

**PERBANDINGAN KONSUMSI GLUKOSA,
AKTIVITAS DAN POLA ELEKTROFORESIS
ENZIM LAKTAT DEHIDROGENASE (LDH)
PADA OTOT TIKUS NORMOKSIA, HIPOKSIA
DAN OTOT PENYU HIJAU (*Chelonia mydas*)**

TESIS

SITI RAHMAWATI ACHYAT

0706170766



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER BIOMEDIK
JAKARTA
MEI 2010**

**PERBANDINGAN KONSUMSI GLUKOSA,
AKTIVITAS DAN POLA ELEKTROFORESIS
ENZIM LAKTAT DEHIDROGENASE (LDH)
PADA OTOT TIKUS NORMOKSIA, HIPOKSIA
DAN OTOT PENYU HIJAU (*Chelonia mydas*)**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister

SITI RAHMAWATI ACHYAT

0706170766



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER BIOMEDIK
JAKARTA
MEI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Siti Rahmawati Achyat

NPM : 0706170766

Tanda Tangan :



Tanggal : 18 Mei 2010

HALAMAN PENGESAHAN

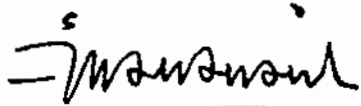
Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Siti Rahmawati Achyat, Ssi
NPM : 0706170766
Program Studi : Magister Biomedik Kekhususan Biomedik
Judul Tesis : **Perbandingan konsumsi glukosa,
aktivitas dan pola elektroforesis
enzim laktat dehidrogenase (LDH)
pada otot tikus normoksia, hipoksia,
dan otot penyu hijau (*Chelonia mydas*)**

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Prof.dr.Mohamad Sadikin, DSc	()
Pembimbing II	: dr.Ninik Mudjihartini, MSi	()
Penguji I	: drg.Dwirini Retno Gunarti, MS	()
Penguji II	: Prof.dr.Frans D. Suyatna, SpFK, PhD	()
Penguji III	: Rini Puspitaningrum, MBiomed	()

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI:
Dr.rer. physiol.dr.Septelia Inawati Wanadi

()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 18 Mei 2010

Universitas Indonesia

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Shalawat serta salam semoga selalu tercurah kepada Junjungan kita Nabi Muhammad SWA, beserta keluarga dan sahabatnya. Saya menyadari bahwa dalam masa perkuliahan sampai pada masa penyusunan tesis ini, saya menerima bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankan saya untuk menyampaikan terimakasih kepada

1. Prof.dr.Mohamad Sadikin, DSc sebagai dosen pembimbing I dalam tesis ini, dan pembimbing akademis yang didalam kesibukkannya, telah memberikan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing saya selama saya menempuh pendidikan Magister Biomedik di kekhususan Biokimia
2. dr.Ninik Mudjihartini, Msi sebagai dosen pembimbing II dalam tesis ini yang telah memberi masukan, bimbingan, dan pengarahan dalam penyusunan tesis ini.
3. Ketua program Magister Ilmu Biomedik, Ketua Program Studi Kekhususan Biokimia, para dosen, staf pengajar dan pegawai-pegawai di program Studi Kekhususan Biokimia dan Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan bantuan kepada saya selama pendidikan dan penyelesaian tesis ini.
4. dr. Septelia Inawati A, Dr.rer.physiol, dr.Ninik mudjihartini MSi, dr. Sri Widia A.Jusman, Msi, dan dr.Ani Retno Prijanti MS, yang telah memberikan kesempatan dan bantuan pada peneliti untuk menggunakan jaringan otot tikus dari penelitian mereka.
5. Ibu Rini Puspitaningrum, MBiomed yang telah memberi dukungan moril dan bantuan untuk menggunakan jaringan otot penyuh hijau dari penelitiannya.
6. Ibu Ifa Manzila dari balai besar penelitian dan pengembangan bioteknologi dan sumberdaya genetik pertanian, pengembangan dan sumber genetik pertaniyang telah berbaik hati memberikan zat NBT (nitro blue tetrazolium).

7. Suami dan anak tercinta, atas doa, dukungan, waktu yang tersita dan pengorbanan yang tulus kepada saya hingga terselesainya tesis ini
8. Orang tua dan keluarga yang telah memberikan doa, semangat, perhatian dan dukungan selama saya menempuh pendidikan ini
9. Agus Efendi selaku teman seperjuangan,
10. Ayi Furqon atas kesediaannya membantu dalam statistik serta
11. Sahabat-sahabat yang di Fakultas Kedokteran yang telah memberi motivasi khususnya mbak Reni, mbak Febri, mbak Novi dan mbak Dewi

Akhir kata saya berharap Allah S.W.T berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu, khususnya ilmu biomedik.

Jakarta, Mei 2010

penulis

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

Sebagai sivitas akademi Universitas Indonesia, saya bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Siti Rahmawati Achyat
NPM : 0706170766
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

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

"Perbandingan konsumsi glukosa, aktivitas dan pola elektroforesis enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada otot tikus normoksia, hipoksia dan otot penyu hijau (*Chelonia mydas*)"

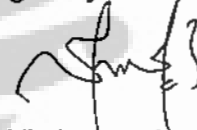
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 18 Mei 2010

Yang menyatakan



(Siti Rahmawati Achyat)

ABSTRAK

Nama : Siti Rahmawati Achyat
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik, Kekhususan Biokimia
Judul : Perbandingan konsumsi glukosa, aktivitas dan pola elektroforesis enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada otot tikus normoksia, hipoksia dan otot penyu hijau (*Chelonia mydas*)

Pada keadaan hipoksia sel akan berganti metabolisme dari tipe aerob ke tipe yang lebih anaerob, yang lebih sedikit menghasilkan energi. Untuk memenuhi kebutuhan energi yang sama, sel pada keadaan hipoksia meningkatkan konsumsi glukosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran adaptasi metabolisme otot pada tikus yang dibuat hipoksia dibandingkan dengan penyu hijau (*Chelonia mydas*). Penyu hijau merupakan hewan yang bernafas dengan paru-paru namun dapat beraktivitas lama di bawah air laut.

Sejumlah tikus ditempatkan pada kandang hipoksia (tekanan 1 atm, dan kandungan O₂ 10%) selama 1, 7 14, dan 21 hari. Pada akhir periode hipoksia setelah euthanasia, otot dianalisis untuk pengukuran konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH dan elektroforesis isozim LDH. Analisis yang sama juga dilakukan pada penyu yang ditempatkan pada kondisi normoksia.

Konsumsi glukosa dan aktivitas LDH meningkat sejalan dengan lamanya hipoksia pada otot tikus, sedangkan isozim LDH tidak mengalami perubahan pola, kecuali peningkatan LDH 4 dan LDH 5. Konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH otot penyu lebih tinggi dibanding otot tikus dan hanya terdapat satu tipe isozim LDH yaitu LDH 4 yang merupakan isozim LDH anaerob. Hasil penelitian menunjukkan adaptasi sel otot terhadap hipoksia, dengan mengubah metabolisme aerob menjadi lebih anaerob

Kata kunci :
Hipoksia, glukosa, LDH, otot

ABSTRACT

Name : Siti Rahmawati Achyat, SSi
Study Program : Biochemistry (Biomedical Science)
Title : Comparison of glucose consumption, activity and electrophoresis patterns of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme in normoxic and hypoxic rat muscle, and green turtles muscle (*Chelonia mydas*)

During hypoxia, there is a shift from aerobic to anaerobic metabolism which results in the production of less ATP. In order to meet the same energy needed, the hypoxic cells have to increase the glucose consumption rate. In this study, we described the muscle metabolic adaptation in globally hypoxic rats as well as in sea turtles (*Chelonia mydas*), the latter animals are well known as lung breathing species which spend most of their time under sea water.

Rats were placed in a hypoxic chamber (1 atm, O₂ 10 Vol %) for 1, 7, 14 and 21 days. At the end of each period, after euthanasia their muscles were analyzed for glucose metabolism rate, total specific LDH activities and LDH isozymes electrophoresis. The same analysis was made in sea turtle muscles which were placed in normal condition.

Glucose consumption rates and LDH activities increased proportionally with the duration of hypoxic state in rats, whereas for LDH isozymes, there were no any change in pattern except for LDH 4 and LDH 5, which was more prominent the course of hypoxia. On the other hand, even in normoxic condition, sea turtles muscles consumed higher amount of glucose, showed much higher of total specific LDH activities and had only one type of LDH isozyme, i.e. LDH 4, which is anaerobic isozyme of LDH. The results suggest that during adaptation to hypoxia, the metabolism of aerobic muscle of rat switch to more anaerobic pattern and that sea turtle was genetically set for hypoxia condition.

Keywords:

Hypoxia, glucose, LDH, muscle

DAFTAR ISI

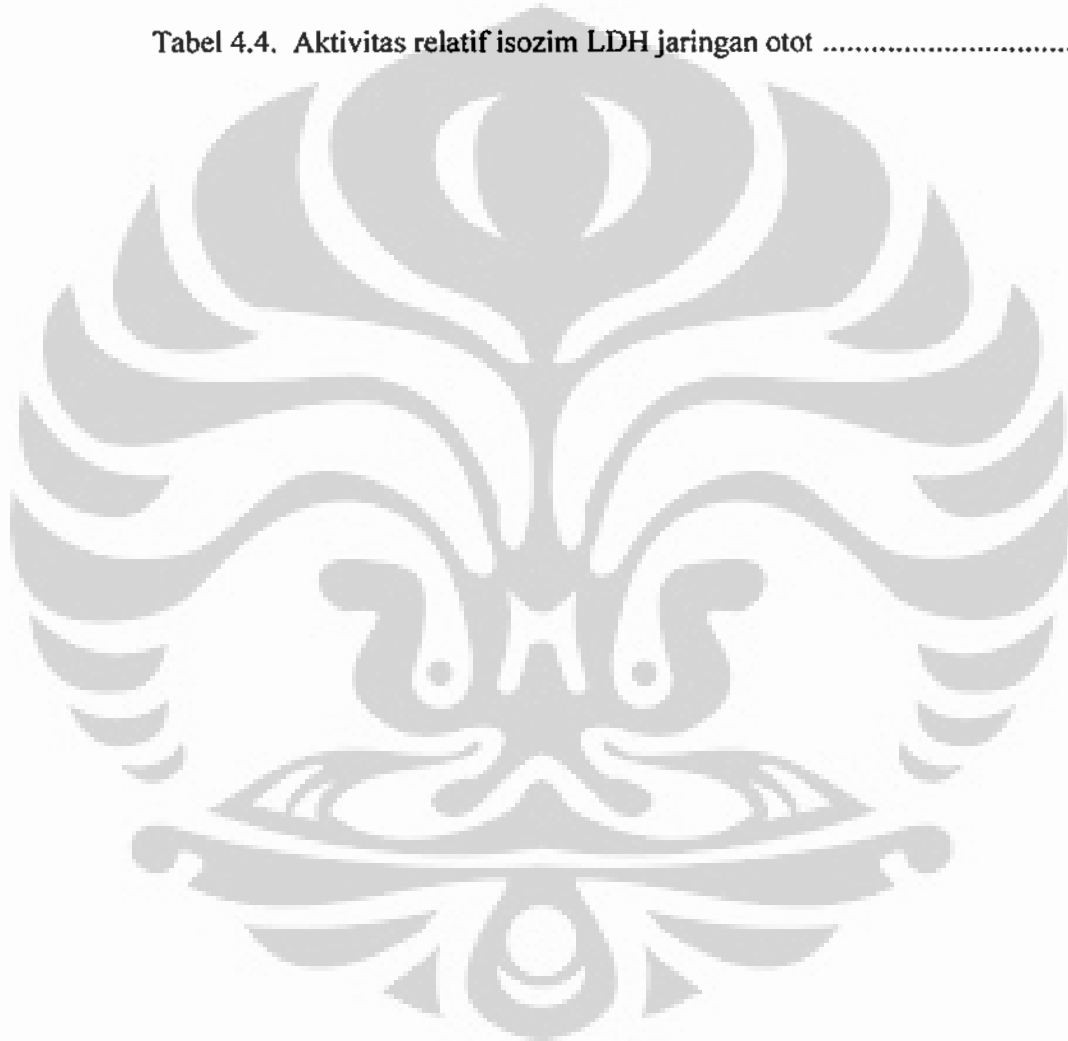
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Hipotesis Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.4.1 Tujuan Umum	4
1.4.2 Tujuan Khusus	4
1.5 Manfaat	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Hipoksia	5
2.2 Glikolisis	6
2.3 Enzim Laktat dehidrogenase	10
2.4 Penyu Hijau (<i>Chelonia mydas</i>) Sebagai Model Hewan Coba Hipoksia Toleran	15
BAB III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Rancangan Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Penetapan Jumlah Sampel Penelitian	17
3.4 Persiapan Bahan Otot	19
3.5 Pembuatan homogenate otot tikus dan penyu	19
3.6 Pengukuran kadar protein	20
3.7 Pengukuran konsumsi glukosa oleh jaringan otot	20
3.8 Pengukuran aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH)	21
3.9 Elektroforesis Enzim	22
3.10 Pembacaan Isoenzim LDH	23
3.11 Pengelohan dan Penyajian Data	24

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1 Hasil	25
4.2 Pembahasan	29
BAB V. PENUTUP.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	40
LAMPIRAN.....	41



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Pengukuran kadar glukosa dengan Glukosa ST kit	21
Tabel 4.1. Kadar protein jaringan otot	26
Tabel 4.2. Konsumsi glukosa per protein jaringan otot.....	26
Tabel 4.3. Aktivitas enzim laktat dehidrogenase jaringan otot.....	27
Tabel 4.4. Aktivitas relatif isozim LDH jaringan otot	29



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Jalur glikolisis	8
Gambar 2.2 Struktur Laktat Dehidrogenase	10
Gambar 2.3. Pembentukan laktat atau piruvat oleh enzim LDH	11
Gambar 2.4 Bentuk tetramer isozim LDH	11
Gambar 2.5. Gen laktat dehidrogenase.....	12
Gambar 2.6. Hasil pemisahan LDH oleh gel elektroforesis.	12
Gambar 2.7 Prinsip reaksi elektroforesis enzim LDH.....	14
Gambar 2.8 Penyu hijau (<i>Chelonia mydas</i>).....	16
Gambar 4.1 Kurva Standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>).....	25
Gambar 4.2. Elektroforesis enzim LDH	28
Gambar 4.3. Diagram batang kadar protein	31
Gambar 4.4. Diagram batang konsumsi glukosa.....	32
Gambar 4.5. Diagram batang aktivitas Enzim LDH	33
Gambar 4.6. Pola Elektroforesis enzim LDH	34
Gambar 4.7. Kolerasi kadar protein terhadap aktivitas enzim LDH	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kadar protein jaringan otot tikus dan oto penyu	41
Lampiran 2. Konsumsi glukosa dalam jaringan otot.....	42
Lampiran 3. Aktivitas enzim LDH dalam jaringan otot.....	43
Lampiran 4. Aktivitas relatif isozim LDH dalam jaringan otot.....	45
Lampiran 5. Analisis statistik uji normalitas	46
Lampiran 6. Analisis statistik uji kruskal wallis	46
Lampiran 5. Analisis korelasi	47



DAFTAR ISTILAH

ATP	Adenosin Trifosfat
TCA cycle	<i>Tricarboxylic Acid cycle</i>
LDH	Laktat Dehidrogenase
O ₂	Oksigen
NADH	<i>Nicotinamide Adenin Dinukleotide hydroxide</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adenin Dinukleotide</i>
AMP	Adenosin Monofosfat
ADP	Adenosin Difosfat
Arg	Arginin
His	Histidin
SH	Sulfhidril
S	Sulfur
PMS	<i>Phenazine Methosulfate</i>
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
H ₂ O	Hidrogen Oksida
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
μL	Mikroliter
dL	Desiliter
mg	Miligram

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dua miliar tahun dari evolusi aerob menghasilkan sel dan jaringan mamalia yang sangat bergantung kepada oksigen. Oksigen berperan sangat penting dalam berbagai macam reaksi biologi. Peran oksigen yang terpenting pada makhluk aerobik adalah akseptor terakhir elektron pada rangkaian reaksi transfer elektron di rantai pernafasan. Pada mitokondria, reaksi ini disebut juga sebagai reaksi fosforilasi oksidatif. Selain itu oksigen juga merupakan substrat pada 200 reaksi seluler lainnya. Energi yang dibebaskan dari rantai pernafasan ditangkap sebagai adenosin trifosfat (ATP), yang dapat digunakan untuk berbagai keperluan. Pada keadaan terpaksa, sel-sel aerob dapat melakukan oksidasi tanpa oksigen. Pada mikroorganisme, proses ini disebut fermentasi. Apabila dibandingkan fosforilasi oksidatif dengan reaksi fermentasi, ATP yang dihasilkan jauh lebih tinggi pada yang pertama. Oleh karena itu sintesis ATP yang bergantung oksigen lebih banyak digunakan oleh organisme multiseluler, termasuk manusia. Makhluk multiseluler seperti juga makhluk mikroseluler, dapat beradaptasi pada keadaan kekurangan oksigen atau hipoksia dengan kemampuan yang bervariasi.¹⁻³

Definisi yang praktis dari hipoksia adalah apabila suplai oksigen kurang dari yang dibutuhkan oleh organ, jaringan, atau sel. Pada keadaan kecukupan oksigen, hampir 90% dari oksigen yang tersedia dipergunakan oleh mitokondria untuk menghasilkan ATP melalui proses fosforilasi oksidatif. ATP yang dihasilkan berfungsi sebagai energi siap pakai bagi hampir seluruh proses sel. Oleh sebab itu kecukupan suplai oksigen sangat dibutuhkan untuk kelangsungan fungsi dan daya tahan sel.⁴⁻⁵

Sebagian besar produksi ATP diperoleh dari metabolisme glukosa. Jalur terpenting metabolisme glukosa adalah glikolisis. Glikolisis yang berlangsung di sitoplasma, merupakan jalur utama dalam metabolisme karbohidrat untuk menghasilkan energi. Jalur glikolisis ini merupakan jalur yang sangat penting.

