

BAB I

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang Masalah

Adhesi intraperitoneal merupakan komplikasi yang umum terjadi setelah operasi abdomen dengan angka kejadian sekitar 93–100% setelah laparotomi abdomen bagian atas dan 67– 93% setelah laparotomi abdomen bagian bawah. (Sudirman et al., 2022). Sekitar 15-18% dari kejadian adhesi akibat laparotomi membutuhkan intervensi bedah. Dari seluruh obstruksi usus halus, 65–75% dari kasus tersebut disebabkan adhesi intraperitoneal, sementara 32% dari kasus obstruksi usus akut juga disebabkan oleh adhesi intraperitoneal. (Sudirman et al., 2022)

Secara definisi, adhesi adalah terkumpulnya jaringan fibrosa dalam suatu rongga seperti peritoneum, perikardium atau pleura yang diakibatkan oleh cedera pada lapisan membran dari rongga tersebut. (Foster et al., 2020). Definisi lain adhesi intraperitoneal adalah kumpulan pita jaringan yang terovaskularisasi dan mempunyai inervasi baik dimana pita jaringan tersebut menyatukan atau menghubungkan organ intraperitoneal yang normalnya dalam keadaan terpisah. (Rossi et al., 2017)

Penyebab adhesi intraperitoneal diantaranya ialah infeksi intra-abdominal, trauma bedah, iskemia, cedera panas, dan reaksi kekebalan tubuh terhadap benda asing. Trauma peritoneum dapat menyebabkan aliran darah daerah luka terganggu, permeabilitas vaskular meningkat diikuti dengan eksudasi sel-sel inflamasi yang berakibat pembentukan matriks fibrin. (Sudirman et al., 2022)

Vitamin E salah satu dari sekian banyak agen yang sedang banyak diteliti sejak lama untuk pencegahan adhesi intraperitoneal. Vitamin E merupakan vitamin

yang dapat larut dalam lipid dan ditemukan dalam seluruh membran sel. Vitamin E memiliki fungsi antioksidan, antiinflamasi, antikoagulan, dan juga antifibroblastik. Dengan potensi tersebut, vitamin E dapat memberikan efek menguntungkan untuk pencegahan adhesi. Namun, bukti mengenai kemanjuran pemberian vitamin E dalam mencegah adhesi intra-abdominal atau peritoneal masih belum jelas. (Sudirman et al., 2022).

Vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas. Vitamin E melindungi asam lemak tidak jenuh pada membran fosfolipid. Radikal peroksil bereaksi 1000 kali lebih cepat dengan vitamin E daripada dengan asam lemak tidak jenuh, dan membentuk radikal tokoferoksil. Selanjutnya radikal tokoferoksil berinteraksi dengan antioksidan lain, seperti vitamin C, yang akan membentuk kembali tokoferol. Vitamin E misalnya penting untuk melindungi membran sel darah merah yang kaya akan asam lemak tidak jenuh ganda dari kerusakan akibat oksidasi. Selain itu vitamin E melindungi lipoprotein dalam sirkulasi LDL teroksidasi yang ternyata memegang peranan penting dalam menyebabkan aterosklerosis. LDL teroksidasi lebih mudah diambil oleh makrofag dibandingkan LDL yang tidak teroksidasi, selanjutnya membentuk sel busa (foam cells) yang berpengaruh buruk pada sel endotel, dan mungkin dapat menyebabkan vasokonstriksi. Vitamin E dosis besar (1600 mg/hari) melindungi LDL dari oksidasi. Meskipun masih kontraindikatif, beberapa hasil studi epidemiologik mendapatkan bahwa vitamin E dapat memproteksi penyakit kardiovaskular, namun mekanisme kerjanya tidak jelas. Di samping efek antioksidannya, efek langsung terhadap endotel pembuluh darah, sel otot polos, atau pembekuan darah diduga ikut berperan. Vitamin E mengatur proliferasi sel otot polos pembuluh darah, menyebabkan vasodilatasi dan menghambat baik aktivasi

trombosit maupun adhesi leukosit. Vitamin E juga melindungi Beta-Karoten dari oksidasi. Beberapa zat yang terdapat pada makanan misalnya selenium, asam amino yang mengandung sulfur, koenzim Q dapat menggantikan vitamin E. (Deswoto et al., 2017)

Dalam kondisi normoksia, subunit HIF-1 α memiliki waktu paruh yang sangat singkat (Cimino et al., 2019) dan sel secara terus-menerus mensintesis dan mendegradasi protein HIF- α . Namun, dalam situasi hipoksia, degradasi dari HIF-1 α menjadi terhambat (Martinez et al., 2021). Reaksi enzimatis hidrosilasi dua residu prolyl (Pro402 dan Pro564) membantu interaksi antara oksigen dan subunit HIF-1 α di mana reaksi ini terjadi pada ODDD (Strowitzki et al., 2019). Hidrosilasi yang membutuhkan oksigen ini meregulasi interaksi dengan protein supresi tumor von Hippel-Lindau (pVHL) di mana pVHL merupakan komponen rekognisi dari kompleks ligase ubiquitin E3 yang menargetkan HIF-1 α untuk proteolisis melalui jalur ubiquitin-proteasom (Minervini et al., 2017).

Dalam kondisi hipoksia, prolyl hydroxylase-domain (PHD) tersupresi sehingga protein HIF- 1 α tidak dihancurkan dan berakumulasi. Selanjutnya, HIF-1 α bertranslokasi ke nukleus dan dimerisasi dengan HIF-1 β . Heterodimeric transactivating complex HIF kemudian menempel kepada HRE pada sekuens promoter atau enhancer dari target gen. (Zhang et al., 2025).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan mitogen endotel yang sel spesifik in vitro dan sebuah pemicu angiogenik pada beberapa model mitogen in vitro (Melincovici et al., 2018). Protein VEGF pertama kali mulai dipikirkan ketika pada tahun 1939 Ide et al. mempostulasikan bahwa terdapat faktor yang menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah akibat tumor dengan basis respons

neovaskularisasi yang kuat (Ide et al., 1939).

Ekspresi mRNA VEGF diinduksi oleh kadar oksigen yang rendah dan HIF-1 merupakan mediator utama dalam kondisi hipoksia (Lazarus, 2011). Mirip seperti HIF-1 α , gen supresor tumor VHL memiliki peranan penting dalam regulasi VEGF di mana aktivitas mitogenik pada sel endotel yang dihasilkan oleh sel karsinoma renal dengan mutasi VHL dapat dinetralisasi dengan antibodi terhadap VEGF (Siemester et al., 1996). Dapat disimpulkan bahwa fungsi protein VHL adalah untuk meregulasi VEGF dan gen yang diinduksi oleh hipoksia lainnya.

Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian vitamin E mempengaruhi ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan kadar HIF-1 α di dalam darah pada hewan coba dengan derajat adhesi pasca operasi?
2. Apakah pemberian vitamin E mempengaruhi ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar VEGF di dalam darah pada hewan coba dengan derajat adhesi pasca operasi?
3. Apakah ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , dan ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar VEGF di dalam darah berhubungan dengan derajat adhesi pasca operasi pada hewan coba yang diberikan vitamin E?

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui efek pemberian vitamin E terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF, serta hubungannya dengan derajat adhesi pasca operasi.

Tujuan Khusus

1. Mengevaluasi efek vitamin E terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α pada hewan coba dengan adhesi pasca operasi.
2. Mengevaluasi efek vitamin E terhadap kadar solubel HIF-1 α pada hewan coba dengan adhesi pasca operasi.
3. Mengevaluasi efek vitamin E terhadap ekspresi mRNA gen VEGF pada hewan coba dengan adhesi pasca operasi.
4. Mengevaluasi efek vitamin E terhadap kadar solubel VEGF pada hewan coba dengan adhesi pasca operasi.
5. Mengevaluasi hubungan ekspresi mRNA HIF-1 α , kadar solubel HIF-1 α , ekspresi mRNA VEGF, kadar solubel VEGF dengan derajat adhesi pasca operasi pada hewan coba setelah pemberian vitamin E.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari Segi Keilmuan

1. Penelitian ini akan menambah pengetahuan mengenai efek vitamin E terhadap adhesi pasca operasi memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan adhesi pasca operasi untuk memberikan luaran yang lebih baik.
2. Penelitian ini juga akan mengeksplorasi mekanisme vitamin E dalam respons adhesi pasca operasi melalui jalur HIF-1 α dan VEGF dalam bentuk ekspresi gen dan kadarnya dalam darah hewan model.
3. Penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lainnya untuk membuka potensi vitamin E menangani adhesi pasca operasi dan membuka wacana

potensi zat aktif yang berperan dalam memodulasi ekspresi HIF-1 α .

4. Data dalam penelitian ini dapat dipergunakan sebagai acuan keilmuan yang dapat menyokong bukti ilmiah untuk menjadikan vitamin E sebagai terapi adhesi pasca operasi.

Manfaat dari Segi Klinis

1. Penelitian ini dapat memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan adhesi pasca operasi untuk memberikan luaran yang lebih baik.
2. Penelitian ini memberikan informasi khasiat vitamin E dalam pencegahan terjadinya adhesi pasca operasi

BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1 Anatomi dan Histologi Peritoneum

Peritoneum viseral meliputi kira-kira 80% dari seluruh peritoneum, peritoneum ini menyelubungi seluruh organ intraperitoneal. Sedangkan 20% lainnya ialah peritoneum parietal yang menutupi bagian dalam dinding abdomen (Hellebrekers, BJW., 2011). Membran peritoneal ditutupi oleh satu lapis sel mesotel yang memiliki mikrovili dan memproduksi cairan pelumas berupa surfaktan yang berbasis fosfolipid (Porta et al., 2016). Sel mesotel berukuran kira-kira 25µm, rata, lentur serta berupa sel gepeng dan kuboid. Penelitian ultrastruktur, terlihat perbedaan antara kedua sel ini dimana sel mesotel gepeng memiliki organel yang terletak di pusat dekat dan mengelilingi nukleus, sedikit mitokondria, sedikit apparatus Golgi, dan retikulum endoplasma yang sedikit. Berlawanan dengan sel kuboid yang mempunyai inti dengan nukleus menonjol dimana retikulum endoplasma yang sangat jelas. Sel mesotel ini melekat longgar dengan membran basalis sehingga mudah lepas saat mengalami cedera dan dapat menutupi defek atau celah peritoneum yang cedera. Sel mesotel baru tidak hanya datang dari tepi defek seperti halnya penyembuhan luka pada kulit melainkan berasal dari dasar luka peritoneum. (Nagai et al., 2013)

Fase penyembuhan luka fisiologis dari peritoneum meliputi, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi. Fase inflamasi timbul pada hari ke 1-3 disertai aktivasi dari kaskade koagulasi. Fase proliferasi dimulai pada hari ke 3, ditandai adanya migrasi fibroblas dibawah pengaruh *growth factor*. Fase yang terakhir adalah fase maturasi, yang merupakan tahap akhir dari penyembuhan luka untuk mengembalikan jaringan luka seperti sebelum luka baik secara fungsi dan struktur,

lamanya fase ini tergantung dari jenis jaringan. (Capobianco A, et al. 2017).

Adhesi Intraperitoneal

Adhesi intraperitoneal adalah suatu kondisi patologis dimana terbentuknya pita atau jaringan fibrosa yang biasanya antara omentum, lengkungan usus dan dinding abdomen. Pita dapat berupa jaringan penyokong yang tipis sampai dengan jaringan fibrosa yang tebal dan mengandung pembuluh darah serta saraf, atau terjadi penyatuan antara permukaan dua organ (Coccolini et al., 2013). Adhesi intraperitoneal biasanya menyebabkan obstruksi usus sederhana, tapi tidak jarang terjadi obstruksi total yang mengancam terjadinya nekrosis usus serta penyulit lain berupa sepsis dan kematian. Sehingga penting untuk segera mengetahui apakah jenis dan stadium obstruksi yang terjadi dalam upaya menentukan apakah penderita perlu terapi pembedahan atau tidak.

Salah satu agen pencegahan adhesi yang banyak dikenal adalah amindotrizoic acid dengan nama dagang *gastroview* atau *urografin* sebanyak 80 ml serta air steril 40 ml melalui selang *nasogastric* dan evaluasi dilakukan setiap 4 jam dengan foto polos abdomen. Terapi akan dilanjutkan dengan operasi adhesiolisis bila kontras tidak mencapai kolon dalam 24 jam. (Loftus, T et al, 2014)

Sampai saat ini belum jelas mengapa terdapat perbedaan antar individu mengenai terjadinya adhesi dan stadium adhesi, pada prosedur pembedahan yang sama (Vase,MN.,2015). Pembentukan adhesi pasca operasi, berdasarkan prosesnya harus dibedakan dalam tiga kelompok yaitu : *adhesion formation* (adhesi yang terbentuk di tempat/sisi operasi), *de novo adhesion formation* (adhesi yang terbentuk di luar tempat operasi) dan *adhesion reformation* (adhesi yang terbentuk setelah adhesiolysis) (Arung, W, 2011).

Beberapa faktor risiko terjadinya adhesi intraperitoneal di antaranya ialah adanya trauma pada jaringan seperti perdarahan, panas yang berlebihan, kelembaban yang kurang, proses infeksi maupun iskemia pada peritoneum akibat ligasi pembuluh darah, devaskularisasi, maupun kauterisasi. Trauma, baik itu trauma tumpul maupun tajam, dapat menjadi pemicu utama terjadinya adhesi intraperitoneal karena keduanya menyebabkan cedera pada permukaan peritoneum, memicu respon inflamasi, dan meningkatkan risiko terbentuknya perlengketan abnormal antar jaringan. Selain trauma akibat tindakan bedah, faktor lain seperti infeksi dan iskemia turut memperberat proses inflamasi dan mengganggu proses fibrinolisis, sehingga adhesi lebih mudah terbentuk. Selain beberapa faktor risiko diatas, adhesi juga dapat disebabkan oleh reaksi imunitas terhadap benda asing dalam rongga intraperitoneal seperti benang intraoperatif, bubuk sarung tangan, dan partikel-partikel dari kasa. (Arung et al., 2011) Secara makroskopik, Zuhlke membagi Stadium adhesi menjadi *Grade 0-4*:

- *Grade 0*, tidak terjadi adhesi.
- *Grade 1*, berupa adhesi yang ringan dan tipis, serta fibrin dapat dilepas secara tumpul.
- *Grade 2*, berupa jaringan adhesi yang lebih kuat; serat adhesi dapat dilepas secara tumpul, Sebagian memerlukan diseksi tajam, dan telah terdapat vaskularisasi ringan.
- *Grade 3*, berupa serat adhesi yang kuat, hanya dapat dilepaskan secara tajam, dan telah terdapat vaskularisasi yang jelas.
- *Grade 4*, berupa jaringan adhesi yang sangat kuat, fibrotik tebal seperti kalus, adhesiolisis harus dilakukan secara tajam, melekat kuat ke organ, cedera organ sulit dihindari.

