DISERTASI

DETEKSI GEN *RESEPTOR TRANSFERRIN* DAN GEN *IRON REGULATED TRANSPORTER* DARI KULTUR SEL OSTEOBLAS TIKUS $7F_2$ PADA KONDISI HIPEROKSIA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS IN VITRO

PRIHARTINI WIDIYANTI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006

DETEKSI GEN *RESEPTOR TRANSFERRIN* DAN GEN *IRON REGULATED TRANSPORTER* DARI KULTUR SEL OSTEOBLAS TIKUS $7F_2$ PADA KONDISI HIPEROKSIA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS IN VITRO

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Kamis
Tanggal : 20 April 2006
Pukul $10.^{00}$ WIB

Oleh :

PRIHARTINI WIDIYANTI
NIM : 090214906 D

HALAMAN PERSETUJUAN

DISERTASI YANG TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 1 MEI 2006

Oleh :

Promotor

Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT (FICS) (K)

NIP 130 325 838

Ko Promotor I

Prof Dr sc med Hartmut Kuehn

Ko Promotor II

Prof Soetjipto, dr, MS, PhD

NIP 130 687 606

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 7 Desember 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof H Kuntoro, dr, MPH, Dr PH

Anggota : 1. Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpOT (K), FICS

2. Prof Hartmut Kuehn, MD, DSc

3. Prof H Soetjipto, dr, MS, PhD

4. Dr Paulus Liben, dr, MS

5. Dr F M Judajana, dr, SpPK (K)

6. Dr Fedik Abdul Rantam, drh

Surat Keputusan

Rektor Universitas Airlangga

Nomor : 9741 /J03/PP/2005

Tanggal 22 Desember 2005

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan segala kerendahan hati penulis memanjatkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT, karena hanya dengan limpahan rahmat dan karuniaNya, penulisan disertasi ini dapat penulis selesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT (K), FICS selaku promotor atas segala arahan, saran, perhatian dan dukungannya selama ini. Kesediaan beliau menyediakan waktu sebagai teman diskusi penulis sangat besar artinya.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis tujukan kepada :

Prof Hartmut Kuhn, MD, DSc selaku ko-promotor satu dari *Institute fur Biochemie Charite Universitatsklinikum Humboldt Universitat* Berlin Jerman atas arahan, masukan, dan bimbingannya selama saya melakukan penelitian di Jerman. Terima kasih pula untuk persahabatan dan segala bantuan yang telah dicurahkan untuk terwujudnya penelitian ini.

Prof H Soetjipto, dr, MS, PhD selaku ko-promotor dua yang telah membimbing dan memberikan saran yang sangat bermanfaat bagi penulis.

Prof Dr Med Puruhito, dr, SpBTKV (K) selaku Rektor Universitas Airlangga, atas ijin untuk mengikuti program doktor.

Prof Dr H Muh Amin, dr, SpP (K) selaku Direktur Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan untuk mengikuti pendidikan program doktor.

Prof Dr Mardojo Rukmo, drg, MSc, SpKG (K) selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga atas arahannya.

Prof H Kuntoro, dr, MPH, Dr PH selaku konsultan metodologi penelitian dan statistik atas bimbingan dan dukungannya.

Guru TK dan SD Bhayangkari I Surabaya, Guru SMPN 1 Surabaya, Guru SMAN 9 Surabaya, Dosen di Fakultas Kedokteran Gigi, Dosen Program Pascasarjana Program Studi Magister Ilmu Kedokteran Dasar Minat Studi Kedokteran Hiperbarik dan Dosen Program Doktor Pascasarjana Program Studi Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, terima kasih tak terhingga atas bimbingannya selama ini.

Kolonel Chairuddin Yunus, dr, M.Kes selaku mantan Kepala Lembaga Kesehatan Kelautan TNI-AL (LAKESLA) Surabaya atas bantuannya.

Semua sahabat saya di laboratorium Biokimia Charite Humboldt Berlin Jerman Pavlos Chaitidis, Dr Kristin Schwarz, Dr Astrid Borchert, Dr Mathias Walter, Dr Rainer Weisner, Dr Rathmann Jorg, Dr Ralf-Jurgen Kuban, Dr Jutta Belkner, Christopher Ufer, Igor, Frau Monika Anton, Frau Heike Schiebel yang telah dengan sangat ramah membantu saya dalam penelitian ini.

Seluruh teman di Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga angkatan tahun 2002/2003 yang saling memberikan motivasi.

Ayahanda H Sarwono Basuki dan ibunda tercinta, Hj Suriningsih atas segala cinta kasih, dukungan dan doanya yang tak henti-hentinya kepada penulis.

Papa mertua Laksamana Pertama (Purn) H Subagyo, dr, SpB, SpOT, FICS dan mama mertua atas dorongan, semangat dan doa yang tak putus-putusnya kepada penulis.

Suami tercinta, H Herry Wibowo, dr, M.Kes yang telah dengan sabar dan penuh pengertian mendampingi secara moril, memberikan segala dukungan, doa dan cintanya yang mampu menguatkan saya.

Ananda Tersayang, *my-life time energy*, Tarissa Diandra Putri Wibowo, sebagai semangat dan cahaya hidup saya yang telah menerima dengan penuh pengertian kesibukan saya dan ketidakhadiran saya dalam hari-harinya demi pelaksanaan studi saya.

Adik kandung saya, saudara ipar saya dan saudara saya yang lain atas doanya.

Terima kasih pula kepada Pemerintah Jerman melalui DAAD (*Deutscher Akademischer Austausch Dienst*) yang telah memberikan beasiswa untuk melaksanakan penelitian di *Institut of Biochemistry, Charite University of Clinics, Humboldt University, Berlin, Germany*.

Dan akhirnya, kepada pihak manapun yang membantu dalam studi penulis, namun karena kekhilafan tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis ucapkan terima kasih yang tak terhingga.

Akhir kata, saran dan masukan untuk melengkapi disertasi ini, sangat penulis harapkan dan semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua pihak.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada kita semua. Amin.

RINGKASAN

Deteksi Gen Reseptor Transferrin dan Gen *Iron regulated transporter* dari Kultur Sel Osteoblas Tikus $7F_2$ pada kondisi Hiperoksia

Prihartini Widiyanti

Fe penting bagi pertumbuhan sel dan proliferasi sel. Namun mekanismenya belumlah jelas. Penelitian ini memberikan gambaran profil "ekspresi gen" *transferrin receptor* dan *iron regulated transporter* dari kultur sel osteoblas tikus ($7F_2$) pada kondisi normoksia dan hiperoksia dalam rangka mengungkapkan mekanisme pengaruh oksigen dalam ekspresi gen osteoblas dan percepatan aktivitas osteoblas.

Tujuan penelitian selain membuktikan adanya perbedaan tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dan beberapa gen lain dari *mouse osteoblast cell line* 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam (dengan tehnologi *microarray*, RT-PCR semi kuantitatif dan *Real Time*-PCR) dan juga membuktikan efek hiperoksia pada proliferasi sel 7F2.

Penelitian eksperimental laboratoris ini menggunakan kultur sel osteoblas $7F_2$ yang dipapar kondisi normoksia 24 jam ($20\%O_2$), hiperoksia 24 jam ($95\%O_2$) dan hiperoksia 48 jam ($95\%O_2$). Penelitian ini dilakukan melalui serangkaian proses yaitu penyiapan kultur, pemberian paparan normoksia dan hiperoksia dalam inkubator, isolasi RNA total, pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk menghasilkan cDNA (*complementary Deoxyribonucleic Acid*), pemeriksaan dengan menggunakan tehnologi cDNA *microarray* untuk melihat densitas *spot* yang mewakili kadar ekspresi gen dari gen osteoblas, pendeteksian pemunculan pita gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dengan metode *Reverse Transcriptase* – PCR semi kuantitatif dan

pemeriksaan kuantifikasi kadar ekspresi gen dengan *Real Time* - PCR. Pada pemeriksaan dengan *microarray*, dibuktikan adanya regulasi naik (*upregulation*) pada gen Fe yaitu gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* pada kondisi hiperoksia. Reseptor transferrin mengalami regulasi naik 3,73 kali (483 unit fluoresensi relatif pada normoksia 24 jam menjadi 1802 unit fluoresensi relatif pada hiperoksia 24 jam). Sedangkan gen *iron regulated transporter* mengalami regulasi naik 2,55-kali (762 unit Fluoresensi relative pada hiperoksia 24 jam menjadi 1592 unit fluoresensi relative pada 48 jam hiperoksia). Metode RT-PCR semi kuantitatif mendeteksi pemunculan pita dari kedua gen tersebut di atas pada gel elektroforesis sesuai dengan panjang basa yang diamplifikasinya. Gen reseptor transferrin (CD71) mempunyai panjang basa yang diamplifikasi 629 *basepairs* dan *iron regulated transporter* (Slc40A1) dengan panjang basa yang diamplifikasi 529 *basepairs*. Pemeriksaan *DNA sequencing* pada kedua gen tersebut juga telah dilakukan untuk membuktikan bahwa produk PCR bukanlah kontaminan. Pada pemeriksaan *Real Time* - PCR, pada kondisi normoksia tampak 3884 kopi reseptor transferrin mRNA/10^6 kopi mRNA GAPDH. Setelah 24 jam hiperoksia dijumpai 8325 kopi mRNA reseptor transferrin/10^6 mRNA GAPDH kopi (2,2 kali regulasi naik). Setelah 48 jam hiperoksia, 8079 kopi mRNA reseptor transferrin/10^6 kopi mRNA GAPDH (2.0 kali regulasi naik). Pada pemeriksaan *Real Time* - PCR, pada kondisi normoksia tampak 359 kopi gen *iron regulated transporter* mRNA/10^6 kopi mRNA GAPDH. Setelah 24 jam hiperoksia dijumpai 555 kopi mRNA *iron regulated transporter* setiap 10^6 mRNA GAPDH kopi (1,6 kali regulasi naik). Setelah 48 jam hiperoksia, peningkatan signifikan kadar ekspresi mRNA *iron regulated transporter* sebesar 1655 kopi mRNA /10^6 kopi mRNA GAPDH (4.6 kali regulasi naik). Selain pendeteksian ekspresi gen reseptor transferrin dengan *iron regulated transporter* dengan metode *microarray*, RT -

PCR semi kuantitatif dan *Real Time* - PCR, juga dilakukan penelitian mengenai proliferasi sel osteoblas dengan mengamati jumlah sel, konsentrasi protein dan konsentrasi DNA pada kondisi normoksia dan hiperoksia. Pada tiap titik satuan waktu didapati penurunan pada ketiga parameter diatas antara kondisi normoksia dan hiperoksia.

Penelitian ini menyediakan data dasar yang komprehensif mengenai 22690 ekspresi gen osteoblas (unit fluoresensi relatif) pada kondisi normoksia dan hiperoksia yang belum pernah dilakukan sebelumnya dan hingga saat ini belum jelas. Penelitian ini membuktikan bahwa paparan hiperoksia dalam jangka waktu lama (24 jam dan 48 jam secara terus menerus) mungkin dapat menyebabkan penghambatan proliferasi sel (*in vitro*). Pengetahuan ini dapat digunakan sebagai dasar penentuan dosis (waktu dan konsentrasi) terapi hiperoksia hiperbarik pada manajemen patah tulang khususnya dalam peningkatan aktivitas osteoblas melalui peningkatan ekspresi gennya. Informasi ini juga akan berguna sebagai *starting point* penelitian selanjutnya mengenai perubahan fungsi biologis sebagai konsekwensi perubahan ekspresi gen dan mekanisme yang mendasarinya.

SUMMARY

Detection of transferrin receptor gene and iron regulated transporter gene of mouse osteoblast cell culture $7F_2$ under hyperoxia condition

Prihartini Widiyanti

Iron is important for cell growth and cell proliferation. But the mechanism is still unclear.This research described gene expression profile of transferrin receptor gene and iron regulated transporter gene of mouse osteoblast cell culture ($7F_2$) under normoxia and hyperoxia. It is for knowing the mechanism of oxygen in osteoblast gene expression and the acceleration of osteoblast activity.

This research aim are to prove the differences of expression level of transferrin receptor gene and iron regulated transporter and some other genes of mouse osteoblast cell line 7F2 under 24 hours normoxia, 24 hours hyperoxia and 48 hours hyperoxia (using microarray, semi quantitative RT-PCR and Real Time-PCR technologies) and to prove the effect of hyperoxia to 7F2 cell proliferation.

This laboratory experimental research using osteoblast cell culture $7F_2$ exposured by normoxia 24 hours, hyperoxia 24 hours and hyperoxia 48 hours. This research is performed including the series of process which are culture preparation, normoxia and hyperoxia exposure in incubator, total RNA isolation, Polymerase Chain Reaction (PCR) method to yield cDNA (complementary Deoxyribonucleic Acid), cDNA microarray technology to observe spot densities which represented gene expression level of osteoblast genes, detection of transferrin receptor and iron regulated gene 's band appearance using semi quantitative Reverse Transcriptase – PCR method and Real Time –PCR to quantified gene expression level. Using microarray, there was upregulation of

iron genes which are transferrin receptor and iron regulated transporter gene under hyperoxia. Transferrin reseptor is upregulated 3.73 fold (483 relative fluorescent unit under 24 hours normoxia becomes 1802 relative fluorescent unit under 24 hours hyperoxia). Iron regulated transporter is upregulated 2.55- fold (762 relative fluorescent unit under 24 hours hyperoxia becomes 1592 relative fluorescent unit under 48 hours hyperoxia). Semi quantitative RT-PCR is detected band appearance of both two genes above in the electrophoresis gel based on the length of base amplification. The length of base amplification of transferrin receptor gene (CD71) is 629 basepairs and for iron regulated transporter (Slc40A1) is 529 basepairs. DNA sequencing method is performed on the two genes to prove that the PCR product is not contaminant. Using Real Time-PCR, under normoxia condition, it seem 3884 kopi mRNA transferrin receptor/10^6 copies mRNA of GAPDH. After 24 hours hyperoxia 8325 copies mRNA transferrin receptor/ 10^6 mRNA of GAPDH copies (upregulated 2,2 fold). After 48 hours hyperoxia, 8079 copies mRNA transferring receptor/10^6 kopi mRNA GAPDH (upregulated 2.0 fold). Using Real Time-PCR, under normoxia condition, it is found 359 copies mRNA iron regulated transporter/10^6 copies mRNA of GAPDH. After 24 hours hyperoxia, it seem 555 copies kopi mRNA iron regulated transporter/10^6 mRNA GAPDH copies (upregulated 1,6 fold). After 48 hours hyperoxia, there is significant increase of expression's level of mRNA of iron regulated transporter 1655 copies mRNA/10^6 copies mRNA of GAPDH (upregulated 4.6 fold). This research also performed the experiment about osteoblast cell proliferation by observing cell number, protein concentration and DNA concentration under normoxia and hyperoxia conditions. In each time point has been found the declination in the three parameters above between normoxia and hyperoxia conditions.

This research is provided comprehensive database of 22690 osteoblast gene expression (relative fluorescence units) under normoxia and hyperoxia. Such experiments have never been carried out before and up till now it was unclear. This research is to prove that long term hyperoxia exposures (24 hours and 48 hours simultaneously) might cause inhibition of cell proliferation. This knowledge could be used as basic dose determination (time and concentration) of hyperoxia hyperbaric therapy in fracture management especially in increasing the osteoblast activities through the inclination of gene expressions. This information is beneficial as starting point of further research about biological function as the consequencies of gene expression alterations and the underlying mechanisms.

ABSTRACT

Detection of transferrin receptor gene and iron regulated transporter gene of mouse osteoblast cell culture $7F_2$ under hyperoxia condition

Prihartini Widiyanti

The aims of this study were to prove level of expression of transferrin receptor gene and iron regulated transporter gene under hyperoxia condition. It had been proved that under hyperoxia condition, the expression level of two genes above are upregulated (through microarray's observation). This fact was supported by the results of semi quantitative RT – PCR method by the appearance of target bands (based on the base pairs) in gel electrophoresis. This research was performed also the Real Time –PCR method in the target genes. Mouse osteoblast cell-line (7F2) from American Tissue Cell Culture were plated into 3 dishes into control group and treatment groups incubated under 37°C and 5% CO_2 until 80 % confluence in osteoblast growth medium. The treatment group were exposured by hyperoxia condition (100% O_2) 24 hours and 48 hours. After subculture process and total RNA isolation, the RT-PCR was performed to produce cDNA. Then the microarray and semi quantitative PCR were performed followed by Real Time-PCR. The experiment of cell proliferation was performed also in this research by observing cell number, protein and DNA concentration under normoxia and hyperoxia. The results showed that hyperoxia (high concentration of O_2) was inhibit cell proliferation. The expression of transferrin receptor gene and iron regulated transporter were upregulated under hyperoxia. It can be concluded that hyperoxia might have effect on upregulating the expression of some osteoblast genes which might have an impact in osteoblast activity. It should, been stressed that changes in the gene expression pattern do never prove functional alterations and the alterations in mRNA concentrations

will never predict variations of the corresponding proteins.. To get such information targeted functional assays must be carried out. Further studies need to be performed to find the underlying mechanism of the hyperoxia's effect to the osteoblast expression genes related to osteoblast activities.

Key words : Osteoblast, transferrin receptor gene, iron regulated transporter gene, gene, hyperoxia

DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Dalam.....ii

Prasyarat gelar.....iii

Halaman Persetujuan.....iv

Penetapan Panitia Penguji.....v

Ucapan terima kasih.....vi

Ringkasan.....ix

Summary.....xii

Abstract.....xv

DAFTAR ISI.....xvii

DAFTAR TABEL.....xxii

DAFTAR GAMBAR.....xxiii

DAFTAR LAMPIRAN.....xxvi

DAFTAR SINGKATAN.....xxvii

BAB 1 PENDAHULUAN.....1

1.1 Latar Belakang.....1

1.2 Rumusan Masalah.....7

1.3 Tujuan Penelitian.....7

1.3.1 Tujuan Umum.....7

1.3.2 Tujuan Khusus.....7

1.4 Manfaat Penelitian.....8

1.4.1 Manfaat Teoritik.....8

1.4.2 Manfaat Praktis.....8

Halaman

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 9

2.1 Peran metabolik Fe.....9

2.2 Oksigen.....12

2.2.1 Senyawa oksigen reaktif (SOR).....13

2.2.1.1 Definisi.....13

2.2.1.2 Jenis senyawa oksigen reaktif (SOR).....13

2.2.1.3 Pembentukan senyawa oksigen reaktif (SOR).....13

2.2.1.4 Dampak SOR terhadap membran sel.....17

2.2.1.5 Dampak SOR terhadap DNA.....18

2.2.1.6 Dampak SOR terhadap protein.....19

2.3 Nitric Oxide (NO•).....21

2.3.1 Dasar kimia.....21

2.3.2 Aksi fisiologis.....22

2.3.3 Sintesis NO•.....23

2.3.4 Radikal bebas NO•.....24

2.4 Pengaruh Hiperoksia Terhadap Timbulnya Radikal Bebas Oksigen.....27

2.5 7F2 *Osteoblast Mouse Cell Lines*.....28

2.6 Ekspresi Gen.....29

2.6.1 Ekspresi gen osteoblas dalam kondisi hiperoksia.....31

2.6.1.1 Gen reseptor transferrin (TfR).....32

2.6.1.2 Gen *iron regulated transporter* (IRT).....33

2.6.1.3 Gen *growth arrest DNA damage alpha* (Gadd45a).....33

Halaman

2.6.1.4 Gen *cyclooxigenase* (COX-2).....35

2.6.1.5 Gen *small inducible cytokine* (Scy A7).....35

2.6.1.6 Gen *serine protease inhibitor* (Spi11).....36

2.6.1.7 Gen *coil coiled forming protein* (Cc1).....36

2.7 Pengaruh Hiperoksia Terhadap Proliferasi Sel.....37

2.8 Struktur Tulang.....37

2.9 Sel Tulang.....39

2.10 Matriks Tulang.....46

2.11 Proses Penyembuhan Patah Tulang.....51

2.12 Teknologi cDNA *Microarray* Dan Analisis *Gene Chips*.....55

2.13 *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).....60

2.14 Primer *Polymerase Chain Reaction* (PCR).....61

2.15 *Real Time – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).....62

2.16 *DNA Sequencing*.....63

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....65

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....67

4.1 Jenis Penelitian.....67

4.2 Variabel Penelitian.....67

4.3 Definisi Operasional Variabel.....67

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian.....68

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....72

4.5.1 Lokasi penelitian.....72

Halaman

4.5.2 Waktu penelitian.....72

4.6 Prosedur Penelitian.....73

4.7 Analisis Data.....75

4.8 Skema Prosedur Penelitian.....76

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN.....78

5.1 Kultur Sel.....78

5.2 Kurva Pertumbuhan sel 7F2 pada kondisi normoksia & hiperoksia..78

5.2.1 Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan.....80

5.3 Hibridisasi *Microarray*.....84

5.3.1 Evaluasi kualitatif data *microarray*.....84

5.3.2 Evaluasi statistik eksperimen *microarray*.....86

5.4 Pengaturan Ekspresi Gen Khusus.....90

5.4.1 Hibridisasi *Microarray*.....90

5.4.1.1 Enzim dan protein *anti-oxidative defense cascade*.....94

5.4.1.2 Enzim yang terlibat dalam metabolisme Fe (*iron*).....96

5.4.2 Reverse Transcriptase (RT- PCR).....97

5.4.2.1 RT- PCR semi kuantitatif.....97

5.4.2.1.1 Gen yang berkaitan dengan Fe (Iron).....97

5.4.2.1.2 Gen GADD45a dan gen COX2.....98

5.4.2.1.3 Gen ScyA7, gen Spi11 dan gen Ccl.....98

5.4.2.2 *Real Time* PCR (RT-PCR).....99

5.5 DNA Sequencing.....102

Halaman

5.5.1 Gen reseptor transferrin (CD71)..... 102

5.5.2 Gen *iron regulated transporter* (Slc40A1).....104

BAB 6 PEMBAHASAN.....106

6.1 Penghambatan Proliferasi Sel Oleh Hiperoksia.....106

6.2 Kadar Ekspresi (*Level Of Expression*) Gen Reseptor Transferrin Dan Gen *Iron Regulated Transporter* Dan Hubungannya Dengan Aktifitas Osteoblas.....113

6.3 Ekspresi Gen Lain *Mouse Osteoblast Cell-lines* 7F2 Pada Kondisi Hiperoksia.....117

BAB 7 PENUTUP.....123

7.1 Kesimpulan.....123

7.2 Saran.....123

DAFTAR PUSTAKA 124

Lampiran.....140

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 : Mekanisme Fe pada metabolisme sel.....11

Tabel 2.2 : Efek pengaturan positif dan negatif pada ekspresi gen.....29

Tabel 5.1 : Statistik deskriptif pertumbuhan sel pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....80

Tabel 5.2 : Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan sel (log 10 jumlah sel).....80

Tabel 5.3 : Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan sel (log 10 konsentrasi protein).....82

Tabel 5.4 : Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan sel (log 10 konsentrasi DNA).....83

Tabel 5.5 : Evaluasi statistik eksperimen *microarray*.....87

Tabel 5.6 : Perbandingan gen yang teregulasi naik pada kondisi normoksia dan hiperoksia 24 jam.....88

Tabel 5.7 : Perbandingan gen yang teregulasi turun pada kondisi normoksia dan hiperoksia 24 jam.....89

Tabel 5.8 : Gen yang teregulasi naik pada kondisi hiperoksia (24 jam vs 48 jam).....89

Tabel 5.9 : Gen yang teregulasi turun pada kondisi hiperoksia (24 jam vs 48 jam).....90

Tabel 5.10: Gen yang paling teregulasi naik selama hiperoksia.....91

Tabel 5.11: Gen yang paling teregulasi turun selama hiperoksia.....93

Tabel 5.12 : Gen yang terlibat dalam metabolisme Fe (*iron*).....96

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Sintesis dan metabolisme NO•.....24

Gambar 2.2 Beberapa nitrosothiols.....26

Gambar 2.3 Representasi diagram respon laju ekspresi gen terhadap sinyal pengaturan spesifik.....30

Gambar 2.4 Skematis struktur tulang dan sel yang berperan dalam regenerasi tulang.....39

Gambar 2.5 Alur sel progenitor tulang yang mengalami diferensiasi dari sel stem mesenkim menjadi osteoblas dan osteosit.....40

Gambar 2.6 Diferensiasi osteoblas.....43

Gambar 2.7 Pengaruh gen terhadap proliferasi dan diferensiasi pada kultur osteoblas.....45

Gambar 2.8 Skematis fase *bone healing*.....51

Gambar 2.9 Skema penyembuhan patah tulang.....55

Gambar 2.10 Proses DNA Sequencing.....64

Gambar 5.1 Gambaran mikroskopik kultur sel 7F2.....78

Gambar 5.2 Kinetik pertumbuhan sel 7F2 di bawah kondisi normoksia dan hiperoksia.....79

Gambar 5.3 Kinetik jumlah sel yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....81

Halaman

Gambar 5.4 Kinetik konsentrasi protein yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....82

Gambar 5.5 Kinetik konsentrasi DNA yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....84

Gambar 5.6 Pola fluoresensi yang didapat oleh hibridisasi *microarray*.....85

Gambar 5.7 Induksi kinetik gen yang terekspresi pada kondisi hiperoksia.....92

Gambar 5.8 Ekspresi pengaturan *isoform gluthathione peroxidase* antioksidatif selama hiperoksia.....94

Gambar 5.9 Ekspresi pengaturan *thioredoxin-related proteins* selama hiperoksia.....95

Gambar 5.10 Ekspresi pengaturan katalase selama hiperoksia.....95

Gambar 5.11 RT- PCR semikuantitatif reseptor transferrin dan *iron regulated transporter* yang terekspresi pada sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....97

Gambar 5.12 RT- PCR semikuantitatif dari Gadd45a dan COX2 sel 7F2 pada Kondisi normoksia dan hiperoksia.....98

Gambar 5.13 RT- PCR semikuantitatif dari ScyA7, Spi11 dan Ccl sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia.....99

Gambar 5.14 Perbandingan *Microarray* dan *Real Time PCR* untuk gen reseptor transferrin.....100

Gambar 5.15 Perbandingan *Microarray* dan *Real Time PCR* untuk gen *iron regulated transporter*.....100

Halaman

Gambar 5.16 RT-PCR *Real Time* PCR gen yang paling teregulasi naik dengan fungsi yang diketahui 102

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1 Uji normalitas.....140

Lampiran 2 Tahap penelitian.....145

Lampiran 3 Foto alat penelitian.....160

Lampiran 4 *Sequencing results*.....161

Lampiran 5 Surat penerimaan riset di Charite.....168

Lampiran 6 Surat kesediaan menjadi Ko-Promotor-1.....169

DAFTAR SINGKATAN

A	= Adenine
ADP	= Adenosine Diphosphate
ALP	= Alkaline Phospatase
ATA	= Atmosphere Absolute
ATCC	= America Tissue Cell Culture
ATP	= Adenosine Triphosphate
BMP	= Bone Morphogenetic Protein
BSA	= Bovine Serum Albumin
β- ME	= β- Mercaptoetanol
C	= Cytosine
cGMP	= cyclic Guanosine Monophosphate
CSF	= Colony Stimulating Factor
C_2H_6	= etana
C_5H_{12}	= pentana
3Ca3(PO4)2.Ca(OH)2	= Kristal hidroksiapatit
ddNTP	= Dideoxynucleoside Triphosphate
ddCTP	= Dideoxy Cytidine Triphosphate
ddGTP	= Dideoxy Guanosine Triphosphate
ddATP	= Dideoxy Adenosin Triphosphate
ddTTP	= Dideoxy Thymidine Triphosphate
DMSO	= Dimethyl Sulfoxide
DNA	= Deoxyribonucleic Acid
dNTP	= Deoxynucleoside Triphosphate
dCTP	= Deoxy Cytidine Triphosphate
dGTP	= Deoxy Guanosine Triphosphate
dATP	= Deoxy Adenosine Triphosphate
dTTP	= Deoxy Thymidine Triphosphate
DP	= Decision Point
FGF	= Fibroblast Growth Factor
G	= Guanine
GF-β	= Transforming Growth Factor - β
Gpx	= glutathione peroxidase
HbFe(III)	= Methaemoglobin
H_2O_2	= Hidrogen Peroksida
HOCl	= asam hipoklorit
HSC	= Haematopoeitic Stem Cells
IGF- I	= Insulin-like Growth Factor -I
INF-γ	= Interferon- γ
iNOS	= inducible Nitric Oxide Synthase
IRP	= Iron Regulated Protein
IRE	= Iron Responsive Element

IREBP	= Iron Response Element Binding Protein
IRF	= Iron Regulatory Factor
IRT	= Iron Regulated Transporter
LO•	= Radikal Alkoksi
MEM	= Minimal Essential Medium
MGP	= Matrix Glutamic Acid
mRNA	= messenger Ribo Nucleic Acid
MSC	= Mesenchymal Stem Cells
NADP	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO•	= Nitric Oxide
NOS	= Nitric Oxyde Synthase
OAF	= Osteoclast Activating Factor
$ONOO^-$	= peroksinitrite
•OH	= radikal hidroksil
•OOH	= radikal peroksil
$O_2^{\cdot-}$	= Superoksida
O_3	= Ozon
$^1O_2$	= Singlet oksigen
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	= Platelet Derived Growth Factor
PDF	= Platelet Derived Factor
PCR	= Polymerase Chain Reaction
PTH	= Parathyroid Hormone
ROS	= Reactive Oxygen Species
RNA	= Ribonucleic Acid
RNS	= Reactive Nitrogen Species
RT -PCR	= Reverse Transcriptase –Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Real Time –Polymerase Chain Reaction
SOR	= Senyawa Oksigen Reaktif
-SH	= Gugus Thiol
T	= Thymine
Timm	= translocase of inner mitochondrial membrane
TNF-α/β	= Tumor Necrosis Factor- α/β
TfR	= Transferrin Receptor
TR	= thioredoxine
Tyr $O^•$	= Radikal tirosil
XO	= Xanthine Oxydase
XD	= Xanthine Dehydrogenase

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoblas yang merupakan sel mesenkim adalah sel yang aktif membentuk jaringan tulang baru (*bone formation)* dan berfungsi mensintesis, mensekresi matriks organik tulang dan mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi (Hall, 1990). Osteoblas dijumpai pada daerah pembentukan tulang, pada saat remodeling dan penyembuhan patah tulang. Osteoblas aktif membentuk jaringan tulang baru dengan mensekresi osteoid dan *alkaline phosphatase* (Bortell *et al*, 1990; Stein *et al*, 1989).

Iron (Fe) memegang peran penting dalam metabolisme semua sel, terutama pada proses fisiologis sel, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi, apoptosis, transfer elektron, transport oksigen dan detoksifikasi (Lieu *et al*, 2001). Fe mempunyai pengaruh yang cukup besar pada replikasi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), patogenitas bakteri, fotosintesis, stress oksidatif dan proliferasi sel (Thomson *et al*, 1999). Kekurangan Fe mempengaruhi proliferasi, hal ini disebabkan karena Fe dibutuhkan oleh ribonukleotida reduktase dan enzim lain yang terlibat dalam pembelahan sel (Hoffbrand *et al*, 1976). Peran utama Fe dalam proliferasi sel dilakukan oleh "chelator" yang mampu melintasi membran plasma, mengikat metal di dalam sel dan membatasi bioavailabilitasnya (Reddel *et al*, 1985). Pengambilan Fe seluler dari transferrin melibatkan ikatan transferrin dengan reseptor transferrin, internalisasi kompleks reseptor transferrin-transferrin *via*

endositosis dan pelepasan Fe dari protein disertai penurunan pH endosomal (Baker dan Morgan, 1994; Richardson dan Ponka, 1997).

Kekurangan oksigen merupakan faktor penyebab melambatnya penyembuhan patah tulang. Pada beberapa jurnal disebutkan oksigen cukup berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tulang yang juga berpengaruh terhadap percepatan penyembuhan patah tulang. Penelitian Gray dan Hamblen, 1975 menggunakan calvaria dari tikus berumur 6 hari yang diinkubasikan dalam ruang hiperbarik dengan udara dan 5% CO_2, 95% O_2 dan 5% CO_2, 98% O_2 dan 2% CO_2 pada tekanan 2 ATA (*Atmosphere Absolute*) pada suhu 37,5° selama 48 jam. Peneliti melaporkan adanya penurunan jumlah osteoklas pada kondisi hiperoksia. Kesimpulan yang diperoleh adalah hiperoksia meningkatkan *turnover* komponen matriks tulang yang memberikan efek percepatan pertumbuhan tulang. Meskipun kondisi hiperoksia disebutkan dalam beberapa penelitian dapat meningkatkan aktivitas osteoblas sebagai sel pembentuk tulang, namun sampai saat ini tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dari *mouse osteoblas cell-line* 7F2 sebagai gen yang mungkin berperan dalam proliferasi sel di bawah kondisi hiperoksia belum diketahui. Literatur yang mengungkap karakterisasi menyeluruh dari pola ekspresi gen dan efek hiperoksia pada kultur sel osteoblas belum ada.

Transferrin adalah glikoprotein 80 kDa yang mengikat Fe dalam darah dan bermigrasi dalam serum elektroforesis pada fraksi ß-globulin serta mampu mengikat 2 ion ferri (Fe^{3-}) dengan afinitas tinggi. Transferrin merupakan komponen penting dari semua media kultur bebas serum dan sangat dibutuhkan bagi pertumbuhan sel (Barnes and Sato, 1980). Transferrin adalah molekul pembawa (*carrier molecule*) terlibat dalam

siklus transport Fe yang berkaitan dengan penyerapan, penyimpanan, penggunaan dan pembuangan dan interaksinya dengan jaringan sasaran (Aisen dan Listowsky, 1980). Pada faktanya, defisiensi transferrin, akan memicu berkurangnya cadangan Fe internal, yang selanjutnya akan diikuti dengan penurunan proliferasi sel (Hoffbrand *et al*, 1976; Rudland *et al*, 1977; Dillner-Canterling *et al*, 1979). Ion Fe dilepaskan dari transferrin lalu diangkut melalui membran endosom (Fleming dan Andrews, 1998) untuk mencapai sitosol. Setelah dilepaskan dari endosom, Fe terikat pada protein pengikat Fe intraseluler dan diangkut ke bagian intraseluler pada saat dibutuhkan. Apotransferrin yang bebas Fe menjadi reseptor ikatan dan kembali ke permukaan sel dimana mereka dilepaskan ke rongga ekstrascluler (Baker dan Morgan,1994; Richardson and Ponka,1997).

Reseptor transferrin adalah glikoprotein yang berhubungan dengan membran sel dan berfungsi sebagai "penjaga gawang" dalam pengaturan pengambilan Fe seluler dari transferrin, yaitu protein plasma yang mengangkut zat besi dalam sirkulasi (Testa *et al*, 1993; Ponka dan Lok, 1999). Reseptor transferrin bisa terekspresi pada semua sel, namun kadarnya bervariasi (Ponka dan Lok, 1999; Richardson dan Ponka,1997). Gen ini terekspresi tinggi pada sel stem, sel eritoid yang belum matang, jaringan plasental, dan sel yang cepat membelah. Status proliferatif yang tinggi berhubungan dengan tingginya kepadatan reseptor transferrin pada permukaan seluler (Sutherland *et al*, 1981). Ekspresi reseptor transferrin berkaitan dengan fase tertentu dari siklus sel. Ekspresi yang tinggi dari gen ini juga ditemukan setelah transformasi ke arah keganasan (Klausner *et al*, 1993; Hentze dan Kuehn, 1996). Reseptor transferrin berperan penting pada pengendalian pertumbuhan sel (Klausner, 1988).

Iron Regulated Transporter sesuai dengan namanya 'transporter', gen ini berperan khususnya dalam sirkulasi dan transportasi Fe (Hentze dan Kuehn, 1996).

Pada penelitian Steinbrech tahun 1999 dan 2000, sel osteoblas yang terpapar kondisi normoksia (O_2 20%) hanya menunjukkan sedikit peningkatan pada proliferasi selulernya. Sebaliknya pada kondisi hiperoksia (O_2 90%) terjadi fenomena yang berlawanan. Hiperoksia diharapkan memicu aktivitas osteoblas untuk melakukan sintesis dan mensekresi komponen matriks tulang. Namun, alasan mekanistik yang mendasarinya belum pernah diteliti secara mendalam. Pada jurnal yang lain (Clement, 1992) disebutkan bahwa ada dua mekanisme utama yang mungkin dapat menjelaskan mengapa hiperoksia dapat menghambat proliferasi sel yaitu kerusakan DNA atau perubahan status redoks sel (Vuillaume, 1987; Hoenje, 1989). Salah satu target utama ROS adalah DNA. Kemampuan oksidan dalam merusak DNA sudah cukup dikenal, termasuk pecahnya utas, yang, jika tidak segera dan dengan benar diperbaiki, dapat mengganggu secara langsung ekspresi gen yang terlibat dalam pengaturan proliferasi dan diferensiasi (Imlay dan Linn, 1988). Beberapa peneliti telah melaporkan penghambatan proliferasi sel oleh ROS disebabkan oleh terhentinya atau terhambatnya siklus sel (Vincent et al, 1989 dan 1991).

Pada berbagai sistem seluler, hiperoksia menghasilkan pembentukan senyawa oksigen reaktif (SOR) atau senyawa nitrogen reaktif (SNR) termasuk NO•. Pada *K562 Human Erythroleukimia Cells* telah diteliti efek NO• pada metabolisme Fe seluler melalui peningkatan afinitas protein pengatur Fe yang disebut *iron-regulated protein* (IRP) (Oria *et al*, 1995). Pada penelitian yang lain ditunjukkan bahwa peningkatan

redoks potensial seluler dapat mengaktifkan ikatan IRP yang mengakibatkan pengambilan Fe seluler meningkat melalui reseptor transferrin (Meneghini, 1997).

Sediaan kultur *mouse osteoblast cell-line* 7F2 yang merupakan *spontaneously immortalized cell-line* dan diisolasi dari p53 -/- sumsum tulang femur tikus dan secara berturut-turut telah dikloning (Moore, 1998). Pemilihan 7F2 didasarkan pada pertimbangan yaitu sel ini muncul berkaitan dengan osteoblas matang karena mereka mengekspresikan *alkaline phosphatase*, mensekresi kolagen tipe I, menunjukkan siklus *adenosine monophosphate* (AMP) yang *significant* berespon terhadap hormon paratiroid, mensekresi osteokalsin dan termineralisasi secara luas. 7F2 mengandung populasi sel yang homogen yang berhubungan dengan osteoblas matang dan mempunyai nomer *passage* yang lebih stabil dibandingkan *cell line* osteoblas lain seperti MC3T3-E1. Prilaku unik 7F2 adalah sel ini merepresentasikan tahap baru dari diferensiasi osteoblas (Thompson *et al*, 1998). Pada penelitian ini digunakan *mouse osteoblasts cell line* 7F2, yang dikultur *in vitro* pada kondisi normoksia dan hiperoksia untuk mengkarakterisasi pola ekspresi gen dan untuk mengidentifikasi perbedaan ekspresi gen. Penentuan waktu eksperimen 24 jam dan 48 jam selain berdasarkan penelitian Gray dan Hamblen, 1975 dan Steinbrech et al, 1999 dan 2000, juga didasarkan atas pertimbangan waktu tersebut merupakan waktu yang cukup memadai untuk mengetahui respon dari perlakuan yang diberikan terhadap sel (sel masih hidup dan mampu merespon perlakuan).

Ekspresi gen adalah salah satu proses yang penting dalam menentukan fungsi seluler. Ekspresi gen dan represi gen tertentu menentukan fenotipe seluler. Perubahan ekspresi gen memicu terjadinya pertukaran fenotipe *(phenotype switching)*. Pola ekspresi gen dari sel tertentu mengindikasikan status fungsionalnya dan perubahan pada fungsi

seluler mencerminkan pola ekspresi yang berubah. Pada penelitian terdahulu pola ekspresi gen tunggal atau sekelompok gen biasanya dikuantifikasi dalam penelitian biomolekuler.

DNA *Microarray* adalah kumpulan titik DNA mikroskopik yang melekat pada permukaan yang *solid*, seperti gelas, plastik atau *silicon chip* yang membentuk suatu *array* yang digunakan untuk mengukur kadar ekspresi sejumlah besar gen secara simultan (http://encyclopedia.thefreedictionary.com/DNA+microarray). Menggunakan tehnologi *microarray* memungkinkan untuk mengkuantifikasi kadar ekspresi semua gen di bawah kondisi eksperimental yang ditentukan (Billiard *et al*, 2003). Tehnologi *microarray* memungkinkan kuantifikasi semua gen secara serempak dan ini merupakan metode yang paling sesuai untuk mengkarakterisasi pola ekspresi gen tertentu (Duggan *et al*, 1999; Khan *et al*, 1999; Seth *et al*, 2001). Dapat ditekankan bahwa karena *screening character* (*high throughput method*) tehnologi *microarray* dapat memberikan ulasan mengenai ekspresi gen seluler yang dititikberatkan pada perbedaan utama pola ekspresi (lebih dari 10-kali lipat teregulasi naik atau turun). Perbedaan yang kecil (2-5-kali lipat teregulasi naik atau turun) seringkali tidak dianalisis atau tidak terlibat saat mengevaluasi data. Sayangnya, relevansi biologis dari efek pengaturan tidak tergantung pada luasnya pengaturan. Faktanya, sering dijumpai gen yang kadar ekspresinya teregulasi naik 2 kali lipat mungkin lebih penting daripada regulasi naik hingga 10 kali lipat pada gen lain. Ada kemungkinan untuk mendapatkan hasil yang salah (*false positive* dan *false negative*) melalui luas sinyal fluoresensi yang diperoleh sebagai indikator kadar ekspresi saat bekerja dengan *microarray*. Maka data *microrray* harus selalu dikonfirmasi dengan

metode dalam kuantifikasi konsentrasi spesies mRNA, seperti *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) semi-quantitatif dan *Real-Time* PCR.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dari *mouse osteoblast cell line* 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam pada 1 atm (atmosfir)?
2. Apakah terdapat perbedaan proliferasi sel 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam dan hiperoksia 24 jam pada 1 atm (atmosfir)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dari *mouse osteoblast cell line* 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam pada 1 atm (atmosfir)?

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dari *mouse osteoblast cell line* 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam pada 1 atm (atmosfir)?
2. Mengetahui perbedaan proliferasi sel 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam dan hiperoksia 24 jam pada 1 atm (atmosfir) melalui kurva pertumbuhan sel.
3. Mengetahui perbedaan kadar ekspresi beberapa gen (*growth Arrest DNA damage 45a, cyclooxigenase-2, small inducible cytokine A7, serine protein inhibitor 11,*

coil coiled forming protein) mouse osteoblasts cell line 7F2 (dengan *microarray*) pada kondisi normoksia 24 jam dan hiperoksia 24 jam dan 48 jam pada 1 atm (atmosfir).

4. Mengkuantifikasi kadar ekspresi gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dengan metode *Reverse Transcriptase* - PCR dan *Real Time*-PCR.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritik

1. Memberikan ulasan mengenai ekspresi gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* pada sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia.

2. Memberikan acuan teori yang dapat digunakan dalam pengembangan ilmu bahwa pemberian terapi hiperoksia hiperbarik pada manajemen patah tulang harus memperhatikan dosis (waktu dan konsentrasi).

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Membantu penentuan optimisasi dosis (waktu dan konsentrasi) terapi hiperoksia hiperbarik dalam manajemen patah tulang khususnya dalam mempercepat aktivitas osteoblas sebagai sel pembentuk tulang.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Peran metabolik Fe

Iron (Fe) memegang peran penting dalam metabolisme semua sel dan sangat diperlukan bagi sintesis DNA dan proses metabolik (Tabel 2.1). Fe dibutuhkan untuk pertumbuhan sel normal dan proliferasi (Orino *et al*, 2001). Peran utama Fe dalam proliferasi sel dilakukan oleh *chelator* yang dapat melintasi membran plasma, terikat pada metal yang ada di dalam sel dan berfungsi membatasi bioavailabilitas sel - sel (http://sickle.bwh.harvard.edu/Fe_differentiation.html). Kekurangan Fe mempengaruhi proliferasi, hal ini disebabkan karena Fe dibutuhkan oleh ribonukleotida reduktase dan enzim lain yang terlibat dalam pembelahan sel (Hoffbrand *et al*, 1976). Fe juga dibutuhkan bagi pertumbuhan sel dan penggandaan sel sehubungan dengan perannya dalam aktifitas ribonuklease reduktase, enzim kunci bagi sintesis DNA dan bertanggungjawab terhadap reduksi ribonukleotida menjadi deoksiribonukleotida (Reichard dan Ehrenbergn, 1983). Fe mempunyai pengaruh yang cukup besar pada replikasi DNA, patogenitas bakteri, fotosintesis, stress oksidatif dan proliferasi sel (Thomson *et al*, 1999). Fe mempunyai peran penting pada proses fisiologis sel, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi, apoptosis, transfer elektron, transport oksigen dan detoksifikasi (Licu *et al*, 2001). Fe menentukan status prooksidan suatu sel yang dapat mengaktifkan IRP sehingga sel lebih dapat menangkap Fe (Meneghini, 1997). Fe adalah kofaktor sejumlah protein yang terlibat pada proses metabolik (Aisen dan Listowsky, 1980). Fe berperan dalam pembentukan tulang yaitu sebagai kofaktor enzim yang terlibat

dalam sintesis kolagen (Prockop, 1971). Fe merupakan kofaktor utama aktifitas *prolyl-4-hydroxylase* yang berperan dalam pembentukan *triple helix procollagen* (Prockop *et al*, 1979 ; Fiedler-Nagy *et al*, 1981). Homeostasis Fe ditentukan oleh pengaturan mekanisme penangkapan, penyimpanan dan pelepasan Fe yang dikendalikan oleh dua protein yaitu *transferrin receptor* yang menjembatani terjadinya pengambilan Fe (*uptake iron*) dan *ferritin* yang berfungsi sebagai cadangan kelebihan Fe yang mungkin dibutuhkan untuk kebutuhan metabolik yang mendesak (Oria *et al*, 1995). Homeostasis *Fe* selular diatur oleh IRP, yang terikat pada IRE dari mRNA *ferritin* dan reseptor transferrin (TfR) (Cairo *et al*, 1998). Melalui reseptor spesifik, Fe masuk ke dalam sel, dan akhirnya Fe disimpan dalam bentuk yang stabil terikat dengan *ferritin* (Gallcano dan Puntarulo, http://www.antioxidantes.com.ar/12/FrArt055.htm). Homeostasis Fe selular diatur melalui koordinasi ekspresi reseptor *transferrin* dan *ferritin* dengan kata lain Fe ditransportasikan ke dalam darah melalui ikatannya dengan protein khusus reseptor *transferrin* dan *ferritin*. Molekul terpenting yang terlibat dalam hal ini adalah *transferrin receptor* yang melakukan pengambilan seluler dari *transferrin* yang terikat Fe (Huebers dan Finch, 1987) dan *ferritin* yang menyimpan Fe yang dibutuhkan untuk metabolisme seluler (Theil, 1987). Ekspresi dari kedua protein ini diatur oleh protein sitoplasmik yang dikenal dengan nama IRP (*Iron-Regulated Protein*) yang juga disebut IREBP (*Iron-Response Element-Binding Protein*) atau IRF (*Iron Regulatory Factor*) yang terikat pada rangkaian yang spesifik yang disebut IRE (*Iron-Responsive Elements*) pada daerah yang tidak diterjemahkan (*untranslated region*) dari mRNA kedua protein tersebut (Casey *et al*, 1988). Meskipun perubahan aktifitas IRP dihasilkan oleh variasi kadar Fe pada kultur sel namun beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa $NO^{\bullet}$, mediator fisiologis

yang dihasilkan melalui aksi enzimatik *NO-synthase* pada *L-arginine* dapat memperluas ikatan IRP terhadap IRE (Weiss *et al*, 1993; Drapier *et al*, 1993). Aktifitas IRP dapat diatur oleh beberapa faktor, seperti proliferasi sel (Cairo dan Pietrangelo, 1995), sitokin dan *nitric oxide* yang dilepaskan selama keradangan (Cairo dan Pietrangelo, 1995, Pantopoulos *et al*, 1994; Pantopoulos *et al*, 1996). SOR bersifat reaktif melawan gugus -SH, berperan penting dalam dalam pengaturan ikatan RNA- IRP (Philpott *et al*, 1993; Hirling *et al*, 1994).

Tabel 2.1. Mekanisme Fe pada metabolisme sel.