Pertama karena tidak hanya berperan pada metabolisme karbohidrat saja, tetapi bersama-sama dengan siklus asam sitrat dapat berperan sebagai jalur katabolisme dan anabolisme. Selain itu, jalur ini juga harus berfungsi setiap saat dan tersebar pada seluruh makhluk hidup, mulai dari bakteri hingga manusia.¹⁻⁴

Salah satu makna biomedis glikolisis yang sangat menentukan adalah kemampuan glikolisis menghasilkan ATP dalam keadaan tanpa oksigen atau disebut juga glikolisis anaerob. Dibandingkan glikolisis anaerob, glikolisis aerob menghasilkan ATP 18 kali lebih banyak, maka diperlukan konsumsi glukosa lebih banyak untuk memenuhi kebutuhan ATP pada keadaan anaerob. Glikolisis anaerob terjadi karena piruvat tidak masuk ke dalam siklus TCA dan rantai pernafasan, melainkan direduksi menjadi laktat oleh enzim laktat dehidrogenase (LDH).⁵

Enzim LDH merupakan enzim yang berperan penting dalam glikolisis anaerob. Enzim ini dapat mengkatalisis reaksi bolak balik (*irreversible*) piruvat menjadi laktat. Tipe isozim LDH berbeda pada keadaan aerob dan anaerob. Pada keadaan aerob, isozim LDH1 mengubah laktat menjadi piruvat. Sebaliknya pada keadaan anaerob, isozim LDH5 akan mengubah piruvat menjadi laktat.⁶

Pada keadaan patologis tertentu, organ-organ yang memerlukan oksigen dalam jumlah besar dihadapkan kepada keadaan hipoksia, yang dapat mengganggu fungsi organ tersebut. Bila hal ini terjadi pada otak atau jantung, maka akan menyebabkan penyakit berat. Akan tetapi beberapa hewan toleran terhadap keadaan hipoksia, sehingga dapat berada dalam keadaan anaerob selama jangka waktu yang cukup panjang.

Lumba-lumba dan paus, yang bernafas dengan paru-paru, dapat mengalami keadaan anaerob selama 30 menit sampai 1 jam. Penyu, yang juga bernafas dengan paru-paru dapat terus menerus berenang tanpa mengeluarkan kepala ke udara selama beberapa hari. Pada keadaan-keadaan ini (hipoksia pada manusia, lumba-lumba, paus, penyu) jelas metabolisme energi terjadi hanya melalui proses anaerob. Hal ini masih menimbulkan pertanyaan, mengapa pada manusia hal itu menyebabkan penyakit, tetapi pada hewan-hewan tersebut tidak menimbulkan kelainan apapun juga dan tetap aktif seperti biasa. Kenyataan ini menyebabkan pada saat ini penelitian-penelitian

tentang hipoksia banyak dilakukan. Jaringan pertama yang dihubungkan dengan hipoksia adalah otot, karena otot sering dihadapkan pada keadaan tekanan rendah oksigen, misalnya selama olahraga. Otot sebenarnya salah satu jaringan yang paling tahan terhadap keadaan hipoksia. Oleh karena aktivitas fisik terutama dilakukan oleh otot, maka proses yang terjadi ada otot dalam keadaan hipoksia perlu dipelajari.

Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk melihat ada tidaknya perbedaan konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tikus normoksia dengan tikus hipoksia, dan otot tukik. Pola elektroforesis enzim LDH dapat berbeda antara otot tikus normoksia, hipoksia, dan otot tukik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat disimpulkan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

- 1.2.1 Bagaimanakah pengaruh kondisi hipoksia terhadap konsumsi glukosa pada jaringan otot tikus?
- 1.2.2 Bagaimanakah pengaruh kondisi hipoksia terhadap aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) yang merupakan enzim kunci dalam proses glikolisis anaerob?
- 1.2.3 Bagaimanakah konsumsi glukosa dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada jaringan otot tukik (hewan hipoksia toleran)?
- 1.2.4 Bagaimanakah pola elektroforesis enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada otot normoksia, hipoksia dan hipoksia toleran?

1.3 Hipotesis Penelitian

- 1.3.1 Kondisi hipoksia dapat meningkatkan konsumsi glukosa dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada jaringan otot tikus normoksia, hipoksia dan tukik
- 1.3.2 Terdapat perbedaan pola elektroforesis enzim LDH pada otot tikus normoksia, hipoksia dan tukik

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mempelajari adaptasi jaringan otot tikus dan tukik pada keadaan normoksia dan hipoksia terhadap konsumsi glukosa dan enzim laktat dehidrogenase (LDH)

1.4.2 Tujuan Khusus

1.4.3 Mempelajari dan mengamati metabolisme glukosa pada otot tikus normoksia, otot tikus hipoksia dan otot penyu.

1.4.4 Mempelajari dan mengamati aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada otot tikus normoksia, otot tikus hipoksia dan otot penyu.

1.4.5 Mempelajari dan mengamati pola elektroforesis enzim laktat dehidrogenase pada otot tikus normoksia, otot tikus hipoksia dan otot penyu

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap perkembangan ilmu yang berkaitan dengan keadaan hipoksia khususnya pada sel otot.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hipoksia

Pada kondisi normoksia (kadar oksigen normal), manusia menghirup udara yang mengandung kurang lebih 21% oksigen. Sel-sel tubuh dapat hidup dalam lingkungan yang mengandung oksigen antara 0,5% sampai 12%. Rentang variasi yang cukup besar ditemukan pada organ atau jaringan yang berbeda. Sebagai contoh dalam darah arteri kadar oksigen berkisar 12%, darah vena sekitar 5%, pada miokardium kurang dari 10% serta jaringan tubuh lainnya rata-rata 3%.⁷

Molekul oksigen sangat penting untuk perkembangan dan pertumbuhan organisme multiseluler. Mamalia telah berevolusi menghasilkan jaringan fisiologis yang canggih, yang dapat mempertahankan homeostasis oksigen pada tingkat jaringan dengan cara menangkap, mengikat, transportasi, dan mengirimkan molekul oksigen. Salah satu aspek penting dari jaringan ini adalah kemampuan untuk merasakan dan merespon terhadap kondisi oksigen rendah atau hipoksia.⁸

Hipoksia menyebabkan oksigenasi jaringan berkurang sehingga berada di bawah tekanan oksigen kritis. Tekanan oksigen kritis adalah tekanan minimal oksigen yang diperlukan untuk oksidasi sitokrom c dalam mitokondria secara sempurna. Hipoksia dapat disebabkan oleh rendahnya tekanan parsial O₂ pada arteri akibat penyakit paru atau pada dataran tinggi (*hipoksia hipoksemik*), berkurangnya kemampuan darah dalam mengangkut O₂ akibat anemia, methemoglobinemia atau keracunan karbon monoksida (*hipoksia anemik*). Selain itu hipoksia dapat disebabkan oleh berkurangnya perfusi jaringan, baik umum maupun lokal (*hipoksia iskemik*), gangguan geometri dari difusi (*hipoksia difusi*) serta ketidakmampuan sel dalam menggunakan O₂ akibat intoksikasi misalnya keracunan sianida (*hipoksia histotoksik atau sitotoksik*).¹⁰

Dalam keadaan cukup oksigen, hampir 90% dari oksigen yang tersedia dipergunakan oleh mitokondria untuk menghasilkan ATP melalui proses

fosforilasi oksidatif. Manusia dan makhluk eukariotik lainnya mendapatkan sebagian besar energinya dengan menggunakan oksigen melalui rantai pernafasan di mitokondria. ATP yang dihasilkan menjadi sumber energi siap pakai hampir untuk semua proses sel.⁶

Jaringan dapat bertahan terhadap kondisi hipoksia dalam jangka waktu tertentu tergantung pada jenis jaringan dan spesies organisme. Otot skeleton lebih tahan terhadap hipoksia dibandingkan dengan jaringan saraf. Jaringan harus mampu beradaptasi dengan mengindera dan memberikan respon terhadap perubahan kadar oksigen guna kelangsungan hidupnya. Mekanisme penginderaan oksigen (*oxygen sensing*) ini dikembangkan untuk menjaga homeostasis oksigen, sekaligus untuk beradaptasi terhadap kondisi hipoksia.⁵

2.2 Glikolisis

Proses kehidupan semua sel dikendalikan oleh energi. Pertumbuhan, transport molekul melalui membran sel dan seluruh aktivitas sel membutuhkan energi. ATP (*adenosine triphosphate*) merupakan molekul dasar penghasil energi di dalam tubuh. ATP diperoleh melalui konformasi molekul organik seperti glukosa, asam lemak bebas, triasilgliserol, dan asam amino. Dalam konsumsi keseharian, glukosa akan menyediakan hampir 50—75% dari total kebutuhan energi tubuh.^{6,9}

Glukosa merupakan monosakarida terbanyak dalam karbohidrat makanan dan terpenting dalam kaitannya dengan penyediaan energi di dalam tubuh. Semua jenis karbohidrat makanan baik monosakarida, disakarida maupun polisakarida akan diabsorpsi menjadi glukosa, fruktosa dan galaktosa. Fruktosa dan galaktosa kemudian akan diubah glukosa di hati. Glukosa merupakan satu-satunya gula yang terdapat dalam darah.⁹

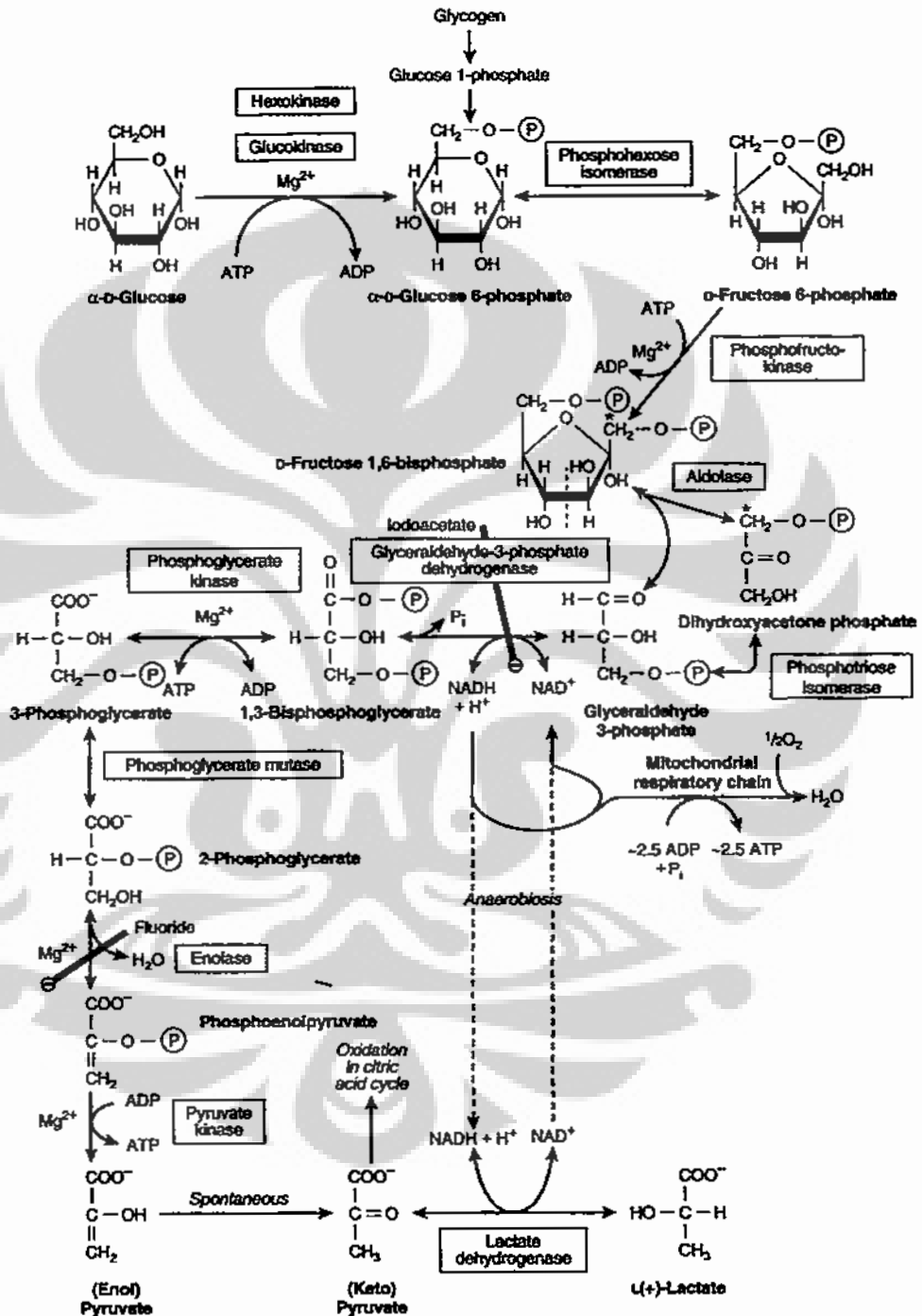
Glukosa yang berada dalam mukosa usus akan berdifusi ke dalam ruang sel dan menuju ke dalam kapiler darah. Proses oksidasi glukosa terjadi pada tiga tempat berbeda di dalam sel, yaitu glikolisis terjadi di sitoplasma, siklus asam trikarboksilat (siklus TCA) di matriks mitokondria, serta transport elektron di

membran dalam mitokondria. Glikolisis terjadi di seluruh sel makhluk hidup. Glikolisis merupakan proses perubahan katalitik glukosa menjadi piruvat dan NADH.^{6,9}

Gambar 2.1 menunjukkan bahwa proses glikolisis diawali dengan reaksi pembentukan senyawa glukosa 6-fosfat dari glukosa. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang membutuhkan energi yang diambil dari pemutusan ikatan fosfat dari ATP. Reaksi yang kedua adalah pembentukan isomer fruktosa 6-fosfat dari glukosa 6-fosfat, reaksi ini dikatalisis oleh fosfohexsokinase. Fosforilasi kedua terjadi pada perubahan fruktosa 6-fosfat menjadi fruktosa 1,6- bisfosfat oleh enzim fosfofruktokinase. Pada reaksi ini dibutuhkan 1 mol ATP dan diregulasi secara ketat. Fosfofruktokinase dapat dihambat oleh ATP. Reaksi selanjutnya, terjadi kondensasi aldol membentuk 2 molekul yaitu gliseraldehid 3-fosfat dan dihidroksiasetonfosfat. Hanya gliseraldehid-3-fosfat yang akan diteruskan dalam proses glikolisis sehingga dihidroksiasetonfosfat diubah menjadi gliseraldehid 3-fosfat. Pada tahap ini menghasilkan 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat.^{9,12}

Proses glikolisis berlanjut dengan oksidasi gliseraldehid-3-fosfat yang dikatalisis oleh enzim gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase dengan NAD^+ sebagai koenzimnya. Reaksi oksidasi ini terjadi pada gugus fosfat dan menghasilkan NADH. Pada tahap ini terbentuk pertama kali senyawa yang mengandung energi tinggi. Senyawa 1,3 bisfosfoglisarat merupakan senyawa berenergi tinggi yang selanjutnya gugus fosfat tersebut ditransfer untuk membentuk ATP yang dikatalisis oleh enzim fosfoglisarat kinase dengan ko-faktor Mg^{2+} . Pada tahap selanjutnya terjadi reaksi perpindahan gugus fosfat pada 3-fosfoglisarat yang berada pada posisi C-3 berpindah ke OH posisi C-2 yang dikatalisis oleh enzim fosfoglisarat mutase. Reaksi ini menghasilkan 2-fosfoglisarat. Tahap berikut pembentukan senyawa berenergi tinggi kedua. Pembentukan senyawa ini dilakukan dengan dehidrasi yang dikatalisis oleh enzim enolase yang memiliki ko-faktor Mg^{2+} . Reaksi ini dapat dihambat oleh fluorida. Pembentukan ATP kedua melalui reaksi yang berjalan spontan dan terjadi transfer gugus fosfat dari fosfoenolpiruvat ke ADP membentuk ATP. Pelepasan fosfat ion menyebabkan

terjadinya ikatan enol yang tidak stabil sehingga akan terkonversi ke bentuk keto dan menjadi piruvat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim piruvat kinase. Enzim ini memerlukan Mg^{2+} sebagai ko-faktor. Piruvat merupakan hasil akhir glikolisis.^{9,12}



Gambar 2.1. Jalur glikolisis⁹

Pada kondisi kecukupan oksigen piruvat diubah secara katalitik menjadi asetil ko-A oleh enzim piruvat dehidrogenase, yang selanjutnya masuk ke siklus asam trikarbonsilat. Selama proses fosforilasi oksidatif, NADH dibentuk kembali menjadi NAD^+ , yang diperlukan untuk kelanjutan produksi ATP dari glikolisis. Pada kondisi hipoksia, produksi ATP dari perubahan glukosa ke piruvat dipenuhi oleh kelanjutan produksi NAD^+ , melalui perubahan piruvat ke laktat.^{6-7,11}

