

**ANALISIS HUBUNGAN KONSUMSI GLUKOSA,
AKTIVITAS SPESIFIK DAN POLA
ISOZIM *LACTATE DEHYDROGENASE* (LDH) PADA HATI TIKUS
YANG DIINDUKSI HIPOKSIDIA SISTEMIK KRONIK**

TESIS

AGUS EVENDI

NPM: 0706170734



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

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Agus Evendi

NPM : 0706170740

Tanda tangan :

Tanggal : 10 Juni 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Agus Evendi
NPM : 070670734
Program Studi : Biokimia dan Biologi Molekuler
Judul tesis : Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim *Lactate Dehydrogenase* (LDH) pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister pada program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI :

Pembimbing I : dr. Sri Widia A. Jusman, MS (.....)

Pembimbing II : drg. Dwirini Retno G., MS (.....)

Penguji I : dr. Nimik Mudjihartini, MS (.....)

Penguji II : Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed (.....)

Penguji III : Prof. Dr. rer. med. habil. HJ. Freisleben, DmedSc., Mpharm., PhD (.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 10 Juni 2010

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI :
Dr. rer. physiol., dr. Septelia Inawati Wanandi (.....)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) dr. Sri Widia A. Jusman, MS, selaku dosen pembimbing I, sekaligus sebagai ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler. Terima kasih dan penghargaan atas segala bimbingan, curahan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
- (2) drg. Dwirini Retno G., MS, selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing saya dalam penyusunan tesis ini.
- (3) dr. Ninik Mudjihartini, MS, Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed, dan Prof. Dr. rer. med. habil. HJ. Freisleben, DMedSc., Mpharm., PhD, selaku Penguji sidang, atas masukan dan sarannya.
- (4) Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik FKUI., yang telah memberi kesempatan dan kemudahan bagi saya dalam melakukan penelitian ini.
- (5) dr. Ani Retno Prijanti, MS, selaku Ketua Kekhususan Biokimia dan seluruh staf pengajar dan pegawai Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI yang telah memberikan ilmu dan ketrampilannya yang berharga.

(6) Orangtua saya tercinta H. M. Husin (Alm) dan Hj. Maisurih serta keluarga besar H. M. Husin yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral

(7) Sahabat-sahabat dan teman seperjuangan yang telah banyak membantu saya menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata saya berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 10 Juni 2010

Penulis

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

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

Nama : Agus Evendi
NPM : 0706170734
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim *lactate dehydrogenase* (LDH) pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Tanggal : 10 Juni 2010

Yang menyatakan



(Agus Evendi)

ABSTRAK

Nama : Agus Evendi

Program Studi : Magister Ilmu Biomedik FKUI, Kekhususan Biokimia

Judul : **Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim *Lactate Dehydrogenase* (LDH) pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik**

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH dan pola isozim LDH pada kondisi hipoksia sistemik kronik. Penelitian dilakukan terhadap hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1, 3, 7 dan 14 hari. Konsumsi glukosa diukur dengan metode enzimatik Trinder. Aktivitas spesifik LDH diukur dengan metode *German Society of Clinical Chemistry* (DGKC). Pola isozim LDH dianalisis dengan elektroforesis *Titan Gel*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi glukosa pada hipoksia sistemik kronik cenderung meningkat walaupun tidak berbeda dengan kontrol. Aktivitas spesifik LDH ditemukan paling tinggi pada hipoksia 3 hari sedangkan pola elektroforesis isozim LDH menunjukkan perbedaan pada hari ke-3 dan ke-7 hipoksia dengan kontrol. Tidak terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH.

Kata kunci: Hipoksia sistemik kronik, konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH, elektroforesis

ABSTRACT

Name : Agus Evendi

Program : Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Indonesia

Title : **Analysis of the relationship of glucose consumption, specific activities and isozyme patterns of *Lactate Dehydrogenase* (LDH) in rat liver tissue during induced chronic systemic hypoxia**

The aim of this study was to observe glucose consumption, specific activity of LDH and electrophoretic LDH isoenzyme patterns on systemic chronic hypoxia. The study was carried out with liver tissue of rats exposed to systemic hypoxia for 1, 3, 7 and 14 days. Glucose consumption was measured by Trinder method. The specific activity of LDH was performed using *German Society of Clinical Chemistry* (DGKC) method, while LDH isoenzyme patterns were analyzed using *Titan Gel* electrophoresis. Results indicated that glucose consumption showed tendencies to increase compared to control group, although the difference were not significant. The specific activity of LDH was highest on day 3 of the hypoxic group. Electrophoretic patterns of LDH isoenzyme showed differences on day 3 and day 7 of hypoxia with control. It is concluded that glucose consumption is not related to specific activity of LDH.

Key words: systemic chronic hypoxia, glucose consumption, LDH specific activity, elecrophoresis

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN TESIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
I.1. Latar belakang.....	1
I.2. Pertanyaan penelitian.....	2
I.3. Hipotesis Penelitian	2
I.4. Tujuan Penelitian.....	3
I.5. Manfaat Penelitian.....	3
I.6. Kerangka Teori	4
I.7. Kerangka konsep	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Hipoksia.....	6
II.2. Metabolisme dalam kondisi normal.....	9
II.3. Metabolisme dalam kondisi hipoksia	10
II.4. Enzim <i>lactate dehydrogenase</i>	13
II.4.1. Struktur <i>lactate dehydrogenase</i>	13
II.4.2. Aktivitas enzim <i>lactate dehydrogenase</i>	14
II.4.3. Isozim <i>lactate dehydrogenase</i>	15
II.5. Elektroforesis	16

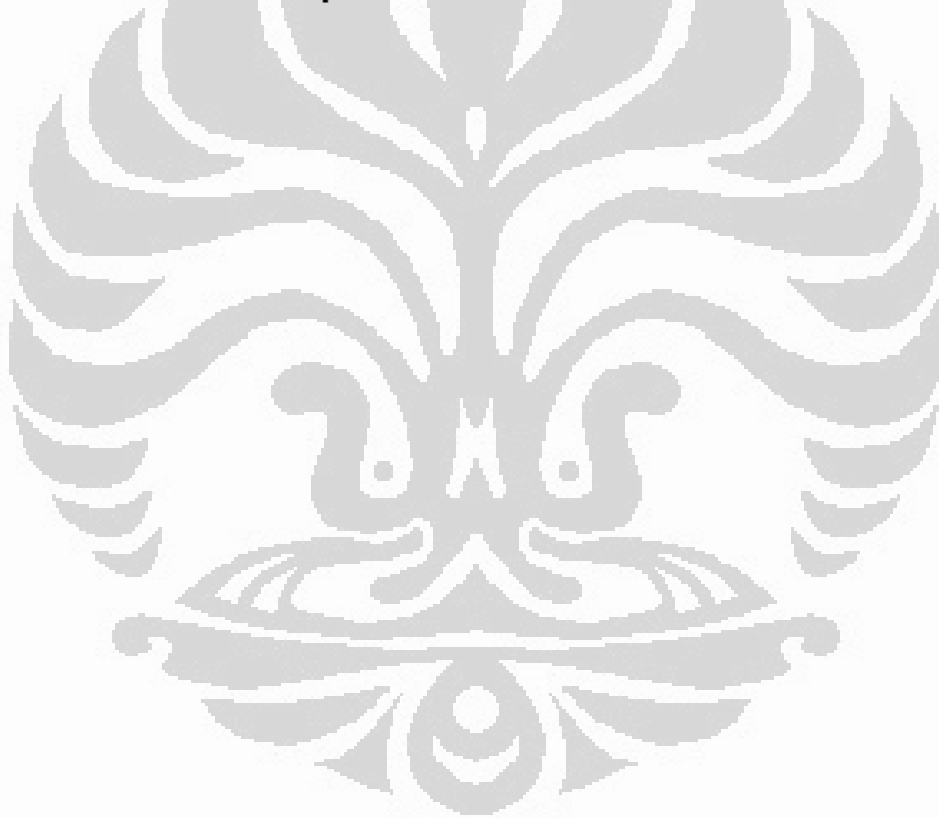
BAB III METODE PENELITIAN

III.1. Rancangan Penelitian	18
III.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
III.3. Hewan Percobaan.....	18
III.4. Penetapan Jumlah Hewan Coba.....	19
III.5. Bahan dan Alat Penelitian	
III.5.1. Bahan Penelitian.....	19
III.5.2. Alat Penelitian.....	20
III.6. Cara Kerja.....	20
III.6.1. Perlakuan Hipoksia.....	20
III.6.2. Pembuatan Homogenat Hati.....	22
III.6.3. Pengukuran Kadar Protein Homogenat Hati.....	22
III.6.4. Pengukuran Konsumsi Glukosa Homogenat Hati.....	23
III.6.5. Pengukuran Aktivitas spesifik LDH Homogenat Hati.....	24
III.6.6. Elektroforesis isozim LDH.....	24

III.7. Analisis Statistik.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1.Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	27
IV.2.Aktivitas LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	28
IV.3.Analisis hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	31
IV.4.Elektroforesis isozim LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1. Kesimpulan.....	35
V.2. Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN.....	40
RIWAYAT HIDUP.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	27
Tabel IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	29
Tabel IV.3. Densitas bercak elektroforesis isozim LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	33



DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1. Mekanisme regulasi HIF-1 α pada kondisi normal dan hipoksia...	8
Gambar II.2. Jalur glikolisis	12
Gambar II.3. Struktur tetramer LDH dan reaksi interkonversi LDH	14
Gambar II.4. Gen LDH, bentuk tetramer isozim LDH, dan elektroforesis isozim LDH pada kondisi normal	15
Gambar III.1. Tikus dalam kandang perlakuan hipoksia.....	21
Gambar IV.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	28
Gambar IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	30
Gambar IV.3. Perbandingan konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	31
Gambar IV.4. Elektroforesis isozim LDH jaringan hati tikus.....	32
Gambar IV.5. Nilai densitas isozim LDH jaringan yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kadar protein dalam jaringan hati	40
Lampiran 2. Kadar glukosa dalam jaringan hati	41
Lampiran 3. Aktivitas spesifik LDH dalam jaringan hati	42
Lampiran 4. Perhitungan densitas isozim LDH5, LDH4, LDH3, LDH2 dan LDH1 pada jaringan yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	44
Lampiran 5. Uji normalitas	46
Lampiran 6. Uji parametrik	47
Lampiran 7. Uji korelasi	50

DAFTAR SINGKATAN

HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor-1</i>
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
DGKC	<i>German Society of Clinical Chemistry</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
ODD	<i>Oxygen Dependent Degradation</i>
PHD	<i>Prolyl Hydroxylase</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
PEP	<i>Phosphoenolpyruvate</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
LSD	<i>Least Significant Difference</i>

BAB I PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Hipoksia merupakan suatu kondisi dimana suplai oksigen tidak mencukupi untuk keperluan sel, jaringan atau organ. Kondisi ini akan mengaktifasi suatu faktor transkripsi yang dinamakan *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). *Hypoxia inducible factor-1* merupakan protein heterodimer, terdiri dari subunit HIF-1 α dengan berat molekul 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar oksigen dan subunit HIF-1 β dengan berat molekul 91-94 kDa yang merupakan protein konstitutif. HIF-1 β juga dikenal sebagai *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT). *Hypoxia inducible factor-1 α* merupakan protein yang tidak stabil karena pada kondisi normoksia didegradasi oleh sistem ubiquitin proteasom dan mengalami stabilisasi sebagai respon terhadap hipoksia. Selanjutnya, HIF-1 α membentuk kompleks dengan HIF-1 β , bertranslokasi ke inti dan kemudian terikat pada *hypoxia response element* (HRE) pada promotor gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen. Banyak gen yang terlibat dalam konsumsi glukosa dan glikolisis ternyata merupakan gen sasaran dari HIF-1. *Hypoxia inducible factor-1* antara lain meregulasi ekspresi gen *glucose transporter* (GLUT) serta *lactate dehydrogenase* (LDH).^{1,2,3}

