

## Deteksi ekspresi protein LC3 dan DDIT pada jaringan otak tikus yang diberikan perlakuan hipoksia hipobarik intermiten

Riska<sup>1</sup> , Ninik Mudjihartini<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Pogram Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

\*Corresponding author: Jl. Salemba Raya N0.6. E-mail: [ninikbiokim@gmail.com](mailto:ninikbiokim@gmail.com)

**Latar belakang:** Otak merupakan organ yang menggunakan oksigen paling besar pada tubuh. Kondisi hipoksia pada otak dapat menyebabkan berbagai kerusakan sampai menginduksi terjadinya kematian sel yang tidak dapat digantikan pada otak dewasa. Pemberian pajanan hipoksia hipobarik intermiten mampu memberikan efek perlindungan pada jaringan yang dilakukan melalui berbagai mekanisme seluler. *Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha* (LC3) dan *DNA Damage Inducible Transcript 3* (DDIT3) merupakan protein yang berperan dalam proses autofagi yang mendukung ketahanan seluler.

**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ekspresi protein LC3 dan DDIT3 pada jaringan otak tikus yang diberikan perlakuan hipoksia hipobarik intermiten.

**Metode:** Dua puluh lima tikus Wistar dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol yang tidak diberikan pajanan *hypobaric chamber* dan 4 Kelompok hipoksia yang secara berturut-turut diberikan pajanan *hypobaric chamber* sebanyak 1 kali, 2 kali, 3 kali dan 4 kali dengan interval setiap perlakuan selama 7 hari. Setelah perlakuan tikus dikorbankan dan diambil otaknya. Ekspresi protein LC3 dan DDIT3 dibuktikan dengan metode *Western blot*.

**Hasil:** Pada semua kelompok perlakuan, protein LC3 terdeteksi pada berat molekul 15 kDa dan DDIT3 pada berat molekul 19 kDa.

**Simpulan:** Kelompok kontrol maupun kelompok hipoksia menunjukkan adanya ekspresi protein LC3 dan DDIT3 pada jaringan otak tikus.

**Kata kunci:** DDIT3, Hipoksia Hipobarik Intermiten, LC3

## Deteksi Ekspresi Protein DDIT3 Pada Jaringan Otak Tikus yang diberikan Perlakuan Hipoksia Hipobarik Intermiten

Riska<sup>1</sup>, Ninik Mudjihartini<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup> Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

\*Corresponding author: [ninikbiokim@gmail.com](mailto:ninikbiokim@gmail.com)

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Otak merupakan organ yang menggunakan oksigen paling besar pada tubuh. Kondisi hipoksia pada otak dapat menyebabkan berbagai kerusakan sampai menginduksi terjadinya kematian sel yang tidak dapat digantikan pada otak dewasa. Pemberian pajanan hipoksia hipobarik intermiten mampu memberikan efek perlindungan pada jaringan yang dilakukan melalui berbagai mekanisme seluler. *DNA Damage Inducible Transcript 3* (DDIT3) merupakan salah satu protein yang berperan dalam proses apoptosis dan autofagi pada sel.

**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ekspresi protein DDIT3 pada jaringan otak tikus yang diberikan perlakuan hipoksia hipobarik intermiten.

**Metode:** Dua puluh lima tikus *Sprague dawley* dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol yang tidak diberikan pajanan *hypobaric chamber* dan 4 kelompok hipoksia yang secara berturut-turut diberikan pajanan *hypobaric chamber* sebanyak 1 kali, 2 kali, 3 kali dan 4 kali dengan interval setiap perlakuan selama 7 hari. Setelah perlakuan tikus dikorbankan dan diambil otaknya. Ekspresi protein DDIT3 dibuktikan dengan metode *Western blot*.

**Hasil:** Pada semua kelompok perlakuan, protein DDIT3 terekspresi dengan berat molekul sekitar 19 kDa.

**Kesimpulan:** Kelompok kontrol maupun kelompok hipoksia menunjukkan adanya ekspresi protein DDIT3 pada jaringan otak tikus.