Proses oksidasi glukosa menjadi piruvat atau laktat menggunakan ATP untuk proses fosforilasi fruktosa 6 fosfat menjadi fruktosa 1,6 difosfat. Walaupun demikian energi yang dihasilkan dalam bentuk ATP pada proses glikolisis lebih banyak dari energi yang digunakan. ATP dihasilkan pada tahap pemecahan 1,3-difosfoglisarat dan fosfopenopiruvat. Setiap 2 molekul ATP yang digunakan 1 molekul glukosa, 4 molekul ATP akan dihasilkan dari pemecahan 1 molekul glukosa tersebut, jadi proses glikolisis ini menghasilkan 2 molekul ATP. Dibandingkan dengan siklus TCA, energi yang dihasilkan dari glikolisis lebih kecil, akan tetapi glikolisis mempunyai satu fungsi unik, yaitu kemampuannya untuk menghasilkan ATP dalam keadaan anaerob atau disebut glikolisis anaerob.¹¹

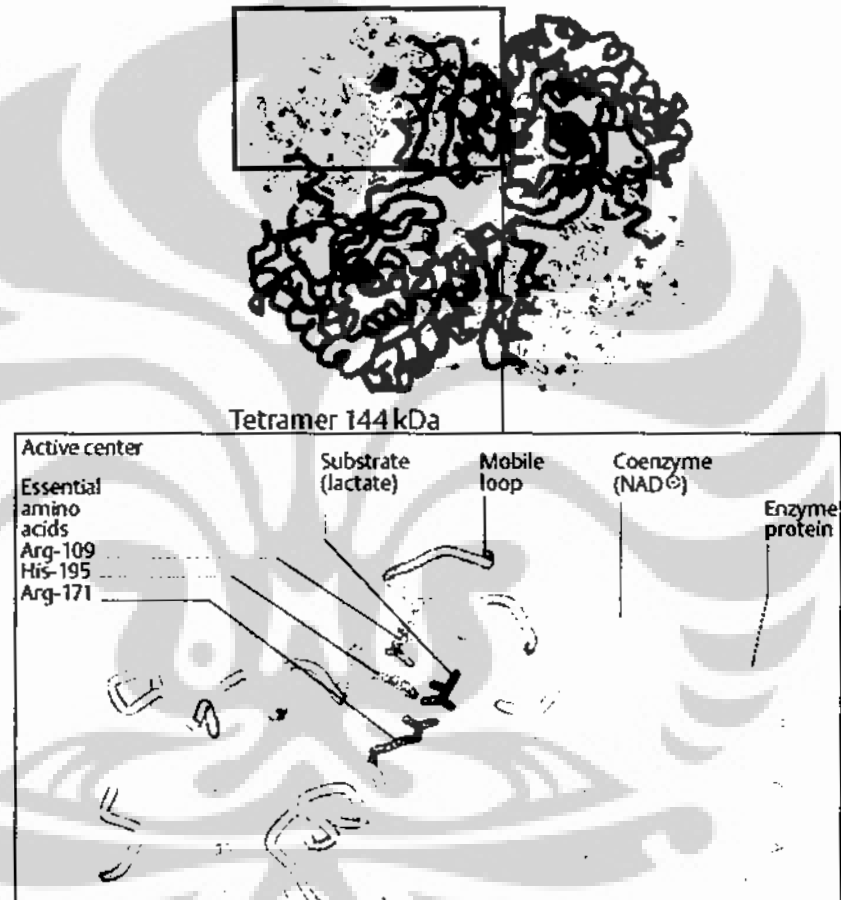
Proses glikolisis anaerob pertama kali dikemukakan oleh Louis Pasteur pada tahun 1860. Pasteur mengumumkan hasil penelitiannya pada ragi, yang menunjukkan pada kondisi anaerob ragi mengkonsumsi glukosa lebih banyak dibanding kondisi aerob. Ia menyimpulkan oksigen menghambat fermentasi dan konsumsi glukosa berbanding terbalik dengan ketersediaan oksigen. Hal ini berarti bahwa glikolisis dapat terjadi dalam keadaan hipoksia. Pasteur mendapat penghargaan untuk penelitiannya dan secara umum penelitiannya dikenal dengan efek Pasteur.¹⁻²

Regulasi glikolisis terdapat pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim hexokinase, fosfofruktokinasee dan piruvat kinase. Ketiganya merupakan reaksi yang tidak dapat balik (*irreversible*) pada proses glikolisis. Fosfofruktokinase dapat dihambat oleh konsentrasi ATP yang cukup di dalam sel.

2.3 Enzim Laktat Dehidrogenase

2.3.1 Struktur dan fungsi enzim laktat dehidrogenase

Struktur enzim laktat dehidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) ditunjukkan pada gambar 2.2. Bentuk aktif LDH (144 kDa) merupakan bentuk tetramer yang terdiri atas 4 subunit. Masing-masing monomer dibentuk oleh rantai peptida yang terdiri atas 334 asam amino (36 kDa). Pada tetramer, subunit menempati posisi yang sama, dan masing-masing monomer mempunyai pusat aktif.¹³

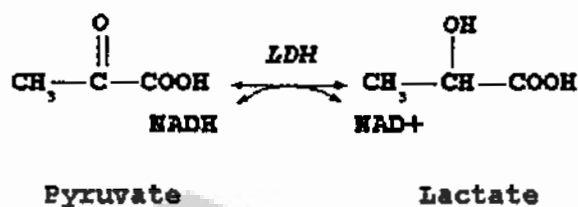


Gambar 2.2. Struktur Laktat Dehidrogenase

Ket: Biru: peptida, merah:substrat (laktat), kuning:koenzim (NAD⁺), hijau: asam amino esensial (arg-109, his-195, arg-171) yang secara langsung terlibat dalam katalisis, merah muda : lup peptida dibentuk oleh residu asam amino 98-111.¹³

Enzim laktat dehidrogenase (LDH) merupakan enzim yang berperan penting dalam glikolisis. Seperti terlihat pada gambar 2.3, enzim LDH dapat

mengkatalisis reaksi *reversible* piruvat menjadi laktat. Enzim LDH dapat dideteksi melalui kemampuannya dalam mengkatalisis reduksi piruvat dengan adanya NADH ataupun mengkatalisis oksidasi laktat dengan adanya NAD^+ .¹⁴

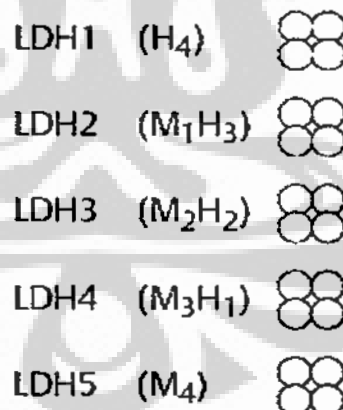


Gambar 2.3 Pembentukan laktat atau piruvat oleh enzim LDH

2.3.2 Isozim Laktat dehidrogenase

Isozim adalah enzim yang mempunyai beberapa bentuk berbeda, tetapi mengkatalisis reaksi yang sama. Perbedaan bentuk dari isozim satu dengan lainnya, disebabkan perbedaan sekuen asam amino, modifikasi ikatan kovalen dan perubahan konformasi struktur tiga dimensi.¹⁴

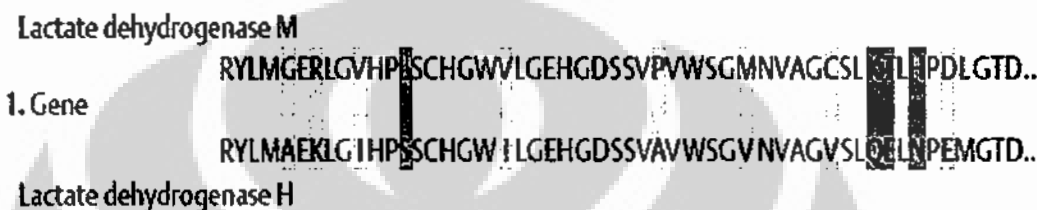
Enzim LDH terdiri atas lima isozim, yang disusun oleh dua jenis subunit, yaitu subunit H dan subunit M. Subunit-subunit ini bergabung membentuk empat jenis tetramer yaitu H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 , dan M_4 (Gambar 2.4).¹⁵



Gambar 2.4 bentuk tetramer isozim LDH¹³

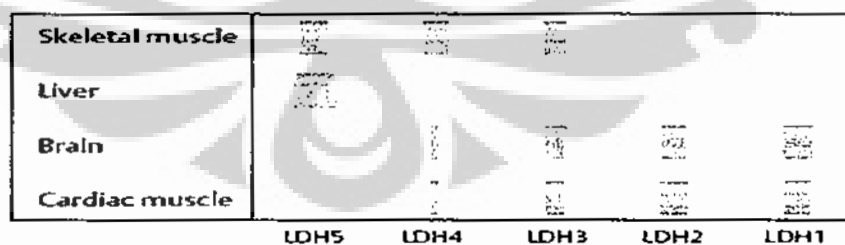
Subunit H dan M disandi oleh dua gen yang berbeda, yaitu untuk subunit H disandi oleh gen LDH H yang berlokasi di kromosom 12p12.2-p12.1, sedangkan

untuk subunit M di sandi oleh gen LDH M yang berlokasi di kromosom 11p15.4. Subunit H lebih menonjol di jantung, sedangkan homolognya subunit M di otot rangka. Perbedaan sekuen antara subunit H dan M terutama pada asam amino yang bersifat konservatif, antara lain glisin (G) dan alanin (A), arginin (R) dan lisin (K). Sedangkan bagian non konservatif yang berubah, seperti lisin (K) dan treonin (T) pada subunit M yang diganti dengan glutamin (Q) dan asam glutamat (E) pada subunit H secara berurutan (Gambar 2. 4).¹³



Gambar 2.4. Gen laktat dehidrogenase (biru= bagian konservatif, merah=bagian non konservatif).¹³

Secara keseluruhan, subunit H mengandung lebih sedikit residu asam amino bersifat basa dan lebih banyak mengandung asam amino dengan residu asam sehingga bermuatan negatif daripada subunit M. Hal ini yang menyebabkan isozim LDH dapat dipisahkan melalui elektroforesis. LDH1 bermigrasi paling cepat dan LDH5 bermigrasi paling lambat pada elektroforesis. Berikut adalah gambar pemisahan LDH dengan elektroforesis gel, pada berbagai jaringan.¹⁴



Gambar 2.6. Hasil pemisahan LDH oleh gel elektroforesis.¹

Isozim H_4 (LDH1) memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap substrat, dibanding isozim M_4 (LDH5). LDH 1 dapat dihambat secara alosterik oleh kadar piruvat yang tinggi sedangkan LDH 5 tidak. Isozim lainnya mempunyai sifat diantara keduanya bergantung pada rasio kedua jenis subunit. Pernah dikemukakan bahwa H_4 dirancang untuk mengoksidasi laktat menjadi piruvat, yang selanjutnya digunakan sebagai bahan bakar oleh jantung. Sedangkan M_4 , bekerja optimal pada arah sebaliknya yaitu mengubah piruvat menjadi laktat, sehingga glikolisis dapat terus pada keadaan anaerob.¹³

Pada kondisi normal, aktivitas LDH sangat sedikit ditemukan di dalam darah. Peningkatan LDH terdapat pada sel proliferasi dan sel tumor karena proses glikolisis yang meningkat.¹⁸

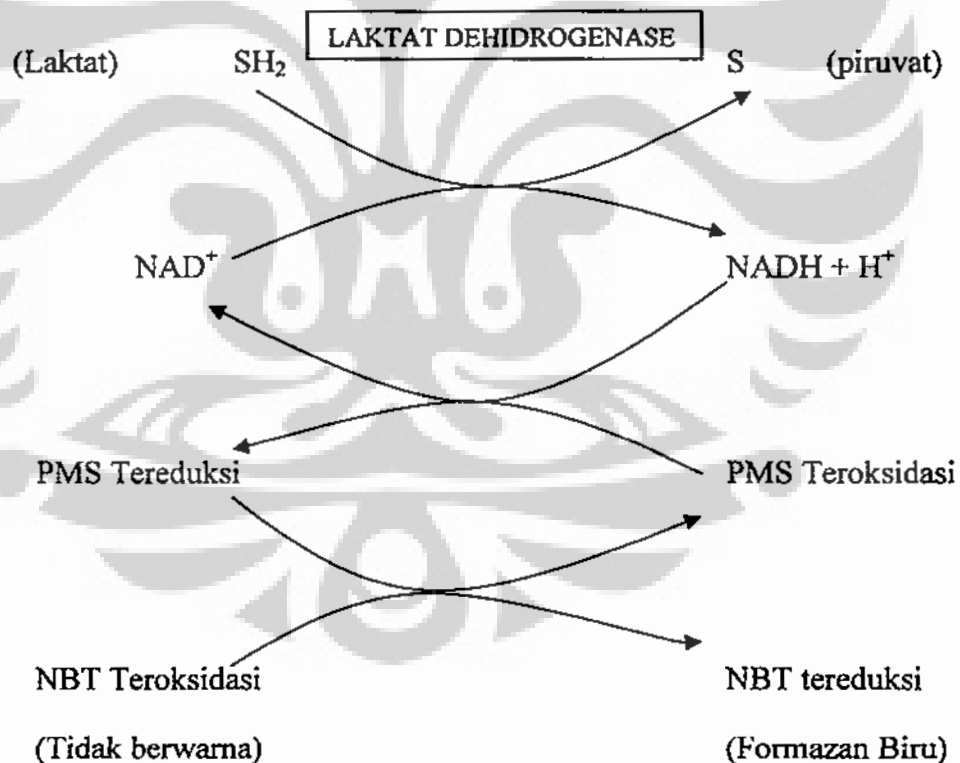
2.3.3 Elektroforesis Enzim Laktat Dehidrogenase

Elektroforesis merupakan cara pemisahan campuran senyawa berdasarkan berat molekul dan muatan yang berbeda-beda dalam suatu medan listrik. Elektroforesis pertama kali dikembangkan oleh Tiselius (tahun 1930). Protein tergolong ke dalam senyawa yang bila dilarutkan dalam pelarut dengan pH tertentu akan bermuatan. Hal ini disebabkan oleh sifat protein sebagai turunan asam amino yang selalu mempunyai kutub positif dan negatif (*zwitter ion*) yang diperankan paling sedikit oleh satu gugus NH_2^+ di satu ujung dan satu gugus $COOH^-$ di ujung lain. Dalam keadaan bermuatan ini senyawa akan bergerak dalam suatu medan listrik dari kutub negatif ke kutub positif atau sebaliknya. Jarak yang ditempuh oleh senyawa tersebut sangat ditentukan oleh muatan listrik tersebut. Makin besar muatannya, makin jauh jarak tempuhnya.²¹

Enzim Laktat dehidrogenase (LDH) merupakan suatu protein enzim yang ditemukan semua jaringan. Konsentrasi LDH yang tinggi terdapat dalam hati, otot rangka, jantung dan ginjal. Determinasi total LDH sedikit digunakan untuk diagnosis. Tes yang lebih pasti untuk diagnosis LDH dapat dilakukan dengan cara menaksirkan isoenzimnya.²³

Isozim laktat dehidrogenase dapat dilihat dengan melakukan elektroforesis, yang biasanya dilakukan dengan pH 8. Isozim tersebut mempunyai muatan yang berlainan pada pH 8 dan bermigrasi menuju lima daerah yang berlainan. Isozim tersebut dideteksi berdasarkan kemampuan masing-masing isozim mengkatalisis proses reaksi suatu zat pewarna yang tidak berwarna menjadi bentuk yang berwarna dan tidak larut.²¹

Prinsip yang mendasari reaksi elektroforesis enzim LDH yaitu rangkaian reaksi oksidasi dan reduksi. Laktat digunakan sebagai substrat yang mengandung NAD^+ , sehingga merupakan suatu substrat tereduksi. Bentuk teroksidasi zat pewarna redoks seperti NBT, pembawa (*carrier*) elektron intermediet yang diperlukan bagi pemindahan elektron dari NADH ke NBT. Berikut reaksi yang dirangkakan untuk mendeteksi LDH (Gambar 2.7).¹⁴



Gambar 2.7 Prinsip reaksi elektroforesis enzim LDH (SH_2 = Sulfhidril, S = Sulfur, NAD^+ = Nicotiamide Adenine Dinukleotide, NADH = Nicotiamide Adenine Dinucleotide Hydroxide, PMS = Phenil Metilsulfat, NBT = Nitro Bluetetrozolum)¹⁴

2.4 Penyu Hijau (*Chelonia mydas*) Sebagai Model Hewan Coba Hipoksia Toleran

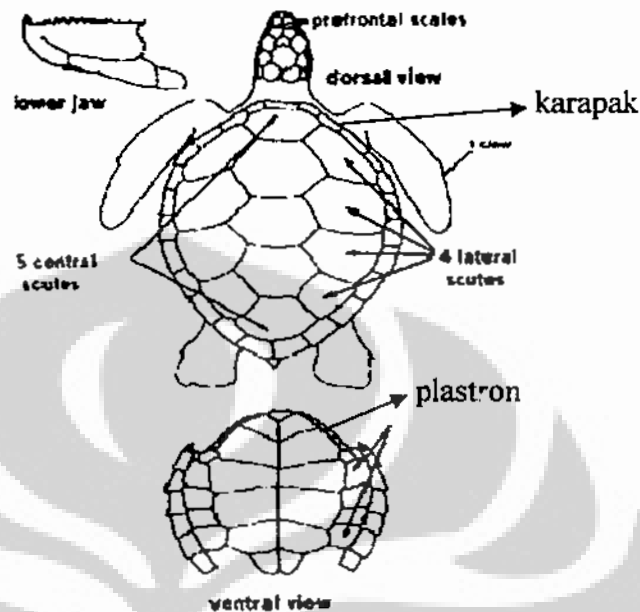
Penyu hijau merupakan model organisme toleran hipoksia. Hewan ini memiliki kemampuan adaptasi yang sangat baik terhadap keadaan lingkungan rendah oksigen. Aktivitas hidup penyu sebagian besar berada di bawah permukaan laut. Hewan ini memiliki kemampuan menyelam dalam waktu yang lama dengan hanya mengandalkan organ paru untuk pernafasannya.⁸ Bahkan penyu tetap bertahan hidup pada lingkungan anoksia selama 12-18 minggu pada lingkungan dengan suhu 3⁰C.¹⁹

Penyu Hijau (*Chelonia mydas*) merupakan salah satu penyu yang tercatat sebagai *endangered species* oleh IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). Penyu hijau hampir terdapat di semua pantai peneluran di Indonesia. Klasifikasi dari penyu hijau adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Classis	: Reptilia
Ordo	: Testudinata
Familia	: Cheloniidae
Genus	: Chelonia
Spesies	: <i>Chelonia mydas</i> (Linnaeus, 1978) ²⁰

Karapak penyu hijau terbagi menjadi dua bagian besar, yaitu karapak punggung yang tertutup oleh kulit seperti sisik yang juga merupakan tulang dan karapak perut (*plastron*) yang juga ditutupi oleh sisik. Karapak berwarna coklat kehijauan, oleh karena itu disebut penyu hijau, sedang plastronnya berwarna kekuning-kuningan. Kepalanya relatif lebih besar dibandingkan spesies penyu lainnya dan hampir seluruhnya tertutup sisik, sehingga membuat tengkoraknya sangat kuat. Pada kepala terdapat mulut yang menyerupai paruh burung dan tidak

bergigi. Selain itu juga terdapat lubang hidung dan mata yang besar terletak di kedua sisi kepalanya (Gambar 2.8).²⁰



Gambar 2.8 Penyu hijau (*Chelonia mydas*), MarineBio_org.htm

Penyu hijau bergerak dengan menggunakan keempat kakinya yang menyerupai dayung dan tidak berjari, namun mampu berfungsi sebagai jari. Kaki penyu berkuku, pada penyu dewasa kuku-kuku tersebut bagaikan kunci yang melengkung. Penyu mempunyai ekor, dan pada ekor ini terdapat kloaka yang berfungsi sebagai tempat keluarnya kotoran dan telur penyu. Ekor pada penyu jantan dewasa umumnya lebih panjang dan disanalah terletaknya penis²⁰.