GLUT merupakan protein transporter yang berperan mentransport glukosa dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Aktivitas transport bergantung pada kadar glukosa dan jumlah protein transporter di membran sel.⁴ Pada kondisi hipoksia, peningkatan ekspresi gen GLUT akan meningkatkan jumlah GLUT sehingga menyebabkan peningkatan konsumsi glukosa, yang merupakan salah satu mekanisme untuk memenuhi kebutuhan molekul *adenosine triphosphate* (ATP).³

Pada kondisi hipoksia terjadi penurunan molekul ATP sehingga kebutuhan energi tidak dapat dipenuhi. Untuk mengatasinya, metabolisme akan beralih menjadi anaerob yang ditandai dengan peningkatan aktivitas spesifik LDH.³ Enzim ini merupakan enzim yang berperan mengkatalisis reaksi interkonversi piruvat dan laktat, tergantung pada ketersediaan oksigen.^{5,6}

Ada dua jenis subunit LDH yang berbeda pada organisme yaitu subunit H terutama diekspresikan di jaringan otak dan otot jantung, dan subunit M terutama diekspresikan di jaringan hati dan otot skelet, yang disandi oleh gen yang berbeda. Oleh karena itu, masing-masing organ tersebut mempunyai pola isozim LDH yang spesifik.⁷

Untuk mempelajari pola isozim LDH di jaringan hati pada hipoksia sistemik kronik dilakukan induksi hewan coba dengan hipoksia sistemik kronik. Pada penelitian ini hewan coba dimasukkan ke dalam *hypoxic chamber* yang mengandung gas campuran (oksigen 10% dan nitrogen 90%) selama 1, 3, 7 dan 14 hari. Organ yang diamati pada penelitian ini adalah hati karena organ ini merupakan organ yang metabolismenya sangat aerob dengan fungsi yang sangat vital sehingga perlu diteliti bagaimana perubahan metabolisme glukosa yang terjadi di hati pada kondisi hipoksia sistemik kronik.

I.2. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dapat disimpulkan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- I.2.1. Apakah konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik lebih tinggi daripada jaringan hati tikus normal?
- I.2.2. Apakah aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik lebih tinggi daripada jaringan hati tikus normal?
- I.2.3. Apakah terdapat perbedaan pola isozim LDH antara jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dengan jaringan hati tikus normal?
- I.2.4. Apakah terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dan jaringan hati tikus normal.

I.3. Hipotesis Penelitian

- I.3.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik lebih tinggi daripada jaringan hati tikus normal.
- I.3.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik lebih tinggi daripada jaringan hati tikus normal.

I.3.3. Terdapat perbedaan pola isozim LDH antara jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dengan jaringan hati tikus normal.

I.3.4. Terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dan jaringan hati tikus normal

I.4. Tujuan

I.4.1. Tujuan Umum

Mempelajari proses glikolisis dalam jaringan hati tikus yang mengalami hipoksia sistemik kronik.

I.4.2. Tujuan Khusus

I.4.2.1. Membandingkan konsumsi glukosa antara jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dengan jaringan hati tikus normal.

I.4.2.2. Membandingkan aktivitas spesifik LDH antara jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dengan jaringan hati tikus normal.

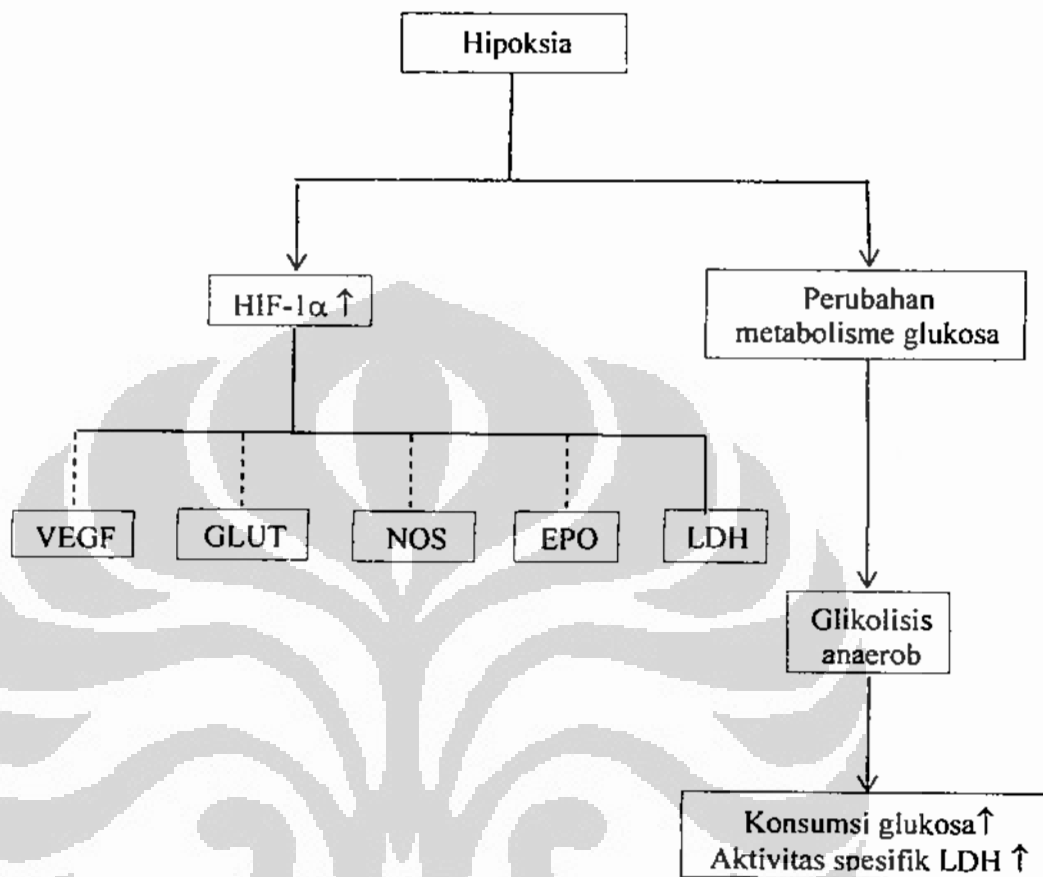
I.4.2.3. Membandingkan pola isozim LDH antara jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dengan jaringan hati tikus normal.

I.4.2.4. Menganalisis hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dan jaringan hati tikus normal.

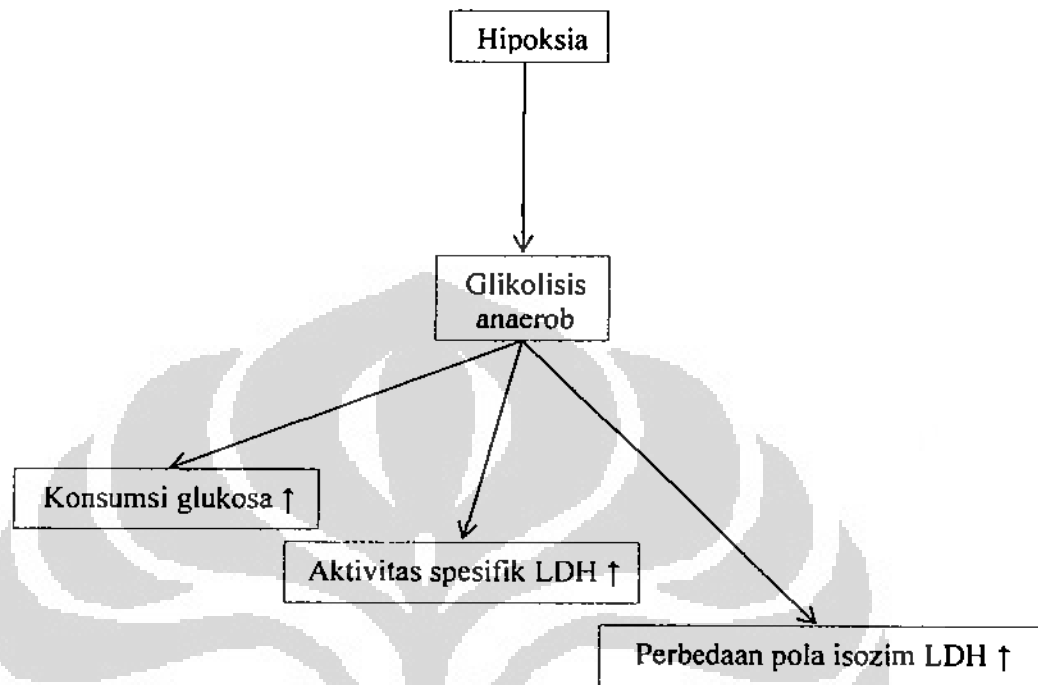
I.5. Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai respons metabolisme glukosa jaringan hati tikus pada hipoksia sistemik kronik.

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Konsep



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Hipoksia

Pada kondisi normal, udara yang kita hirup mengandung kurang lebih 21 % oksigen, sedangkan sel-sel tubuh kita hidup dalam lingkungan yang mengandung kadar oksigen dengan kisaran 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 %. Perbedaan kadar oksigen antar organ atau jaringan ini menyebabkan hipoksia sulit didefinisikan. Definisi yang praktis dari hipoksia adalah suatu kondisi dimana suplai oksigen tidak mencukupi untuk keperluan sel, jaringan atau organ.⁸