(Wienberg, 1990)

Mechanism	Specific site of Fe participation
DNA synthesis	Ribonucleotide reductase
RNA synthesis	RNA polymerase
Electron transfer	Cytochrome, hidrogenase, succynate dehidrogenase, ferredoxine
Oxygen metabolism	Catalase, oxygenases, peroxidases
Kreb's cycle	Aconitase
Immune response	Activation of T-lymphocytes neutrophyls and B-lymphocytes

Fe mengandung elektron yang tidak berpasangan yang dapat dianggap sebagai radikal bebas (Halliwell dan Gutteridge, 1990). Oksidasi Fe^{2+} memicu pembentukan anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dengan transfer elektron ke molekul oksigen. $O_2^{\cdot-}$ akan menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), yang bereaksi dengan Fe^{2+} dan menghasilkan $HO^{\cdot}$ (reaksi 1-3). Dengan cara ini, Fe berperan sebagai katalisator pada pembentukan produk penengah dari reduksi parsial oksigen yang sangat reaktif.

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \qquad (1)$$

$$2\,O_2^{\cdot-} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (2)$$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{-} + Fe^{3+} + HO^{\cdot}$ (3)

Diantara reaksi Fe, peroksidasi lipid adalah salah satu yang paling sering dipelajari (Halliwell dan Gutteridge, 1990). Selama fase perkembangan Fe berpartisipasi meningkatkan laju oksidasi lipid melalui konversi lipid hidroperoksidase (ROOH) menjadi alkoksil ($RO^{\cdot}$) atau radikal peroksil ($ROO^{\cdot}$) (reaksi 4 dan 5).

$ROOH + Fe^{2+} \longrightarrow RO^{\cdot} + HO^{-} + Fe^{3+}$ (4)

$ROOH + Fe^{3+} \longrightarrow ROO^{\cdot} + H^{+} + Fe^{2+}$ (5)

Dua konsekwensi fundamental dari reaksi ini adalah: a) rupturnya membran sel dengan perubahan air yang diikuti oleh pertukaran ion, dan b) produksi toksiknya. Perubahan ini bisa dianggap sebagai mekanisme awal kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh kadar Fe yang berlebihan (Bacon dan Britton, 1990).

2.2 Oksigen

Molekul oksigen penting bagi kelangsungan hidup semua organisme aerobik. Metabolisme energi aerobik tergantung pada fosforilasi oksidatif, sebuah proses dimana energi oksidoreduksi dari transport elektron mitokondria diubah menjadi ikatan fosfat energi tinggi yaitu *Adenosine Tri Phosphate* (ATP). Oksigen berperan sebagai elektron penerima akhir bagi *cytochrome c oxidase*. Oksigen yang berlebihan dapat menjadi toksik karena adanya senyawa oksigen reaktif (SOR). Sel mempunyai strategi untuk merespon peningkatan atau penurunan tegangan oksigen. Sel mempunyai sistem khusus yang dapat mendeteksi kelebihan SOR dan memicu aktifasi faktor transkripsi spesifik dan ekspresi gen sasaran yang tepat (D'Angio *et al*, 2000). *Oxidative stress* mempunyai implikasi

sebagai mediator kematian dan pertumbuhan sel (Ushio-Fukai *et al*, 1996 ; Irani *et al*, 1997).

2.2.1 Senyawa oksigen reaktif (SOR)

2.2.1.1 Definisi

SOR adalah senyawa turunan oksigen yang dapat bertindak sebagai oksidan berat.

2.2.1.2 Jenis senyawa oksigen reaktif (SOR)

Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar justru berasal dari proses biologis alami, dan melibatkan apa yang disebut sebagai SOR. Ada dua jenis SOR adalah :

a. Nonradikal bebas misalnya oksigen singlet ($^1O_2$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan ion hipoklorit (ClO^-)
b. Radikal bebas misalnya radikal hidroksil ($\bullet OH$), radikal peroksil ($\bullet OOH$) dan ion superoksida ($O_2^{-}\bullet$)

2.2.1.3 Pembentukan senyawa oksigen reaktif (SOR)

Pembentukan radikal bebas adalah penting pada banyak proses biologi normal :

1. Senyawa hidrogen peroksida H_2O_2 terutama terbentuk karena aktifitas enzim-enzim oksidase yang terdapat dalam retikulum endoplasmik (mikrosom) dan peroksisom. Enzim-enzim tersebut mengkatalisis reaksi :

$$RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2$$

H_2O_2 merupakan oksidan yang kuat dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat di dalam sel, misalnya glutation :

$$2\ GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

Daya rusak H_2O_2 bukan hanya karena senyawa tersebut merupakan oksidan yang kuat, tetapi juga karena H_2O_2 dapat menghasilkan radikal hidroksil (•OH) bila H_2O_2 dapat menghasilkan radikal hidroksil (•OH) bila H_2O_2 bereaksi dengan logam transisi (*transitional metal*) seperti Fe^{2+} dan Cu^{+} :

$$Fe^{2+}(Cu^{+}) + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}(Cu^{2+}) + OH^{-} + \bullet OH$$

(reaksi Fenton)

2. H_2O_2 juga dapat menghasilkan oksidan kuat yang lain, yaitu ion hipoklorit(ClO^{-}) melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim mieloperoksidase yang terdapat dalam sel radang, seperti granulosit, monosit dan makrofag :

$$H_2O_2 + Cl^{-} \longrightarrow H_2O + ClO^{-}$$

Ion hipoklorit dapat mengoksidasi berbagai senyawa :

$$R + ClO^{-} \longrightarrow RO + Cl^{-}$$

3. Singlet oksigen merupakan bentuk oksigen yang jauh lebih reaktif disbanding oksigen "biasa" (oksigen dalam bentuk *ground state* atau triplet oksigen). Singlet oksigen terbentuk pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim tertentu antara lain :

   a. Enzim mono-oksigenase yang menggunakan sitokrom P_{450},apabila enzim tersebut menggunakan suatu peroksida sebagai substrat :

$$2\ ROOH \longrightarrow 2\ ROH + {}^{1}O_2$$

   b. Enzim prostaglandin endoperoksida sintetase,suatu enzim yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat :

$$2\ PGG_2 \longrightarrow 2PGH_2 + {}^{1}O_2$$

c. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim mieloperoksidase,bila ion hipoklorit yang terjadi bereaksi dengan H_2O_2 yang kedua :

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow H_2O + ClO^-$$

$$ClO^- + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + Cl^- + {}^1O_2$$

Atau kalau kedua reaksi tersebut dijumlah :

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + {}^1O_2$$

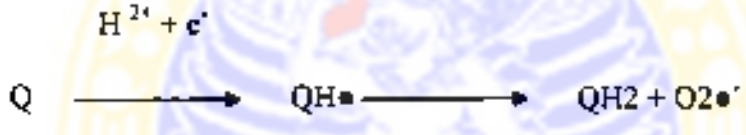
Singlet oksigen dapat mengoksidasi berbagai senyawa :

$$R + {}^1O_2 \longrightarrow RO_2$$

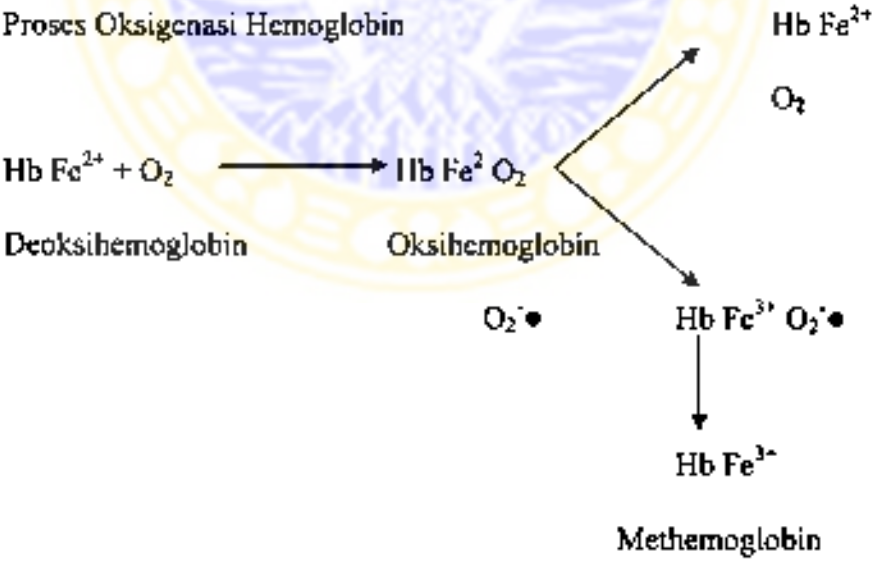
4. Ion superoksid($O_2^{-}\bullet$) terbentuk melalui beberapa cara, antara lain :

a. Sebagai reaksi sampingan yang melibatkan Fe seperti misalnya :

Proses Fosforilasi Oksidatif



Proses Oksigenasi Hemoglobin



Proses hidroksilasi oleh enzim monooksidase (sitokrom P450 dan sitokrom b4)

Ion Fe^{2+}

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + O_{2\bullet}^-$$

b. Reaksi yang dikatalisis oleh NADH/NADPH oksidase yang terdapat dalam mitokondria dan granulosit :

$$NADH(NADPH) + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^-\bullet$$

c. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim xantin oksidase,mirip dengan reaksi nomor b diatas :

$$XH + H_2O + 2O_2 \longrightarrow X\text{-}OH + 2O_2^-\bullet + 2H^+$$

Enzim xantin oksidase (XO) dalam keadaan normal tak terdapat dalam sel mamalia. Enzim mini terbentuk dari enzim lain yaitu xantin dehidrogenase (XD) yang mengkatalisis reaksi sebagai berikut :

$$\underset{\text{Xantin}}{XH} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Asam urat}}{X\text{-}OH} + NADH + H^+$$

Dalam keadaan iskemia atau hipoksemia, XD berubah menjadi XO melalui proses protcolisis :

$$XD \longrightarrow XO + \text{peptida}$$

Perubahan tidak reversibel. Akibatnya bila pasokan oksigen kembali normal, terbentuklah ion superoksida yang justru dapat merusak jaringan (jejas reperfusi).

5. Ion superoksida akan sangat berbahaya bila terdapat bersamaan dengan H_2O_2 karena akan terbentuk radikal hidroksil ($\bullet OH$) :

$$O_2^-\bullet + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + \bullet OH \text{ (reaksi Haber-Weiss)}$$

Reaksi memerlukan Fe3+ atau Cu 2+ dan diperkirakan terjadi melalui dua tahap, yaitu :

$$Fe^{3+}(Cu^{2+}) + O_2^{-}\bullet \longrightarrow Fe^{2+}(Cu^{2+}) + O_2$$

$$Fe^{2+}(Cu^{+}) + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}(Cu^{2+}) + OH^{-} + \bullet OH$$

Diantara senyawa-senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil adalah yang paling reaktif, karena itu paling berbahaya. Namun radikal hidroksil bukan merupakan produk primer proses biologis,tetapi berasal dari H_2O_2 dan $O_2^{-}\bullet$.

Ion Superoksida sendiri sebetulnya tak terlalu reaktif. Bentuk reaktifnya ialah radikal peroksida yang terbentuk melalui reaksi sebagai berikut :

$$O_2^{-}\bullet + H^{+} \longrightarrow \bullet OOH \text{ (Radikal peroksil)}$$

Seperti halnya radikal lain,radikal inipun sangat reaktif dan akan membentuk radikal baru serta H_2O_2 :

$$XH + \bullet OOH \longrightarrow \bullet X + H_2O_2$$

Dari reaksi diatas kiranya jelas bahwa radikal peroksil jauh lebih berbahaya dibandingkan H_2O_2 (Suryohudoyo, 2000).

2.2.1.4 Dampak SOR terhadap membran sel

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh. Asam lemak tak jenuh ini (asam linoleat, linolenat dan arakidonat) sangat rawan terhadap serangan radikal bebas terutama radikal hidroksil.

Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid :

$$LH + OH \leftrightarrow L + H_2O$$
Asam lemak radikal lipid

$$L + O_2 \longrightarrow LOO$$
radikal peroksilipid

$$LOO + LH \longrightarrow L + LOOH \quad dst$$

Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain aldehida seperti malonaldehida, 9-hidroksi-nonenal, serta berbagai hidrokarbon seperti etena (C_2H_6) dan pentane (C_5H_{12}). Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptide (protein) yang timbul karena reaksi antara dua radikal :

$$R_1 + R_2 \longrightarrow R_1\text{-}R_2$$

Semuanya mengakibatkan kerusakan parah membran sel sehingga membahayakan kehidupan sel (Suryohudoyo, 1995).

2.2.1.5 Dampak SOR terhadap DNA

Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA.

Bila kerusakan tak terlalu parah, maka masih dapat diperbaiki oleh system perbaikan DNA (*DNA repair system*). Namun bila kerusakan tersebut sangat parah misalnya rantai DNA terputus di berbagai tempat maka replikasi sel akan terganggu. Perbaikan DNA ini justru sering menimbulkan mutasi karena dalam memperbaiki DNA tersebut, system perbaikan DNA cenderung membuat kesalahan (*error prone*) dan bila

mutasi tersebut mengenai gen yang disebut proto-onkogen, mutasi ini akan menyebabkan kanker (Suryohudoyo, 1995).

2.2.1.6 Dampak SOR terhadap protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam amino yang menyusun protein tersebut. Beberapa amino asil yang penting untuk fungsi protein sangat peka terhadap radikal bebas. SOR dapat bereaksi pada beberapa tempat pada protein dan dapat diteruskan ke tempat lain dengan cepat dalam protein tersebut. Jalur penjalaran tersebut ialah :

Metionin ⟶ Triptofan ⟶ Tirosin ⟶ Sistein

Di antara asam amino penyusun protein, yang paling rawan adalah sistein.

Sistein mengandung gugusan sulfhidril (SH) yang paling peka terhadap serangan radikal bebas seperti radikal hidroksil :

$$RSH + OH \longrightarrow RS + H_2O$$

$$RS + RS \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R$$

Pembentukan ikatan disulfide (-S-S-) menimbulkan ikatan intra atau antar molekul protein tersebut kehilangan fungsi biologisnya (misalnya enzim menjadi kehilangan aktivitasnya) (Suryohudoyo,1995).

Protein juga peka terhadap senyawa antara peroksidasi lipid yaitu alkoksil $LO^{\bullet}$ dan radikal peroksil $LOO^{\bullet}$. Akibat modifikasi oksidatif protein akan mengubah aktifitas enzimatik dan perubahan membran serta fungsi seluler karena degradasi atau *cross link*. Kerusakan protein transport akan mengganggu homeostasis ionik dengan akibat penumpukan kalsium intraseluler dan aktifasi fosfolipase dan protease. Radikal bebas ini

pada akhirnya akan menyebabkan destruksi protein dan degradasi jaringan yang patologik (Rice-Evans *et al*, 1991 ; Wilhelm, 1991).

Modifikasi protein oksidatif cukup penting karena banyak reaksi katalitik yang terpengaruh dan keseluruhan jaringan metabolik seluler menjadi rusak. Modifikasi protein oksidatif ditimbulkan oleh superoksida ($O_2^{\cdot}$), radikal hidroksil ($^{\cdot}OH$), radikal peroksil ($ROO^{\cdot}$), radikal alkoksi ($RO^{\cdot}$), radikal hidroperoksi ($ROO^{\cdot}$) dan senyawa non radikal seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), hipoklorit (HOCl), ozon (O_3), singlet oksigen ($^1O_2$), *nitric oxide* (NO) atau peroksinitrit (ONOO-). Oksidasi asam amino rantai samping membentuk senyawa karbonil yang menunjukkan reaktivitas yang tinggi dengan gugus NH_2-group (Dalle-Donne *et al*, 2003). Sistein yang mengandung protein termasuk yang sensitif terhadap oksidasi. Disini mungkin sekali terbentuk protein dimmer oleh ikatan kovalen rantai protein *via* jembatan disulfite. Contoh yang paling jelas bagi oksidasi thiol adalah *glutathion demirization*.

$$GSH + {\bullet}X \longrightarrow GS{\bullet} + XH$$

$$2GS{\bullet} \longrightarrow G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$$

Modifikasi oksidatif rantai samping asam amino lain mengarah kepada pembentukan karbonil (Berlett dan Stadtman, 1997). Karbonil protein biasanya terbentuk *via* dekomposisi kedua sistein, histidin dan rantai lisin. Bagaimanapun, senyawa karbonil juga terbentuk selama modifikasi oksidasi lipid seluler. Munculnya karbonil bukan merupakan indikasi modifikasi protein (Dalle-Donne *et al*, 2003).

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

2.3 Nitric Oxide ($NO^{\bullet}$)

2.3.1 Dasar kimia

Nitric oxide yang sering disebut *nitrogen monoxide* adalah gas yang tak berwarna yang dapat berdifusi antar sel dan di dalam sel. $NO^{\bullet}$ mempunyai elektron yang tak berpasangan pada orbital *antibonding* phi* 2p, yang merupakan molekul paramagnetik dan radikal bebas. Jika elektron yang tak berpasangan diganti oleh oksidasi 1 elektron, *nitrosonium cation*, akan menghasilkan NO^{+}. Reduksi 1 elektron akan menghasilkan *anion nitroksil* (NO^{-}) yang reaktif, jangka hidupnya pendek, dapat bereaksi dengan $NO^{\bullet}$ untuk menghasilkan *nitrous oxide*, N_2O dan radikal hidroksil (Halliwell dan Gutteridge, 1999)

$$NO^{\bullet} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^{\bullet -}$$

$$ONOO^{-} + NO^{\bullet} \longrightarrow N_2O + NO_2$$

$$ONNO^{\bullet -} + H^{+} \longrightarrow N_2O + OH^{\bullet}$$

$NO^{\bullet}$ dapat bereaksi dengan O_2 untuk membuat peroksinitrit

$$NO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ONOO^{-}$$

$NO^{\bullet}$ bereaksi dengan O_2 untuk membentuk $NO_2^{\bullet}$, yang lebih reaktif. Reaksinya adalah

$$2NO + O_2 \longrightarrow 2NO_2^{\bullet}$$

Hukum rata-rata ini mempunyai implikasi biologi.

$$R = k [NO]^2 [O_2]$$

Rata-rata oksidasi $NO^{\bullet}$ tergantung kuadrat konsentrasi $NO^{\bullet}$. Waktu paruh 1 μM $NO^{\bullet}$ sekitar 12 menit dalam solusi udara jenuh dari tiap 50% penurunan konsentrasi $NO^{\bullet}$.

Kadar fisiologis $NO^{\bullet}$ berada di rentang 1- 10 nM dan konsentrasi O_2 *in vivo* juga rendah. Oksidasi $NO^{\bullet}$ terlarut dalam solusi aqueous non nitrit (NO_2^-), persamaannya adalah

$$4NO^{\bullet} + O_2 + 2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4NO_2^-$$

dan merupakan jumlah dari beberapa persamaan

$$2NO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow 2NO_2^{\bullet}$$

$$NO_2^{\bullet} + NO^{\bullet} \longrightarrow N_2O_3 \text{ (tambahan 2 radikal)}$$

$$N_2O_3 + 2OH^- \longrightarrow 2NO_2^- + H_2O$$

2.3.2 Aksi fisiologis

$NO^{\bullet}$ yang terikat ion metal tertentu menunjukkan efek fisiologis sebagai hasil ikatan awal Fe^{2+} gugus haem pada enzim *guanilate siklase*. $NO^{\bullet}$ tersintesis oleh sel endotel vaskular yang terletak pada bagian dalam pembuluh darah yang berdifusi ke semua arah, tapi beberapa dapat mencapai otot halus yang mendasarinya, terikat pada guanilate siklase dan mengaktifasinya. Sebagai hasil cGMP (*cyclic Guanosine Monophosphate*), Ca^{2+} intrasel menyebabkan relaksasi otot halus (vasodilatasi), pembuluh darah melebar dan tekanan darah menurun. $NO^{\bullet}$ *in vivo* akhirnya hilang karena interaksi antara gugus haem dengan Hb. Bentuk kompleks $NO^{\bullet}$ dengan Fe^{2+} yang stabil dan gugus ferrous termasuk *deoksihemoglobin* (memberi $HbFe^{2+}$ NO) (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

$$Fe^{2+} + NO^{\bullet} \longrightarrow Fe^{2+}NO$$

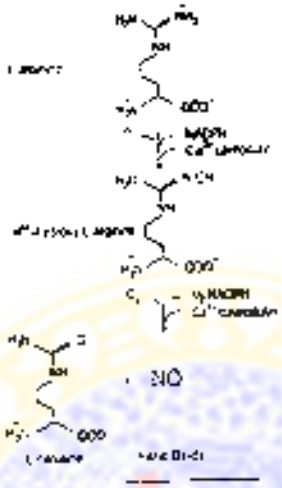
Dengan *oksihemoglobin*, $NO^{\bullet}$ dapat terikat pada gugus –SH. Sebagian besar $NO^{\bullet}$ dapat menyebabkan oksidasi Hb terhadap *metahemoglobin* (HbFe(III)) dan nitrat. Sekali

$NO^{\bullet}$ masuk ke eritrosit, waktu paruhnya < 1 μ. Jarak antar sel jarang yang lebih dari 1μm dari pembuluh darah terdekat, jarak $NO^{\bullet}$ dapat berdifusi < 1s. Kadar basal plasma NO_3^- pada manusia dengan diet rendah NO_3^- sekitar 30 μM, meskipun dapat meningkat dengan cepat setelah intake makanan kaya NO_3^-. Kadar basal merupakan hasil metabolisme $NO^{\bullet}$. Ikatan $NO^{\bullet}$ - haem di sitokrom P_{450} dapat menghambat aktifitasnya. $NO^{\bullet}$ terikat dengan haem Fe pada kedua status *ferrous* dan *ferric*, menyebabkan hambatan yang reversibel (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

2.3.3 Sintesis $NO^{\bullet}$

$NO^{\bullet}$ terutama disintesis pada organisme oleh aksi enzim yang disebut *nitric oxide synthase* (NOSs) yang mengubah asam amino *L-arginine* menjadi $NO^{\bullet}$ dan asam amino lain, *L-sitrulline*. O_2 dibutuhkan dan NOSs mengandung 4 kofaktor : FAD (*Flavin adenine dinucleotide*), FMN (*Flavin mononucleotide*) , *tetrahidrophiopterin* (semua komponen yang mempunyai bentuk tereduksi yang dapat dioksidasi langsung dan menghasilkan radikal O_2) dan haem; haem mempunyai spektral yang menyerupai sitokrom P_{450}. Seperti P_{450}, NOS (*Nitric Oxide Synthase*) dapat terikat dengan $NO^{\bullet}$ dan menurunkan aktifitas enzim. NOSs dan kofaktornya pada kondisi tidak adanya arginin dapat memicu produksi O_2^- tapi bukti fisiologisnya belum jelas. Perubahan *L-arginine* terhadap $NO^{\bullet}$ adalah oksidasi 5 elektron dari NADPH atau bentuk tereduksi dari NADP (*Nicotinamide-adenine Dinucleotide Phosphate*) (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Isoenzim NOS berperan sebagai dioksigenase dengan menggunakan molekul O_2 dan NADPH untuk mengubah bentuk *L-arginin* menjadi *L-citrulline* dan NO (Nijkamp dan Parnham, 1999). *N-nitrosoglutathione* dan *N-nitrosocysteine* dianggap sebagai penghambat *guanilate siklase*.



Gambar 2.1 Sintesis dan metabolisme $NO^{\bullet}$

2.3.4 Radikal bebas $NO^{\bullet}$

$NO^{\bullet}$ biasanya tidak reaktif dengan sebagian besar ion radikal, contohnya , rata-rata reaksi dengan gugus thiol (-SH) rendah. Untuk menghasilkan *thionitrit* (lebih sering disebut *nitrosothiols*), $NO^{\bullet}$ biasanya diubah menjadi oksida nitrogen lebih tinggi (misal N_2O_3) atau peroksinitrit. *Nitrosothiols* yang dideteksi pada darah hewan termasuk *S-nitrosoalbumin, nitrosohaemoglobin* ($NO^{\bullet}$ dapat mengikatkan diri pada sistein 93 dari rantai ß) dan beberapa *S-nitrososistein* yang kurang stabil. Konsentrasi total *nitrosothiols* (sebagian besar *nitrosoalbumin*) di plasma sekitar 1 µM (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Sebaliknya, $NO^{\bullet}$ bereaksi cepat dengan banyak radikal contohnya rata-rata konstan reaksi dengan radikal tirosil (Tyr $O^{\bullet}$) adalah > 10^{9} M^{-1} s^{-1}. Radikal tirosil terletak pada tempat aktif beberapa enzim, terutama *ribonukleotida reduktase*. Efek toksik $NO^{\bullet}$ yang bereaksi dengan radikal tirosin diperlukan untuk aktifitas katalitik. $NO^{\bullet}$ juga bereaksi cepat dengan O_2

$$O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^- \qquad k > 10^{9}\ M^{-1}\ s^{-1}$$

dengan radikal peroksil

$$RO_2^{\bullet} + NO^{\bullet} \longrightarrow ROONO \qquad k > 10^{9}\ M^{-1}\ s^{-1}$$

dengan OH

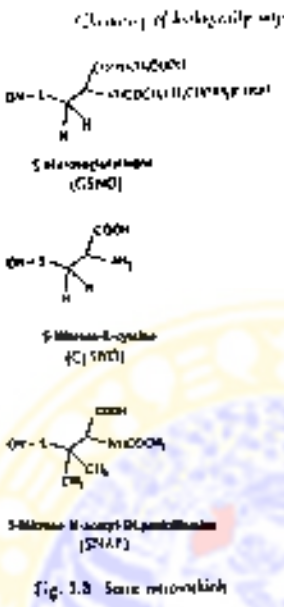
$$NO^{\bullet} + OH^{\bullet} \longrightarrow HNO_2 \qquad k > 10^{9}\ M^{-1}\ s^{-1}$$

dengan radikal asam amino selain tirosin (misal triptofan) dan dengan *ferryl haem* saat protein haem diterapi dengan H_2O_2. Reaksi $NO^{\bullet}$ dengan $RO_2^{\bullet}$ dan dengan protein haem atau sistem H_2O_2 dapat menghambat efek merusak senyawa ini, dan hal ini dianggap sebagai efek antioksidan $NO^{\bullet}$ (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Realisasi fisiologis $ONOO^-$ dan ROONO memberi bukti adanya bidang baru, reaktif nitrogen spesies. Contohnya, paparan $NO^{\bullet}$ berlebih pada sel dapat menyebabkan modifikasi kovalen gugus –SH pada *gliseraldehida-3-foxfat dehidrogenase* dan kerusakan besi-protein sulfur di mitokondria. Kedua efek berkaitan dengan produk oksidasi derivat $NO^{\bullet}$ (N_2O_3, $ONOO^-$). Efek toksik langsung dari kelebihan $NO^{\bullet}$ termasuk hambatan *ribonukleotida reduktase* dan *sitokrom oksidase*; $NO^{\bullet}$ menghambat ikatan O_2 dengan kompleks multienzim mitokondrial esensial. $NO^{\bullet}$ juga bereaksi dengan

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

ferrositokrom c untuk membuat Fe(III) sitokrom c plus $NO^{\bullet}$, yang dapat bereaksi dengan O_2 untuk membentuk ONOO- (Halliwell dan Gutteridge, 1999).



Gambar 2.2 Beberapa *nitrosothiols*

$NO^{\bullet}$ disintesis dari *L-arginine*, molekul O_2, NADPH dan kofaktor lain dari enzim NOS. Efek $NO^{\bullet}$ terhadap hemoglobin dan *guanilate cyclase* yang dapat larut, 2 protein yang secara langsung terlibat dalam transport oksigen via arteri-vena pada kadar biologis sel. $NO^{\bullet}$ dan N-oksida yang lain berperan utama dalam fungsi mitokondria (Henry dan Guissani, 1999).

NO menghambat proliferasi beberapa jenis sel termasuk osteoklas. Baik osteoklas maupun osteoblas mempunyai *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dan menghasilkan NO. Danziger *et al*, 1997 dalam penelitiannya menemukan bahwa NO mungkin berperan terhadap osteoblas yaitu memicu *self-regulation* dari metabolisme mineral.

2.4 Pengaruh Hiperoksia Terhadap Timbulnya Radikal Bebas Oksigen (ROS)

Penggunaan terapi hiperoksia hiperbarik (oksigen konsentrasi tinggi dan tekanan tinggi) selain mempunyai keuntungan juga mempunyai kerugian yaitu meningkatnya pembentukan SOR (Efuni *et al*, 1987; Thom, 1994; Thibaut *et al*, 1996). Pada penelitian mengenai radikal bebas secara *in vivo*, ditemukan senyawa yang tak memiliki elektron bebas sehingga tak tergolong sebagai radikal bebas, namun memiliki kemampuan seperti radikal bebas. Senyawa ini dinamakan spesies oksigen reaktif (SOR) (Sjödin *et al*, 1990). Sesuai dengan namanya, SOR berasal dari oksigen yang diperlukan oleh semua organisme aerobik. Organisme aerobik membutuhkan oksigen untuk menghasilkan ATP sebagai sumber energi melalui proses fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria.

Berikut reaksi pembentukan ATP dan reduksi oksigen tetravalen (Guyton, 1992) :

$$2NADH + 2H^+ + O_2 \longrightarrow 2NAD^+ + 2H_2O + Energi$$

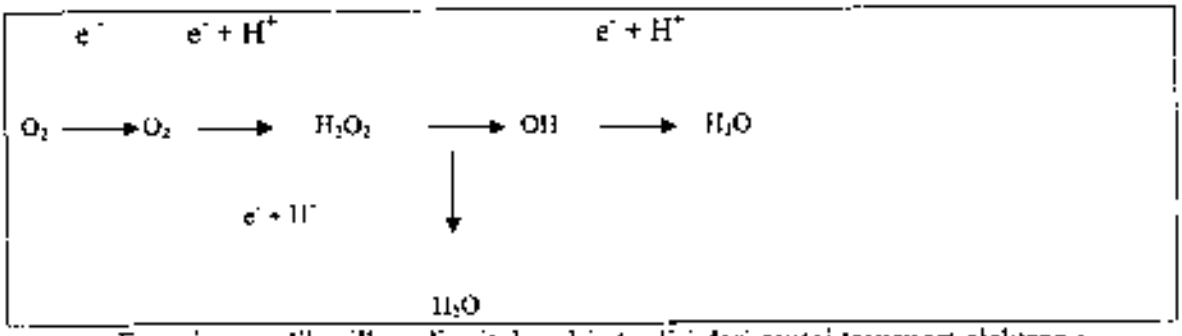
$$ADP + P + Energi \longrightarrow ATP$$

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

Pada proses di atas terjadi pengalihan 4 elektron (reduksi tetravalen). Pada kondisi tertentu (stress oksidatif), NADH berkurang maka pengalihan elektron tersebut berjalan kurang sempurna (reduksi univalen) akibatnya O_2 tidak bisa direduksi secara penuh sehingga terbentuk SOR yang sangat berbahaya (Sjödin *et al*, 1990; Oriani *et al*, 1996). Jika O_2 cukup banyak sementara NADH tetap maka elektron hanya tereduksi sebagian (Weindruch, 1996).

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Reduksi *univalen* berlangsung sebagai berikut :



Energi yang dihasilkan di mitokondria terdiri dari rantai transport elektron :

Energi yang dihasilkan di mitokondria terdiri dari rantai transport elektron : satu seri dari empat kompleks molekul yang besar dan dua yang lebih kecil. Kompleks I dan II mengambil elektron dari makanan dan berlanjut ke semua bagian, tempat radikal bebas terbesar. Bagian-bagian mengirim elektron turun dari sebagian rantai menuju kompleks IV, kemudian berinteraksi dengan oksigen dan hidrogen untuk membentuk air. Aliran elektron menghasilkan aliran proton (H^+) menuju kompleks lain – ATP sintesis yang menghasilkan energi yang dikeluarkan oleh proton untuk membentuk ATP. Radikal bebas terbentuk saat elektron keluar dari rantai transport dan bergabung dengan oksigen di sekelilingnya (Weindruch, 1996).

2.5 7F2 Osteoblast Mouse Cell Lines

7F2 adalah *spontaneously immortalized cell line* yang diisolasi dari p53-/- sumsum tulang tikus jantan berumur 5-6 minggu yang diambil dari tulang femur dan diklon berkali-kali (Moore, 1998). Sel ini mengandung populasi homogen yang berkaitan dengan osteoblas matang karena mengekspresikan *alkaline phosphatase*, mensekresi kolagen tipe 1, menunjukkan siklik *adenosine monophosphate* (AMP) yang merespon hormon paratiroid, mensekresi ostcokalsin dan termineralisasi secara luas 7F2 juga relatif

lebih stabil dibandingkan osteoblast cell line lain yang biasa digunakan seperti MC3T3-E1 (Leis *et al*, 1997). Berbeda dengan osteoblas matang, klon ini dapat menghasilkan differensiasi adiposit yang cepat yang disertai dengan hilangnya ekspresi semua marker (penanda) osteoblas kecuali *alkaline phosphatase*. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa sel yang mendapatkan karakteristik osteoblas matang dapat terlibat dalam jalur adiposit (Thompson *et al*, 1998).

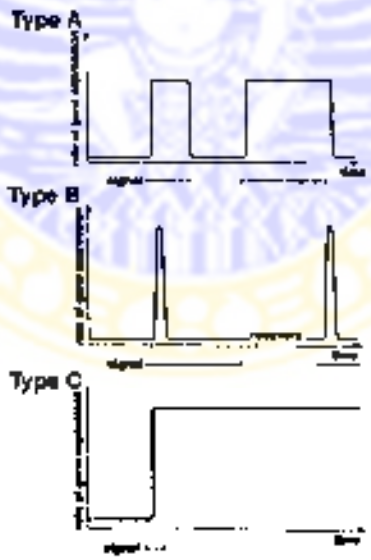
2.6 Ekspresi Gen

Informasi genetik yang terdapat pada tiap sel somatik dari organisme metazoa hampir semuanya identik. Perbedaannya terletak pada beberapa sel yang mempunyai gen ganda untuk melaksanakan fungsi seluler yang khusus. Singkatnya, ada dua tipe regulasi gen yaitu regulasi positif dan regulasi negatif. Jika ekspresi informasi genetik secara kuantitatif meningkat oleh kehadiran molekul pengatur spesifik, maka regulasi dikatakan positif dan sebaliknya jika ekspresi informasi genetik secara kuantitatif menurun oleh kehadiran molekul pengatur spesifik, maka regulasi dikatakan negatif. Pada organisme biologis ada 3 tipe respon temporal sinyal pengaturan (*regulatory signal*) (Englesberg, 1974).

Tabel 2.2 Efek Pengaturan Positif dan Negatif Pada Ekspresi Gen

	Laju Ekspresi Gen	
	Regulasi Negatif	**Regulasi Positif**
Ada Regulator	Menurun	Meningkat
Tidak Ada regulator	Meningkat	Menurun

Tipe A dibentuk oleh laju peningkatan ekspresi gen yang tergantung pada kehadiran *inducing signal*. Jika sinyal menghilang, maka ekspresi gen menurun hingga ke tingkat basal, namun lajunya secara berulang meningkat sebagai respon terhadap pemunculan kembali sinyal tersebut. Tipe B menunjukkan peningkatan laju ekspresi gen yang sementara (*transient*) bahkan pada kondisi adanya sinyal pengatur. Setelah sinyal menghilang dan sel pulih (*recover*), respon sementara (*transient*) kedua muncul kembali. Tipe respon ini sering muncul selama perkembangan organisme saat hanya ada produk gen spesifik yang muncul *transient* yang dibutuhkan meskipun sinyal ada. Tipe C pola penunjukan, sebagai respon terhadap sinyal pengaturan, peningkatan laju ekspresi gen yang hadir dalam jangka waktu tak terbatas (*indefinitely*) bahkan setelah terminasi sinyal. Sinyal berperan sebagai pemicu pada pola ini. Respon ini merupakan proses diferensiatif. Saat ekspresi gen dimulai di sel, maka tidak dapat dihentikan bahkan oleh sel saudaranya dan itu merupakan proses *irreversible* (Jacob, 1961).



Gambar 2.3 Representasi diagram respon laju ekspresi gen terhadap sinyal pengaturan spesifik

2.6.1 Ekspresi gen osteoblas dalam kondisi hiperoksia

DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) adalah suatu molekul yang secara struktural bersifat dinamis dan berbentuk heliks. Urutan nukleotida dalam DNA yang merupakan molekul hereditas menentukan urutan nukleotida komplementer dalam RNA (*Ribonucleic Acid*) dan akhirnya menentukan urutan asam amino dalam suatu protein. Gen menentukan macam protein yang dibentuk oleh sel. Namun DNA bukanlah merupakan cetakan langsung bagi sintesis protein. Cetakan untuk sintesis protein adalah molekul-molekul RNA. *Messenger* RNA adalah suatu kelompok molekul RNA yang merupakan perantara pembawa informasi pada sintesis protein. Arus informasi genetik pada sel normal adalah sebagai berikut :

$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{transkripsi}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{translasi}} \text{Protein}$$

Aktifitas gen terutama diatur pada tingkat transkripsi. Gen yang bergerombol dalam satuan-satuan disebut *operon*. Transkripsi gen dalam suatu *operon* secara terkoordinasi dihambat oleh protein *repressor* dan diaktifkan oleh protein *stimulator*. *Operon* adalah unit terkoordinasi untuk ekspresi gen. Unsur genetik adalah *gen regulator*, suatu situs *operator* dan seperangkat gen struktural. Gen *regulator* menghasilkan suatu *repressor* yang dapat berinteraksi dengan *operator*. *Repressor* adalah suatu protein sedangkan *operator* adalah segmen DNA yang berbatasan dengan gen struktural yang dikendalikannya (Stryer, 1995).

Pengaturan ekspresi gen oleh faktor transkripsi adalah salah satu mekanisme utama bagi pengendalian fungsi seluler. Tiga sel utama tulang, osteoblas, osteoklas dan kondrosit berkembang dan berdiferensiasi menurut program perkembangannya masing-

masing. Ketiga sel ini melalui tahap ganda diferensiasi yang sering diatur oleh faktor transkripsi (Kobayashi dan Kronenberg, 2005). *Microarray* dan tchnologi *gene chip* memungkinkan analisis perubahan ekspresi mRNA sejumlah besar gen pada waktu yang sama. Pendekatan ini digunakan untuk meneliti profil genetik diferensiasi osteoblas pada tikus coba. Pada penelitiannya Billiard menemukan 47 gen yang ekspresinya naik menjadi 3 kali lipat atau lebih pada tahap pre-osteoblastik dan pre-osteositik diferensiasi osteoblas. Gen ini dibagi menjadi tujuh fungsi yaitu : faktor matriks dan yang berhubungan dengan matriks, faktor pengendali metabolisme, faktor pengendali siklus sel dan proliferasi sel, elemen pengendali struktur sel dan gerakan sel, faktor respon imun, *signalling molecules*, dan enzim dan penghambat enzim. Gen yang dipilih adalah yang ekspresinya meningkat atau menurun 3 kali lipat atau lebih (Billiard *et al*, 2003). Dalam penelitiannya Steinbrech *et al*, 1999 menemukan fakta bahwa hipoksia mengakibatkan penurunan proliferasi sel, penurunan ekspresi *proliferating cell nuclear antigen* dan peningkatan ALP (*marker* diferensiasi osteoblas). Data ini mengukuhkan bahwa osteoblas melalui ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) mungkin bertanggungjawab terhadap angiogenesis dan peningkatan aliran darah pada segmen tulang yang patah. Dan lagi, data ini menunjukkan bukti bahwa osteoblas memiliki mekanisme yang sensitif terhadap O_2 dan penurunan tegangan O_2 dapat mengatur ekspresi beberapa gen tertentu, proliferasi sel dan diferensiasi sel (Steinbrech *et al*, 1999).

2.6.1.1 Gen reseptor transferrin (TfR)

Reseptor transferrin adalah glikoprotein yang berhubungan dengan membran sel dan berfungsi sebagai "penjaga gawang" dalam pengaturan pengambilan seluler Fe dari transferrin, yaitu protein plasma yang mengangkut zat besi dalam sirkulasi (Testa *et al*,

1993; Ponka dan Lok, 1999). Reseptor transferrin (TfR) adalah gen yang paling penting bagi homeostasis seluler Fe (*iron*) (Oria, 1995). Gen ini bertanggung jawab terhadap pengambilan Fe seluler dan defisiensinya akan mengarah ke ketidakseimbangan suplai Fe seluler yang parah. Reseptor transferrin bisa terekspresi pada semua sel, namun kadarnya bervariasi (Ponka dan Lok, 1999; Richardson dan Ponka,1997). Gen ini terekspresi tinggi pada sel stem, sel eritoid yang belum matang, jaringan plasental, dan sel yang cepat membelah. Status proliferatif sel adalah faktor yang mampu mempengaruhi ekspresi reseptor transferrin per detik Status proliferatif yang tinggi berhubungan dengan tingginya kepadatan reseptor transferrin pada permukaan seluler (Sutherland *et al*, 1981). Ekspresi reseptor transferrin berkaitan dengan fase tertentu dari siklus sel. Ekspresi yang tinggi dari gen ini juga ditemukan setelah transformasi ke arah keganasan (Klausner *et al*, 1993; Hentze dan Kuehn, 1996). Data ini menunjukkan bahwa reseptor transferrin berperan penting pada pengendalian pertumbuhan sel (Klausner, 1988).

2.6.1.2 Gen *iron regulated transporter* (IRT)

Iron Regulated Transporter sesuai dengan namanya 'transporter', gen ini berperan khususnya dalam sirkulasi dan transportasi Fe (Hentze dan Kuehn, 1996).

2.6.1.3 Gen *growth arrest DNA damage alpha* (Gadd45a)

Gadd45a adalah protein yang terikat pada *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) dan mungkin berperan dalam interaksinya dengan CDK (*cell division protein kinase*), merangsang eksisi repair in vitro dan menghambatn masuknya sel ke fase S. Gadd45a merupakan 20 kDa *acidic globular protein* yang merupakan anggota *growth arrest and DNA damage-inducible gene family* yang berfungsi dalam regulasi negatif (penghambatan) pertumbuhan sel yang kuat (Zhang *et al*, 2002). Gen yang diklon dari

UVR sel hamster (Fornace *et al*, 1988) dan homolog manusia yang diklon pada lengan pendek kromosom 1 pada 1p31.1-31.2 (Hollander *et al*, 1993). Gadd45a (Gadd45/Gadd45α) termasuk dalam kelompok tiga gen yaitu Gadd45b (Myd118/Gadd45β) dan Gadd45g (CR6/OIG37/Gadd45γ). *Growth arrest and DNA damage inducible protein a 45 (Gadd45a)* adalah *p53-regulated gene*, yang produk proteinnya terlibat dalam mempertahankan stabilitas *genome*. Penghapusan Gadd45a memicu pada *aneuploidy* parah sebagai konsekwensi amplifikasi sentrosom dan segregasi kromosom abnormal secara berturut-turut selama mitosis. Selain itu, Gadd45a dibutuhkan untuk kontrol fase S dan pengaturan titik kontrol pada kondisi kekurangan nutrisi (Hollander *et al*, 2005). Pentingnya Gadd45a dalam mempertahankan integritas genomik menunjukkan bahwa gangguan Gadd45a endogen pada tikus menghasilkan ketidakstabilan genomik dan karsinogenik. Gadd45a muncul sebagai komponen yang penting dalam jaringan pertahanan seluler yang dibutuhkan untuk mempertahankan kestabilan genomik (Zhan, 2005). Gadd45a adalah gen efektor p53 (Fornace *et al*, 1989) dan diregulasi baik oleh p53 (Kastan *et al*, 1992) dan oleh *p53-independent signaling* yang melibatkan p38 (Oh-Hashi *et al*, 2001). Gadd45a memicu supresi pertumbuhan pada beberapa sel terutama melalui aktivasi G2 checkpoint pada siklus sel (Zhan *et al*, 1994). Gadd45a berinteraksi dengan *cyclin-dependent kinase inhibitor p21* $^{WAF1/CIP1}$ dan *proliferating cell nuclear antigen* (Kearsey *et al*, 1995; Smith *et al*, 1994; Zhao *et al*, 2000; Vairapandi *et al*, 2000) dan terlibat dalam perbaikan kerusakan DNA (Smith *et al*, 1996; Carrier *et al*, 1999; Xiao *et al*, 2000; Smith *et al*, 2000). *Cyclin-dependent kinase inhibitor p21* $^{WAF1/CIP1}$ telah dikenal keterlibatannya pada penghambatan G1/S *transition* (El-Deiry *et al*, 1993; Harper *et al*, 1993; Deng *et al*, 1995). Pada beberapa literatur juga

dilaporkan bahwa Gadd45α berhubungan dengan Cdc2 kinase dan merusak interaksi antara Cdc2 dan cyclin B1 sehingga menekan pertumbuhan sel melalui *induction of G2/M arrest* (Zhan *et al*, 1999; Wang *et al*, 1999; Jin *et al*, 2000). Gadd45 juga terlibat dalam apoptosis (ekspresinya meningkat) melalui aktivasi MAPK dan/atau *c-Jun N-terminal kinase signaling pathways* (Takekawa *et al*, 1998; Harkin *et al*, 1999). Jika digabungkan dapat dikatakan bahwa Gadd45 menghambat proliferasi sel pada level yang berbeda, termasuk G1/S dan G2/M *checkpoints* sebagaimana yang terjadi pada apoptosis.

2.6.1.4 Gen *cyclooxygenase* (COX-2)

Cyclooksigenase-2 (COX2) adalah protein yang berperan sebagai enzim dan secara khusus mengkatalisa produksi prostaglandin. Enzim penting bagi sintesis *pro-inflammatory prostaglandins* (Williams, 1999). Ekspresi protein ini teregulasi naik secara kuat saat sel radang (misal granulosit, monosit) dirangsang dengan *pro-inflammatory signaling molecules*. Ekspresi COX_2 pada osteoblas (sel 7F2) *immature* tidak terlalu mengherankan karena enzim juga terlibat dalam diferensiasi sel (Williams *et al*, 1999).

2.6.1.5 Gen *small inducible cytokine* (SCyA7)

Small inducible cytokines (Scy) merupakan bagian dari hormon bioaktif, yang menghambat pengaturan pertumbuhan dan aktifitas pro-inflamatori (Hogan, 1994). Scy merupakan faktor kemotaktik yang menarik monosit eosinofil. Protein ini meningkatkan aktivitas anti-tumor, melepaskan gelatinase B dan dapat menikat heparin. Gen ini diekspresikan pada sel inflamasi atau hematopoietik dan terlibat dalam patogenesis inflamasi.

2.6.1.6 Gen *serine protease inhibitor* (Spi11)

Serine proteases (Spi) adalah enzim proteolitik yang merupakan kelompok peptidase yaitu enzim yang memotong ikatan peptida pada protein. Gen ini berperan dalam pemecahan protein matriks ekstraseluler selama inflamasi, siklus koagulasi (*blood clotting*) dan imunitas (Mansat, 1997). Aktivitas enzimatik diatur pada tingkat transkripsional dan translasional, tapi juga ekspresi penghambatan protein. *Serine protease* dihambat oleh *serine protease inhibitor (serpin)*, kelompok enzim yang berlawanan aksinya yang membentuk ikatan kovalen dengan *serine protease*. *Serpin* yang paling banyak dipelajari adalah *antithrombin* dan *alpha 1- antitrypsin* dalam kaitannya dengan koagulasi/thrombosis dan *emphysema*. Penentuan kadar *serine protease* dapat berguna dalam berbagai penyakit seperti kadar faktor koagulasi (dibutuhkan untuk diagnosis *hemorrhagic*/ kondisi trombotik), *fecal elastase* (untuk menentukan aktivitas eksokrin pankreas misalnya pada *cystic fibrosis/chronic pancreatitis*) dan *prostate spesific antigen* (untuk menentukan resiko kanker prostat).

2.6.1.7 Gen *coil coiled forming protein* (Ccl)

Coiled coil forming protein (Ccl) diidentifikasikan sebagai glikoprotein ekstraseluler, yang mengikat vitamin D dan hormon lipofilik yang lain (Ozbek *et al*, 2002). *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) adalah *non-collagenous glycoprotein* yang terekspresi pada kartilago artikuler, tendon and ligamen (Hedborn *et al*, 1992; DiCesare *et al*, 1994; Smith *et al*, 1997; Muller *et al*, 1998). Ekspresi COMP pada jaringan secara dominan terletak pada daerah proliferatif yang menunjukkan peran COMP pada perkembangan kartilago (Shen *et al*, 1995; Ekman *et al*, 1997). Ikatan antara COMP dengan vitamin D_3 ditentukan oleh peningkatan stabilitas termal *coiled-coil*

pentamer (Guo *et al*, 1998). Gen ini diperlukan bagi metabolisme tulang, muncul berperan pada homeostasis kalsium dan terlibat dalam proses mineralisasi. Dan lagi, gen ini juga terlibat dalam diferensiasi vitamin D.