Panjang tubuh penyu hijau dewasa dapat mencapai 1 meter dengan berat 180 kg. Sedangkan panjang tubuh tukik (penyu yang baru menetas) sekitar 50mm dengan panjang sekitar 25 gram. Karapak tukik hijau berwarna hitam kehijauan dan plastronnya berwarna putih²⁰.

Berdasarkan usianya, penyu dikelompokkan ke dalam 5 kategori yaitu:

- tukik (*juvenile*) yaitu saat menetas dan masih terlihat tali pusarnya hingga minggu pertama penetasan
- muda (*young*) yaitu saat tali pusar tukik tidak terlihat lagi atau hilang

- remaja (*sub adult*) yaitu belum matang kelamin
- dewasa (*adult*) yaitu penyu sudah matang kelamin dan memiliki panjang car
- tua (*old*) yaitu saat produksi telur menurun atau banyak yang gagal menetas dan bentuk telurnya tidak normal

Penyu menghabiskan sebagian besar hidupnya dibawah permukaan air, menyelam untuk mencari akan atau menghindari dari serangan predator. Bertahan dari iklim dingin dengan cara hibernasi di bawah permukaan air dilakukan oleh sebagian penyu agar terhindar dari temperatur beku. Mekanisme tersebut adalah upaya penyu agar dapat bertahan dalam kondisi lingkungan dengan kadar oksigen yang sangat sedikit (hipoksia).²⁸

Respirasi aerob merupakan mekanisme yang dilakukan oleh penyu untuk dapat mendukung penyelaman yang singkat. Tetapi untuk penyelaman yang lebih lama misalnya saat musim dingin, penyu memerlukan strategi adaptasi lain untuk dapat bertahan hidup. Menurut storey bahwa untuk penyelaman yang lama, hewan yang bernafas dengan paru-paru ini melakukan metabolisme respirasi anaerob.⁸

Respirasi anaerob dilakukan penyu saat menyelam adalah untuk menjaga jaringan tubuh dari kerusakan akibat hipoksia. Jika dilihat dari tingginya aktivitas penyu didalam air, maka penyu pasti memerlukan lebih banyak ATP sebagai sumber energinya.^{2,28}

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen in vivo. Hewan coba pada penelitian ini yaitu tikus (*Rattus sp. Strain Sprague Dawley*) dan penyu hijau (*Chelonia mydas*). Bahan yang diperiksa adalah otot betis (gastromenius).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No.6, Jakarta Pusat. Waktu penelitian pada Januari 2009 sampai Maret 2010.

3.3 Penetapan Jumlah Sample Penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 jenis hewan coba yaitu tikus dan tukik. Tikus dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu kelompok pertama adalah tikus normoksia atau kontrol atau tanpa perlakuan. Kelompok kedua adalah tikus yang mendapat perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia. Kelompok hipoksia dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan rentang waktu paparan hipoksia yang berbeda-beda, antara lain hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Tukik penyu hijau (*Chelonia mydas*) yang merupakan model hewan hipoksia toleran digunakan sebagai kontrol positif.

Penetapan jumlah ulangan sample penelitian ditetapkan berdasarkan rumus Federer²⁰, yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dimana : t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah sample dalam tiap perlakuan

Berdasarkan rumus diatas, dimana t atau jumlah perlakuan sama dengan 6, yaitu tikus normoksia, tikus hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari, serta tukik, maka didapatkan jumlah minimal tikus untuk masing-masing perlakuan adalah:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n-6 \geq 15$$

$$n \geq 21/5$$

$$n \geq 4,2$$

Jadi jumlah ulangan yang dapat digunakan minimal 4 hewan coba dalam satu kelompok.

3.4 Persiapan bahan otot

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium lanjutan Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Otot tikus yang digunakan berasal dari jaringan otot tikus normoksia dan tikus yang telah diperlakukan hipoksia pada penelitian sebelumnya. Sediaan otot tersebut disimpan pada suhu -80°C .

Pada penelitian ini juga menggunakan otot tukik dari tukik yang berumur 25 hari. Tukik diperoleh dari peneliti lain, yang telah berhasil menetasakan telur penyu sampai menjadi tukik. Telor penyu tersebut berasal dari pantai pangumbahan Sukabumi Jawa Barat atas ijin Departemen Kehutanan Indonesia dan Yayasan Kelestarian Penyu Hijau Indonesia. Penggunaan penyu ini telah lolos uji Komisi Etik Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2008, PHKA Departemen Kehutanan Republik Indonesia melalui Surat Keputusan 136/IV-SET/2008.

3.5 Pembuatan homogenate otot tikus dan penyu

3.5.1 Bahan

Otot tikus jantan *Sparaque Dawley*, otot penyu, dapar fosfat isotonik (PBS = *phosphat buffer saline*) 0,1M, pH 7,4, es, es kering dan aquades.

3.5.2 Alat

Homogenizer, sentrifugasi, tabung (mikrotube), mikropipet, tips

3.5.3 Cara Kerja

Sebanyak 0,1 gram jaringan otot, dimasukkan ke dalam 1mL larutan PBS 0,1M pH 7,4. Pembuatan homogenat jaringan otot dilakukan dengan menggunakan homogenizer dalam kondisi dingin. Setelah itu dipisahkan dengan sentrifugasi pada

5000 rpm selama 10 menit. Supernatan (bagian atas) diambil dan disimpan dalam suhu -80°C .

3.6 Pengukuran kadar protein pada panjang gelombang 280 nm

3.6.1 Bahan

Aquabides, larutan standar albumin sapi (BSA), homogenat otot tikus dan penyusu

3.6.2 Alat

Spektrofotometer, peralatan gelas, pipet mikro

3.6.3 Cara Kerja

Sebanyak 6 larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi masing-masing 0.05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, dan 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian larutan homogenat diencerkan sebanyak 20 kali. Setelah itu baca serapan pada panjang gelombang 280 nm. Kadar protein dihitung dengan membandingkan serapan larutan homogenat terhadap kurva standar. Protein menyerap cahaya pada daerah ultraviolet dengan panjang gelombang 280 nm. Serapan cahaya terutama disebabkan oleh adanya residu asam amino triptofan dan tirosin yang terdapat dalam protein tersebut.

3.7 Pengukuran konsumsi glukosa oleh jaringan otot

3.7.1 Bahan

Homogenat otot tikus dan penyusu, Glukosa ST kit (ST Reagensia Cat No.013-0248), larutan trikloroasetat (TCA) 8%

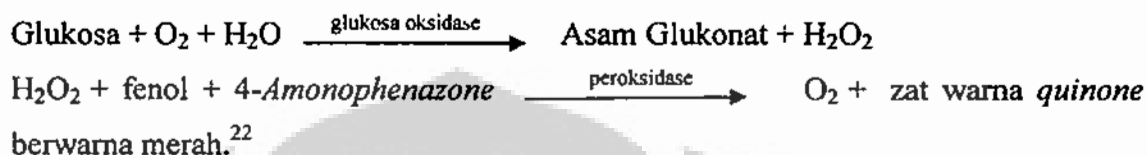
3.7.2 Alat

Spektrofotometri (Biorad), penangas air suhu 37°C , stopwatch, sentrifugasi, vortex, tabung (mikrotube), mikropipet, tips

3.7.3 Cara Kerja

Sebanyak 100 μL homogenat jaringan otot ditambah 100 μL larutan glukosa dengan kadar 100 mg/dL, jadi kadar awal glukosa dalam homogenat sebanyak 50 mg/dL. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C , kemudian diberi larutan TCA 8%

sebanyak 10 μL . Setelah itu homogenat disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit, ambil supernatan untuk pemeriksaan kadar glukosa. Kadar glukosa diukur dengan glukosa ST kit (ST Reagensia Cat No.013-0248), yang menggunakan rangkaian enzim glukosa oksidase, peroksidase, H_2O_2 , fenol dan 4-aminofenazon. Reaksinya adalah sebagai berikut:



Prosedur pengukuran kadar glukosa dengan menggunakan glukosa ST kit, tertera pada tabel dibawah ini:

Tabel 3.1. Pengukuran kadar glukosa dengan Glukosa ST kit:

	Blanko	Standard	Uji
Aguadest	10 μL	-	-
Standard	-	10 μL	-
Lat. uji	-	-	10 μL
Reagensia warna	1000 μL	1000 μL	1000 μL

Kocok sampai rata, inkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit,
Baca absorbance test dan standard terhadap blanko pada gelombang 507 nm

Perhitungan kadar glukosa yang diukur dengan kit:

$$\text{Glukosa (mg/dL)} = \text{abs.test/abs. Standard} \times \text{kadar standard}$$

Kadar standar 200 mg/dL

3.8 Pengukuran aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH)

3.8.1 Bahan

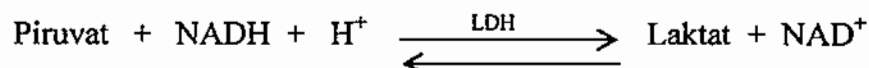
Homogenat otot tikus dan penyu, kit LDH FS (DGKC Cat No.1970).

3.8.2 Alat

Spektrofotometri (Biorad), stopwatch, sentrifugasi, tabung (mikrotube), mikropipet, tips

3.8.3 Cara kerja

Kit LDH FS ini terdiri atas dua reagen, yang pertama (R1) mengandung dapar fosfat dan piruvat. Reagen kedua (R2) mengandung dapar dan NADH. Prinsip pengukuran aktivitas enzim LDH pada kit ini, adalah:



Pengukuran aktivitas enzim LDH ini dilakukan pada suhu 25⁰C. Pada tahap persiapan dibuat larutan monoreagen dari reagen R1 dan R2, dengan komposisi 4:1. Sebanyak 20 μ L homogenat dicampur dengan 1000 μ L monoreagen. Serapan kemudian dibaca pada panjang gelombang 340 nm. Dalam reaksi yang melibatkan NAD⁺ atau NADH⁺ (enzim-enzim dehidrogenase), misalnya pada reaksi oksidasi laktat atau reduksi piruvat menggunakan panjang gelombang 340 nm. Oksidasi NADH menjadi NAD⁺ terjadi disertai dengan penurunan densitas optik (OD, *optical density*) pada 340 nm, yang sama dengan jumlah NADH yang dioksidasi. Demikian pula, jika NAD⁺ direduksi, OD pada 340 nm akan meningkat sebanding dengan jumlah NADH yang terbentuk. Perubahan OD pada 340 nm ini dapat dimanfaatkan bagi pemeriksaan analisis kuantitatif setiap enzim dehidrogenase. Kecepatan penurunan OD pada 340 nm akan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Penurunan OD diamati selama 3 menit. Aktivitas enzim LDH dihitung, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min sampel} \times 8095 \text{ (faktor yang tertulis pada kit)}$$

3.9 Elektroforesis Enzim

3.9.1 Bahan

Kit Titan Gel LD Isoenzyme (terdiri atas Titan Gel LD Isoenzyme Plate, Titan Gel LD Isoenzyme Buffer, Titan Gel LD Isoenzyme Reagent, Titan Gel LD Isoenzyme Diluent, Titan Gel Blotter A, Titan Gel Blotter B, Titan Gel Blotter D, dan Titan Gel LD Templates) Asam Asetat 10%

3.9.2 Alat

Titan gel chamber, oven, power supply, titan gel isoenzyme chamber, development slides, mikropipet, tips, pipet ukuran untuk 5mL.

3.9.3 Cara Kerja

Kertas saring yang telah dibasahi diletakkan di dalam wadah yang tahan pada suhu 100⁰C. Letakkan wadah tersebut pada oven atau inkubator yang telah diset suhunya menjadi 45 ⁰C. Bufer elektroforesis laktat dehidrogenase dilarutkan pada

1500 mL aquabides. Ambil 35 mL bufer tersebut dan dimasukkan ke dalam masing-masing bagian dalam bak elektroforesis. Sebelum sampel diaplikasikan lempeng gel agarose, dialasi kertas saring. Pada area aplikasi lempeng dikeringkan dengan kertas saring, lalu template diletakkan pada area aplikasi dan pastikan tidak ada gelembung di area tersebut. Sebanyak 3 uL sample dimasukkan pada lubang template, lalu didiamkan selama 3 menit. Template dikeringkan kembali dengan kertas pengering, dan didiamkan selama 3 detik.

Setelah sample diaplikasikan, lempeng yang dialasi kertas saring diletakkan di dalam bak elektroforesis, dengan posisi agarose menghadap kebawah, pastikan kutub positif (+) lempeng sesuai dengan kutub kutub positif (+) bak elektroforesis. Kemudian arus listrik dijalankan pada tegangan 100 volt selama 15 menit. 3-4 menit sebelum elektroforesis selesai, reagen pewarna dilarutkan dengan 1 mL pelarutnya.

Setelah elektroforesis, reagen pewarna dituangkan di sepanjang pinggir kutub positif lempeng, dan ratakan keseluruhan permukaan lempeng. Lempeng ditempatkan pada suhu 45 °C selama 25 menit, lalu dicuci dengan menambahkan asam asetat 10% pada rotor secara pelan selama 2 menit. Tahap pencucian ini dilakukan sekali lagi selama 1 menit dan terakhir dikeringkan pada inkubator bersuhu 60 °C selama 5 menit.

3.10 Pembacaan Aktivitas Relatif Isozim LDH

Aktivitas relatif isozim LDH adalah aktivitas tiap pita hasil elektroforesis dibandingkan dengan aktivitas LDH sampel. Aktivitas relatif isozim LDH dihitung dengan menggunakan komputer, perangkat lunak *adobe photoshop CS* :

- Nilai integral, diperoleh dari perkalian antara nilai mean (m) dan nilai pixel (p) masing-masing bercak pita
- Seluruh nilai integral masing-masing bercak pita dijumlahkan:

$$a + b + c + d + e = f$$

- Aktivitas relatif isozim LDH, dihitung dengan rumus:

$$\frac{d}{f} \times \text{aktivitas LDH} = X$$

dimana : a = nilai integral pita LDH 5
 b = nilai integral pita LDH 4
 c = nilai integral pita LDH 3
 d = nilai integral pita LDH 2
 e = nilai integral pita LDH 1
 f = jumlah nilai integral
 X = Aktivitas isozim LDH

3.11 Pengelohan dan Penyajian Data

Data diolah dengan menggunakan software SPSS 17.0. Uji normalitas data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Berdasarkan hasil tersebut, maka dipilih uji statistik dengan metode Kruskal Wallis untuk menguji perbedaan dan uji statistik Spearman's Rho untuk menguji hubungan antara masing-masing kelompok perlakuan. Perbedaan antara variabel dinyatakan bermakna jika $p < 0,05$.