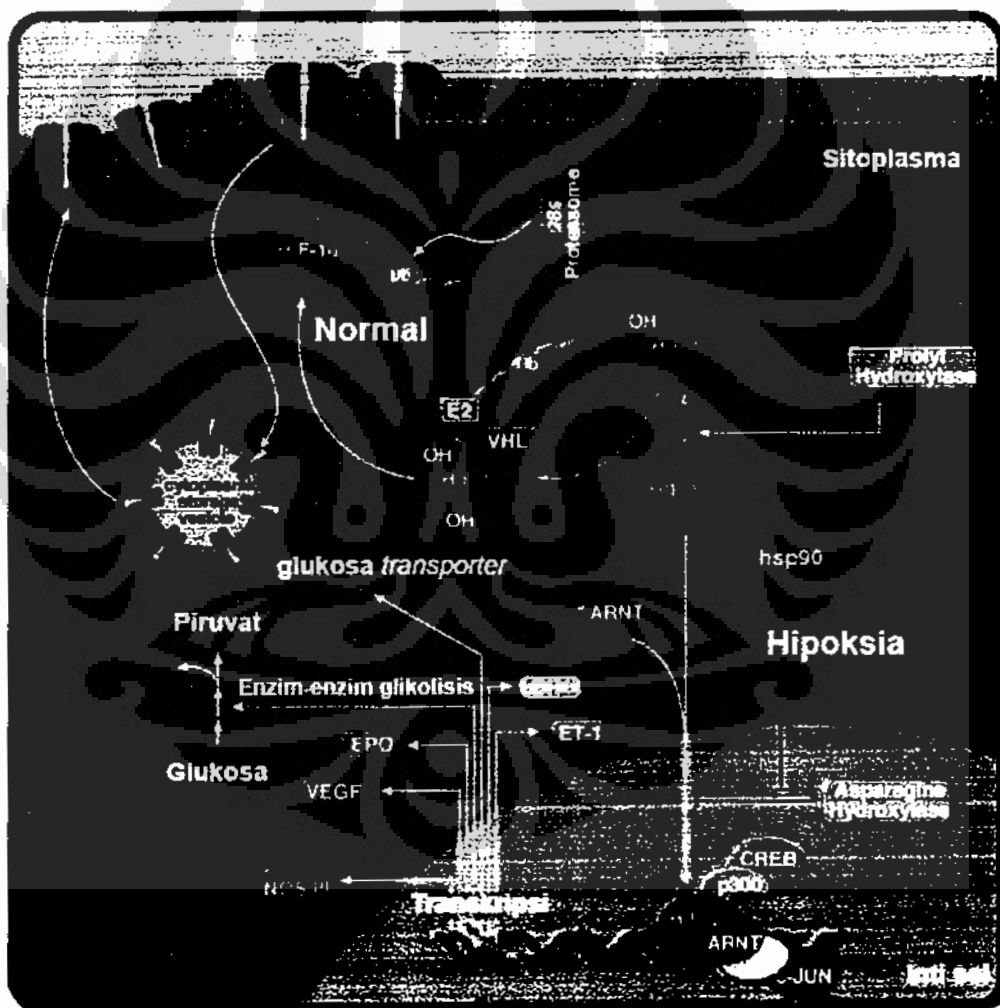
Oksigen diketahui merupakan akseptor elektron terakhir dalam rantai transport elektron. Bila oksigen tidak mencukupi, transport elektron menjadi terganggu, terjadi deplesi molekul ATP sehingga kebutuhan energi tidak dapat dipenuhi. Hipoksia terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara konsumsi oksigen seluler dengan suplai oksigen bagi sel. Kondisi seperti ini dapat terjadi akibat berbagai hal. Antara lain adalah menurunnya kapasitas transport O₂ oleh Hb (*anemic hypoxia*). Kondisi yang sama yang terlihat pada *anemic hypoxia* dapat terjadi karena pembentukan karbonmonoksida hemoglobin pada perokok berat. Karbon monoksida lebih tinggi afinitasnya terhadap hemoglobin sehingga pada perokok berat hemoglobin lebih kuat berikatan dengan karbon monoksida, yang menyebabkan kapasitas transport oksigen oleh Hb menurun. Penyebab lainnya, pembuluh-pembuluh pada jaringan seringkali mempunyai fungsi dan struktur yang tidak normal seperti jaringan pembuluh yang tidak teratur, pemendekan, pemanjangan, dan tidak adanya regulasi aliran darah. Selain itu hipoksia dapat disebabkan oleh gangguan difusi oksigen (*diffusional hypoxia*). *Diffusional hypoxia* terjadi karena meningkatnya jarak difusi, biasanya terjadi pada tumor. Hal ini menyebabkan tidak cukupnya suplai oksigen dari pembuluh darah ke jaringan yang jauh. Penyebab hipoksia yang lainnya adalah tekanan parsial oksigen (pO₂) yang rendah dalam darah arteri.⁹

Jaringan dapat bertahan terhadap kondisi hipoksia dalam waktu tertentu tergantung pada jaringan dan spesies organisme. Otot skeletan lebih tahan terhadap hipoksia dibandingkan dengan jaringan saraf. Agar dapat beradaptasi terhadap hipoksia, jaringan harus mampu 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 dimana suplai oksigen kurang dari yang dibutuhkan jaringan.¹⁰

Selama lebih dari satu dekade terakhir, pemahaman mengenai mekanisme adaptasi terhadap hipoksia pada level molekuler telah jauh berkembang. Sebagai respon terhadap hipoksia, terjadi aktivasi suatu faktor transkripsi yang dinamakan HIF-1. *Hypoxia inducible factor-1* merupakan protein heterodimer, terdiri dari subunit HIF-1 α dengan berat molekul 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar oksigen dan subunit HIF-1 β dengan berat molekul 91-94 kDa yang merupakan protein konstitutif. HIF-1 β juga dikenal sebagai ARNT. *Hypoxia inducible factor-1 α* merupakan protein yang tidak stabil karena pada kondisi normoksia didegradasi oleh sistem ubiquitin proteasom dan mengalami stabilisasi sebagai respon terhadap hipoksia. Selanjutnya, HIF-1 α membentuk kompleks dengan HIF-1 β , bertranslokasi ke inti dan kemudian terikat pada HRE pada promotor gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen. Banyak gen yang terlibat dalam konsumsi glukosa dan glikolisis ternyata merupakan gen sasaran dari HIF-1. *Hypoxia inducible factor-1* antara lain meregulasi ekspresi gen *erythropoietin* (EPO), LDH, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *nitric oxide synthase* (NOS), *glucose transporter* (GLUT) dan gen-gen lain yang mempengaruhi glikolisis.^{2,11}

Hypoxia inducible factor-1 diregulasi melalui proses hidroksilasi yang tergantung oksigen pada residu Pro402 dan Pro564 dalam molekul HIF-1 α atau HIF-2 α pada *oxygen-dependent degradation* (ODD). Terdapat 3 *prolyl hydroxylase* (PHD), yaitu PHD-1, PHD-2 dan PHD-3. *Prolyl hydroxylase* merupakan dioksigenase yang memerlukan oksigen dan 2-oksoglutarat sebagai ko-substrat. *Prolyl hydroxylase* mengandung besi yang berikatan dengan residu His dan 1 residu Asn. Pengikatan oksigen ini memerlukan vitamin C untuk

mempertahankan besi dalam bentuk fero. *Prolyl hydroxylase* mentransfer 1 atom oksigen ke residu Pro dari HIF-1 α dan 1 atom oksigen lainnya ke oksoglutarat membentuk suksinat dan karbondioksida. Bila oksigen berkurang atau PHD mengalami inaktivasi karena kompetisi dengan substrat analog, residu Pro tidak mengalami perubahan. Efek yang sama ditemukan pula pada *iron chelation*, oksidasi dan adanya ion Co. Daerah transaktivasi pada C-terminal dari HIF-1 α juga mengalami hidroksilasi yang tergantung oksigen. Hidroksilasi pada daerah ini terjadi pada residu *asparagine* (Asn) 803 dan 851 yang mengatur aktivasi HIF-1 α setelah berikatan dengan koaktivator CBP/p300.^{2,11}



Gambar II.1. Mekanisme regulasi HIF-1 α pada kondisi normal dan hipoksia.¹¹

Pada kondisi normal, hidroksilasi residu Pro akan menyebabkan degradasi proteolitik, karena berinteraksi dengan protein *von hippel lindau* (VHL), suatu protein supresor tumor. Interaksi terjadi melalui ikatan hidrogen dengan kantung pengikatan OH-Pro pada domain- β pVHL. *Hypoxia inducible factor-1* yang telah berikatan dengan pVHL akan didegradasi melalui system ubiquitin-proteosom. Terdapat juga HIF-2 α dan HIF-3 α . *Hypoxia inducible factor-2 α* yang sangat mirip dengan HIF-1 α dalam hal struktur dan fungsi, tetapi ekspresinya terbatas pada jaringan tertentu. Juga terdapat perbedaan gen sasaran antara HIF-1 α dengan HIF-2 α .^{2,11}

Selain mekanisme stabilisasi HIF-1 α melalui hipoksia, banyak *growth factors* dan sitokin yang diketahui dapat menstabilisasi HIF-1 α pada keadaan normoksia. Termasuk di dalamnya antara lain insulin, *insulin-like growth factors* 1 dan 2, *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor* 2, *interleukin-1 β* , *tumour necrosis factor α* , *angiotensin II*, trombin, *transforming growth factor β* , *platelet-derived growth factor* dan *hepatocyte growth factor*. Kebanyakan dari *growth factor* ini kemungkinan menstabilisasi HIF-1 α melalui jalur kinase yang diaktifkan melalui reseptor-reseptor tertentu. Tetapi belum diketahui bagaimana HIF-1 α akhirnya benar-benar stabil melalui jalur-jalur ini.^{2,11}

II.2. Metabolisme glukosa dalam kondisi normal

Proses kehidupan semua sel dikendalikan oleh energi. Pertumbuhan, transport molekul melalui membran sel dan seluruh aktivitas sel membutuhkan energi. Molekul ATP yang merupakan molekul dasar penghasil energi di dalam tubuh. Molekul ATP diperoleh dari glukosa, asam lemak bebas, *triacylglycerol* (TAG) dan asam amino. Dalam konsumsi keseharian, glukosa akan menyediakan hampir 50-75% dari total kebutuhan energi tubuh.¹¹

Glukosa merupakan karbohidrat terpenting dalam kaitannya dengan penyediaan energi di dalam tubuh. Glukosa ini kemudian akan berperan sebagai salah satu molekul utama bagi pembentukan energi di dalam tubuh. Dalam tubuh manusia glukosa yang diserap oleh usus halus kemudian akan terdistribusi ke dalam semua sel tubuh melalui aliran darah. Sumber energi seperti glukosa diubah menjadi piruvat melalui jalur glikolisis di dalam sitoplasma sel.¹³

Proses oksidasi glukosa terjadi melalui 3 tahap berbeda di dalam sel, yaitu glikolisis terjadi di sitoplasma, siklus Krebs di matriks mitokondria, dan transport elektron di membran dalam mitokondria. Glikolisis terjadi diseluruh sel makhluk hidup. Glikolisis merupakan proses konversi glukosa menjadi piruvat dan NADH. Produksi molekul piruvat bergantung pada keberadaan oksigen. Pada kondisi kecukupan oksigen, di dalam mitokondria, molekul piruvat dikonversi menjadi asetil KoA oleh *pyruvate dehydrogenase* (PDH). Asetil KoA melalui siklus Krebs akan menghasilkan elektron melalui pembentukan NADH dan FADH₂, yang akan menyumbangkan elektronnya ke proses fosforilasi oksidatif. Selama proses fosforilasi oksidatif, NADH dibentuk kembali menjadi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺), yang diperlukan untuk kelanjutan produksi ATP dari glikolisis.^{8, 14-15}