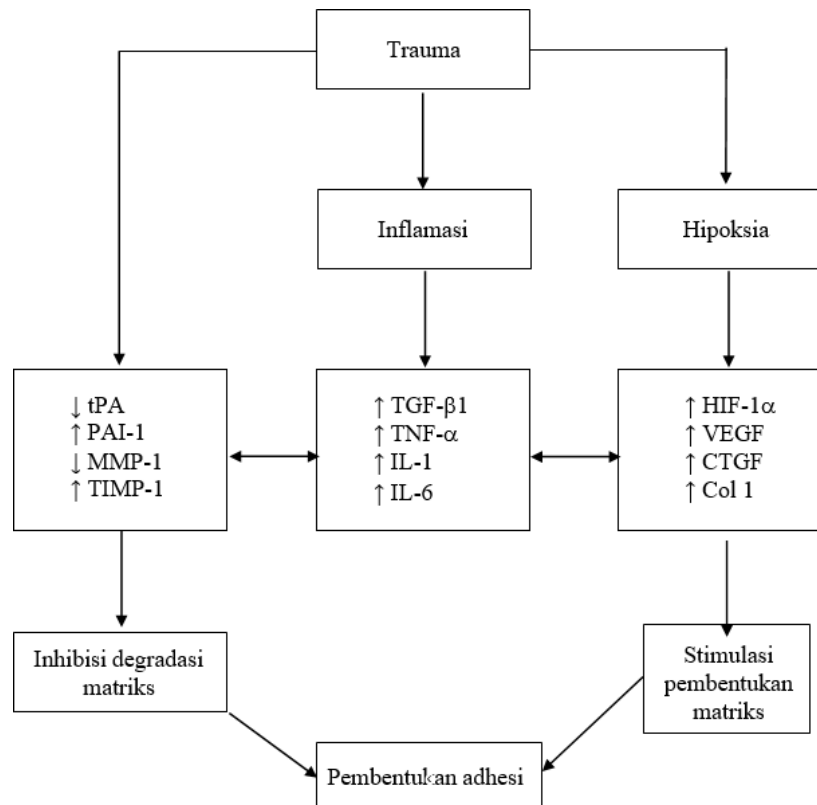
Sedangkan secara mikroskopik, Zuhlke membagi stadium adhesi menjadi Skor 1-4:

- Skor 1, berupa jaringan ikat longgar yang kaya akan sel, dengan fibrin lama dan baru, serta serabut retikulin yang halus
- Skor 2, jaringan ikat dengan sel, kapiler, dan beberapa serabut kolagen
- Skor 3, jaringan ikat yang lebih padat, lebih sedikit sel, lebih banyak pembuluh darah, dan beberapa serabut otot polos dan elastis
- Skor 4, jaringan granulasi lama yang padat, sangat sedikit sel, dan lapisan serosa yang sulit untuk dibedakan.

Pada peritoneum yang cedera, Ellis dkk., mendapati sel mesenkim primitif yang belum terdiferensiasi dalam jaringan konektif perivaskular yang diyakini sel-sel ini memberikan kontribusi terhadap terbentuknya sel-sel mesotelial. Sel-sel mesotelial yang baru bisa berasal dari pertumbuhan dari sel mesotel perifer, transformasi sel mesenkim totipotent atau sel-sel darah, transplantasi dari free floating sel mesotel yang berasal dari struktur sekitar, serta transformasi sel dari cairan peritoneum (Hellebrekers, 2011). Empat proses mesotelialisasi di atas akan terjadi bersamaan. Penyembuhan peritoneum dapat dimengerti dengan memahami aspek inflamasi, koagulasi dan sistem fibrinolisis. (Hellebrekers, 2011). Patogenesis adhesi melibatkan tiga proses (Atta H, 2011), yaitu :

1. Trauma menginduksi penghambatan fibrinolitik dan degradasi matriks ekstraseluler (ECM).
2. Trauma serta benda asing, menginduksi respon inflamasi dengan memproduksi sitokin, terutama *transforming growth factor- β 1* (TGF)- β 1, yang merupakan komponen kunci dalam pengaturan jaringan fibrosa.
3. Trauma juga menginduksi hipoksia jaringan akibat gangguan pasokan darah ke sel-sel mesotelial dan fibroblas submesotelial, yang

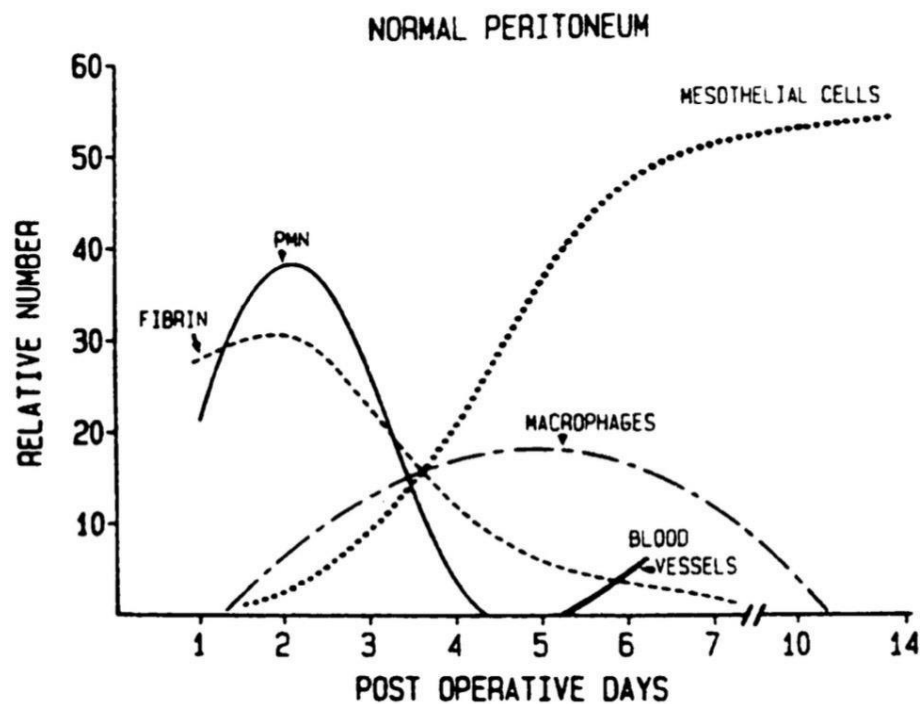
menyebabkan peningkatan ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF)-1 α dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), yang bertanggung jawab untuk pembentukan kolagen dan angiogenesis.



Gambar 2.1. Peran trauma, hipoksia dan inflamasi dalam patofisiologi molekular pembentukan adhesi. tPA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitors 1; MMP: Matrix metalloproteinase; TIMP: Tissue inhibitors of MMP; TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL: Interleukin; HIF-1 α : Hypoxia inducible factor-1 α ; VEGF: Vascular endothelial growth factor; CTGF: Connective tissue growth factor; Col: Collagenase. (Atta H, 2011)

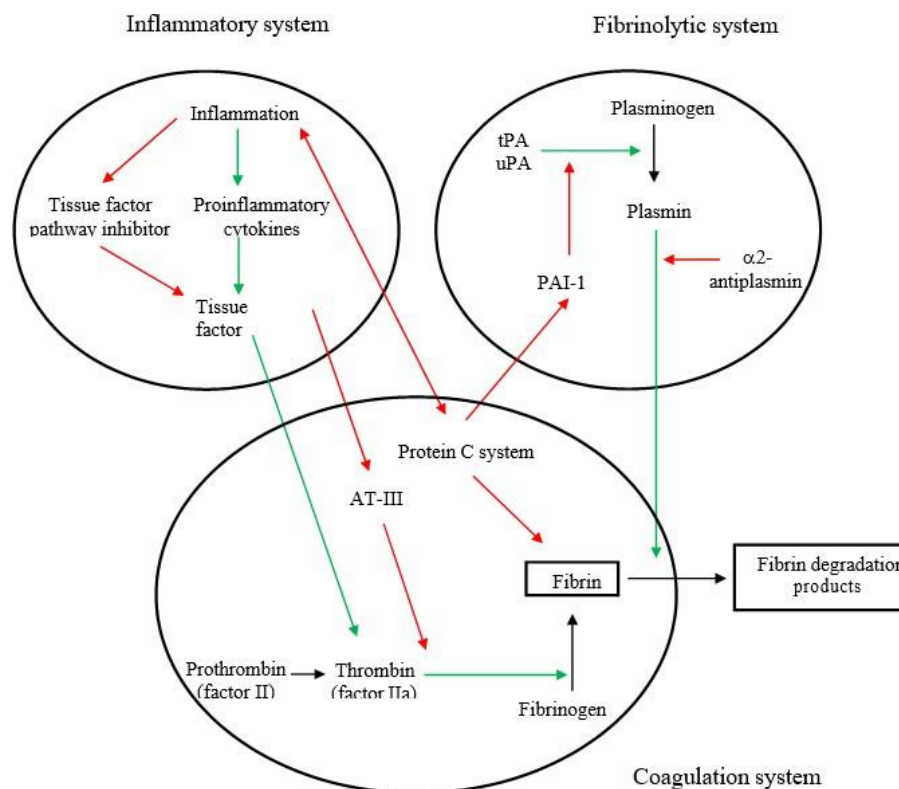
Kurang lebih dua belas jam setelah trauma, leukosit *polymorphonuclear* (PMN) akan muncul di daerah cedera dan meningkat maksimal sampai hari kedua, pada saat yang sama terlihat juga peningkatan fibrin. Makrofag adalah sel yang mendominasi pada hari berikutnya bersamaan dengan munculnya sel mesotel. Berbeda dengan makrofag yang akan menurun di hari kelima, sel mesotel akan terus meningkat.

(Herrick SE, 2021) Pada fase akut ini, terjadi sekresi mediator-mediator proinflamasi seperti sitokin (IL dan TNF), mediator kimiawi (kinin dan histamine), growth factor, metabolit asam arakidonat, NO, dan ROS yang berkontribusi terjadinya adhesi (Herrick SE, 2021). Regenerasi secara lengkap terjadi di hari kedelapan. (Kamel, RM,2010)



Gambar 2.2. Perubahan jumlah elemen sel dan fibrin pada penyembuhan normal peritoneum tikus. (diZerenga, 2001)

Fibrin terbentuk karena aktivasi kaskade koagulasi yang terjadi di rongga peritoneum, thrombin (faktor IIa) yang diubah dari prothrombin (faktor II) merupakan katalisator yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin. (Arung, W,2011). Di level thrombin, aktivasi koagulasi akan dihambat oleh antitrombin III (Hellebrekers, BJW,2011). *Recombinant plasminogen activator* (r-PA); Reteplase yang dikenal sebagai trombolitik, yang diberikan dengan dosis rendah efektif dalam pencegahan adhesi (Binda, MM,2013).



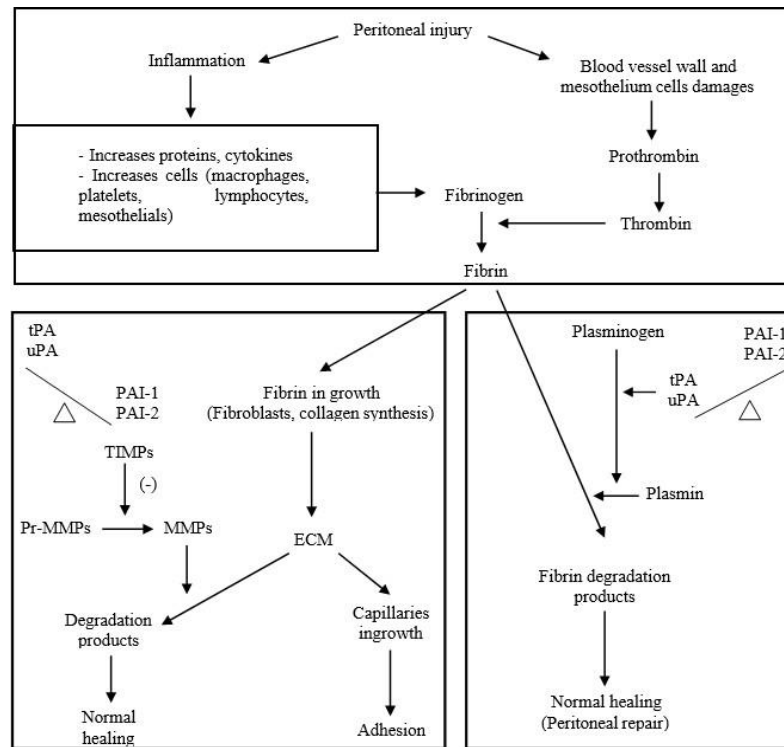
Gambar 2.3. Interaksi utama antara sistem inflamasi, koagulasi, dan fibrinolisis yang memainkan peran yang penting dalam patogenesis adhesi, tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor; AT, antithrombin. (Hellebrekers, BWJ, 2011)

Matriks fibrin secara bertahap akan mengalami organisasi dan akan diganti dengan jaringan yang mengandung fibroblas, makrofag dan sel raksasa (Li et al, 2023). Degradasi fibrin diatur melalui sistem fibrinolisis. (Hellebrekers, BWJ, 2011) Proses fibrinolisis terjadi karena adanya enzim plasmin yang telah diaktifkan dari substrat non-aktif plasminogen oleh *tissue-plasminogen activator* (tPA) dan *urokinase-plasminogen activator* (uPA). (Risman, 2023) Dibanding dengan tPA, uPA kapasitasnya lebih lemah dalam merubah plasminogen menjadi plasmin. (Li et al., 2023). Penghambat plasmin adala antiplasmin, yang juga berperan untuk

mencegah lisis dini terhadap bekuan fibrin oleh ikatan ke plasminogen dan *cross-linking* fibrin dengan mengganggu ikatan plasmin dan plasminogen ke fibrin selama proses koagulasi. PAI adalah penghambat kuat terhadap tPA dan uPA. Inhibitor ini diproduksi dan dilepaskan oleh berbagai sel termasuk: sel endothelial, sel mesotel, makrofag, trombosit dan fibroblas (Li et al., 2023).