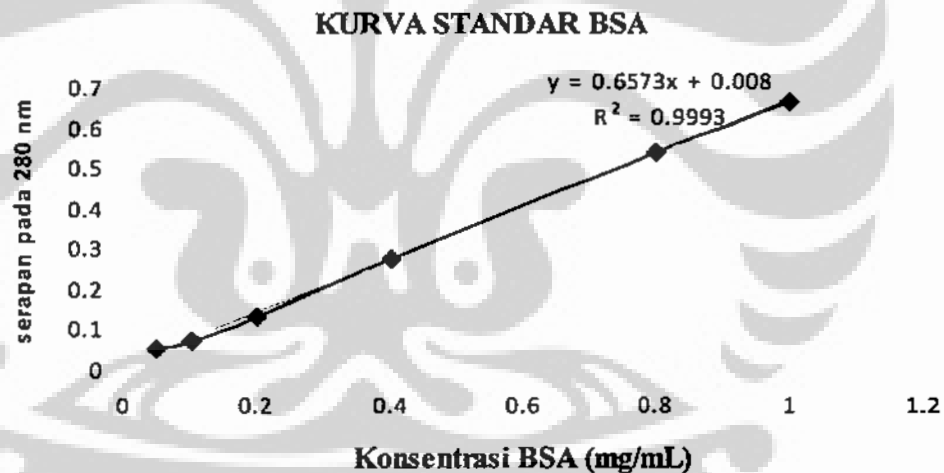
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL PENELITIAN

4.1.1. Kadar protein jaringan otot

Protein otot diukur dengan mengukur absorbansi albumin serum sapi (*Bovine Serum Albumin* = BSA) sebagai standar pada λ 280 nm. Untuk tujuan tersebut dibuat kurva standar dengan menggunakan sederetan konsentrasi BSA, dimulai dari 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL sampai 1 mg/mL. Hasilnya, diperoleh hubungan linear antara absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dengan berbagai konsentrasi BSA antara 0,05 mg/mL sampai 1 mg/mL. (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Persamaan garis yang diperoleh ialah $y = 0,6573x + 0,008$. Persamaan ini menunjukkan bahwa pada daerah konsentrasi BSA yang digunakan untuk standar, absorbansi pada panjang gelombang 280 nm berbanding lurus dengan konsentrasi. Dari persamaan tersebut, didapatkan kadar protein jaringan otot dalam satuan mg/mL. Hasil perhitungan rata-rata kadar protein jaringan otot tiap kelompok, setelah dikoreksi dengan pengenceran disajikan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Kadar Protein jaringan otot (mg/mL)

	Kelompok					
	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari	Hipoksia 21 hari	Tukik
Mean	2,763	2,788	2,703	3,177	2,761	2,100*
N	5	5	5	5	4	5
SD	0,245	0,067	0,033	0,374	0,186	0,286
SEM	0,109	0,030	0,015	0,167	0,093	0,128

$p < 0.05$: terdapat perbedaan bermakna antara kadar protein pada masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa kadar protein otot tikus normoksia, hipoksia 1 hari dan 7 hari hampir sama. Peningkatan kadar protein otot tikus terjadi pada hipoksia 14 hari, namun menurun kembali pada hipoksia 21 hari. Hasil pengukuran kadar protein otot tukik adalah paling kecil.

Uji normalitas dengan Kolmogorov Smirnov menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal. Analisis lalu dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan metode Kruskal Walls. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar protein antara kelompok normoksia dengan tukik.

4.1.2. Hasil pengukuran konsumsi glukosa jaringan otot

Pengukuran konsumsi glukosa dilakukan dengan pemberian glukosa pada homogenat dengan kadar tertentu, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian diukur kadar glukosa yang tersisa. Konsumsi glukosa ialah selisih antara kadar glukosa awal dalam homogenat dengan kadar glukosa yang diukur setelah inkubasi dibagi dengan kadar protein. Hasil perhitungan rata-rata konsumsi glukosa per protein tiap kelompok dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Konsumsi glukosa per protein jaringan otot (mg/mg)

	Kelompok					
	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari	Hipoksia 21 hari	Tukik
Mean	2,568	2,478	2,191	6,926*	7,314*	12,149*
N	5	5	5	5	4	5
SD	0,964	0,385	1,041	1,420	0,080	2,425
SEM	0,431	0,172	0,466	0,635	0,040	1,085

$p < 0.05$: terdapat perbedaan bermakna antara konsumsi glukosa per protein pada masing-masing kelompok perlakuan.

Pada tabel tersebut tampak, bahwa lamanya periode hipoksia pada tikus menyebabkan peningkatan konsumsi glukosa. Pada tukik, walaupun tidak dilakukan percobaan pemaparan hipoksia memberikan hasil konsumsi glukosa otot jauh lebih besar dibandingkan dengan konsumsi glukosa tertinggi pada tikus.

Uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsumsi glukosa antara kelompok normoksia dengan hipoksia 14 hari dan 21 hari, juga kelompok normoksia dengan tukik.

4.1.3. Hasil pengukuran aktivitas laktat dehidrogenase jaringan otot

Aktivitas spesifik LDH dinyatakan dalam unit enzim. *International Union of Biochemistry* mengartikan satu unit aktivitas spesifik enzim sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk mengolah 1 μ mol substrat atau menghasilkan 1 μ mol produk per detik per protein dalam kondisi yang sesuai. Berdasarkan definisi tersebut, dihitung aktivitas spesifik LDH pada masing-masing kelompok, hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Aktivitas spesifik laktat dehidrogenase jaringan otot (U/g protein)

	Kelompok					
	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari	Hipoksia 21 hari	Tukik
Mean	0,983	2,524*	2,398*	2,180*	1,215	201,882*
N	5	5	5	5	4	5
SD	0,092	0,886	0,556	1,172	0,230	85,584
SEM	0,041	0,396	0,249	0,524	0,116	38,274

$p < 0.05$: terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas spesifik LDH pada masing-masing kelompok perlakuan.

Aktivitas spesifik LDH tikus hipoksia lebih tinggi dibandingkan dengan tikus normoksia, akan tetapi aktivitas spesifik LDH menurun sejalan dengan lamanya hipoksia. Aktivitas spesifik LDH tertinggi terdapat pada otot tukik.

Uji Kruskal Walls menunjukkan bahwa terdapat terdapat perbedaan aktivitas spesifik LDH pada kelompok normoksia dengan hipoksia 1 hari, 7 hari dan 14 hari, juga normoksia dengan tukik.

4.1.4. Hasil elektroforesis enzim laktat dehidrogenase jaringan otot

Hasil elektroforesis (Gambar 4.4) LDH otot memperlihatkan 2 hal yang perlu diperhatikan:

1. Otot tikus, baik pada keadaan normoksia maupun hipoksia, memperlihatkan 5 isozim (LDH 1 – 5) pada berbagai periode lamanya hipoksia yang berbeda. Pola distribusi isozim tetap sama dan selalu didominasi oleh isozim LDH 4 dan 5
2. Otot tukik, sebaliknya hanya mempunyai 1 isozim saja yaitu isozim LDH 4.



Gambar 4.2. Elektroforesis enzim LDH

(keterangan: 1 = otot tikus hipoksia 1 hari, 2 = otot tikus hipoksia 7 hari, 3 = otot tikus normoksia, 4 =otot tikus hipoksia 14 hari, 5 =otot tikus hipoksia 21 hari, 6 = otot tukik)

Hasil elektroforesis kemudian dianalisis menggunakan program *adobe photoshop CS*, didapatkan jumlah relatif aktivitas isoenzim LDH. Tabel 4.4. menunjukkan nilai isozim LDH 4 dan 5, pada otot tikus normoksia dan hipoksia, lebih tinggi dibanding LDH 1, LDH 2 dan LDH 3. Jumlah relatif aktivitas isozim LDH kelompok hipoksia 1, 7 dan 14 hari lebih tinggi dibanding dengan kelompok normoksia. Sedangkan hipoksia 21 hari, jumlah relatif aktivitas isozim LDHnya hampir sama dengan dengan normoksia. Pada tukik aktivitas isozim LDHnya paling tinggi dan hanya mempunyai satu isozim.

Tabel 4.4. aktivitas relatif isoenzim laktat dehidrogenase jaringan otot

	Kelompok				
	LDH 5	LDH 4	LDH 3	LDH 2	LDH 1
Normoksia	1,205	1,197	1,175	1,044	0,989
Hipoksia 1 hari	3,230	3,257	3,193	2,823	2,611
Hipoksia 7 hari	3,389	3,379	3,160	2,445	2,402
Hipoksia 14 hari	3,160	3,154	2,980	2,636	2,525
Hipoksia 21 hari	1,105	1,118	1,124	1,024	0,970
Tukik		317,499*			

$p > 0,05$: tidak terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas relatif isoenzim pada kelompok normoksia dan berbagai hipoksia.

Uji Kruskal Wallis menghasilkan tidak terdapat perbedaan antara aktivitas relatif isoenzim pada kelompok normoksia dan berbagai hipoksia. Pada tukik didapatkan hasil yang sebaliknya, yaitu aktivitas relatif isoenzim paling tinggi dan hanya mempunyai isozim LDH 4 saja. Hasil ini sangat berbeda dengan hasil pada kelompok tikus normoksia dan hipoksia.

4.2. PEMBAHASAN

Otot rangka merupakan jaringan yang sangat berkembang dan sangat spesifik. Pada jaringan ini berlangsung perubahan energi kimia menjadi energi mekanik. Otot juga berfungsi untuk mempertahankan sikap tubuh (duduk, berdiri, tidur, dan lain-lain) dan pergerakan. Aktivitas ini merupakan ciri utama pada hewan. Selain yang tersebut di atas, otot rangka juga berperan dalam termogenesis dan merupakan organ metabolik yang penting untuk menghasilkan energi. Peran otot rangka yang besar, menjadikannya jaringan yang terbesar di dalam tubuh, sekitar 40-50% dari jumlah total jaringan manusia dewasa.^{26,29}

Otot rangka berkontraksi dan relaksasi secara bergantian. Sumber tenaga untuk kontraksi otot adalah ATP, yang sebagian sudah tersedia dalam bentuk ikatan dengan miofibril. ATP dalam otot selalu tersedia di otot tetapi dalam jumlah yang terbatas. Pada saat awal suatu aktivitas, penggunaan ATP berasal dari simpanan yang ada di otot sendiri. ATP yang sudah terpakai harus dibentuk kembali dengan proses metabolisme secara aerob, tetapi karena cadangan O_2

terbatas maka metabolisme bergeser ke anaerob. Pada metabolisme aerob, piruvat akan diubah menjadi CO_2 dan H_2O . Proses glikolisis aerob ini menghasilkan 36 ATP. Metabolisme anaerob adalah pemanfaatan glukosa dan glikogen dengan cara glikolisis tanpa O_2 dan tidak melibatkan rantai respirasi mitokondria. Proses anaerob menghasilkan 2 ATP dan laktat¹¹.

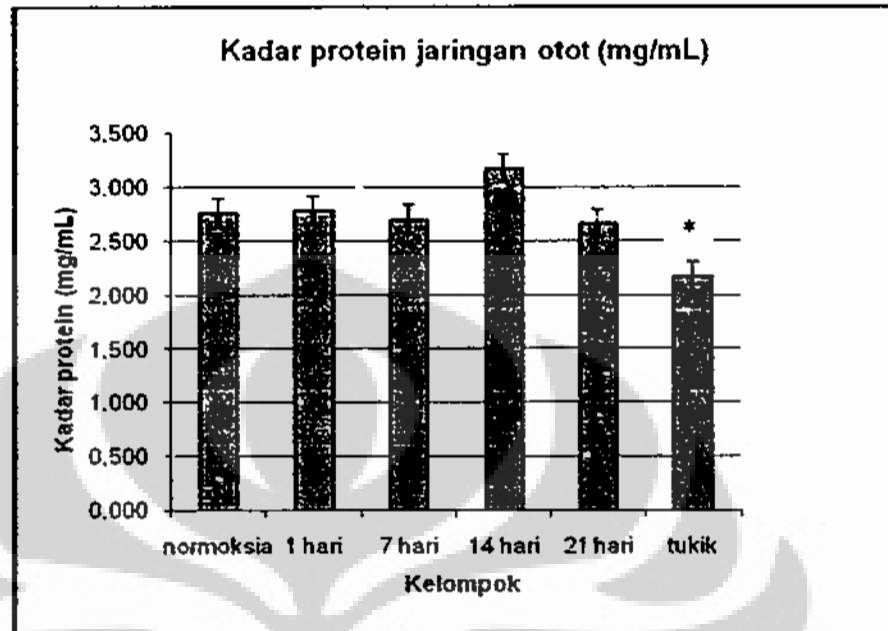
Otot rangka merupakan jaringan pertama yang dihubungkan dengan hipoksia, sebab sering dihadapkan pada keadaan tekanan rendah oksigen, misalnya selama olahraga. Otot sebenarnya salah satu jaringan yang paling tahan terhadap hipoksia, sebab otot mempunyai beberapa mekanisme untuk melindungi diri dalam keadaan hipoksia. Pertama, oksigen disimpan terikat dengan mioglobin, khususnya pada otot yang sering berkontraksi seperti otot rangka. Mioglobin akan mengambil oksigen dari hemoglobin dan akan melepaskannya hanya ketika tekanan oksigen pada sel otot menjadi lebih rendah. Peran mioglobin ini seperti cadangan darurat (*emergency reserve*).¹¹

4.2.1. Kadar protein jaringan otot normoksia, berbagai hipoksia dan penyul

Adaptasi sel otot terhadap kondisi hipoksia dapat dilihat dari perubahan protein pada masing-masing kelompok seperti terlihat pada gambar 4.3. Uji statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar protein otot tikus normoksia dengan hipoksia. Pada gambar 4.3. terlihat adanya kenaikan kadar protein pada hipoksia 14 hari dan penurunan kadar protein pada hipoksia 21 hari.

Pada hipoksia 21 hari terjadi penurunan kadar protein. Kondisi hipoksia akan menurunkan sel otot untuk mensintesis protein karena proses ini membutuhkan ATP. ATP yang dihasilkan melalui metabolisme aerob lebih tinggi dibandingkan energi yang dihasilkan oleh anaerob. Hal ini mengakibatkan sel-sel yang secara fisiologis menggunakan oksigen berada dalam kondisi kekurangan ATP pada keadaan hipoksia. Sel hidup perlu energi untuk kelangsungan hidupnya, dalam keadaan kekurangan oksigen (hipoksia) energi yang dihasilkan dari glikolisis anaerob jauh lebih sedikit dibandingkan glikolisis aerob. Glikolisis anaerob hanya menghasilkan 2 ATP, sedang glikolisis aerob menghasilkan 36 ATP. Jadi untuk jumlah energi yang sama perlu konsumsi glukosa 18 kali lebih banyak.³¹ Untuk memenuhi kebutuhan glukosa tersebut dapat diperoleh dari

proses glukoneogenesis yaitu proses pembentuk glukosa baru dari bahan lain, yaitu protein.

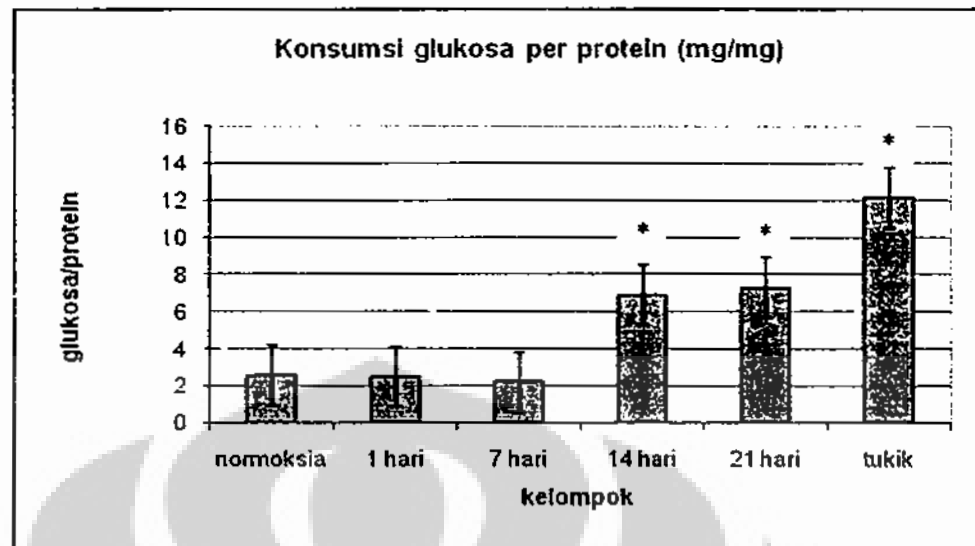


Gambar 4.3. Diagram batang kadar protein jaringan otot pada kelompok normoksia, hipoksia berbagai periode, dan tukik ($p < 0,05$ terhadap normoksia)

Kadar protein pada otot tukik berbeda dan nilainya lebih rendah dibanding dengan kelompok normoksia. Tukik merupakan hewan yang toleran hipoksia, proteinnya ada yang memiliki pemanjangan waktu paruh dibandingkan kondisi normoksia. Hal ini selain bermanfaat untuk menghindari penumpukan metabolit dan pengeluaran energi.⁸

4.2.2. Konsumsi glukosa jaringan otot pada kondisi normoksia, berbagai hipoksia dan penyusu

Gambar 4.4 dan uji statistik memperlihatkan konsumsi glukosa jaringan otot normoksia dengan hipoksia hari 1 dan 7 hari adalah sama. Hal ini dapat dikarenakan energi yang tersedia masih mencukupi sehingga hanya sedikit glukosa yang dioksidasi.



Gambar 4.4 Konsumsi glukosa pada kelompok normoksia, hipoksia berbagai periode dan tukik ($p < 0,05$ terhadap normoksia)

Peningkatan tajam konsumsi glukosa terjadi pada hipoksia 14 hari dan 21 hari. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan glikolisis anaerob sejalan lamanya pemaparan hipoksia. Dalam keadaan PO_2 normal, fosforilasi oksidatif merupakan penghasil energi utama sel. Akan tetapi ketika PO_2 turun sampai keadaan kritis, metabolisme berganti dengan menonaktifkan transfer elektron di mitokondria dan mengaktifkan glikolisis anaerob. Tanpa pengaktifan glikolisis anaerob, sel-sel akan mengalami defisit energi segera dan kematian di PO_2 yang rendah.¹ Dengan demikian glikolisis dapat terjadi pada keadaan anaerob, tetapi ini membatasi jumlah energi yang dilepaskan per mol glukosa yang dioksidasi. Energi yang dihasilkan dari glikolisis anaerob yaitu hanya 2 molekul ATP per molekul glukosa. Sedangkan ATP yang dihasilkan dari glikolisis aerob 18 kali lebih besar dari ATP yang dihasilkan glikolisis anaerob. Sebagai akibatnya, untuk memenuhi keperluan jumlah energi, akan lebih banyak glukosa yang harus mengalami glikolisis pada keadaan anaerob dibanding keadaan aerob.