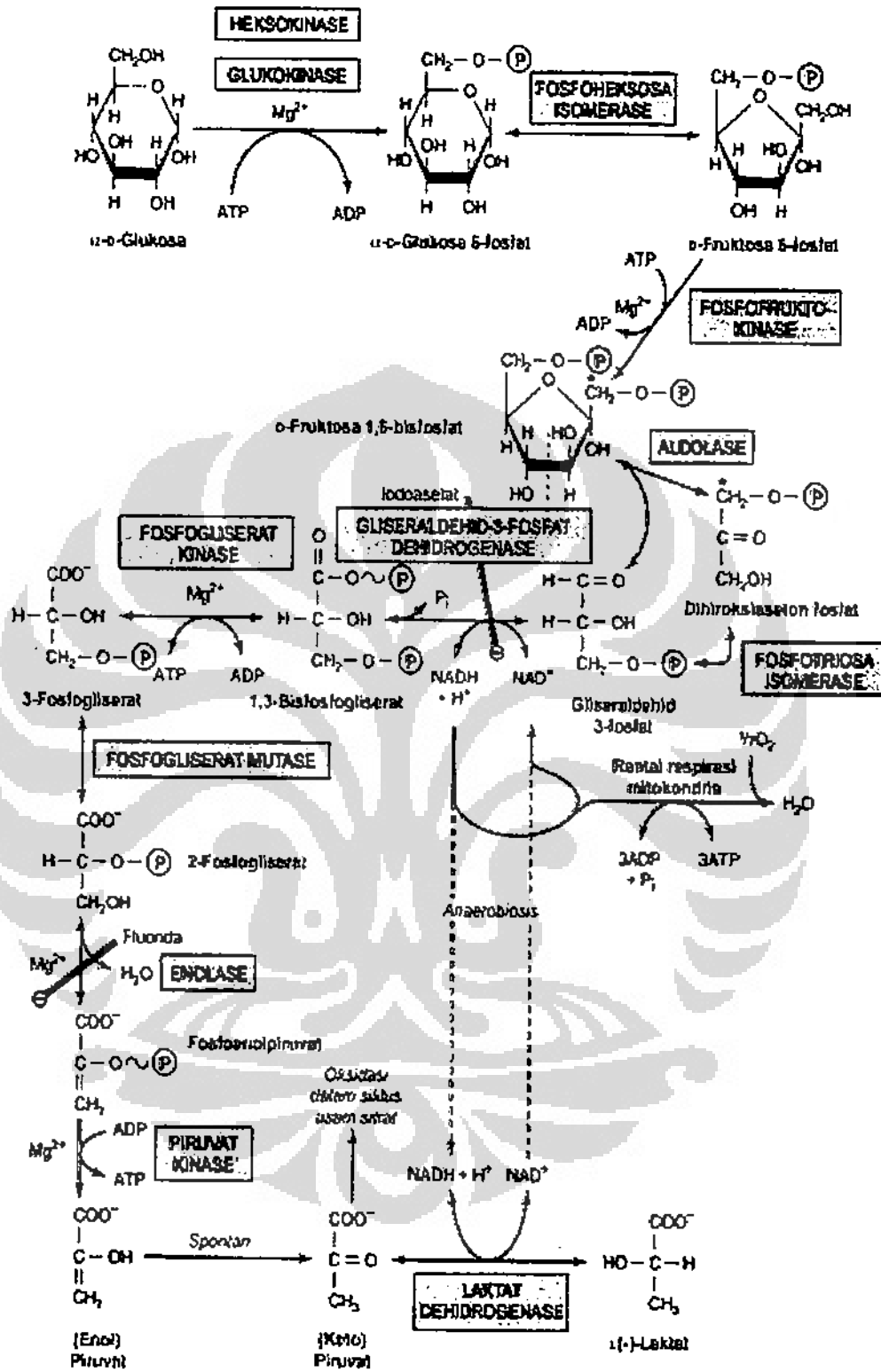
Keseluruhan proses glikolisis, siklus Krebs dan fosforilasi oksidatif yang berjalan dengan efisien akan menghasilkan 38 molekul ATP untuk setiap molekul glukosa yang dioksidasi.⁷ Molekul ATP dibutuhkan untuk proses fosforilasi fruktosa-6-fosfat menjadi fruktosa-1,6-bisfosfat. Walaupun demikian, energi yang dihasilkan dalam bentuk ATP pada proses glikolisis lebih banyak dari energi yang digunakan. Molekul ATP dihasilkan pada tahap pemecahan 1,3-bisfosfoglisarat dan *phosphoenolpyruvate* (PEP). Setiap 2 molekul ATP yang digunakan pada proses glikolisis ini hanya dihasilkan 2 molekul ATP untuk setiap molekul glukosa, dibandingkan dengan siklus Krebs yang menghasilkan 38 molekul ATP, walaupun energi yang dihasilkan dari proses glikolisis lebih sedikit dibandingkan dengan siklus Krebs, namun proses glikolisis mempunyai satu fungsi unik, yaitu kemampuannya untuk menghasilkan ATP dalam kondisi anaerob atau disebut glikolisis anaerob.¹⁵

II.3. Metabolisme glukosa dalam kondisi hipoksia

Dalam kondisi hipoksia, metabolisme akan beralih ke proses glikolisis anaerob. Proses ini pertama kali dikemukakan oleh Louis Pasteur pada tahun 1860. Pasteur menyatakan bahwa konsumsi glukosa berbanding terbalik dengan ketersediaan oksigen. Hal ini berarti bahwa proses glikolisis dapat terjadi dalam kondisi hipoksia.¹⁶ Pada kondisi hipoksia, produksi molekul ATP dapat dipenuhi

dari pembentukan kembali NAD^+ . Jika kondisi bersifat anaerob, reoksidasi NADH melalui pemindahan sejumlah unsur ekuivalen pereduksi melalui rantai respirasi kepada oksigen tidak terjadi. Piruvat direduksi oleh NADH menjadi laktat. Reoksidasi NADH lewat pembentukan laktat memungkinkan berlangsungnya glikolisis dalam kondisi tanpa oksigen melalui pembentukan kembali NAD^+ (Gambar II.2). Hasil penelitian Kawaguchi pada makrofag, menunjukkan bahwa sel beradaptasi terhadap kondisi hipoksia dengan beralih ke glikolisis anaerob untuk membentuk ATP.⁴ Hasil penelitian Webster pada sel eukariotik, menunjukkan bahwa dalam kondisi hipoksia metabolisme berubah dengan mengaktifkan glikolisis anaerob.¹⁶

Salah satu respon sel terhadap kondisi hipoksia adalah terjadi peningkatan aktivasi HIF-1. Banyak gen yang diregulasi oleh HIF-1 terlibat, seperti ekspresi gen GLUT serta LDH.¹ Peningkatan ekspresi gen GLUT akan meningkatkan jumlah GLUT sehingga akan menyebabkan peningkatan konsumsi glukosa, yang merupakan salah satu mekanisme untuk memenuhi kebutuhan ATP. Studi terbaru menunjukkan, HIF-1 dapat berperan langsung menghambat masuknya piruvat ke siklus Krebs, melalui aktivasi *pyruvate dehydrogenase kinase* (PDK) 1 dengan menghambat penggunaan piruvat sebagai substrat bagi PDH, yang mengkonversi piruvat menjadi asetil KoA. Dengan demikian, piruvat yang masuk ke siklus Krebs terbatas, dan sel mengalami penumpukan piruvat, yang kemudian dikonversi menjadi laktat oleh LDH. Pada kondisi hipoksia, peningkatan ekspresi gen LDH akan meningkatkan konversi piruvat menjadi laktat, oleh karena itu laktat sering digunakan sebagai petanda hipoksia.¹⁷⁻¹⁹ Paparan hipoksia telah terbukti dapat menghasilkan perubahan yang ditandai dengan perubahan metabolisme glukosa dan lebih spesifik lagi metabolisme hati, karena hati merupakan organ utama homeostasis glukosa.¹⁷



Gambar II.2. Jalur glikolisis.²⁰

Pada hati terdapat beberapa daerah yang berbeda kadar oksigennya, karena aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta (periportal) ke vena sentral (perivenus). Terdapat gradien tekanan oksigen yang semakin menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35 mmHg di vena sentral (perivenus). Akibatnya terdapat perbedaan metabolisme sel-sel parenkim hati. Pada daerah periportal yang merupakan daerah yang kaya akan oksigen, enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan di ekspresikan, sedangkan pada daerah perivenus kandungan oksigennya lebih rendah, sehingga enzim-enzim glikolisis ekspresinya lebih kuat pada daerah ini.²¹

Hati merupakan salah satu organ yang paling penting dalam konsumsi laktat untuk kemudian diubah menjadi glukosa melalui glukoneogenesis. Pada kondisi normal, daerah periportal lebih tinggi konsumsi laktatnya dibandingkan dengan daerah perivenus, karena pada daerah ini enzim-enzim glukoneogenesis yang memakai laktat sebagai substratnya lebih banyak diekspresikan daripada di daerah perivenus. Namun, pada kondisi hipoksia konsumsi laktat oleh sel-sel pada daerah periportal mengalami penurunan, oleh karena untuk metabolisme laktat diperlukan oksigen yang cukup. Akan tetapi pada kondisi hipoksia, terjadi peningkatan produksi laktat yang disebabkan oleh penurunan glukoneogenesis akibat penghambatan enzim *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), dan juga oleh karena peningkatan aktivitas LDH yang mengkonversi piruvat menjadi laktat oleh sel-sel periportal.²² Jaringan yang berfungsi dalam kondisi hipoksia termasuk hati cenderung memproduksi laktat.²³ Pada kondisi hipoksia walaupun terjadi penurunan konsumsi laktat akibat penurunan oksigen, tetapi hati masih dapat mengonsumsi laktat dalam jumlah yang sangat menurun.²¹

II.4. Enzim *Lactate Dehydrogenase*

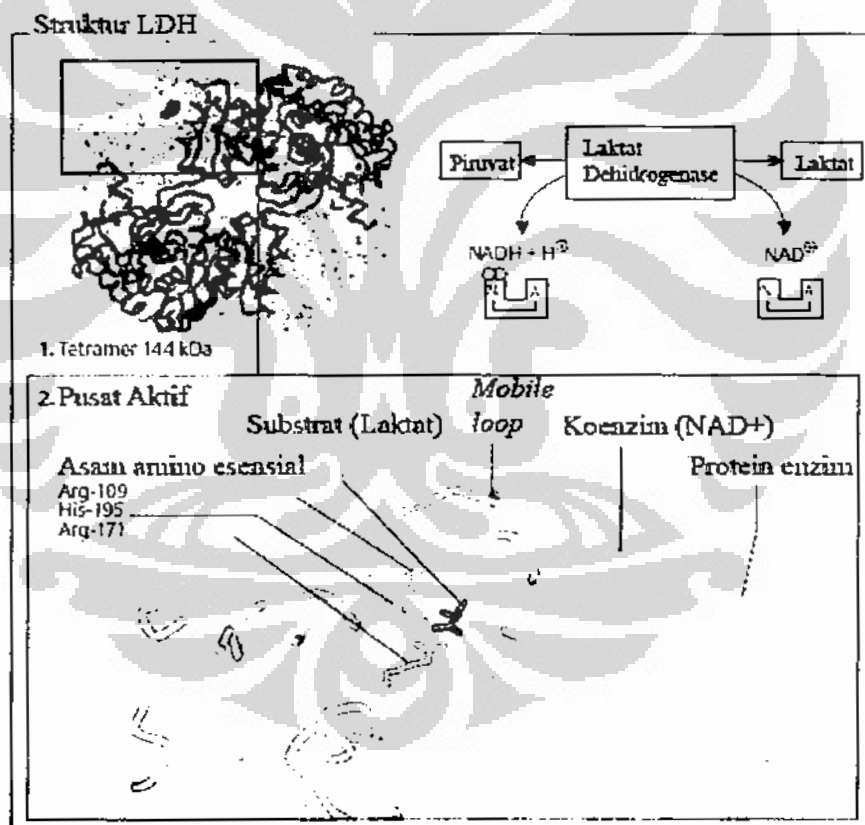
II.4.1. Struktur *lactate dehydrogenase*

Struktur LDH (144 kDa) merupakan tetramer terdiri 4 monomer. Pada tetramer, subunit menempati posisi ekuivalen : masing-masing monomer mempunyai pusat aktif. Pusat aktif subunit LDH terlihat secara skematik pada Gambar II.3.⁷

Lactate dehydrogenase berperan penting dalam mengkatalisis reaksi interkonversi piruvat dan laktat yang tergantung pada ketersediaan oksigen. *Lactate dehydrogenase* mengkonversi piruvat, hasil akhir glikolisis menjadi laktat pada kondisi anaerob, sedangkan pada kondisi aerob LDH mengkonversi laktat menjadi piruvat (Gambar II.3).⁷

II.4.2. Aktivitas enzim *lactate dehydrogenase*

Aktivitas enzim LDH dapat ditentukan secara kuantitatif dengan mengukur perubahan konsentrasi laktat sebagai substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut dalam jangka waktu tertentu. Satuan enzim yang diukur dengan cara tersebut dinyatakan dengan unit enzim.