2.7 Pengaruh Hiperoksia Terhadap Proliferasi Sel

Tampak peningkatan ROS pada permulaan dan perkembangan penyakit dan pada regulasi beberapa proses biologis (Halliwel dan Gutteridge, 1999). Ada dua mekanisme utama yang kemungkinan dapat menjelaskan mengapa hiperoksia dapat menghambat proliferasi sel yaitu kerusakan DNA atau perubahan status redoks sel (Vuillaume, 1987; Hoenje, 1989). Salah satu target utama ROS adalah DNA. Kemampuan oksidan dalam merusak DNA sudah cukup dikenal, termasuk pecahnya utas, yang, jika tidak sefera dan dengan benar diperbaiki, dapat mengganggu secara langsung ekspresi gen yang terlibat dalam pengaturan proliferasi dan diferensiasi (Imlay dan Linn, 1988).

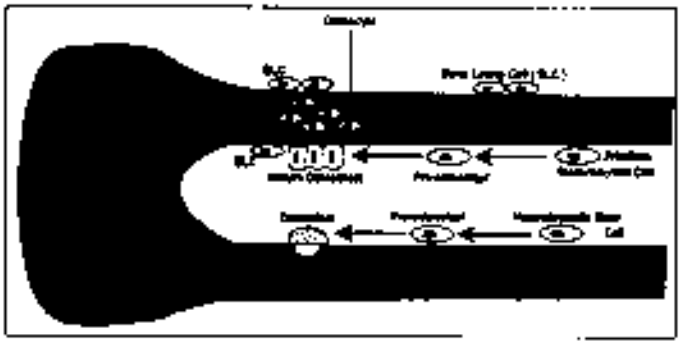
2.8 Struktur Tulang

Pada jaringan tulang didapatkan sel penyusun tulang dan matriks tulang. Sel yang terdapat pada jaringan tulang ternyata hanya sekitar 2% dari seluruh jaringan tulang. Sel penyusun jaringan tulang terdiri dari *osteogenic precursor cells*, sel osteoblas, sel osteoklas, osteosit dan sel darah dari jaringan sumsum tulang. *Osteogenic precursor cells* merupakan sel pengganti sel tulang yang rusak dan berada di dalam lapisan osteogenik. Lapisan ini terdapat pada lapisan dalam periosteum dan endosteum. Sel osteoblas merupakan sel pembentuk tulang dengan mengeluarkan osteoid. Osteoid adalah suatu matris ekstrasel yang belum mengalami mineralisasi. Osteoid ini akan mengalami

mineralisasi sehingga menjadi tulang yang keras. Sel ostcosit merupakan sel osteoblas yang sudah tertimbun oleh matriks yang disekresi oleh sel itu sendiri. Sel ini mempunyai sitoplasma yang panjang untuk berhubungan dengan sel yang lain dan pembuluh darah melalui saluran dalam sistem kanalikuli dan untuk mendapatkan makan. Sel osteoklas merupakan sel peresorbsi jaringan tulang, dimana kerjanya diatur oleh sistem hormon dan mekanisme seluler. Sel ini dapat mengeluarkan enzim hidrolitik dan memecah susunan ikatan inorganik maupun organik sehingga menyebabkan erosi pada jaringan tulang (Appley *et al*, 1993).

Tulang tersusun atas matriks dan seluler, matriks tulang merupakan 90% dari seluruh masa tulang. Matriks tulang tersusun dari bahan organik dan anorganik. Air merupakan 20% berat jaringan tulang hidup. Jika tulang dikeringkan, akan didapatkan bahan penyusun tulang yaitu, bahan anorganik sekitar 65%-70% dan bahan organik, yang terdiri atas protein dan kolagen (30-35%) (Appley *et al*, 1993).

Bahan anorganik terutama terdiri dari kalsium phosphat dan kalsium karbonat, dan jumlah kecil magnesium, fluoride serta natrium. Mineral tersebut menyusun suatu senyawa yang disebut hidroksiapatit, yang akan mengendap di susunan kolagen dari jaringan ostcoid. Osteoid (matriks organik yang belum mengalami mineralisasi dan dikeluarkan oleh sel osteoblas) tersusun dari bahan kolagen tipe I (90%) dan bahan non kolagen sebesar 10% (protein, glikoprotein, proteoglikan, peptida, karbohidrat, dan lemak) (Appley *et al*, 1993; Loveridge 1999; Kalfas, 2001).



Gambar 2.4 Skematis struktur tulang dan sel yang berperan dalam regenerasi tulang (Nelson, 2000)

Gambar di atas menunjukkan aktifitas didalam tulang. Didalam tulang didapatkan *Mesenchymal Stem Cell (MSC)* yang dapat berubah menjadi sel osteoblas, sedangkan *Haemopoeitic Stem Cell (HSC)* dapat berubah menjadi sel osteoklas. Sel osteoblas dan sel osteoklas tersebut berperan dalam metabolisme tulang. Sel osteoblas berperan dalam deposisi tulang, sedangkan sel osteoklas berperan dalam resorbsi tulang. Perubahan-perubahan tersebut terjadi pada keadaan tertentu dan dipengaruhi berbagai faktor.

2.9 Sel Tulang

Sel tulang terdiri dari osteoblas, osteosit dan osteoklas.Sel tulang berfungsi membentuk tulang, resorpsi tulang, keseimbangan mineral (*mineral homeostasis*) dan reparasi tulang. Osteoblas untuk membentuk tulang, osteosit untuk *regulator* tulang dan osteoklas untuk menyerap tulang. Guna melakukan fungsi tersebut sel tulang merupakan sel khusus, mempunyai bentuk dan fungsi serta berada pada lokasi tertentu (Buckwalter *et al*, 2000). Sel tulang berasal dari sel stem mesenkim dan sel stem hematopoietik. Sel pembentuk tulang yang berasal dari sel stem mesenkim akan mengalami diferensiasi menjadi pre-osteoblas, osteoblas, *bone lining cells* atau *resting osteoblas* dan osteosit. Sel

tulang yang berasal dari sel stem *haematopoietik* monosit terdapat pada sumsum tulang dan peredaran darah yaitu preosteoklas dan osteoklas.

Susunan sel tulang terdiri dari 95% osteosit dan 5% terbagi atas 94% *bone lining cell*, 5% osteoblas dan 1% osteoklas (Duncan dan Turner, 1995). Sel tulang berasal dari *osteoprogenitor* yang berdifusi menjadi osteoblas dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas bekerja bergantian untuk *remodeling* sehingga plastisitas tulang dapat dipertahankan.

Gambar 2.5 Alur sel progenitor tulang yang mengalami diferensiasi dari sel stem mesenkim menjadi osteoblas dan osteosit (Buckwalter *et al*, 2000)

a. Sel mesenkim

Sel mesenkim adalah sel yang belum terdiferensiasi dan mempunyai kemampuan berubah menjadi fibroblast, kondrosit dan osteoblas termasuk preosteoblas, osteoblas, *bone lining cells* atau *resting osteoblas* dan osteosit (Hauschka, 1992). Sel mesenkim dapat memasuki tulang melalui migrasi dari jaringan lunak atau aliran darah, demikian pula perisit vaskular dapat menjadi pre-osteoblas. Sebelum mengalami diferensiasi sel mesenkim berbentuk *irregular*, dengan satu inti, sedikit sitoplasma dan organel.

Sel ini tetap dalam keadaan seperti ini sampai ada rangsangan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Rangsangan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi dapat terjadi akibat patah tulang dan berbagai keadaan yang melepaskan faktor pertumbuhan sehingga

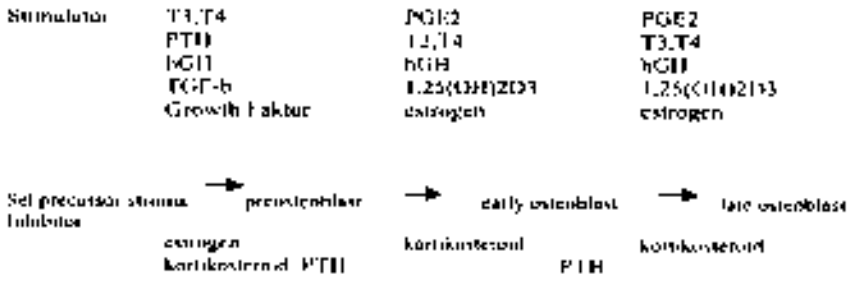
merangsang migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel ini menjadi osteoblas. Peristiwa diferensiasi dipengaruhi oleh faktor lokal dan sistemik.

b. Osteoblas

Osteoblas adalah sel yang memproduksi osteoid atau matriks tulang (Buckwalter *et al*, 2000). Osteoblas berbentuk bulat, oval atau polihidral, terpisah dari matriks setelah mengalami mineralisasi. Saat sedang mensintesis matriks, osteoblas mengandung banyak retikulum endoplasmik, membran Golgi dan mitokondria. Banyaknya retikulum endoplasmik kasar menunjukkan aktifitas produksi protein, dan aparat Golgi bertanggungjawab untuk mensekresi protein. Fungsi osteoblas adalah sintesis dan sekresi matriks organik tulang dan mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi. Osteoblas terdapat pada kanal, endosteum, periosteum, sumsum tulang (*bone marrow*) dan berderet pada permukaan tulang yang mengalami regenerasi. Sel ini aktif membentuk jaringan tulang baru dengan mensekresi osteoid dan *alkaline phosphatase*. Menurut Kahn dan Partridge (1987) dan Azria (1989) sel ini menghasilkan *osteoclast activating faktor* (OAF), kolagenase dan penghambatnya. Osteoblas menghasilkan sekret berupa osteonektin, osteokalsin, osteopontin, fosfoprotein, protein morfogenetik, faktor pertumbuhan tulang dan prostaglandin (Avioli dan Krane, 1990).

Osteoblas mensintesis serat kolagen tipe I dan protein non kolagen lain serta mensekresinya ke ekstrasceluler. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang akan menurun kemampuan mensintesis proteinnya dan bentuk selnya menjadi pipih yang disebut *bone lining cells*. Osteoblas yang berada di tengah matriks akan menjadi osteosit dan sebagian besar menghilang (Buckwalter *et al*, 1995). Osteoblas dijumpai pada daerah pembentukan tulang, remodeling dan penyembuhan patah tulang. Osteoblas berasal dari

sel mesenkim yang bersifat *pluripoten*. Faktor yang mempengaruhi diferensiasi osteoblas masih banyak diteliti antara lain *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) dan oleh berbagai sitokin lainnya, seperti interleukin, *Insulin Growth Factor* (IGF) dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Berbagai sitokin dan BMP telah terbukti mempengaruhi diferensiasi osteoblas secara *in vitro*. Osteoblas memproduksi protein struktural seperti kolagen, osteokalsin, sialoprotein tulang dan protein *regulator*, berupa *growth faktor* dan sitokin lain (Buckwalter *et al*, 2000). Osteoblas memproduksi matriks berupa pro α-$_1$ kolagen sebagai komponen terbesar dari osteoid, osteokalsin dan BMP. Osteoblas juga berfungsi untuk memulai mineralisasi melalui pengaturan aliran elektrolit antara cairan ekstraseluler dan intraseluler. Osteoblas saling berhubungan melalui *gap junction*, memungkinkan komunikasi antara sel melalui proses aliran listrik dan proses kimia. Aktifitas osteoblas selalu disertai aktifitas osteoklas. Kerja sama osteoblas dan osteoklas dalam peristiwa resorbsi dan deposisi tulang secara temporal dan kuantitatif disebut mekanisme *coupling*. Peristiwa resorbsi diikuti deposisi disebut *coupling temporal*, sedangkan besar resorbsi sama dengan deposisi disebut *coupling kuantitatif* (Eriksen *et al*, 1992). Osteoblas juga memproduksi *alkaline phosphatase* dan protein matriks lain, sensitif terhadap hormon paratiroid (PTH),1,25$(OH)_2D_3$ dan kalsiotropik hormon lain. Osteoblas menjadi pipih setelah membentuk matriks dan nukleous menjadi piknotik. Diferensiasi osteoblas ditandai dengan peningkatan aktifitas *alkaline phosphatase* tulang dan sintesis kolagen (Wong, 1992).



Gambar 2.6 Diferensiasi osteoblas (Eriksen *et al*, 1992)

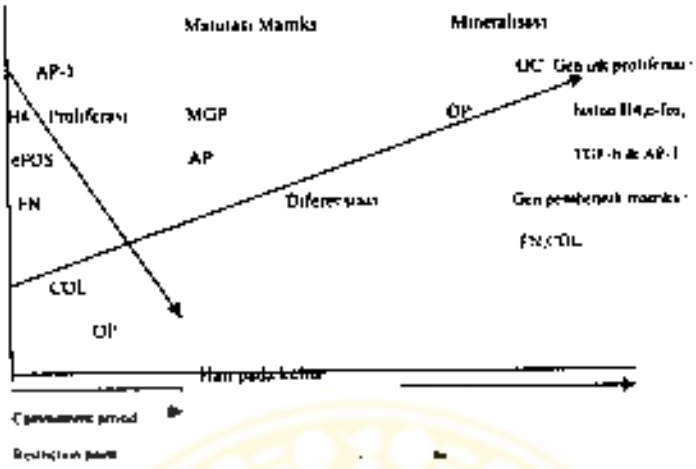
c. Osteoklas

Osteocytic bone resorption atau *osteocytic osteolysis* pertama kali diketahui sekitar 40 tahun yang lalu dimana pada saat itu proses ini dianggap sebagai akibat dari ekspansi lakuna yang ditimbulkan oleh osteosit yang mengelilingi tulang. Osteoklas adalah sel besar berinti banyak. Fungsinya menghancurkan matriks tulang karena lisosom menghasilkan katepsin dan fosfatase. Sel ini cenderung memompakan ion H ke luar sel. Osteoklas termasuk keluarga monosit berasal dari garis sel stem *haematopoetik*. Dalam sitoplasma dekat inti dijumpai banyak mitokondria, komplek Golgi, sentriol sedangkan sitoplasma dekat membran ada filamen aktif yang menyebabkan membran osteoklas berlekuk waktu menempel pada tulang. Aktifitas resorpsi osteoklas berhenti jika membran sel tidak berlekuk-lekuk lagi tapi mengkerut. Sel pindah menuju ruang sumsum untuk degenerasi, desintegrasi dan hibernasi. Sel prekursor osteoklas terdapat pada sumsum tulang dan sirkulasi darah. Jika mengalami rangsangan, sel prekursor ini berproliferasi dan menyatu membentuk sel besar berinti banyak menjadi osteoklas. Osteoklas mempunyai tiga sampai sepuluh inti, mitokondria dan lisosom dalam jumlah sangat banyak. Osteoklas jarang ditemukan pada keadaan normal namun ditemukan pada

permukaan endosteum, havers dan periosteum. Pada tulang spongiosa, osteoklas terletak di cekungan yang disebut *lacuna Howship*. Di daerah kortikal,osteoklas membuat rongga penyerapan, membentuk kanal di dalam tulang, ujung terdepannya disebut *cutting cone*. Osteoklas aktif di dalam sitoplasma dipenuhi mitokondria untuk menyediakan energi guna menyerap tulang. Bagian osteoklas perusak matriks adalah *ruffled* atau *brush border*. Di sekitar *brush border* sitoplasma bebas dari organela yang disebut *clear zone*. Osteoklas merusak matriks tulang dengan sangat efisien, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks endosom yang mengandung pompa proton pada membran akan menurunkan pH dari 7 menjadi 4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan selanjutnya untuk merusak matriks, osteoklas akan mengeluarkan protease. Setelah osteoklas selesai menyerap, tulang akan membelah menjadi sel mononuklear.

Dengan penakaian mikroskop elektron, saat ini dapat diketahui bahwa resorpsi tulang ditandai oleh perubahan oleh karena degradasi matriks tulang yang dilakukan oleh osteoklas. Sejalan dengan berkembangnya pengetahuan diketahui bahwa terdapat sel lain yang berperan dalam proses resorpsi tulang seperti monosit dan makrofag. Mereka mempunyai prekursor yang sama dengan osteoklas. Bahkan saat ini diperkirakan bahwa osteoblas berperan sebagai sel penolong *(helper cells)* dalam proses resorpsi tulang dengan mempersiapkan permukaan tulang untuk aktifitas enzim - enzim osteoklas (Mundi, 1993). Resorpsi tulang merupakan komponen integral dari modeling skeletal, penyembuhan patah tulang dan remodeling. Resorpsi tulang itu sendiri merupakan suatu kebalikan dari proses *bone formation* dimana akan terjadi suatu hidrolisis dari kolagen dan disolusi mineral tulang. Sel yang bertanggung jawab terhadap proses ini adalah

osteoklas. Jumlah dari tulang yang diabsorbsi bergantung kepada jumlah keberadaan dan aktifitas dari osteoklas (Keith, 1991).



COL : *collagen* MGP : *matrix glutamic acid* OP : osteopontin

AP : *alkaline phosphatase* OC : osteokalsin FN : fibronektin

Gambar 2.7 Pengaruh gen terhadap proliferasi dan diferensiasi pada kultur osteoblas (Buckwalter *et al*, 2000)

d. Osteosit

Osteosit berasal dari osteoblas dan terjadi pada akhir proses mineralisasi karena terhimpit oleh ekstraseluler matriks. Osteosit merupakan 90% dari sel tulang,terletak di antara matriks tulang yang mengalami mineralisasi. Osteosit mempunyai satu inti, jumlah organel dan volume sitoplasma yang bervariasi. Osteoblas berhubungan dengan osteosit lain melalui cabang sitoplasma. Sitoplasma osteoblas memanjang dan bercabang, badan sel berbentuk elips dan menyerupai lensa. Hubungan antar sel ini menjangkau permukaan luar dan dalam tulang, dan membuat tulang menjadi sensitif terhadap pengaruh tekanan, mengontrol pergerakan ion dan mineralisasi. Hubungan osteosit, osteoblas dan *bone lining cells* memungkinkan rangkaian sel mengatur pembentukan tulang melalui pengaturan aliran ion antara matriks tulang dengan cairan ekstravaskular.

Walau mampu mensekresi osteoid sedikit namun tidak dapat membelah diri lagi. Guyton (1991) menyatakan bahwa membran osteoid atau osteoblas cenderung memompakan kalsium dari cairan tulang ke cairan ekstraseluler, sehingga terjadi osteolisis atau terlepasnya Kalsium dan Fosfor dari tulang tanpa disertai penghancuran bahan organiknya. Sedangkan osteosit sensitif terhadap tekanan mekanik. Tekanan mekanik akan merangsang osteosit memproduksi IGF_1 yang akan merangsang *resting osteoblast* menjadi osteoblas aktif.

c. *Bone lining cells*

Bone lining cells disebut juga *resting osteoblas* atau *surface osteosit*. Sel ini berbentuk memanjang atau pipih, sitoplasma menembus matriks tulang untuk berhubungan dengan osteosit. Sel ini mempunyai sedikit sitoplasma dan organel. Jika dirangsang dengan hormon paratiroid, sel ini akan berkontraksi dan mengeluarkan enzim *collagenase* untuk membuang lapisan osteoid sehingga memudahkan kerja ostcoklas untuk menyerap tulang.

2.10 Matriks Tulang

Matriks tulang tersusun atas 25% matriks organik ,65% anorganik dan 10% air. Komponen organik terbesar adalah kolagen sebagai pembentuk tulang dan penahan regangan. Komponen anorganik atau mineral sebagai penahan beban tekanan (Buckwalter *et al*, 1995). Matriks organik terdiri dari molekul kolagen dan sebagian kecil gel polisakarida terhidrasi dan cairan ekstraseluler. Matriks ini semula agak cair sehingga memungkinkan difusi nutrien, metabolit dan hormon. Setelah diendapi garam mineral, matriks akan menjadi keras. Matriks organik terdiri atas kolagen tipe I, sebagian kecil

kolagen tipe V dan tipe XII. Kolagen merupakan 90% dari keseluruhan matriks organik, 10% glikoprotein non kolagen dan proteoglikan spesifik tulang. Protein non kolagen ikut menyusun matriks dan berperan pada proses mineralisasi dan mempengaruhi perilaku sel tulang. Protein non kolagen terdiri atas osteokalsin, osteonektin, sialoprotein tulang, fosfoprotein tulang dan proteoglikan. Fungsi spesifik molekul ini belum jelas, tapi sebagian mempengaruhi mineralisasi. Matriks tulang mengandung faktor pertumbuhan yang terdiri dari famili TGF (*Transforming Growth Factor*)$_\beta$, IGF_1, IGF_2 BMP, PDGF, IL (*Interleukine*)$_1$, IL_6 dan CSF (*Colony Stimulating Factor*) yang berperan dalam mengatur fungsi sel tulang. Matriks anorganik mempunyai dua fungsi pokok yaitu sebagai cadangan ion dan pembuat tulang menjadi struktur yang kuat dan keras. Menurut Guyton (1991) bahan organik pada tulang yang utama adalah kalsium dan fosfat. Selain itu ada $Mg^{2+}Na^{2+}K^{2+}$ dan $CO3^{2-}$. Sebagian besar kalsium dan fosfat akan membentuk kristal hidroksiapatit [$3Ca_3(P04)_2.Ca(OH)_2$] sedang sisanya tetap *amorf* sebagai buffer kalsium dalam darah. Kalsium tubuh 99% terdapat dalam tulang, 85% fosfor, 40-60% natrium dan magnesium dalam kristal mineral tulang. Perubahan kalsium menjadi hidroksiapatit membutuhkan waktu beberapa minggu hingga beberapa bulan. Bronner dan Worrell (1991) menyatakan bahwa kalsifikasi matriks ini berlangsung dengan bantuan osteonektin sebagai pengikat kolagen dan hidroksiapatit. Melalui cadangan ionnya, matriks anorganik membantu mempertahankan konsentrasi cairan ekstraseluler, mempertahankan fungsi fisiologis seperti rangsang saraf dan kontraksi otot.

a.Kolagen

Kolagen tipe I membuat tulang mempunyai kekuatan regangan (*tensile strength*). Kolagen tersusun sebagai *triple helix tropocollagen* yang terdiri dari dua rantai α_1 dan

satu rantai α_2. Molekul kolagen tersusun lurus memanjang dari bagian kepala sampai ekor, membentuk serabut kolagen. Diantara ujung molekul terdapat celah atau *hole zone* sehingga terdapat pori sejajar yang merupakan tempat kalsifikasi. Susunan ini menyebabkan kolagen mempunyai kelarutan rendah dan kekuatan regang tinggi.

b. Protcoglikan

Proteoglikan berikatan dengan faktor pertumbuhan lokal dan serabut kolagen. Protcoglikan berperan dalam menambah kekuatan menahan tekanan, penyedia ruang bagi pertumbuhan tulang dan menghambat mineralisasi.

c. Osteokalsin

Osteokalsin merupakan produk spesifik dibandingkan berbagai produk osteoblas lainnya karena osteokalsin tidak disintesis oleh jaringan lain. Osteokalsin diproduksi oleh osteoblas dan merupakan penyusun 10-20% protein tulang. Fungsinya terkait dengan remodeling tulang. Sintesis osteokalsin meningkat karena $1,25(OH)_2D_3$ dan dihambat oleh hormon paratiroid (PTH). Osteokalsin disebut juga Gla protein tulang yaitu protein berberat molekul rendah (5700 Da) dan merupakan protein nonkolagen terbanyak dalam tulang. Sintesis protein ini dipengaruhi oleh vitamin K dan A. Kedua vitamin ini terlibat dalam pengaturan gen untuk sintesis osteokalsin. Osteokalsin merupakan penanda diferensiasi osteoblas (Hauschka, 2001). Osteokalsin dinyatakan sebagai penghambat mineralisasi tulang yang berlebihan (Wolff, 1997) dan penghambat pembentukan matriks tulang yang berlebihan (Ducy *et al*, 1994). Pada penyembuhan patah tulang, osteokalsin meningkat pada hari ke 9-11 dan mencapai puncak pada hari ke-15 (Buckwalter *et al*, 2000).

d. Osteonektin

Osteonektin diekresi oleh platelet, osteoblas dan osteoklas. Osteonektin berperan dalam pengaturan kalsium dan organisasi matriks seperti pengikat kolagen, mempunyai afinitas tinggi terhadap kalsium dan hidroksiapatit dan melokalisasi kristal yang dibentuk oleh vesikel matriks. Osteonektin berfungsi sebagai *regulator* sel pada proses *tissue morphogenesis*. Pada proses penyembuhan patah tulang, osteonektin muncul pada hari ke 9-15 yaitu awal osifikasi,bersama ekspresi kolagen tipe I dan tipe V.

c. Osteopontin

Osteopontin adalah matriks protein ekstraseluler yang berperan pada ikatan sel dengan matriks tulang *(cellular attachment)* seperti integrin. Tersusun atas asam amino Arg-Gly-Asp, protein ini dapat dikenali oleh molekul permukaan sel yaitu integrin. Osteopontin berinteraksi dengan CD_{44} pada remodeling tulang dalam bentuk interaksi ligan-reseptor.

f. Sitokin dan faktor pertumbuhan

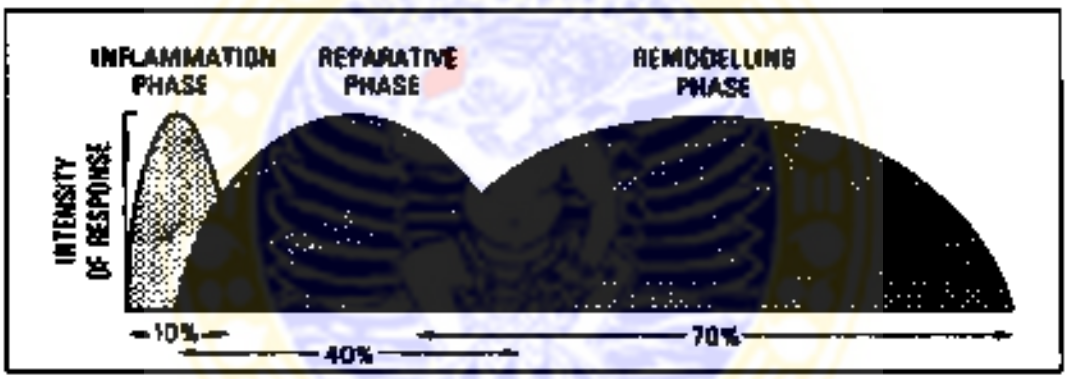
Berbagai faktor pertumbuhan yang terdapat dalam matriks mempunyai reseptor yang sesuai terdapat pada membran plasma. Setiap faktor pertumbuhan mempunyai karakter reseptor tertentu ligan spesifik dan *post binding signalling*. Rangsangan faktor pertumbuhan pada osteoblas mengikuti jalur protein G (Hauseka, 1992). TGF_β merupakan faktor pertumbuhan yang terbanyak ditemukan pada matriks tulang. TGF_β dikeluarkan pada saat resorpsi tulang, berfungsi merangsang aktifitas osteoblas untuk meningkatkan sintesis kolagen. Selain meningkatkan aposisi tulang, TGF_β menghambat diferensiasi osteoklas. Aktifitas TGF_β dikontrol oleh hormon paratiroid (PTH), IL_1 dan 1,25 - dihidroxivitamin D. TGF_β adalah stimulator terkuat pada pembentukan tulang,

didapatkan dalam kadar 0,1 mg/kg dan tulang merupakan sumber terbesar TGF_β di dalam tubuh. TGF_β merupakan protein homodimer 25 kDa, mempunyai aktifitas mitogenik dan kemotaktik terhadap osteoblas. Selain berasal dari sel tulang, TGF_β diproduksi oleh sel platelet, sel limfosit T, sel limfosit B dan makrofag (Mundi, 1993). TGF-β mengatur proliferasi sel, diferensiasi dan sintesis matriks ekstraseluler. Pada proses penyembuhan patah tulang TGF_β berperan untuk memulai reparasi, kondrogenesis dan pembentukan tulang, merangsang ekspresi gen untuk pembentukan kalus, merangsang proliferasi sel mesenkim dan diferensiasi osteoblas serta kondrosit (Joyce *et al*, 1990). IGF yang terdapat pada jaringan tulang adalah IGF_1 dan IGF_2. Sintesis IGF_1 dirangsang oleh PTH (*Paratiroid Hormone*) dan prostaglandin E_2 (PGE_2) dan dihambat oleh kortiso. IGF_1 meningkatkan aposisi tulang, melalui peningkatan replikasi preosteoblas dan sintesis kolagen dan penurunan resopsi tulang. Secara umum IGF_1 berperan dalam mempertahankan masa tulang normal. IGF_1 identik dengan somatomedin C, mempunyai berat molekul 7.6 kD. IL_1 merupakan perangsang utama untuk resopsi tulang, merangsang mitogenik prekursor osteoklas, meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoklas. Fungsi ini diperkuat oleh TNF_α yang bekerja secara sinergi dengan PTH dan peptida terkait dengan PTH. IL_6 merupakan protein fase akut, memperkuat resorpsi tulang bersama IL_1 dan TNF_α (*Tumor Necrosis Factor*) melalui rangsang mitogenesis dari osteoklas. Sintesis IL_6 dipengaruhi oleh PTH, IL_1 dan 1,25 $(OH)_2$. BMP adalah anggota superfamili TGF_β, merangsang diferensiasi sel progenitor menjadi osteoblas dan kondroblas, berperan dalam pembentukan tulang ektopik. BMP terdapat pada matriks tulang dan dilepas bersama aktifitas resorpsi pada daerah cedera. BMP mempunyai berat molekul rendah (19 KD), didapatkan dari pemurnian atau ekstraksi proteoglikan dari

demineralisasi tulang. BMP sebagai *cytodifferentiating growth faktor* (Simmons dan Grynpas, 1992).

2.11 Proses Penyembuhan Patah Tulang

Penyembuhan patah tulang merupakan suatu proses regenerasi, dimana terjadi proses penggantian tulang yang rusak dengan jaringan tulang baru (Appley *et al*, 1993; Loveridge 1999; Kalfas, 2001). Penyembuhan patah tulang merupakan proses yang sangat komplek, mencakup sejumlah proses seluler dan fisiologi. Proses ini dimulai dari tahap inflamasi, kemotaksis, proliferasi dan diferensiasi serta berakhir dengan terbentuknya struktur.



Gambar 2.8 Skematis fase *bone healing* (Nelson, 2000)

Proses penyembuhan patah tulang menurut Buckwalter *et al* (2000) melalui 6 fase yaitu : (1) Hematom dan inflamasi, (2) Angiogenesis dan pembentukan tulang rawan (*cartilage formation*), (3) Kalsifikasi tulang rawan, (4) *Cartilage removal, (5)* Pembentukan tulang (*bone formation)* dan (6) Remodeling. Secara singkat proses penyembuhan patah tulang terbagi atas tiga fase.yaitu (1) fase inflamasi, (2) fase reparasi, dan (3) fase remodeling. Ketiga fase berlangsung sesuai teori *regulatory accelerating phenomenon*, yaitu serangkaian kegiatan seluler yang diatur oleh mediator berupa protein

lokal dan datang melalui aliran darah, bekerja sebagai autokrin,parakrin dan endokrin. Mediator akan menyebabkan sel memulai perubahan biokimia sehingga terjadi reaksi penyembuhan.

a. Fase inflamasi

Pada patah tulang terjadi kerusakan pembuluh darah, iskemia dan kematian sel. Besar nekrosis tulang terjadi sebanding dengan iskemia disebabkan oleh kerusakan pembuluh darah intrakortikal, medular dan sistem kapilar periosteum. Jaringan lunak dan sumsum tulang rusak, peristeum dan fragmen tulang terlepas dari keutuhan. Osteosit mati melepaskan enzim lisosom akan merusak matriks organik kolagen maupun non kolagen. Hematoma dan inflamasi terjadi, diikuti vasodilatasi dan edema jaringan sekitar makin meluas. Elemen dalam darah membentuk bekuan, terdiri dari deposisi platelet dan terbentuknya jala -jala fibrin. Sel baru datang dari sumsum tulang, endosteum dan lapisan periosteum. Pada inflamasi makrofag, lekosit polimorfonuklear dan sel mastosit akan muncul di daerah luka. Makrofag dan *giant cell* akan membersihkan jaringan nekrotik dan menyerap hematoma, osteoklas berasal dari sistem hematopoetik dan monosit akan menyerap tulang mati.

Sel prekusor mesenkim dan sel osteoprogenitor berproliferasi dan migrasi ke daerah luka, otot, sumsum tulang, endosteum dan lapisan periosteum. Sel mesenkim akan menjadi sel fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Sel endotel dan otot polos akan migrasi sepanjang celah fibrin akan membentuk kapiler dan jaringan granulasi. Sel prekusor menjadi osteoblas, fibroblas dan kondroblas akan memproduksi osteoid, kolagen dan tulang rawan.

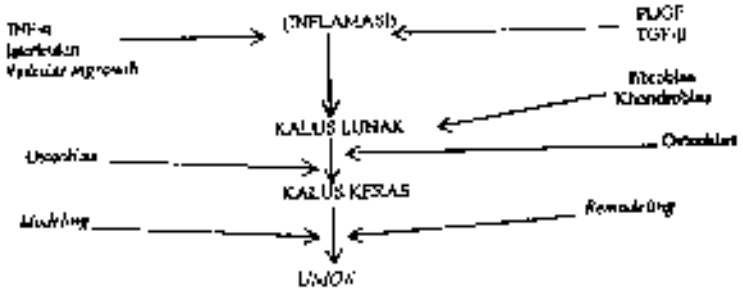
b. Fase reparasi

Pada tahap reparasi dimulai dengan pembentukan jaringan dasar tulang atau tulang rawan, tahap reparasi merupakan tahap penting karena akan menentukan kelangsungan rangkaian proses penulangan. Pada tahap awal kolagen tipe I, II dan III akan membentuk kalus lunak. Kalus lunak merupakan jaringan ikat, tulang rawan dan tulang hasil sintesis matriks dari osteoblas, fibroblas dan kondroblas. Pembentukan kalus lunak dipengaruhi oleh faktor lokal, yaitu tingkat pergeseran tulang, vaskularisasi, kerusakan jaringan lunak dan kontaminasi. Kolagen tipe I akan mendominasi akan membentuk jaringan untuk memungkinkan terjadinya mineralisasi membentuk kalus keras. Proses pembentukan tulang terjadi melalui dua jalur yaitu melalui osifikasi endokondral dan osifikasi intra membran. Proses osifikasi endokondral melibatkan kondrosit dalam menjembatani proses pembentukan tulang. Proses endothorakal dan intramembran osifikasi terjadi pada penyembuhan patah tulang secara bersamaan. Pada imobilisasi patah tulang tidak stabil menyebabkan angiogenesis terhambat, sehingga menimbulkan daerah hipovaskular dan mempunyai tekanan oksigen rendah. Tekanan oksigen rendah menyebabkan sel mesenkim berdiferensiasi membentuk kondrosit. Penggantian kondrosit dengan osteoblas terjadi bersamaan dengan kematian kondrosit melalui proses *programmed cell death* atau apoptosis (Lee, 1998). Osifikasi endokondral terjadi karena sel mesenkim berdiferensiasi menjadi kondrosit membentuk matriks tulang rawan. Tulang rawan hialin akan mengalami mineralisasi. Tulang rawan akan diresorpsi oleh osteoklas, sel osteoprogenitor berdiferensiasi menjadi osteoblas akan membentuk matriks tulang, menggantikan tulang rawan (Buckwalter *et al*, 1995).

c. Fase remodeling

Proses remodeling tulang ini terjadi karena (Keith, 1991) : (1). Mempertahankan homeostasis kalsium dengan mengambil kalsium yang tersimpan dalam tulang, (2) Memperbaiki kerusakan jaringan *(micro fractures)*, (3) Mengatur struktur dan massa tulang sebagai respon terhadap perubahan didalam proses mekanis *(mechanical loading)*. Fase ini merupakan yang terakhir dan terlama yang ditandai dengan perubahan lambat bentuk patah tulang kalus dan tulang (jika ada deformitas residual) dan restorasi menjadi berkekuatan normal kembali. Remodeling patah tulang paralel dengan fenomena deposisi-resorpsi (Wendeberg, 1961). Resorpsi osteoklastik dari tulang trabekular muncul pada waktu yang sama dengan struktur baru trabekula. Tulang yang kompak dari korteks secara lambat diperbaiki menjadi susunan osteonal. Secara radiografis, kalus menurun ukurannya saat korteks terbentuk kembali dan mencapai integritas struktural. Deformitas *angular* secara lambat menurun dan menghilang saat tulang terbentuk pada permukaan konkaf dan pindah dari permukaan konfek. Tampak penurunan ekspresi gen mRNA setelah 4-6 minggu setelah patah tulang. Penurunan ini tampak pada tikus pada semua usia dan tergantung pada status kesembuhan patah tulangnya.

Penurunan ekspresi gen ini berdampak pada melambatnya proses penyembuhan patah tulang (Meyer *et al*, 2001).



Gambar 2.9 Skema penyembuhan patah tulang

2.12 Teknologi *cDNA Microarray* Dan Analisis *Gene Chips*

cDNA (complementary Deoxy Ribo Nucleic Acid) microarray adalah perangkat dengan kekuatan yang tidak dapat diperkirakan untuk studi tentang rangkaian gen, struktur dan ekspresinya. *cDNA microarray* secara cepat menjadi metode terpilih untuk mendeteksi profil ekspresi gen. Menggunakan *microarray*, ekspresi ribuan gen dapat dimonitor secara simultan dalam beberapa sampel biologis yang pola ekspresinya dapat dianalisis lebih lanjut. *cDNA microarray* mampu mengidentifikasi pola profil ekspresi gen lebih dari sepuluh ribu gen dalam satu eksperimen. Metode ini memiliki sensitifitas yang tinggi dan spesifitas pendeteksian yang sangat bagus, selektifitas antara untaian asam nukleat yang saling melengkapi. (Duggan *et al*, 1999). Pada eksperimen *array*, banyak gen dengan polinukleotida spesifik yang diturunkan dari ujung 3' transkripsi RNA secara individual di-*array* pada matriks tunggal. Matriks ini yang kemudian secara simultan dicelupkan ke *probe* dengan *fluorescently tagged cDNA* yang mewakili *total RNA pool* dari sel yang diuji dan sel pembanding. *cDNA array* dihasilkan dengan menerjemahkan titik-titik produk PCR (sekitar 0,6-2,4 kb) yang merepresentasikan gen spesifik ke dalam matriks. Biasanya *array* menggunakan cetakan yang murni sehingga

kontaminan selular tidak akan mempengaruhi hasil *array*. Produk PCR sebagian dimurnikan dengan pengendapan, filtrasi dengan gel atau keduanya untuk menghilangkan garam , detergen, primer PCR dan protein yang tidak diinginkan. Gelas dan membran, tiap elemen *array* diberikan deposisi sedikit nanoliter produk PCR yang sudah dimurnikan, biasanya sekitar 100-500 µg/ml. Pencetakan dilakukan oleh robot yang menandai dengan titik tiap produk gen ke dalam *matrice*. Peralatan untuk *printing* tidak menyerupai pena biasa, biasanya berupa tabung kapiler dengan tekanan yang rendah dan konstan. Tipe membran yang biasa digunakan adalah *nitrocellulose* dan *charged nylon commercial varieties* yang digunakan untuk berbagai uji *blotting*. *Array* yang menggunakan gelas seringkali dibuat *slide* mikroskop yang mempunyai kadar fluoresensi yang rendah. *Array* jenis ini diselubungi *poly-lysine*, *amino silanes* atau *amino reactive-silanes* yang memperluas hidrofobisitas dari *slide* dan perlekatan deposit DNA (Schena *et al*, 1996). *Array* jenis ini juga membatasi penyebaran *droplet spot* DNA pada *slide*. Pada sebagian besar kasus, DNA berikatan silang dengan matriks oleh iradiasi ultraviolet. Setelah fiksasi, *residual amines* pada permukaan *slide* bereaksi dengan *succinic anhydride* untuk mengurangi *positive charge* pada permukaannya. Pada tahap akhir, beberapa persentase deposit DNA membuat utas tunggal dengan panas atau alkali (Cheung *et al*, 1999). Sasaran *array* adalah kumpulan mRNA sel yang sudah dilabel. Umumnya, digunakan *reverse transcription* dengan primer oligo-dT. Seringkali, RNA total (dibandingkan mRNA yang discleksi dari oligo-dT) yang dilabel, untuk memaksimalkan jumlah pesan yang diperoleh dari jaringan tertentu. Kemurnian RNA merupakan faktor penting bagi proses hibridisasi, sebagian menggunakan *fluorescence*, seperti protein seluler, lipid, dan karbohidrat yang dapat menghasilkan ikatan non

spesifik yang *significant* antara label *fluorescence* dengan permukaan *slide*. Untuk *fluorescence* yang adekuat, total RNA yang dibutuhkan tiap sasaran, tiap *array* adalah 50-200 µg (2-5 µg yang dibutuhkan jika menggunakan poly(A)mRNA). Untuk mRNA sebagai transkrip tunggal tiap sel (sekitar 1 transkrip per 100.000), aplikasi sasaran didapat dari 100 µg dari RNA total lebih dari 800 mm^2 area hibridisasi (mengandung 200 µm diameter *probe* yang menghasilkan 300 trankrip yang cukup untuk memungkinkan terjadinya hibridisasi). Kemudian, jika *fluorescently tagged transcript* sekitar 600 bp, mempunyai sekitar 2 *fluor tag* per 100 bp dan dihibridisasi- semuanya- ke dalam *probe*, sekitar 12 *fluor tag* akan menghasilkan 100 μm^2 *scanned pixel* dari probe. Penatalaksanaan tingkat tinggi elemen detektor dan sinyal gambar yang *crispy* yang dihasilkan dari penecetakan dengan robot dan *confocal imaging of fluor*- memungkinkan *array* membuat data gambar yang dapat diekstraksi secara *highly developed*, dengan prosedur proses digital. Lokasi kisi sasaran siap dibaca selapis di atas gambar. *Local sampling* dari dasar dapat digunakan untuk menganalisis ambang batas dari sinyal sebenarnya yang berlebihan. Metode morfologi matematika dapat digunakan untuk memprediksi bentuk seperti apa dan posisi sinyal hibridisasi. Dengan aplikasi metode ini memungkinkan secara akurat mendeteksi sinyal yang lemah dan mengekstraksi nilai tengah intensitas di atas nilai dasar sasaran (Chen *et al*, 1997). Kemampuan *cDNA microarray* untuk menggambarkan elemen demi elemen normalisasi dengan dua warna deteksi *fluorescence* dan menggunakan probe tunggal yang *highly specific immobilized* dapat menyajikan pengukuran yang paling akurat tentang kadar ekspresi relatif. Keseluruhan metode *array* membutuhkan data dasar untuk manajemen informasi mengenai gen yang direpresentasikan pada *array*, hasil utama hibridisasi dan konstruksi

algoritma untuk memungkinkan menguji keluaran eksperimen dengan *array* tunggal atau ganda (Chen *et al*, 1997 ; Ermolaeva *et al*, 1998). Metode yang menggunakan analisis data *microarray* lebih *highly constrained* (seperti protein atau perbandingan rangkaian asam amino) daripada kadar transkripsinya. Tingkat analisis *array* dengan data yang sangat luas menyajikan perspektif baru mengenai *genetic networks*. Perbandingan profil ekspresi tidak diragukan lagi menyajikan gambaran yang sangat berguna mengenai patogenesis molekuler dari berbagai penyakit (Khan *et al*, 1998; Debouck dan Goofellow, 1999). *Microarray* merupakan tehnologi yang canggih dalam penelitian biologi molekuler yang memungkinkan pengamatan ekspresi gen hingga puluhan ribu dalam waktu bersamaan. Peneliti menggunakan *microarray* untuk memahami aspek fundamental dari pertumbuhan dan perkembangan dan mempelajari penyebab genetik dari berbagai penyakit. *Microarray* sangat bermanfaat untuk survey sejumlah besar gen secara cepat atau contoh sampel yang tersedia sangat sedikit. *Microarray* digunakan untuk menguji ekspresi gen dalam sampel tunggal atau membandingkan ekspresi gen pada dua tipe sel atau jaringan yang berbeda, misal pada jaringan sehat dan sakit. *Microarray* telah digunakan untuk meneliti bidang yang berkaitan dengan penyakit pada tulang sejak 1997, saat Heller *et al* mengaplikasikan tehnik ini untuk meneliti gen yang terlibat pada rheumatoid arthritis. Setelah itu *microarray* banyak digunakan untuk mempelajari apek osteogenesis dan profil ekspresi gen dari jaringan osteoporosis. *Microarray* digunakan untuk mempelajari metabolisme tulang dan osteogenesis pada kultur sel manusia dan tikus. *Microarray* sangat membantu untuk menemukan gen yang ingin diteliti. Seperti halnya yang dilakukan Theilhaber *et al* tahun 2002 yang yang menemukan 176 gen baru yang berhubungan dengan osteogenesis. Beck *et al*, tahun 2001

juga melakukan analisis *array* gen fase diferensiasi *osteoblast mouse calvarial-derived MC3T3-E1*. Raouf dan Seth pada tahun 2002 meneliti ekspresi 8700 gen yang diketahui dan tidak diketahui selama proliferasi (hari 3) dan mineralisasi (hari ke-34) dari *MC3T3-E1 osteoblast-like cells*. Terdapat 8600 gen yang mempunyai signal yang dapat diukur dan 252 gen yang secara berbeda terekspresi selama fase proliferasi dan mineralisasi kemudian dipilih untuk dipelajari lebih lanjut. Pada penelitian ini digunakan cDNA *microarray gene chip* dari *Affymetrix untuk* mengidentifikasi ekspresi dari 22690 gen di bawah kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan 48 jam. Dari 22690 gen tersebut dipilih 5 gen yaitu : Slc40A1 (*iron regulated transporter*), CD71 (*transferrin receptor*), Serpin B9 (*serine protease inhibitor B9*), COX-2 (*glucocorticoid regulated inflammatory prostaglandine GH synthase*) dan Gadd45a (*growth arrest DNA damage inducible 45 alpha*), ScyA7 (*Small inducible cytokine A7*) dan CC1(*Coil coiled forming protein*) untuk diteliti lebih lanjut.

Gene Chip Mouse Expression Set 430 terdiri dari 2 *GeneChip array* yang terdiri dari 45000 *set probe* dan 981228 gambaran oligonukleotida yang berbeda yang mencakup 39000 transkrip dan *varian*, termasuk 34000 gen tikus yang *well substantiated*. Rangkaian yang digunakan dalam rancangan *array* diseleksi dari *GenBank,dbEST*, dan RefSeq. *Cluster* rangkaian diciptakan dari data dasar UniGene (Build 107, Juni 2002). *GeneChip Mouse Expression Array 430A* merupakan representasi dari data dasar rangkaian RefSeq dan set probe yang berkaitan dengan rangkaian yang sebelumnya telah direpresentasikan pada *GeneChip Mouse Genome U74Av2 Array*. *GeneChip Mouse Expression Array 430B* mengandung *set probe* yang ditemukan dari *cluster* rangkaian EST dan non-EST. *Probe* oligonukleotida disintesis secara in situ pada *array*. 11 pasang

probe oligonukleotida digunakan untuk memastikan kadar transkripsi tiap rangkaian dalam *GeneChip* ini (Affymetrix, 2003).

2.13 *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

PCR adalah tehnik amplifikasi urutan DNA spesifik dengan perluasan primer secara simultan dari utas komplementer DNA (Taylor, 1991). PCR menggunakan dua primer oligonukleotida yang terhibridisasi pada utas yang berlawanan dan mengapit urutan sasaran DNA yang diamplifikasi. Elongasi primer dikatalisa oleh *Taq DNA Polymerase*, *polymerase DNA* yang stabil pada pemanasan yang diisolasi dari *Thermophilic eubacterium Thermus aquaticus* (Saiki *et al*, 1985). Siklus bersri yang berulang melibatkan denaturasi, *annealing* primer, dan *extension* primer yang telah di*annealing* oleh *Taq DNA Polymerase* yang dihasilkan pada akumulasi eksponensial fragmen DNA spesifik. Ujung fragmen ditentukan oleh ujung 5' primer. Perluasan primer yang sudah disintesis pada siklus yang diberikan dapat berfungsi sebagai cetakan pada siklus selanjutnya, maka jumlah kopi sasaran DNA menjadi berlipat dua setiap siklus, sehingga 20 siklus PCR menghasilkan sekitar jutaan kopi(2^{20}) sasaran DNA (Ausubel *et al*, 1991 ; Scharf *et al*, 1986).