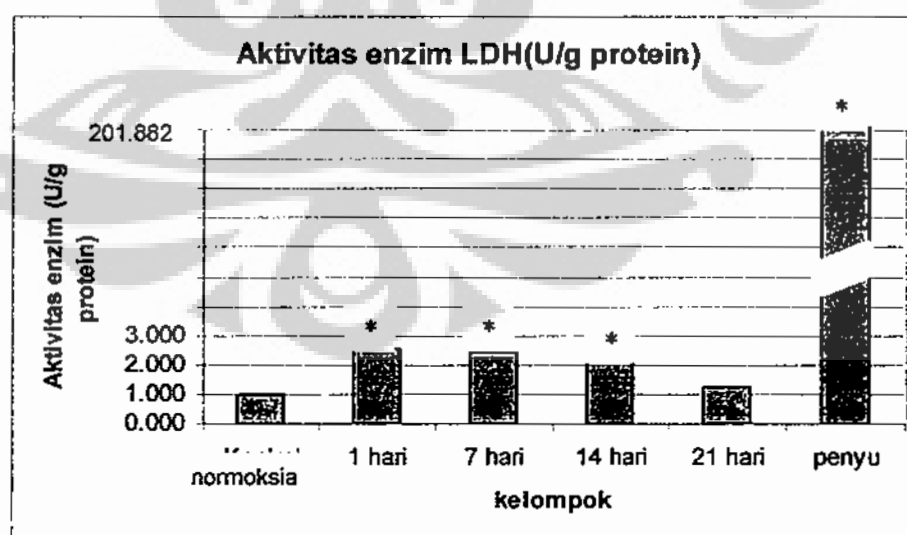
Konsumsi glukosa tertinggi terdapat pada penyu. Metabolisme glukosa yang tinggi, merupakan salah satu adaptasi jaringan otot pada penyu yang merupakan hewan hipoksia adaptif. Penyu merupakan hewan vertebrata yang dikenal toleran terhadap hipoksia. Beberapa spesies penyu mampu bertahan empat bulan dalam paparan hipoksia di suhu rendah selama hibernasi. Salah satu kunci

kelangsungan hidup dalam hipoksia berkepanjangan pada hewan tersebut adalah ketepatan produksi ATP dan pemanfaatannya.²⁸

4.2.3. Aktivitas spesifik laktat dehidrogenase jaringan otot pada kondisi normoksia, berbagai hipoksia dan tukik

Uji statistik dan gambar 4.5 memperlihatkan bahwa aktivitas spesifik LDH pada hipoksia lebih tinggi daripada kondisi normoksia. Hasil ini menunjukkan glikolisis anaerob meningkat pada keadaan hipoksia. Terjadi penurunan aktivitas enzim LDH dari hipoksia 7 hari sampai 21 hari walaupun aktivitas LDH masih di atas kelompok normoksia. Hal tersebut dapat disebabkan oleh karena adanya apoptosis sel. Menurut Ferdinal, pemaparan hipoksia terus menerus dapat menyebabkan kondisi sel menurun, bahkan dapat menyebabkan terjadinya apoptosis.²⁷

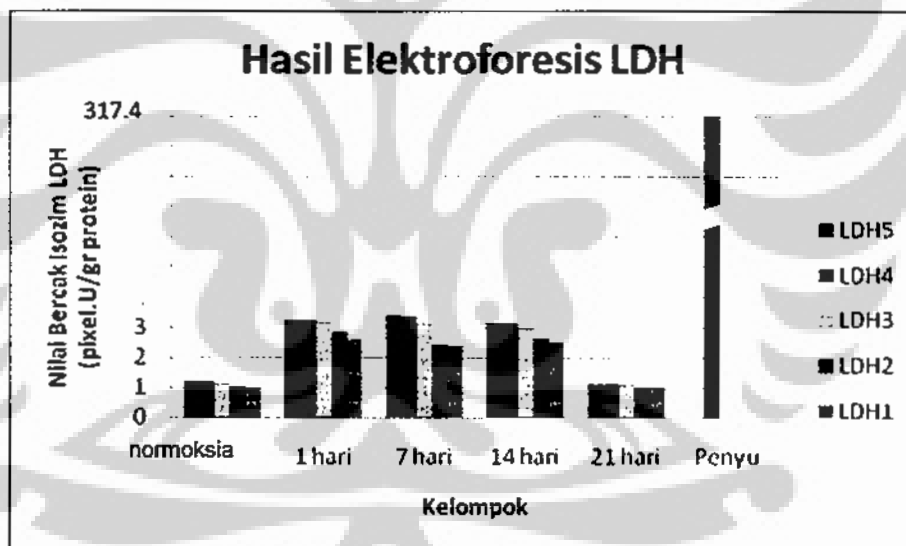
Pada penelitian ini didapatkan aktivitas spesifik LDH tukik yang belum terpapar hipoksia, 100 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tikus. Hal ini menunjukkan bahwa sudah terdapat mekanisme adaptasi metabolisme penyu terhadap hipoksia, walaupun belum terpapar hipoksia. Penelitian Duncan, menunjukkan adanya tingginya aktivitas spesifik LDH pada hati penyu air tawar. Peningkatan ini berkaitan dengan produksi energi anaerobik.³⁰



Gambar 4.5 Aktivitas enzim LDH pada kelompok normoksia, hipoksia berbagai periode dan tukik ($p < 0,05$ terhadap normoksia)

4.2.4. Pola elektroforesis enzim laktat dehidrogenase jaringan otot pada kondisi normoksia, berbagai hipoksia dan penyu

Hasil elektroforesis menunjukkan terdapat kelima isozim LDH pada jaringan otot tikus baik normal maupun hipoksia, dengan kadar yang berbeda-beda. Uji statistik membuktikan tidak terdapat perbedaan aktivitas relatif isozim LDH otot tikus normoksia dan berbagai hipoksia. Hal ini berarti tidak ada perubahan ekspresi gen isozim LDH, yang disebabkan kondisi hipoksia. Akan tetapi, hanya ada perubahan jumlah total aktivitas LDH. Gambar 4.6. memperlihatkan bahwa pada hipoksia aktivitas relatif isozim LDH 5 dan LDH 4 lebih tinggi dari isozim lain. Hal ini dikarenakan LDH 5 dan LDH 4 dapat bekerja optimum pada keadaan anaerob, mengkatalisis piruvat menjadi laktat. Pada hipoksia 21 hari, aktivitas relatif isozimnya menurun, dikarenakan paparan hipoksia yang sudah terlalu lama menurunkan kemampuan aktivitas enzim.



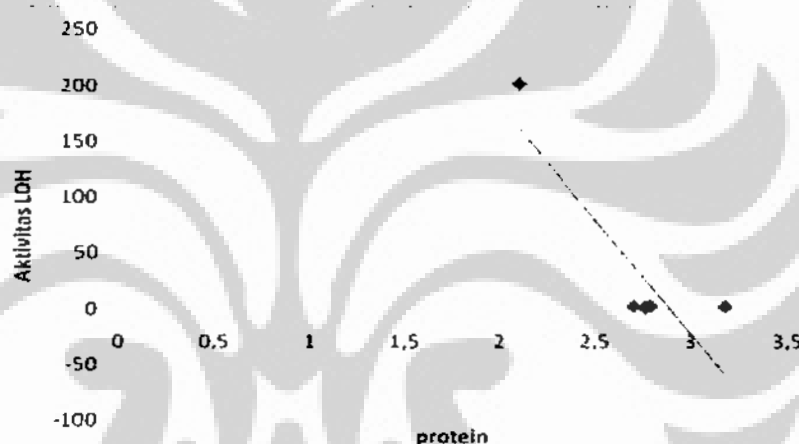
Gambar 4.6. Pola elektroforesis enzim LDH pada kelompok normoksia, hipoksia berbagai periode dan tukik

Berbeda dengan otot tikus, hasil elektroforesis otot tukik hanya menunjukkan 1 pita yaitu isoenzim LDH 4, dimana mempunyai subunit H_1M_3 . Subunit H bekerja pada kondisi aerob sedang subunit M sebaliknya, sehingga LDH4 lebih optimum bekerja pada kondisi anaerob. Hal ini menunjukkan

bahwa otot penyu, secara genetis sudah terkondisikan dapat hidup dalam keadaan hipoksia.

4.2.5. Hubungan antara kadar protein, konsumsi dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH)

Pada penelitian ini didapatkan adanya korelasi yang bermakna antara kadar protein terhadap aktivitas enzim laktat dehidrogenase (koefisien korelasi, $R=-0,523$, $p<0,05$) dengan menggunakan uji korelasi non parametrik Spearman's rho. Analisis korelasi tersebut pada penelitian ini menunjukkan hubungan tidak kuat dan negatif



Gambar 4.7. Kolerasi kadar protein terhadap aktivitas enzim laktat dehidrogenase (koefisien korelasi, $R=-0,523$, $p<0,05$)

Kolerasi kadar protein dengan aktivitas LDH, menunjukkan adanya pengaturan metabolisme sel terhadap kondisi hipoksia. Hal ini bertujuan untuk efesiensi ATP. Pengaturan metabolisme sel terhadap kondisi hipoksia terutama dengan cara meningkatkan produksi ATP dan pengurangan konsumsi ATP.⁸ Peningkatan produksi ATP dapat dicapai dengan meningkatkan aktivitas enzim LDH, sedangkan pengurangan konsumsi ATP dapat dengan cara menurunkan kadar protein. Penurunan kadar protein dapat disebabkan karena sintesis protein yang menurun dan adanya degradasi protein. Degradasi protein pada keadaan hipoksia untuk proses glukoneogenesis yaitu pembentukkan glukosa baru dari protein (bahan bukan karbohidrat).

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan

- 5.1.1 Konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tikus yang mengalami hipoksia lebih tinggi dari pada tikus normoksia.
- 5.1.2 Konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tukik (hewan toleran hipoksia) lebih tinggi dari pada tikus hipoksia maupun normoksia.
- 5.1.3 Pola elektroforesis enzim LDH otot tikus normoksia dan otot tikus hipoksia sama.
- 5.1.4 Pola elektroforesis enzim LDH otot tikus dengan otot tukik berbeda, pada otot tikus terdapat 5 isozim LDH sedang pada otot tukik hanya 1 isozim LDH yaitu isozim LDH 4.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain:

- 5.2.1 Perlu dilakukan pengenceran konsentrasi protein pada elektroforesis enzim LDH
- 5.2.2 Perlu dilakukan pengukuran laktat, yaitu produk yang terbentuk pada proses glikolisis anaerob, sehingga dapat menggambarkan lebih jelas perubahan glikolisis anaerob yang terjadi pada keadaan hipoksia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Webster KA. Evolution of The Coordinate Regulation Of Glycolytic Enzyme by Hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd.2003;206: 2911-22.
2. Storey KB. Biochemical Adaptation. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons, 2004. p.383-96.
3. Lutz PL. and Prentice H. Sensing and Responding to Hypoxia, *Molecular and Physiological Mechanisms*. Chicago.Integ and Comp.Bioll.. 2002;42:463-68.
4. Taylor CT, Pouyssegur JP. Oxygen, Hypoxia and Stress. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1113:87-94.
5. Bender DA and Mayes PA. Glycolysis and piruvat oxidation In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry* 28th edition. McGraw-Hills. New York. 2009. p.151-58.
6. Lieberman M and Allan DM. *Basic medical Biochemistry, a clinal approach* 3ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2009. p.341-420.
7. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int*. 1991;39:476-500.
8. Storey KB. Oxygen limitation and metabolic rate depression. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons,2004. p.415-42
9. Bender DA and Mayes PA. Carbohydrates of physiologic significance In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry* 28th edition. McGraw-Hills. New York. 2009.p.112-20
10. Vaupel P. et al.. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanism, and cellular response. *Oncologist*. 2004;9:4-9.
11. Alberti.K., The biochemical consequences of hypoxia. *J.Clin.Path*. 30: 14-20
12. Hames BD, Hooper NM, and Houghton JD. *Instant Notes in Biochemistry*. Springer. New York. 1997. p.229-37.
13. Koolman J, and Klaus HR. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme Stuttgart. New York: 2005.

14. Kennelly, PJ & Victor WR. Enzyme: Mechanism of Action In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. Harper's Illustrated Biochemistry 28th edition. McGraw-Hills. New York. 2009. p.56-59.
15. Latier, AL. Isoenzymes. Biology and Medicine Academic Press. 1970; London.
16. Bulakh, PM, Kowak, CN, Ranade SM, Chandovkar AG. LDH isoenzyme profile in pulmonary tuberculosis. *Ind. J. Tub.* 1983; 30: 116.
17. Michel IK. Lactate dehydrogenase 5(LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clinical and experimental metastasis.* 2005; 22:25-30.
18. Otsu N, Buhiro, Hirata M. Abnormal Lactate Dehydrogenase Isoenzyme in serum and tumor tissue. *Clin, Chem.* 1985;31:318-20.
19. Southwood A, Charler AD and David RJ. Metabolic and cardiovascular adjustments of juvenile green turtles to seasonal changes in temperature and photoperiod. *The journal of experimental biology.* 2003;206:4521-31.
20. Green sea turtle, *Chelonia mydas* at [MarineBio_ort.htm](#)
21. Menchenko G. Handbook of detection of enzyme on electrophoretic gels. CRC Press. United States of America:2003.
22. Srigondo B. Jumlah Ulangan Dalam Percobaan, Dalam Rancangan Percobaan. Semarang: Universitas Diponegoro, 1981.
23. Bishop ML., Fady EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: Techniques, principles, correlations. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia: 2010.
24. ST Reagensia. Pedoman Kerja. Jakarta: PT. Gresik Sarana Tirta.
25. Helene Laboratories Titan Gel LD isoenzyme procedure.
26. Ikrar T, et al. Efektivitas pemberian kombinasi vitamin B1, B6, B12 per oral untuk mengatasi kelelahan pada tikus. Disertasi S3. Jakarta;FKUI; 2003
27. Ferdinal F, et al. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran Hypoxia Inducible Factor-1 dalam regulasi ekspresi gen B-Type Natriuretic Peptida-45. Disertasi S3 biokimia dan Biologi Molekuler. Jakarta;FKUI;2008.
28. Hochachka, P W. Oxygen, a key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. *Amer. Zool.* 1997; 37: 595-603.

29. Lundy C, Jose AL, Calbet PR. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66:3615-23.
30. Duncan WP and Marcon JL. Enzymes of energy metabolism in hatchlings of amazonian fresh water turtles (testunides, podocnemididae). *Brazilian journal of biology*. 2009;69(2):15.
31. Bartrons R and Jaime C. Hypoxia, glucose metabolism and the warburg's effect. *J Bioenergy Biomembr*. 2007;39:223-29.

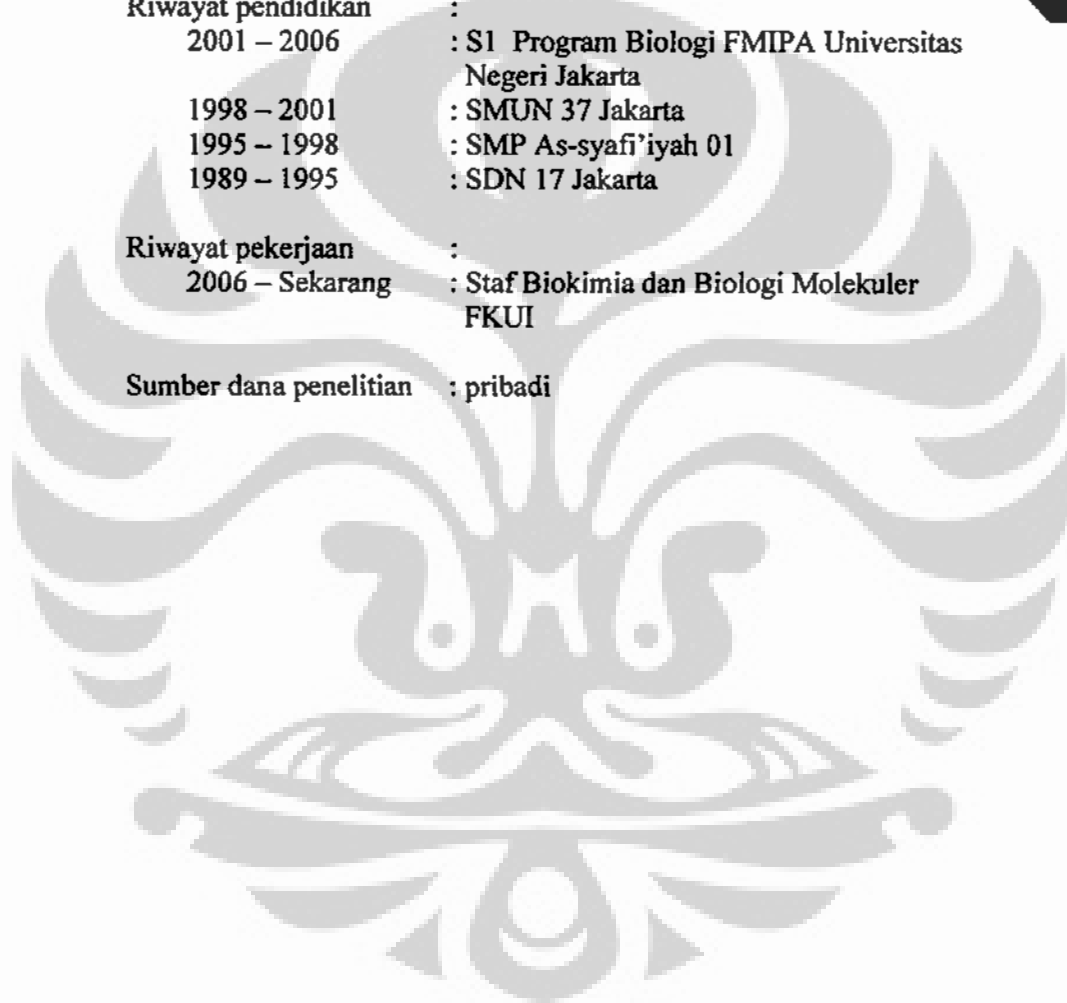


DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Siti Rahmawati
NPM : 0706170766
Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 16 Juni 1983
Alamat : Jl. Pengadegan Utara No.6
Rt.002/007 , Jakarta Selatan
Pekerjaan : Staf Biokimia dan Biologi Molekuler
FKUI
Alamat instansi : Salemba Raya No.6
Riwayat pendidikan :
2001 – 2006 : S1 Program Biologi FMIPA Universitas
Negeri Jakarta
1998 – 2001 : SMUN 37 Jakarta
1995 – 1998 : SMP As-syafi'iyah 01
1989 – 1995 : SDN 17 Jakarta