**Kata kunci:** *DDIT3, Hipoksia Hipobarik Intermiten*

## Latar Belakang

Otak menggunakan 25% total oksigen tubuh dimana persentase ini merupakan persentase kebutuhan oksigen tertinggi jika dibandingkan dengan organ lainnya.<sup>1</sup> Ketersediaan oksigen di otak sangat berpengaruh pada aktivitas metabolik jaringan saraf. Rendahnya tekanan oksigen pada otak dapat memicu kerusakan pada sel otak dan menyebabkan kematian sel. Kondisi saat terjadi penurunan kadar oksigen pada jaringan atau sel dikenal dengan istilah hipoksia.<sup>2</sup> Hipoksia pada otak dapat memicu terjadinya kematian sel yang berbahaya karena kematian yang terjadi pada jaringan otak dewasa sudah tidak dapat digantikan. Hal ini terjadi karena sistem saraf pusat manusia dewasa sudah mencapai tahapan diferensiasi terminal.<sup>3</sup> Salah satu aktivitas yang dapat menyebabkan seseorang mengalami kondisi hipoksia adalah aktivitas penerbangan. Perkembangan teknologi penerbangan memungkinkan manusia terbang dan mencapai ketinggian tertentu dalam waktu yang relatif singkat. Perbedaan tekanan udara dan ketinggian pada aktivitas penerbangan ini akan memicu terjadinya hipoksia yang disebut dengan hipoksia hipobarik. Hipoksia hipobarik merupakan suatu kondisi dimana ketersediaan oksigen tidak mencukupi akibat adanya penurunan tekanan parsial oksigen atmosfer ( $PO_2$ ) yang disebabkan oleh perbedaan ketinggian.<sup>4</sup> Kondisi hipoksia yang berlebih dapat menimbulkan efek negatif pada tubuh, tetapi paparan terhadap hipoksia dengan kadar dan waktu tertentu yang dapat ditoleransi oleh tubuh akan memicu respons adaptasi berupa respons perlindungan.<sup>5</sup> Paparan terhadap kondisi hipoksia dengan kadar dan waktu tertentu dikenal dengan istilah *hypoxia preconditioning* dimana salah satu jenis hipoksia ini adalah hipoksia hipobarik intermiten. Sel akan melakukan berbagai macam mekanisme perlindungan diri dimana salah satu respons yang dilakukan oleh sel otak adalah mekanisme pertahanan sel melalui autofagi dan penurunan aktivitas apoptosis sel. Autofagi merupakan suatu mekanisme degradasi lisosomal dan daur ulang komponen seluler pada sel sedangkan apoptosis merupakan program kematian sel.<sup>6</sup> Pada penelitian ini akan dilakukan deteksi ekspresi protein *DNA Damage Inducible Transcript 3* (DDIT3) dengan metode *western blot*. Protein ini berperan dalam proses autofagi melalui aktivasi jalur *ATG5-dependent pathway* dan apoptosis melalui jalur *mitochondria dependent pathway*.<sup>7,8</sup>

## **Metode**

Pada penelitian ini digunakan 25 tikus *Sparague dawley* jantan yang dibagi kedalam 5 kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol yang tidak diberikan pajanan hipoksia hipobarik intermiten dan empat kelompok lainnya adalah kelompok hipoksia. Kelompok hipoksia 1 diberikan pajanan *hypobaric chamber* sebanyak 1x, kelompok hipoksia 2 diberikan pajanan 2x dengan interval setiap perlakuan selama 7 hari. Kelompok hipoksia 3 dan 4 masing-masing diberikan pajanan sebanyak 3x dan 4x. Pajanan hipoksia hipobarik dilakukan dengan memasukkan kelompok tikus hipoksia kedalam *hypobaric chamber* dan diterbangkan sampai ketinggian 25000 kaki kemudian dibiarkan selama 5 menit pada ketinggian tersebut. Ketinggian kemudian diturunkan secara bertahap sampai pada keadaan normal. Setelah perlakuan tikus dikorbankan dan diambil bagian otaknya.

Deteksi ekspresi protein DDIT3 pada jaringan otak tikus dilakukan dengan metode *western blot*. Homogenasi jaringan otak dilakukan dengan larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7.4. Sebanyak 100 mg jaringan dihomogenasikan dengan 900  $\mu$ l PBS kemudian disentrifugasi 10000 g selama 5 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi akan digunakan sebagai sampel uji. Sebanyak 15  $\mu$ l larutan sampel (13  $\mu$ l sampel dengan 7  $\mu$ l *sample buffer*) dimasukan dalam 13% gel SDS-PAGE dan dilakukan elektroforesis (120 V, 100 menit) kemudian ditransfer pada membran *nitrocelulose*. Membran sebelumnya direndam dalam 5% *skim milk* pada suhu ruang selama 1 jam untuk proses *blocking* kemudian dicuci dengan larutan *Phospat Buffer Saline Tween* (PBST) selama 5 menit. Penambahan antibodi primer dilakukan dengan perbandingan (1:1000) pada suhu 4°C dan diinkubasi selama satu malam, kemudian dicuci dengan PBST selama 5 menit. Inkubasi antibodi sekunder dilakukan pada suhu ruang selama 1 jam dengan perbandingan pengenceran (1:1000), setelah itu dilakukan pencucian kembali dengan PBST selama 5 menit. Visualisasi hasil transfer dilakukan dengan penambahan larutan TMB sebanyak 1 ml pada membran dan dilakukan inkubasi selama 10 menit.