PCR terdiri dari :

a. Cetakan DNA (sumber DNA genomik, cDNA yang dihasilkan dari RNA dengan RT- PCR, *cDNA libraries* dan *cloned cDNA*).

b. Primer oligonukleotida

c. DNA polymerase yang stabil terhadap suhu.

d. Deoksinukleotida (dNTP): campuran empat nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

e. Buffer yang mengandung Mg^{2+}(dibutuhkan untuk aktifitas polymerase).

Ada 3 tahap utama dalam PCR, yang diulang sebanyak 30-40 siklus. Tahap-tahap ini dilakukan oleh *automatic cycler* yang dapat memanaskan dan mendinginkan tabung reaksi campuran dalam waktu singkat.

a. Denaturasi pada 94°C : selama denaturasi, utas ganda meleleh dan terbuka menjadi utas tunggal DNA, semua reaksi enzimatik berhenti.
b. *Annealing* pada 54°C : Primer berguncang, menyebabkan gerakan Brownian. Ikatan hidrogen terbentuk secara konstan dan pecah antara primer utas tunggal dan cetakan. Ikatan yang lebih kuat bertahan lebih lama dan pada bagian yang kecil dari utas ganda DNA (cetakan dan primer), *polymerase* dapat mencapai dan mulai menyalin cetakan.
c. *Extension* pada 72°C : Ini merupakan suhu ideal bagi *polymerase* untuk dapat bekerja dengan baik. Primer, yang mempunyai sedikit basa penyusun, mempunyai ikatan yang lebih kuat terhadap cetakan, yang dibuat oleh ikatan hidrogen, lalu kekuatan ini memecahkan ikatan tersebut. Basa (komplementer terhadap cetakan) berpasangan dengan primer pada ujung 3'(Erlich, 1992).

2.14 *Primer Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Syarat-syarat penyusunan rangkaian primer (Innis dan Gelfand, 1991) :

1. Panjang primer berkisar antara 17-28 basa
2. Komposisinya 50-60% (G+C)
3. Primer harus berakhir dengan G atau C pada ujung (3'), atau CG atau GC : untuk mencegah *breathing* dari ujungnya dan meningkatkan efisiensi penyusunan primer

4. Tms dianjurkan berkisar antara 55-80°
5. Keberadaan tiga atau lebih C atau S pada ujung 3' dari primer akan merangsang terjadinya *mispriming* pada rangkaian yang kaya akan G atau C (karena stabilitas dari *annealing*) dan ini harus dihindari
6. Ujung 3' primer seharusnya tidak komplementer (misalnya pasangan basa), sebagaimana primer dimer yang berlawanan akan disintesis menjadi produk lain
7. Sifat komplementer dari primer (kemampuan untuk membentuk struktur 2° seperti *hairpins*) harus dihindari

2.15 *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Real Time PCR adalah metode yang memungkinkan pendeteksian *sequence* spesifik dari produk PCR yang terakumulasi dalam "real time" atau waktu yang sesungguhnya selama proses amplifikasi PCR dan mengkuantifikasi jumlah substrat yang ada pada campuran awal PCR sebelum amplifikasi dimulai (http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/realtimepcr.html). Metode ini merupakan langkah yang penting bagi validasi ekspresi data yang dikumpulkan melalui analisa *microarray* ataupun tehnik genomik yang lain. Secara umum, protokol *real time* PCR sama dengan protokol reaksi PCR standart yaitu cetakan (*template*) yang bersih dari kontaminan, desain primer dan optimasi kondisi reaksi. Perbedaannya adalah penggunaan *intercalating agent* seperti SYBR green atau *fluorescent primer* untuk mendeteksi produk PCR (http://www.Realtimeprimers.org).

2.16 *DNA Sequencing*

DNA sequencing adalah penentuan sequence yang tepat dari nukleotida DNA contoh. Metode yang paling populer adalah *dideoxy method*. DNA disintesis dari empat *deoxynucleoside triphosphates*. Formula yang teratas menunjukkan salah satu dari mereka yaitu *deoxythimidine triphosphate* (dTTP). Tiap nukleotida baru ditambahkan ke 3' gugus –OH dari nukleotida terakhir yang ditambahkan. Metode *dideoxy* diperoleh namanya dari perannya melalui nukleotida sintetik yang kekurangan –OH pada 3' atom karbon. *Dideoxynucleotide* (*dideoxythymidine triphosphate*-ddTTP) dapat ditambahkan pada utas DNA yang sedang "tumbuh" namun terjadi pemberhentian pemanjangan rantai (*chain elongation stops*) karena tidak adanya 3' –OH bagi nukleotida selanjutnya yang bias ditambahkan. Alasan inilah yang menyebabkan metode *dideoxy* disebut juga *chain termination method*. DNA yang akan di"*sequence*" adalah dari utas tunggal.

Cetakan DNA terdiri dari :

- Campuran empat (deoxy) nukleotida yang normal dalam jumlah yang besar :

  ☼ dATP ☼ dGTP ☼ dCTP ☼ dTTP

- Campuran empat *dideoxynucleotides*, dengan jumlah terbatas dan masing-masing dilabel dengan "*tag*" yang memancarkan warna yang berbeda yaitu :

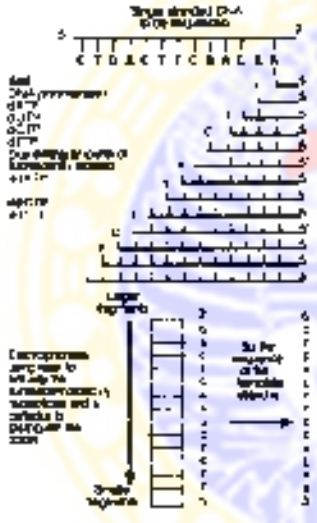
  ☼ ddATP ☼ ☼ ddCTP ☼ ddTTP

- DNA polymerase I

Dengan tersedianya empat nukleotida normal, maka pemanjangan rantai (*chain elongation*) berjalan normal sampai, secara kebetulan, DNA polymerase memasuki *dideoxynucleotide* (yang tampak sebagai huruf yang berwarna) ke dalam *deoxynucleotide* (yang digambarkan sebagai garis vertikal). Jika rasio nukleotida normal terhadap *dideoxy*

version cukup tinggi, beberapa utas DNA akan dengan suksesnya bertambah beberapa ratus nukleotidanya sebelum *dideoxy version* menghentikan proses. Pada akhir periode inkubasi, fragmen dipisahkan oleh panjangnya dari yang terpanjang ke yang terpendek. Resolusi cukup baik jika perbedaan satu nukleotida cukup untuk memisahkan utas tertentu dari utas berikutnya yang lebih pendek atau lebih panjang. Tiap empat *dideoxynucleotide* memancarkan warna yang berbeda saat diilluminasi dengan sinar laser dan *scanner* otomatis yang mengeluarkan hasil cetak dari *sequence* tersebut.

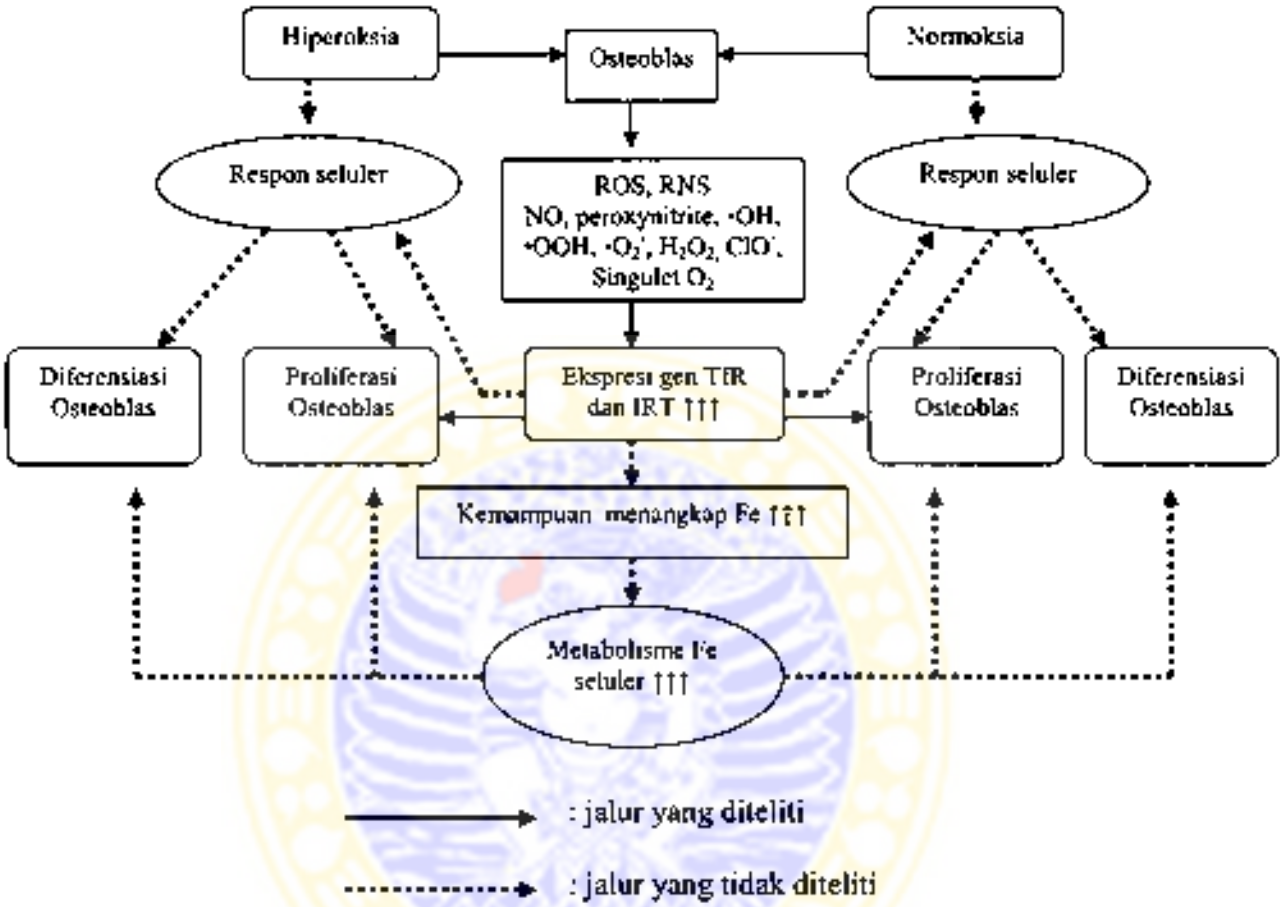
(http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html)



Gambar 2.10 Proses *DNA sequencing*

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL



Hiperoksia dapat mempengaruhi fungsi sel dan mempercepat aktivitas osteoblas. Hiperoksia menghasilkan bentukan oksigen reaktif (ROS – *superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singulet oxygen*) dan nitrogen reaktif (RNS - *nitric oxide, peroxyitrite*). Senyawa oksigen dan nitrogen reaktif ini selain menghasilkan respon seluler juga mungkin mempunyai peran dalam *cell signaling* dan pengaturan ekspresi gen. Perubahan konsentrasi oksigen dapat mengatur ekspresi gen tertentu, misalnya pada gen yang berperan dalam metabolisme Fe seperti gen reseptor transferrin dan gen *iron*

regulated transporter yang cukup penting peranannya dalam proliferasi dan diferensiasi sel. Osteoblas mempunyai mekanisme yang sensitif terhadap konsentrasi oksigen sehingga perubahan pada suplai oksigen diharapkan akan diterjemahkan ke dalam perubahan metabolisme sel. Fe sebagai *trace element* yang cukup penting bagi metabolisme sel terutama pada pertumbuhan sel. Gen yang cukup penting dalam homeostasis Fe adalah reseptor transferrin dan *iron regulated transporter*. Status oksidatif sel yaitu regulasi naik (*upregulated*) atau turun (*downregulated*) dari gen dalam tubuh termasuk salah satu faktor yang mempengaruhi keseimbangan Fe seluler. Keterlibatan produk gen yang teregulasi naik atau turun utamanya pada gen Fe dalam hal ini adalah reseptor transferrin dan *iron regulated transporter* akan berkaitan dengan perubahan fungsi dasar sel, seperti proliferasi dan diferensiasi sel. Peningkatan konsentrasi oksigen (hiperoksia) dapat meningkatkan bentukan ROS dan RNS yang berkaitan dengan peningkatan ekspresi gen Fe yaitu reseptor transferrin dan iron regulated transporter. Reseptor transferrin dan iron regulated transporter berperan penting dalam sirkulasi dan transportasi Fe. Semakin tinggi tingkat pengekspresian kedua gen ini dapat dikatakan semakin banyak Fe yang dapat ditangkap oleh sel. Semakin banyak Fe yang dapat ditangkap oleh sel maka metabolisme Fe seluler akan semakin meningkat. Fe memegang peran penting dalam metabolisme semua sel, terutama pada proses fisiologis sel seperti pertumbuhan sel, termasuk proliferasi dan diferensiasi sel, apoptosis, transfer elektron, replikasi DNA dan transport oksigen. Metabolisme Fe seluler yang cukup tinggi dapat memicu peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observatif eksploratif dengan pendekatan molekuler.

4.2 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti dalam penelitian ini adalah :

1. Paparan Hiperoksia 24 jam dan 48 jam
2. Paparan Normoksia 24 jam
3. *Level of expression* gen reseptor transferrin, gen *iron regulated transporter*, gen *Growth Arrest DNA Damage 45 alpha* (Gadd45a), gen *Cyclooxigenase-2* (COX-2), gen *Small inducible cytokine A7*(ScyA7), gen *Serine protein inhibitor 11* (Spi11), gen *Coil coiled forming protein* (Ccl) *Osteoblast Mouse Cell-line* (7F2) dari *American Tissue Cell Culture* (ATCC)

4.3 Definisi Operasional Variabel

1. Paparan Hiperoksia : Pemberian oksigen dengan konsentrasi tinggi antara 80-95% dari komposisi udara sekitarnya (dalam penelitian ini selama 24 jam dan 48 jam) dalam inkubator.

2. Paparan normoksia : Pemberian oksigen dengan konsentrasi 20% dari komposisi udara sekitarnya (dalam penelitian ini selama 24 jam) dalam inkubator.

3. *Level of expression* / tingkat pengekspresian : Informasi genetik yang disimpan dalam DNA dan ditranslasikan menjadi protein selama proses ekspresi gen yang melibatkan transkripsi menjadi mRNA, dan translasi menjadi protein.

4. Gen Reseptor Transferrin : gen yang berhubungan dengan membran sel dan berfungsi sebagai "penjaga gawang" dalam pengaturan pengambilan seluler Fe.

5. Gen *Iron Regulated Transporter* : gen yang berperan khususnya dalam sirkulasi dan transportasi Fe.

6. Gen *Growth Arrest DNA damage 45 alpha : p53-regulated gene* yang terlibat dalam mempertahankan stabilitas *genome.*

7. Gen *Cyclooxigenase-2* : gen yang penting bagi sintesis *pro-inflammatory prostaglandins.*

8. Gen *Small Inducible Cytokine A7* : gen yang diekspresikan pada sel inflamasi atau hematopoietik dan terlibat dalam patogenesis inflamasi.

9. Gen *Serine Protein Inhibitor 11* : gen yang berperan dalam pemecahan protein matriks ekstraseluler selama inflamasi dan berpartisipasi dalam siklus koagulasi.

10. Gen *Coil Coiled Forming Protein* : gen yang berperan dalam homeostasis kalsium, proses mineralisasi dan diferensiasi vitamin D.

4.4 Bahan Dan Instrumen Penelitian

1. Paparan Hiperoksia

Satu unit Inkubator untuk paparan hiperoksia (80% gas O_2 , 5% CO_2, 15% Gas N_2)

2. Paparan Normoksia

Satu unit Inkubator untuk paparan normoksia (20% gas O_2 , 5% CO_2, 75% Gas N_2)

3. Peralatan untuk eksperimen jumlah sel, konsentrasi protein dan DNA

Mouse osteoblast cell-line ($7F_2$) dari American Tissue Cell Culture (ATCC), 25 cm^2 dan 75 cm^2 *monolayer flask*, Kamera Olympus, 50 ml tabung Falcon, Mikroskop Olympus CK_2,,Centrifuge Eppendorf 5417 R, Phophate Buffer Saline (PBS), Neubauer Chamber (haemacytometer), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Buffer RLT 350 dan 600, *Qiashredder column*, β-ME (β-Mercaptoethanol), ethanol 70%, Trypsine (EDTA), tabung *polypropylene*, gelas bebas RNA, 2 ml tabung koleksi, kolom RNeasy mini, kalkulator RNA, tabung FALCON, *Trypan Blue Solution*, termos, nitrogen cair, *water bath* GFL, inkubator sel, *syringe* bebas RNA, Buffer RPE, membran RNeasy *silica gel*, Pipet, Dye (Coomassie Brilliant Blue G-250), α MEM (*Minimal Essential Medium*) M 4526 dari SIGMA (50 ml FBS/ *Fetal Bovine Serum*, 10%, 2mM *L-Glutamine* (protein sel), 5 ml *Streptomycin Penicillin* (antibiotika), 500 ml MEM *Eagle α Modification)*.

4. *Microarray oligonucleotide*

Oligo-dT (T_{15}) - Roche, 0.5M EDTA,dNTPs (dalam buffer 50 mM Tris pH 8), 2M NaOH, RNasin - Promega, 1M HCl, Superscript II - Life Technologies, 1M pH Tris 8, *Qiaquick PCR purification system*-QIAGEN, Poly dA - Roche,22 x 50 mm *cover slips*, 20x SSC, Cot-1 DNA - Life Technologies, 20% SDS ,Cy3 dan Cy5-dUTP, MilliQ Water, 100mM sodium asetat, Gelas kimia ukuran 2 liter, *Detonized Formamide, Hybridisation chamber,Array chip (Gene Chip Mouse Expression Set 430)*.Tabung eppendorf yang bebas DNase-, RNase 0.5 and 1.5 ml, Pemegang *slide* yang terbuat dari plastik, *Software Affymetrix,Microarray reader*

5.Mesin PCR (T3 Thermocycler, Serial No.1308324, Vers 3,28 t3,Biometra,2000)

10 x PCR Buffer, MgSO4 (30 mM,Qbio), dNTP (10 mM), Pyra Taq Polymerase (8 U/µl dan 2 U/µl), *Destillated Water,* Primer-Mix CD71 (2,5 µM), Primer-Mix Slc40A1 (2,5 µM), Primer Cc1 (2,5 µM), Primer Spi11 (2,5 µM), Primer Gadd45a (2,5 µM), Primer COX2 (2,5 µM), Primer ScyA7 (2,5 µM), Primer-Mix GAPDH (2,5 µM), 0,5 ml tabung Eppendorf, Pipet 2,5 µl,10 µl,20 µl,100 µl,200 µl,1000 µl

6. Alat Elektroforesis

Peralatan Roth/ Gibco/ Biometra *Electroforesis*, 50x TE Buffer, *Agarose* LE (suhu leleh (1,5%) 87-89°C, suhu menjadi *gel* (1,5%) 36-39°C, EEO(-mr) 0,09-0,13, kelembaban ≤10%, Sulfate ≤0,15 %, bebas DNase/RNase, CAS 9012-36-6, Cat# V3125, PkSize 5009,Lot # 168856, suhu penyimpanan 22-25°C, tanggal kadaluwarsa April 2006 *Gel Strength* (1%) ≥ 1000 g/cm^2), *Marker* 100 bp DNA *Ladder* dari Biolabs untuk analisa elektroforesis dan *Low DNA Mass Ladder* dari Invitrogen untuk Real Time-PCR.

7. Perangkat Lunak Komputer dan Primer PCR

NCBI data base, Program DNA Strider, Program Genomatix –DiAlign, Program Oligo 5. 0 (Software primer design) dari Wojciech & Piotr Rychlik, Genetyx-Mac version 8.0.

a. **Primer *Iron Regulated Transporter* (Slc40A1)**

Sense

5'-CCG AGA TGG ATG GGT CTC CTA C-3' , Panjang Primer 22

Antisense

5'-GGA CCA AAG ACC GAT TCT AGC AG-3', Panjang Primer 23

Panjang basa yang diamplifikasi : 526 bp

b. Primer Reseptor Transferrin (CD71)

Seose

5' -TTT CCT TGC ATA TTC TGG AAT CCC -3', Panjang Primer 24

Antisense

5' -CGT CAC CAG AGA GGG CAT TTG C-3', Panjang Primer 22

Panjang basa yang diamplifikasi : 629 bp

c. Primer *growth arrest DNA damage inducible 45 alpha* (Gadd45a)

Sense

5'-GGA TGC CCT GGA GGA AGT GCT -3', Panjang Primer : 21

Antisense

5' -AGG ATG TTG ATG TCG TTC TCG CA-3', Panjang primer : 23

Panjang basa yang diamplifikasi : 210 bp

d. Primer *serine proteinase inhibitor 9* (Serpin B9)

Sense

5' -CAA AGG CCA GTG CAG ATG ATG T-3' , Panjang Primer : 22

Antisense

5' -GAA GAA AAG GAA AGG GTG GTC AG-3' , Panjang Primer : 23

Panjang basa yang diamplifikasi : 501 bp

e. Primer *prostaglandine GH synthase/ cyclooxigenase-2* (COX-2)

Sense

5' -GCA TTC TTT GCC CAG CAC TTC AC-3', Panjang Primer : 23

Antisense

5' -CCA AAG ACC TCC TGC CCC ACA -3' , Panjang primer : 21

Panjang basa yang diamplifikasi : 284 bp

f. Primer *small inducible cytokine A7* (ScyA7)

Sense

5'- GAG AGC TAC AGA AGG ACC ACC AGT -3', Panjang primer : 24

Antisense

5'- AAG CAA ATC TTT GCA CTG ATT CTT G-3', Panjang primer : 25

Panjang basa yang diamplifikasi : 487 bp

g. Primer *coil coiled forming protein* (Cc1)

Sense

5'- AGA GAT TTT CAG GTG GGA GAT TTG G-3', Panjang primer : 25

Antisense

5'- GTT TTG TGC CTT TTT GGC TTG ACA G-3', Panjang primer : 25

Panjang basa yang diamplifikasi : 213 bp

8. *DNA Sequencing*

a. *Template* b. Primer

9. *Real Time PCR* meliputi :

SYBR Green, TaqMan Probes, Primer TfR, IRT, Gadd45a, COX-2,ScyA7, Spi11,Cc1,

Thermocycler.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi Penelitian

Institut Biokimia, Universitas Klinik Charite, Universitas Humboldt, Berlin, Jerman.

4.5.2 Waktu Penelitian

Pelaksanaan Penelitian di Laboratorium Charite - Jerman 1 April – 30 Juni 2004 dan 17 Mei – 17 Juni 2005.

4.6. Prosedur Penelitian

1. Tahap subkultur sel

Sel osteoblas beku dimasukkan *water bath* selama 5 menit lalu diresuspensi dan disentrifugasi. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah dan konsentrasi sel. Lalu kultur dalam tabung *monolayer* dan dimasukkan dalam inkubator suhu 37°C. Setelah beberapa hari dilakukan tripsinasi, sentrifugasi dan *haemacytometer* (menghitung viabilitas sel). Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

2. Tahap isolasi RNA total

Sel diisolasi RNAnya dengan menggunakan *RNeasy mini kit* dari Qiagen. Tahapan isolasi RNA secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

3. Tahap eksperimen proliferasi sel

Penghitungan jumlah sel

Sel dibiakkan dalam *monolayer flask* lalu disentrifugasi, cairan *supernatant* dibuang dan sel pelet dibekukan dalam *dry ice* pada suhu -80°C. Pada tiap titik waktu dilakukan tripsinasi. Kemudian sel diresuspensi dalam PBS dan dihitung viabilitasnya. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

Penghitungan konsentrasi protein dan DNA

Sel pelet disedot campur dalam PBS dan lysat disentrifugasi 14.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Cairan supernatant digunakan untuk penentuan konsentrasi protein dan DNA. Penentuan konsentrasi protein menggunakan *dye-binding assay* sesuai

tehnik Bradford. Sedangkan penentuan konsentrasi DNA menggunakan metode Labarca. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

4. Tahap pemeriksaan dengan *Microarray*

RNA total yang telah diisolasi dikuantifikasi dengan spektroskopi ultra violet. Kualitas RNAnya dicek dengan *LabChip*. cDNA disintesis dari RNA total dengan *Superscript Choice*. Kemudian dilakukan pemurnian dan diendapkan. Sintesis biotin dilakukan dengan perangkat *BioArray High Yield RNA*. Ukuran fragmen RNA dicek dengan *LabChip*. cRNA yang telah terfragmentasi lalu dihibridisasi dalam *chip* oligonukleotida dari Affymetrix. Sebelum diaplikasikan ke *microarray* dipanaskan 95°C lalu didinginkan 45°C dan endapan dihilangkan. Hibridisasi dilakukan selama 16 jam. Lalu dicuci dan dicat dengan *GeneChip fluidics station protocol EukGE-WS2*. Kemudian *probe array* discan dua kali dengan *GeneChip System confocal scanner* dan dikontrol dengan *Microarray Suite Version 5.0 software (Affymetrix)*. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

5. Tahap RT- PCR

RNA total diisolasi dengan *RNeasy mini kit* dari Qiagen. Kemudian ditranskriptasi sebaliknya. Reaksi dihentikan dengan memanaskan sampel hingga 94°C selama 10 menit. Sampel diencerkan 1 : 5. Dilakukan *Reverse Transkriptase*- PCR (fase denaturasi, *annealing*, *extension*). Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

6. Tahap elektroforesis

Gel dibuat (konsentrasi 1-2%) dan ditetesi *Ethidium Bromide*. Lalu diletakkan dalam alat elektroforesis. Produk PCR yang telah dicampur *Loading Buffer*

diaplikasikan. Slot pertama *gel* diberi marker. Alat dijalankan. Jika pita telah mencapai setengah *gel*, alat dimatikan dan *gel* diletakkan di bawah sinar ultra violet. Foto dibuat dan print. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

7. Tahap *DNA sequencing*

Dilakukan TOPO TA Cloning. Lalu dilakukan isolasi plasmid DNA dengan *Protocol Qiagen Mini Preparation Kit*. Kemudian analisa plasmid dengan enzim restriksi. Lalu klon dikirimkan ke MWG AG Biotech untuk dilakukan proses *DNA Sequencing*. Hasilnya kemudian dicari homologinya dengan program *gene bank* di NCBI atau menggunakan program *genetic mac*. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

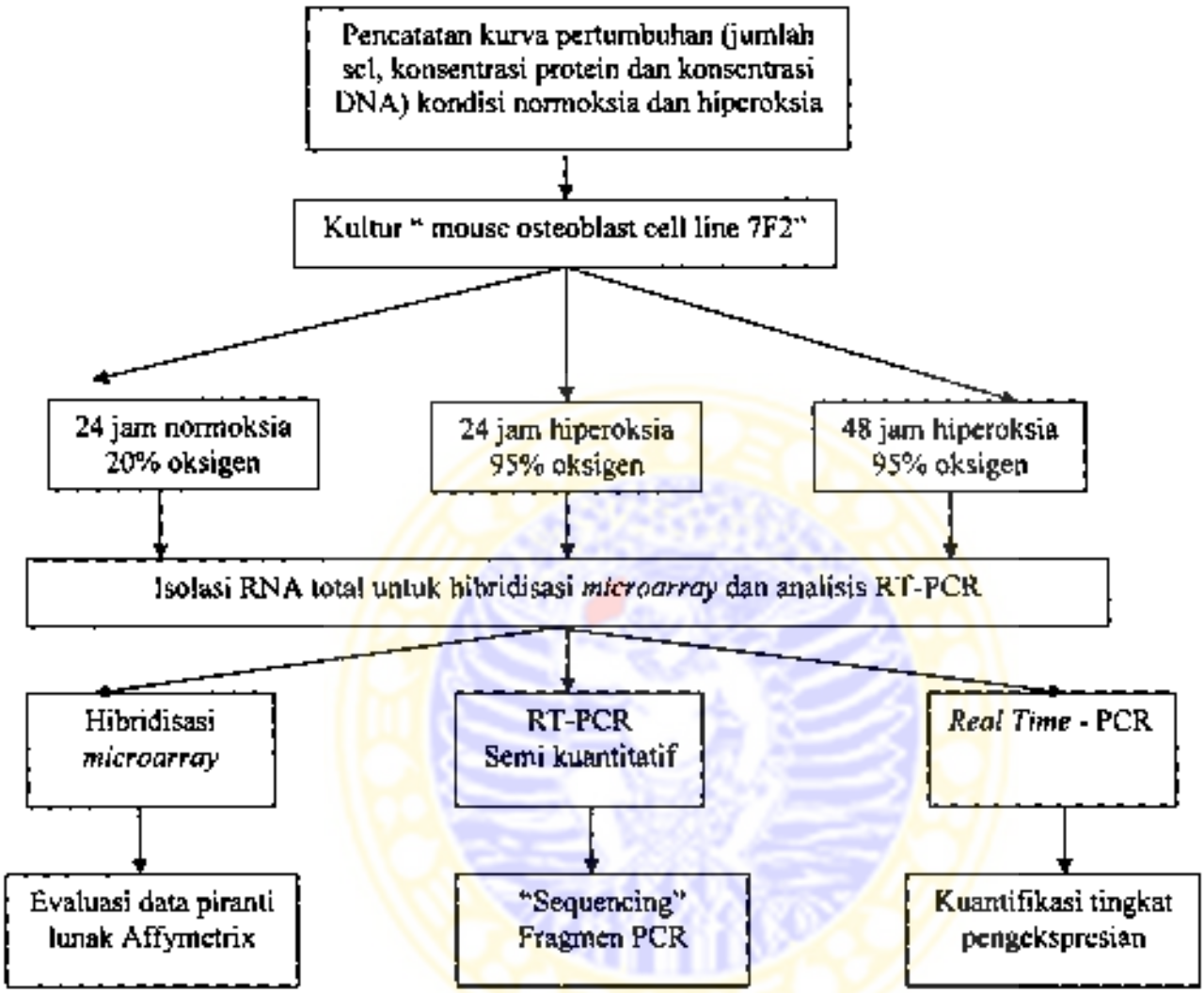
8. Tahap Real Time - PCR

Tahap awalnya adalah amplifikasi standard (*double PCR* dan ekstraksi *gel*), kemudian diikuti re-amplifikasi (*double PCR* dan purifikasi PCR). Lalu dilakukan penentuan kuantitas dengan Low Mass Ladder dan seri dilusi. Kemudian persiapan solusi kerja dilakukan dan protap Real Time PCR dirancang, diaplikasikan pada alat dan alat dijalankan. Tahapan secara rinci dijelaskan pada Lampiran.

4.7 Analisis Data

Berdasarkan analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini maka tehnik pengolahan data yang dapat digunakan adalah statistik deskriptif.

4.8 Skema Prosedur Penelitian



Kultur *osteoblast cell line* tikus 7F2 dicatat kurva pertumbuhannya (jumlah sel, konsentrasi protein dan konsentrasi DNA) di bawah kondisi normoksia dan hiperoksia (setelah dilakukan eksperimen proliferasi sel). Lalu kultur *osteoblast cell line* tikus 7F2 dimasukkan inkubator dengan tiga kondisi yaitu 24 jam normoksia (20%O_2), 24 jam hiperoksia (95%O_2) dan 48 jam hiperoksia (95%O_2). Prosedur selanjutnya adalah isolasi RNA total. Kemudian RNA total ditranskriptasi sebaliknya menghasilkan cDNA. cDNA

kemudian digunakan untuk pemeriksaan *Reverse Transcriptase*-PCR dan hibridisasi *microarray*. cDNA yang sudah dicek pemunculan pitanya dengan RT-PCR semi kuantitatif kemudian digunakan untuk pemeriksaan *Real Time*-PCR. Pemeriksaan *microarray* menghasilkan data berupa densitas spot (unit fluoresensi relatif). Pemeriksaan *Reverse Transcriptase*-PCR menghasilkan pemunculan pita gen tertentu pada agarose *gel* elektroforesis (sebagai konfirmasi data *microarray*), dan gen yang diteliti dilakukan pemeriksaan *DNA sequencing*. Pemeriksaan Real Time-PCR menghasilkan kuantifikasi kadar ekspresi gen.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Kultur Sel

Setelah ditumbuhkan pada periode waktu yang berbeda kultur diamati menggunakan mikroskop Olympus CK2 dengan pembesaran 10 kali. Pada Gambar 5.1 kinetik pertumbuhan sel pada kondisi normoksia tergantung pada durasi periode kultur.

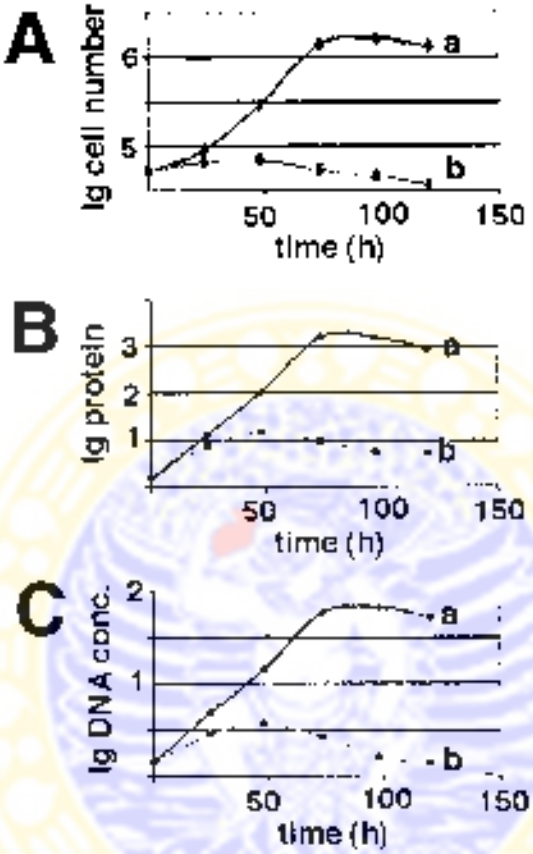
Gambar 5.1 Gambaran mikroskopik kultur sel 7F2. Sel dikultur pada periode waktu yang berbeda dan foto diambil menggunakan mikroskop Olympus CK2 A) Hari ke-5 subkultur (*confluent*), B) Hari ke-3 subkultur (*pre-confluent*). C) Hari pertama subkultur (setelah dibiakkan)

Setelah 5 hari dalam kultur sel mencapai stadium *confluence* (densitas sel osteoblas tinggi pada lapangan pandang) seperti ditunjukkan pada Gambar 5.1A. Tanda panah menunjukkan sel osteoblas. Kuantifikasi jumlah sel menggunakan *chamber Neubauer (haemacytometer)*. Daya hidup (viabilitas) nya diuji dengan *trypan blue exclusion assay*. Pada uji ini sel yang mati akan berwarna biru dan tampak seperti diwarnai di bawah mikroskop. Sebaliknya sel yang hidup tidak akan mengambil zat warna dan tetap putih. Pada penelitian ini daya hidup sel bervariasi antara 69-95 %.

5.2. Kurva pertumbuhan sel 7F2 di bawah kondisi normoksia dan hiperoksia

Untuk mengetahui efek konsentrasi oksigen pada kondisi kultur, pada rata-rata replikasi sel 7F2 dibiakkan pada densitas 50000 sel/ml dalam 25 ml *culture flasks* dan

dibiarkan tumbuh hingga mencapai stadium *confluence*. Kinetik pertumbuhan sel menentukan jumlah sel (Gambar 52 A), konsentrasi protein (Gambar 5.2 B) dan konsentrasi DNA (Gambar 5.2 C). Tampak bahwa kinetik tiga pengukuran ini paralel (sama satu dengan yang lain).



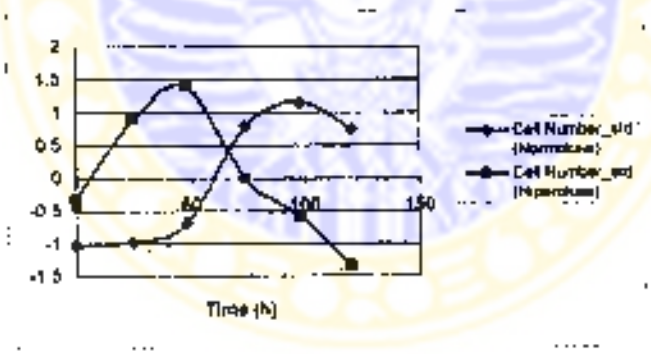
Gambar 5.2. Kinetik pertumbuhan sel 7F2 di bawah kondisi normoksia dan hiperoksia. A. Jumlah Sel, B. Konsentrasi Protein, C. Konsentrasi DNA. Sel dibiakkan pada densitas 2.000 sel/ml (5 ml cairan kultur dengan 10.000 sel/ml) dan tampak tumbuh *confluence* pada kondisi normoksia (garis a) dan pada kondisi hiperoksia (garis b). Pada titik waktu periode kultur yang berbeda alikuot diambil dan sel dihitung, konsentrasi protein dan konsentrasi DNA diukur. Titik data yang tampak pada grafik menunjukkan rata-rata tiga kali pengukuran yang terpisah dan standard devasinya lebih rendah dari 20% untuk tiap titik data.

Di bawah kondisi normoksia (garis a) membutuhkan waktu 75 jam untuk mencapai stadium *confluence*. Setelah tiga kali pengamatan kemudian tampak menurun dan muncul sebagai peningkatan rata-rata kematian sel. Sebaliknya, pada kondisi hiperoksia (garis b) tampak hampir tidak ada pertumbuhan sel. Faktanya, jumlah sel hanya sedikit meningkat selama

Hasil uji Levene diatas menunjukkan nilai signifikansi F dari log10 jumlah sel osteoblas sama dengan 0,001. Hal ini menunjukkan bahwa variabel jumlah sel osteoblas kondisi normoksia mempunyai varians yang berbeda dengan kondisi hiperoksia. Oleh karena itu *equal varians* tidak diasumsikan.

Hasil uji t terhadap rata-rata jumlah sel osteoblas pada kedua kondisi menunjukkan nilai signifikansi t sama dengan 0,022. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel osteoblas antara kondisi normoksia dan hiperoksia. Perbandingan nilai rata-rata menunjukkan bahwa jumlah sel yang diperoleh pada kondisi normoksia lebih tinggi daripada yang diukur pada kondisi hiperoksia.

Saat melakukan kinetik jumlah sel yang terstandarisasi melebihi durasi periode kultur, ditemukan bahwa pada kondisi normoksia, nilai maksimal tercapai setelah periode kultur yang lebih panjang dan penurunan jumlah sel setelah mencapai maksimum tidak secepat pada kondisi hiperoksia.



Gambar 5.3 Kinetik jumlah sel yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia

Data ini menunjukkan bahwa pada kondisi normoksia pembelahan sel membutuhkan waktu yang lebih lama. Sebaliknya pada kondisi hiperoksia, sel berhenti membelah lebih awal dan mereka mati lebih cepat (jumlah selnya segera menurun setelah mencapai titik maksimal) meskipun sel belum mencapai *confluency*.

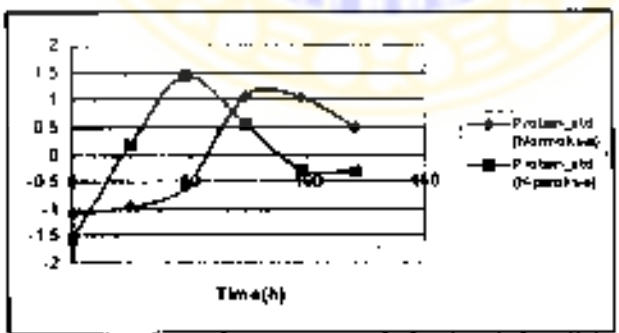
Tabel 5.3 Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan sel (log10 konsentrasi protein)

Uji Levene untuk Kesamaan Varians	
F	8,809
Sig	0,014
Uji t terhadap rata-rata(*equal varians not assumed*)	
T	2,543
Sig	0,046
Perbedaan rata-rata	0,67

Sumber : Lampiran

Uji Levene menunjukkan bahwa varians konsentrasi protein yang diukur pada kondisi normoksia dan hiperoksia berbeda bermakna (Tabel 5.3). Hasil uji Levene diatas menunjukkan nilai signifikansi F dari log10 konsentrasi protein sama dengan 0,014. Hal ini menunjukkan bahwa variabel konsentrasi protein kondisi normoksia mempunyai varians yang berbeda dengan kondisi hiperoksia. Oleh karena itu *equal varians* tidak diasumsikan.

Hasil uji t terhadap rata-rata konsentrasi protein kedua kondisi menujukkan nilai signifikansi t sama dengan 0,046. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein yang diukur selama pertumbuhan sel pada kondisi normoksia dan hiperoksia berbeda bermakna. Perbandingan nilai rata-rata menunjukkan bahwa konsentrasi protein yang diperoleh pada kondisi normoksia lebih tinggi daripada yang diukur pada kondisi hiperoksia.



Gambar 5.4 Kinetik konsentrasi protein yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia

Saat melakukan kinetik konsentrasi protein yang terstandarisasi melebihi durasi periode kultur, ditemukan bahwa pada kondisi hiperoksia, konsentrasi protein maksimal tercapai setelah interval kultur yang lebih pendek. Pada kondisi normoksia nilai maksimal diukur setelah periode kultur yang lebih lama dan penurunan nilai setelah mencapai titik maksimum tidak secepat pada kondisi hiperoksia.

Data ini menunjukkan bahwa kinetik konsentrasi DNA yang diukur selama pertumbuhan sel pada kondisi normoksia dan hiperoksia berbeda bermakna.

Tabel 5.4 Evaluasi statistik kinetik pertumbuhan sel (log10 konsentrasi DNA)

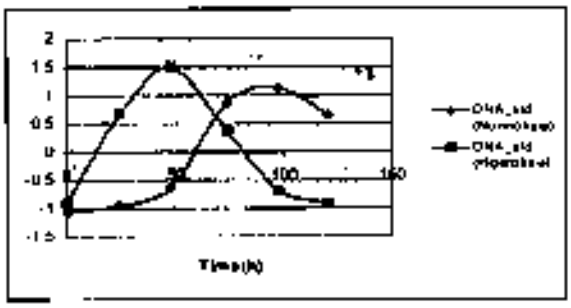
Uji Levene untuk Kesamaan Varians	
F	8,897
Sig	0,014
Uji t terhadap rata-rata(*equal varians not assumed*)	
T	3,087
Sig	0,023
Perbedaan rata-rata	0,8891

Sumber : Lampiran

Hasil uji Levene diatas menunjukkan nilai signifikansi F dari log10 konsentrasi DNA sama dengan 0,014. Hal ini menunjukkan bahwa variabel konsentrasi DNA kondisi normoksia mempunyai varians yang berbeda dengan kondisi hiperoksia. Oleh karena itu *equal varians* tidak diasumsikan.

Hasil uji t terhadap rata-rata konsentrasi DNA kedua kondisi menunjukkan nilai signifikansi t sama dengan 0,023. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata konsentrasi DNA antara kondisi normoksia dan hiperoksia.

Perbandingan nilai rata-rata menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang diperoleh pada kondisi normoksia lebih tinggi daripada yang diukur pada kondisi hiperoksia.



Gambar 5.5 Kinetik konsentrasi DNA yang terstandarisasi pada kondisi normoksia dan hiperoksia

Saat melakukan kinetik konsentrasi DNA yang terstandarisasi melebihi durasi periode kultur, ditemukan bahwa pada kondisi hiperoksia, nilai maksimal tercapai setelah interval kultur yang lebih pendek. Sebaliknya, pada kondisi normoksia nilai maksimal tercapai setelah periode kultur yang lebih lama dan penurunan nilai setelah mencapai titik maksimum tidak secepat pada kondisi hiperoksia. Hasil ini serupa (paralel) dengan kinetik pada jumlah sel dan konsentrasi protein (seperti telah disebutkan atas).

5.3 Hibridisasi *Microarray*

5.3.1. Evaluasi kualitatif data *microarray*

Guna mendapatkan informasi eksperimental pada efek tersebut, maka dikuantifikasi kadar ekspresi dari 22690 gen sel 7F2 pada kondisi hiperoksia dan membandingkannya dengan nilai yang diperoleh pada kondisi normoksia. Demi tujuan ini maka pada penelitian ini digunakan tehnologi densitas-tinggi *microarray*. Metode ini memungkinkan kuantifikasi kadar ekspresi ribuan gen dengan eksperimen tunggal.

Melihat gambar ini dengan mata biasa tidak akan dapat menemukan titik yang berbeda dan kemudian, sangat tidak mungkin untuk mendeteksi perbedaan pola ekspresi gen antara normoksia dan hiperoksia tanpa menggunakan alat khusus. Di bawah mikroskop *(chip reader)* intensitas fluoresensi tiap titik dapat secara tepat dikuantifikasi. Menggunakan prosedur statistik intensitas fluoresensi dari semua titik oligonukleotida yang cocok untuk satu gen dirata-rata, dikurangi rata-rata intensitas dari oligonukleotida yang tidak cocok dan perbedaan intensitas fluoresensi yang dihasilkan dihubungkan dengan GAPDH, yang digunakan sebagai referensi internal mRNA. Mengikuti prosedur ini salah satu mendapatkan serangkaian intensitas fluoresensi yang relatif terkoreksi, yang menunjukkan kadar ekspresi produk gen.

5.3.2. Evaluasi statistik eksperimen *microarray*

Pada kondisi normoksia (24 jam periode pertumbuhan) dari 22690 gen yang ada pada *microarray chip*, terdapat 9554 gen (42,1 %) yang tidak terekspresi oleh sel 7F2 (Tabel 5.1). Diantara gen yang masih ada 9548 (42,0 %) adalah yang terekspresi tingkat rendah atau sedang (intensitas fluoresensi < 5000) dan 3588 gen (15,9 %) menunjukkan ekspresi yang tinggi (intensitas fluoresensi > 5000). Saat sel ditumbuhkan pada kondisi hiperoksia (24 jam) 11172 gen (49,2 %) tidak terekspresi, 7880 (34,7%) menunjukkan ekspresi rendah atau sedang dan 3638 gen (16,1) terekspresi pada kadar yang tinggi. Jika membandingkan angka-angka ini maka dapat disimpulkan, dalam format statistik, bahwa hanya ada perubahan yang kecil *(minor)* pada kesseluruhan pola ekspresi mRNA. Sebaliknya, kurva pertumbuhan mengindikasikan efek penghambatan hiperoksia terhadap

pertumbuhan sel. Kemudian, disimpulkan bahwa sedikit perubahan pada pola ekspresi mRNA menghasilkan efek fisiologis sel yang besar.

Tabel 5.5 Evaluasi statistik eksperimen *microarray*

	24 jam Normoksia		24 jam Hiperoksia		48 jam Hiperoksia	
	Jumlah gen	Prosentase (%)	Jumlah gen	Prosentase (%)	Jumlah gen	Prosentase (%)
Tidak terekspresi	9554	42,1	11172	49,2	10496	46,3
Terekspresi rendah atau sedang (≤ 5000)	9548	42,0	7880	34,7	8571	37,8
Terekspresi tinggi (> 5000)	3588	15,8	3638	16,1	3623	15,9

Sel 7F2 yang ditumbuhkan pada kondisi normal mencapai stadium *confluence*. Kemudian komposisi atmosfir diubah (95% oksigen, 5 % CO_2 untuk kondisi hiperoksia dan udara normal dan 5 % CO_2 untuk kondisi normoksia) dan sel disimpan dalam kultur untuk periode 24 jam atau 48 jam (hanya hiperoksia). Setelah periode kultur sel kemudian diambil, RNA total diekstraksi dan hibridisasi *microarray* dilakukan seperti dijelaskan pada Bab metode penelitian. Jumlah gen total pada *microarray* adalah 22690, yang mencakup dua pertiga dari *mouse genome*.

Jika membandingkan pola ekspresi mRNA pertumbuhan sel setelah paparan hiperoksia 24 jam dan 48 jam maka hanya sedikit perbedaan yang tampak. Persentase gen yang tidak terekspresi menurun dari 49.2 % pada 24 jam hiperoksia menjadi 46.3 % setelah 48 jam. Sebaliknya, gen yang terekspresi rendah atau sedang meningkat dari 34.7 % menjadi 37.8%. Jumlah gen yang terekspresi tinggi tidak terlalu berubah (16.1 % *vs.* 15.9 %).

Selanjutnya, yang dievaluasi hanya spesies mRNA, yang teregulasi naik atau turun saat sel ditumbuhkan pada kondisi normoksia dan hiperoksia (24 jam periode kultur). Dari Tabel 5.6 tampak bahwa hanya ekspresi 5 spesies mRNA (0,00022 % dari 22690 yang ada dalam *chip*) yang teregulasi naik lebih dari 10 kali lipat. Dan lagi, 5 gen teregulasi naik 5-10 kali. Dapat ditekankan bahwa semua gen hanya terekspresi rendah pada kondisi normoksia. Bahkan, peningkatan sedang pada kadar ekspresi absolut akan

mengarah ke peningkatan besar ekspresi relatif (berkaitan dengan ekspresi pada kondisi normoksia).