Riwayat pekerjaan :
2006 – Sekarang : Staf Biokimia dan Biologi Molekuler
FKUI

Sumber dana penelitian : pribadi



Universitas Indonesia

Lampiran 1. Kadar protein jaringan otot tikus dan otot penyu

Kelompok	Kode	Absorbansi	Kadar protein (mg/mL)	Mean±St.Dev	SEM
kontrol	C1	0.087	2,404	2.763±0.245	0,109
	C2	0.094	2,617		
	C3	0.103	2,891		
	C4	0.104	2,922		
	C5	0.106	2,982		
1 hari	A1	0.096	2,678	2.788±0.067	0,030
	A2	0.100	2,800		
	A3	0.102	2,861		
	A4	0.100	2,800		
	A5	0.100	2,800		
7 hari	B1	0.097	2,709	2.703±0.033	0,015
	B2	0.097	2,709		
	B3	0.098	2,739		
	B4	0.095	2,648		
	B5	0.097	2,709		
14 hari	D1	0.100	2,800	3.177±0.374	0,167
	D2	0.123	3,500		
	D3	0.113	3,195		
	D4	0.100	2,800		
	D5	0.126	3,591		
21 hari	E1	0.106	2,982	2.761±0.186	0,093
	E2	0.105	2,526		
	E3	0.091	2,769		
	E4	0.099	2,769		
Penyu	P1	0.083	2,283	2.100±0.286	0,128
	P2	0.064	1,705		
	P3	0.083	2,283		
	P4	0.070	1,887		
	P5	0.085	2,344		

Lampiran 2. Konsumsi glukosa dalam jaringan otot

Kelompok	Kode	Absorbansi Rata-rata	Blanko	Standar	Kadar Glukosa	Kadar protein (mg/mL)	Konsumsi Glukosa/protein
kontrol	C1	0.077	0.006	0.169	43,56	2,404	2,678
	C2	0.076	0.006	0.169	42,95	2,617	2,694
	C3	0.072	0.006	0.169	40,49	2,891	3,289
	C4	0.072	0.006	0.169	40,49	2,922	3,255
	C5	0.083	0.006	0.169	47,24	2,982	0,925
1 hari	A1	0.188	0.002	0.890	41,9	2,678	3,024
	A2	0.195	0.002	0.890	43,46	2,800	2,336
	A3	0.190	0.002	0.890	42,34	2,861	2,678
	A4	0.199	0.002	0.890	44,36	2,800	2,014
	A5	0.195	0.002	0.890	43,46	2,800	2,336
7 hari	B1	0.191	0.002	0.890	42,56	2,709	2,747
	B2	0.208	0.002	0.890	46,4	2,709	1,329
	B3	0.202	0.002	0.890	45,04	2,739	1,811
	B4	0.180	0.002	0.890	40,1	2,648	3,739
	B5	0.208	0.002	0.890	46,4	2,709	1,329
14 hari	D1	0.042	0.000	0.323	26	2,800	8,572
	D2	0.040	0.000	0.323	24,77	3,500	7,209
	D3	0.044	0.000	0.323	27,24	3,195	7,123
	D4	0.054	0.000	0.323	30,16	2,800	7,086
	D5	0.069	0.004	0.199	33,33	3,591	4,642
21 hari	E1	0.046	0.000	0.323	28,48	2,982	7,215
	E2	0.065	0.004	0.199	31,28	2,526	7,411
	E3	0.062	0.004	0.199	29,74	2,769	7,315
	E4	0.062	0.004	0.199	29,74	2,769	7,315
Penyu	P1	0.05	0.004	0.199	23,59	2,283	11,570
	P2	0.05	0.004	0.199	23,59	1,705	15,494
	P3	0.056	0.004	0.199	26,667	2,283	10,222
	P4	0.056	0.004	0.199	24,103	1,887	13,723
	P5	0.051	0.004	0.199	27,18	2,344	9,738

Perhitungan kadar glukosa yang diukur dengan kit:

Glukosa (mg/dL) = $\frac{\text{abs.test}}{\text{abs. Standard}} \times \text{kadar standard}$

Lampiran 3. Aktivitas enzim LDH dalam jaringan otot

Kelompok	Kode	A1	A3	ΔA	$\Delta A/3$	Akt. LDH (U/L)	Akt. LDH rata2	Kadar protein (mg/mL)	Akt. LDH (U/g prot.)
kontrol	C1	0,133	0,132	0,001	0,000	2,698	2,698	2,404	1,122
		0,147	0,146	0,001	0,000	2,698			
	C2	0,132	0,131	0,001	0,000	2,698	2,698	2,617	1,031
		0,155	0,154	0,001	0,000	2,698			
	C3	0,106	0,105	0,001	0,000	2,698	2,698	2,891	0,933
		0,161	0,160	0,001	0,000	2,698			
	C4	0,135	0,134	0,001	0,000	2,698	2,698	2,922	0,924
		0,164	0,163	0,001	0,000	2,698			
	C5	0,140	0,139	0,001	0,000	2,698	2,698	2,982	0,905
		0,102	0,101	0,001	0,000	2,698			
1 hari	A1	0,215	0,212	0,003	0,001	8,095	8,095	2,678	3,023
		0,227	0,224	0,003	0,001	8,095			
	A2	0,222	0,220	0,002	0,001	5,397	5,397	2,800	1,927
		0,278	0,276	0,002	0,001	5,397			
	A3	0,146	0,144	0,002	0,001	5,397	5,397	2,861	1,886
		0,132	0,130	0,002	0,001	5,397			
	A4	0,265	0,261	0,004	0,001	10,793	10,793	2,800	3,855
		0,265	0,261	0,004	0,001	10,793			
	A5	0,134	0,133	0,001	0,001	5,397	5,397	2,800	1,927
		0,123	0,122	0,001	0,001	5,397			
7 hari	B1	0,243	0,241	0,002	0,001	5,397	5,397	2,709	1,992
		0,231	0,229	0,002	0,001	5,397			
	B2	0,231	0,229	0,002	0,001	5,397	5,397	2,709	1,992
		0,239	0,237	0,002	0,001	5,397			
	B3	0,225	0,222	0,003	0,001	8,095	8,095	2,739	2,955
		0,227	0,224	0,003	0,001	8,095			
	B4	0,138	0,135	0,003	0,001	8,095	8,095	2,648	3,057
		0,138	0,135	0,003	0,001	8,095			
	B5	0,146	0,144	0,002	0,001	5,397	5,397	2,709	1,992
		0,132	0,130	0,002	0,001	5,397			

14 hari	D1	0,129	0,126	0,003	0,001	8,095	8,095	2,800	2,891
		0,149	0,146	0,003	0,001	8,095			
	D2	0,160	0,154	0,006	0,002	16,190	13,492	3,500	3,855
		0,114	0,110	0,004	0,001	10,793			
	D3	0,129	0,127	0,002	0,001	5,397	5,397	3,195	1,689
		0,152	0,150	0,002	0,001	5,397			
	D4	0,105	0,104	0,001	0,000	2,698	2,698	2,800	0,964
		0,164	0,163	0,001	0,000	2,698			
	D5	0,103	0,101	0,002	0,001	5,397	5,397	3,591	1,503
		0,146	0,144	0,002	0,001	5,397			
21 hari	E1	0,119	0,118	0,001	0,000	2,698	4,048	2,982	1,357
		0,127	0,125	0,002	0,001	5,397			
	E2	0,131	0,130	0,001	0,000	2,698	2,698	2,526	1,068
		0,111	0,110	0,001	0,000	2,698			
	E3	0,147	0,146	0,001	0,000	2,698	4,048	2,769	1,461
		0,128	0,126	0,002	0,001	5,397			
	E4	0,104	0,103	0,001	0,000	2,698	2,698	2,769	0,974
		0,126	0,125	0,001	0,000	2,698			
Penyu	P1	0,427	0,327	0,100	0,033	269,833	210,470	2,283	92,204
		0,198	0,142	0,056	0,019	151,107			
	P2	0,354	0,137	0,217	0,072	585,538	541,016	1,705	317,399
		0,291	0,107	0,184	0,061	496,493			
	P3	0,336	0,145	0,191	0,064	515,382	403,401	2,283	176,724
		0,257	0,149	0,108	0,036	291,420			
	P4	0,333	0,136	0,197	0,066	531,572	473,558	1,887	250,945
		0,250	0,096	0,154	0,051	415,543			
	P5	0,336	0,145	0,191	0,064	515,382	403,401	2,344	172,135
		0,257	0,149	0,108	0,036	291,420			

Aktivitas enzim LDH dihitung, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min sampel} \times 8095 \text{ (faktor yang tertulis pada kit)}$$

Lampiran 4. Aktivitas relative isozim LDH dalam jaringan otot

Kelompok	Isoenzim	Mean	Pixel	Integral (Pixel)	kadar protein (mg/mL)	Aktivitas relatif Isozim
Kontrol	LDH5	224,3	5184	1162771,2	1082906,496	1,204747863
	LDH4	222,95	5184	1155772,8		1,197496817
	LDH3	218,71	5184	1133792,64		1,174723161
	LDH2	194,46	5184	1008080,64		1,044472891
	LDH1	184,05	5184	954115,2		0,988559269
1 hari	LDH5	227,26	5184	1178115,84	1102470,912	3,230420091
	LDH4	229,13	5184	1187809,92		3,257001476
	LDH3	224,62	5184	1164430,08		3,19289343
	LDH2	198,62	5184	1029646,08		2,823312675
	LDH1	183,71	5184	952352,64		2,611372327
7 hari	LDH5	227,29	5184	1178271,36	1027282,176	3,389323742
	LDH4	226,59	5184	1174642,56		3,378885418
	LDH3	211,9	5184	1098489,6		3,159829737
	LDH2	163,95	5184	849916,8		2,444804556
	LDH1	161,09	5184	835090,56		2,402156547
14 hari	LDH5	233,54	5184	1210671,36	1107478,656	3,160377749
	LDH4	233,07	5184	1208234,88		3,154017478
	LDH3	220,18	5184	1141413,12		2,979583681
	LDH2	194,81	5184	1009895,04		2,636264405
	LDH1	186,57	5184	967178,88		2,524756687
21 hari	LDH5	232,32	5184	1204346,88	1164222,72	1,104807908
	LDH4	235,07	5184	1218602,88		1,117885653
	LDH3	236,29	5184	1224927,36		1,123687417
	LDH2	215,24	5184	1115804,16		1,023583222
	LDH1	203,98	5184	1057432,32		0,9700358
Penyu	LDH4	233,85	5184	1212278,4	1212278,4	317,499

Analisis statistik uji normalitas

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KdrProtein	1	.299	5	.164	5	.282
	2	.372	5	.022	5	.135
	3	.374	5	.021	5	.130
	4	.243	5	.200*	5	.233
	5	.266	4	.	4	.670
	6	.338	5	.063	5	.129
KonsGluk	1	.345	5	.051	5	.063
	2	.243	5	.200*	5	.788
	3	.242	5	.200*	5	.273
	4	.345	5	.052	5	.246
	5	.255	4	.	4	.682
	6	.194	5	.200*	5	.577
AktEnzLDH	1	.307	5	.139	5	.222
	2	.350	5	.045	5	.065
	3	.367	5	.027	5	.013
	4	.263	5	.200*	5	.580
	5	.238	4	.	4	.502
	6	.216	5	.200*	5	.884

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis statistik Uji Kemaknaan dengan metode Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	KdrProtein	KonsGluk	AktEnzLDH
Chi-Square	17.797	23.611	22.551
df	5	5	5
Asymp. Sig.	.003	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Analisis korelasi kadar protein, konsumsi glukosa dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase

Correlations

			KdrProtein	KonsGluk	AktEnzLDH
Spearman's rho	KdrProtein	Correlation Coefficient	1.000	-.350	-.523**
		Sig. (2-tailed)		.062	.004
		N	29	29	29
	KonsGluk	Correlation Coefficient	-.350	1.000	.345
		Sig. (2-tailed)	.062		.066
		N	29	29	29
	AktEnzLDH	Correlation Coefficient	-.523**	.345	1.000
		Sig. (2-tailed)	.004	.066	
		N	29	29	29

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Analisis korelasi kadar protein antar kelompok
Kruskal Walls Test

Kelompok	Kelompok					
	Normoksia	H. 1hari	H. 7hari	H. 14hari	H. 21hari	Tukik
Normoksia	-	0,597	0,597	0,173	0,902	0,009*

Analisis korelasi konsumsi glukosa antar kelompok
Kruskal Walls Test

Kelompok	Kelompok					
	Normoksia	H. 1hari	H. 7hari	H. 14hari	H. 21hari	Tukik
Normoksia	-	0,753	0,753	0,009*	0,014*	0,009*

Analisis korelasi aktivitas LDH antar kelompok
Kruskal Walls Test

Kelompok	Kelompok					
	Normoksia	H. 1hari	H. 7hari	H. 14hari	H. 21hari	Tukik
Normoksia	-	0,009*	0,008*	0,028*	0,086	0,009*

PERBANDINGAN KADAR KONSUMSI GLUKOSA, AKTIVITAS DAN POLA ELEKTROFORESIS ENZIM LAKTAT DEHIDROGENASE (LDH) PADA OTOT TIKUS NORMOKSIA, HIPOKSIA DAN OTOT PENYU HIJAU (*Chelonia mydas*)

Siti Rahmawati A.¹, Ninik Mudjihartini¹, Sri Widia A.Jusman¹, Septelia Inawati¹, Rini Puspitaningrum², Frans Ferdinal³, Mohamad Sadikin¹

¹Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

²Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta

³Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanegara

ABSTRAK

Keadaan hipoksia dapat menyebabkan sel berganti metabolisme ke tipe yang lebih anaerob, yang menghasilkan energi yang lebih sedikit. Untuk memenuhi kebutuhan energi yang sama pada keadaan hipoksia, sel meningkatkan konsumsi glukosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran adaptasi metabolisme otot pada tikus yang dibuat hipoksia dibandingkan dengan penyu hijau (*Chelonia mydas*). Penyu hijau merupakan hewan yang bernafas dengan paru-paru namun dapat beraktivitas lama di bawah air laut.

Sejumlah tikus ditempatkan pada kandang hipoksia (tekanan 1 atm, dan kandungan O₂ 10%) selama 1, 7, 14, dan 21 hari. Pada akhir periode hipoksia setelah euthanasia, otot dianalisis untuk pengukuran konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH dan elektroforesis isozim LDH. Analisis yang sama juga dilakukan pada penyu yang ditempatkan pada kondisi normoksia.

Konsumsi glukosa dan aktivitas LDH meningkat sejalan dengan lamanya hipoksia pada otot tikus, sedangkan isozim LDH tidak mengalami perubahan pola, kecuali peningkatan LDH 4 dan LDH 5. Konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH otot penyu lebih tinggi dibanding otot tikus dan hanya terdapat satu tipe isozim LDH yaitu LDH 4 yang merupakan isozim LDH anaerob. Hasil penelitian menunjukkan adaptasi sel otot terhadap hipoksia, dengan mengubah metabolisme ke tipe yang lebih anaerob

Kata kunci :
Hipoksia, glukosa, LDH, otot

ABSTRACT

Hypoxia would lead cell to switch its metabolic machine towards relatively more anaerobic type, which produces lesser energy. To meet the same energy needs, therefore the hypoxic cell has to increase the glucose consumption rate. In this studies, we described the metabolic adaptation in hypoxic made rats as well as in sea turtles (*Chelonia mydas*), well known as lung breathing animal which pass most of their time under sea water.

A certain number rats were placed in a hypoxic chamber (1 atm, O₂ 10 Val %) for 1, 7, 14 and 21 days. At the end of each period, after euthanasia, muscles were analyzed for glucose metabolism rate, total specific LDH activities and LDH isozymes electrophoresis. The same analysis was made in sea turtle muscles which were placed in normal condition.

Glucose consumption rates and LDH activities increased proportionally with the duration of hypoxic state in rats, whereas in LDH isozymes, there were no any changement in pattern except in LDH 4 and LDH 5, which was more accentuated in the course of hypoxia. On the other hand, even in normoxic condition, sea turtles muscles consumed higher amount of glucose, showed much higher of total specific LDH activities and had only one type of LDH isozyme, i.e. LDH 4, which is anaerobic isozyme of LDH. The results suggest that in adaptation to hypoxia, the metabolism switch to more anaerobic pattern and that sea turtle was genetically set for hypoxia condition.