Inaktivasi PA oleh PAI-1 melalui pembentukan tPA-PAI-1 dan uPA-PAI-1 kompleks. PAI-2 telah diisolasi tapi perannya dalam sistem fibrinolisis masih dipertanyakan. (Hellebrekers, BWJ, 2011) Matriks Ekstraseluler (ECM) terbentuk setelah fibroblas menginvasi matriks fibrin. Dibuktikan bahwa respon sel mesotel terhadap signal sitokin dan ECM akan membentuk miofibroblas. Fibroblas dan miofibroblas akan memproduksi fibronectin, asam hialuronat, glikosaminoglikan, dan proteoglikan dalam jumlah besar sebagai molekul ECM (Ward, BC, 2011). Jadi deposit fibrin adalah matriks untuk pertumbuhan jaringan fibrokolagenous. (Arung W, 2011) Penyembuhan tanpa adhesi akan terjadi bila ECM didegradasi oleh proenzim MMP secara seimbang. Kerja MMP akan dihambat oleh TIMP. MMP dan inhibitorynya terdapat di peritoneum parietal dan beberapa organ intraperitoneal, khususnya pada sel mesotel dan PMN yang memproduksi enzim ini. (Nikolov, 2020) MMP dalam bentuk laten diaktifkan oleh plasmin dan mampu untuk mendegradasi semua komponen ECM. Ekspresi berlebihan dari TGF- α di peritoneum dan cairan peritoneal akan meningkatkan insiden adhesi intraperitoneal, karena terjadi peningkatan PAI-1 mRNA dan menurunkan tPA mRNA sel mesotel serta menurunkan MMP-1 dan meningkatkan TIMP-1 mRNA (Cheong YC, 2001). Sel mesotel peritoneum manusia mempunyai kemampuan untuk mengontrol akumulasi ECM dengan mensekresi MMP-2, MMP- 3 dan MMP-9. Sekresi enzim ini diregulasi oleh IL-1 dan TGF. (Cabral-Pacheco et al.,

2020)



Gambar 2.4. Keseimbangan antara aktivator plasminogen dan inhibitor plasminogen. TIMP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases*; MMP: *Matrix metalloprotease*; ECM: *Extracellular matrix*; tPA: *Tissue-type plasminogen activator*; uPA: *Urokinase-type*; PAI: *Plasminogen-activating inhibitor* (Arung W.,2011).

2.2 Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 α)

Hypoxia-inducible factor (HIF) merupakan sebuah kompleks heterodimer yang berikatan dengan DNA yang terdiri dari dua protein helix-loop-helix dasar dari keluarga PAS (Keluarga PER, AHR, ARNT dan SIM) (Weidemann A., 2008). HIF adalah faktor transkripsi yang dihasilkan ketika terjadi penurunan kadar oksigen di dalam sel atau kondisi hipoksia (Smith et al., 2008).

Gen HIF-1 α terdapat di kromosom 14 lokus q 23.1, dengan koordinat genomik pada

61,695,512- 61748,259 pasang basa. Faktor transkripsi HIF-1 α pertama kali ditemukan pada tahun 1995 oleh Gregg L. Semenza dan Guang Wang (Wang et al., 1995), dan semenjak itu HIF-1 α mulai dipostulasikan untuk memiliki peranan dalam beberapa penyakit dari kanker hingga infeksi. Respons seluler utama terhadap level oksigen yang rendah adalah dengan meningkatkan produksi HIF-1 α sehingga meningkatkan ekspresi genetik yang dapat mengkodekan protein untuk meningkatkan suplai oksigen (seperti eritropoietin atau VEGF) atau memperbaiki produksi anaerobik (enzim glikolitik) (Loscalzo et al, 2010).

Pentingnya HIF-1 α terbukti saat hilangnya komponen ini pada embriogenesis dapat membunuh mudigah karena vaskularisasi yang defektif. Selain itu, HIF-1 α dapat membantu revaskularisasi setelah iskemia jantung dan otak. Kompleks HIF juga menyokong ekspresi gen lainnya seperti eritropoietin (EPO) dengan cara mengikat pada *hypoxia-responsive enhancer elements* (HREs) (Haase, 2013).

Proses aklimatisasi merupakan sebuah proses di mana saat mencapai batas ketinggian tertentu akan terjadi hipoksia dalam konteks lingkungan sekitar akibat perubahan fisiologis yang besar sehingga akan mengaktifkan transkripsi HIF dan mempengaruhi proses hematologi, respirasi, dan kardiovaskular. Hipoksia akan meningkatkan serum eritropoietin dalam 90 menit dan semakin tinggi ketinggiannya, serum Epo akan memuncak dalam 2 hari dan setelah itu akan menurun dalam waktu 1-2 minggu (Khuu, 2020).

Ventilasi pulmoner akan berkaitan dengan metabolisme energi di dalam tubuh yang berfungsi untuk memberikan substrat esensial (oksigen) dan membuang sisa metabolisme (karbon dioksida) dan ventilasi terpengaruh dari perubahan tekanan parsial arteri dari oksigen (PO₂) dan karbon dioksida (PCO₂). Hipoksia akut

menstimulasi peningkatan minute ventilation secara langsung yang memuncak dalam hitungan menit dan kemudian menurun ke kadar pre- hipoksia dalam waktu hitungan menit hingga jam (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).

Ketika hipoksia dipertahankan, ventilasi kemudian akan meningkat kembali dalam beberapa jam dan melewati kadar hipoksia akut dan ventilasi akan terus meningkat dalam beberapa hari. Proses ini disebut juga dengan aklimatisasi ventilasi terhadap hipoksia yang ditandai dengan turunnya kadar PCO₂ dan meningkatnya sensitivitas ventilasi hipoksia terhadap stimulus hipoksia akut. Hipoksia akut juga meningkatkan curah jantung yang diasosiasikan dengan peningkatan laju jantung. Curah jantung kemudian akan kembali normal setelah aklimatisasi walaupun laju jantung dapat tetap tinggi yang dikompensasikan dengan menurunnya volume sekuncup (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).

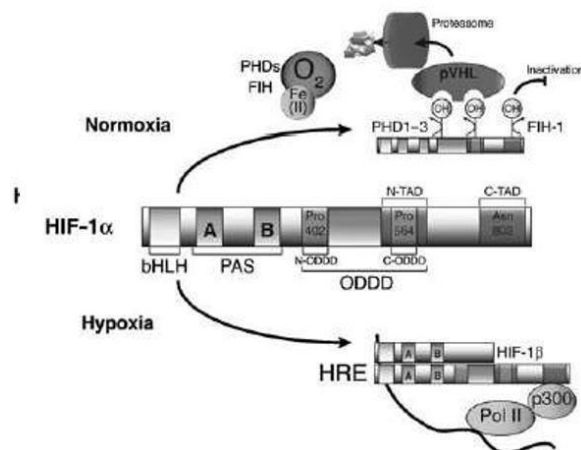
Pada manusia, terdapat 3 subunit dari HIF yaitu HIF-1 α , HIF-2 α , dan HIF-3 α . Secara struktur, subunit yang saling berhubungan memiliki *O₂-dependent degradation domain* (ODDD). Residu prolin (dua untuk HIF-1 α dan HIF-2 α serta satu untuk HIF-3 α) memiliki peran penting terhadap fungsi ODDD (Fujita et al., 2012). Keseluruhan dari isoform HIF- α dikode oleh lokus genetik yang unik dan keragaman dari isoform ini terjadi melalui promotor alternatif dan pola splicing. HIF-1 α dan HIF-2 α memiliki arsitektur domain yang mirip serta melalui regulasi proteolitik yang serupa namun ekspresi jaringan HIF-2 α lebih terbatas (Fujita et al., 2012).

Studi in vivo pada binatang serta in vitro membuktikan bahwa isoform HIF-1 α , HIF-2 α memiliki fungsi penting dalam regulasi ekspresi gen namun terdapat fungsi yang tumpang tindih di antara keduanya yang sangat bervariasi dari satu sel ke sel

lainnya. Isoform HIF-3 α belum diketahui secara pasti fungsinya namun splicing alternatif dari HIF-3 α menghasilkan protein domain inhibitor PAS yang berfungsi menghambat respons HIF dengan membentuk heterodimer inaktif secara transkripsi dengan HIF-1 α (Makino et al., 2001).

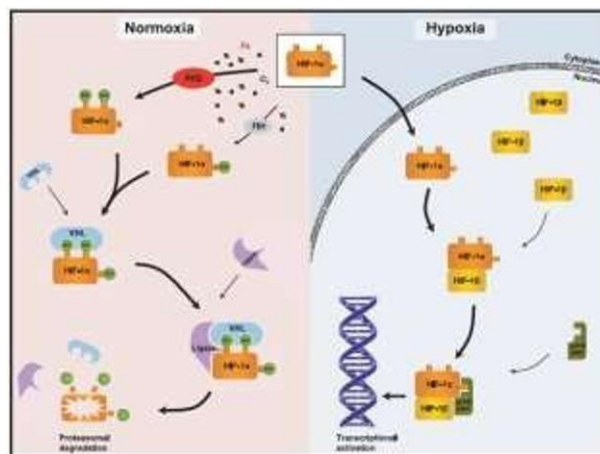
Dalam kondisi normoksia, subunit HIF-1 α memiliki waktu paruh yang sangat singkat (Cimmino et al., 2019) dan sel secara terus-menerus mensintesis dan mendegradasi protein HIF- α . Namun, dalam situasi hipoksia, degradasi dari HIF- α menjadi terhambat (Martinez et al., 2021). Reaksi enzimatik hidroksilasi dua residu prolyl (Pro402 dan Pro564) membantu interaksi antara oksigen dan subunit HIF- α di mana reaksi ini terjadi pada ODDD (Strowitzki et al, 2019). Hidroksilasi yang membutuhkan oksigen ini meregulasi interaksi dengan protein supresi tumor von Hippel-Lindau (pVHL) di mana pVHL merupakan komponen rekognisi dari kompleks ligase ubiquitin E3 yang menargetkan HIF- α untuk proteolisis melalui jalur ubiquitin-proteasom (Minervini et al., 2017).

Dalam kondisi hipoksia, *prolyl hydroxylase-domain* (PHD) tersupresi sehingga protein HIF- α tidak dihancurkan dan berakumulasi. Selanjutnya, HIF- α bertranslokasi ke nukleus dan dimerisasi dengan HIF-1 β . Heterodimeric transactivating complex HIF kemudian menempel kepada HRE pada sekuens promoter atau enhancer dari target gen (Gambar 2.5) (Weidemann A., 2008).



Gambar 2.5. Regulasi protein HIF-1 α oleh hidroksilasi prolyl dan degradasi proteasomal (Weidemann A., 2008)

Terdapat 3 jenis isoform PHD yaitu PHD1, PHD2, dan PHD3 yang merupakan anggota dari 2 - oxoglutarat dan famili dioksigenase yang bergantung dengan zat besi. Aktivitas mereka tergantung dengan oksigen sebagai ko-substrat bersama dengan zat besi, askorbat, dan 2 - oxoglutarat sebagai kofaktor obligat. Bersama dengan VHL dan HIF, terbentuklah aksis PHD-VHL - HIF sebagai regulator sentral dari homeostasis oksigen seluler (Gambar 2.6) (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).



Gambar 2.6. Aksis PHD-VHL-HIF (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008)

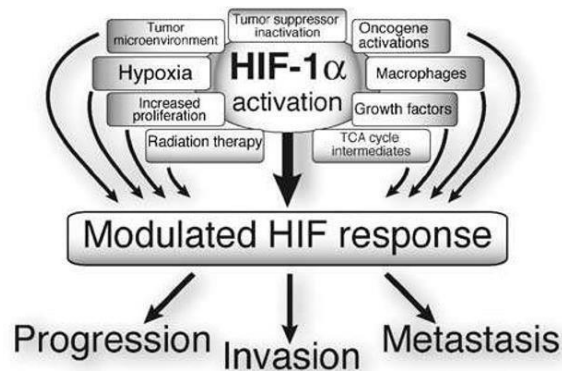
Banyak gen yang dioperasi oleh HIF-1 α diekspresikan pada kadar yang lebih tinggi pada kanker terutama faktor pertumbuhan angiogenik seperti VEGF dan enzim dari metabolisme glukosa. Metabolisme kanker sangat bergantung oleh HIF-1 α seperti peningkatan asupan glukosa ke dalam sel, produksi laktat, dan penurunan respirasi. Aktivasi HIF merupakan sifat umum dari tumor yang lebih prominen pada tumor agresif dan merupakan prediktor independen terhadap prognosis buruk pada kanker tipe tertentu (Weidemann et al., 2008).

Namun, mekanisme aktivasi HIF pada tumor kompleks karena terpengaruh oleh

lingkungan mikro yang hipoksia akibat tumor dan juga akibat inaktivasi dari gen supresi tumor seperti hilangnya fungsi pVHL. Pada sebuah studi hereditary renal cell carcinoma ditemukan adanya hubungan dengan inaktivasi fumarat hydratase (FH) siklus tricarboxylic (TCA) di mana pada siklus Krebs fumarat intermediat menghambat 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases seperti HIF hydroxylases. Setelah itu, studi menemukan defisiensi FH memang dapat meningkatkan regulasi HIF- α namun fumarat juga memiliki fungsi dalam pembentukan matriks sehingga mekanisme lebih lanjut perlu diteliti (Pollard et al., 2007).