Tabel 5.6 Perbandingan gen yang teregulasi naik pada kondisi normoksia dan hiperoksia 24 jam

Gen yang teregulasi naik (kali lipat)	Jumlah Gen	Prosentase gen pada *array* (%)	Terekspresi rendah	Terekspresi tinggi
> 10-kali	5	0,00022	5	0
5-10-kali	5	0,00022	5	0
4-5-kali	3	0,00013	2	1
3-4-kali	29	0,12781	24	5
2-3-kali	178	0,78449	159	19

Eksperimen *microarray* yang dilakukan seperti digambarkan pada Tabel 5.6. Data dasar ekspresi mRNA kemudian dilakukan pemilihan ekspresi yang berbeda (regulasi naik) spesies mRNA dan dibandingkan pertumbuhannya antara kondisi hiperoksia (24 jam) dan normoksia (24 jam).

Faktanya, sebagian besar gen yang teregulasi naik adalah yang terekspresi rendah pada kondisi hiperoksia. Mayoritas gen yang teregulasi naik mempunyai kadar 2-4 kali lipat. Pada kelas ini diidentifikasikan 207 gen (0.9 % dari semua gen pada *microarray*). 24 gen diklasifikasikan sebagai gen yang terekspresi tinggi.

Pada tabel 5.7 di bawah ini, pada gen yang teregulasi turun saat hiperoksia ditemukan bahwa tidak satupun spesies mRNA yang ada pada *array* yang teregulasi turun lebih dari 5-kali lipat dan hanya satu gen yang teregulasi turun 4-5 kali lipat. Ekspresi mRNA dari 6 gen turun 3-4 kali lipat dan 77 gen turun 2-3 kali lipat. Diantara mereka diidentifikasi 12 gen dengan ekspresi tinggi (sinyal fluoresensi > 5000).

Tabel 5.7 Perbandingan gen yang teregulasi turun pada kondisi normoksia dan hiperoksia 24 jam

Gen yang teregulasi turun (kali lipat)	Jumlah gen	Prosentase gen pada *array* (%)	Terekspresi rendah	Terekspresi tinggi
> 10	0	-	-	-
5-10	0	-	-	-
4-5	1	0,00044	1	0
3-4	6	0,02644	4	2
2-3	77	0,33936	67	10

Eksperimen *microarray* dilakukan seperti digambarkan pada Tabel 5.7. Data dasar ekspresi mRNA kemudian dilakukan pemilihan ekspresi yang berbeda (regulasi turun) spesies mRNA dan dibandingkan pertumbuhannya antara kondisi hiperoksia (24 jam) dan normoksia (24 jam).

Selanjutnya diteliti, spesies mRNA yang berbeda regulasinya saat sel pada kondisi hiperoksia selama 24 jam dan 48 jam seperti digambarkan pada Tabel 5.8 di bawah ini. Tampak bahwa tidak ada gen yang teregulasi naik lebih dari 3-kali dan hanya 5 spesies mRNA (0.022 % dari semua gen yang ada pada *array*) yang terekspresi rendah 3-4 kali lipat. Semua gen ini pada ekspresi rendah. Selain itu dijumpai 66 gen (0.29 % dari semua gen yang ada pada *array*) yang diregulasi naik 2-3 kali lipat.

Tabel 5.8 Gen yang teregulasi naik pada kondisi hiperoksia (24 jam vs 48 jam)

Gen yang teregulasi naik (kali lipat)	Jumlah gen	Prosentase gen pada *array* (%)	Terekspresi rendah	Terekspresi tinggi
> 10	0	-	-	-
5-10	0	-	-	-
4-5	0	-	-	-
3-4	5	0,02204	5	0
2-3	66	0,29088	46	20

Eksperimen *microarray* dilakukan seperti digambarkan pada Tabel 5.8. Data dasar ekspresi mRNA kemudian dilakukan pemilihan ekspresi yang berbeda (regulasi naik) spesies mRNA dan dibandingkan pertumbuhannya antara kondisi hiperoksia (24 jam) dan hiperoksia (48 jam).

Data mengindikasikan bahwa hanya 71 spesies mRNA (0.31 % dari semua gen yang ada di *array*) secara signifikan diregulasi saat *transcriptome* (jumlah semua spesies mRNA dalam sel) dari kultur sel 24 jam dan 48 jam pada kondisi hiperoksia.

Tabel 5.9 Gen yang teregulasi turun pada kondisi hiperoksia (24 jam vs 48 jam)

Gen yang teregulasi turun (kali lipat)	Jumlah gen	Prosentase gen pada *array* (%)	Terekspresi rendah	Terekspresi tinggi
> 10	0	-	-	-
5-10	12	0,053	12	0
4-5	13	0,057	13	0
3-4	30	0,132	30	0
2-3	385	1,670	385	0

Eksperimen *microarray* dilakukan seperti digambarkan pada Tabel 5.5. Data dasar ekspresi mRNA kemudian dilakukan pemilihan ekspresi yang berbeda (regulasi turun) spesies mRNA dan dibandingkan pertumbuhannya antara kondisi hiperoksia (24 jam) dan hiperoksia (48 jam).

Saat pembuatan ringkasan gen yang teregulasi turun saat sel ditumbuhkan pada kondisi hiperoksia 24 jam dan 48 jam, ditemukan perbedaan yang lebih jelas. Pada kondisi hampir 2% dari gen yang ada pada *microarray* menunjukkan regulasi turun yang signifikan seperti tampak pada Tabel 5.9 di atas. Tampak dengan jelas 25 gen teregulasi turun 4-10 kali dan 415 gen teregulasi turun 2-4 kali.

5.4. Pengaturan ekspresi gen khusus

5.4.1. Hibridisasi *Microarray*

Untuk menemukan, spesies mRNA khusus yang paling kuat teregulasi naik saat sel diinkubasikan selama 24 jam pada kondisi hiperoksia dicari dari data dasar *microarray* yang memiliki nilai kali lipat yang tertinggi. Pada Tabel 5.10 gen tersebut dibuat ringkasan. Tampak 20 gen yang paling kuat teregulasi naik sepertiganya belum diketahui fungsinya. Sebaliknya, gen lain yang teregulasi naik dikenal dengan baik dan fungsi biologisnya masih diteliti. Untuk lebih jelasnya dipilih 5 spesies mRNA yang berbeda (yang dicetak tebal

dalam tabel) karena alasan berikut: i) diketahui fungsi biologisnya, ii) memiliki derajat ketergantungan waktu dengan regulasi naik, iii) terekspresi tinggi atau sedang pada kondisi tersebut.

Tabel 5.10 Gen yang paling teregulasi naik selama hiperoksia

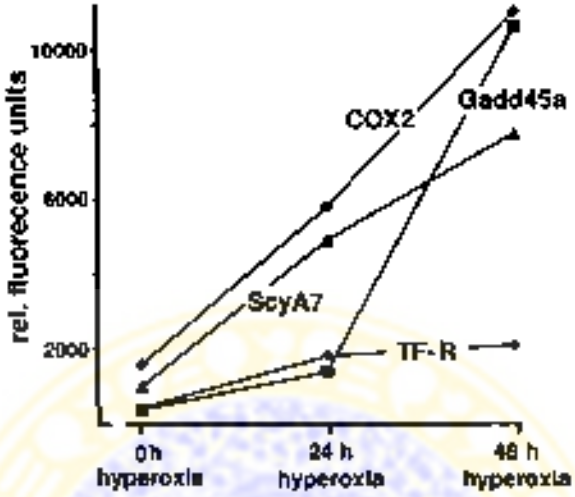
No.	Nama Gen	24 jam normoksia	24 jam hiperoksia	48 jam hiperoksia
1.	Prefoldin 5	13	186 (14.3)	64 (4.9)
2.	**Coiled coil forming protein (Ccl)**	**17**	**220 (13.3)**	**360 (22.3)**
3.	C-type lectin related f (Clrf) pending	13	116 (8.9)	176 (13.5)
4.	**Serine protease inhibitor 11 (Spi11)**	**128**	**993 (7.8)**	**955 (7.5)**
5.	Carnitine palmitoyl-transferase 1 (Cpt1a)	71	533 (7.5)	107 (1.5)
6.	High mobility group 20A (Hmg20a)	25	121 (4.9)	17 (0.7)
7.	**Small inducible cytokine A7 (ScyA7)**	**1010**	**4893 (4.9)**	**7727 (7.7)**
8.	Calmodulin 3 (Calm3)	40	170 (4.3)	42 (1.1)
9.	C21orf18 mRNA	77	304 (4.0)	320 (4.2)
10.	Per3	76	295 (3.9)	151 (2.0)
11.	**Reseptor transferrin (TF-R)**	**483**	**1802 (3.7)**	**2081 (4.3)**
12.	**Cyclooksigenase-2 (COX-2)**	**1591**	**5780 (3.6)**	**11001 (6.9)**
13.	**Growth arrest and DNA damage related protein 45 a (Gadd45a)**	**384**	**1391 (3.6)**	**10577 (27.5)**

Perbandingan kali lipat dengan normoksia 24 jam ditunjukkan dengan angka yang berada di dalam kurung.

Dari 20 gen yang paling teregulasi naik, 13 gen dapat dikenali dan 7 gen tidak dapat dikenali *(unknown)*. Gen yang diteliti adalah nama gen yang dicetak tebal. Pembahasan mengenai fungsi biologis gen yang dicetak tebal terdapat pada Bab 6 Pembahasan.

Pada Gambar 5.7 di bawah ini tampak induksi kinetik dari gen yang teregulasi naik yang paling menarik dengan fungsi biologis yang diketahui. COX-2 dan ScyA7 menunjukkan a *linear time-course* regulasi naik pada periode inkubasi lebih dari 48 jam.

Sebaliknya, ekspresi Gadd45a menunjukkan *lag-phase* selama 24 jam pertama namun kemudian secara tajam meningkat antara 24 dan 48 jam hiperoksia.



Gambar 5.7 Induksi kinetik gen yang terekspresi pada kondisi hiperoksia. Eksperimen *microarray* dilakukan seperti tergambar pada Tabel 5.5 Ekspresi data dasar mRNA lalu dipilih untuk dicari perbedaan ekspresinya (regulasi naik) spesies mRNA dengan fungsi yang diketahui (lihat Tabel 5.10).

Tabel 5.11 di bawah ini merupakan ringkasan 20 gen yang paling teregulasi turun saat sel dikultur pada kondisi hiperoksia. Ada 11 spesies mRNA yang tidak diketahui fungsinya (*unknown*) (data tidak dicantumkan dalam tabel). Untuk penelitian ini dipilih 3 spesies mRNA yang berbeda (yang dicetak tebal dalam tabel) karena alasan berikut: i) diketahui fungsi biologisnya, ii) memiliki derajat ketergantungan waktu dengan regulasi turun, iii) terekspresi tinggi atau sedang pada kondisi tersebut.

Tabel 5.11 Gen yang paling teregulasi turun selama hiperoksia

No.	Nama gen	24 jam Normoksia	24 jam Hiperoksia	48 jam hiperoksia
1.	Dentin matrix protein (Dmp1)	271	60 (4.5)	144 (1.9)
2.	Sterol-C4-methyl oxidase-like (Sc4mol)	18033	5144 (3.5)	5983 (3.0)
3.	Galactosyltransferase I	281	90 (3.1)	188 (1.5)
4.	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e (Atp5k)	34691	11181 (3.1)	15769 (2.2)
5.	Chloride channel 2 (Clcn2)	411	153 (2.7)	293 (1.4)
6.	Laminin B11 subunit 1 (Lamb1-1)	1665	625 (2.7)	5151 (3.1)
7.	Radical fringe gene homolog (Rfng)	2343	902 (2.6)	923 (2.5)
8.	G-protein gamma 3 linked gene (Gng3lg)	1082	424 (2.6)	81 (13.4)
9.	Zinc finger protein 96 (Zfp96)	537	218 (2,5)	405 (1.3)
10.	Transcription factor Id1B (Id1B)	13540	3399(4.0)	13618 (1.0)
11.	Cyclin D3 (Ccnd3)	9483	2797(3.4)	7204 (1.3)
12.	Mitogen activated protein kinase kinase 3b (Map2k3)	6153	2324 (2.7)	8846 (1.4)
13.	Translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (Timm22)	6004	2244(2.7)	3660(1.6)
14.	Translocase of inner mitochondrial membrane 17 kDA homolog (Timm17)	7991	3337(2.4)	6352(1.3)
15.	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like (Cox 7a 21)	7098	3059(2.3)	4909(1.4)

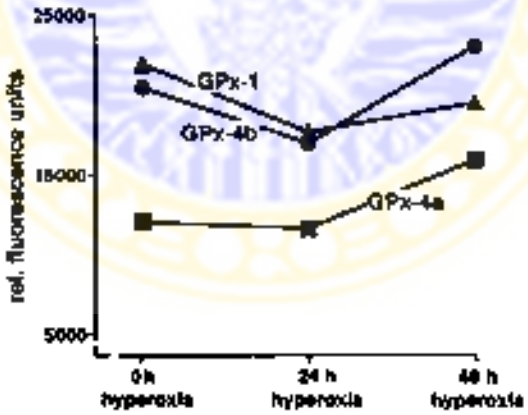
Perbandingan kali lipat dengan normoksia 24 jam ditunjukkan dengan angka yang berada di dalam kurung.

Tampak pada Tabel 5.11 bahwa F1 ATPase mitokondrial, enzim yang bertanggung jawab terhadap produksi ATP mitokondrial (*ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e*) teregulasi turun selama hiperoksia (3 kali pada 24 jam dan 2,2 kali pada 48 jam). Enzim lain dari rantai pernafasan mitokondria juga turun: i) dua subunit *adenine nucleotide translocase* dari membran mitokondrial bagian dalam (Timm 22: 2,7

kali pada 24 jam; 1,6 kali pada 48 jam; Timm17: 2,4 kali pada 24 jam, 1,3 kali pada 48 jam) ii) *cytochrome c oxidase subunit VIIa* (2,3 kali pada 24 jam; 1,4 kali pada 48 jam). Ditemukan juga bahwa beberapa protein yang terlibat dalam pengaturan proliferasi sel juga turun: i) *cyclin D3* (3,4 kali pada 24 jam dan 1,3 kali pada 48 jam), ii) *Transcription factor Id1B* (4 kali pada 24 jam dan 1 kali pada 48 jam), iii) *mitogen activated kinase kinase 3b* (Map2k3) (2,7 kali pada 24 jam dan 1,4 kali pada 48 jam). Penting untuk dicatat bahwa gen ini semua terekspresi pada kadar yang relatif cukup tinggi (fluoresensi relatif > 1000).

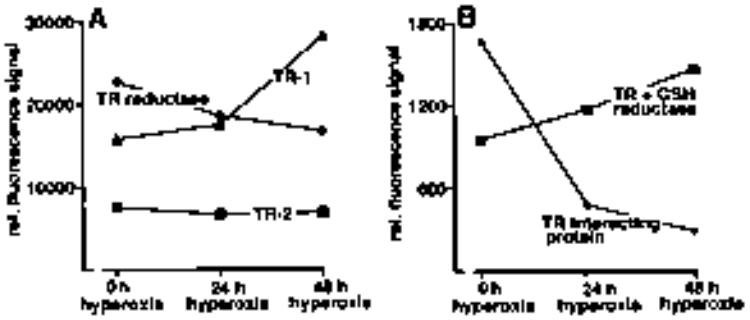
5.4.1.1 Enzim dan protein *anti-oksidatif defense cascade*

Hiperoksia adalah bentuk yang paling tepat bagi stress oksidatif. Untuk menggambarkan luasnya respon perlawanan anti oksidatif dari sel, maka dikuantifikasi kadar ekspresi dari sistem pertahanan anti-oksidatif klasik. Mekanisme antioksidatif seluler dapat dikategorikan dalam tiga kelompok: i) *glutathione-dependent reactions*, ii) *thioredoxin-dependent mechanisms*, iii) *glutathione- and thioredoxin-independent mechanisms*.



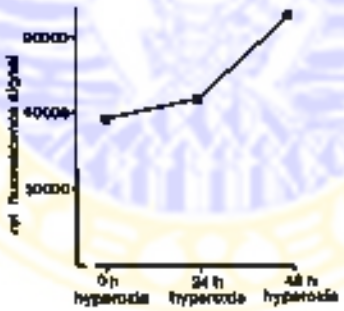
Gambar 5.8 Ekspresi pengaturan *isoform glutathione peroxidase* antioksidatif selama hiperoksia. Eksperimen *Microarray* experiments dilakukan seperti pada Bab Metode Penelitian. Data dasar ekspresi mRNA diseleksi perbedaan ekspresi dari isoform *glutathione peroxidase*. *Isoform glutathione peroxidase* yang lain (GPx-2, GPx-3) tidak terekspresi pada sel ini.

Berdasarkan data dasar mRNA *microarray* tidak ditemukan ekspresi GPx-2 dan GPx-3 pada sel 7F2. Sebaliknya, GPx-1 dan GPx-4 (kedua *isoform*) terekspresi pada kadar sedang sebagaimana ditunjukkan oleh intensitas sinyal fluoresensi (Gambar 5.8)



Gambar 5.9 Ekspresi pengaturan *thioredoxin-related proteins* (A,B) selama hiperoksia Eksperimen *microarray* dilakukan seperti dijelaskan pada Bab Materi dan Metode Penelitian. Ekspresi mRNA dari data dasar kemudian dibandingkan dengan data dari *microarray*.

Pada gambar 5.9 tidak ditemukan respon pengaturan utama pada gen ini. Hanya ada regulasi naik minor dari ekspresi *thioredoxin-1* setelah 48 jam hiperoksia dan *TR+GSH reductase* juga naik. Sebaliknya, *thioredoxin interacting protein* teregulasi turun selama hiperoksia.



Gambar 5.10 Ekspresi pengaturan katalase selama hiperoksia. Eksperimen *microarray* dilakukan seperti dijelaskan pada Bab Materi dan Metode Penelitian. Ekspresi mRNA dari data dasar kemudian dibandingkan dengan data dari *microarray*.

Katalase menunjukkan peningkatan pada kondisi hiperoksia (Gambar 5.10).

5.4.1.2 Enzim yang terlibat dalam metabolisme Fe *(iron)*

Untuk mendapatkan informasi lebih dalam mengenai homeostasis Fe pada sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia diekstraksi gen yang berhubungan dengan *turnover* Fe menggunakan perangkat lunak Affimetrix untuk melakukan *go-class* metabolisme Fe. Pada Tabel 5.12 gen yang paling teregulasi naik dibuat ringkasan.

Reseptor transferrin, yang direpresentasikan pada *microarray* oleh beberapa oligonukleotida adalah yang paling kuat teregulasi naik (3.73 kali).

Tabel 5.12 Gen yang terlibat dalam metabolisme Fe (*iron*)

No.	Nomer Affimetrix	Nomer Akses	Gen	Kali lipat
1	1417061_at	BC003438	Solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1	2.55
2	1448566_at	AF226613	Mus musculus ferroportin1 (Fpn1) mRNA, complete cds.	2.35
3	AFFX-TransRecMur/X 57349_3_at	X57349	reseptor transferrin mRNA	3.73

Eksperimen *Microarray* experiments dilakukan seperti tampak pada Tabel 5.5. Data dasar ekspresi mRNA diseleksi perbedaan ekspresi (regulasi naik) dari spesies mRNA pada kondisi hiperoksia (24 jam hiperoksia dibandingkan dengan 24 jam normoksia)

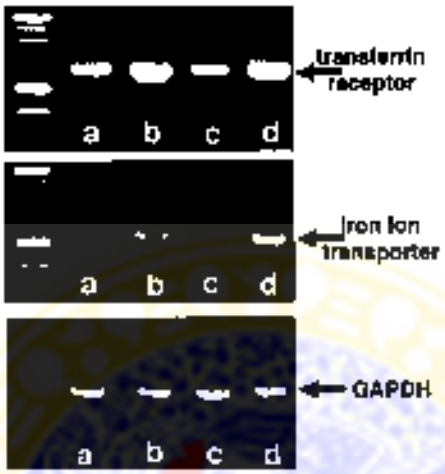
Ditemukan pula regulasi naik *iron regulated transporter* (2.55-kali) dan ferroportin-1 (2.35-kali). Dapat ditekankan bahwa tidak ada keseragaman kecenderungan ekspresi pengaturan bagi produk gen yang berkaitan dengan Fe. Faktanya, sebagian besar gen yang berhubungan dengan metabolisme Fe teregulasi dalam respon terhadap hiperoksia. Tidak dapat diprediksikan dengan evaluasi data ekspresi gen apakah ada atau tidak perubahan fungsional dalam metabolisme Fe. Untuk menguji pertanyaan mengenai fungsinya dalam metabolisme Fe maka perlu dilakukan penelitian eksperimental lebih lanjut.

5.4.2 *Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction* (RT-PCR)

5.4.2.1 *Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction* (RT-PCR) semi kuantitatif

5.4.2.1.1 Gen yang berkaitan dengan Fe (*Iron*)

Dari Gambar. 5.10 tampak bahwa ekspresi reseptor transferrin (gambar teratas) lebih tinggi pada kondisi hiperoksia jika dibandingkan dengan normoksia.



Gambar. 5.11 RT.PCR semi-kuantitatif reseptor transferrin dan *iron regulated transporter* yang terekspresi pada sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia. Sel 7F2 ditumbuhkan 24 jam pada kondisi normoksia dan hiperoksia. Setelah diambil, RNA total diekstrak dan RT-PCR dilakukan seperti tergambar pada Bab Materi dan Metode Penelitian. Pada tiap bagian atas (reseptor transferrin), bagian tengah (*iron regulated transporter*), bagian bawah (GAPDH), berlaku keterangan sebagai berikut : a) normoksia 24 jam, b) hiperoksia 24 jam, c) normoksia 48 jam, d) hiperoksia 48 jam.

Pengamatan ini dibuat tanpa memperhatikan apakah sel diinkubasi selama 24 jam (slot a dan b) atau 48 jam (slot c dan d). Pada kedua kasus, pita PCR yang didapat pada sampel hiperoksia sampel (slot b dan d) lebih padat (tebal) daripada yang didapat pada sampel normoksia (slot a dan c). Hasil yang sama didapat untuk *iron regulated transporter* (B tengah). Data ini konsisten dengan pengamatan dari studi *microarray*. Pada *microarray* tampak 3.73 kali ekspresi reseptor transferrin dan 2.55 kali teregulasi naik pada *iron regulated transporter*.

5.4.2.1.2 Gen GADD45a dan gen COX 2

Data *microarray* (Tabel 5.10) menunjukkan bahwa Gadd45a dan COX_2 termasuk gen yang paling kuat teregulasi naik. Untuk mengkonfirmasi data, dilakukan RT-PCR semikuantitatif menggunakan kombinasi primer khusus untuk produk gen tersebut. Dari Gambar. 5.11 tampak bahwa hiperoksia menghasilkan ekspresi dua gen ini setelah paparan 24 jam oksigen. Saat sel dikultur 48 jam hiperoksia tampak regulasi naik yang lebih kuat. Data ini konsisten dengan hasil studi *microarray*. intensitas sinyal GAPDH identik untuk semua sampel (data tidak ditunjukkan).

Gambar. 5.12 RT- PCR semikuantitatif dari Gadd45a dan COX2 sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia. Sel 7F2 pada kondisi 24 jam normoksia dan hiperoksia. Setelah diambil, RNA total diekstrak dan RT-PCR dilakukan seperti tergambar pada Bab Metode Penelitian. Analisis GAPDH menunjukkan intensitas yang sama bagi semua sampel.

5.4.2.1.3 Gen SeyA7, gen Spi11 dan gen Ccl

Data *microarray* (Tabel 5.10) menunjukkan bahwa SeyA7 dan Spi11 termasuk gen yang paling kuat teregulasi naik. Disini kembali dilakukan RT-PCR semikuantitatif untuk mengkonfirmasi data *microarray*. Dari Gambar 5.12 tampak bahwa hiperoksia menghasilkan ekspresi dua gen. Perbandingan intensitas pita menunjukkan bahwa setelah 24 jam dan 48 jam pita lebih padat (tebal) pada sampel hiperoksia jika dibandingkan dengan normoksia.

Dalam hal ini, intensitas sinyal GAPDH identik untuk semua sampel (data tidak ditunjukkan). Data RT-PCR ini mengkonfirmasi hasil studi *microarray*.

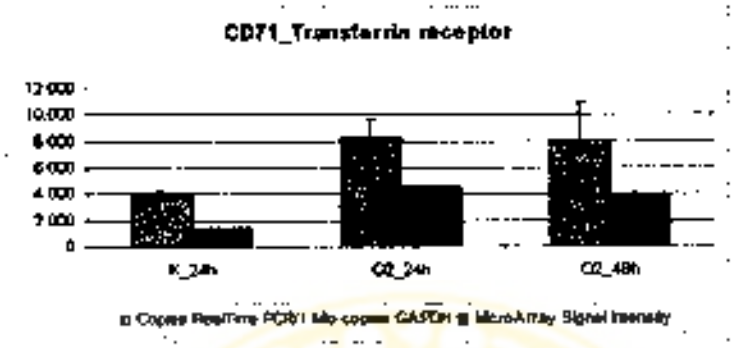
Gambar. 5.13 RT- PCR semikuantitatif dari ScyA7, Spi11 dan Cc1 sel 7F2 pada kondisi normoksia dan hiperoksia. Sel 7F2 pada kondisi 24 jam normoksia dan hiperoksia. Setelah diambil, RNA total diekstrak dan RT- PCR dilakukan seperti tergambar pada Bab Metode Penelitian. Analisis GAPDH menunjukkan intensitas yang sama bagi semua sampel.

Data *microarray* menunjukkan ekspresi Cc1. Kadar ekspresi gen ini sedikit lebih rendah bahkan setelah 48 jam hiperoksia (380 unit fluoresensi). Saat RT-PCR semikuantitatif dilakukan untuk gen ini tidak ada respon pengaturan besar yang tampak (data tidak ditunjukkan). Data ini menunjukkan bahwa hasil studi *microarray* tidak selalu dapat dipercaya karena rendahnya intensitas sinyal.

5.4.2.2 *Real-Time*-PCR

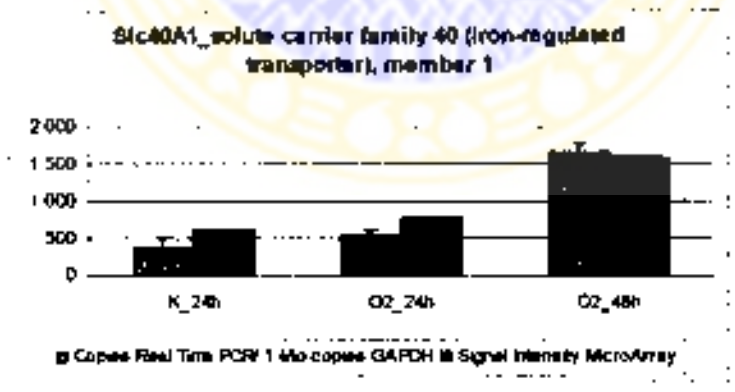
Untuk data yang lebih kuantitatif dari ekspresi gen yang paling kuat teregulasi dengan fungsi yang diketahui maka dilakukan PCR *Real-Time*. Metode ini memungkinkan kuantifikasi yang tepat dari jumlah kopi (salinan) mRNA yang ditentukan dalam sistem seluler. Untuk kuantifikasi dibutuhkan standard sinyal eksternal dan internal dan *time course* dari proses amplifikasi yang secara langsung menyertai. Sebagai standard internal mRNA yang biasa digunakan adalah GAPDH ß-actin. Pada sebagian besar sistem seluler gen ini tidak teregulasi dalam merespon rangsangan, tetapi gen ini sangat cocok untuk studi perbandingan. Sebagai standard eksternal *truncated version* (bentuk yang lebih praktis

dengan memotong bagian atas dan bawah) dari produk PCR yang diharapkan adalah yang biasa digunakan, yang dapat diamplifikasi dengan primer yang sama namun mempunyai berat molekul yang berbeda daripada produk PCR.



Gambar 5.14 Perbandingan *Microarray* dan *Real-Time PCR* untuk gen reseptor transferrin

Pada normoksia 24 jam tampak 3884 kopi reseptor transferrin mRNA tiap 1.000.000 kopi mRNA GAPDH. Setelah 24 jam hiperoksia 8325 kopi mRNA reseptor transferrin ditemukan tiap 1.000.000 mRNA GAPDH kopi menunjukkan 2,1 kali regulasi naik. Setelah 48 jam hiperoksia tidak ada peningkatan lebih jauh pada kadar ekspresi mRNA reseptor transferrin yaitu 8079 mRNA kopi tiap 1.000.000 kopi mRNA GAPDH (2,0 kali regulasi naik jika dibandingkan dengan normoksia 24 jam).

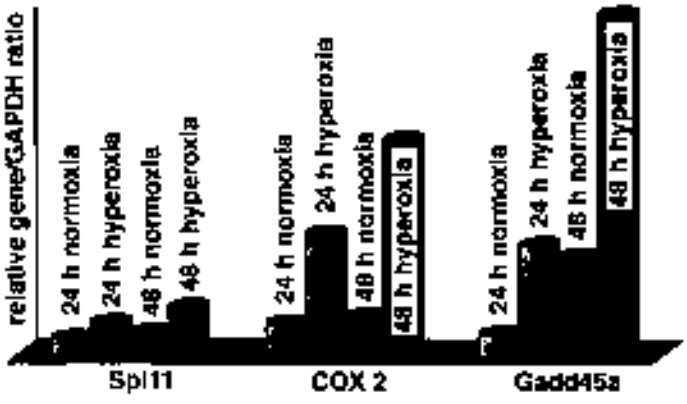


Gambar 5.15 Perbandingan *Microarray* dan *Real-Time PCR* untuk gen *iron regulated transporter*

Pada normoksia 24 jam tampak 359 kopi *iron regulated transporter* mRNA tiap 1.000.000 kopi mRNA GAPDH. Setelah 24 jam hiperoksia 555 kopi mRNA ditemukan *iron regulated transporter* tiap 1.000.000 mRNA GAPDH kopi menunjukkan 1,5 kali regulasi naik. Setelah 48 jam hiperoksia ada peningkatan yang cukup besar pada kadar ekspresi mRNA *iron regulated transporter* yaitu 1655 mRNA kopi tiap 1.000.000 kopi mRNA GAPDH (4,6 kali regulasi naik jika dibandingkan dengan normoksia 24 jam).

Data ini mengkonfirmasikan hasil yang didapat dari hibridisasi *microarray* dan semikuantitatif RT-PCR. Luas regulasi naik agak berbeda untuk tiga metode. Pada hibridisasi *microarray* tampak regulasi 3,7 kali meningkat pada konsentrasi mRNA reseptor transferrin mRNA saat sel dikultur pada kondisi 24 jam hiperoksia dan nilai yang sama diperoleh dengan semikuantitatif RT-PCR. Kuantifikasi dengan PCR *Real-Time* menunjukkan regulasi naik yang lebih rendah (2,1 kali).

Selanjutnya, dianalisa kadar ekspresi relatif dari Spi11, COX2 dan Gadd45a. Dari Gambar. 5.14 tampak bahwa ekspresi tiga gen ini teregulasi naik pada kondisi hiperoksia baik pada saat sel dikultur selama 24 jam atau 48 jam. Data ini konsisten dengan hasil penelitian yang didapat selama hibridisasi *microarray* dan RT-PCR semikuantitatif. Gen ScyA7 tidak terekspresi pada pemeriksaan Real Time PCR. Sedangkan gen Ccl menunjukkan ekspresi naik sebesar 1,28 kali lipat antara hiperoksia 24 jam dan normoksia 24 jam. Pada hiperoksia 48 jam terdapat regulasi sebesar 1,04 kali lipat jika dibandingkan dengan normoksia 24 jam (Data tidak ditunjukkan).



Gambar. 5.16 RT-PCR *Real-Time* gen yang paling teregulasi naik dengan fungsi yang diketahui. 7F2 ditumbuhkan pada kondisi 24 jam normoksia dan kondisi hiperoksia. Setelah sel diambil, RNA total diekstraksi dan RT-PCR *Real-Time* dilakukan seperti dijelaskan pada Bab Metode Penelitian. Tingginya kolom menunjukkan kadar ekspresi relatif gen tersebut dalam hubungannya dengan ekspresi GAPDH. Tampak bahwa ekspresi semua gen teregulasi naik pada kondisi hiperoksia tanpa memperhatikan apakah dikultur 24 jam atau 48 jam pada kondisi hiperoksia.

5.5 DNA Sequencing

5.5.1 Gen reseptor transferrin (CD71)

Pada gen reseptor transferrin (CD71) dilakukan pemeriksaan *DNA Sequencing* dan pemeriksaan homologi dengan program *Genetyx-Mac* versi 8.0. Pertama, data gen reseptor transferrin (CD71) dengan nomer akses X57349 dicari di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Kemudian susunan primer dicari di data gen NCBI. Daerah antara primer dipotong dari data NCBI lalu dihomologikan dengan daerah antara primer dari sampel (dari hasil *DNA Sequencing*). Primer sebagai pedoman untuk menentukan homologi.

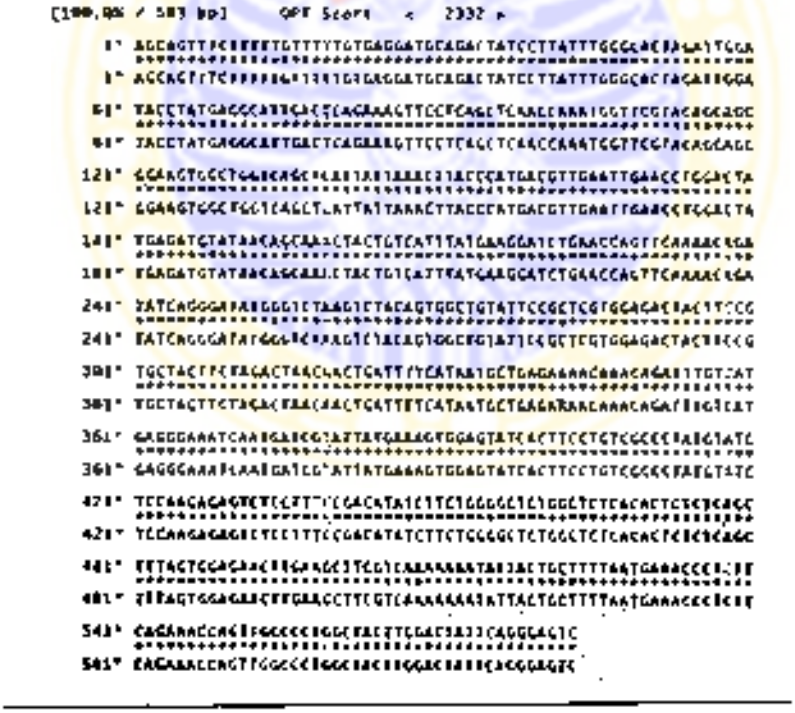
Data Gen Reseptor Transferrin dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

```
Sequence  583 BP;  162 A;  123 C;  175 T;  123 G.
agcagtttct tttgttttt gtggaggtgc agactatcct tatttgggca ctagattggg      60
tacctatggg gcattgactc agaaagttcc tcagctcaac caaatggttc gtacagcagc     120
gggagtggct agttgactca ttattgaact taccccatgc gttgaatttg aaaccctgga     180
tagagtatat aacagcaaac tacttgtcat ttatgaaggc atctgaacca gttcaaaact     240
tatcagggat atgggtctgg gtctacagtg gctgtattcc ggctcgtgga gactactccg     300
tgctacttct agactaacaa ctgatttca tatagtgctg aagaaaacaa acagatttgt     360
gaggcaaatc aatgatcgta ttatgaaagt ggagtatcac ttcctgtccg ccctatgtat     420
tccaagagag tctcctttcc gacatatctt ctgggggctg tggctctcac actctcgcag     480
tttagtgagg acttgaagtc ttcgtcaaaa gagtattact gcttttaatg aaaacccttt     540
cagaaaccag ttggcccttg gctcttgagc tattcgaggg gtc                       583
```

Data Gen Sampel Reseptor Transferrin

```
Sequence  583 BP;  162 A;  123 C;  175 T;  123 G,  0 other
agcagtttct tttgttttt gtggaggtgc agactatcct tatttgggca ctagattggg      60
tacctatggg gcattgactc agaaagttcc tcagctcaac caaatggttc gtacagcagc     120
gggagtggct agttgactca ttattgaact taccccatgc gttgaatttg aaaccctgga     180
tagagtatat aacagcaaac tacttgtcat ttatgaaggc atctgaacca gttcaaaact     240
tatcagggat atgggtctgg gtctacagtg gctgtattcc ggctcgtgga gactactccg     300
tgctacttct agactaacaa ctgatttca tatagtgctg aagaaaacaa acagatttgt     360
gaggcaaatc aatgatcgta ttatgaaagt ggagtatcac ttcctgtccg ccctatgtat     420
tccaagagag tctcctttcc gacatatctt ctgggggctg tggctctcac actctcgcag     480
tttagtgagg acttgaagtc ttcgtcaaaa gagtattact gcttttaatg aaaacccttt     540
cagaaaccag ttggcccttg gctcttgagc tattcgaggg gtc                       583
```

Gen tyx-Mac versi 8.0: Data Homologi Sekuens Nukleotida Gen Reseptor Transferrin



Dari data tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa terdapat 100% kesamaan data sekuens yang didapat pada penelitian ini dengan sekuens yang diperoleh dari data dasar.

5.5.2 Gen *iron regulated transporter* (Slc40A1)

Pada gen *iron regulated transporter* (Slc40A1) dilakukan pemeriksaan *DNA Sequencing* dan pemeriksaan homologi dengan program *Genetyx-Mac* versi 8.0. Metode yang digunakan sedikit berbeda dengan metode yang digunakan untuk gen reseptor transferrin. Pertama, data gen *iron regulated transporter* (Slc40A1) dengan nomer akses BC003438 dicari di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Kemudian susunan primer dicari di data gen NCBI. Daerah antara primer dari data NCBI dihomologikan dengan hasil *sequencing* dengan program *Genetyx-Mac*. Program akan mencari homologi dan sekuens primer. Homologi tertinggi yang digunakan.

Data Gen *Iron Regulated Transporter* dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

```
Sequence  481 BP;  107 A;  119 C;  144 T;  111 G;  0 other.
tataaccagc caqtqtttct qqctqqcatq qqcctqqtct tcctctatat qacagtcctq      60
qqctttqact qtatcactac qqqatacqcc tacactcagg qqctqaqtqq atccatcctt     120
aqtattttqa tqqqaqcatc qqcaatqatc qqaataatqq qaatcqtqqc ctccacctqq     180
ctacqtcqaa aatqtqqcct tqttcqqact qqtctattct caaaactqqc ccaqctttcc     240
tqtttaatct tqtqtqtqat ctccqtattc atqcctqaaa qccccttqqa cctqtctqtt     300
tctccatttq aaqatatccq ttctaqqttt qtqaatqtqq qqccaqtqtc cccaactacc     360
aaaatacctq aqaccqtctt tacaacaqaa atqcatatqt ccaacatqtc taatqtccat     420
qaqatqaqta ctaaacccat ccccatqqtc tctqtcaqcc tqctqtttqc aqqaqtcatt     480
q                                                                     481
```

Data Gen Sampel *Iron Regulated Transporter*

```
Sequence  685 BP;  194 A;  166 C;  154 T;  171 G;  0 other.
GTGCTGGAAT TCGCCCTTGG ACAAAGACCG ATTCTAGCAG CAATGACTCC TGCAAACAGC      60
AGGCTGACAG AGACTATGGG GATGGGTTTA GTACTCATCT CATGGACATT AGACATGTTG     120
GACATATGCA TTTCTGTTGT AAAGACGGTC TCAGGTATTT TGGTAGTTGG GGACACTGGC     180
TCACATTCAC AAACCTAGAA CGGATATCTT CAAATGGAGA AACAGACAGG TCCAAGGGGC     240
TTCCAGGCAT GAATACGGAG ATCACACACA AGATTAAACA GGAAAGCTGG GCTAGTCCTG     300
AGAATAGACC AGTCCGAACA AGGCCACATT TTCGACGTAG CCAGGTGAAG GCCACAGTTC     360
CCATTATTCC AGTTATTGCT GATGCTCCCA TCAAAATACT AAGGATGGAT CCACTCAGCC     420
CCTGAGTGTA GGCGTACCCT GTAGTGATAC AGTCAAAGCC CAGGACTGTC ATATAGAGGA     480
AAGCCAGGCC CATGCCAGCC AGAAACACTG GCTGGTTATA GTAGGAGACC CATCCATCTC     540
GGAAGGGCGA ATTCTGCAGA TATCCATCAC ACTGGCGGCC GCTCGAGCAT GCATCTAGAG     600
GGCCCAATTC GCCCTATAGT GAGTCGTATT ACAATTCACT GGCCGTCGTT TTACAACGTC     660
GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTAC                                           685
```

Genetyx-Mac versi 8.0 : Data Homologi Sekuens Nukleotida Gen *Iron Regulated Transporter*

Jika dibandingkan dengan data dasar hasil *sequencing* penelitian ini, terdapat 98,5% kesamaan sekuens. Nukleotida yang salah pasangan dapat menandakan mutasi pada gen ini namun dikenal sebagai artefak *sequencing*. Pengulangan *sequencing* dapat dilakukan untuk memperkecil kemungkinan timbulnya artefak *sequencing*.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Penghambatan Proliferasi Sel Oleh Hiperoksia

Beberapa peneliti sejak tahun 2000 telah menyatakan bahwa jumlah oksigen yang terdapat pada kultur sel dapat mempengaruhi proses diferensiasi sel (Csete *et al*, 2001; Erickon *et al*, 2002; Struder *et al*, 2000). Kultur sel yang berada pada lingkungan buatan membutuhkan suplai semua elemen yang dibutuhkan anabolisme dan metabolisme sel normal termasuk oksigen. Sel aerobik, seperti sel mamalia, mempunyai konsumsi oksigen yang relatif lebih tinggi selama proses proliferasi. Namun batas aktual kecukupan jumlah oksigen belum didefinisikan, pemahaman yang umumnya dipakai adalah menyediakan oksigen dalam jumlah berlebih, dibandingkan dengan tekanan parsial oksigen yang tersedia pada jaringan hidup.

Hiperoksia dapat dikategorikan sebagai kondisi yang patologis. Hiperoksia menghasilkan pembentukan radikal bebas yang nantinya dapat menimbulkan kerusakan oksidatif (Zweier *et al*, 1989). Namun bagi kondisi tertentu, (misalnya hipoksia yang parah), hiperoksia dapat dipertimbangkan sebagai pendekatan terapeutik karena dapat mengembalikan kondisi jaringan menjadi normoksia (Gille dan Joenje, 1992). Hiperoksia menghasilkan radikal bebas ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti oksigen singlet ($^1O_2$), hidrogen peroksida (H_2O_2), ion hipoklorit (ClO^-), radikal hidroksil ($\bullet OH$), radikal peroksil ($\bullet OOH$) dan ion superoksida ($O_2^{-}\bullet$) dan RNS (*Reactive Nitrogen Species*) seperti *nitric oxide* ($NO\bullet$) dan peroksinitrit ($ONOO^-$). Beberapa studi dengan

menggunakan kultur menunjukkan bahwa hiperoksia mempengaruhi proliferasi sel (Corroyer *et al*, 1996; Rancourt *et al*, 2001; Shenberger dan Dixon, 1999) namun mekanisme fisiologis yang mendasarinya belum pernah diteliti. Ada dua mekanisme utama yang kemungkinan dapat menjelaskan mengapa hiperoksia dapat menghambat proliferasi sel yaitu kerusakan DNA atau perubahan status redoks sel (Vuillaume, 1987; Hoenje, 1989). Salah satu target utama ROS adalah DNA. Kemampuan oksidan dalam merusak DNA sudah cukup dikenal, termasuk pecahnya utas, yang, jika tidak segera dan dengan benar diperbaiki, dapat mengganggu secara langsung ekspresi gen yang terlibat dalam pengaturan proliferasi dan diferensiasi (Imlay dan Linn, 1988). Beberapa peneliti telah melaporkan penghambatan proliferasi sel oleh ROS disebabkan oleh terhentinya atau terhambatnya siklus sel (Vincent *et al*, 1989 dan 1991). Pada beberapa literatur disebutkan bahwa hiperoksia menghasilkan ekspresi *tumor suppressor protein* p53 (Barazzone *et al*, 1998; O'Reilly *et al*, 1998; Rancourt *et al*, 2001; Shenberger dan Dixon, 1999). Karena hiperoksia meningkatkan ekspresi p53 pada beberapa *cell lines*, efek ini dapat dianggap sebagai jalur utama untuk menjelaskan mekanisme hiperoksia yang berkaitan dengan penghentian pertumbuhan (*growth arrest*) (el-Deiry et al, 1993). Hiperoksia menunjukkan peningkatan konsentrasi p21 mRNA melalui mekanisme tergantung p53 tanpa mempengaruhi kadar mRNA *G1-phase kinase inhibitors*. Sebaliknya, target utama p53 adalah *cyclin-dependent kinase inhibitor p21*, yang menghambat proliferasi dan merangsang perbaikan DNA (Barazzone *et al*, 1998; O'Reilly *et al*, 1998). Pada penelitian ini ditemukan perubahan proliferasi sel osteoblas di bawah kondisi hiperoksia. Data ini konsisten dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh von Zglinicki *et al*, 1995; McGrath, 1998; Cazals *et al*, 1994) yang

menyatakan bahwa oksigen yang berlebihan dapat menghambat proliferasi pada fase G1-, S-, dan G2. Pada data *microarray*, tidak ditemukan p53 dan p21. Data ini menunjukkan bahwa pada osteoblas ekspresi p53 dan p21 mungkin tidak berkaitan dengan penghentian pertumbuhan yang disebabkan hiperoksia. Ada kemungkinan pada *cell line* lain, mekanisme p53 dan p21 itu terlibat dalam penghentian pertumbuhan (*growth arrest*).

Paparan NO• berlebih pada sel dapat menyebabkan modifikasi kovalen gugus –SH pada *gliseraldehida-3-phosphate dehidrogenase* dan kerusakan besi-protein sulfur di mitokondria. Kedua efek berkaitan dengan produk oksidasi derivat NO• (N_2O_3, $ONOO^-$). Efek toksik langsung dari kelebihan NO• termasuk hambatan *ribonukleotida reduktase* dan *sitokrom oksidase*; NO• menghambat ikatan O_2 dengan kompleks multienzim mitokondrial esensial. NO• juga bereaksi dengan *ferrositokrom c* untuk membuat Fe(III) sitokrom c plus NO•, yang dapat bereaksi dengan O_2 untuk membentuk ONOO-. Osteoblas mempunyai *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dan menghasilkan NO•(Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Nitric oxide (NO•) adalah molekul *signalling* yang penting dalam berbagai kondisi fisiologis dan patologis. NO• juga merupakan molekul lipofilik yang sangat kecil yang secara cepat berdifusi dan mencapai komponen sitoplasmik dan dihasilkan dari aktivasi berbagai fungsi biologis yang berbeda. NO• merupakan radikal diatomik bebas yang diproduksi saat *nitric oxide synthases* (NOSs) mengkatalisa konversi *L-arginine* dan *L-citrulline*. NO• konsentrasi rendah dapat merangsang pertumbuhan sel dan melindungi berbagai tipe sel dari apoptosis, sedangkan NO• konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan sel dan menyebabkan apoptosis (Kim *et al*, 2001). NO• mempunyai aksi yang bertentangan yaitu merangsang dan menghambat pertumbuhan sel pada tahap kultur

yang berbeda (Hassid *et al*,1994) atau pada sistem sel yang berbeda (Konturek *et al*, 1993; Munoz-Fernandez dan Fresno, 1993; Zicho *et al*, 1994; Jenkins *et al*, 1995). Stimulasi NO• ringan dijembatani oleh *cyclic GMP generation* dan penghambatan NO• yang kuat disebabkan oleh *cyclic GMP-independent pathways* (Angel dan Karin, 1991). Pada efek penghambatan, mekanisme yang sudah diketahui adalah blokade ribonukleotida reduktase. Dalam beberapa literatur telah dilaporkan bahwa kultur osteoblas mensintesis NO• dalam merespon sitokin *proinflammatory* dan lipopolisakarida (Damoulis dan Hauschka, 1994; Ralston *et al*, 1994). Sitokin yang dihasilkan NO• melalui osteoblas menghambat resorpsi tulang dengan menyebabkan apoptosis dari sel progenitor osteoblas dan menekan aktivitas osteoblas (van't Hof dan Ralston,1997; Yamamoto *et al*, 1999). Dalam proliferasi sel, NOS inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine dilaporkan menghasilkan efek penghambatan yang tergantung dosis pada proliferasi *osteoblats-like MG63 cell lines* dan pada *ROS 17/2.8 cell lines* menunjukkan bahwa NO• mungkin merangsang proliferasi sel tulang (Riancho *et al*, 1996). Sebaliknya dilaporkan bahwa sitokin yang dihasilkan NO• mengurangi aktivitas osteoblas pada konsentrasi tinggi, seperti dibuktikan oleh penghambatan sintesis DNA, proliferasi sel, aktivitas alkalin fosfatase dan produksi osteokalsin. Sehingga efek NO• pada proliferasi osteoblas dapat bertentangan tergantung pada konsentrasinya (Hukkanen *et al*, 1995; Riancho *et al*, 1996). Pada konsentrasi sedang NO• berpotensi menyebabkan resorpsi tulang dan produksi NO• pada konsentrasi rendah merangsang *proliferasi osteoblast-like cells* dan memodulasi fungsi osteoblas (Evans dan Ralston, 1996). Juga dilaporkan bahwa pelepasan perlahan dan sedang NO• akan merangsang replikasi *primary rat osteoblast* dan aktivitas alkalin fosfatase, sedangkan pelepasan NO• cepat dan konsentrasi tinggi

akan menghambat proliferasi dan menghasilkan apoptosis (Mancini *et al*,2000). Pada studi binatang, NO• diekspresikan selama penyembuhan patah tulang pada tikus coba dan disebutkan bahwa penekanan NOS mempengaruhi penyembuhan patah tulang dan suplementasi NO• dapat melawan penghambatan penyembuhan yang dihasilkan oleh NOS inhibitor (Corbett *et al*, 1999 ; Diwan *et al*, 2000). NO• juga dilaporkan dapat mengaktifkan *cytoplasmic guanylate cyclase* pada *vascular smooth muscle* dan menurunkan *vascular tone* melalui mekanisme tergantung cGMP (Prabhakar *et al*, 1997). NO• memegang peranan penting dalam remodeling tulang melalui modifikasi proliferasi sel (Kanamaru *et al*, 2001). NO• memiliki efek bifasik pada osteoblas, pada konsentrasi rendah NO• dapat mengatur proliferasi normal atau merangsang proliferasi, sedangkan pada konsentrasi tinggi dapat menghambat proliferasi dan menghasilkan apoptosis Kanamaru *et al*, 2001; Mancini *et al*, 2000; Armour *et al*, 2001).