## **Hasil dan Pembahasan**

Ekspresi protein DDIT3 pada jaringan otak tikus dapat dilihat pada Gambar 1. Dari hasil tersebut dapat terlihat bahwa baik pada kelompok kontrol maupun kelompok hipoksia menunjukkan ekspresi protein DDIT3.



Gambar 1. Hasil *western blot* protein DDIT3 pada jaringan otak tikus (HHI: Hipoksia Hipobarik Intermiten)

*DNA Damage Inducible Transcript 3* (DDIT3) merupakan suatu protein yang berperan dalam proses apoptosis dan autofagi pada sel.<sup>8,9</sup> Kondisi kekurangan asam amino, hipoksia dan stres retikulum endoplasma dapat memicu peningkatan ekspresi protein ini.<sup>10</sup> Hasil *western blot* menunjukkan protein DDIT3 memiliki berat molekul sekitar 19 kDa. Pada mekanisme apoptosis DDIT3 berperan sebagai protein *pro-apoptotic* atau protein yang menginduksi terjadinya proses apoptosis. Jalur yang diaktivasi oleh protein ini adalah *mitochondria dependent pathway*.<sup>9</sup> Kondisi hipoksia dapat meningkatkan kadar ROS melalui inhibisi aktivitas kompleks I mitokondria serta dapat memicu terjadinya stres retikulum endoplasma.<sup>11</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Linhao Xu, et al. menunjukkan hasil dimana kondisi kronik intermiten hipoksia memicu terjadinya stres retikulum endoplasma pada bagian hipokampus dan memicu terjadinya apoptosis.<sup>9</sup>

Selain berperan pada apoptosis, protein ini juga berperan dalam mekanisme autofagi yang mendukung ketahanan sel. Protein DDIT3 berperan dalam aktivasi autofagi melalui jalur *ATG5-dependent pathway*.<sup>8</sup> Hasil penelitian menunjukkan pada kondisi hipoksia berat (<0,1% O<sub>2</sub>) dapat menginduksi terjadinya autofagi melalui peningkatan ekspresi ATG5 dan LC3.<sup>12</sup> Hipoksia menyebabkan protein DDIT3 akan meningkatkan konversi protein LC3-I menjadi LC3-II yang merupakan biomarker proses autofagi pada sel.<sup>8</sup> Protein DDIT3 berperan penting dalam proses homeostasis seluler melalui mekanisme apoptosis dan autofagi bergantung pada jalur yang digunakan.

### **Kesimpulan**

Pengujian *western blot* menunjukkan hasil bahwa baik pada kelompok kontrol maupun kelompok hipoksia menunjukkan adanya ekspresi protein DDIT3 pada jaringan otak tikus.

## Daftar Pustaka

1. Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain energy and oxygen metabolism: Emerging role in normal function and disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11. doi:10.3389/fnmol.2018.00216
2. Daskalaki I, Gkikas I, Tavernarakis N. Hypoxia and selective autophagy in cancer development and therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6(SEP). doi:10.3389/fcell.2018.00104
3. Abdissa D. Review Article on adult neurogenesis in humans. *Translational Research in Anatomy.* 2020;20. doi:10.1016/j.tria.2020.100074
4. Shaw DM, Cabre G, Gant N. Hypoxic Hypoxia and Brain Function in Military Aviation: Basic Physiology and Applied Perspectives. *Front Physiol.* 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.665821
5. Feng Y, Bhatt AJ. Corticosteroid responses following hypoxic preconditioning provide neuroprotection against subsequent hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rats. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2015;44. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.04.010
6. Bar-Yosef T, Damri O, Agam G. Dual role of autophagy in diseases of the central nervous system. *Front Cell Neurosci.* 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00196
7. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol.* 2019;10(JAN). doi:10.3389/fimmu.2018.03083
8. Sun L, Liu N, Liu SS, et al. Beclin-1-independent autophagy mediates programmed cancer cell death through interplays with endoplasmic reticulum and/or mitochondria in colbat chloride-induced hypoxia. *Am J Cancer Res.* 2015;5(9).
9. Xu L, Bi Y, Xu Y, et al. Suppression of CHOP Reduces Neuronal Apoptosis and Rescues Cognitive Impairment Induced by Intermittent Hypoxia by Inhibiting Bax and Bak Activation. *Neural Plast.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/4090441
10. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004;18(24). doi:10.1101/gad.1250704
11. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7(9). doi:10.1038/sj.embor.7400779
12. Rouschop KMA, van den Beucken T, Dubois L, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(1). doi:10.1172/JCI40027

Seminar Nasional XXV Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI)  
25-26 Agustus 2022 Ballroom Krakatau Swiss BelHotel Bandar Lampung