Gen supresi tumor yang dapat memengaruhi kadar HIF-1 α termasuk p53 dan PTEN yang mensupresi operasi HIF-1 α saat hipoksia dan aktivasi gen target yang diduga melalui modulasi AKT. Lingkungan mikro tumor juga telah diimplikasikan untuk mempengaruhi stabilitas HIF-1 α di mana radiasi dapat menginduksi HIF-1 α melalui translasi mRNA HIF-1 α yang dilepaskan dari granula stres setelah oksigenasi kembali. Efek ini tergantung dengan terbentuknya radikal bebas in vivo (Weidemann et al., 2008).

Aktivasi HIF-1 α juga mempengaruhi derajat invasif dan metastasis dari tumor. Proses kompleks ini dimulai dari sel tumor yang memisahkan diri dari inti tumor, melewati membran basal, migrasi melalui ECM, invasi pembuluh darah, ekstrasvasi, dan proliferasi pada tempat yang sesuai. Pada tumor renal, hilangnya molekul adhesi antar sel E-cadherin ditemukan meningkatkan agresivitas dan derajat invasi kanker di mana HIF-1 memiliki peran penting dalam memediasi downregulation dari E-cadherin pada kondisi defisien VHL (Gambar 2.7) (Krishnamachary B, 2006).



Gambar 2.7. HIF- α pada kanker (Krishnamachary B, 2006)

2.3 Potensi HIF sebagai Biomarker dan Terapi

Peranan sentral dari HIF-1 α membuat aktivator dari HIF-1 α menjadi sebuah potensi pengobatan infeksi. Beberapa senyawa farmakologis telah diteliti untuk mengaktivasi HIF dan yang paling banyak diteliti adalah inhibitor dari prolyl hidroksilasi (Kim et al., 2006). Studi terbaru menunjukkan bahwa peranan HIF-1 mieloid pada patofisiologi sepsis sangat terpengaruh oleh waktu. Studi menemukan bahwa mencit dengan delesi HIF-1 mieloid spesifik memiliki proteksi terhadap takikardia, hipotensi, dan hipotermia akibat sepsis di fase awal namun pada fase akhir HIF-1 mieloid tidak memiliki efek pada gejala klinis (Fitzpatrick et al., 2018).

Pada *in vitro*, setelah stimulasi LPS akut, protein HIF-1 α berakumulasi dan gen target HIF-1 diekspresikan akibat peningkatan mRNA HIF-1 α . Sebaliknya, stimulasi LPS yang repetitif mengakibatkan toleransi endotoksin sehingga kadar HIF-1 α menurun pada monosit. Pada pasien dengan sepsis, monosit yang bersirkulasi pertama-tama terekspos dengan konsentrasi toksin rendah (sepsis insipien) dan kemudian kadar toksin meningkat di dalam darah atau ketika bermigrasi menuju fokus patogen dengan kadar toksin yang lebih tinggi (Schäfer et

al., 2013).

Menariknya lagi regulasi HIF-1 α pada manusia dengan sepsis belum diteliti sehingga masih tidak jelas apakah kadar mRNA HIF-1 α meningkat, menurun atau tidak berubah pada pasien dengan sepsis. Selain itu, masih tidak jelas apakah kadar konsentrasi protein HIF-1 α in vitro yang menurun berasosiasi dengan eksposur LPS yang repetitif atau karena peningkatan degradasi dan penurunan ekspresi mRNA (Schäfer et al., 2013).

Perubahan dinamis dalam ekspresi HIF pada sepsis membuat studi-studi meneliti potensi HIF sebagai biomarka sepsis walau masih sangat kontroversial. HIF-1 mRNA yang diekstraksi dari sampel darah lengkap meningkat secara signifikan pada pasien dengan syok sepsis namun tidak terdapat korelasi dengan luaran akhir pasien (Textoris et al., 2012). Namun, kadar protein dan HIF-1 mRNA leukosit menurun pada pasien sepsis dan memiliki korelasi terbalik dengan derajat penyakit (Schäfer et al., 2013).

Terdapat uji coba klinis yang menginvestigasi potensi HIF-1 sebagai biomarka novel pada syok sepsis yang masih menunggu publikasi (NCT02163473). Penggunaan HIF sebagai biomarka dapat menjadi sebuah masalah kompleks karena peranannya yang sangat luas tergantung dari tipe sel. HIF juga telah dipostulasikan dapat menjadi target terapeutik potensial untuk sepsis dan studi memfokuskan dalam menargetkan HIF secara tidak langsung. Edaravone yang merupakan radical scavenger yang kuat yang dapat menginduksi HIF-1 α yang kemudian akan menekan stres dan memproteksi jantung dari cedera miokardial sepsis dan disfungsi (He et al., 2018).

Selain itu, ditemukan juga bahwa 7-dihydroxy-8-methoxyflavone memproteksi

melawan cedera paru akut akibat sepsis melalui inhibisi akumulasi HIF-1 α . Ko-stimulasi LPS dan simvastatin menurunkan kadar HIF-1 α dan membantu memproteksi disfungsi hepar pada tahapan awal sepsis pada mencit. Studi lebih lanjut dibutuhkan menggunakan inhibitor HIF spesifik untuk memaparkan potensi jalur target terapeutik dari HIF tersebut (Fitzpatrick, 2019).

2.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan mitogen endotel yang sel spesifik *in vitro* dan sebuah pemicu angiogenik pada beberapa model mitogen *in vitro* (Shibuya, 2011). Protein VEGF pertama kali mulai dipikirkan ketika pada tahun 1939 Ide et al. mempostulasikan bahwa terdapat faktor yang menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah akibat tumor dengan basis respons neovaskularisasi yang kuat (Ide et al., 1939).

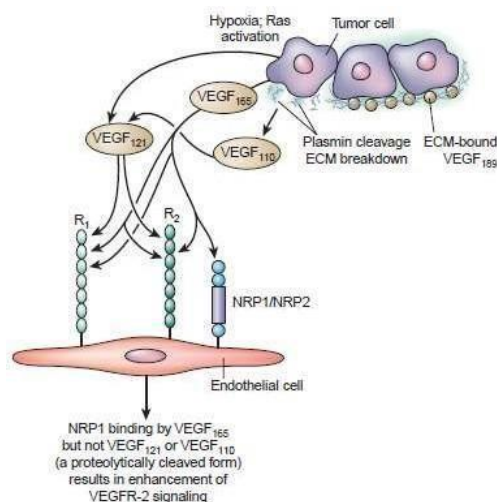
Ekspresi mRNA VEGF dioperasi oleh kadar oksigen yang rendah dan HIF-1 merupakan mediator utama dalam kondisi hipoksia (Lazarus, 2011). Mirip seperti HIF-1 α , gen supresor tumor VHL memiliki peranan penting dalam regulasi VEGF di mana aktivitas mitogenik pada sel endotel yang dihasilkan oleh sel karsinoma renal dengan mutasi VHL dapat dinetralisasi dengan antibodi terhadap VEGF (Siemester et al., 1996). Dapat disimpulkan bahwa fungsi protein VHL adalah untuk meregulasi VEGF dan gen yang dioperasi oleh hipoksia lainnya.

Beberapa faktor pertumbuhan mayor seperti faktor pertumbuhan epidermal, TGF- α , TGF- β , faktor pertumbuhan keratinosit, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) dapat meningkatkan ekspresi mRNA VEGF sehingga terdapat hipotesa bahwa pelepasan faktor-faktor tersebut secara parakrin atau autokrin bekerja sama dengan

hipoksia lokal dalam meregulasi VEGF (Neufeld et al. 1999). Sitokin inflamatori seperti IL-1 α dan IL-6 menginduksi ekspresi dari VEGF pada beberapa tipe sel termasuk fibroblas sinovial sehingga memperkuat hipotesis bahwa VEGF mungkin merupakan mediator angiogenesis dan permeabilitas dalam penyakit inflamasi (Neufeld et al. 1999).

Gen VEGF pada manusia diatur dalam 8 ekson yang dipisahkan oleh 7 *introns*. *Splicing exon* secara alternatif menghasilkan 4 generasi isoform yang berbeda yaitu VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, dan VEGF₂₀₆ yang masing-masing memiliki 121, 165, 189, dan 206 asam amino secara berurutan (Houck et al., 1991). Isoform yang predominan adalah VEGF₁₆₅ di mana isoform ini tidak memiliki residu yang dikode oleh exon 6 sedangkan VEGF₁₂₁ tidak memiliki residu yang dikode oleh exon 6 dan 7. Variasi dari hasil splice yang tidak begitu sering ditemukan dapat berupa VEGF₁₄₅ dan VEGF₁₈₃ (Houck et al., 1991).

VEGF natif merupakan glikoprotein berukuran 45 kDa homodimerik yang berikatan dengan heparin di mana VEGF₁₂₁ merupakan polipeptida dengan pH asam yang tidak berikatan dengan heparin sedangkan VEGF₁₈₉ dan VEGF₂₀₆ hampir seluruhnya berada di matriks ekstraseluler (ECM). Hilangnya domain yang berikatan dengan heparin berakibat menurunnya aktivitas mitogenik dari VEGF secara signifikan (Gambar 2.8) (Houck et al., 1991).



Gambar 2.8. Isoform VEGF dan interaksinya dengan reseptor VEGF

(Houck et al., 1991)

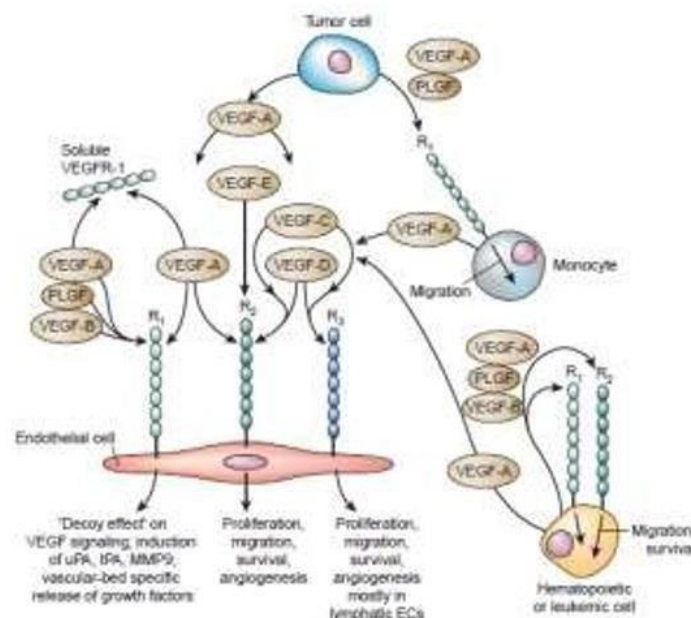
Pada perkembangan fase embrionik dan post-natal, VEGF terlibat dalam vaskulogenesis, angiogenesis dan limfangiogenesis. Delesi alel tunggal dari VEGF dan hilangnya VEGFR1 atau VEGFR2 menghasilkan kematian pada embryo akibat defisit dari vaskulogenik atau angiogenik (Karaman et al., 2022). Secara lebih spesifik VEGF telah terimplikasikan dalam beberapa fungsi lainnya seperti angiogenesis ovarium, formasi tulang endokondral, regenerasi jaringan, kelangsungan hidup sel punca hematologi, regulasi eritropoietin dan proses patologis seperti neoplasma, hematologi, okular, inflamatori dan penyakit iskemik (Gerber et al., 2002).

Data terbaru menunjukkan bahwa pembuluh darah yang sudah terbentuk di usus halus, pankreas, tiroid dan hepar membutuhkan VEGF untuk pemeliharaan pembuluh darah di mana hilangnya VEGF akan mengakibatkan regresi parsial dari jaringan kapiler yang kompleks pada organ tersebut (Olfert, 2017). Efek dari VEGF ditargetkan terhadap sel endotel vaskular. Sel-sel tipe lainnya termasuk neuron, osteoblas, sel duktus pankreas, sel progenitor retina dan megakariosit mengekspresikan VEGFR2 namun pada kadar yang lebih rendah dari sel endotel vaskular yang dapat menjelaskan spesifisitas VEGF untuk sel endotel (Wang et al, 2020).

Walaupun VEGF memiliki afinitas yang lebih tinggi dengan VEGF ($K_d \sim 10\text{--}20\text{pmol/L}$) dibandingkan dengan terhadap VEGFR2 ($K_d \sim 75\text{--}125\text{pmol/L}$), (de Vries et al., 1992) VEGFR2 lebih berperan terhadap hampir semua aktivitas VEGF

secara angiogenik termasuk permeabilitas sel endotel vaskular, proliferasi, migrasi, dan ketahanan hidup. Stimulasi VEGF dari VEGFR1 dilaporkan dapat menstimulasi migrasi monosit/makrofag dan kemotaksis, ekspresi *matrix metalloproteinase* (MMP)-9, dan hematopoiesis (Duffy et al., 2013).

Terdapat 2 tirosine kinase reseptor (RTKs) untuk VEGF yaitu VEGFR-1 dan VEGFR-2. Kedua reseptor ini memiliki 7 domain yang mirip dengan imunoglobulin pada domain ekstraseluler, regio tunggal transmembran dan sekuens tirosin kinase yang memiliki *domain kinase-insert* (Shibuya et al., 1990). Terdapat pula VEGFR-3 (fms-like-tyrosine kinase (Flt)-4) yang merupakan bagian dari famili RTKs namun bukan reseptor untuk VEGF namun berikatan dengan VEGFC dan VEGFD. Selain RTKs, VEGF juga berinteraksi dengan famili koreseptor yaitu neuropilins (Gambar 2.9) (Karkkainen et al., 2002).