Pada Gambar 5.2 Kinetik pertumbuhan sel 7F2 di bawah kondisi normoksia dan hiperoksia (jumlah sel, konsentrasi protein dan konsentrasi DNA) pada Bab 5 Analisis Hasil Penelitian tampak penurunan proliferasi sel pada kelompok hiperoksia jika dibandingkan dengan kelompok normoksia. Tampak pada kinetik pertumbuhan sel 7F2 tersebut adanya peningkatan awal konsentrasi DNA yang lebih jelas daripada peningkatan pada jumlah sel dan protein sel. Data ini menunjukkan bahwa sel mungkin dapat memulai replikasi materi genetiknya (sintesis DNA) tapi pembelahan sel (meningkatnya jumlah sel dan protein sel) terhambat. Data ini mengindikasikan bahwa hiperoksia *in vitro* menghambat proliferasi sel osteoblas tikus. Data ini sejalan dengan eksperimen pertumbuhan sel yang dilakukan dengan sistem sel yang lain pada kondisi hiperoksia (*Tissue culture* yang kaya akan osteoblast dari Gibco yang berasal dari

embrionik Sprague-Dawley *rat calvariae* yang berumur 19-21 hari) (Tuncay *et al*, 1994) yaitu bahwa saat populasi kultur sel yang kaya osteoblast dipapar hiperoksia maka proliferasi sel tampak terhambat. Namun data ini berlawanan dengan pengamatan bahwa paparan hiperoksia meningkatkan aktivitas osteoblas dan mendukung penyembuhan patah tulang (Gray dan Hamblen, 1975; Pamela 1990; Simon, 1994). Salah satu mekanisme penyebab penghambatan proliferasi sel yang mungkin adalah melalui pembentukan radikal bebas (termasuk RNS) sesuai dengan penelitian Mancini *et al*, 2000, Kanamaru *et al*, 2001 dan Armour *et al*, 2001 yang menemukan bahwa pelepasan NO• cepat dan konsentrasi tinggi akan menghambat proliferasi dan menghasilkan apoptosis. Namun faktanya pada data *microarray* tidak dijumpai ekspresi dari *NO• synthase*. Fenomena ini mungkin disebabkan karena gen NOS yang seyogyanya ada dalam *GeneChip Mouse Expression Set 430* tidak tereskpresi pada pemeriksaan *microarray*. *GeneChip Mouse Expression Set 430* mengandung 34.300 gen, sedangkan data *microarray* memberikan gambaran mengenai 22.690 gen.

Mekanisme lain yang mungkin dapat menjelaskan penghambatan proliferasi sel osteoblas pada kondisi hiperoksia adalah dengan meningkatnya kadar ekspresi gen Gadd45a yang merupakan gen yang befungsi dalam regulasi negatif (penghambatan) pertumbuhan sel. Pada data *microarray*, ekspresi Gadd45 apada kondisi normoksia 24 jam adalah 384 yang kemudian meningkat 3,6 kali lipat menjadi 1391 unit fuoresensi relatif pada kondisi hiperoksia 24 jam. Menariknya pada kondisi hiperoksia 48 jam, ekspresi Gadd45a melonjak tajam 27,5 kali lipat menjadi 10577 unit fluoresensi relatif.

Kemungkinan mekanisme terhambatnya proliferasi sel adalah karena peran Gadd45a dalam penghambatan *G1/S transition* melalui interaksi dengan *cyclin-dependent*

kinase inhibitor p21 $^{WAF1/CIP1}$ dan *proliferating cell nuclear antigen* (Kearsey *et al*, 1995; Smith *et al*, 1994; Zhao *et al*, 2000; Vairapandi *et al*, 2000, El-Deiry *et al*, 1993; Harper *et al*, 1993; Deng *et al*, 1995). *p21* yang terikat pada *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) memblokir perkembangan siklus sel melalui dua jalur yaitu menghambat *cyclin dependent kinase* (cdk) dan menghambat secara langsung replikasi DNA pada fase S. *Cyclin dependent kinase* itu sendiri berfungsi merangsang perkembangan siklus sel terutama replikasi DNA (Cooper dan Hausman, 2004). Fase G1 adalah fase antara mitosis dan permulaan replikasi DNA. Selama fase G1, sel secara metabolik aktif dan terus tumbuh tapi tidak mereplikasi DNA. Sedangkan fase S (*Synthesis*) adalah fase saat replikasi DNA terjadi. Respon pengaturan siklus sel yang utama terjadi pada akhir fase G1 (*decision point in late of G1/ START/Restriction point*) atau antara fase G1 dan fase S. Saat sel melalui START maka sel berprinsip untuk memasuki fase S dan berlanjut ke satu siklus pembelahan sel. START dipengaruhi oleh signal eksternal (misal kecukupan *nutrient*, hiperoksia). Jika sel mendapat signal eksternal (contohnya hiperoksia), maka sel menghentikan siklus sel pada START dan masuk pada kondisi istirahat daripada ke fase S. START adalah DP (*decision point*) untuk menentukan apakah signal eksternal itu mendukung atau mengganggu siklus pembelahan. START merupakan titik keputusan (*decision point*) pengkoordinasian replikasi DNA dan pembelahan sel. Proliferasi pada sebagian besar binatang diatur pada fase G1. Titik keputusan akhir G1 disebut *restriction point* (RP) yang analog dengan START. Bila ada *growth factor* (GF) maka sel melalui RP dan masuk ke fase S. Sekali sel melalui RP, sel berprinsip untuk menjalankan fase S bahkan jika GF tidak ada. Jika GF tidak ada di G1, maka perkembangan siklus terhenti pada RP, dan sel masuk ke fase G0 (tidak berproliferasi dalam jangka waktu lama). Pada

fase G0, sel masih aktif secara metabolik meski menghentikan pertumbuhan dan menurunkan sintesis protein.

Gadd45a juga berperan dalam perangsangan *G2/M arrest melalui interaksinya dengan* Cdc2 kinase dan perannya dalam merusak interaksi antara Cdc2 dan cyclin B_1 (protein penghasil mitosis) (Zhan *et al*, 1999; Wang *et al*, 1999; Jin *et al*, 2000). Fase G2 adalah fase dimana pertumbuhan sel berlanjut dan protein disintesis untuk persiapan mitosis. Sedangkan fase M adalah fase terjadinya mitosis yang diikuti sitokinesis. Regulasi pertumbuhan sel juga bisa diatur pada fase G2. Pada transisi antara fase G2 dan Fase M, ketersediaan nutrient dimonitor oleh sel. Signal ekstrasel mengendalikan proliferasi sel pada G2-M sama dengan pengendalian pada G1-S. Hal ini belum jelas hingga saat ini, mekanisme mana yang terlibat pada penghambatan pertumbuhan dan apakah perubahan ini reversibel atau tidak jika konsentrasi oksigen diturunkan hingga mencapai konsentrasi normal.

6.2 Kadar ekspresi gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dan hubungannya dengan aktifitas osteoblas

Fe memegang peranan vital dalam pematangan, pertumbuhan dan pembelahan sel (Taylor *et al*, 1985; Frazier *et al*, 1982; Vandewalle *et al*, 1985). Sel mendapatkan nutrient Fe yang penting melalui aksi reseptor transferrin. Transport ekstraseluler dan penyimpanan Fe dalam tubuh ditunjang oleh ikatannya dengan protein khusus yaitu transferrin (Bomford dan Munro, 1985). Reseptor transferrin tersusun dari dua 760-subunit glikoprotein asam amino dengan berat ~ 95 kDa (Huebers dan Finch, 1987; Ward, 1987; Ecarot-Charrier *et al*, 1980). Transferrin dibutuhkan untuk proliferasi dan

differensiasi terminal (Ekblom dan Thesleff, 1985). Reseptor transferrin (TfR) adalah gen yang paling penting bagi homeostasis seluler Fe (*iron*) (Oria, 1995). Jumlah reseptor transferrin pada permukaan sel sangat meningkat pada sel yang berproliferasi dengan cepat (Larrick dan Cresswell, 1979; Trowbridge dan Omary, 1981; Hamilton, 1982). Peningkatan tajam kadar reseptor transferrin pada sel yang berproliferasi dibutuhkan untuk sintesis DNA (Neckers dan Crossman, 1983; Trowbridge dan Lopez, 1982). Reseptor transferrin merefleksikan potensi untuk proliferasi sel. Status proliferatif sel merupakan faktor yang mampu mempengaruhi ekspresi reseptor transferrin per detik. Status proliferatif yang tinggi berhubungan dengan kepadatan tinggi reseptor transferrin (Sutherland *et al*, 1981). Jumlah reseptor transferrin berkaitan dengan kepadatan sel dan *rate* proliferasi secara in vitro. Kadar fisiologis transferrin dpat meningkatkan sintesis DNA dan peningkatan transferrin dapat mempengaruhi proliferasi osteoblas (Kasai *et al*, 1990). Gen ini bertanggung jawab terhadap pengambilan Fe seluler dan defisiensinya akan mengarah kepada ketidakseimbangan suplai Fe seluler yang parah. Reseptor transferrin sangat penting bagi pengendalian pertumbuhan sel. Begitu pentingnya reseptor transferin, sehingga blokade pada reseptor transferrin pada sel akan menghambat sintesis DNA (Neckers *et al*, 1985). Waktu yang dibutuhkan untuk *G1 arrest* berkaitan dengan kadar awal reseptor transferrin permukaan. Saat ekspresi reseptor transferrin rendah, maka kemungkinan untuk terjadinya *G1 arrest* menjadi lebih besar. Sebaliknya jika kadar respetor transferrin tinggi maka kemungkinan terjadinya *G1 arrest* menjadi lebih kecil. Ekspresi reseptor transferrin selama siklus sel bervariasi pada tiap jenis sel namun sebagian besar terekspresi tinggi pada awal fase G1 dan kadarnya menurun saat akhir fase G1 (Neckers *et al*, 1988). Menurut data *microarray*, reseptor transferrin secara jelas

tergolong kelas gen yang dirangsang oleh hiperoksia. Gen ini terekspresi rendah pada kondisi normoksia 24 jam (unit fluoresensi relatif 483), namun ini teregulasi naik 4 kali pada kondisi hiperoksia 24 jam. Tidak ada keseragaman kecenderungan ekspresi pengaturan bagi produk gen yang berkaitan dengan Fe. Faktanya, sebagian besar gen yang berhubungan dengan metabolisme Fe teregulasi dalam kondisi hiperoksia.

Iron Regulated Transporter (IRT) adalah transporter utama yang bertanggung jawab terhadap *uptake* Fe (Vert *et al*, 2002) Menurut data *microarray*, *iron regulated transporter* secara jelas tergolong kelas gen yang dirangsang oleh hiperoksia. Gen ini terekspresi rendah pada kondisi normoksia (unit fluoresensi relatif 624), namun ini teregulasi naik 3 kali pada kondisi hiperoksia. Tampak regulasi naik *iron regulated transporter* sebesar 2.55-kali. Tidak dapat diprediksikan dengan evaluasi data ekspresi gen apakah ada atau tidak perubahan fungsional dalam metabolisme Fe. Untuk menguji pertanyaan mengenai fungsinya dalam metabolisme Fe maka perlu dilakukan penelitian eksperimental lebih lanjut.

Pada beberapa literatur dinyatakan bahwa hiperoksia (oksigen konsentrasi tinggi) dapat mempengaruhi fungsi sel dan mempercepat aktivitas osteoblas. Hiperoksia menghasilkan bentukan oksigen reaktif (ROS – *superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singulet oxygen*) dan nitrogen reaktif (RNS - *nitric oxide, peroxyitrite*) yang menghasilkan respon seluler, berperan dalam *cell signaling* dan pengaturan ekspresi gen. Oksigen ini kemudian mempengaruhi ekspresi gen tertentu yang salah satunya adalah gen Fe (reseptor transferrin dan *iron regulated transporter*). Fe adalah *trace element* yang cukup penting bagi metabolisme sel terutama pada pertumbuhan sel. Gen yang cukup penting dalam homeostasis Fe adalah reseptor transferrin dan *iron regulated*

transporter. Status oksidatif sel yaitu regulasi naik (*upregulated*) atau turun (*downregulated*) dari gen dalam tubuh termasuk salah satu faktor yang mempengaruhi keseimbangan Fe seluler. Keterlibatan produk gen yang teregulasi naik atau turun utamanya pada gen Fe dalam hal ini adalah reseptor transferrin dan *iron regulated transporter* akan berkaitan dengan perubahan fungsi dasar sel, seperti proliferasi dan diferensiasi sel. Sutherland tahun 1981 menyebutkan bahwa status proliferatif sel sangat berkaitan dengan kepadatan reseptor transferrin pada permukaan sel. Semakin tinggi kadar ekspresi kedua gen ini dapat dikatakan semakin banyak Fe yang dapat ditangkap oleh sel. Semakin banyak Fe yang dapat ditangkap oleh sel maka metabolisme Fe seluler akan semakin meningkat. Fe berperan penting dalam metabolisme semua sel, terutama pada proses fisiologis sel seperti pertumbuhan sel, termasuk proliferasi dan diferensiasi sel, apoptosis, transfer elektron, replikasi DNA dan transport oksigen. Metabolisme Fe seluler yang cukup tinggi dapat memicu peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel. Proliferasi sel prekursor dan progenitor adalah lini terdepan dari proses osteogenesis yang kemudian diikuti dengan diferensiasi sel menjadi osteoblas aktif, produksi matriks tulang (kolagen dan non-kolagen) dan kalsifikasi matriks tulang (deposisi calsium phosphate). Sehingga diharapkan peningkatan ekspresi gen reseptor transferrin dan gen iron regulated transporter dapat mengarah kepada percepatan aktivitas osteoblas dan proses osteogenesis yang berdampak pada percepatan penyembuhan patah tulang.

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi 22690 gen (regulasi naik atau regulasi turun) pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam. Dari keseluruhan data ekspresi gen *mouse osteoblast* 7F2 tersebut diperoleh daftar 20 gen yang paling teregulasi naik dan turun. Kemudian dilakukan pemilihan gen yang akan

menjadi obyek penelitian berdasarkan kriteria fungsi biologisnya diketahui, memiliki derajat ketergantungan waktu dengan regulasi naik atau turun dan memiliki kadar ekspresi sedang atau tinggi. Selain membahas profil ekspresi gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter*, dipandang sangat perlu pengkajian mengenai gen lain dari kelompok 20 gen yang teregulasi naik sebagai sumbangan ilmiah bagi dunia pengetahuan.

6.3 Ekspresi gen lain pada mouse osteoblas cell-lines 7F2 pada kondisi hiperoksia

Pembahasan dilakukan terhadap 5 gen lain dalam kelompok gen yang paling teregulasi naik yaitu gen Gadd45a, gen COX-2, gen Spi11, gen Scy A7, dan gen Cc1. *Growth arrest and DNA damage inducible protein a 45 (Gadd45a)* adalah protein yang terikat pada *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) dan mungkin berperan dalam interaksinya dengan CDK (*cell division protein kinase*), merangsang eksisi repair in vitro dan menghambatn masuknya sel ke fase S. Gadd45a sebagai *p53-regulated gene* yang produk proteinnya terlibat dalam mempertahankan stabilitas *genome*. Ketiadaan Gadd45a memicu pada *aneuploidy* parah sebagai konsekwensi amplifikasi sentrosom dan segregasi kromosom abnormal secara berturut-turut selama mitosis. Selain itu, Gadd45a dibutuhkan untuk kontrol fase S dan pengaturan titik kontrol pada kondisi kekurangan nutrisi (Hollander *et al*, 2005). Pentingnya Gadd45a dalam mempertahankan integritas genomik menunjukkan bahwa gangguan Gadd45a endogen pada tikus menghasilkan ketidakstabilan genomik dan karsinogenik. Gadd45a muncul sebagai komponen yang penting dalam jaringan pertahanan seluler yang dibutuhkan untuk mempertahankan kestabilan genomik (Zhan, 2005). Regulasi naik yang kuat dan tergantung waktu dari gen

ini pada sel 7F2 selama hiperoksia (Gambar. 5.7) dianggap sebagai respon melawan sel untuk mencegah kerusakan *genome* berlebihan. Faktanya, setelah 48 jam hiperoksia tampak 27.5 kali regulasi naik mRNA dan kadar ekspresinya sangat tinggi (10577 unit fluoresensi relatif).

Cyclooksigenase-2 (COX2) adalah protein yang berperan sebagai enzim dan secara khusus mengkatalisa produksi prostaglandin. Ekspresi protein ini teregulasi naik secara kuat saat sel radang (misal granulosit, monosit) dirangsang dengan *pro-inflammatory signaling molecules* (Williams *et al*, 1999). Ekspresi COX_2 pada osteoblas (sel 7F2) tidak terlalu mengherankan karena enzim ini juga terlibat dalam diferensiasi sel. Menariknya mRNA sangat kuat teregulasi naik dan tergantung waktu pada kondisi hiperoksia (7 kali setelah 48 jam hiperoksia). Faktanya, gen ini terekspresi dengan kadar sedang (1591 unit fluoresensi relatif), tapi setelah hiperoksia ekspresinya meningkat sejalan dengan waktu (Gambar. 5.7 pada Bab 5) dan ekspresi enzim menjadi sensitif terhadap oksigen.

Serine proteases (Spi) adalah enzim proteolitik yang merupakan kelompok peptidase yaitu enzim yang memotong ikatan peptida pada protein. Gen ini berperan dalam pemecahan protein matriks ekstraseluler selama inflamasi namun juga berpartisipasi dalam siklus koagulasi (Mansat, 1997).Serpin diketahui dapat menghambat proses seluler kritis seperti adesi, migrasi dan produksi radikal bebas (Rubin, 1996). Aktivitas enzimatik diatur pada tingkat transkripsional dan translasional, tapi juga ekspresi penghambatan protein. *Serine protease* dihambat oleh *serine protease inhibitor*, kelompok enzim yang berlawanan aksinya yang membentuk ikatan kovalen dengan *serine protease*. Serpin yang paling banyak dipelajari adalah *antithrombin* dan *alpha 1-*

antitrypsin dalam kaitannya dengan koagulasi/thrombosis dan *emphysema*. Penentuan kadar serine protease dapat berguna dalam berbagai penyakit seperti kadar faktor koagulasi (dibutuhkan untuk diagnosis *hemorrhagic*/ kondisi trombotik), fecal elastase (untuk menentukan aktivitas eksokrin pankreas misalnya pada *cystic fibrosis/chronic pancreatitis*) dan *prostate spesific antigen* (untuk menentukan resiko kanker prostat). Gen *serine protease inhibitor (Spi11)* endogen, hanya terekspresi rendah pada sel normal 7F2 saat sel dikultur pada kondisi hiperoksia. Regulasi naik gen ini hanya tampak selama 24 jam hiperoksia (7.8 kali lipat). Paparan oksigen yang lebih lama tidak akan memicu peningkatan konsentrasi mRNA.

Small inducible cytokines (Scy) merupakan bagian dari hormon bioaktif, yang menghambat pengaturan pertumbuhan dan aktifitas pro-inflamatori (Hogan, 1994). Scy merupakan faktor kemotaktik yang menarik monosit eosinofil. Protein ini meningkatkan aktivitas anti-tumor, melepaskan gelatinase B dan dapat mengikat heparin. Gen ini diekspresikan pada sel inflamasi atau hematopoietik dan terlibat dalam patogenesis inflamasi. Pada penelitian ini mRNA dari ScyA7 saat dikultur pada kondisi normoksia terekspresi rendah. Pada kondisi hiperoksia ekspresinya teregulasi naik 5 kali (24 jam) dan 8 kali (24 jam). Pada gen ini tampak ketergantungan terhadap waktu yang jelas dan pada 48 jam hiperoksia ekspresi mRNA pada kadar yang tinggi (7727 unit fluoresensi relatif).

Coiled coil forming protein (Ccl) diidentifikasikan sebagai glikoprotein ekstraseluler, yang mengikat vitamin D dan hormon lipofilik yang lain (Ozbek *et al*, 2002). Gen ini diperlukan bagi metabolisme tulang, muncul berperan pada homeostasis kalsium dan terlibat dalam proses mineralisasi. Selain itu, gen ini juga terlibat dalam

diferensiasi vitamin D. Pada kondisi hipcroksia ekspresi gen ini teregulasi naik 13.3 kali lipat (24 jam hiperoksia) dan 22.3 kali lipat (48 jam hiperoksia). Bahkan setelah 48 jam hiperoksia gen ini hanya terekspresi rendah.

Selain itu, gen yang dikarakterisasi teregulasi turun relatif cukup tinggi, ada perubahan lain yang luar biasa yang mempengaruhi fungsi dasar sel. Tampak pada Tabel 5.11 bahwa F1 ATPase mitokondrial, enzim yang bertanggung jawab terhadap produksi ATP mitokondrial (*ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e*) teregulasi turun selama hiperoksia (3.1 kali pada 24 jam dan 2.2 kali pada 48 jam). Enzim lain dari rantai pernafasan mitokondria juga turun: i) dua subunit *adenine nucleotide translocase* dari membran mitokondrial bagian dalam (Timm 22: 2.7 kali pada 24 jam dan 1.6 kali pada 48 jam; Timm17: 2.4 kali pada 24 jam dan 1.3 kali pada 48 jam) ii) *cytochrome c oxidase subunit VIIa* (2.3 kali pada 24 jam dan 1.4 kali pada 48 jam). Ditemukan juga bahwa beberapa protein yang terlibat dalam pengaturan proliferasi sel juga turun: i) *cyclin D3* (3.4 kali pada 24 jam dan 1.3 kali pada 48 jam), ii) *Transcription factor Id1B* (4 kali pada 24 jam dan 1 kali pada 48 jam), iii) *mitogen activated kinase kinase 3b* (Map2k3) (2.7 kali pada 24 jam dan 1.4 kali pada 48 jam). Penting untuk dicatat bahwa gen ini semua terekspresi pada kadar yang relatif cukup tinggi (fluoresensi relatif > 1000). Prilaku pengaturan gen ini pada kondisi hiperoksia muncul sebagai relevansi biologis.

Efek merusak SOR dilawan oleh molekul pertahanan antioksidan yang meliputi enzim seperti superoksida dismustase, katalase dan *gluthathione peroxidases* atau vitamin dengan berat molekuler rendah (Michiels *et al*, 1994). *Glutathione peroxidases (GPx)* bentuk dari golongan peroksidase, yang mengurangi peroksida organik dan inorganik

untuk berikatan dengan senyawa hidroksi (Kuehn, 2002). Terdapat *selenium-dependent* dan *selenium-independent GPxs*. GPxs yang mengandung selenium dapat dibagi menjadi 4 subfamili utama: a) *cytosolic GPx* (GPx-1), b) *plasma GPx* (GPx-2), c) *gastro-intestinal GPx* (GPx-3), d) *phospholipids hydroperoksida GPx* (GPx-4, dua isoform). Berdasarkan data dasar mRNA *microarray* tidak ditemukan ekspresi GPx-2, GPx-3 dan GPx5 pada sel 7F2. Sebaliknya, GPx-1 dan GPx-4 (kedua *isoform*) terekspresi pada kadar sedang sebagaimana ditunjukkan oleh intensitas sinyal fluorosensi (Gambar 5.5) Menariknya, ekspresi kinetik dua isoform ini sama. Awalnya, tampak regulasi turun sedikit pada ekspresi GPx setelah 24 jam hiperoksia diikuti dengan regulasi naik. Tidak terdeteksi *major counter-regulative upregulation* dari *selenium-dependent GPx-isoform*. Trend yang sama diamati pada enzim dari homeostasis *glutathione*. Ekspresi *glutathione reductase* tidak teregulasi selama hiperoksia. *Glucose-6-phosphate dehidrogenase*, enzim utama *oksidatif pentose phosphate shunt*, yang merupakan jalur utama NADPH seluler teregulasi turun selama hiperoksia sekitar 35 %. Hasil ini menunjukkan bahwa pada hiperoksia tidak ada regulasi naik produksi NADPH sebagai kondisi awal dari peningkatan reaksi *glutathione*.

Thioredoksin dan thioredoksin reduktase menyusun sistem *glutathione-dependent* redoks alternatif. Karena pada penelitian ini tidak diamati regulasi utama pada *glutathione system* selama hiperoksia kami mengharapkan regulasi naik dari *thioredoxin system*. Seperti tampak pada Gambar. 5.6 tidak ditemukan respon pengaturan utama pada gen ini. Hanya ada regulasi naik minor (0.9- 1.8 kali lipat) dari ekspresi *thioredoxin-1* setelah 48 jam hiperoksia dan *TR+GSH reductase* (0.8-1.5 kali lipat) juga naik.

Sebaliknya, *thioredoxin interacting protein* teregulasi turun (0.1-0.8 kali lipat) selama hiperoksia.

Superoksida dismutases (SOD) enzim anti-oksidatif yang mereduksi superoksida menjadi hidrogen peroksida. Ada dua isoform SOD; *copper/zinc enzyme* yang ditemukan di sitosol sebagian besar tipe sel (SOD-1) dan *manganese enzyme* (SOD-2), yang utamanya muncul di mitokondria (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Bentuk SOD yang telah dioksidasi direduksi oleh superoksida dan reaksi ini menghasilkan oksigen. Bentuk SOD yang sudah tereduksi selama reaksi ini bereaksi dengan molekul superoksida lain untuk membentuk anion peroksida, yang mengambil dua proton untuk membentuk hidrogen peroksida. Ditemukan ekspresi SOD-2 (*manganese enzyme*) hanya sedikit teregulasi turun (10 %) setelah 48 jam hiperoksia. SOD-1 turun sekitar 40 % setelah periode inkubasi. Data ini cukup mengejutkan karena tidak menunjukkan tanda- tanda proteksi antioksidatif.

Katalase adalah zat lain yang merupakan bagian kaskade anti-oksidatif (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Zat ini mendetoksifikasi hidrogen peroksida membentuk air dan molekul oksigen. Zat ini merupakan hemoprotein dengan berat molekul 120 kDa. Katalase terdapat pada sitoplasma sebagian besar sel termasuk eritrosit dan berada pada konsentrasi yang tinggi di peroksisom. Seperti dua *isoform* SOD, katalase merupakan katalis yang sangat efisien. Rata-rata katalis sangat tinggi dan reaksi menunjukkan kontrol difusi. Hal ini berarti bahwa rata-rata katalisis dibatasi oleh availabilitas substrat. Ditemukan bahwa hiperoksia menghasilkan 20 % hingga 35 % (48 jam) peningkatan dalam ekspresi katalase yang mungkin dapat diterjemahkan sebagai respon anti-oksidatif terhadap stress oksidatif yang disebabkan hiperoksia.

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan tingkat pengekspresian gen reseptor transferrin dan gen *iron regulated transporter* dari *mouse osteoblast cell line* 7F2 pada kondisi normoksia 24 jam, hiperoksia 24 jam dan hiperoksia 48 jam pada 1 atm (atmosfir). Ekspresi gen reseptor transferrin (TfR), gen *Iron Regulated Transporter* (IRT), gen *Growth Arrest DNA Damage 45 alpha* (Gadd45a), gen *Cyclooxigenase-2* (COX-2), *gen Small inducible cytokine A7* (Scy A7), gen *Serine protein inhibitor 11* (Spi11) dan gen *Coil coiled forming protein* (Cc1) pada kultur sel *mouse osteoblast cell line* 7F2 mengalami regulasi naik (*upregulation*) pada kondisi hiperoksia 24 jam dan 48 jam pada 1 ATA (atmosfir absolut).

2. Paparan hiperoksia selama 24 jam 1 atm (atmosfir) terus menerus secara in vitro menghasilkan efek penghambatan proliferasi sel (jumlah sel, konsentrasi protein dan konsentrasi DNA) *mouse osteoblast cell line* 7F2.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai efek hiperoksia secara in vivo pada hewan coba untuk mengetahui protein yang berperan dalam proses osteogenesis.

2. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh hiperoksia terhadap ekspresi gen lain selain gen Fe dengan mengeksplorasi kelompok gen yang paling teregulasi naik untuk mengetahui fungsi biologis dan peranannya dalam proses osteogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

Aarts MG,BTE Lintel Hekkert, EB Holub, JL Beynon, WJ Stiekema, A Pereira,1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in Arabidopsis thaliana.Mol Plant Microbe Interact, 11(4) : p 251-8

Affymetrix, 2003. Santa Clara,USA.www.affymetrix.com, 22 Agustus 2004, 16.00 WIB

Afzal F, Polak J, Buttery L,2004. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblasic mineralizing activity and bone integrity. J.Pathol.2004 Apr ; 202(4) : pp 503-10

Aisen P, Listowsky I,1980. Iron transport and storage proteins. Ann Rev.Biochem 49 : Pp 357-393

Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME, 1999. A recombinant human TGF- beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration,growth and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. Exp Cell Res.1999 Aug 1 ; 250(2) : pp 485-98

Angel P dan Karin M, 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim. Biophys.Acta, 1072, 129-157

Appley, 1993. System of Orthopaedics and Fractures. 7 ed, ELBS with Butterworth-Heinemann. p. 80-87

Apley AG, Solomon L, and Mankin HJ. 1997. How Fracture heal. In: Apley's System of Orthopaedics and fracture. 7th ed. Butherworth Heinemann: p 518 -- 520

Armour KJ, Armour KE, van't Hof RJ, Reid DM, Wei XQ, Lew FY, Ralston SH, 2001. Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis. Arthritis Rheum 44, 2790-2796

Ausubel AM, Brent R,Kingston RE, Smith JA,Seidmann JG, Struhl D,1991. Current protocols in molecular biology.New York : John Wiley & Sons

Avioli L V, Krane S M , 1990. Metabolic Bone Disease and Clinically related Disorders, 2nd ed., Philadelphia-London- Toronto -Montreal - Sydney - Tokyo, p 8-15, 21-24

Bacon BR, Britton RS,1990. The pathology of hepatic iron overload : a free radical-mediated process. Hepatology 11 : p 127

Baker E and Morgan EH,1994. Iron Metabolism in Health and Disease(Brock JH, Halliday JW,Pippard MJ, Powell LW.,eds),WB Saunders Company Ltd,London,63-95

Barrazone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I and Piguet PF, 1998. Oxygen toxicity in mouse lung : pathways to cell death. Am. J. Respire Cell. Mol.Biol 19 : pp 573-581

Barnes D, Sato G, 1980. Serum-free culture : a unifying approach. Cell 22 : 649-655

Beck GR Jr, Zerler B, Moran E,2001. Gene array analysis of osteoblast differentiation. Cell Growth Differ 12 : pp 61-83

Berlett BS,Stadtman ER,1997.Protein oxidation in aging,disease and oxidative stress,. J Biol Chem 272 : pp 20313-20316

Bianchi S, Fabiani S, Muratori M, Arnold A, Sakaguchi K, Miki T, Brandi ML, 1994. Calcium modulates the cyclin D1 expression in a rat parathyroid cell line. Biochem Biophys Res Commun 204 : pp 691-700

Billiard J, Moran RA,whitley MZ,Chatterjee-Kishore M,Gillis K,Brown EL Komm BS,Bodine PVN,2003.Transcriptional Profoling of Human Osteoblas Differentiation,Journal of Cellular Biochemistry 89 : pp 389-400

Bomford AB, Munro HN, 1985. Transferrin and its receptor : their roles in cell function. Hepatology, 5, 870-5

Bortell R, Barone LM, Tassinari MS, Lian JB and Stein GS, 1990. Gene expression during endochondral bone development : Evidence for coordinate expression of transforming growth factor beta 1 and collagen type 1. J.Cell Biochem 44(2): pp 81-91

Bourne S,Polak JM,Hughes SP,Buttery LD,2004. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells : differential gene expression analysis by cDNA microarray and purification of osteoblass by cadherin-11 magnetically activated cell sorting. Tissue Eng.2004 May-Jun; 10(5-6) : pp 796-806

Brighton CT,Krebs AG,1972. Oxygen and healing fractures in the rabbit. J.Bone Joint Surg 1972 54 : pp 323

Bronner F, Worrel RV, 1991. A Basic Science Primer in Orthopaedics,Williams and Wilkins,Baltimore- Hongkong - London - Munich - San Fransisco - Sydney - Tokyo, pp 14, 24, 53, 186

Bucher JR,Ming T,Aust SD,1983. The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ironrous Iron.Biochem Biophysl Res Commun, 111 : pp 777

Buckwalter JA,Glimcher MJ,Cooper RR,Recker R, 1995. Bone Biology, J Bone Joint Surg (Am),77(8): pp 1256-1272

Buckwalter JA,Einhorn, Simon,2000.Orthopaedic Basic Science,Biology and Biomechanic of The Musculoskeletal System,2nd.ed., American Academy of Orthopaedic Surgeon, p 320-355.

Cairo G, Pietrangelo A,1995. Nitric oxide mediated activation of Iron regulatory protein controls hepatic Iron metabolism during acute inflammation.Eur.J.Biochem 232 : pp 358-363.

Cairo G, et al, 1998.Effects of Reactive Oxygen species on Iron Regulatory Protein Activity, Annals of the New York Academy of Sciences 851 : pp 179-186

Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, Gariboldi M, Myers TG, Weinstein JN, Pommier Y, Fornace Jr AJ, 1999. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA acessability on damaged chromatin. Mol Cell Biol 19 : 1673-1685

Cazals V, Mouhieddine B, Maitre B, Le Bouc Y, Chadelat K, Brody JS, Clement A, 1994. Insulin-like growth factors, their binding proteins and transforming growth factor-beta 1 in oxidant-arrested lung alveolar epithelial cells. J Biol Chem May 13; 269 (10) : pp 14111-7

Cazzola M, Bergamaschi G dkk ,1990. Manipulations of cellular Iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation : achievements and prospects. Blood 75, pp 1903

Chae HJ, Kang JS, Han JI, Bang BG, Chae SW, Kim KW, Kim HM, Kim HR, 2000. Immunopharmacol.Immunotoxicol. 22, pp 317-337

Chen Y,Dougherty ER, Bittner ML, 1997. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray gambars. J.Biomed. Optics 2, pp 364-374

Cheung VG *et.al*, 1999. Making and reading microarrays,Nature Genet.21, pp 15-19

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH,2000. Mechanism of transforming growth factor beta1 induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblasic MC3T3-E1 cells. Biochim Biophys Acta.2000 Jun 2; 1497 (1) : pp 69-76

Corbett SA, Hukkanen M, Batten J, McCarthy ID, Polak JM, dan Huges SP, 1999. Nitric oxide in fracture repair. Differential localization, expression and activity of nitric oxide synthases. J.Bone Joint Surg. Br.81 : 531-537

Cooper GM dan Hausman RE, 2004. The Cell A Molecular Approach. 3rd edition. ASM Press, Washington DC, 591-607

Corroyer S, Maitre B, Cazals V and Clement A, 1996. Altered regulation of G1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells. Accumulation of inactive cyclin E-DCK2 complexes. J.Biol.Chem 271, pp 25117-25125

Cotran RS, Kumar V, Collins T, 1999. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th ed., WB Saunders Company, Philadelphia, 75-76

Csete M, Walikonis J, Slawny N, Wei Y, Korsness S, Doyle JC, wold B, 2001. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. Cell Physiol 2001 Nov, 189 (2) : 189-96

Damoulis PD dan Hauschka PV, 1994. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 924-931

D'Angio CT, Finkelstein JN,2000. Oxygen regulation of gene expression : a study in opposites. Mol.Genet.Metab.71 : pp 371-380

Danziger RS, Zuckerbraun BS, Pensler JM, 1997. Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. Plast Reconstr Surg 1997 Sep ; 100(3) : pp 670-3.

Dalle-Donne I,Rossi R,Giustarini D, dkk, 2003. Protein carbonyl groups as biopenandas of oxidative stress. Biochim Biophys Acta 329 : pp 23-38

Debouck C, Goodironllow P,1999. DNA microarrays in drug discovery and development. Nature Genet. 21, pp 48-50

De Martino G, De Rosa RC, Vaira ML, Basile G, Ventriglia G, 1996. The extend of the oxygen free radicals damage during hyperbaric therapy. In (Marroni A, eds.). Proceeding of International Joint Meeting on Hyperbaric and Underwater Medicine. Instituto Ortopedico Galeazzi Milano, Italy. Sept 4-8

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P, 1995. Mice lacking p21 WAF1/CIP1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell 82 : 675-684

DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, and Paulsson M, 1994. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett 354, 237-240

Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, dan Murrell GA, 2000. Nitric oxide modulates fracture healing. J.Bone Miner Res 15, 342-351

Dillner-Canterling ML, Hammarstrom S, Perlmann P,1979. Transferrin can replace serum for in vitro growth of mitogen-stimulated T lymphocytes. Eur J Immunol 9 : pp 942

Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin J,Kaldy P,Kuehn LC,1993. Biosynthesis odf nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages.EMBO J : 12, pp 3643

Ducy P,Debois C.Boyce B,1994. Increased Bone Formation in Osteocalcin- Deficient mice. Nature 382 : pp 448-452

Ducy P,Zhang R,Geoffrey V,Ridall A,Karsenty G,1997.Cell, 89, pp 747-754

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM,1999. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999 Jan ; 21(1Suppl) : pp 10-4

Duncan RL,Turner CH,1995. Mechanotransduction and the functional respons of bone to mechanical strain. Calcif Tissue Int 57 : pp 344-358

Ecarot-Charrier B, Grey VL, Wilczynska A, Schulman HM, 1980. Reticulocyte membrane transferrin receptors. Can J. Biochem 58, 418-26

Efuni S N , Ashurova L D , Kaplan Y Y , Gusakov E A , Demirov EA, Kolotkina AS,1987. The use of kinetic indices of peroxidation in plasma to evaluate oxygen effects in humans. In (Kindwall E P eds). Proceeding of the Eight International Conggress on Hyperbaric Medicine. Long Beach, California, August 20-22, pp 8-12

Ekblom P dan Thesleff I, 1985. Control of kidney differentiation by soluble factors secreted by the embryonic liver and the yolk sac. Dev. Biol., 110, 29-38

Ekman S, Reinholt FP, Hultenby K and Heinegard D, 1997. Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in porcine growth cartilage. Calcif.Tissue.Int.60, 547-553

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein b, 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75, pp 817-825

Englesberg E, Wilcox G, 1974. Regulation : Positive control. Annu Rev Genet 8 : pp 219

Eriksen EF, Kassem M, 1992.The Cellular Basis of Bone Remodelling.Triangle 31: pp 45-56

Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F, 2002. Chondrogenic potensial of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys res Commun 2002 Jan 18 ; 290 (2) : 763-9

Erlich HA, 1992. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification.W.H.Freeman and Company, p 7-44

Ermolaeva O dkk, 1998. Data management and analysis for gene expression arrays. Nature genet.20,19-23

Evans DE dan Ralston SH, 1996. Nitric oxide and bone. J.Bone Miner res 11, 300-305

Fernandes RJ, SS Skiena,2002. Microarray synthesis through multiple-use PCR primer design.Bioinformatics,18 Suppl 1 : p S128-35

Fiedler-Nagy C, Bruckner P, Hayashi T, Prockop DJ, 1981. Isolation Of Unhydroxylated Type I Procollagen Folding Of The Protein In Vitro . Arch. Biochem.Biophys 2`1, 668-677

Fleming MD and Andrews NC, 1998. J.Lab.Clin.Med 32, 464-468

Fontecave M,Pierre JL,1993. Iron : Metabolism,toxicity and therapy.Biochemie 75 : 767

Fornace Jr AJ, Alamo Jr I, Hollander MC, 1988. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 85 : 8800-8804

Fornace AJ Jr, Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J and Holbrook NJ, 1989. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. Mol Cell Biol 9 : 4196-4203

Frazier JL, Caskey Jh, Yofiron M, Seligman PA,1982. Studies of the transferrin receptor on both human reticulocytes and nucleated human cells in culture. Journal of Clinical Investigation 69, pp 853-65

Fux C, Mitta B, Kramer BP, Fussenegger M, 2004. Dual-regulated expression of C/EBP-α and BMP-2 enables differential differentiation of C2c12 cells into adipocytes and osteoblasts. Nucleic Acids Research,2004. Vol 32.No 1 e1.

Galleano M dan Puntarulo S, 6 November 2004. Iron overload and Free radicals. http://www.antioxidantes.com.ar/12/FrArt055.htm).

Giegerich R,F.Meyer,C Schleiermacher,1996. GeneFisher-software support for the detection of postulated genes. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 4 : p 68-77

Gray DH, Hamblen DL,1975. The Effects of Hiperoksia Upon Bone in Organ Culture, Clin Orthop 1976 Sep; (119): pp 225-30

Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer RA, Schulthess T and Engel J, 1998. All-trans retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of five- stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein. EMBO J 17, 5265-5272

Guyton AJ, 1991. Text Book of Medical Physiology, 5th ed, WB Saunders Co.USA, p 45

Guyton AJ,1992. Text Book of Medical Physiology,5th ed,WB Saunders Co.,USA, 45

Hall BK, 1990. Bone.Volume 1 : The Osteoblas and Osteocyte, The Telford Press, Caldwell, New Jersey, p 87

Halliwell B , Gutteridge JMC, 1990. Role of Free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview.Meth Enzymol 186 : pp 1

Halliwell B , Gutteridge JMC, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edition, Oxford University Press Inc, New York, pp 73-82

Hamilton TA, 1982. Regulation of transferrin receptor expression in concanavalin A stimulated and gross virus transformed rat lymphocytes. J.Cell.Physiol 113, 40-46

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ, 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75 : 805-816

Hauschka PV, 1992. Growth Faktor Effects in Bone,Bone Volume I,The Osteoblas and Osteocyte,New Jersey,Telford Press, pp 103-170

Hauschka PV,2000. Research currently focuses on four important question in skeletal biology, e-mail: hauschka@ al.tch.Harvard.edu.

Hedborn E et al, 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem 267, 6132-6136

Heller RA, Schena M, Chai A dkk,1997. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. Proc. Natl Acad sci USA 94 : pp 2150-2155

Henry Y,Guissani A,1999. Interactions of nitric oxide with hemoproteins : roles of nitric oxide in mitochondria. Cell Moll Life Sci.1999 Jul;55 (8-9) : pp 1003-14

Hensley K,Robinson KA,Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA,2000. Reactive Oxygen spesies,cell signaling and cell injury.Free.Radic.Biol.Med. 28 : pp 1456-1462

Hentze MW, Kuhn LC,1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism : mRNA based regulatory circuits operated by Iron, nitric oxide and oxidative stress. Proc.Natl.Acad.Sci USA 93 : pp 8175-8182

Hirling H, Henderson BR, Kuhn LC,1994. Mutational analysis of the [illegible] 4Iron-4S]cluster converting iron regulatory faktor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. EMBO J.13 : pp 453-461

Ho WP, Chen TL, Chiu WT, Tai YT, Chen RM, 2005. Nitric Oxide induces osteoblast apoptosis through a mitochondria-dependent pathway. Ann N Y Acad Sci May 2005, 1042, 460-70

Hoenje H, 1989. Genetic toxicology of oxygen. Mutat. Res. 219 : 193-208.

Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JW, Tattersall MH,1976. Effect of Iron deficiency and deferrioxamine on DNA synthesis in human cells.British Journal of Haematology 33, pp 517

Hogan M, Sherry B, Ritchlin C, Fabre M, Winchester R, Cerami A, Bucala R, 1994. Differential Expression of the Small Inducible Cytokines GRO Alpha and GRO beta by synovial fibroblasts in chronic arthritis : Possible Role in Growth Regulation, Cytokine, Jan 1994, 6 (1) : pp 61- 69

Hollander MC, Alamo I, Jackman J, Wang MG, McBride OW and Fornace AJ, Jr, 1993. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. J Biol Chem 268 : 24385-24393

Hollander MC, Philburn RT, Patterson AD, Wyatt MA, Fornace AJ Jr, 2005. Genomic Instability in Gadd45a(-/-) Cells is Coupled with S-Phase Checkpoint Defects. Cell Cycle. 2005 May,14; 4(5)

Hou J, 2002. Design of endonuclease restriction sites into primers for PCR cloning. Bioinformatics, 18(12) : pp 1690-1

Howard S.An.MD, 1991.Synopsis of Orthopaedics.Assistant Professor. Director of Reconstructive Spine Surgery.Departement of Orthopaedics Surgery,The Medical College of Wisconsin,Milwaukee; 322-326

http://encyclopedia.thefreedictionary.com/DNA+microarray,4 November'05, 17.00 WIB

http://sickle.bwh.harvard.edu/Iron_difironrentiation.html),revised 6 October 1997, 6 November 2004. The role of Iron in Cell Proliferation and Differentiation

http://www.drugreseacher.com/productnews/productpresentation.asp?id=309, 20 April 2005 11.00 WIB, Real time, multiplex PCR can be so simple-hit all targets in one tube

http://www.nttrscientific.com/MaterialsDNASequencing.asp, 20 April 2005 11.50 WIB, Materials required for DNA sequencing services

Huebers HA, Finch CA, 1987. The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiol Rev, pp 67 :520-82

Hukkanen M, Hughes FJ, Buttery LD, Gross SS, Evans TJ, Seddon S, Riveros-Moreno V, MacIntyre I dan Polak JM, 1995. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. Endocrinology 136, 5445-5453

Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, Schipani E, Mallya S, Papanikolaou A, Kifor O, Tokura T, Sablosky M, Ledgard F, Gronowitz G, Wang TC, Schimdt EV, Hall C,Brown EM, Bronson R, Arnold A, 2001. Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. J Clin Invest 107 : pp 1093-1102

Imlay JA, Linn S, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science (Wash.DC). 240 : 1302-1309

Innis MA, Gelfand DA,1990. Optimization of PCRs. in : PCR Protocols (Innis,Gelfand,Sninsky,White,eds); Academic Press,New York, pp 3-12

Irani K,Xia Y,Zweier JL,Sollot SJ,Der CJ,Ironaron ER,Sundaresan M,Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ,1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts.Science 275 : pp 1649-1652

Jacob F, Monod J, 1961. Genetic regulatory mechanisms in protein synthesis. J Mol Biol 3 : pp 318

Jain KK, 1996. Text Book of Hyperbaric Medicine. Toronto : Hogrefe and Huber, 12-23

Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC dan Moncada S, 1995. Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc. Natl Acad. Sci USA, 92, 4392-4396

Jin S, Antinore MJ, Lung FDT, Dong X, Zhao H, Fan F, Colchagie AB, Blanck P, Roller PP, Fornace Jr AJ, Zhan Q, 2000. The Gadd45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with Gadd45-mediated growth suppression. J Biol Chem 275 : 16602-16608

Joyce ME Jingushi S, Bollander M,1990. Transforming Growth Faktor-b in tb regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am,21 (1): pp 199-209.