Keywords:
Hypoxia, glucose, LDH, muscle

1. Pendahuluan

Dua miliar tahun dari evolusi aerob menghasilkan sel dan jaringan mamalia yang sangat bergantung kepada oksigen. Peran oksigen yang terpenting pada makhluk aerobik adalah akseptor terakhir elektron pada rangkaian reaksi transfer elektron di rantai pernafasan. Pada mitokondria, reaksi ini disebut juga sebagai reaksi fosforilasi oksidatif. Energi yang dibebaskan dari reaksi tersebut ditangkap sebagai adenosin trifosfat (ATP). Fosforilasi oksidatif (glikolisis aerob) menghasilkan ATP 18 kali lebih banyak dibandingkan glikolisis anaerob. Oleh karena itu diperlukan konsumsi glukosa lebih banyak untuk memenuhi kebutuhan ATP pada keadaan anaerob.¹⁻³

Glikolisis anaerob terjadi karena piruvat tidak masuk ke dalam siklus TCA dan rantai pernafasan, melainkan direduksi menjadi laktat oleh enzim laktat dehidrogenase (LDH). Enzim LDH merupakan enzim yang berperan penting dalam glikolisis anaerob. Enzim ini dapat mengkatalisis reaksi bolak balik (*irreversible*) piruvat menjadi laktat. Tipe isozim LDH berbeda pada keadaan aerob dan anaerob. Pada keadaan aerob, isozim LDH 1 mengubah laktat menjadi piruvat. Sebaliknya pada keadaan anaerob, isozim LDH 5 akan mengubah piruvat menjadi laktat.⁵⁻⁶

Pada keadaan patologis tertentu, organ-organ yang memerlukan oksigen dalam jumlah besar dihadapkan kepada keadaan hipoksia, yang dapat mengganggu fungsi organ tersebut. Bila hal ini terjadi pada otak atau jantung, maka akan menyebabkan penyakit berat. Akan tetapi beberapa hewan toleran terhadap keadaan hipoksia, sehingga dapat berada dalam keadaan anaerob selama jangka waktu yang cukup panjang.

Lumba-lumba dan paus, yang bernafas dengan paru-paru, dapat mengalami keadaan anaerob selama 30 menit sampai 1 jam. Penyu, yang juga bernafas dengan paru-paru dapat terus menerus berenang tanpa mengeluarkan kepala ke udara

selama beberapa hari. Pada keadaan-keadaan ini (hipoksia pada manusia, lumba-lumba, paus, penyu) jelas metabolisme energi terjadi hanya melalui proses anaerob. Hal ini masih menimbulkan pertanyaan, mengapa pada manusia hal itu menyebabkan penyakit, tetapi pada hewan-hewan tersebut tidak menimbulkan kelainan apapun juga dan tetap aktif seperti biasa. Kenyataan ini menyebabkan pada saat ini penelitian-penelitian tentang hipoksia banyak dilakukan. Jaringan pertama yang dihubungkan dengan hipoksia adalah otot, karena otot sering dihadapkan pada keadaan tekanan rendah oksigen, misalnya selama olahraga. Otot sebenarnya salah satu jaringan yang paling tahan terhadap keadaan hipoksia. Oleh karena aktivitas fisik terutama dilakukan oleh otot, maka proses yang terjadi ada otot dalam keadaan hipoksia perlu dipelajari.

Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk melihat ada tidaknya perbedaan konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tikus normoksia dengan tikus hipoksia, dan otot tukik. Pola elektroforesis enzim LDH dapat berbeda antara otot tikus normoksia, hipoksia, dan otot tukik.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen *in vivo*. Hewan coba pada penelitian ini yaitu tikus (*Rattus sp.* Strain *Sprague Dawley*) dan penyu hijau (*Chelonia mydas*). Bahan yang diperiksa adalah otot betis (gastromenius).

Tikus dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu kelompok pertama adalah tikus normoksia atau kontrol atau tanpa perlakuan. Kelompok kedua adalah tikus yang mendapat perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia. Kelompok hipoksia dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan rentang waktu paparan hipoksia yang berbeda-beda, antara lain hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Tukik penyu hijau (*Chelonia mydas*) yang

menjadi energi mekanik. Otot rangka berfungsi untuk mempertahankan sikap tubuh (duduk, berdiri, tidur, dan lain-lain) dan pergerakan. Aktivitas ini merupakan ciri utama pada hewan. Otot rangka juga berperan dalam termogenesis dan merupakan organ metabolik yang penting untuk menghasilkan energi. Peran otot rangka yang besar, menjadikannya jaringan yang terbesar di dalam tubuh, sekitar 40-50% dari jumlah total jaringan manusia dewasa.^{26,29}

Otot rangka berkontraksi dan relaksasi secara bergantian. Sumber tenaga untuk kontraksi otot adalah ATP, yang sebagian sudah tersedia dalam bentuk ikatan dengan miofibril. ATP dalam otot selalu tersedia di otot tetapi dalam jumlah yang terbatas. Pada saat awal suatu aktivitas, penggunaan ATP berasal dari simpanan yang ada di otot sendiri. ATP yang sudah terpakai harus dibentuk kembali dengan proses metabolisme secara aerob, tetapi karena cadangan O₂ terbatas maka metabolisme bergeser ke anaerob. Pada metabolisme aerob, piruvat akan diubah menjadi CO₂ dan H₂O. Proses glikolisis aerob ini menghasilkan 36 ATP. Metabolisme anaerob adalah pemanfaatan glukosa dan glikogen dengan cara glikolisis tanpa O₂ dan tidak melibatkan rantai respirasi mitokondria. Proses anaerob menghasilkan 2 ATP dan laktat¹¹.

Otot rangka merupakan jaringan pertama dihubungkan dengan hipoksia, sebab sering dihadapkan pada keadaan tekanan rendah oksigen, misalnya selama olahraga. Otot sebenarnya salah satu jaringan yang paling tahan terhadap hipoksia. Jaringan otot mempunyai beberapa mekanisme untuk melindungi diri dalam keadaan hipoksia. Pertama, oksigen disimpan terikat dengan mioglobin, khususnya pada otot yang sering berkontraksi seperti otot rangka. Mioglobin akan mengambil oksigen dari hemoglobin dan akan melepaskannya hanya ketika tekanan oksigen pada sel otot menjadi lebih rendah. Peran mioglobin ini

seperti cadangan darurat (*emergency reserve*).¹¹

Peningkatan tajam konsumsi glukosa terjadi pada hipoksia 14 hari dan 21 hari. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan glikolisis anaerob sejalan lamanya pemaparan hipoksia. Dalam keadaan PO₂ normal, fosforilasi oksidatif merupakan penghasil energi utama sel. Akan tetapi ketika PO₂ turun sampai keadaan kritis, metabolisme berganti dengan menonaktifkan transfer elektron di mitokondria dan mengaktifkan glikolisis anaerob. Tanpa pengaktifan glikolisis anaerob, sel-sel akan mengalami defisit energi segera dan kematian di PO₂ yang rendah.¹ Dengan demikian glikolisis dapat terjadi pada keadaan anaerob, tetapi ini membatasi jumlah energi yang dilepaskan per mol glukosa yang dioksidasi. Energi yang dihasilkan dari glikolisis anaerob yaitu hanya 2 molekul ATP per molekul glukosa. Sedangkan ATP yang dihasilkan dari glikolisis aerob 18 kali lebih besar dari ATP yang dihasilkan glikolisis anaerob. Sebagai akibatnya, untuk memenuhi keperluan jumlah energi, akan lebih banyak glukosa yang harus mengalami glikolisis pada keadaan anaerob dibanding keadaan aerob.

Konsumsi glukosa tertinggi terdapat pada penyu. Metabolisme glukosa yang tinggi, merupakan salah satu adaptasi jaringan otot pada penyu yang merupakan hewan hipoksia adaptif. Penyu merupakan hewan vertebrata yang dikenal toleran terhadap hipoksia. Beberapa spesies penyu mampu bertahan empat bulan dalam paparan hipoksia di suhu rendah selama hibernasi. Salah satu kunci kelangsungan hidup dalam hipoksia berkepanjangan pada hewan tersebut adalah ketepatan produksi ATP dan pemanfaatannya.²⁸

Aktivitas spesifik LDH pada hipoksia lebih tinggi daripada kondisi normoksia. Hasil ini menunjukkan glikolisis anaerob meningkat pada keadaan hipoksia. Terjadi penurunan aktivitas enzim LDH dari hipoksia 7 hari sampai 21 hari walaupun aktivitas LDH masih di atas

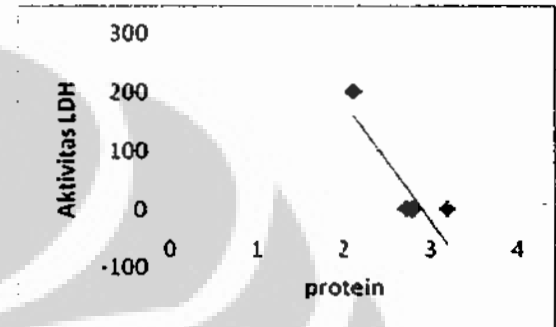
kelompok normoksia. Hal tersebut dapat disebabkan oleh karena adanya apoptosis sel. Menurut Ferdinal, pemaparan hipoksia terus menerus dapat menyebabkan kondisi sel menurun, bahkan dapat menyebabkan terjadinya apoptosis.²⁷

Pada penelitian ini didapatkan aktivitas spesifik LDH tukik yang belum terpapar hipoksia, 100 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tikus. Hal ini menunjukkan bahwa sudah terdapat mekanisme adaptasi metabolisme penyus terhadap hipoksia, walaupun belum terpapar hipoksia. Penelitian Duncan, menunjukkan adanya tingginya aktivitas spesifik LDH pada hati penyus air tawar. Peningkatan ini berkaitan dengan produksi energi anaerobik.³⁰

Hasil elektroforesis menunjukkan terdapat kelima isozim LDH pada jaringan otot tikus baik normal maupun hipoksia, dengan kadar yang berbeda-beda. Uji statistik membuktikan tidak terdapat perbedaan aktivitas relatif isozim LDH otot tikus normoksia dan berbagai hipoksia. Hal ini berarti tidak ada perubahan ekspresi gen isozim LDH, yang disebabkan kondisi hipoksia. Akan tetapi, hanya ada perubahan jumlah total aktivitas LDH. Gambar 4.6. memperlihatkan bahwa pada hipoksia aktivitas relatif isozim LDH 5 dan LDH 4 lebih tinggi dari isozim lain. Hal ini dikarenakan LDH 5 dan LDH 4 dapat bekerja optimum pada keadaan anaerob, mengkatalisis piruvat menjadi laktat. Pada hipoksia 21 hari, aktivitas relatif isozimnya menurun, dikarenakan paparan hipoksia yang sudah terlalu lama menurunkan kemampuan aktivitas enzim.

Berbeda dengan otot tikus, hasil elektroforesis otot tukik hanya menunjukkan 1 pita yaitu isoenzim LDH 4, dimana mempunyai subunit H_1M_3 . Subunit H bekerja pada kondisi aerob sedang subunit M sebaliknya, sehingga LDH4 lebih optimum bekerja pada kondisi anaerob. Hal ini menunjukkan bahwa otot penyus, secara genetis sudah terkondisikan dapat hidup dalam keadaan hipoksia.

Pada penelitian ini didapatkan adanya korelasi yang bermakna antara kadar protein terhadap aktivitas enzim laktat dehidrogenase (koefisien korelasi, $R=-0,523$, $p<0,05$) dengan menggunakan uji korelasi non parametrik Spearman's rho. Analisis korelasi tersebut pada penelitian ini menunjukkan hubungan tidak kuat dan negatif



Gambar 4.6. Kolerasi kadar protein terhadap aktivitas enzim laktat dehidrogenase (koefisien korelasi, $R=-0,523$, $p<0,05$)

Kolerasi kadar protein dengan aktivitas LDH, menunjukkan adanya pengaturan metabolisme sel terhadap kondisi hipoksia. Hal ini bertujuan untuk efisiensi ATP. Pengaturan metabolisme sel terhadap kondisi hipoksia terutama dengan cara meningkatkan produksi ATP dan pengurangan konsumsi ATP.⁸ Peningkatan produksi ATP dapat dicapai dengan meningkatkan aktivitas enzim LDH, sedangkan pengurangan konsumsi ATP dapat dengan cara menurunkan kadar protein. Penurunan kadar protein dapat disebabkan karena sintesis protein yang menurun dan adanya degradasi protein. Degradasi protein pada keadaan hipoksia untuk proses glukoneogenesis yaitu pembentukan glukosa baru dari protein (bahan bukan karbohidrat).

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan

1. Konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tikus yang mengalami

hipoksia lebih tinggi dari pada tikus normoksia.

2. Konsumsi glukosa dan aktivitas enzim LDH pada otot tukik (hewan toleran hipoksia) lebih tinggi dari pada tikus hipoksia maupun normoksia.
3. Pola elektroforesis enzim LDH otot tikus normoksia dan otot tikus hipoksia sama.
4. Pola elektroforesis enzim LDH otot tikus dengan otot tukik berbeda, pada otot tikus terdapat 5 isozim LDH sedang pada otot tukik hanya 1 isozim LDH yaitu isozim LDH 4.

6. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain:

1. Perlu dilakukan pengenceran konsentrasi protein pada elektroforesis enzim LDH
2. Perlu dilakukan pengukuran laktat, yaitu produk yang terbentuk pada proses glikolisis anaerob, sehingga dapat menggambarkan lebih jelas perubahan glikolisis anaerob yang terjadi pada keadaan hipoksia.

Daftar pustaka

1. Webster KA. Evolution of The Coordinate Regulation Of Glycolytic Enzyme by Hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd.2003;206: 2911-22.
2. Storey KB. Biochemical Adaptation. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons, 2004. p.383-96.
3. Lutz PL. and Prentice H. Sensing and Responding to Hypoxia, Molecular and Physiological Mechanisms. *Chicago.Integ and Comp.Bioll.* 2002;42:463-68.
4. Taylor CT, Pouyssegur JP. Oxygen, Hypoxia and Stress. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1113:87-94.
5. Bender DA and Mayes PA. Glycolysis and piruvat oxidation In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry 28th edition*. McGraw-Hills. New York. 2009. p.151-58.
6. Lieberman M and Allan DM. Basic medical Biochemistry, a clinal medical approach 3ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2009. p.341-420.
7. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int*. 1991;39:476-500.
8. Storey KB. Oxygen limitation and metabolic rate depression. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons,2004. p.415-42
9. Bender DA and Mayes PA. Carbohydrates of physiologic significance In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry 28th edition*. McGraw-Hills. New York. 2009.p.112-20
10. Vaupel P. et al.. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanism, and cellular response. *Oncologist*. 2004;9:4-9.
11. Alberti.K. The biochemical consequences of hypoxia. *J.Clin.Path*. 30: 14-20
12. Hames BD, Hooper NM, and Houghton JD. *Instant Notes in Biochemistry*. Springer. New York. 1997. p.229-37.
13. Koolman J, and Klauss HR. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme Stuttgart. New York: 2005.
14. Kennelly, PJ & Victor WR. Enzyme: Mechanism of Action In: Murray RK, Granner DK, and Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry 28th edition*. McGraw-Hills. New York. 20091.p.56-59.
15. Latier, AL. Isoenzymes. *Biology and Medicine Academic Press*. 1970; London.

16. Bulakh, PM, Kowak, CN, Ranade SM, Chandovkar AG. LDH isoenzyme profile in pulmonary tuberculosis. *Ind. J. Tub.* 1983; 30: 116.
17. Michel IK. Lactate dehydrogenase 5(LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clinical and experimental metastasis.* 2005; 22:25-30.
18. Otsu N, Buhiro, Hirata M. Abnormal Lactate Dehydrogenase Isoenzyme in serum and tumor tissue. *Clin, Chem.*1985;31:318-20.
19. Southwood A, Charler AD and David RJ. Metabolic and cardiovascular adjustments of juvenile green turtles to seasonal changes in temperature and photoperiod. *The journal of experimental biology.*2003;206:4521-31.
20. Green sea turtle, *Chelonia mydas* at [MarineBio_ort.htm](#)
21. Menchenko G. Handbook of detection of enzyme on electrophoretic gels. CRC Press. United States of America:2003.
22. Srigondo B. Jumlah Ulangan Dalam Percobaan, Dalam Rancangan Percobaan.Semarang: Universitas Diponegoro,1981.
23. Bishop ML., Fady EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Techniques, principles, correlations.* 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia: 2010.
24. ST Reagensia. *Pedoman Kerja.* Jakarta: PT. Gresik Sarana Tirta.
25. Helene Laboratories Titan Gel LD isoenzyme procedure.
26. Ikrar T, et al. Efektivitas pemberian kombinasi vitamin B1, B6, B12 per oral untuk mengatasi kelelahan pada tikus. *Disertasi S3.* Jakarta;FKUI; 2003
27. Ferdinal F, et al. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran Hypoxia Inducible Factor-1 dalam regulasi ekspresi gen B-Type Natriuretic Peptida-45. *Disertasi S3* biokimia dan Biologi Molekuler. Jakarta;FKUI;2008.
28. Hochachka, P W. Oxygen, a key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. *Amer. Zool.* 1997; 37: 595-603.
29. Lundly C, Jose AL Calbet PR. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cellular and molecular life sciences.* 2009; 66:3615-23.
30. Duncan WP and Marcon JL. Enzymes of energy metabolism in hatchlings of amazonian fresh water turtles (testunides, podocnemididae). *Brazilian journal of biology.* 2009;69(2):15.
31. Bartrons R and Jaime C. Hypoxia, glucose metabolism and the warburg's effect. *J Bioenergy Biomembr.* 2007;39:223-29.