Gambar 2.9. Peranan reseptor VEGF dalam beberapa tipe sel (Karkkainen et al., 2002)

2.5 Fungsi VEGF

VEGF memiliki beberapa peran dalam angiogenesis fisiologik. Dalam perkembangan embrionik dan awal post-natal di mana inaktivasi dari satu alel VEGF pada mencit menghasilkan kematian embrio pada hari ke-11 dan ke-14. Kematian ini diakibatkan beberapa anomali perkembangan, vaskularisasi defektif pada beberapa organ dan penurunan bermakna dari sel darah merah yang bernukleasi pada kantung kuning (Ferrara et al., 2013). Inhibisi parsial dari VEGF berakibat pada peningkatan mortalitas, stunting, dan perkembangan organ yang terganggu pada masa awal post-natal. Selain itu, perkembangan glomerulus yang defektif juga terjadi pada neonatus yang tidak memiliki VEGF (Eremina et al., 2003).

Peranan VEGF juga terlihat dalam perkembangan skeletal dan formasi tulang endokondral di mana VEGF mRNA diekspresikan oleh kondrosit hipertrofik pada lempeng perkembangan epifiseal yang berarti bahwa VEGF dibutuhkan untuk perkembangan dan invasi kartilago oleh pembuluh darah metafiseal (Ferrara et al., 2013).

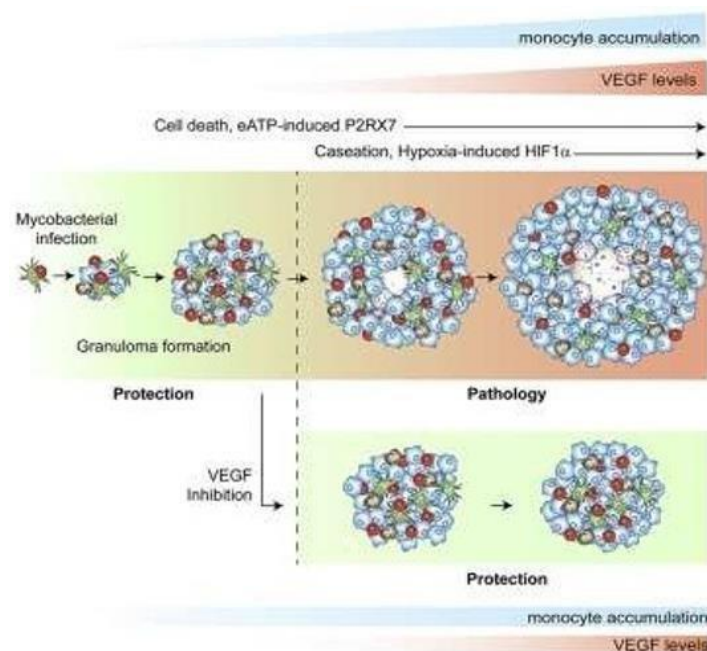
2.6 Peranan VEGF dalam Infeksi

Peranan VEGF terhadap infeksi dimediasi melalui pengaruh VEGF terhadap inflamasi. Vasodilatasi yang terjadi saat inflamasi dipengaruhi oleh bradikinin, histamin, dan VEGF yang dilepaskan pada saat terjadi kerusakan jaringan dan nitric oxide yang dihasilkan oleh endotelium vaskular. Histamin dan VEGF mengakibatkan kebocoran pembuluh darah pada saat inflamasi sehingga terjadi eksudasi plasma. Peningkatan permeabilitas vaskular meningkatkan massa jenis sel di dalam pembuluh darah dan tekanan interstitial di luar pembuluh darah di mana tekanan ini dapat meningkatkan kejadian trombotik sehingga aliran darah menjadi

stasis. Ketika stasis pada pembuluh darah terjadi, sel imun alami dapat berekstravasasi ke jaringan (Ramakrishnan et al., 2014).

Vascular endothelial growth factor, CXCL12, *endothelial monocyte activating peptide-II* (EMAPII) dan Angiopoietin-2 (Ang2) membantu mediasi ekstravasasi dari monosit dalam keadaan hipoksia. Setelah itu, *human monocyte derived macrophages* (hMDM) beradaptasi terhadap lingkungan hipoksia dan dengan cepat mengekspresikan gen seperti FGF, VEGFR, dan sitokin pro-inflamasi yang dapat dioperasi hipoksia seperti IL-1 beta, TNF- α , dan protein fase akut seperti IL-6 (Bosco et al., 2008).

Pada infeksi kronis seperti tuberculosis, peranan VEGF meningkatkan respons jaringan sehingga terbentuk jaringan granuloma yang berlebihan. Penghambatan pada VEGF memberikan respons perbaikan jaringan, perlindungan dan meningkatkan survival sel terinfeksi. (Gambar 2.10) (Harding et al., 2019)



Gambar 2.10. Respons Penghambatan jalur VEGF pada infeksi tuberculosis
(Harding et al., 2019)

Nuclear factor-kappa b (NFκB) merupakan faktor transkripsi sentral untuk memediasi respons inflamasi yang terlibat dalam ekspresi MCP-1 di mana VEGF akan menginduksi MCP-1 melalui jalur NFκB (Takenoshita et al., 2024). Sitokin inflamasi seperti IL-1β dioperasikan oleh NFκB-COX2 dan dapat menstabilisasi HIF-1 sebagai akibat dari operasi oleh VEGF (Ramakrishnan et al., 2014).

VEGF di dalam infeksi dapat diaktifkan lewat jalur Prostaglandin E2 (PGE2). (Xu dan Croix, 2014) (Cheng, et al. 1998) Pada jaringan terinfeksi PGE2 endogen akan dihasilkan dan merangsang VEGF dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Cheng, et al. 1998). PGE2 mengaktivasi ERK2 dan JNK, kemudian merangsang VEGF dari endotel untuk respons angiogenesis dan permeabilitas vaskular (Pai, et al 2001).

2.7 Vitamin E

2.7.1 Sejarah dan Kimia

Pada tahun 1922 Evans dan Bishop menyatakan bahwa tikus betina membutuhkan bahan makanan penting untuk mempertahankan kehamilan. Kekurangan zat tersebut dapat menyebabkan kematian dan resorpsi janin, sedangkan pada tikus jantan dapat menyebabkan sterilitas. Karena itu dahulu vitamin E disebut juga vitamin anti sterilitas, tetapi kemudian ternyata bahwa defisiensi vitamin E menimbulkan efek yang lebih luas. Vitamin E antara lain didapatkan pada telur, susu, daging, buah-buahan, kacang-kacangan dan sayur-sayuran misalnya selada dan bayam. Terdapat 8 jenis tokoferol alam yang mempunyai aktivitas vitamin E. RRR- α -tokoferol (dahulu disebut d- α -tokoferol) merupakan bentuk yang paling penting karena merupakan 90% dari tokoferol yang berasal dari hewan dengan

aktivitas biologik yang paling besar. Bentuk d lebih aktif dari bentuk 1. Senyawa sintetik merupakan d, 1 alfa tokoferol. Struktur alfa tokoferol hampir sama dengan koenzim Q yang terdapat di dalam jaringan tubuh. Tokoferol akan rusak bila terkena udara atau sinar ultraviolet. Vitamin E dipasarkan sebagai campuran tokoferol. (Deswoto et al., 2019)

2.7.2 Fungsi Fisiologik dan Farmakodinamik

Vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas. Vitamin E melindungi asam lemak tidak jenuh pada membran fosfolipid. Radikan peroksil bereaksi 1000 kali lebih cepat dengan vitamin E daripada dengan asam lemak tidak jenuh, dan membentuk radikal tokoferoksil. Selanjutnya radikal tokoferoksil berinteraksi dengan lain antioksidan, seperti vitamin C, yang akan membentuk kembali tokoferol. Vitamin E misalnya penting untuk melindungi membran sel darah merah yang kaya akan asam lemak tidak jenuh ganda dari kerusakan akibat oksidasi. Selain itu vitamin E melindungi lipoprotein dalam sirkulasi LDL teroksidasi yang ternyata memegang peranan penting dalam menyebabkan aterosklerosis. LDL teroksidasi lebih mudah diambil oleh makrofag dibandingkan LDL yang tidak teroksidasi, selanjutnya membentuk sel busa (foam cells) yang berpengaruh buruk pada sel endotel, dan mungkin dapat menyebabkan vasokonstriksi. Vitamin E dosis besar (1600 mg/hari) melindungi LDL dari oksidasi. Meskipun masih kontraindikatif, beberapa hasil studi epidemiologik mendapatkan bahwa vitamin E dapat memproteksi penyakit kardiovaskular, namun mekanisme kerjanya tidak jelas. Di samping efek antioksidannya, efek langsung terhadap endotel pembuluh darah, sel otot polos, atau pembekuan darah diduga ikut berperan. Vitamin E mengatur proliferasi sel otot polos pembuluh darah, menyebabkan vasodilatasi dan menghambat baik

aktivasi trombosit maupun adhesi leukosit. Vitamin E juga melindungi Beta-Karoten dari oksidasi. Beberapa zat yang terdapat pada makanan misalnya selenium, asam amino yang mengandung sulfur, koenzim Q dapat menggantikan vitamin E. (Winarsi et al., 2007)

2.7.3 Defisiensi Vitamin E

Vitamin E banyak terdapat pada makanan, maka defisiensi vitamin E biasanya sering disebabkan oleh gangguan absorpsi misalnya steatore, obstruksi biliaris dan penyakit pankreas. Gejala defisiensi vitamin E antara lain anemia hemolitik, degenerasi retina, kelemahan otot, miopatia, ataksia dan gangguan neurologis. Gejala neurologis pada pasien malabsorpsi antara lain menurunnya refleks, gangguan sikap tubuh, oftalmoplegia. Gejala-gejala tersebut mirip dengan gejala akibat distrofi akson pada tikus yang mengalami defisiensi vitamin E. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa vitamin E dosis farmakologis dapat mencegah progresifitas atau menyebabkan perbaikan gangguan saraf tersebut. Bayi prematur dengan makanan yang kaya akan asam lemak tidak jenuh ganda dan kurang akan vitamin E mengalami anemia hemolitik, lesi kulit dan edema. (Chung et al., 2000).

2.7.4 Hipervitaminosis Vitamin E

Pemakaian vitamin E dosis besar untuk waktu lama dapat menyebabkan kelemahan otot, gangguan reproduksi dan gangguan saluran cerna. Gejala-gejala ini hilang dalam beberapa minggu setelah asupan yang berlebihan dihentikan. (Chung et al., 2000)

2.7.5 Kebutuhan Sehari

Pada orang Indonesia, kebutuhan ini belum diketahui. Diperkirakan asupan 10-30

mg vitamin E cukup untuk mempertahankan kadar normal di dalam darah. Kebutuhan vitamin E umumnya sudah dipenuhi oleh makanan sehari-hari. Diet yang kaya akan asam lemak yang tidak jenuh akan meningkatkan kebutuhan vitamin E per hari. Meskipun makanan yang mengandung asam lemak tidak jenuh misalnya, margarin, minyak sayur kaya akan vitamin E. Diet yang mengandung antioksidan, selenium dan asam amino yang mengandung sulfur akan mengurangi kebutuhan vitamin E. Kebutuhan vitamin E mungkin meningkat bila lingkungan kaya oksigen atau pada pasien yang mendapat terapi sediaan besi atau mendapat dosis besar hormon tiroid. Lesi kulit, perubahan hematologi dan edema terjadi pada bayi prematur yang mendapat makanan/susu formula yang kaya akan asam lemak tak jenuh dan rendah vitamin E; defisiensi vitamin E dapat diperberat oleh suplementasi besi dosis besar. Penyembuhan terjadi bila diberikan alfa-tokoferol 25-30 mg/hari atau pengurangan suplementasi besi dan asam lemak tak jenuh. (Winarsi et al., 2007)

2.7.6 Farmakokinetik

Vitamin E diabsorpsi baik dalam saluran cerna. Dalam darah terutama terikat dengan beta- lipoprotein dan didistribusikan ke semua jaringan. Kadar plasma sangat bervariasi di antara individu normal, dan berfluktuasi tergantung kadar lipid. Rasio vitamin E terhadap lipid total dalam plasma digunakan untuk memperkirakan status vitamin E. Nilai dibawah 0,8 mg/g menunjukkan keadaan defisiensi. Pada umumnya kadar tokoferol plasma tampaknya lebih berhubungan dengan asupan gangguan absorpsi lemak pada usus halus daripada pada ada tidaknya penyakit. Vitamin E sukar melalui sawar uri, sehingga bayi yang baru lahir hanya mempunyai kadar tokoferol plasma kurang lebih $\frac{1}{3}$ kadar tokoferol plasma ibunya, tetapi ASI mengandung alfa-tokoferol yang cukup untuk bayi. Gudang vitamin E di jaringan

tubuh dapat merupakan sumber vitamin E untuk waktu lama. Kebanyakan vitamin E diekskresi secara lambat ke dalam empedu, sedangkan sisanya diekskresi melalui urin sebagai glukoronida dari asam tokoferonat atau metabolit lain. (Winarsi et al., 2007)

2.7.7 Indikasi dan Dosis

Penggunaan vitamin E hanya diindikasikan pada keadaan defisiensi yang dapat terlihat dari kadar serum yang rendah dan atau peningkatan fragilitas eritrosit terhadap hidrogen peroksida. Hal ini dapat terjadi pada bayi prematur, pada pasien-pasien dengan sindrom malabsorpsi dan steatore, dan penyakit dengan gangguan absorpsi lemak. Penggunaan vitamin E untuk penyakit-penyakit yang mirip dengan keadaan yang timbul sebagai akibat defisiensi vitamin E pada hewan, misalnya distrofia otot, abortus habitualis, sterilitas dan toksemia gravidarum, ternyata hasilnya mengecewakan. Dari penelitian epidemiologik dan beberapa uji klinik disimpulkan bahwa peran suplementasi vitamin E jangka panjang untuk memproteksi risiko infark miokard dan kematian karena penyakit jantung koroner masih diragukan/kontradiktif. (Deswoto et al., 2019)