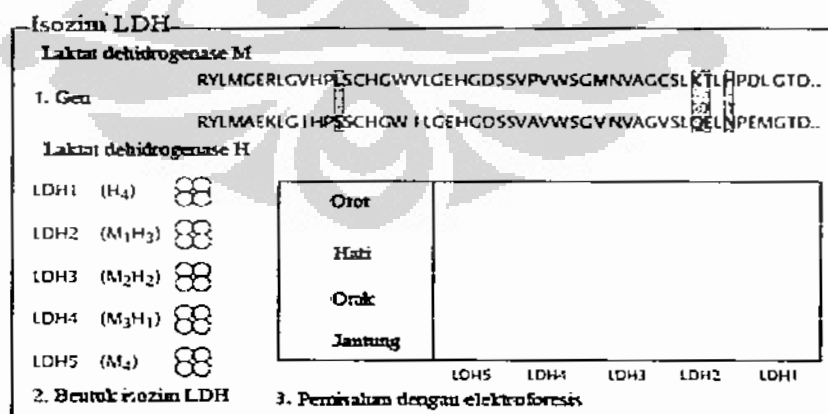
Gambar II.3. Struktur tetramer LDH dan Reaksi interkonversi yang dikatalisis oleh LDH, pusat aktif struktur LDH; Biru : peptida, merah : substrat (laktat), kuning : koenzim (NAD⁺), hijau : asam amino esensial (arg-109, his-195, arg-171) yang secara langsung terlibat dalam katalisis, merah muda : *mobile loop* peptida dibentuk oleh residu asam amino 98-111.⁷

Satu unit enzim adalah jumlah enzim yang dapat menghasilkan piruvat satu mikromol per menit atau jumlah enzim yang mampu mengkatalisis perubahan satu mikromol laktat per menit dalam kondisi percobaan tertentu. Dengan demikian, keaktifan enzim dapat ditentukan dengan cara mengukur kadar piruvat yang terbentuk. Aktivitas spesifik enzim adalah jumlah satuan enzim per mikrogram protein dinyatakan dengan U/ μ g protein.

Enzim digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis suatu penyakit. Enzim dapat digunakan sebagai petanda dari suatu penyakit atau kerusakan jaringan. Pada kondisi normal, aktivitas LDH sangat sedikit ditemukan di dalam darah, namun ketika jaringan mengalami kerusakan, terjadi peningkatan jumlah aktivitas LDH di dalam darah, oleh karena itu aktivitas LDH sering digunakan sebagai pertanda adanya kerusakan jaringan.⁷ Peningkatan aktivitas LDH ini akibat dari semakin meningkatnya proses glikolisis untuk memenuhi kebutuhan energi. Hasil penelitian Pathak (2005), menunjukkan peningkatan aktivitas LDH beberapa kali lipat lebih tinggi pada proliferasi sel dan sel tumor karena proses glikolisis yang meningkat.⁷

II.4.3. Isozim *lactate dehydrogenase*

Ada dua jenis subunit LDH, yaitu subunit H dan subunit M. Dua subunit dapat dihubungkan ke dalam bentuk tetramer secara random, keseluruhan terdapat 5 isozim LDH yaitu LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 dan LDH5.⁷



Gambar II.4. Gen LDH, bentuk tetramer isozim LDH dan elektroforesis isozim LDH pada kondisi normal.⁷

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 disandi oleh gen LDH M yang berlokasi di kromosom 11p15.4. Urutan asam amino antara subunit H dan subunit M bersifat lestari (*conserved*), kecuali pada urutan asam amino seperti glisin (G), alanin (A), arginin (R) dan lisin (K) yang tergolong dalam jenis yang sama. Sedangkan urutan asam amino seperti lisin (K) dan treonin (T) pada subunit M serta glutamin (Q) dan asam glutamat (E) pada subunit H tergolong dalam jenis yang berbeda.⁷

Subunit H mengandung lebih banyak asam amino dengan residu asam sehingga lebih bermuatan negatif sedangkan subunit M mengandung lebih banyak residu asam amino dengan residu basa sehingga lebih bermuatan positif. Dalam medan listrik, subunit H akan bermigrasi ke kutub positif sedangkan subunit M akan bermigrasi ke kutub negatif (Gambar II.4.).^{7,24}

Isozim LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 dan LDH5 masing-masing mempunyai subunit H4, H3M1, H2M2, H1M3 dan M4. Isozim utama otot jantung adalah LDH1 yang mempunyai 4 subunit M (M untuk *muscle*), sedangkan LDH5 merupakan isozim utama otot skeletal dan hati yang mengandung 4 subunit H (H untuk *heart*). LDH1 mengkonversi laktat menjadi piruvat dalam kondisi aerob, sedangkan LDH5 lebih aktif dalam kondisi anaerob yang mengkatalisis konversi piruvat menjadi laktat.⁷

II.5. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses pergerakan molekul bermuatan listrik dalam larutan dengan menggunakan medan listrik. Dalam medan listrik, molekul-molekul akan bermigrasi dengan kecepatan yang bergantung pada muatan, bentuk dan ukurannya. Oleh karena itu, teknik elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan molekul. Teknik ini dapat digunakan untuk menganalisa dan mengisolasi molekul yang sangat besar, seperti protein dan asam nukleat, dan juga yang sederhana, seperti asam amino, peptida, nukleotida dan ion-ion sederhana.²⁵

Pada elektroforesis molekul bermuatan bergerak melalui medium yang dapat berupa selulosa asetat, kertas atau gel yang terbentuk dari poliakrilamid atau agarosa. Elektroforesis gel merupakan jenis elektroforesis yang paling sering digunakan karena teknik ini mudah dilakukan. Dengan menggunakan matriks gel agarosa dapat dilakukan pemisahan berdasarkan muatan molekul. Agarosa merupakan matriks gel yang paling sering dan aman digunakan untuk memisahkan protein.²⁵

Dalam suatu larutan dengan pH tertentu, protein-protein yang berbeda dapat mempunyai muatan listrik yang berbeda pula, karena susunan dan jumlah asam amino yang tidak sama. Bila campuran protein dalam larutan tersebut diletakkan dalam suatu medan listrik, tiap protein akan bermigrasi ke kutub berlawanan dengan muatan protein yang bersangkutan. Makin besar nilai mutlak protein tersebut, makin jauh jarak yang ditempuh. Dengan demikian protein-protein tersebut terpisah secara nisbi, sesuai muatannya. Protein yang tidak bermuatan pada pH larutan, tidak bergerak dalam medan listrik. Jadi, selama proses elektroforesis, setiap komponen dalam medium dengan pH tertentu akan bermigrasi dengan mobilitas tertentu sesuai dengan jumlah dan muatan masing-masing komponen pada pH tersebut. Larutan dapat digunakan untuk menjaga kestabilan pH medium, karena dapat mempengaruhi mobilitas partikel.²⁵

BAB III METODE PENELITIAN

III.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari suatu proyek penelitian dengan tema hipoksia. Penelitian ini dilakukan dengan cara eksperimen *in vivo* pada hewan coba tikus. Bahan yang diperiksa dari hewan coba adalah organ hati. Organ hati diperoleh dari 5 kelompok tikus perlakuan, yaitu: kelompok hipoksia 1 hari, kelompok hipoksia 3 hari, kelompok hipoksia 7 hari, kelompok hipoksia 14 hari dan kelompok kontrol.²³

III.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat. Penelitian berlangsung sekitar 6 bulan, mulai bulan Juli 2009 sampai dengan Desember 2009.

III.3. Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) galur *Sprague Dawley* jantan yang berusia 6 minggu dengan berat antara 150-250 gram. Tikus diperoleh dari Badan Penelitian Veteriner (Balitvet), Departemen Pertanian RI. Etik hewan coba diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan – Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan RI (BALITBANG DEPKES RI) dengan Nomor Persetujuan Etik (*Ethical Clearence*) LB.03.02/KE/1373/2008. Perlakuan hipoksia diberikan selama 1, 3, 7 dan 14 hari. Setelah perlakuan, dilakukan *euthanasia* dengan menggunakan eter, dan jaringan hatinya diambil melalui pembedahan. Jaringan hati hasil perlakuan hipoksia ini, bila tidak langsung dikerjakan disimpan di *deep freezer* bersuhu -86°C.

III.4. Penetapan Jumlah Hewan Coba

Jumlah tikus masing-masing kelompok adalah 5 ekor berdasarkan rumus *Federer*⁽²⁶⁾, yaitu:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 5$$

dimana : t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan di tiap kelompok

Tikus dibagi menjadi 5 (lima) kelompok, yaitu:

1. Kelompok 1 (I): perlakuan hipoksia dilakukan selama 1 hari
2. Kelompok 2 (II): perlakuan hipoksia dilakukan selama 3 hari
3. Kelompok 3 (III): perlakuan hipoksia dilakukan selama 7 hari
4. Kelompok 4 (IV): perlakuan hipoksia dilakukan selama 14 hari
5. Kelompok 5 (kontrol) (K): tidak ada perlakuan hipoksia

Berdasarkan rumus *Federer* di atas dan jumlah perlakuan maka didapatkan jumlah minimal sampel untuk masing-masing perlakuan adalah 5 sampel.

III.5. Bahan dan Alat Penelitian

III.5.1. Bahan Penelitian

III.5.1.1. Larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4

III.5.1.2. Larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) (standar protein)

III.5.1.3. Larutan *Thiochloroacetate Acid*(TCA) 8%

III.5.1.4. Larutan glukosa standar (50 mg/dL)

III.5.1.5. Reagensia warna untuk pengukuran kadar glukosa: *Glucose ST Kit*

III.5.1.6. Reagen 1 (*phosphate buffer* dan *pyrivate*)

III.5.1.7. Reagen 2 (*good's buffer* dan NADH)

III.5.1.8. Monoreagen (campuran reagen 1 dan reagen 2)

III.5.1.9. *Titan Gel LD Isoenzyme Plate* (*plate agarose*)

III.5.1.10. *Titan Gel LD Isoenzyme Reagent* (serbuk pewarna)

III.5.1.11. *Titan Gel LD Isoenzyme Diluent* (pelarut pewarna)

III.5.1.12. *Titan Gel LD Isoenzyme Buffer* (dapar elektroforesis)

III.5.1.13. Asam asetat 10%

III.5.2. Alat Penelitian

Semua alat yang digunakan dalam kondisi steril

III.5.2.1. Neraca analitik (sartorius)

III.5.2.2. *Homogenizer*

III.5.2.3. *Sentifuge*

III.5.2.4. Spektrofotometer UV (*SmartSpec-Plus*, Biorad®)

III.5.2.5. *Cuvet*

III.5.2.6. *Micropipette* berbagai ukuran beserta tips

III.5.2.7. Vorteks

III.5.2.8. *Titan Gel Blotter A*

III.5.2.9. *Titan Gel Blotter B*

III.5.2.10. *Titan Gel Blotter D*

III.5.2.11. *Titan Gel LD Templates*

III.5.2.12. Sarung tangan

III.5.2.13. Set alat bedah

III.5.2.14. Labu Ukur

III.5.2.15. Batang Pengaduk

III.5.2.16. pH Meter

III.5.2.17. *Power Supply*

III.6. Cara Kerja

III.6.1. Perlakuan hipoksia

Tikus perlakuan dimasukkan ke dalam sungkup hipoksia yang dialiri gas campuran (O_2 10%: N_2 90%) (Gambar III.1). Gas campuran dialirkan dengan permulaan kecepatan 3mL/menit. Penurunan oksigen diamati dengan *digital oxygen meter* (OX-12B) no. 5213 (MIEI, Shanghai-P.R. China), dan kipas dinyalakan untuk menambah sirkulasi udara, jika kadar oksigen turun sampai 10% oksigen dan 90% nitrogen maka kecepatan aliran diturunkan menjadi 1-2 mL/menit. Setelah kadar udara dalam sungkup cukup stabil tikus dimasukkan ke dalam kandang dan waktu pada saat tikus dimasukkan dicatat sebagai jam nol.