Kahn AJ, Partridge NC, 1987. New Concept in Bone Remodelling : An Expanding Role for the Osteoblas. Am J Otolaryngol 8 : pp 258-64

Kalfas Ian H, 2001.Principles of Bone Healing Neurosurg.Focus/Volume 10/April,p : 1-4

Kampke T, M Kieniger, M.Mecklenburg, 2001. Efficient primer design algorithms. Bioinformatics,17(3) : pp 214-25

Kanamaru Y, Takada T, Saura R, Mizuno K, 2001. Effect of nitric oxide on mouse clonal osteogenic cell, MC3T3-E1, proliferation in vitro. Kobe J Med Sci, 47, 1-11

Kasai K, Hori MT, Goodman WG, 1990. Characterization of the transferrin receptor in UMR-106-01 osteoblast-like cells. Endocrinology, Mar 1990, 126(3), 1742-9

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BA, Vogelstein B, Fornace Jr AJ, 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and Gadd45 is defective in ataxia-telengiectasia. Cell 71 : 587-597

Kawakabata H. Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP ,1999. Molecular cloning of TfR2. A new member of the transferrin receptor-like family. Journal of Biological Chemistry 274, pp 20826–20832

Kearsey JM, Coates PJ, Prescot AR, Warbrick E, Hall PA, 1995. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. Oncogene 11 : 1675-1683

Keith B, 1991. Bone : The Osteoclast. Volume 2. CRC Press, Florida, pp.1 – 183

Khan J dkk,1998. Gene expression profiling of alveolar rhabdomysarcoma with cDNA microarrays. Cancer.Res. 58, pp 5009-5013

Kim PK, Zamora R, Petrosko P dan Billiar TR, 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. Int. Immunopharmacol, 1, 1421-1441

Klausner RD, 1988. From receptors to genes : Insights from molecular iron metabolism. Clin Res 1988; 36, pp 494-500

Klausner RD, Rouault TA and Harford JB, 1993. Regulating the fate of mRNA the control of cellular iron metabolism. Cell 72, pp 19-28

Knowles RG, Moncada S, 1994. Nitric Oxide synthases in mammals. Biochem J 298 : pp 249

Kobayashi T dan Kronenberg H, 2005. Minireview : Transcriptional Regulation in Development of Bone. Endocrinology 146 (3), pp 1012-1017

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y,Yoshiki S, Kishimoto T,1997.Cell 89, pp 755-764

Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J dan Stachura J, 1993. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. Eur. J. Pharmacol, 239, 215-217

Koppenol WJ,1985. The reaction of ferrous EDTA with hidrogen peroxide : evidence against hydroxyl radical formation.Free Radical Biol Med 1 : pp 281

Kwok S,SY Chang,JJ Sninsky,A Wang,1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. PCR Methods Appl, 3(4) : p S39-47

Labarca, C., Paigen, K. (1980). A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure.; *Anal. Biochem.*, 102(2), pp 344-352

Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J.1997 Feb ; 11(2), pp 118-24

Larrick JW dan Cresswell P,1979. Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. J.Supramol Struct 11, 579-586

Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O.E., Yeo, C.Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U.K., Fallon, J.F., Tabin, C, 1997. Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. Nature 386, pp 366-373

Lederman HM, Cohen A, Lee JW, Freedman MH, Gelfand EW, 1984. Deferoxamine : a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. Blood 64, pp 748- 53

Lee, 1998. Programmed removal of chondrocyte during endokondral fractur healing, J Orthop Res, 16 : pp 144 – 150

Leis HJ, Hulla W, Gruber R, Huber E, Zach D, Gleispach H, Windischhofer W, 1997. Phenotypic heterogeneity of osteoblast-like MC3T3-E1 cells : Changes bradykinin-induced prostaglandin E2 production during osteoblast maturation. J.Bone Miner Res 12 : 541-551

Li LC, R Dahiya,2002. MethPrimer : designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics, 18(11), pp 1427-31

Linhart C, R.Shamir,2002. The degenerate primer design problem. Bioinformatics 18 suppl 1 : p S172-81

Li PF, Dietz R, von Harsdorf R,1999. IRONBS Lett.448, pp 206-210

Li TF, Dong Y, Ionescu AM, Rosier RN, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H, 2004. Parathyroid hormone-related peptida(PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA sinyaling pathway,Exp Cell Res, 2004 Sep 10, 299(1) : 128-36

Lieu PT, Heiskala M,Peterson PA, Yang Y, 2001. The roles of iron in health and disease. Molecular aspects of Medicine, 22, pp 1- 87

Long MW, Robinson JA, Ashcraft AE, Mann KG,1997. J.Clin Investig.95, pp 3-12

Loveridge 1999: Bone More Than a Stick J. Anim. Sci. Vol. 77, Suppl. 2/J. Dairy Sci. Vol. 82, Suppl. 2

Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martineti V, MacIntyre I, 2000. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblast are cGMP dependent. Biochem. Biophys. Res. Commun, 274, 477-481

Mansat V, Bettaieb A, Levade T, Laurent G, Jaffrezou JP, 1997. Serine Protease Inhibitors Block Neutral Sphingomyelinase Activation, Ceramide Generation, and Apoptosis triggered by Daunorubicin, The FASEB Journal, Vol.21, July 1997, pp 695-702

McGrath SA, 1998. Induction of p21 WAF/CIP1 during hyperoxia. Am J Respir Cell I Mol Biol Feb; 18 (2) : pp 179-87

McPherson MJ, Jones KM, Gurr SJ, 1991. PCR with highly degenerate primer. In PCR, A Practical Approach (edited by MJ McPherson,P.Quirke,GRTaylor,1991), Oxford University Press,Oxford, p 171-174

Meneghini R, 1997. Iron homeostasis,oxidative stress and DNA damage. Free Radical Biol Med 1997 ; 23(5) : pp 783-92

Michiels C, Raes M, Toussaint O and Remacle J, 1994. Importance of Se-gluthathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic Biol Med 17, 235-248

Miner, J.H., Yurchenco, P.D, 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 20, pp 255-284

Moore EE,1998. Preparation of immortalized cells. US Patent 5,830,682 dated Nov 3

Muller G, Michel A and A. Altenburg E, 1998. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is synthesized in ligament, tendon, meniscus and articular cartilage. Connect. Tissue. Res. 39, 233-244

Mundi GR, 1993. Bone Resorbing Cells. Primer on The Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism. 2nd edition. Raven Press Ltd New York. p. 6-9, 25-31

Munoz-Fernandez MA dan Fresno M, 1993. Involvement of nitric oxide on the cytokine induced growth of glial cells. Biochem. Biophys.Res.Commun, 194, 319-325

Neckers LM, Tsuda H, weiss E, Pluznik Dh, 1988. Differential expression of c-myc and the transferrin receptor in G I synchronized M 1 myeloid leukimia cells. J. Cell Physiol 135, 339

Neckers LM, 1991. Regulation of Transferrin Receptor Expression and Control of Cell Growth. Pathobiology, 59 : 11-18

Nelson, 2000 ,Fractures in General Pagewww.davidlnelson.md/fractures_in_general.htm Last updated January 14, 2002

Nijkamp FP , Parnham MJ, 1999. Principles of Immunopharmacology, Birkhauser Verlag, Basel, 115-118

Noji, H., Yoshida, M, 2001. The rotary machine in the cells: ATPsynthase. J. Biol. Chem. 276, pp 1665-1668

Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K, 2001. Peroxynitrite induces Gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells. Free Radic Biol Med 30 : 213-221

O'Reilly MA, Staversky RJ, Stripp BR and Finkelstein JN, 1998. Exposure to hyperoxia induces p53 expression in mouse lung epithelium. Am. J. Respire Cell. Mol.Biol 18 : pp 43-50

Oria R, Sanchez L, Houston T, Hentze MW, Liew FY, Brock JH. Blood. 1995 May 15; 85(10): pp 2962-6

Oriani G, Marroni A,Wattel F, 1996. Handbook on Hyperbaric Medicine. Berlin: Springer,p 1-25

Orino K dkk, 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. Biochem J. 2001 Jul; 357(Pt 1) : pp 241-7

Otto F,Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS,Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ,1997.Cell 89, pp 765-771

Ozbek S, Engel J, Stetefeld J, 2002. Storage Function of Cartilage Oligomeric Matrix Protein : The Crystal Structure of the Coiled-Coil Domain in Complex with vitamin D3. EMBO Journal ,Vol 21,No.22, pp 5960 5968

Pamela S,et al,1990.Hyperbaric Oxygen Therapy. The Journal of the American Medical association.April 25,1990 V 263 n.16,p 2216 (5).

Pantopulos K, Weiss G, MW Hentze, 1994. Nitric oxide and the post transcriptional control of Iron cellular traffic.Trends Cell.Biol.4 : pp 82-86

Pantopoulos K, Weiss G, MW Hentze , 1996. Nitric oxide and oxidative stress (H_2O_2) control mammalian Iron metabolism by different pathways. Mol.Cell.Biol.16 : pp 3781-3788

Pantopoulos K,2004. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system : an update. Ann N Y Acad Sci.2004 Mar; 1012 : pp 1-13

Phillips JD, Kinikini DV, Yu Y, Guo B, Leibold EA, 1996. Differential regulation of IRP1 and IRP2 by nitric oxide in rat hepatoma cells, Blood 87 : pp 2983 - 2992

Philpott CC, Haile D, Rouault TA, Klausner RD, 1993. Modification of free Iron-S cluster cysteine residue in the active Iron-responsive element-binding protein prevents RNA binding. J.Biol.Chem 268 : pp 17655-17658

Podowski RM, EL Sonnhammer,2001. MEDUSA : large scale automatic selection and visual assessment of PCR primer pairs. Bioinformatics,17(7) : p 656-7

Ponka P and Lok CN,1999. Int.J.Biochem.Cell.Biol., in press

Prabhakar S, Short DB, Scholz NL, dan Goy MF,1997. Identification of nitric oxide-sensitive and insensitive forms of cytoplasmic guanylate cyclase. J. Neurochem 69, 1650-1660

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA, 1979. The biosynthesis of collagen and its disorders. N. Engl. J.Med 301, pp 13-23

Raddatz G, M Dehio, TF Meyer,C. Dehio,2001. PrimeArray : genome-scale primer design for DNA-microarray construction. Bioinformatics, 17(1) : p 98-9

Ralston SH, Todd D, Helfrich MH, Benjamin N dan Grabowski PS, 1994. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. Endocrinology 135, 330-336

Rammelt S, Schulze E, Witt M, Petsch E, Holch M, Pompe W and Zwipp H, 2002. Addition of Osteocalcin to HA/ Collagen Composites. Chir Forum 31 : 411-414

Rancourt RC, Keng PC, Helt CE and O'Reilly MA,2001. The role of p21 $^{Cip1/WAF1}$ in growth of epithelial cells exposed to hyperoxia. Am. J. Physiol 280, L617-626

Raouf A, Seth A,2002. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. Bone 30 : pp 463-471

Reddel RR, Hedley DW and Sutherland RL,1985. Cell cycle effects of iron depletion on T-47D human breast cancer cells. Exp.Cell Res. 161, pp 277

Reichard P, Ehrenbergn A, 1983. Ribonucleotide reductase –A radical enzyme. Science 221 : pp 514

Riancho JA, Zarrabeitia MT, Salas E dan Gonzalez-Macias J, 1996. Impairment of osteoblast growth by nitric oxide synthase inhibitors : an effect independent of nitric oxide and arginine transport inhibition. Methids Find Exp. Clin. Pharmacol. 18, 663-667

Rice-Evans C, Bruckdorfer KR,1991.Free radicals.Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction.Molec.Aspects.Med.13 : pp 1-111

Richardson DR and Ponka P, 1997. Biochim.Biophys.Acta 1331, pp 1-40

Rose TM, ER Schultz, JG Henikoff, S.Pietrokovski, CM McCallum,S Henikoff, 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. Nucleic Acids Res, 26(7) : p 1628-35

Rose TM, JG Henikoff, S Henikoff, 2003. CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. Nucleic Acid research, 2003, Vol 31, No.13, pp 3763-3766

Rubin H, 1996. Serine Protease Inhibitors (SERPINS) : Where mechanism meets medicine. Nature Med 2, 632-633

Rudland PS, Durbin H, Clingan D, de Asua LJ, 1977. Iron salts and transferrin are specially required for cell division by cultured 3T6 cells. Biochem Biophys Res Commun 75: pp 556

Saiki R dkk,1985. Science 230, pp 1350

Sasaki, T, Fassler, R., Hohenester, E, 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. J. Cell. Biol. 164, pp 959-963

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J, 2001. Reactive Oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell.Physiol.Biochem. 11, pp 173-186

Scharf S dkk,1986. Science 230, pp 1076

Schena M dkk,1996. Parallel human genome analysis : microarray-based expression monitoring of 1000 genes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, pp 10614 -10619

Seth A, Lee BK, Qi S, and Vary CP,2001. Coordinate expression of novel genes during osteoblast differentiation. J Bone Miner Res 15(9) : pp 1683-1696

Shen KA,BC Meyers, MN Islam-Faridi, DB Chin, DM Stelly, RW Michelmore, 1998. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. Mol Plant Microbe Interact,1998. 11(8) : p 815-23

Shen Z, Heinegard D and Sommarin Y, 1995. Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development. Matrix Biol. 14, 773-781

Shenberger JS and Dixon PS, 1999. Oxygen induces S-pahse growth arrest and increases p53 and p21($^{WAF/CIP1}$) expression in human bronchial smooth-muscle cells. Am.J.respir.Cell.Mol.Biol 21, pp 395-402

Sherr CJ,1995. D-type cyclins. Trends Biochem Sci 20 : pp 187-190

Siggelkow H,Schmidt E,Hennies B,hufner M,2004. Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal difironrentiation in human osteoblass, Bone 2004 Aug ; 35(2) : pp 570-6

Simmons DJ, Grynpass MD, 1992. Mechanism of bone formation in vivo. In : Bone Volume I,The Osteoblas and Osteocyte,New Jersey : Telford Press, pp 193-302

Simon SR.MD,1994. Fracture Repair.In : Orthopaedic Basic Science.America Academy of Orthopaedic Surgeon.Columbus,Ohio, pp 298-304

Sjodin B, Westing YH, Apple FS, 1990. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercises. Sport Medicine 10(4), p 236-254

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace Jr AJ, 1994. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science 266 : 1376-1380

Smith ML, Kontny HU, Zhan Q, Sreenath A, O'Connor PM, Fornace Jr AJ, 1996. Antisense Gadd45 expression results in decrease DNA repair and sensitizes cells to UV-irradiation or cisplatin. Oncogene 13 : 2255- 2263

Smith ML, Ford JM, Hollander C, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, Fornace Jr AJ, 2000. p53- mediated DNA repair responses to UV radiation : studies of mouse lacking p53, p21, and/or Gadd45 genes. Mol Cell Biol 20 : 3705-3714

Smith RK, Zunino L, Webbon PM, and Heunegard D, 1997. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. Matrix Biol. 16, 25-271

Spector JA, Mehrara BJ, greenwald GA, Saadeh PB, Steinrech DS, Bouletreau PJ, Smith LP, Longaker MT, 2000. Osteoblas expression of vascular endothelial growth faktor is modulated by the extracellular microenvironment, Am J Physiol Cell Physiol 280 : C72-C80

Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, Shalhoub V, Aronow M, Owen T and Markose E, 1989. The onset of progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation. Connect Tissue Res 20(1) : pp 3-13

Steinbrech DS dkk,1999. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblas in vitro. Plast reconstr Surg.1999 Sep;104(3) : pp 738-47

Steinbrech DS dkk,2000. VEGF expression in an osteoblast like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. Am J Physiol Cell Physiol 278, Issue 4, April 2000, C853-C860

Struder L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R, 2000. Enhanced proliferation, survival and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. J Neurosci 2000 Oct 1 ; 20 (19) : 7377-83

Stryer L, 1995. Biochemistry. Freeman and Company, New York, 75-116

Sugioka K, Nakano H, Nakano M, Tero-Kubota S, Ikegami Y,1983. Generation of hydroxyl radicals during the enzymatic reductions of the $Iron^{3+}$ -ADP-phosphate-adriamycin and importance of proposed perferryl ion complexes in lipid peroxidation.Biochim Biophys Acta 1983; 753 : pp 411

Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M, 1981. Ubiquitous cell surface glycoprotein on tumor cells is proliferation associated receptor for transferrin. Proc.Natl Acad Sci USa 78 : pp 4515

Suryohudoyo,1995. Oksidan, Anti Oksidan dan Radikal Bebas. Dalam Simposium Dampak Negatif Radikal Bebas Pada Organ Tubuh Dan Manfaat Antioksidan. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Panitia Indonesia Emas Dan Dies Natalis XLI Fakultas Kedokteran UNAIR, Surabaya.

Suryohudoyo, 1997. Oksidan dan Anti oksidan pada Diabetes Mellitus. Naskah Lengkap Surabaya Diabetes UPDATE - III 1997, Surabaya : Pusat Diabetes dan Nutrisi RSUD dr. Sutomo-FK Unair, hal 27 -39

Suryohudoyo P, 2000. Kapita Selekta.Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta : Sagung Seto.

Takagi M, Kamiya N, Takahashi T, Ito S, Hasegawa M, Suzuki N, Nakanishi K, 2004. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth faktor beta 1 on gene expression of transcription faktors,AJ18 and Runx2 in cultured osteoblasic cells,J Mol Histol 2004 Jan, 35(1) : pp 81-90

Taylor A, Hogan BLM, Watt FM. Biosynthesis of EGF receptor, transferrin receptor and collagen by cultured human keratinocytes and the effect of retinoid acid. Exp Cell Res, 159 : 47-54

Taylor GR, 1991. Polymerase Chain Reaction : basic principles and automation in PCR A Practical Approach (McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR,1991). Oxford University Press, Oxford, 1

Testa U, Pelosi E and Peschle C,1993. Crit.Rev.Oncog.4, pp 241-276

Thannickal VJ, Fanburg BL,2000. Reactive Oxygen Species in cell signaling.Am.J.Physiol.279 : L 1005-1028

Theil EC, 1987. Ferritin : Structure, gene regulation and cellular function in animals,plants and microorganisms. Annu Rev Biochem 56 : pp 289

Theilhaber J, Connoly T, Roman-Roman S dkk,2002. finding genes in the C2C12 osteogenic pathway by k-nearest-neighbor classification of expression data. Genome Res 12 : pp 165-176

Thibaut G, Chemla JM, Franck P, Durand A, Dubois F, Nicolas B, Belleville F, 1996. Hyperbaric Oxygen Therapy : Free Radical and status of antioxidant defences. In (Marroni A, eds). Proceeding of International Joint Meeting on Hyperbaric and Underwater Medicine. Instituto Ortopedico Galeazzi Milano, Italy. Sept 4-8

Thom SR, 1994. Beneficial and toxic of oxidative stress. In (Wattel F, Mathieu D, eds.). Proceeding of the 1st European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine. Lille (France), Sept.19-21, pp 453-458

Thompson DL et al, 1998. The Derivation and Characterization of Stromal Cell Lines from the Bone Marrow of p53-/- Mice : New Insights into Osteoblas and Adipocyte Differentiation, Journal of Bone and Mineral Research,Volume 13,Number 2, 1998,Blackwell Science,Inc, pp 195-204

Thomson AM,Rogers JT,Leedman PJ,1999. Iron-regulatory proteins,Iron-responsiveness elements and ferritin mRNA translation, Int J Biochem Cell Biol.1999 Oct; 31(10) : pp 1139-52

Trowbridge IS dan Omary MB,1981. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3039-3043

Trowbridge IS dan Lopez F, 1982. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1175-1179

Tuncay OC, Ho D ,Barker MK, 1994. Oxygen Tension Regulates Osteoblas Function.American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics, Volume105, Issue 5, May 1994,University of Missisipi Medical Center,Departement of Orthodontics, Jackson, p 457-463

Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q et.al,1998. Relation of alleles of the collagen type Iα1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. N Engl J Med 338 : pp 1016-21

Ushio-Fukai M,Zafari AM,Fukui T,Ishizaka N,Griendling KK, 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells,J Biol Chem 271 : pp 23317-23321

Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B, Libermann DA, 2000. Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. J Biol Chem 275 : 16810-16819

Vandewalle B, Granier AM, Peyrat JP, Bonneterre J, Lefebvre J, 1985. Transferrin receptors in cultured breast cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol, 110 : 71-6

van't Hof RJ dan Ralston SH, 1997. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoblast progenitors and suppressing osteoclast activity. J.Bone Miner.Res 12, 1797-1804

Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C, 2002. IRT1, an Arabidopsis Transporter essential for Iron uptake from the soil and for plant growth, The Plant Cell, Vol 14, 1223-1233

Vincent F, Brun H, Clain E, Ronot X, Adolphe M, 1989. Effects of oxygen-free radicals on proliferation kinetics of cultured rabbit articular chondrocytes. J.Cell Physiol 141 : 262-266

Vincent F, Corbal M, Defer N, Adolphe M, 1991. Effects of oxygen-free radicals on articular chondrocytes in culture : c-myc and c-HA-ras messengers RNAs and proliferation kinetics. Exp. Cell. Res 192 : 333-339

von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C,1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence? Exp cell res. Sep; 220(1) : pp 186-93

Vuillaume M, 1987. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. Mut. Res. 186 : 43-72

Wang XW, Zhan Q, Coursen JC, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace Jr AJ, Harris CC, 1999. Gadd45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 3706-3711

Ward JH, 1987. The structure, function, and regulation of transferrin receptors (Review). Invest Radiol, 22 : 74-83

Waterman MR dan Lepesheva GI, 2005. Sterol 14α-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. Biochimica et Biophysica Acta(BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids Volume 1633, Issue 2, 21 July 2003, 106-117

Wei X, Kuhn DN, Narasimhan G, http://www.cs.fiu.edu/~giri/bioinf/DePiCt/

Weindruch R, 1996. Caloric Restriction and Aging. Scientific American, January 1996

Weiss G, Goosen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer G, Watcher H, Hentze MW, 1993. Translational regulation via iron responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. EMBO J 12 : pp 3651-3657

Wendeberg, 1961. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85.Acta Orthop Scand Suppl 52

Widjaja, 1998. Oksigen Hiperbarik.Aksona, Majalah Neurologi Surabaya 14 (2) : 22-35

Wienberg ED, 1990. In : Diet,demography,and disease : changing perspectives of anemia.Stuar-Mcdam & S.Kent

Wilhelm J, 1991. Metabolic aspects of Membrane Lipid Peroxidation.Praha ; 43515

Williams CS, Shattuck-Brandt RL, Dubois RN, 1999. The Role of COX-2 in Intestinal Cancer. Expert Opin Investig Drugs, Jan 1999, 8 (1) ; pp 1-12

Wolff G, 1997. Function of the bone protein Osteocalcin : Definitive Evidence.Nutrition Review 54(10) : pp 332-333

Wong G, 1992.Isolation and Behaviour of Isolated Bone Forming Cells.In Bone Volume I,The Osteoblas and Osteocyte,New Jersey,Telford Press,pp 171-192

Xiao G, Chicas A, Olivier M, Taya Y, Tyagi S, Kramer FR, Bargonetti J, 2000. A DNA damage signal is required for p53 to activate Gadd45. Cancer Res 60 : 1711-1719

Yasuda, R., Niji, H., Kinoshita, K., Yoshida, M, 1998. F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. Cell 93, 1117-1124

Yamamoto S, Mogi M, Kinpara K, Ishihara Y, Ueda N, Amano K, Nishibara T, Noguchi T dan Togari A, 1999. Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from Actinobacillus actinomycetemcomitans induces apoptotic cells death in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. J.Dent.Res 78, 1230-1237

Ying Peng, Quan Kang, Qing Luo, wei Jiang, Weike Si, bernard A.Liu, Hue h.Luu, Jong Kyung Park,Xinmin Li,Jefferey Luo, Anthony G.Montag, Rex C. Haydon and Tong-Chuan He, 2004. Inhibitor of DNA Binding/Differentiation Helix-Loop-Helix Proteins Mediate Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem cells. The Journal of Biological chemistry Vol 279, No.31, Issue of July 30, pp 32941-32949

Zhan Q, Lord KA, Alamo IJ, Hollander MC, Carrier F, Ron D, Kohn KW, Hoffman B, Liebermann DA and Fornace AJ, Jr,1994. The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. Mol.Cell.Biol 14 : 2361-2371

Zhan Q, 1995. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. Mutat Res. 2005 Jan 6 ; 569 (1-2) : 133-43

Zhan Q, Antinore Mj, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace Jr AJ, 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. Oncogene 18 : 2892-2900

Zhang X, Sun H, Danila DC, Johnson SR, Zhou Y, Swearingen B, Klibanski A, 2002. Loss of expression of GAdd45γ, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas : Implications for Tumorigenesis, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87(3) : 1262-1267

Zhao H, Jin S, Antinore MJ, Lung FDT, Fan F, Blanck P, Roller P, Fornace Jr AJ, Zhan Q, 2000. The central region of Gadd45 is required for its interaction with p21/WAF1. Exp Cell res 258 : 92-100

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Gepetti P and Ledda F, 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vivo promoted by substance P. J.Clin. Invest 94, 2036-2044

Lampiran 1

UJI NORMALITAS

Descriptives

			Statistic	Std. Error
CELL	Mean		422716.7	178894.9
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	28971.75	
		Upper Bound	816461.6	
	5% Trimmed Mean		377207.4	
	Median		68350.00	
	Variance		3.8E+11	
	Std. Deviation		619709.9	
	Minimum		37100.00	
	Maximum		1627500	
	Range		1590400	
	Interquartile Range		1009375	
	Skewness		1.336	.637
	Kurtosis		-.095	1.232
PROT	Mean		115.8667	43.83161
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	19.3939	
		Upper Bound	212.3394	
	5% Trimmed Mean		106.0630	
	Median		33.4000	
	Variance		23064.519	
	Std. Deviation		151.83715	
	Minimum		12.20	
	Maximum		398.00	
	Range		383.80	
	Interquartile Range		225.1000	
	Skewness		1.332	.637
	Kurtosis		-.002	1.232
DNA	Mean		17.1508	7.12871
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.4606	
		Upper Bound	32.8410	
	5% Trimmed Mean		15.4020	
	Median		3.2300	
	Variance		609.823	
	Std. Deviation		24.69459	
	Minimum		1.38	
	Maximum		64.40	
	Range		63.02	
	Interquartile Range		40.1400	
	Skewness		1.312	.637
	Kurtosis		-.139	1.232

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
CELL	12	100.0%	0	.0%	12	100.0%
PROT	12	100.0%	0	.0%	12	100.0%
DNA	12	100.0%	0	.0%	12	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CELL	.370	12	.000	.644	12	.000
PROT	.363	12	.000	.678	12	.001
DNA	.359	12	.000	.665	12	.000

a. Lilliefors Significance Correction

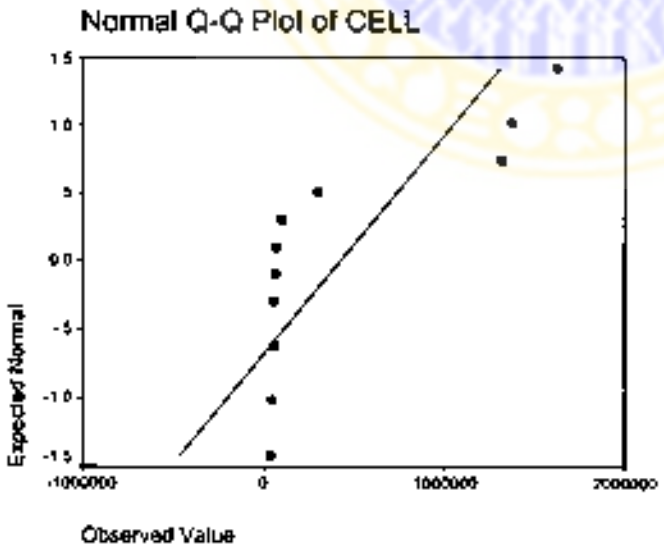
CELL

CELL Stem-and-Leaf Plot

```
 Frequency     Stem &  Leaf

     9.00        0 .  000000002
      .00        0 .
     2.00        1 .  33
     1.00        1 .  6

 Stem width:   1000000
 Each leaf:       1 case(s)
```

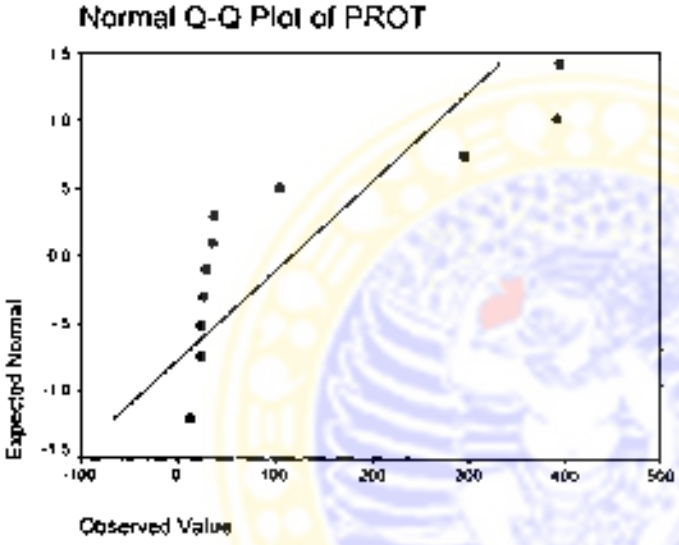


PROT

PROT Stem-and-Leaf Plot

Frequency	Stem &	Leaf
8.00	0 .	11222333
1.00	1 .	0
1.00	2 .	9
2.00	3 .	99

Stem width: 100.00
Each leaf: 1 case(s)

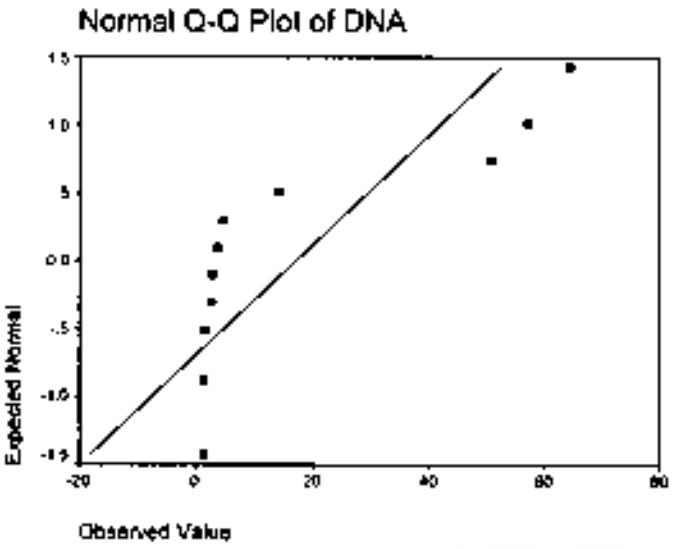


DNA

DNA Stem-and-Leaf Plot

Frequency	Stem &	Leaf
9.00	0 .	000000001
.00	0 .	
2.00	0 .	55
1.00	0 .	6

Stem width: 100.00
Each leaf: 1 case(s)


Normal Q-Q Plot of DNA
Expected Normal
Observed Value

UJI BEDA DUA SAMPEL
T-Test (log10)

Group Statistics

	JENIS	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Log10 Cell number	Normoxia	6	5.5994	.65866	.26890
	Hyperoxia	6	4.7229	.10278	.04196
Log10 Protein	Normoxia	6	2.0545	.62309	.25438
	Hyperoxia	6	1.3845	.16750	.06838
log10 DNA	Normoxia	6	1.2065	.68244	.27860
	Hyperoxia	6	.3174	.17907	.07311

Independent Samples Test

			Log10 Cell number		Log10 Protein		log10 DNA	
			Equal variances assumed	Equal variances not assumed	Equal variances assumed	Equal variances not assumed	Equal variances assumed	Equal variances not assumed
Levene's Test for Equality of Variances	F		20.857		8.809		8.897	
	Sig.		.001		.014		.014	
t-test for Equality of Means	t		3.220	3.220	2.543	2.543	3.087	3.087
	df		10	5.243	10	5.719	10	5.685
	Sig. (2-tailed)		.009	.022	.029	.046	.012	.023
	Mean Difference		.8764	.8764	.6700	.6700	.8891	.8891
	Std. Error Difference		.27215	.27215	.26341	.26341	.28804	28804
	95% Confidence Interval of the Difference	Lower	.27005	.18651	.06305	.01767	.24727	.17469
		Upper	1.48284	1.56636	1.25687	1.32225	1.53084	1.60342

Lampiran 2

Tahap Penelitian :

1. Tahap Subkultur sel osteoblas
   - Siapkan media α MEM (*Minimal Essential Medium*) M 4526 dari SIGMA ,komposisinya adalah sbb : 50 ml FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10%, 2mM *L-Glutamine* (protein sel), 5 ml *Streptomycin Penicillin* (antibiotika), 500 ml MEM *Eagle α Modification*
   - Ambil sel osteoblas beku yang disimpan dalam nitrogen cair, segera diletakkan dalam termos yang telah diisi nitrogen cair.
   - Letakkan tabung berisi sel osteoblas beku ke dalam *water bath* selama 5 menit. Goyang perlahan dalam *water bath*. Semprot tabung dengan ethanol 70%. Pipet keluar sel tersebut ke dalam 50 ml tabung Falcon.
   - Basahi bagian dasar tabung kultur atau *monolayer* agar substrat yg terletak di dasarnya bisa beradaptasi dengan α-MEM. Tambahkan 9 ml medium α-MEM, sedot campur.
   - Sentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan *cryopreservative* medium yaitu 5% DMSO (*Dimethyl Sulfoxyde*) yang berfungsi untuk mencegah terbentuknya kristal es yang dapat merusak sel. Sedot supernatant medium. Tampak *cell pellet*, sedot campur dalam 5 ml α-MEM untuk memastikan tidak adanya perlekatan.
   - Hitung jumlah dan konsentrasi sel.
   - Ambil 1 ml sel, tambahkan 11 ml α-MEM, masukkan dalam kultur / monolayer tabung. Masukkan dalam inkubator bersuhu 37°C.

2. Tahap Tripsinasi dan Haemacytometer (Penghitungan Viabilitas Sel)
   - Sedot medium dalam tabung.
   - Masukkan 2,5 ml Tripsin (EDTA).
   - Sedot Tripsin, masukkan ke dalam inkubator 37 C selama 10 menit atau tambahkan 10 ml α MEM untuk menghentikan tripsinasi karena di dalam medium tersebut terdapat streptomisin yang mengandung *trypsin inhibitor*
   - Sentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit. Sedot medium, akan tampak *cell pellet* di dasar tabung Falcon.
   - Masukkan 5 ml α MEM ke tabung FALCON, sedot campur agar tercampur rata.
   - Ambil 5-10 ml Medium + 400 ml 0,5% *Trypan Blue Solution* (yang sudah dibuat dilusinya dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) selaku cairan isotonik untuk sel) + 600 ml sel.
   - Lakukan *haemocytometer* dengan Neue Bauer buatan Jerman. Sel mati akan berwarna biru dan sel hidup akan berwarna putih.
   - Lakukan penghitungan sel yang berada pada 5 kotak dengan rumus : $n \cdot 10^4$. Dilution Faktor
   - Hitung viabilitas sel
     Sel yang hidup = a + b + c + d + e = f/5

Sel yang mati = g + h + i + j + k = l/5

$\frac{100\%}{10^6} = \frac{x}{l/5}$

- Masukkan 12 ml α MEM baru ke dalam tabung lalu masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C

3. Tahap isolasi RNA total

- Sel pelet yang disimpan dalam suhu -70/-80°C,telah dihitung dulu jumlah selnya sebelum dibekukan. Tambahkan buffer RLT 350 µl jika jumlah sel pellet < 5 x10^6 dan tambahkan buffer RLT 600 µl jika jumlah sel pellet 5 x 10^6- 1 x 10^7.Tambahkan 10 µl β-ME per 1 ml Buffer RLT. Letakkan sampel selama 15-20 menit pada suhu 37°C dalam *water bath* untuk melarutkan garam. Sentrifugasi selama 5 menit pada 3000-5000 xg. Pindahkan cairan *supernatant* ke dalam gelas bebas RNA yang baru atau tabung *polypropylene*.
- Saring *lysate* sekurang-kurangnya 5 kali melalui jarum 1:20 gauge (0,9 diameter) yang melekat pada syringe bebas RNA.
- Pipet *lysate* secara langsung ke *Qiashredder column* yang diletakkan dalam 2 ml tabung koleksi, dan sentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan maksimum.
- Tambahkan 1 volume (biasanya 350 atau 600 µl) ethanol 70% ke dalam "*homogenized lysate*", dan campur dengan memipetnya berulang. Jangan disentrifugasi.
- Aplikasikan 700 µl sampel, termasuk semua endapan yang mungkin terbentuk, ke dalam kolom RNeasy mini yang diletakkan dalam 2 ml tabung koleksi. Tutup tabung secara perlahan dan sentrifugasi 15 detik ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm). Buang sisa cairan.
- Transfer ke kolom RNeasy ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru. Pipet 500 µl Buffer RPE melewati kolom RNeasy. Tutup tabung secara perlahan dan sentrifugasi selama 15 detik ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm). Buang sisa cairan.
- Tambahkan 500 µl Buffer RPE ke dalam kolom RNeasy. Tutup tabung secara perlahan dan sentrifugasi selama 2 menit pada ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) untuk mengeringkan membran RNeasy silica gel. Lanjutkan ke langkah berikutnya.
- Letakkan kolom RNeasy ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru dan buang tabung yang lama termasuk saringannya. Sentrifugasi dalam *microcentrifugation* dengan kecepatan penuh selama 1 menit.
- Transfer kolom RNeasy ke dalam 1,5 ml tabung koleksi yang baru. Pipet 30-50 µl RNase-bebas air secara langsung melalui membran RNeasy *silica gel*. Tutup tabung secara perlahan dan sentrifugasi selama 1 menit pada ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) untuk mencairkan.
- Jika RNA yang dihasilkan > 30 µg, ulangi langkah "*elution*" dengan volume kedua RNase-bebas air pada tabung koleksi yang sama.
- Siapkan dilusi 1:40 dari solusi RNA (ambil 2 µl solusi RNA dan 78 µl H_2O).
- Hitung konsentrasi RNA dengan kalkulator RNA – pengukuran dengan *absorbance* 260 nm (= karakter panjang gelombang RNA/DNA) dan 280 nm

(= karakter panjang gelombang protein) secara berturut-turut. Gunakan air sebagai referensi. Letakkan air di dalam kuvet. Tekan tombol 'ref'. Lihat konsentrasi pada 260 (RNA) nm dan 280 (protein) nm – angkanya harus nol. Letakkan 80 µl dilusi dari solusi RNA dalam kuvet. Tekan tombol 'sampel'. Tunggu hingga muncul bunyi "beep". Masukkan kuvet yang mengandung solusi RNA. Jika bunyi "beep" muncul lagi lalu keluarkan kuvet dan cek nilai *absorbance* (AU = *absorbance unit*). Catat nilai untuk 260 nm dan 280 nm.

- Ulang pemeriksaan dengan solusi RNA yang lain yang ingin kita ukur.
- Hitung nilai 260 nm. Kalikan dengan faktor dilusi. Lakukan dengan nilai 280 nm. Kalikan dengan faktor dilusi.
- Hitung kemurnian RNA.
- Lakukan RT-PCR

Mix I

Sampel = .. µl RNA + .. µl Oligo D_T18 + … H_2O

Dan dicampur dengan Mix II* tanpa enzim (Rnasin dan RT)

Inkubasikan Mix I selama 5 menit pada suhu 72°C.

*Mix II

1x	4x
12,15 µl H_2O	48,6 µl H_2O
9 µl 5xBuffer (Promega)	36 µl 5xBuffer(Promega)
1,25 µl dNTPs	5 µl dNTPs
0,45 µl 100 x BSA	1,8 µl 100x BSA
0,75 µl Rnasin (= RNase inhibitor)	3 µl RNase inhibitor
0,4 µl RT(-)Point	1,6 µl RT(-)Point

Tambahkan Mix II ke dalam Mix I yang sudah ada dalam alat PCR, inkubasikan 3 jam pada 37°C atau pilih nomer program RT-PCR.

4. Eksperimen proliferasi sel

Biakkan 50000 sel dalam 15 *monolayer flasks* (25 cm^2) - 3 *flasks* untuk tiap titik dalam satuan waktu. 3 x 50000 sel disentrifugasi (5 menit 1000 x *g*), cairan supernatant dibuang dan *pellet* dibekukan dengan *dry ice* dan disimpan pada suhu -80°C sampai penentuan protein dan DNA (nilai 0 jam). Pada tiap titik waktu (lajur pertama table Excel), dilakukan tripsinasi. Kemudian sel disedot campur (*resuspend*) dalam PBS dan dihitung dengan *Haematocytometer* (*Neubauer chamber*). Lalu sel disentrifugasi, cairan supernatant dibuang dan *pellet* dibekukan dengan *dry ice* dan disimpan pada suhu -80°C seperti pada nilai 0 jam.

***DNA and protein determination*:**

Sel pellet diambil dan disedot campur (resuspend) dalam 200 µl PBS dan *lysed* dengan ultrasonik.

a. Protein determination:

100 µl *lysat* disentrifugasi pada 14000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C dan cairan supernatant digunakan untuk penentuan konsentrasi protein intraselular. Konsentrasi protein ditentukan menggunakan dye-binding assay sesuai dengan

tehnik Bradford (Bradford, M., *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976) yang berdasar pada perbedaan perubahan warna dye (Coomassie Brilliant Blue G-250) terhadap variasi konsentrasi protein (Roti®-Quant, Roth).

Standard kurva (dengan BSA sebagai standard protein):

(2, 4, 6, 8, 10, 15 µg BSA standard solusi + H2O 800 µl + 200 µl reagen Bradford)

1. Masukkan 0,8 ml standard dan buatlah dilusi sampel yang tepat pada tabung coba yang bersih dan kering
2. Masukkan 0,8 ml buffer sampel ke dalam tabung coba kosong
3. Tambahkan 0,2 ml *Dye reagent Concentrate*
4. Vorteks (hindari busa yang berlebihan); atau campur secara perlahan dengan cara membalikkannya beberapa kali
4. Setelah jangka waktu 5 menit – 1 jam, ukur OD595 versus *reagent blank*
5. Plot OD595 versus konsentrasi standards. Baca *unknowns* dari standard kurva

b. DNA determination:

Konsentrasi DNA lysat ditentukan menggunakan metode Labarca, 1980.

DNA stock solution:

1. 100 µg/ml dalam 50 mM Na-Phosphate Buffer/1,5 M NaCl; pH 7,5
2. Rebus dalam *water bath* selama 30 menit, karena DNA sulit larut
3. Simpan dalam suhu 4 °C

Bis-benzimidin stock solution:

1. 200 µg/ml dalam *Distilled Water*
2. Simpan dalam lemari pendingin yang gelap
3. Standard kurva- tersedia meja dengan volume pada copy kita
4. Volume sampel 2 ml (sesuai volume kuvet)
5. Panjang gelombang diukur pada *Fluorescent Photometer* : *excitation* pada 350 nm; *emission* pada 460 nm

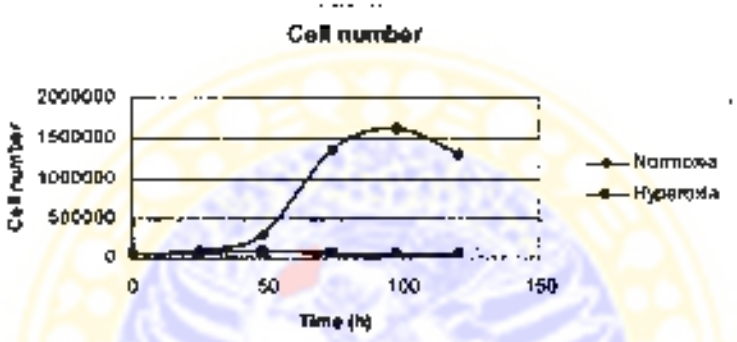
Sampel: 100 µl (atau 50 µl berturut-turut) lysat
1895 µl Buffer (atau 1945 µl berturut-turut)
5 µl *Bis-Benzimidin solution*
Campur dengan benar

Tabel data deskriptif jumlah sel, konsentrasi protein dan DNA pada kondisi normoksia

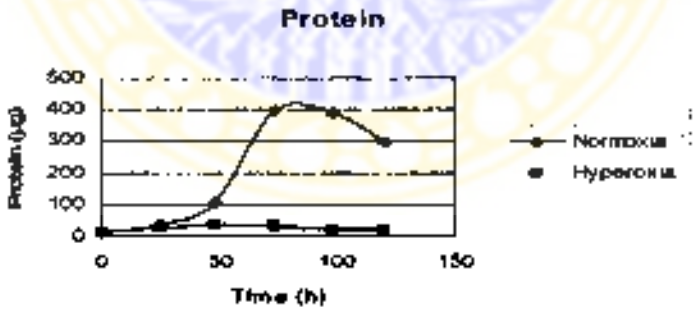
NORMOXIA						
Time (h)	Cell number	log10 Cell number	Protein (µg)	log10 Protein	DNA (µg)	log10 DNA
0	50000	4,70	12,2	1,09	1,39	0,14
24,5	91200	4,96	38,4	1,56	4,76	0,68
48	295500	5,47	104	2,02	14,04	1,15
73,5	1370000	6,14	396	2,60	57,08	1,76
97,5	1627500	6,21	392	2,59	64,4	1,81
120	1314000	6,12	296	2,47	50,76	1,71

Tabel data deskriptif jumlah sel, konsentrasi protein dan DNA pada kondisi hiperoksia

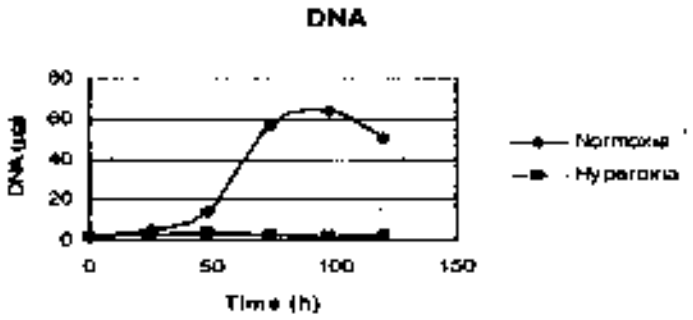
HYPEROXIA						
Time (h)	Cell number	log10 Cell number	Protein (µg)	log10 Protein	DNA (µg)	log10 DNA
0	50000	4,70	12,2	1,09	1,39	0,14
24,5	65200	4,81	27,2	1,43	2,84	0,45
48	71500	4,85	38	1,58	3,62	0,56
73,5	54000	4,73	30,4	1,48	2,58	0,41
97,5	46600	4,67	23,2	1,37	1,59	0,20
120	37100	4,57	22,8	1,36	1,38	0,14



Kurva data deskriptif jumlah sel osteoblas pada kondisi normoksia dan hiperoksia



Kurva data deskriptif konsentrasi protein pada kondisi normoksia dan hiperoksia



Kurva data deskriptif konsentrasi DNA pada kondisi normoksia dan hiperoksia

5. Tahap Microarray

RNA total diisolasi dari berbagai tipe sel yang telah dikuantifikasi oleh spektroskopi *ultra violet* dan kualitas RNA yang telah dicek dengan menganalisis sampel pada sebuah *LabChip* (*BioAnalyzer, AGILENT Technologies, Santa Clara, CA*). Hibridisasi dari *microarray* oligonukleotida dengan densitas tinggi telah dilakukan sesuai rekomendasi *Affymetrix* (Santa Clara, CA). Pertama, cDNA disintesis dari RNA total menggunakan perangkat *Superscript Choice* (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Untuk tujuan ini RNA total (5 µg) di*anneuling* hingga T7-$(dT)_{24}$ primer (100 p mol, H PLC m urni, M WG-Biotech, E bersberg, G ermany) p ada suhu 70°C selama 10 menit. *Reverse transcription* (RT) dilakukan pada suhu 43°C selama 1.5 jam pada buffer utas pertama yang mengandung 10 mM dithiothreitol, 500 µM untuk tiap dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, dan 20,000 U/ml of *Superscript II reverse transcriptase*. Reaksi dihentikan dengan menempatkan tabung ke dalam es balok. Sintesis utas kedua dilakukan dalam volume total 150 µl yang mengandung keseluruhan sampel dari reaksi utas pertama (20 µl). Ke dalam utas kedua, ditambahkan buffer reaksi [20mM Tris/HCl, pH=6.9 mengandung 4.6 mM NaCl, 90 mM KCl, 0.25 µM NAD^+, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$)], 200 µM untuk tiap dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, 1.2 mM *dithiothreitol*, 65 U/ml dari DNA *ligase*, 250 U/ml DNA *polymerase* I dan 13 U/ml RNase H. Campuran diinkubasi pada suhu 16°C selama 2 jam. Kemudian 2 µl T4 *DNA polymerase* (5 U/µl) ditambahkan dan inkubasi dilanjutkan pada suhu 16°C selama 5 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan 10 µl of 0.5 M EDTA. Pemurnian utas ganda cDNA dilakukan dengan ekstraksi *phenol / chloroform* dan diendapkan dengan 5 M *amonium asetat* dalam *ethanol absolut* pada suhu -20°C selama 20 menit. *Pellet* diresuspensi dalam 12 µl RNase- bebas air. Sintesis *biotin* dari cRNA yang telah dilabel dilakukan dengan transkripsi secara *in vitro* menggunakan perangkat *BioArray High Yield RNA Transcription* (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Reaksi dilakukan pada suhu 37°C selama 6 jam dalam buffer transkripsi T7 yang mengandung 7.0 mM ATP, 7.0 mM GTP, 5.3 mM UTP, 1.7 mM *biotinylated* UTP, 5.3 mM CTP, 1.7 mM biotinylated CTP. cRNA yang sudah diamplifikasi telah dipemurnian dengan *affinity resin column* (RNeasy, Qiagen, Valencia, CA) dan difragmentasi dengan cara

diinkubasi pada suhu 94°C selama 35 menit dengan disertai pemberian 40 mM Tris-asetat (pH 8.1), 100 mM potassium asetat, dan 30 mM magnesium asetat. Jumlah cRNA dikuantifikasi dan distribusi ukuran fragmen RNA dicek dengan *LabChip* (BioAnalyzer, AGILENT Technologies, Santa Clara, CA). cRNA yang telah terfragmentasi lalu dihibridisasi ke dalam *chip* oligonukleotida "HG U133A" (*chip* oligonukleotida *microarray* yang berdensitas tinggi dari *Affymetrix*, Santa Clara, CA). Solusi hibridisasi (100mM MES buffer, 1M NaCl, 20mM EDTA, 0.01% TWEEN20) yang berisi kandungan (konsentrasi akhir) : 0.05 mg/ml cRNA yang telah terfragmentasi, 50 pM oligonukleotida kontrol B2, kontrol hibridisasi eukaryotik (bioB, bioC, bioD, 1.5, 5, 25 pM berturut-turut, *Affymetrix*, Santa Clara, CA), 0.1 mg/ml *DNA sperma herring*, 0.5 mg/ml *acetylated bovine serum albumin* (Sigma, St.Louis, MO). Sebelum diaplikasikan ke dalam *microarray*, solusi hibridisasi dipanaskan hingga 95°C, lalu didinginkan hingga 45°C, dan endapan dihilangkan dengan sentrifugasi. Hibridisasi dilakukan pada suhu 45°C dalam *oven* hibridisasi selama 16 jam. Lalu dicuci dan pengecatan *array* dilakukan menggunakan *GeneChip fluidics station protocol EukGE-WS2*. Secara singkat, *GeneChip probe arrays* dicuci 10 kali pada suhu 25°C dengan buffer cuci tidak keras (0.9 M NaCl, 0.06 M NaH_2PO_4, 6 mM EDTA, 0.01% TWEEN20). Pencucian kedua terdiri dari 4 siklus dari 15 campuran tiap siklus dengan buffer cuci keras (100 mM MES (2-N-*morpholinoethanesulfonic acid*, Sigma, St.Louis, MO), 0.1 M NaCl, 0.01% Tween-20) pada suhu 50°C. *Array* dicat selama 10 menit dalam *streptavidin-phycoerythrin* (SAPE) *solution* (10 µg/ml SAPE (Molecular Probes, Eugene, OR), 2 µg/µl *acetylated BSA* (Sigma, St. Louis, MO) dalam 100mM MES; 1M NaCl, 0.05% Tween20) pada suhu 25°C. Pengecatan akhir terdiri dari 10 siklus pada suhu 25°C dalam *fluidics station* menggunakan solusi tidak keras. *Probe array* direndam selama 10 menit dalam solusi antibodi (2 µg/µl *acetylated BSA*, 0.1 µg/µl *normal goat IgG* (Sigma, St. Louis, MO), 3 µg/ml *goat-anti-streptavidin, biotinylated antibody* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in 100 mM MES; 1M NaCl, 0.05% Tween20) pada suhu 25 °C. Pencucian akhir terdiri dari 15 siklus dari 4 campuran untuk tiap siklus pada suhu 30°C dalam *fluidics station* menggunakan solusi tidak keras. Pada pencucian dan pengecatan selanjutnya, *probe array* discan dua kali pada 3µm resolusi menggunakan *GeneChip System confocal scanner* (Hewlett-Packard, Santa Clara, CA) kemudian dikontrol dengan *Microarray Suite Version 5.0 software (Affymetrix)*.