Demikian pula manfaat vitamin E pada kanker manusia tidak jelas. Makanan yang mengandung jumlah besar vitamin anti oksidan A,C dan E disertai dengan berkurangnya risiko berbagai keganasan. Akan tetapi dari studi epidemiologi yang besar didapatkan meskipun asupan vitamin E sangat besar tidak melindungi wanita dari kanker payudara. (Chung et al., 2000)

Beberapa penelitian melaporkan adanya respons yang baik terhadap alfa tokoferol pada anemia megaloblastik makrositer yang terdapat pada adak PCM, anemia hemolitik pada bayi prematur, anemia hemolitik pada sindrom akantositosis dan anemia hemolitik pada sindrom malabsorpsi yang ditandai oleh steatore. Untuk

anemia hemolitik pada bayi prematur, digunakan dosis 200-800 mc alfa-tokoferol asetat/hari, dan untuk anemia hemolitik pada sindrom akantosisitis digunakan dosis 100 mg/hari alfa tokoferol asetat secara parenteral. (Deswoto et al., 2019)

Vitamin E terdapat dalam bentuk d atau campuran d dan 1 isomer dari tokoferol, alfa- tokoferol asetat, alfa-tokoferol suksinat. Sediaan oral antara lain dalam bentuk tablet dan kapsul dan untuk suntikan tersedia larutan. Selain itu, vitamin E juga terdapat dalam sediaan campuran dengan vitamin lain. (Chung et al., 2000)

Untuk memperbaiki keadaan defisiensi umumnya dicapai dengan vitamin E dosis besar, 50- 200 mg/hari, diberikan secara oral. Penyesuaian dosis tergantung rasio vitamin E terhadap lipid total. Bila secara oral tidak memberikan hasil dapat diberikan d, 1-alfa-tokoferol dengan dosis 1-2 mg/kgBB per hari secara IM. (Chung et al., 2000)

2.7.8 Efek Samping Vitamin E

Pemberian vitamin E dalam dosis fisiologis pada umumnya tidak menimbulkan efek samping. Namun dapat terjadi beberapa gangguan gastrointestinal seperti mual, rasa penuh di epigastrik, sendawa berlebihan, dan diare ringan. Pada rute intra peritoneal, pemberian vitamin E dapat menimbulkan reaksi inflamasi ringan atau adhesi mekanik akibat trauma injeksi (NIHODS, 2021).

2.8 Olive Oil

Olive oil merupakan sebuah minyak yang didapatkan dari ekstrak buah *Olea europaea*, yang dijadikan bagian dari diet manusia. *Olive oil* kemudian diklasifikasi menjadi berbagai tipe, seperti *Virgin Olive Oil* (VOO), *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO), *Olive oil* olahan dan *Olive oil* biasa. Kandungan *Olive oil* umumnya terdiri dari 80% asam lemak tidak jenuh ikatan satu (MUFA), 3-22% asam lemak tidak jenuh, dan 8-26% asam lemak jenuh (Bilal et al., 2021). *Olive oil* (Otex®)

merupakan *olive oil* yang sudah terstandarisasi yang digunakan dalam penelitian (Santis et al., 2019). Selain itu, *Olive oil* juga mengandung vitamin E berkisar antara 12-20 mg per 100 gram minyak. Sehingga, setiap 1 sendok makan (12.5 gram minyak) terkandung 1.6-2.7 mg vitamin E EFSA 18.5 mg/ 100 g.

Efek positif yang diberikan *virgin oil* cenderung akibat adanya MUFA, terutama asam oleat, yang menunjukkan banyak sekali sifat protektif. MUFA memiliki kemampuan untuk memodulasi respon imun tubuh, dan dapat meningkatkan regulasi imun tubuh manusia. polifenol dari *Olive oil* ditemukan memiliki efek protektif seperti anti-atherogenic, antitumor, antiinflamasi, modulasi imun dan anti viral yang sebagian besar merupakan dampak dari efek antioksidan produk *Olive oil*. Polyphenol pada *olive oil* dipostulasikan dapat menghambat aktivitas invitro leucocyte 5 lipoxygenase, dan menghambat formasi dari ROS pada sel (Jawhara, 2024). Kandungan polyphenol ini umumnya hanya ditemukan pada *virgin olive oil*, karena akan hilang bila sudah diproses.

Menurut laporan, polifenol EVOO dapat mencegah penurunan kognitif yang disebabkan oleh penuaan dan penyakit neurodegeneratif karena dapat melindungi DNA dari stres oksidatif, mencegah kerusakan mitokondria, dan mengurangi peroksidasi lipid dengan menangkap radikal bebas, yang semuanya menjaga stabilitas antioksidan endogen. Selain itu, polifenol EVOO meningkatkan pelepasan enzim antioksidan pada aktivasi Nrf-2 di tingkat hati (Alarcon et al., 2018). Karena Nrf2 dianggap sebagai pengatur utama homeostasis redoks, mediator proinflamasi seperti sitokin, COX-2, dan iNOS dihambat ketika diaktifkan (Ahmed et al., 2016). Karena polifenol EVOO memiliki kemampuan untuk memutus rantai radikal, menangkap radikal bebas, dan mengurangi pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen reaktif (RNS), mereka membatasi peradangan

dengan mengurangi ekspresi dan aktivitas faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1 (Ortega et al., 2018).

Pemberian *olive oil* secara oral umumnya memiliki efek samping minimal. Beberapa efek samping yang dapat muncul yaitu, feses lunak, mual, kenaikan berat badan, atau rasa tidak nyaman pada mulut. Pada pemberian dengan rute intra peritoneal, efek samping yang dapat muncul berupa iritasi atau inflamasi lokal peritoneum, pembentukan adhesi mekanik, peritonitis steril maupun reaksi imun non-spesifik (Ferré et al., 2025).

2.9 Hipoksia

Hipoksia didefinisikan sebagai ambang batas di mana konsentrasi oksigen merupakan faktor yang dibatasi untuk melakukan proses seluler secara normal; ini karena oksigen adalah faktor penting yang diperlukan untuk melakukan metabolisme pada tubuh, termasuk produksi ATP. Dengan demikian, sediaan oksigen yang tidak cukup akan mengubah status metabolisme tubuh serta fungsi penting lainnya dalam sel yang terdampak oleh hipoksia, sehingga membuat hipoksia sebagai paradigma respons yang melibatkan seluruh tubuh organisme. (Bhutta et al., 2022)

Atmosfer bumi terdiri dari 20,9% oksigen, tetapi jaringan organ manusia biasanya mengalami konsentrasi oksigen yang jauh lebih rendah, biasanya berkisar antara 2%-9%. Tingkat oksigen ini masih mewakili lingkungan yang sesuai untuk sel bahkan ketika sel sudah mendekati batas ambang hipoksia. Dengan demikian, kadar oksigen perlu dipantau secara ketat dan mekanisme intraseluler yang terlibat dalam homeostasis O₂ terlibat dalam banyak penyakit modern seperti serangan jantung,

kanker, retinopati diabetik, dan arthritis rheumatoid. Kondisi yang menyebabkan hipoksia sementara meliputi olahraga, sepsis atau pada sel yang mengalami trauma, sedangkan pada hipoksia sistemik yang kronis dapat diamati selama paparan elevasi yang tinggi atau di zona jaringan organ tubuh yang kurang teroksigenasi, seperti sumsum ginjal. (Bhutta et al., 2022)

Karena relevansi klinisnya dalam terapi radiasi, hipoksia tumor telah menjadi salah satu hipoksia yang paling banyak dipelajari secara mikroseluler. Beberapa karakteristik khas dari sel-sel karsinogenik seperti proliferasi sel yang dipercepat dan metabolisme yang abnormal menyebabkan ketidakseimbangan antara sediaan dan konsumsi oksigen, yang mengarah ke hipoksia jaringan organ, dengan perubahan drastis dalam fungsi seluler. Karena ini adalah proses dinamis yang dihasilkan dari perubahan tingkat pengiriman atau konsumsi oksigen, istilah "siklus hipoksia" telah dinamakan. Perjalanan dari siklus hipoksia itu merupakan proses yang kompleks, melibatkan waktu siklus antara beberapa siklus per jam hingga berjam-jam per hari. Hipoksia intermiten ini menginduksi serangkaian respons seluler, molekuler dan patofisiologis, yang menghasilkan adaptasi dan kelangsungan hidup atau luka dan kematian seluler. Hal ini karena proses hipoksia ini membuat stres oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid, meningkatkan produksi protein yang merespons terhadap stres, dan apoptosis. (Sarkar et al., 2017)

Ketika metabolisme jaringan melebihi sediaan bahan untuk melakukan proses metabolik, seperti dalam kebanyakan kasus tumor, hipoksia respon untuk membuat serangkaian perubahan dalam ekspresi protein untuk mempromosikan faktor pelindung terhadap kematian seluler, dengan kemungkinan lebih besar untuk menghasilkan metastasis tumor. Asosiasi ini dijelaskan dengan peningkatan ekspresi gen yang terkait dengan metastasis seperti CXCR4, uPAR, VEGF dan osteopontin pada

tumor di tikus terpapar oleh siklus hipoksik ini. Studi lain menetapkan bahwa siklus hipoksia meningkatkan stres oksidatif pada tumor mammae pada tikus yang memiliki gen transgenik MMTV-PyMT, menghasilkan kerusakan DNA dan peroksidasi lipid. Selain itu, ada juga perbedaan dalam efisiensi dari metastasis antara hipoksia siklik dan hipoksia kronis, yang dapat disebabkan oleh perubahan substansial dalam ekspresi genetik yang bergantung pada HIF-1. (Sarkar et al., 2017)

2.10 Stress Oksidatif

Stres oksidatif (yang timbul baik dari rantai transpor elektron mitokondria atau stimulasi sumber enzimatik yang berlebihan) menghasilkan proses yang dapat merusak struktur sel, termasuk lipid, membran, protein dan DNA. Sebaliknya, efek menguntungkan dari senyawa yang sangat reaktif yang dihasilkan [misal O_2 , dan oksida nitrat (NO)] terjadi pada konsentrasi yang rendah/sedang dan melibatkan peran fisiologis dalam respons seluler terhadap anoksia, seperti misalnya dalam pertahanan melawan agen infeksi, jalur pensinyalan seluler dan operasi respon mitogenik. Berbagai tindakan yang dimediasi ROS sebenarnya melindungi sel dari stres oksidatif yang dioperasi oleh ROS dan membangun kembali atau mempertahankan "keseimbangan redoks," juga disebut "homeostasis redoks." Misalnya, semakin banyak bukti menunjukkan bahwa ROS intraseluler bertindak sebagai pembawa pesan sinyal yang sekunder dalam kaskade pensinyalan intraseluler, yang menginduksi dan mempertahankan respons fisiologis terhadap hipoksia dan peradangan. Ekspresi gen yang bergantung pada oksigen tampaknya memodulasi respons inflamasi terhadap hipoksia jika terkoordinasi dengan baik, dengan keterlibatan faktor transkripsi HIF dan faktor inti kB (NF- κ B). (Pizzino et

al., 2017)

Sejak tahun 1950-an, hipoksia telah dipahami sebagai faktor membatasi efektivitas terapi radiasi, yang telah sebagian dijelaskan oleh berkurangnya pembentukan spesies oksigen pada hipoksia meskipun mekanisme resistensi lainnya terhadap kematian sel yang dioperasi terapi tentu saja terlibat. Bukti terkini menunjukkan bahwa ROS dan spesies reaktif nitrogen tidak hanya dihasilkan dalam kondisi peningkatan oksigen hiperoksia, tetapi juga dari hipoksia. Mitokondria terkena intermiten hipoksia, dan hiperkapnia membawakan peningkatan produksi superoksida di hadapan aktivitas pernapasan yang menurun, menunjukkan bahwa ROS diproduksi oleh perubahan aktivitas rantai transpor elektron yang disebabkan oleh paparan kombinasi intermiten hipoksia dan hiperkapnia. Ini akan berkorelasi dengan stabilisasi HIF-1 α in vivo serta in vitro. (Pizzino et al., 2017)

PHDs adalah enzim yang sangat penting mengenai regulasi mekanisme hipoksia dan stres oksidatif yang bergantung pada HIF-1 α . PHD merasakan ketegangan oksigen intraseluler dan memberikan sinyal ke HIF untuk menginduksi proses adaptif terhadap hipoksia seperti angiogenesis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mekanisme kontrol mereka terdiri dari hidroksilasi HIF-1 α , yang menginduksi ubiquitination dan memberi sinyal HIF-1 α untuk degradasinya melalui proteasome. Juga telah dilaporkan bahwa PHD2 menekan aktivitas transkripsi N-terminal HIF-1 α . Hal ini menandakan bahwa PHD juga dapat beroperasi sebagai supresi kadar HIF dalam hipoksia dan memperbaiki aktivitas kerja HIF dengan mencegah pengaktifan gen yang berlebihan. Karena PHD menghidroksilasi asam prolyl amino yang berbeda di HIF, beberapa mungkin terletak di pusat kontrol HIF-1 α , di mana hanya beberapa dari mereka yang terkait secara khusus dengan respons terhadap perubahan tekanan oksigen, atau hanya

beberapa dari mereka yang lebih sensitif terhadap sinyal-sinyal yang menghasilkan beberapa perubahan struktural yang minimal di HIF-1 α , tetapi akan mempengaruhi kapasitas pengikatan DNA-nya, yang dapat menunjukkan bahwa operasi transkripsi yang diatur oleh ikatan struktural spesifik di mana situs yang aktif mungkin terpengaruh. Demikian juga, itu akan menunjukkan bahwa asam prolyl amino tertentu yang akan dihidroksilasi untuk memungkinkan ubiquitination oleh pVHL dan degradasi selanjutnya. Selain itu, harus dipertimbangkan bahwa ada faktor lain yang mengatur ekspresi PHD, seperti faktor pertumbuhan dan faktor hormon. Demikian pula, molekul lain terlibat dalam regulasi degradasi senyawa HIF- 1 α , seperti reseptor untuk activated c kinase. (RACK1). Ekspresi berlebihan RACK1 menyebabkan peningkatan degradasi HIF-1 α secara independen dari O₂, prolin hidroksilasi atau mengikat pVHL. RACK1 bersaing dengan HSP90, pendamping molekuler yang bertanggung jawab atas stabilisasi HIF-1 α dalam lingkungan hipoksia melalui pengikatan residu 81-200 dalam HIF-1 α , terdiri dari PAS-A domain. (Burton et al., 2011)

2.11 HIF-1 α dan ROS

HIF-1 dibentuk oleh dua subunit: HIF-1 α dan HIF-1 β yang diidentifikasi sebagai protein yang mengandung dasar helix-buckle-helix dan domain Per/ARNT/Sim (PAS), yang bertanggung jawab atas operasi eritropoietin dalam kondisi hipoksia. Di bawah kadar oksigen berkurang, kedua protein ini mengalami heterodimerisasi dalam nukleus dan menginduksi transkripsi gen yang terlibat dalam angiogenesis, adaptasi metabolik dan hipoksia serta resistensi terhadap stres oksidatif dan meningkatkan sifat yang invasif. Di antara berbagai rute pengaturan HIF-1, yang paling penting adalah degradasi yang dimediasi oleh PHD, yang menghidroksilasi residu prolin dalam domain degradasi yang bergantung pada oksigen melalui

proteosom. Dibawah kondisi oksigen normal, HIF- 1a terdegradasi; sedangkan di bawah kondisi hipoksia, PHD berhenti berfungsi secara normal, karena mereka membutuhkan oksigen untuk hidroksilasi, menyebabkan kadar HIF-1 α meningkat, dan heterodimerisasi dengan HIF-1b serta memasuki nukleus sel dimana tempat mengikat elemen respons hipoksia (HRE) di daerah promotor beberapa gen terjadi.