Selama perlakuan, kondisi tikus dan sungkup diamati. Pengamatan sungkup terutama pada kadar oksigen, kecepatan aliran dan sirkulasi udara. Kondisi optimal ditandai stabilnya kadar oksigen. Sirkulasi udara yang baik ditandai dengan dinding sungkup yang tidak berembun dan gelembung udara CO₂ dapat diamati dalam botol yang mengandung larutan kalsium karbonat jenuh. Pembersihan kandang serta pergantian makanan dan minuman dilakukan 2 hari sekali. Pada saat pembersihan, tikus dipindahkan sementara pada sungkup yang lebih kecil yang telah dioptimalisasi dengan kadar oksigen tetap 10%.



Gambar III.1. Tikus dalam kandang perlakuan hipoksia

Pada akhir perlakuan tikus dikorbankan, setelah itu dilakukan *euthanasia* dengan eter. Dalam kondisi terbius tikus dikeluarkan, kemudian diterlentangkan di papan bedah. Keempat kaki direntangkan sejauh mungkin dan difiksasi ke papan bedah dengan menggunakan jarum pentul. Permukaan perut dibasahi dengan alkohol, selanjutnya dinding perut dijepit dengan pinset dan digunting dengan arah melintang. Pengguntingan dilakukan ke arah tulang dada sampai diafragma. Beberapa organ dan darah dipisahkan untuk beberapa penelitian. Jaringan hati ditimbang dan disimpan pada suhu -86 °C.

III.6.2. Pembuatan Homogenat Hati

Pembuatan homogenat hati dilakukan pada suhu 4°C. Jaringan hati ditimbang 0,1 gram dan dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditambah larutan dapar fosfat 0,1M pH 7,4 sebanyak 0,5 mL dan dilakukan pembuatan homogenat dengan menggunakan *micro homogenizer*. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, selama 10 menit. Kemudian supernatan diambil dan disimpan pada suhu -4°C (homogenat hati).

III.6.3. Pengukuran Kadar Protein Homogenat Hati (Metode Warburg-Christian)

III.6.3.1. Pengukuran kurva standar

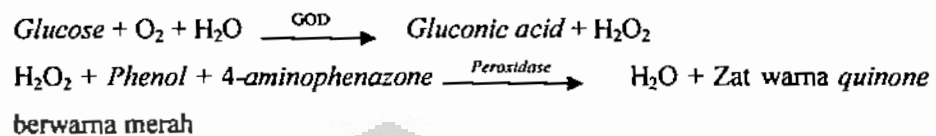
Masing-masing larutan BSA (standar protein) dibuat dalam berbagai kadar (0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,3mg/mL, 0,4mg/mL, 0,5mg/mL, 0,6mg/mL, 0,7mg/mL, 0,8mg/mL, 0,9mg/mL dan 1mg/mL). Masing-masing kadar larutan BSA dibaca serapannya pada λ 280 nm. Hasil serapan masing-masing kadar larutan BSA dibuat menjadi satu kurva standar dengan menggunakan kadar larutan BSA sebagai sumbu x dan serapan sebagai sumbu y.

III.6.3.2. Pengukuran kadar protein homogenat hati

Sebanyak 5 μ L homogenat hati dilakukan pengenceran dengan menambahkan akuabides hingga volume akhir 1000 μ L. Tiap larutan homogenat hati dibaca serapannya pada λ 280 nm. Jika serapan homogenat hati melebihi serapan kadar standar, maka dilakukan pengenceran dengan akuabides. Kadar protein homogenat hati diperoleh dari serapan homogenat hati dibandingkan dengan standar BSA. Nilai kadar protein homogenat hati yang dihasilkan kemudian dikalikan dengan pengenceran.

III.6.4. Pengukuran Konsumsi Glukosa Homogenat Hati (Metode enzimatik Trinder)

Pengukuran konsumsi glukosa homogenat hati menggunakan *Glucose ST Kit* berdasarkan metode *Trinder* menggunakan enzim *glucose oxidase* (GOD), dan *peroxidase* dengan reaksi sebagai berikut :



Glucose oleh GOD dikonversi menjadi *gluconic acid* dan H_2O_2 , kemudian H_2O_2 oleh *peroxidase* akan membentuk zat warna quinone berwarna merah muda yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 507 nm.

Sebanyak 100 μL homogenat hati ditambah 100 μL glukosa (100 mg/dL), kemudian divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Campuran ini ditambah 10 μL larutan TCA 8% dan divorteks lagi dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil untuk pemeriksaan selanjutnya, sedangkan endapannya dibuang.

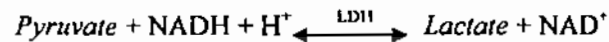
Untuk pengukuran konsumsi glukosa, diambil 10 μL supernatan, 10 μL akuabides (blanko) dan 10 μL larutan standar glukosa, masing-masing ditambah 1000 μL reagensia warna, kemudian divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Untuk setiap sampel dilakukan pengukuran duplo. Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 507 nm. Kadar glukosa dapat dihitung dengan memasukkan nilai serapan ke dalam rumus berikut:

$$\text{Kadar glukosa (mg/dL)} = \frac{\text{Serapan uji}}{\text{Serapan standar}} \times \text{standar glukosa (mg/dL)}$$

Nilai konsumsi glukosa homogenat hati diperoleh dari hasil pengurangan kadar glukosa awal dengan kadar glukosa.

III.6.5. Pengukuran Aktivitas Spesifik LDH Homogenat Hati {Metode German Society of Clinical Chemistry (DGKC)}

Pengukuran aktivitas spesifik LDH homogenat hati menggunakan LDH FS Kit berdasarkan metode *german society of clinical chemistry* (DGKC) 1970, dengan reaksi sebagai berikut :



Pyruvate dan NADH dikonversi menjadi *lactate* dan NAD^+ oleh *lactate dehydrogenase* (LDH). Oksidasi NADH menjadi NAD^+ menyebabkan terjadi penurunan densitas optik pada panjang gelombang 340 nm. Kecepatan penurunan densitas optik ini berbanding lurus dengan aktivitas LDH.

Sebanyak 10 μL homogenat hati ditambah 500 μL monoreagen, dikocok, kemudian langsung diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm (bacaan t_0), serapan dibaca lagi setelah 3 menit.

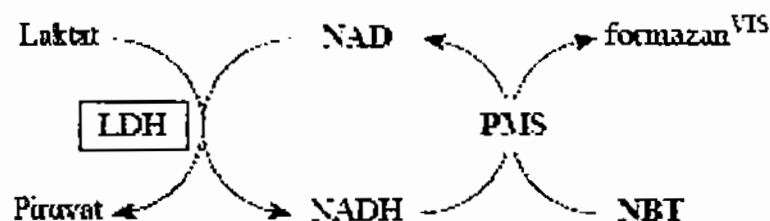
Pengukuran aktivitas LDH dilakukan duplo untuk tiap sampel. Aktivitas LDH dapat diketahui dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas LDH (U/L)} = \frac{\Delta \text{ serapan uji} \times 8095}{\text{Menit}}$$

Nilai aktivitas spesifik LDH diperoleh dari hasil pembagian aktivitas LDH dengan kadar protein total.

III.6.6. Elektroforesis Isozim LDH

Isozim LDH dipisahkan berdasarkan pergerakannya dalam *agarose* menggunakan metode TITAN GEL LD Isoenzyme, dengan reaksi sebagai berikut:



III.6.6.1. Persiapan dapar elektroforesis

Serbuk dapar elektroforesis dilarutkan dalam 1500 mL akuabides, kemudian sebanyak 35 mL larutan dapar elektroforesis dituang ke dalam wadah elektroforesis

III.6.6.2. Persiapan wadah tempat inkubasi *plate agarose*

Kertas saring (kira-kira berukuran sama dengan wadah) dibasahi dengan akuabides dan dibuang kelebihan airnya, kemudian wadah ditutup dan ditempatkan disuhu 45°C

III.6.6.3. Aplikasi homogenat hati (sampel)

Untuk aplikasi sampel, *plate agarose* disiapkan dengan meletakkan *blotter A* di tempat aplikasi sampel, tepi *plate agarose* diberi nomor untuk memudahkan penempatan dan identifikasi sampel. *Plate agarose* diletakkan di *blotter D* dengan sisi *agarose* menghadap ke atas. Tempat aplikasi sampel dikeringkan dengan *blotter A*, kemudian *template* aplikasi sampel diletakkan di atas *agarose* dengan posisi yang telah disesuaikan dengan simbol positif pada sisi *plate* sambil ditekan dengan jari untuk memastikan tidak ada gelembung udara.

Sebanyak 3 μ L sampel diaplikasi ke dalam *template*, didiamkan selama 3 menit, kemudian *blotter A* diletakkan diatas *template* sambil ditekan dengan jari selama 30 detik, kemudian *template* diangkat secara hati-hati

III.6.6.4. Proses elektroforesis

Plate agarose diletakkan di dalam wadah elektroforesis dengan posisi *agarose* menghadap ke bawah *chamber* dengan *agarose* di sisi bawah sehingga tepi *agarose* berada di dalam dapar elektroforesis dan simbol positif pada sisi *plate agarose* sesuai dengan sisi positif pada wadah elektroforesis. Kemudian wadah elektroforesis ditutup dan elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 15 menit

III.6.6.5. Proses pewarnaan agarosa

Serbuk pewarna ditambah 1 mL pelarut pewarna, kemudian larutan pewarna dikocok hingga homogen. Persiapan ini dilakukan sekitar 4 menit sebelum elektroforesis dimulai. Setelah 15 menit, *plate agarose* dengan agarosa di sisi atas diletakkan dipermukaan yang rata. Kemudian larutan pewarna dituang disepanjang tepi *plate agarose*. Kemudian diratakan secara perlahan dengan batang pengaduk ke seluruh permukaan agarosa, kemudian *plate agarose* ditempatkan di wadah inkubasi dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 25 menit.

Setelah inkubasi, pencucian dilakukan 2 kali dengan asam asetat 10% selama 2 menit sambil digoyang-goyang. Kemudian permukaan *agarose* dikeringkan dengan *blotter B*, lalu *plate agarose* dikeringkan pada suhu 60°C selama 5 menit.

III.7. Analisis Statistik

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) yang diikuti dengan uji beda nyata terkecil (BNT, *least significant difference*, LSD) bila data berdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya untuk mengetahui adanya korelasi antar kelompok dilakukan uji korelasi Pearson.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian terhadap konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH dan pola isozim LDH jaringan hati tikus kontrol dan jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

IV.1 Konsumsi glukosa jaringan hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Dari perhitungan didapatkan sebaran nilai konsumsi glukosa jaringan hati tikus kontrol dan jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, seperti ditampilkan pada Tabel IV.1.

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan uji Saphiro-Wilk, didapat hasil bahwa konsumsi glukosa berdistribusi normal ($p > 0,05$). Karena data berdistribusi normal maka dilakukan analisis statistik parametrik yaitu menggunakan *analysis of variance* (ANOVA). Hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna konsumsi glukosa antara kelompok perlakuan ($p > 0,05$).