6. Tahap RT-PCR

RNA total diisolasi dengan *RNeasy mini kit* dari Qiagen (Hilden, Germany). 3 µg of RNA total ditranskriptasi sebaliknya pada suhu 37°C selama 170 menit dalam 45 µl 28 mM Buffer Tris-HCl, pH 8.3 yang mengandung 1.7 mM $MgCl_2$, 42 mM KCl, 5.5 mM *dithiothreitol*, 100 µg/ml BSA, 277 µM of dNTP's, 33 ng/µl of oligo $d(T)_{18}$ primer dan 200 U *reverse transcriptase*. Untuk menghentikan reaksi, sampel dipanaskan hingga 94°C selama 10 menit. Sampel RT diencerkan 1:5 dan 5 µl digunakan untuk amplifikasi.

RT-PCR semikuantitatif untuk produk gen yang berbeda dilakukan seperti dijelaskan di bawah ini dan primer yang khususs seperti pada Tabel S1. Sebagian

besar primer dirancang untuk amplifikasi produk gen manusia dan tikus. Sampel PCR (volume total 25 µl) mengandung 10 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0 mengandung 1 µl of campuran reaksi RT, 1 mM magnesium sulfate, 100 nM *forward* dan *reverse primer* (Table S1), 120 µM dNTP's (konsentrasi akhir telah ditentukan) dan 1 U Pyra exo(-) DNA polymerase. 10 µl sampel PCR diaplikasikan ke *agarose gel electrophoresis*. Untuk amplifikasi GAPDH digunakan protocol yang telah dimodifikasi sedikit. Untuk enzim ini sampel PCR (volume total 25 µl) mengandung 0.5 µl sampel RT, 1.5 mM magnesium sulfate, 200 nM *forward* dan *reverse primer*, 200 µM dNTP's (konsentrasi akhir telah ditentukan) dan 0.8 U Pyra exo(-) DNA polymerase. 10 µl sampel PCR diaplikasikan pada *agarose gel electrophoresis*. Untuk amplifikasi GAPDH program berikut digunakan. Fase awal pelembaban adalah 2 menit pada suhu 94°C; fase denaturasi 40 detik pada suhu 94°C diikuti fase annealing selama 1 menit pada suhu 65°C dan fase sintesis selama 2 menit pada suhu 72°C. Setelah 29 siklus amplifikasi fase setelah pelembaban (8 menit pada suhu 72°C) berlangsung dan sampel disimpan pada suhu 4°C hingga elektroforesis. Produk RT-PCR diaplikasikan ke dalam 2% *agarose gel electrophoresis* dan pita DNA ditandai dengan *ethidium bromide*. Intensitas sinyal dikuantifikasi dengan densitometri dan dibandingkan dengan ekspresi normalnya dengan primer GAPDH.

1. Protap Pelaksanaan RT-PCR Iron Regulated Transporter (Slc40A1) dan Transferrin Receptor (CD 71)

1x		6,5x	
15,87	µl Aqua	103,155	µl
2,5	µl 10 x-Buffer (Isis)	16,25	µl
0,83	µl MgSO4 (30 mM,Q Bio)	5,395	µl
0,3	µl dNTP (10 mM)	1,95	µl
2	µl Primer Slc40A1	13	µl
1	µl DNA Taq Polymerase (Isis)	6,5	µl
22,5	µl Mix + 2,5 µl cDNA osteoblas	146,25	µl

Program PCR :

94 °C selama 2 menit
94 °C selama 45 detik
60 °C selama 30 detik — 33 siklus
68 °C selama 2 menit
70 °C selama 10 menit
10 °C selama 0 menit

2. Protap Pelaksanaan RT-PCR Serine Proteinase Inhibitor B9 (Serpin B9), Cyclooxigenase 2 (COX2) dan Growth arrest DNa damage 45 alpha (Gadd45a)

1x		5,5x	
11,87	µl Aqua	65,29	µl
2,5	µl 10 x-PCR Buffer	13,75	µl
0,83	µl MgSO4 (30 mM,Q Bio)	4,57	µl
0,3	µl dNTP (10 mM)	1,65	µl
1	µl Primer SerpinB9/COX2/Gadd45a	5,5	µl
0,5	µl DNA Pyra Taq Polymerase ..	2,75	µl
17	µl Master Mix + 8 µl cDNA (15ng/ µl)	93,51	µl

Program PCR :

94 °C selama 2 menit

95 °C selama 45 detik

60 °C selama 30 detik — 34 siklus untuk Gadd45a

68 °C selama 2 menit — 27 siklus untuk Serpin B9, COX2

70 °C selama 10 menit

10 °C selama 0 menit

7. Tahap elektroforesis

a. Buatlah gel dengan konsentrasi 2% dari 2 gram bubuk *agarose* dalam 100 ml TAE Buffer 1x.
b. Untuk membuat TAE Buffer 1x :
   20 ml TAE Buffer 50x + 980 ml *Destilated Water*
c. Letakkan dalam *microwave* 360° C selama 5 menit.
d. Teteskan 5µl Ethidium Bromide ke dalam tiap 100 ml *agarose gel.*
e. Letakkan gel ke dalam alat elektroforesis.
f. Teteskan ke dalam slot pertama 4µl marker 100 kbp.
g. Masukkan 2,5 µl *Loading Buffer* ke dalam PCR Product.
h. Teteskan 11 µl PCR product ke dalam slot.
i. Nyalakan alat elektroforesis. Matikan jika *band* telah mencapai setengah dari gel.
j. Ambil gel dan letakkan di bawah sinar ultra violet.
k. Dengan menggunakan program BioDocAnalyze, buatlah foto dan print.

8. *DNA sequencing* (http://www.p2000.umich.edu/chemical_waste/cw12.htm)

Tahap sebelum *DNA sequencing* adalah *TOPO TA Cloning.*

Tahap TOPO TA Cloning adalah sebagai berikut :

Reaksi Kloning	: Produk PCR	4,5 µl
	Solusi Garam	1 µl
	Vektor TOPO	0,5 µl
	Volume akhir	6 µl

10 menit diinkubasi pada suhu kamar

Transformasi :

- 100 µl XL1-Blue competent cells – letakkan di atas es
- Tambahkan reaksi kloning (6 µl) ke dalam sel dan kocok perlahan
- Inkubasikan di atas es selama 30 menit
- *Heat-shock* 45 detik pada suhu 42°C (dalam *water bath*)
- Inkubasikan tabung di atas es selama 2 menit segera
- Tambahkan 500 µl (42°C) Medium NZY yang sebelumnya telah dipanaskan
- Inkubasikan pada suhu 37°C dengan goncangan (220 rpm) selama 1 jam
- Tanamkan 100 µl *transformation mixture* pada plat agar LB/ampicillin
- Konsentrasikan sisa sel dengan mensentrifuge pada 3000 rpm selama 5 menit
- Buang 300 µl *supernatant*, sedot campur sisa sel dan tanamkan pada plat agar LB/ ampicillin
- Inkubasikan plat pada suhu 37°C semalam

Analisis Transforman

- Ambil klon tunggal dari plat transformasi dan inokulasikan medium 5 ml LB/ ampicillin
- Guncangkan semalam dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C
- Lanjutkan dengan tahapan dari *Protocol Qiagen Mini Preparation Kit* untuk mengisolasi plasmid DNA

  QIAprep Spin Miniprep Kit menggunakan *Microcentrifuge*

  a. Sedot campur sel bakteri dalam 250 µl Buffer P1 dan transfer ke tabung *microcentrifuge*
  b. Tambahkan 250 µl Buffer P2 dan kocok perlahan 4- 6 kali untuk mencampur
  c. Tambahkan 350 µl Buffer N3 dan kocok perlahan 4- 6 kali
  d. Sentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 13000 rpm dalam *table-top microcentrifuge*
  e. Aplikasikan supernatan dari tahap 4 ke *QIAprep spin column* dengan memipetnya
  f. Sentrifuge selama 30-60 detik. Buang sisa cairan.
  g. Cuci *QIAprep spin column* dengan menambahkan 0,5 ml Buffer PB dan sentrifuge selama 30-60 detik.Buang sisa cairan
  h. Cuci QIAprep spin column dengan menambahkan 0,75 ml Buffer PE dan sentrifuge selama 30-60 detik

i. Buang sisa cairan dan sentrifuge selama 1 menit untuk membuang sisa buffer pencuci
j. Letakkan QIAprep column pada 1,5 ml tabung *microcentrifuge* yang bersih. untuk mendapatkan DNA, tambahkan 32 µl air ke pusat tiap *QIAprep spin column*, biarkan selama 1 menit dan sentrifuge selama 1 menit

- Analisa plasmid dengan analisis restriksi (dengan enzim restriksi) untuk mengkonfirmasi adanya "inserts" (Produk PCR CD71 dan Slc40A1)
- Kirimkan klon yang menunjukkan pola restriksi yang tepat ke MWG AG Biotech untuk diproses DNA Sequencing
- Setelah menerima hasil sequencing dari Biotech, cek hasil sequence dengan sequence CD71 dan Slc40A1 yang ada di www.genomatix.de atau www.ebi.ac.uk/clustalw/
- Pemeriksaan homologi dengan program Genetyx.Mac. Prosedurnya adalah dengan mencari sequences primer pada data NCBI dan elektroferogram (hasil DNA seq). Lalu dimasukkan dalam program dan akan keluar hasil homologinya. Atau bisa juga dengan metode kedua yaitu dengan mencari data gen di NCBI lalu hasil DNA sequencing yang berupa huruf dan data dari NCBI dimasukkan ke dalam program. Lalu program akan mencari sendiri homologinya dan regio sequences primer. Homologi yang tertinggi yang dipilih.

DNA sequencing dilakukan dengan menggunakan nukleotida yang dilabel untuk mendapatkan inkorporasi salinan bagian DNA. DNA sequence dapat diturunkan oleh posisi nukleotida yang terlabel. Pertama, segmen DNA digandakan, yang disebut cetakan DNA, dan dipisahkan menjadi dua utas dengan pemanasan. Enzim digunakan untuk membuat *complementary copies*) dari utas individu dengan nukleotida terlabel. Segmen DNA lalu dipisahkan menurut panjangnya dengan elektroforesis pada polyacrylamide gel. Elektroforesis adalah gerakan secara elektris partikel tertentu melalui bahan yang *porous (polyacrylamide gel)* di bawah pengaruh medan elektrik dengan tegangan tinggi. Saat DNA dipisahkan, beberapa tehnik yang berbeda memungkinkan analisa DNA *sequence*. Metode tradisional DNA sequencing menggunakan isotop radioaktif seperti *phosphorous-32, sulfur-35* dan *phosphorous-33*, tergabung dalam nukleotida spesifik (A,C,T,G). Nukleotida yang dilabel radioaktif memungkinkan pembacaan *sequence* dengan tehnik yang disebut *autoradiography*. Gel yang mengandung segmen DNA yang terpisah dipapar film X-ray selama beberapa saat. Radiasi menyebabkan noda gelap pada film yang mengindikasikan lokasinya. Lalu, film di*develop* untuk melihat pola nukleotida terlabel. Dibutuhkan empat jalur untuk menentukan *sequence* penuh DNA.

9. PCR Real Time

Prosedur PCR *Real Time* :

1. Amplifikasi Standard
   a. *double* PCRs : 1 µl *Template*, 25µl Volume Reaksi (30 siklus)
   b. Ekstraksi Gel : Elusi dengan 32 µl *Destilated Water* (DW)

Protokol Ekstraksi Gel

1. Iris fragmen DNA dari *agarose gel* dengan *scalpel* yang bersih dan tajam
2. Timbang potongan *gel* dalam tabung yang tak berwarna. Tambahkan 3 volume Buffer QG ke dalam tiap 1 volume *gel* (100 mg~ 100µl).
3. Inkubasikan pada suhu 50°C selama 10 menit (atau sampai potongan gel larut seluruhnya). Untuk membantu melarutkan gel, campur dengan memvortex tabung tiap 2-3 menit selama inkubasi.
4. Setelah potongan *gel* larut seluruhnya, periksa apakah warna campuran kuning (sama dengan warna Buffer QG tanpa *agarose* yang larut).
5. Tambahkan 1 *gel* volume isopropanol ke dalam sampel dan campur.
6. Letakkan *QIAquick spin column* dalam tabung koleksi 2ml yang tersedia.
7. Untuk mengikat DNA, aplikasikan sample ke dalam *QIAquick column* dan sentrifuge selama 1 menit.
8. Buang cairan sisanya dan letakkan *QIAquick column* ke dalam tabung koleksi yang sama.
9. Tambahkan 0,5 ml Buffer QG ke dalam *QIAquick column* dan sentrifuge selama 1 menit.
10. Untuk mencuci, tambahkan 0,75 ml Buffer PE ke dalam *QIAquick column* dan sentrifuge selama 1 menit.
11. Buang cairan sisanya dan sentrifuge *QIAquick column* selama 1 menit pada 13000 rpm (~ 17900 xg)
12. Letakkan *QIAquick column* ke dalam 1,5 ml microcentrifuge tube yang bersih.
13. Untuk mendapatkan DNA, tambahkan 50 µl Buffer EB (10 mM Tris Cl, pH 8,5) atau H2O ke pusat membran *QIAquick* dan sentrifuge *column* selama 1 menit.

2. Re-Amplifikasi Standard
   a. *double* PCRs : 10 µl Template, 100 µl Reaction Volume (30 cycles)
   b. Pemurnian PCR : Elusi dengan 32 µl DW = Solusi Ur (UL)

Protokol Pemurnian PCR menggunakan Protokol Perangkat QIAquick

1. Tambahkan 5 volume Buffer PB ke dalam 1 volume sampel PCR dan campur. Tidak perlu menghilangkan minyak mineral atau kerosene.
2. Letakkan *QIAquick spin column* dalam tabung koleksi 2 ml yang tersedia.
3. Untuk mengikat DNA, aplikasikan sample ke *QIAquick column* dan sentrifuge selama 30-60 detik.

4. Buang cairan sisanya. Letakkan *QIAquick column* kembali ke dalam tabung koleksi.
5. Untuk cuci, tambahkan 0,75 ml Buffer PE ke dalam *QIAquick column* dan sentrifuge selama 30-60 detik.
6. Buang cairan sisanya dan letakkan *QIAquick column* kembali ke dalam tabung yang sama. Sentrifuge *column* selama 1 menit.
7. Letakkan *QIAquick column* diatas 1,5 ml *microcentrifuge tube* yang bersih.
8. Untuk mendapatkan dNA, tambahkan 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) atau H2O ke pusat membrane QIAquick dan sentrifuge column selama 1 menit.

3. Penentuan kuantitas dengan *Low Mass ladder* (LML) (1 : 25)
2 µl Eluat (sampel), 43 µl DW, 5 µl 10x *Loading Buffer*
Analisa dan kuantifikasi dari 3 x 5 µl tiap sample pada gel
LML

Bp	1 µl = x ng	1 : 25, 5 µl
2000	50	10
1200	30	6
800	20	4
400	10	2
200	5	1
100	2,5	0,5

4. Seri dilusi
   a. Kalkulasi jumlah utas ganda DNA Molekul/µl dalam UL

$$\frac{c(DNA[ng/\mu l])/1\times10^{9}}{FragmentSize[bp]\times660}\times6{,}022\times10^{23}=\_\_\_\ dsDNA-Molecules/\mu l=c(DNA-UL)$$

   b. Persiapan Solusi Standard 1 (SL1)
Volume : 100 µl ; Konsentrasi 10^{10} utas tunggal (ut) DNA Molekul

$$\frac{100\mu l\times1\times10^{10}\ dslDNA-molecules/\mu l}{c(DNA-UL[dsDNA-molecules/\mu l])}\Big/_{2}=\_\_\_\ \mu l/UL$$

   c. Solusi Standard 2 (SL2) = 10 µl SL1 + 2,5 µg plasmid ke dalam 1000 µl dengan 1x RT Buffer* = 10^{8} ssDNA Molekul/µl
   d. Solusi Standard 3 (SL3) = 10 µl SL2 = 990 µl 1 x RT Buffer * = 10^{6} ss DNA Molekul/µl

5. Persiapan untuk Solusi Kerja 1 x RT Buffer (tanpa DTT) *

	µl		µl 1 x RT Buffer		Ut DNA Molekul / µl
AL 1 :	50	SL 3	50	= AL 1	= 500000
AL 2 :	20	AL 1	80	AL 2	100000
AL 3 :	25	AL 2	75	= AL 3	= 25000
AL 4 :	20	AL 3	80	= AL 4	= 5000
AL 5 :	20	AL 4	80	= AL 4	= 1000
AL 6 :	20	AL 5	80	= AL 5	= 200

*...1 x RT Buffer = 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 15 mM KCl; 0,6 mM MgCl2

6. Gunakan 1 atau 2 µl Standard untuk PCR *Real Time*

7. Protap Pelaksanaan Real Time-PCR

1x	8,5x
1,0 µl Aqua	8,5 µl
5,0 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	42,5 µl
2,0 µl Primer Mix (1,25 µM)	17 µl
8,0 µl Master Mix + 2,0 µl cDNA (5ng/ µl)AL1-AL8	68 µl

10 µl SL1
1,06 µl Plasmid (pGL3 Kontrol 2,35 µg/ µl)
989 µl 1x RT

SL2 **10^7 ut Molekul/ µl**
10 µl SL2
990 µl 1x RT

SL3 **10^6 ut Molekul/ µl**

AL 1	50µl	SL3	
AL2	20 µl	AL1	
AL3	25 µl	AL2	
AL4	20 µl	AL3	
AL5	20 µl	AL4	
AL6	20 µl	AL5	2 µl

SL3	mGAPDH	10^6 ut Molekul / µl	2.000.000
AL1	50 µl SL3 + 50 µl 1x RT* - Buffer	500.000ut Molekul / µl	1.000.000
AL2	40 µl AL1 + 60 µl 1x RT* - Buffer	200.000ut Molekul / µl	400.000
AL3	40 µl AL2 + 60 µl 1x RT* - Buffer	80.000ut Molekul / µl	160.000
AL4	40 µl AL3 + 60 µl 1x RT* - Buffer	32.000ut Molekul / µl	64.000
AL5	40 µl AL4 + 60 µl 1x RT* - Buffer	12.800ut Molekul / µl	25.600
AL6	40 µl AL5 + 60 µl 1x RT* - Buffer	5.120ut Molekul / µl	10.240
AL7	40 µl AL6 + 60 µl 1x RT* - Buffer	2.048ut Molekul / µl	4.096
AL8	40 µl AL7 + 60 µl 1x RT* - Buffer	819.2ut Molekul / µl	1.638

1. GAPDH	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	447bp
2. Spi11	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	501bp
3. COX2	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	284bp
4. Gadd45a	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	210bp
5. CD71	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	629bp
6. SLc40A1	N24h, H24h, N48h, H48H, K+N24h, K+ H24h, K+ N48h, K+H48h	529bp

Program PCR :

95 °C selama 15 menit

95 °C selama 20 detik

60 °C selama 30 detik

72 °C selama 1 menit

45 siklus

60 °C selama 1°C/menit ditunggu 5 detik

99 °C

Lampiran 3

Foto Alat Penelitian

Mikroskop Olympus CK2

Air flowed Benc ANTAIR

Centrifuge Sorvall & Eppendorf

Timbangan OWALABOR

RT- PCR BIOMETRA

Real Time PCR CORBETT

BioDocAnalyze

Luminometer

Water Bath

Inkubator sel

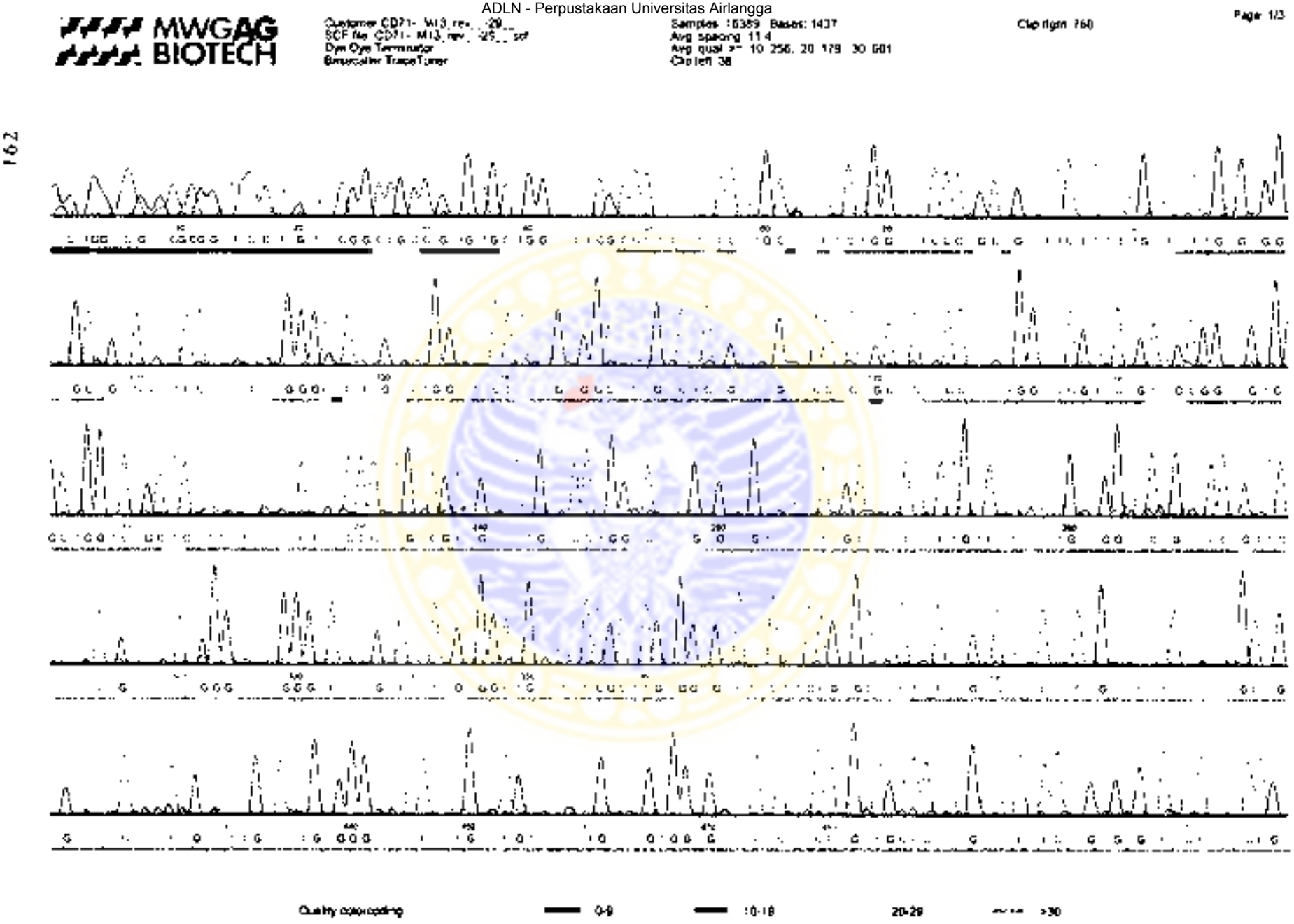
Lemari Pendingin Sel

Alat Elektroforesis BIOMETRA

home o track o sequencing o show sequences

equencing results

ame/Label	Qual left	Qual right	Primer	Sequence
071 CU0001681	38	760	M13 rev (-29)	>CD71-_M13_rev__-29__ 38..760 of trace file CTGGAATTCGCCCTTTTTCCTTGCATATTCTGGAATCCCAGCAGTTTCTTTTTGTTTT TGAGGATGCAGACTATCCTTATTTGGGCACTAGATTGGATACCTATGAGGCATTGACT GAAAGTTCCTCAGCTCAACCAAATGGTTCGTACAGCAGCGGAAGTGGCTGGTCAGCTC TATTAAACTTACCCATGACGTTGAATTGAACCTGGACTATGAGATGTATAACAGCAAA ACTGTCATTTATGAAGGATCTGAACCAGTTCAAAACAGATATCAGGGATATGGGTCTA TCTACAGTGGCTGTATTCCGCTCGTGGAGACTACTTCCGTGCTACTTCTAGACTAACA TGATTTTCATAATGCTGAGAAAACAAACAGATTTGTCATGAGGGAAATCAATGATCGT TATGAAAGTGGAGTATCACTTCCTGTCGCCCTATGTATCTCCAAGAGAGTCTCCTTTC ACATATCTTCTGGGGCTCTGGCTCTCACACTCTCTCAGCTTTAGTGGAGAACTTGAAG TCGTCAAAAAAATATTACTGCTTTTAATGAAACCCTCTTCAGAAACCAGTTGGCCCTG TACTTGGACTATTCAGGGAGTCGCAAATGCCCTCTCTGGTGACGAAGGGCGAATTCTG GATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTA GT
Lc40A1 CU0001680	21	706	M13 rev (-29)	>SLc40A1-_M13_rev__-29__ 21..706 of trace file GTGCTGGAATTCGCCCTTGGACAAAGACCGATTCTAGCAGCAATGACTCCTGCAAACA AGGCTGACAGAGACTATGGGGATGGGTTTAGTACTCATCTCATGGACATTAGACATGT GACATATGCATTTCTGTTGTAAAGACGGTCTCAGGTATTTTGGTAGTTGGGGACACTG TCACATTCACAAACCTAGAACGGATATCTTCAAATGGAGAAACAGACAGGTCCAAGGG TTCCAGGCATGAATACGGAGATCACACACAAGATTAAACAGGAAAGCTGGGCTAGTCC AGAATAGACCAGTCCGAACAAGGCCACATTTTCGACGTAGCCAGGTGAAGGCCACAGT CCATTATTCCAGTTATTGCTGATGCTCCCATCAAAATACTAAGGATGGATCCACTCAG CCTGAGTGTAGGCGTACCCTGTAGTGATACAGTCAAAGCCCAGGACTGTCATATAGAG AAGCCAGGCCCATGCCAGCCAGAAACACTGGCTGGTTATAGTAGGAGACCCATCCATC GGAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG GTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTAC


MWGAG BIOTECH
Customer CD71- M13_rev_ -29__
SCF file CD71- M13_rev_ -25__ scf
Dye Dye Terminator
Binuscaller TraceTuner
Samples 16389 Bases: 1437
Avg spacing 11.4
Avg qual >= 10 256, 20 179, 30 601
Clip left 38
Clip right 760
Page 1/3
Quality color coding
0-9
10-19
20-29
>30

MWGAG BIOTECH

Customer CD71-_M13 rev -29
SCF file CD71-_M13 rev -29_.scf
Dye Dye Terminator
Basecaller TraceTuner

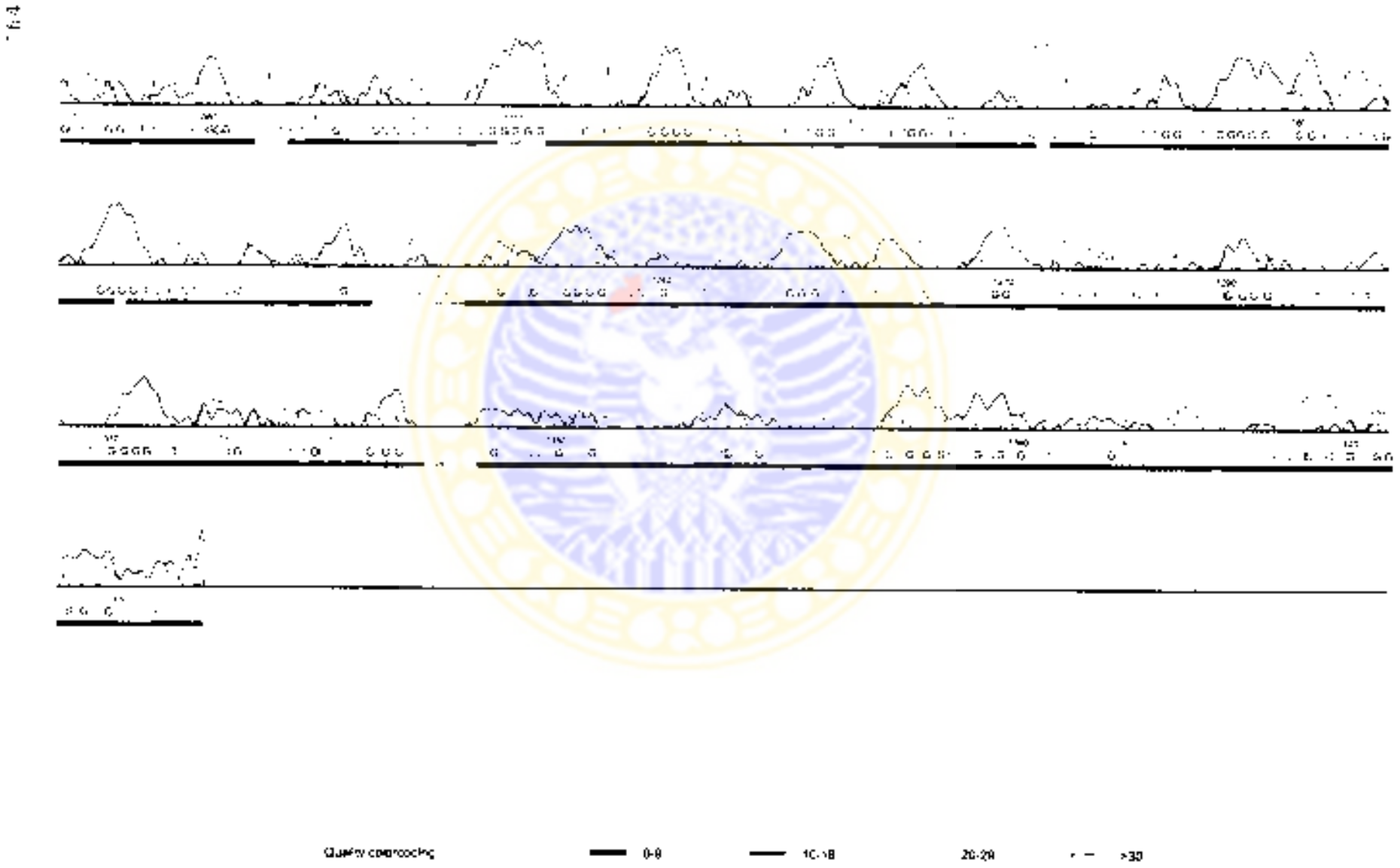
Samples 16389 Bases 1437
Avg spacing 11.4
Avg qual +- 10 256 20 179, 30 601
Clip left 38

Clip right 780

163

Quality colorcoding 0-9 10-19 20-29 >30

MWGAG BIOTECH



MWGAG BIOTECH

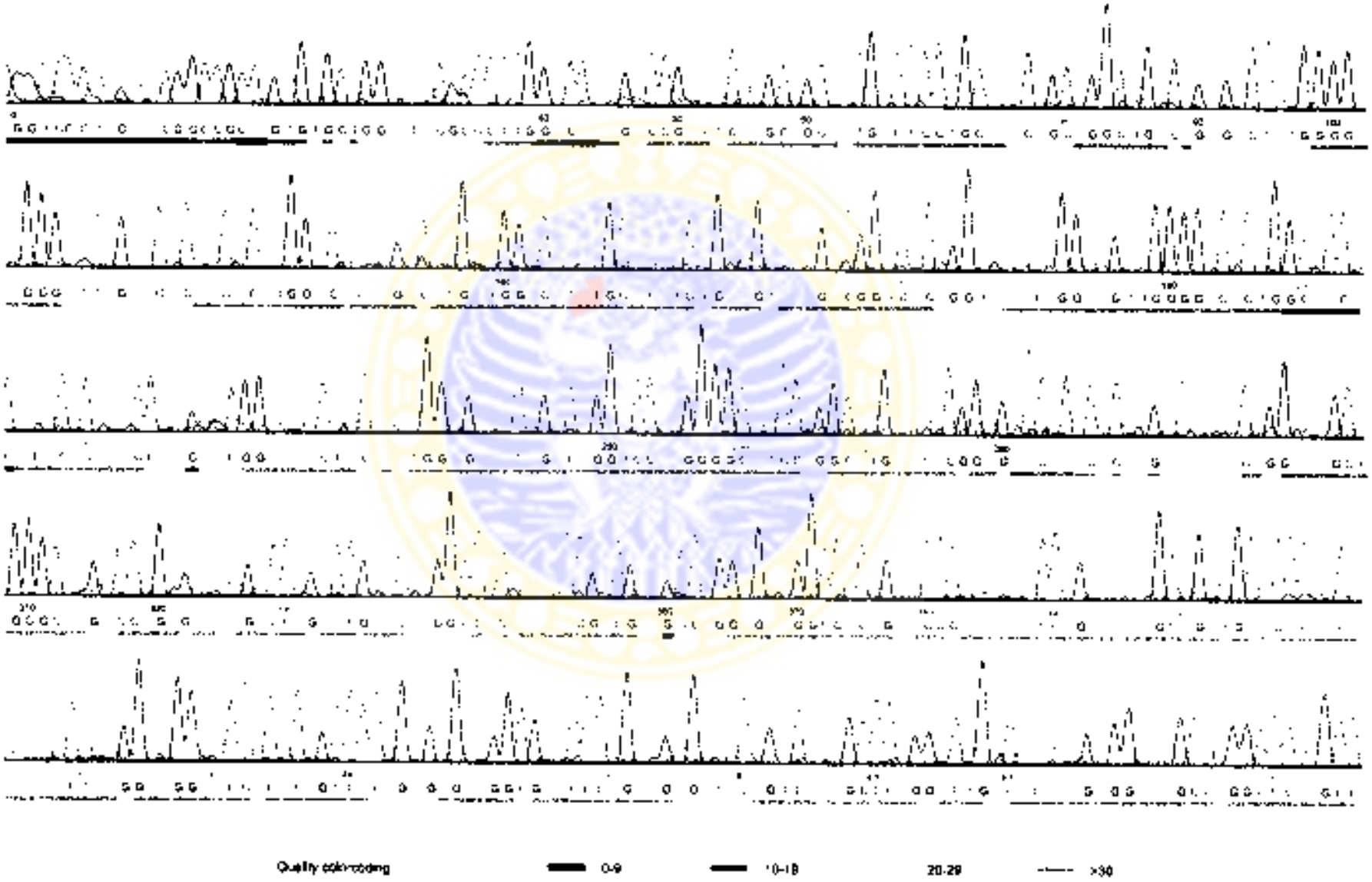
Customer SLo40A1-_M13 rev_-29__
SCF file SLo40A1-_M13_rev_-29__.scf
Dye Dye Terminator
Basecaller TraceTuner

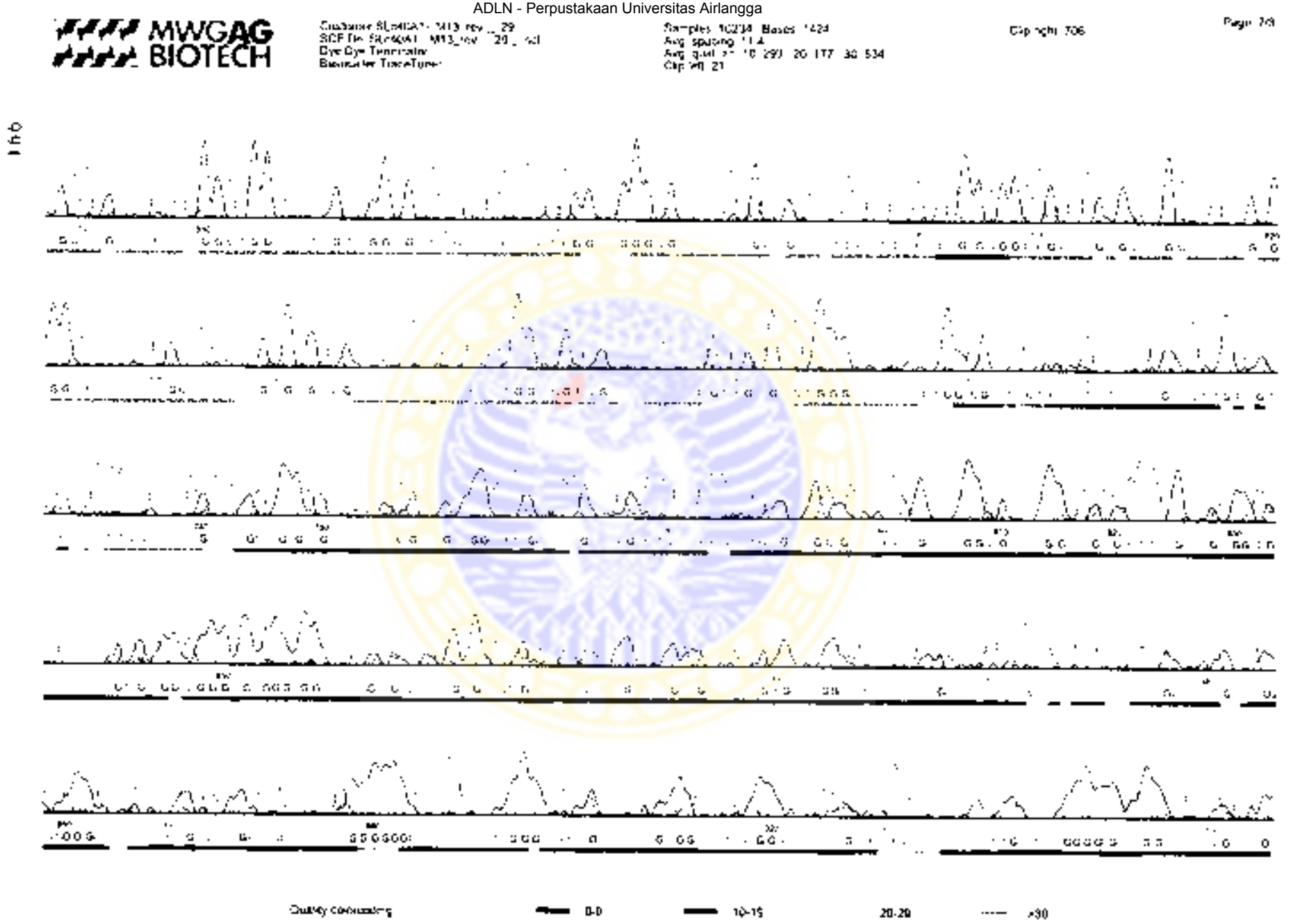
Samples 16734 Bases 1424
Avg spacing 11.4
Avg qual >= 10 293, 20 177, 30 534
Clip left 21

Copyright 706

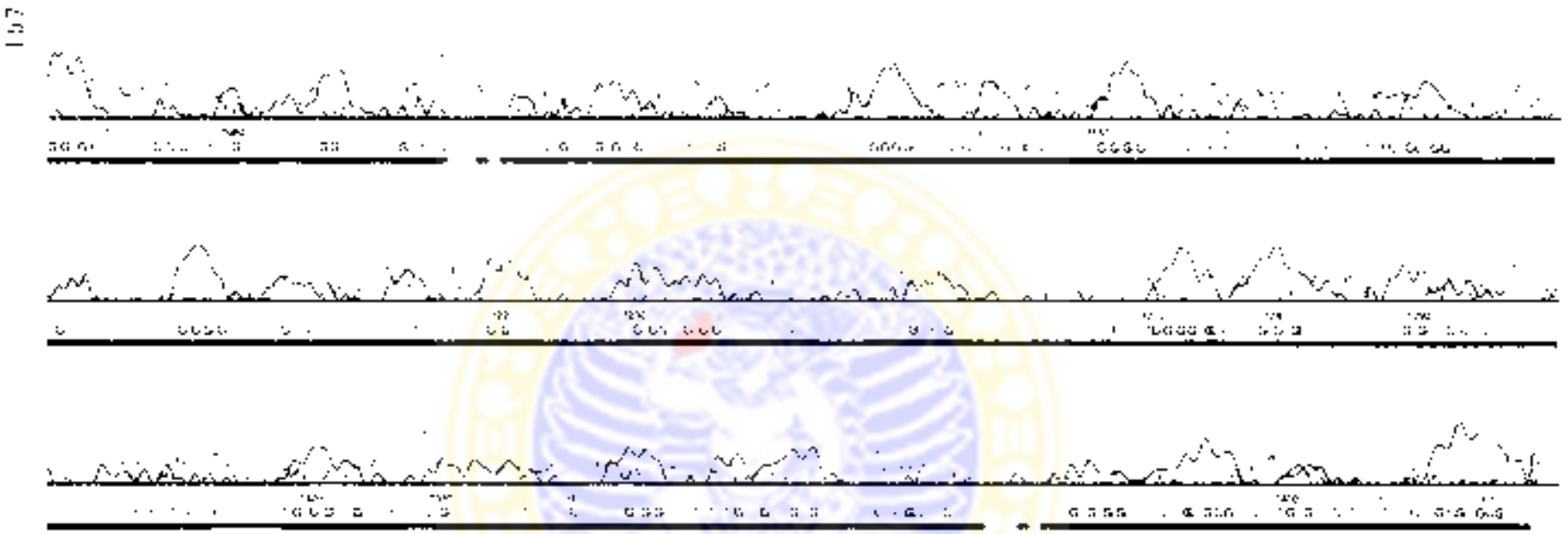
Page 1/3

165




MWGAG BIOTECH
Dye Dye Terminator
Basecaller TraceTuner
Samples 10234 Bases 1424
Clip left 21
Clip right 706
Quality calculating
0-9
10-19
20-29
>30

MWGAG BIOTECH



Lampiran 5

Charité

UNIVERSITÄTSMEDIZIN · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Prof. Dr. sc. med. Hannut Kuhn , Institut für Biochemie, Monbijoustr. 2, D-10117 Berlin
(Tel. +49 30 450 528040, Fax +49 30-450 528905, E-mail hannut.kuehn@charite.de)

Mrs. Prihartini Widiyanti
Jl Jemur 9-11
Surabaya, East Java
Indonesia 60241

Berlin, den 12.9.03

Ihre Zeichen/Ihre Nachricht vom — Unser Zeichen/Unsere Nachricht vom

Betr : research stay

Dear Mrs Widyanti,

I would be happy to host you for a research stay in my laboratory at the Institute of Biochemistry, University Clinics Charité, Humboldt University to complete your Ph.D thesis on differential gene expression under hyperoxic conditions. You are welcome to used free of charge all devices and equipments present in our lab during your stay. However, you have to raise funds from independent funding institutions to cover your living expenses in Germany as well as the travel costs.

I am prepared and willing to supervise your work during your stay in Germany. The best time for coming here would be April to July

Sincerely yours

H. Kuhn

Prof. Dr. sc. med. Hannut Kuhn
Institut für Biochemie
Universitätsklinikum (Charité)
Humboldt-Universität Berlin
Hessische Str. 3-4 · 10115 Berlin

Lampiran 6

CHARITÉ

Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn, Institut für Biochemie, Monbijoustr. 2, D-10117 Berlin
(Tel +49-30-450 528040, Fax +49-30-450 528905, E-mail: hartmut.kuehn@charite.de)

Charité | Campus Mitte | 10098 Berlin

Postgraduate Programme
Airlangga University
Surabaya
Indonesia

Berlin, den 20.6.04

Ihre Zeichen/Ihre Nachricht vom

Unsere Zeichen/Unsere Nachricht vom

Betr.: Graduation of Mrs. Prihartini Widyanti

To whom it may concern,

I am writing this letter to express my willingness to become a co-promoter for Mrs Prihartini Widyanti in the frame of her postgraduat studies. I have supervised the experimental work carried out by Mrs. Widyanti during her DAAD fellowship period at the Institute of Biochemistry, University Clinics Charité, Humboldt University in Berlin.

Sincerely

H. Kühn

Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn
Institut für Biochemie
Universitätsklinikum Charité
Humboldt-Universität Berlin
Hessische Str. 3-4 · 10115 Berlin