Karena setiap atom oksigen mengandung dua elektron bebas tidak berpasangan pada lapisan luar, reduksi molekul O₂ ke H₂O membutuhkan empat elektron. Donasi yang berurutan dari elektron ke oksigen selama proses ini dapat menghasilkan ROS sebagai produk samping, dan "penguras elektron" dapat juga berkontribusi pada pembentukan ROS. Donasi dari satu elektron ke O₂ menghasilkan pembentukan radikal superoksida (O₂[•]). Sumbangan elektron kedua menghasilkan peroksida, yang kemudian mengalami protonasi untuk menghasilkan hidrogen peroksida (H₂O₂). Donasi elektron ketiga, seperti pada reaksi Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ -> Fe³⁺ + •OH + OH⁻), menghasilkan produksi radikal yang sangat reaktif terhadap hidroksil (•OH). Akhirnya, sumbangan elektron keempat menghasilkan H₂O. Singlet oksigen (O₂¹), sebuah bentuk reaktif dari oksigen molekuler dengan waktu paruh yang pendek, di mana elektron terluar dinaikkan ke keadaan energi yang sangat tinggi, dapat dibentuk oleh berbagai mekanisme termasuk reaksi Haber-Weiss (H₂O₂ + O₂[•] ↔ •OH + OH⁻ + ¹O₂). Superoksida (O₂[•]) serta hidrogen peroksida (H₂O₂) memenuhi peran modulasi aktivitas HIF-1. Peran ini dilakukan pada dua sikap yang berbeda. Dalam satu kasus, NADPH oksidase (O₂ + 2e⁻ → O₂[•]) bertanggung jawab untuk memproduksi ROS, yang di bawah kondisi normoksia akan menginduksi degradasi HIF-1 α . (Zheng et al., 2022)

Situasi kedua menunjukkan bahwa produksi mitokondria ROS (cyt c1 O₂ → H₂O₂) di bawah kondisi hipoksia akan menginduksi stabilisasi HIF-1 α . Genetik dan

penghambatan farmakologis transport elektron mitokondria mencegah pembentukan ROS dan mengurangi operasi hipoksia HIF, menunjukkan bahwa ROS mitokondria memodifikasi respon PHD terhadap hipoksia. Selain itu, oksidasi Fe (II) dapat secara positif memodulasi regulasi transkripsi HIF-1 α dan meningkatkan kadar proteinnya. Ada kemungkinan bahwa hipoksia menyebabkan peningkatan ROS dari sumber yang berbeda seperti seperti NADPH oksidase, transpor elektron mitokondria, dan oksidase dan eNOS. Beberapa sumber H₂O₂ dalam hipoksia dan interaksinya dengan stabilisasi HIF-1 α masih belum ditentukan. (Movagh et al., 2015)

Jumlah ROS yang moderat, terutama O₂ dan H₂O₂, akan mengaktifkan kaskade sinyal yang memediasi respons terhadap beragam faktor fisik dan kimia. Contoh yang bagus dari stres fisik yang berhubungan dengan hipoksia adalah radiasi. Telah diamati bahwa paru-paru pasti terkena radiasi selama pengobatan multipel di daerah toraks. Hipoperfusi dini yang disebabkan oleh perubahan vaskular yang dioperasi oleh radiasi dan peningkatan konsumsi oksigen, sebagai konsekuensi dari peningkatan metabolisme seluler, telah dikaitkan dengan pembentukan hipoksia pada jaringan, yang memperburuk kerusakan organ. Pada tingkat molekul, dipercayai bahwa oksidatif stres yang kronis, sebuah mediator di mana radiasi menstabilkan HIF-1 α , dapat dikaitkan dengan peningkatan ekspresi HIF-1 α pada paru-paru yang terpapar oleh radiasi. (Movagh et al., 2015)

Mekanisme yang bermacam-macam telah digunakan untuk menjelaskan bagaimana radiasi menyebabkan perkembangan hipoksia pada jaringan normal. Semua mekanisme memiliki poin yang sama: operasi HIF-1 α melalui jalur yang tidak hipoksik terinduksi oleh radiasi atau jalur hipoksik oleh HIF-1 α . Pada aktivasi pensinyalan HIF-1 α yang tidak dalam kondisi hipoksia, radikal bebas secara

langsung atau tidak langsung mengatur stabilisasi, translokasi dan aktivasi HIF-1 melalui sitokin dalam mekanisme yang bergantung pada ROS. Mekanisme kedua dari stabilisasi HIF-1 α melibatkan efek reoksigenasi pada struktur sel granula yang mengalami stres, yaitu pada kompleks mRNA-protein terbentuk dalam sel selama periode stres dan berusaha untuk menghindari stres untuk menggunakan energi dalam proses transduksi protein. Pembentukan granula stres bertepatan dengan hipoksia secara in vivo dan in vitro, yang dipecah selama reoksigenasi yang diatur oleh transkripsi HIF-1. Mekanisme stabilisasi ketiga HIF-1 α bertepatan dengan infiltrasi makrofag di sisi tumor dengan produksi NO, di mana spesifik target NO adalah residu sistein dalam oksigen-tergantung domain HIF-1. Namun, jika ekspresi HIF-1 α dioperasi oleh radiasi pada jaringan paru merupakan konsekuensi dari hipoksia jaringan atau akibat stres oksidatif atau keduanya belum ditentukan. (Movagh et al., 2015)

Gen yang diatur HIF-1 termasuk di antara yang dipertahankan dalam granula stres, dan begitu mereka pecah, dalam beberapa jam diterjemahkan menjadi protein. Mengingat bukti peningkatan oksidatif stres karena siklus hipoksia tumor, hal itu diharapkan bahwa pembentukan dan pemecahan granula stres terjadi sebagai respons terhadap siklus hipoksia. Kelompok gen lainnya yang diatur oleh HIF-1 mengkompensasi efek metabolik pada tingkat oksigen yang rendah. Ekspresi transporter glukosa dan enzim glikolat yang meningkat di bawah kondisi hipoksia memungkinkan generasi ATP secara oksigen-independen. Ketika kadar oksigen turun bawah ke sebuah titik kritis, oksidatif fosforilasi dan transpor elektron mitokondria akan berhenti, dan produksi energi bebas oksigen dioperasi melalui glikolisis. Dalam rute glikolat, empat molekul ATP diproduksi ketika satu molekul glukosa dimetabolisme menjadi dua molekul piruvat dengan dua molekul ATP

yang dikonsumsi selama proses ini; ini meninggalkan produksi bersih sebesar dua ATP. Dibandingkan dengan kondisi aerobik dimana piruvat dioksidasi dalam siklus Krebs dan produksi bersihnya adalah 31 molekul ATP, anaerob glikolisis jauh kurang efisien. Hipoksia mempengaruhi banyak jalur transkripsi lainnya, seperti yang dimediasi oleh faktor transkripsi AP-1, ets-1, fos dan jun, NF-kB dan p53. Dengan demikian, ada kemungkinan bahwa berbagai respons seluler terhadap hipoksia dimediasi oleh HIF- independen mekanisme. (Zheng et al., 2022)

HIF-2 dan HIF-3 adalah protein yang sangat homolog dengan ARNT, dan ketiganya terlibat dalam pembentukan dimer dengan subunit HIF- α yang berbeda. HIF-1 α memiliki dua homolog yang terkait erat: HIF-2 α dan HIF-3 α . HIF-2 α (juga dikenal sebagai protein endotel dari domain PAS atau EPAS1) identik dengan HIF-1 α , dioperasi oleh hipoksia dan berikatan dengan HIF-1 β untuk mengaktifkan transkripsi gen sebagai respons terhadap hipoksia. HIF-3 α tampaknya menjadi regulator dominan negatif dari HIF dan akan di dimer dengan HIF-1 β untuk menghasilkan transkripsi heterodimer inaktif. Dalam kondisi normoksik, HIF-1 α diekspresikan secara jumlah rendah di semua organ, sedangkan HIF-2 α diekspresikan secara banyak di paru-paru, jantung, otak, hati dan lain-lain. Meskipun kesamaan dalam memediasi respons transkripsi terhadap hipoksia, HIF-1 α dan HIF-2 α memiliki fungsi yang berbeda. (Zheng et al., 2022)

2.12 HIF-1 α dan VEGF

HIF-1 α mempromosikan pertumbuhan dan angiogenesis oleh ekspresi faktor angiogenik seperti VEGF yang berlebihan. VEGF adalah faktor angiogenik yang kuat, juga dikenal sebagai faktor permeabilitas vaskular (VPF) berdasarkan

kemampuannya untuk menginduksi hiperpermeabilitas vaskular. VEGF termasuk dalam kelompok pertumbuhan faktor yang mencakup VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF- D, VEGF-E dan faktor pertumbuhan plasenta. VEGF disekresikan sebagai homo dimer yang dihubungkan oleh ikatan disulfida; namun VEGF-C dan VEGF-D yang diproses sepenuhnya disekresikan sebagai dimer yang tidak terikat secara kovalen. Fungsi utama dari molekul- molekul ini untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel, untuk menginduksi proliferasi dan untuk meningkatkan migrasi dan permeabilitas sel-sel endotel, yang berkontribusi pada angiogenesis. Efek biologis dari VEGF memerlukan transfosforilasi residu tirosin terletak pada domain sitoplasma dari reseptor VEGFRs: VEGFR-1, VEGFR-2 dan VEGFR-3. Interaksi gand-reseptor terjadi secara tumpang tindih: VEGF-A, VEGF-B dan faktor pertumbuhan plasenta berikatan dengan VEGFR-1; VEGF-A serta VEGF-E berikatan dengan VEGFR-2; VEGF-C dan VEGF-D berikatan dengan VEGFR-3. Kedekatan dari domain tirosin kinase intraseluler dari reseptor VEGF menginduksi transfosforilasi mereka dalam residu tirosin. (Hu et al., 2016)

VEGF secara langsung mengatur permeabilitas vaskular di berbagai organ, dan ini bisa memiliki peran dalam kondisi klinis tertentu seperti: seperti sindrom pernafasan akut, sepsis, penyakit gunung akut dan edema paru akibat paparan ketinggian tinggi. Pada sel endotel arteri pulmonalis manusia yang hipoksia, peningkatan H₂O₂, HIF-1 α nuklear, VEGF sitosol dan permeabilitas monolayer diamati, sedangkan peningkatan HIF-1 α , VEGF dan kebocoran vaskular diamati secara in vivo di pembuluh darah paru pada tikus yang mengalami hipoksia. Menariknya, pengobatan dengan reseptor VEGF larut sFlt-1, yang setelah pengikatan akan menghambat efek biologis VEGF dan menurunkan permeabilitas sel endotel arteri pulmonalis. VEGF serta sFlt-1, berkontribusi pada disfungsi

dinding sel endotel pada model manusia dan hewan dan berkorelasi dengan tingkat keparahan penyakit sepsis dan sindrom pernapasan akut. (Hu et al., 2016)

Gen tumor suppressor p16 adalah penghambat cyclin D kinase, dan regulator negatif dari siklus seluler, ekspresi p16, berkorelasi dengan penghambatan VEGF dan angiogenesis pada glioma manusia; namun, mekanisme digunakan oleh p16 untuk mengatur VEGF belum dieksplorasi. Dipercayai bahwa interaksi p16-HIF-1 memainkan peran penting dalam modulasi ekspresi p16 dan VEGF, yang berkontribusi pada angiogenesis dan perkembangan tumor. Alasannya, VEGF dan faktor angiogenik lainnya telah diakui sebagai target terapi untuk penyakit seperti kanker. VEGF juga diatur secara berlebihan oleh kondisi yang terkait dengan pembentukan radikal bebas dan ROS; mekanisme ini masih belum diketahui tetapi terkait dengan pengurangan sistem antioksidan. (Hu et al., 2016)

2.13 *Rattus Norvegicus* Strain Wistar

Hewan coba merupakan hewan yang dikembangbiakan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus atau mencit memiliki genetika yang unik dan mudah dikembangbiakan, murah, dan mudah untuk didapatkan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) berasal dari wilayah Cina dan menyebar hingga ke Eropa Barat. Tikus ini memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakan sesama jenis atau 15 persilangan. Salah satu galur tikus yang cukup sering digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar. Tikus putih galur Wistar memiliki tubuh yang panjang dengan kepala sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah dan ekornya tidak lebih panjang dari tubuhnya. Berat tikus jantan dapat mencapai 500 gram dan betinanya dapat mencapai 325 gram. Tikus ini memiliki umur hidup sekitar 5 tahun. (Sirois et al., 2005). Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*)

galur Wistar menurut Myres & Armitage (2004):