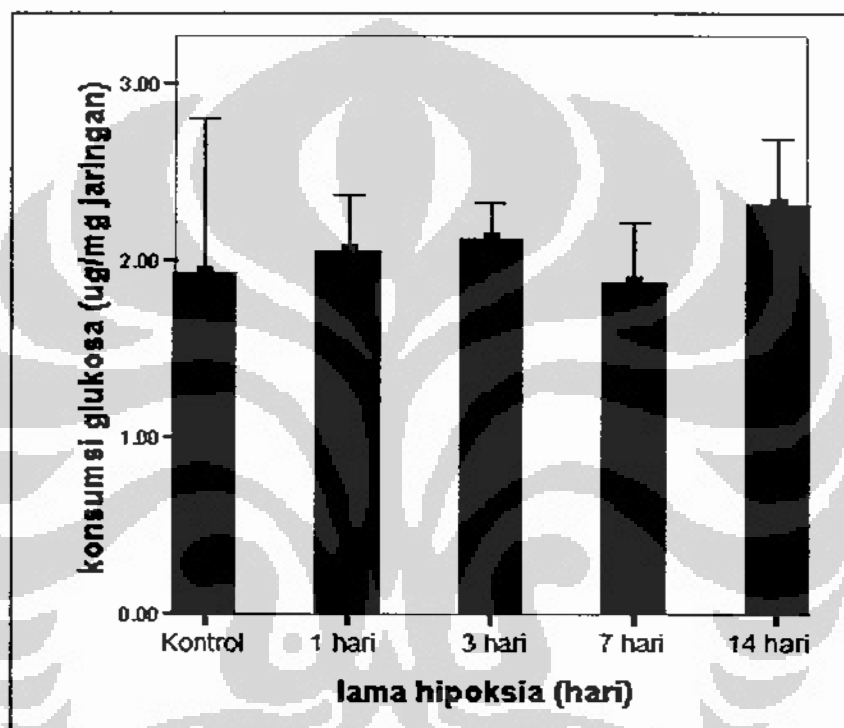
Tabel IV.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus ($\mu\text{g}/\text{mg}$ jaringan) kelompok yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Ulangan	Kontrol	Hipoksia			
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari
1	2.87	1.90	1.90	1.97	2.52
2	2.35	2.09	2.13	2.28	2.56
3	1.80	2.43	2.02	1.75	2.36
4	1.59	1.76	2.26	1.55	2.33
5	1.06	2.09	2.29	1.81	1.80
Rerata \pm SE	1.93 \pm 0.31	2.05 \pm 0.11	2.12 \pm 0.07	1.87 \pm 0.18	2.31 \pm 0.13

Keterangan: Tidak berbeda bermakna antar semua kelompok ($p > 0,05$)

Meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, namun terlihat bahwa konsumsi glukosa pada kelompok hipoksia 1, 3 dan 14 hari cenderung lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, kecuali pada kelompok hipoksia 7 hari. Konsumsi glukosa paling tinggi terjadi pada kelompok hipoksia 14 hari (Gambar IV.1).

Peningkatan konsumsi glukosa yang tidak berbeda bermakna ini diduga disebabkan karena adanya sumber energi lain yang digunakan untuk menghasilkan energi, yaitu melalui oksidasi beta asam lemak, yang berasal dari pemecahan TAG di jaringan adiposa. Pada penelitian Larsen (1989), ditemukan peningkatan gliserol pada kondisi hipoksia, gliserol yang dilepaskan dari TAG ini kemudian dikonversi menjadi gliserol-3-fosfat oleh gliserol kinase.²⁷ Shen (2005), gliserol kinase ternyata diregulasi oleh HIF-1 α pada kondisi hipoksia.²⁸



Gambar IV.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Keterangan: Tidak berbeda bermakna antar semua kelompok ($p > 0,05$)

IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Perhitungan aktivitas LDH dilakukan duplo untuk tiap sampel dan kemudian dihitung aktivitas spesifiknya per mikrogram protein. Dari perhitungan tersebut didapatkan sebaran nilai yang dapat dilihat pada Tabel IV.2.

Analisis statistik terhadap aktivitas spesifik LDH jaringan hati menggunakan uji Saphiro-Wilk menunjukkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Oleh karena itu dilakukan analisis parametrik, yaitu uji ANOVA. Pada uji ANOVA tampak adanya perbedaan bermakna antar semua kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana saja yang saling berbeda bermakna dilakukan uji *least significant difference* (LSD). Tampak bahwa terdapat perbedaan bermakna aktivitas spesifik LDH antar kelompok perlakuan. Pada awal hipoksia (kelompok hipoksia 1 hari), aktivitas spesifik LDH lebih rendah tidak bermakna dibanding kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa hipoksia belum berpengaruh terhadap metabolisme glukosa di jaringan hati.

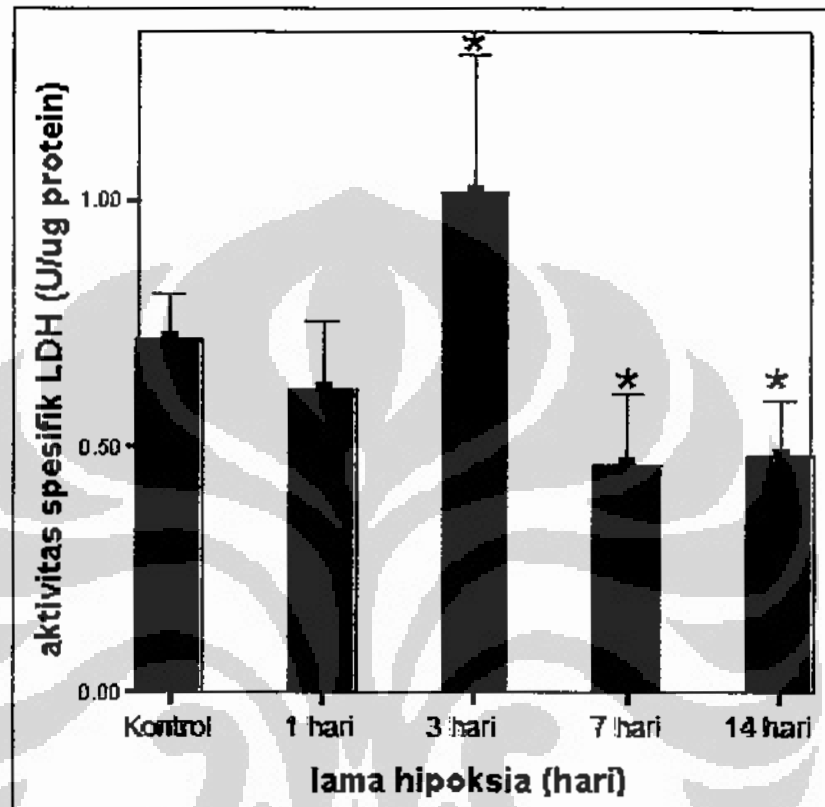
Tabel IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus (U/ μ g protein) kelompok yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Perlakuan	Kontrol	Hipoksia			
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari
1	0.80	0.72	0.66	0.64	0.32
2	0.72	0.70	0.99	0.46	0.55
3	0.60	0.57	1.11	0.44	0.54
4	0.71	0.44	1.27	0.46	0.48
5	0.76	0.64	1.06	0.31	0.50
Rerata \pm SE	0.72 \pm 0.03	0.61 \pm 0.05	1.02 \pm 0.10*	0.46 \pm 0.05*	0.48 \pm 0.04*

(*): berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$)

Aktivitas spesifik LDH paling tinggi terjadi pada kelompok hipoksia 3 hari, meningkat secara bermakna dibanding kelompok kontrol dan hipoksia 1 hari. Hal ini diduga disebabkan oleh karena peningkatan mRNA HIF-1 α pada hari pertama hipoksia, yang kemudian diikuti dengan peningkatan kadar protein HIF-1 α pada hari ke-3 hipoksia. Enzim LDH diketahui merupakan salah satu protein yang diregulasi oleh HIF-1 α (Gambar IV.2). Hal ini didukung oleh penelitian Jusman (2010) dari kelompok penelitian yang sama, membuktikan bahwa pada hari pertama hipoksia terjadi peningkatan mRNA HIF-1 α .²⁹ Hal ini diperkuat oleh penelitian Halim (2008) juga dari kelompok penelitian yang sama, menemukan dengan *Western blot* terjadi peningkatan ekspresi protein HIF-1 α yang signifikan pada hipoksia hari ke-3.³⁰

Peningkatan aktivitas spesifik LDH ini disebabkan oleh meningkatnya proses glikolisis untuk memenuhi kebutuhan energi. Pathak (2005), membuktikan bahwa terjadi peningkatan LDH beberapa kali lipat lebih tinggi pada proliferasi sel dan sel tumor karena proses glikolisis yang meningkat.⁵



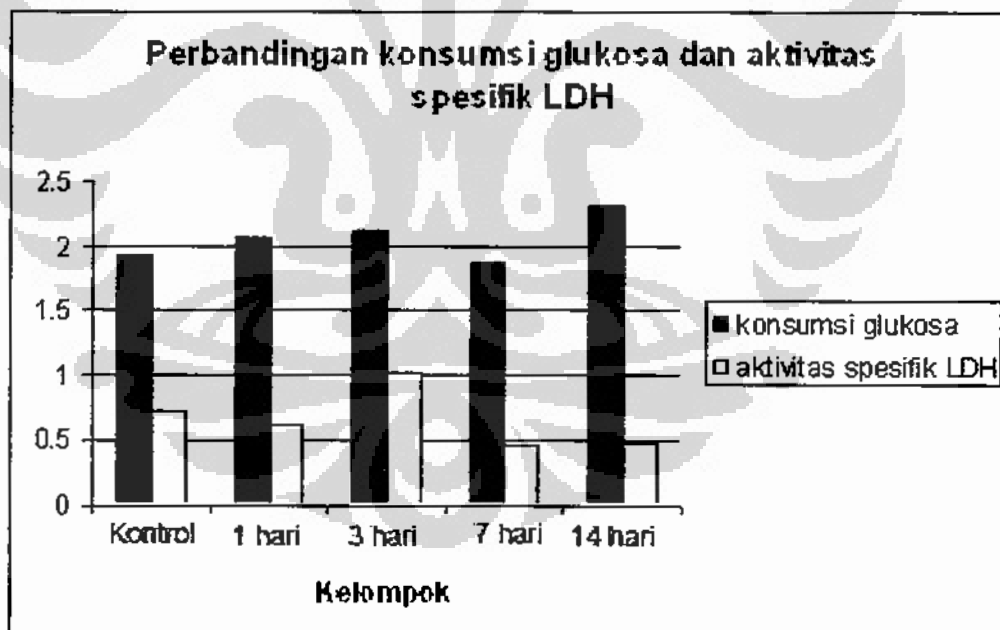
Gambar IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. (*): berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$)

Aktivitas spesifik LDH pada kelompok hipoksia 7 hari dan 14 hari lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Lebih rendahnya aktivitas spesifik LDH setelah hipoksia hari ke-7 ini diduga disebabkan oleh karena telah terjadi apoptosis. Hendrawan (2008), mengemukakan bahwa pemaparan hipoksia secara terus menerus akan mengaktivasi HIF-1 α . *Hypoxia inducible factor -1 α* akan menstabilisasi p53 yang akan memicu apoptosis.³¹

IV.3. Analisis hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Perbandingan konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH di jaringan hati ditampilkan pada Gambar IV.3.

Untuk mengetahui adanya korelasi antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati, dilakukan uji korelasi. Karena kedua data berdistribusi normal, maka uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi Pearson. Dari hasil uji korelasi Pearson antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH menunjukkan korelasi positif lemah, tidak bermakna ($r=0.101$, $p>0.05$). Meskipun secara statistik tidak ada korelasi yang bermakna antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH, hasil yang ditunjukkan pada Gambar IV.3, tampak bahwa konsumsi glukosa cenderung meningkat, walaupun tidak bermakna selama hipoksia berlangsung. Konsumsi glukosa yang cenderung meningkat selama hipoksia ini, tidak berkorelasi dengan aktivitas spesifik LDH yang meningkat pada hari ke-3 hipoksia.