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Kelas: Mamalia
- Ordo: Rodentia
- Famili: Muridae
- Sub-Famili: Murinae
- Genus: Rattus
- Spesies: *Rattus norvegicus*
- Strain: Wistar

2.14 Penentuan Dosis Vitamin E pada Tikus

Penentuan dosis pada hewan coba tidak dapat sekedar menghitung dosis manusia dengan berat badan hewan coba. Hal ini dikarenakan sistem biokimia dan fungsional pada suatu spesies dengan spesies lainnya berbeda sehingga dapat mempengaruhi farmakokinetik dari obat tersebut. Penskalaan alometrik dapat digunakan untuk mengkonversi dosis manusia ke spesies lain. Penskalaan tersebut adalah pendekatan empiris di mana konversi dosis obat dilakukan berdasarkan normalisasi dosis ke luas permukaan tubuh. Pendekatan ini menganggap ada beberapa karakteristik unik pada proses anatomis, fisiologis, dan biokimia di antara spesies. Metode ini dapat menghitung animal equivalent dose (AED) dengan mengalikan dosis manusia (mg/kg) dengan rasio faktor koreksi (Km) pada spesies yang dituju. Faktor koreksi didapatkan dengan membagi rerata berat badan spesies dengan luas permukaan tubuhnya. (Gambar 2.11) Sebagai contoh, jika maksimum dosis dari obat tertentu pada manusia adalah 10 mg/kg, maka AED pada tikus

didapatkan dengan mengalikan dosis manusia dengan 6.2 menjadi 62 mg/kg. (Jacob et al., 2022)

Species	Reference body weight (kg)	To convert dose in mg/kg to dose in mg/m ² , divide by K _m	To convert human dose in mg/kg to AED in mg/kg, either	
			Multiply human dose by	Divide human dose by
Human	60	37		
Mouse	0.02	3	12.3	0.081
Hamster	0.08	5	7.4	0.135
Rat	0.15	6	6.2	0.162
Ferret	0.30	7	5.3	0.189
Guinea pig	0.40	8	4.6	0.216
Rabbit	1.8	12	3.1	0.324
Dog	10	20	1.8	0.541
Monkeys (rhesus)	3	12	3.1	0.324
Marmoset	0.35	6	6.2	0.162
Squirrel monkey	0.60	7	5.3	0.189
Baboon	12	20	1.8	0.541
Micro pig	12	27	1.4	0.730
Mini pig	40	35	1.1	0.946

Gambar 2.11 Perhitungan Animal Equivalent Dose berdasarkan Luas Permukaan Tubuh (Nair et al., 2016)

Dosis maksimum suplementasi vitamin E yang aman untuk orang dewasa adalah 400 mg/hari. (Suter, 2022). Dengan asumsi rerata berat badan dewasa adalah 60 kg, maka dosis maksimum vitamin E pada orang dewasa sekitar 6,7 mg/kg. Berdasarkan metode yang telah dijelaskan di atas, AED vitamin E pada tikus dapat diperoleh dengan mengalikan 6,7 mg/kg dengan 6,2 (faktor koreksi tikus) sehingga didapatkan dosis 41,5 mg/kg. Jika berat rerata berat tikus putih 250 gram, maka diperoleh dosis vitamin E sebesar 10,3 mg sehingga dapat dibulatkan menjadi 10 mg.

2.15 Pemeriksaan Ekspresi Gen

2.15.1 Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA

Boom Original (Boom et al, 1990). Metode Boom merupakan metode yang dilakukan pertama kali oleh Boom et al (1990). Proses isolasi DNA dilakukan dengan cara sebanyak 50 μ L sampel isolat *M. tuberculosis* ditambahkan dengan 900 μ L *buffer* lisis L6 dan 40 μ L suspensi diatom. Larutan tersebut divorteks dengan segera $\pm$ 5 detik. Tabung didiamkan selama 10 menit pada suhu ruangan, kemudian tabung (5 detik) dan disentrifugasi (15 detik) dalam Eppendorf *microfuge* dengan kecepatan 12.000 x g. Supernatan yang diperoleh dibuang. Pelet yang diperoleh dicuci dengan penambahan 1 mL *buffer* L2, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Selanjutnya pelet ditambahkan 1 mL dengan etanol 70% (v/v), divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Pelet ditambahkan 1 mL aseton ke dalam tabung, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (Boom, 1990).

Setelah asetonnya dibuang, tabung reaksi dikeringkan pada suhu 56oC dengan penutup dalam keadaan terbuka dan dipanaskan selama 10 menit. Buffer elusi (buffer TE pH 8) ditambahkan dan tabung reaksi ditutup, divorteks dengan cepat dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 56oC. Tabung reaksi divorteks dengan cepat dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 x g dan supernatan yang mengandung DNA dapat digunakan. Proses ini dilakukan di dalam *Biological Safety Cabinet Class II* (Boom, 1990).

2.15.2 Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Analisis ekspresi gen melibatkan penentuan pola gen yang diekspresikan pada

tingkat transkripsi genetik, dalam keadaan tertentu atau dalam sel tertentu. Pengukuran ekspresi gen adalah alat penting yang digunakan di seluruh penemuan obat, penelitian ilmu kehidupan dan optimalisasi bioproduksi. Analisis ekspresi melibatkan beberapa teknik mulai dari analisis ekspresi gen seluruh genom seperti *microarray* atau sekuensing RNA, hingga teknik ekspresi gen target yang lebih spesifik seperti teknik qPCR. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. *Real-time* PCR atau *quantitative* PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (O'Connell, 2002).

Real time PCR juga meliputi *Real Time-RT* PCR dimana PCR dilakukan secara *Real Time* menggunakan enzim *Reverse Transcriptase* secara langsung pada waktu yang bersamaan. Real Time- RT PCR memiliki tambahan siklus Reverse Transcription yang memacu perubahan molekul DNA dari molekul RNA. (O'Connell, 2002).

2.15.3 Prinsip Kerja qPCR

Prinsip kerja qPCR adalah mendeteksi dan menguantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Putra, 2020). Berdasar pada molekul yang digunakan untuk deteksi, prinsip kerja qPCR dapat dibedakan sebagai berikut:

1. Deteksi target non-spesifik menggunakan pewarnaan DNA

Pada *Real Time* PCR, pewarna DNA digunakan sebagai reporter fluoresensi untuk memonitor reaksi *Real Time* PCR. Fluoresensi pada reporter akan terakumulasi seiring dengan proses amplifikasi yang berlangsung. Pencatatan secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung pancaran fluoresensi tiap siklus PCR. Hal tersebut mungkin untuk dilakukan guna memonitor reaksi PCR selama fase eksponensial. Jika grafik digambarkan antara log jumlah awal templat dan hubungan peningkatan fluoresensi reporter selama proses *Real Time* PCR, maka akan didapatkan suatu garis hubungan yang menunjukkan kuantitas gen yang diekspresikan. (Tamam, 2016)

2.15.4 Deteksi Target Spesifik

Terdapat dua jenis reporter fluoresen yang umumnya digunakan dalam qPCR, yaitu Taqman dan SYBR Green. SYBR Green akan berfluoresensi ketika berikatan dengan seluruh *double-stranded* DNA (dsDNA). Sinyal fluoresens SYBR Green saat berikatan dengan dsDNA direkam setiap siklus sehingga menunjukkan banyak produk yang teramplifikasi selama reaksi berlangsung. Semakin banyak template pada awal reaksi, maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai titik saat sinyal fluoresens SYBR Green terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas (*threshold*) fluoresens yang ditentukan (Bustin, 2000).

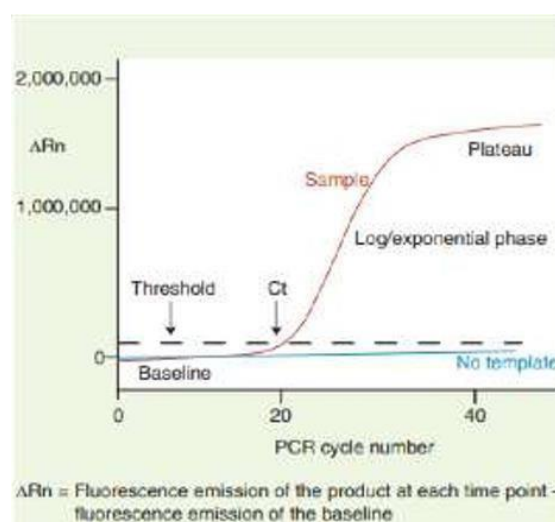
Deteksi target spesifik *Real Time* PCR dilakukan menggunakan beberapa oligonukleotida yang dilabeli pada dua bagian reporter dengan label *fluorescent dye* dan pewarna *quencher dye*. Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Untuk menganalisa tingkat ekspresi gen, cDNA yang telah disintesis dari mRNA diuji secara : kuantitatif menggunakan real time PCR. Analisis hasil real time PCR dapat dilakukan secara kuantitatif absolut dan

kuantitatif relatif. Metode kuantitatif relatif atau yang dikenal juga dengan *comparative threshold method* menghilangkan kebutuhan akan kurva standar yang digunakan dalam perhitungan kuantitatif absolut dan menggunakan perhitungan secara matematika untuk mengukur tingkat kuantitatif relatif ekspresi dari gen target dengan menggunakan gen referensi dan kalibrator dari jaringan (Putra, 2020).

Untuk mengetahui ekspresi suatu gen maka dibutuhkan gen referensi sebagai pembanding internal (*endogenous control*) jumlah DNA agar tidak terjadi kesalahan interpretasi akibat jumlah DNA yang berbeda. Gen referensi yang digunakan adalah gen yang tidak terpengaruhi oleh lingkungan. Gen yang paling banyak digunakan adalah housekeeping gene seperti actin dan gliseraldehid-3-fosfat- dehidrogenase (GAPDH) (Bustin, 2000).

2.15.5 Hasil qPCR

Hasil real time PCR dengan metode comparative threshold meliputi nilai C_q dan relative quantitation. C_q/C_t merupakan hasil fraksi jumlah siklus PCR dimana nilai reporter fluoresensi lebih besar dari tingkat deteksi minimal mesin real time PCR sehingga amplikasi meningkat secara signifikan. Nilai C_q/C_t didapat dari jumlah siklus pada proses PCR yang berpotongan dengan garis threshold. Threshold adalah garis yang menandai peningkatan sinyal fluoresensi secara signifikan berdasarkan variabilitas baseline, namun posisi threshold dapat diatur bebas pada setiap titik di fase eksponensial (Life TechnologiesTM, 2015).



Gambar 2.12. Hasil qPCR (Life Technologies™, 2015)

2.16 Metode ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang menggunakan bidang imunologi untuk mendeteksi antibodi atau antigen yang terdapat pada suatu sampel. ELISA digunakan sebagai alat diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan dan bidang industri (Hnasko, 2015). Penggunaan ELISA melibatkan antibodi dengan spesifitas terhadap antigen tertentu. Sampel dengan jumlah antigen yang tidak diketahui akan dimobilisasi pada suatu permukaan solid yang non spesifik (penyerapan pada permukaan) atau spesifik (melalui penangkapan oleh antibodi lain yang spesifik untuk antigen yang sama). Setelah antigen diimobilisasi akan ditambahkan antibodi pendeteksi untuk membentuk kompleks dengan antigen. Antibodi pendeteksi dapat berikatan juga pada enzim atau dapat dideteksi secara langsung oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan enzim melalui biokonjugasi. Antara tiap tahap, plat dicuci dengan larutan deterjen lembut untuk membuang protein yang kelebihan atau antibodi yang tidak terikat. Setelah tahap pencucian terakhir, dalam plat akan ditambahkan substrat enzimatik untuk memproduksi sinyal yang visibel yang menunjukkan kuantitas antigen dalam sampel. Teknis ELISA yang lama adalah dengan menggunakan substrat kromogenik, terdapat metode-metode terbaru yang lebih sensitif yaitu dengan menggunakan substrat fluorogenik (Hnasko, 2015).

2.16.1 Aplikasi

ELISA dapat mengevaluasi kehadiran dari antigen dan antibodi dalam suatu sampel karena hal tersebut ELISA dapat berguna sebagai metode untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam serum dan mendeteksi adanya antigen. Metode ELISA juga digunakan pada bidang industri makanan yaitu untuk mendeteksi potensial alergen dalam makanan seperti dalam susu, kacang, walnut, telur dan almond. ELISA dapat digunakan dalam bidang toksikologi untuk menguji dugaan secara cepat pada pembagian kelas obat (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015).

2.17 Perbandingan Dengan Penelitian Serupa

Berikut adalah tabel perbandingan penelitian serupa yang sudah pernah dilakukan sebelumnya.

	Judul penelitian	Hasil penelitian
Atilgan et. al. (2015)	<i>Evaluation of vitamin C and vitamin E for prevention of postoperative adhesion: a rat uterine horn model study</i>	Pemberian Vit. C atau vit. E efektif dalam mencegah pembentukan adhesi pada model eksperimental
Makarska et. al. (2010)	<i>Influence of Vitamin E Given Intraperitoneally to Prevent Peritoneal Adhesions in Rats</i>	Pemberian vitamin E secara intraperitoneal pada tikus menurunkan intensitas dan tingkat ekstensif adhesi intraperitoneal secara mikroskopik dan makroskopik

Corrales et. al. (2008)	<i>Preventing intraperitoneal adhesions with vitamin E and sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose (HA/CBMC). A comparative study in rats</i>	Vitamin E yang diberikan secara intraperitoneal sama efektifnya dengan HA/CBMC dalam mencegah adhesi postoperatif
Durmus et. al. (2011)	<i>Efficacy of vitamin E and selenium for the prevention of intra-abdominal adhesions in rats: uterine horn models</i>	Pemberian selenium atau kombinasi selenium dengan vit. E efektif dalam mencegah pembentukan adhesi intraperitoneal pada model tikus