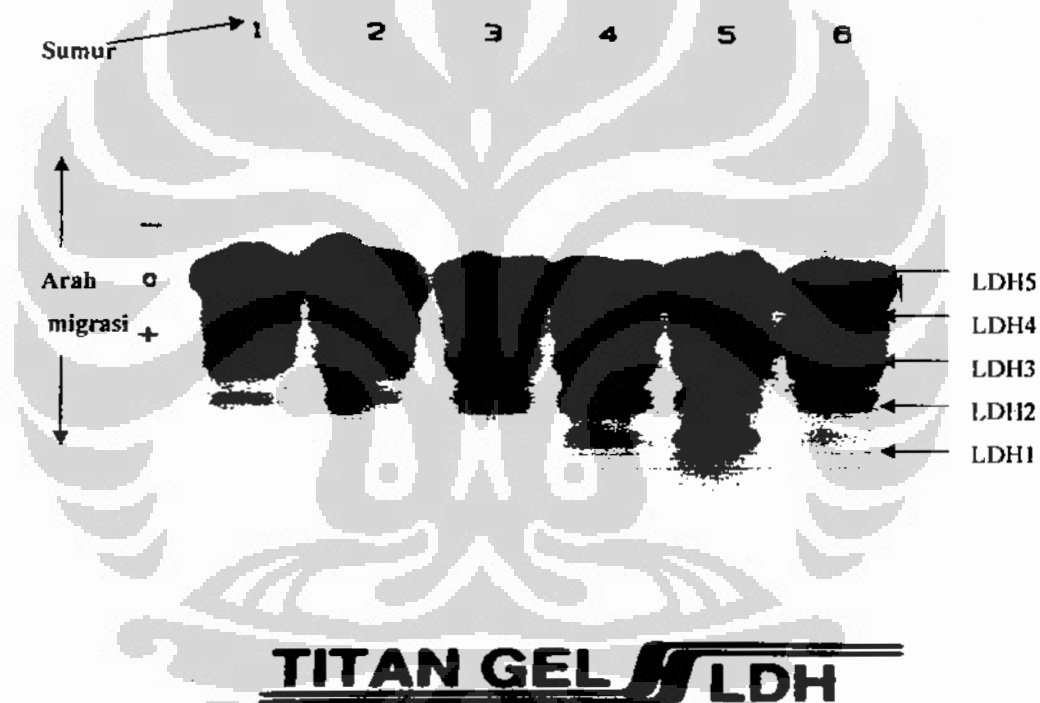


Gambar IV.3. Perbandingan konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH pada jaringan yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

IV.4. Elektroforesis isozim LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Hasil elektroforesis menunjukkan adanya 5 isozim LDH (LDH5, LDH4, LDH3, LDH2 dan LDH1) baik pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik maupun jaringan hati tikus kontrol.

Pada Gambar IV.4 tampak bahwa distribusi pola isozim selalu didominasi oleh isozim LDH5 dan LDH4 diikuti dalam jumlah kecil isozim LDH3, LDH2 dan LDH1, baik pada kelompok hipoksia maupun kelompok kontrol. Fountain (1970), membuktikan bahwa pola isozim LDH selalu didominasi isozim LDH5, baik pada kelompok sel tumor maupun kelompok kontrol.³²



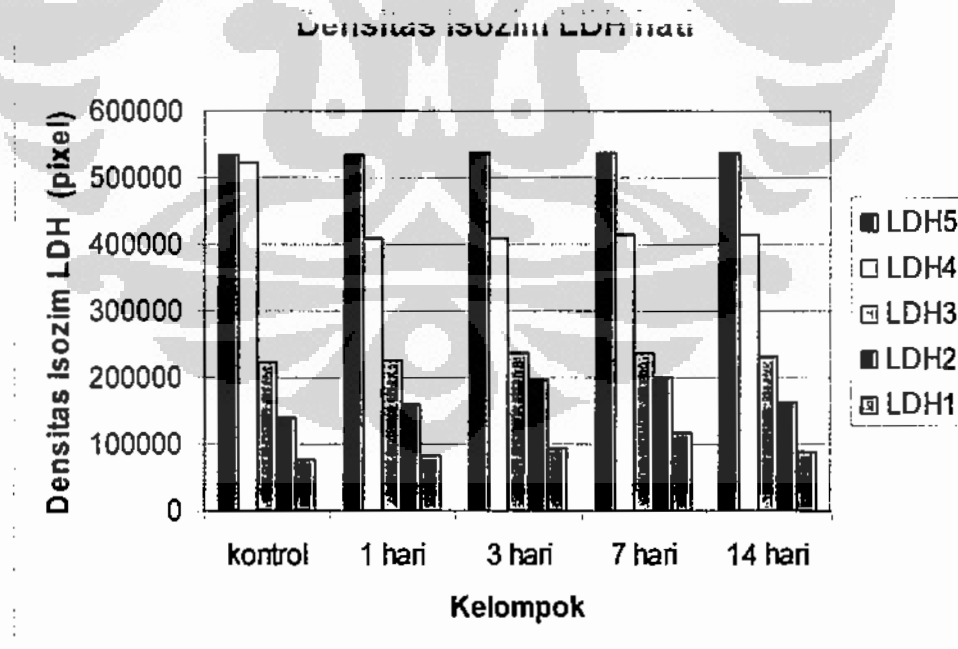
Gambar IV.4. Elektroforesis isozim LDH jaringan hati tikus. Sumur 1 (kontrol 1), sumur 2 (kontrol 2), sumur 3 (hipoksia 1 hari), sumur 4 (hipoksia 3 hari), sumur 5 (hipoksia 7 hari), dan sumur 6 (hipoksia 14 hari)

Terdapat perbedaan pola isozim LDH2 dan LDH1 kelompok hipoksia 3 hari dan 7 hari dengan kelompok kontrol. Isozim LDH2 dan LDH1 masing-masing mempunyai subunit M1H3 dan H4. Isozim LDH2 dan LDH1 mengubah laktat menjadi piruvat. Piruvat yang terbentuk ini kemudian akan dikonversi

menjadi asetil KoA oleh PDH dan selanjutnya masuk ke siklus Krebs serta menghasilkan molekul ATP. Peningkatan ekspresi LDH2 dan LDH1 pada hipoksia 3 dan 7 hari ini, diduga merupakan upaya adaptasi tubuh terhadap kondisi hipoksia yang berlangsung kronik. Penggunaan laktat sebagai sumber energi ini merupakan usaha tubuh untuk menghemat penggunaan glukosa, yang mutlak diperlukan oleh jaringan yang vital seperti sel darah merah. Hal ini sesuai dengan aktivitas spesifik LDH yang paling tinggi pada hari ke-3 hipoksia. Nilai densitas masing-masing ditampilkan pada Tabel IV.3 dan Gambar IV.5.

Tabel IV.3. Densitas bercak elektroforesis isozim LDH (*pixel*) tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Isozim	Kontrol	Hipoksia			
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari
LDH5	534138	535568	535766	537064	536866
LDH4	522544	409836	409683	415242	413185
LDH3	222086	227078	237159	235931	230198
LDH2	140390	159510	198149	200402	163283
LDH1	77832	83076	94182	118248	88830



Gambar IV.5. Nilai densitas isozim LDH jaringan yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Keterangan: Tidak berbeda bermakna antar semua kelompok ($p > 0,05$)

Koukourakis (2005), membuktikan bahwa pada konsentrasi laktat yang tinggi dapat terjadi reaksi umpan balik reaksi yang dikatalisis oleh LDH5 sehingga konversi piruvat menjadi laktat menurun. Sebaliknya konversi laktat menjadi piruvat yang meningkat, yang dikatalisis oleh LDH1 yang bekerja optimum pada kondisi yang lebih aerob.³³

Penurunan konsumsi glukosa pada hipoksia hari ke-7, disertai oleh penurunan aktivitas spesifik LDH dan peningkatan ekspresi LDH2 dan LDH1. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan glukosa sebagai sumber energi berkurang dan jaringan hati menggunakan laktat sebagai sumber energi.

Pada hipoksia hari ke-14, tampak bahwa tidak ditemukan peningkatan ekspresi LDH2 dan LDH1. Diduga kondisi ini disebabkan jaringan hati tidak dapat mempertahankan lingkungan yang kondusif untuk aktivitas LDH2 dan LDH1 yang memerlukan kondisi yang cukup aerob. Sehingga pemakaian glukosa sebagai sumber energi meningkat, yang kemudian dikonversi menjadi piruvat selanjutnya dikatalisis menjadi laktat oleh LDH5

Ada beberapa kendala pada penelitian ini, diantaranya tidak dilakukan pengukuran kadar laktat oleh karena kit untuk pemeriksaan asam laktat tidak diperoleh hingga penelitian berakhir. Oleh karena itu, parameter perubahan metabolisme glukosa pada kondisi hipoksia yang dapat diamati hanya konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim LDH.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1. Kesimpulan

- V.1.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik cenderung meningkat walaupun tidak berbeda bermakna
- V.1.2. Aktivitas spesifik LDH pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik paling tinggi pada hipoksia hari ke-3
- V.1.3. Pola elektroforesis isozim LDH kelompok tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik menunjukkan perbedaan pada hari ke-3 dan ke-7 dengan kontrol
- V.1.4. Tidak terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH

V.2. Saran

Penelitian menggunakan jaringan lain yang metabolismenya tergantung oksigen, seperti otak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee JW. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α): its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 2004; 36: 1-12
2. Bartrons R, Can J. Hypoxia, glucose metabolism and the warburg's effect. *J. Bioenerg Biomembr.* 2007; 39: 223-229
3. Semenza GL. HIF-1 mediates the warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J. Bioenerg Biomembr.* 2007; 39: 231-234
4. Stryer L. *Biokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000
5. Pathak JW, Vinayak M. Modulation of *lactate dehydrogenase* isozymes by modified base queuine. *Molecular Biology Reports.* 2005; 32: 191-196
6. Wenger R. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB.* 2002; 16: 1151-62
7. Koolman J, Roehm KH. *Color atlas of biochemistry*. Thieme. 2005
8. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.* 1991; 39: 476-500
9. Vaupel P. Tumour hypoxia: causative factors, compensatory mechanism, and celluler response. *Oncologist.* 2004; 9: 4-9
10. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and liver failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-5008

11. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:167-71.
12. Raven PH, Johnson G. *Understanding biology.* USA: Mosby company. 1998
13. Bender D. Carbohydrates of physiologic significance In: *Harper's Illustrated Biochemistry.* USA: McGraw-Hills. 2009
14. Lieberman M, Allan DM. *Basic medical biochemistry.* Philadelphia: Williams and Wilkins. 2009
15. Alberti K. The biochemical consequences of hypoxia. *J. Clin. Path.* 30: 14-20
16. Webster KA. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *The Journal of experimental biology.* 2003; 206: 2911-2922
17. Pison CM, Chauvin C, Fontaine E, Catelloni F, Keriell C, Paramelle B, Lerverve XM. Mechanism of gluconeogenesis inhibition in rat hepatocytes isolated after *in vivo* hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995; 268: 965-973
18. Farco V, Gabrielle A. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: Hypothesis. Biomed central ltd. 2005
19. Mayes PA. Glycolysis and piruvat oxidation in: Murray, R. K., Granner DK, Rodwell VW., editors *Harper's Biochemistry.* McGraw-Hills. Newyork: 2003

20. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia harper. Jakarta: Penerbit buku kedokteran. 2000
21. Dufour JF, Clavien PA. Signaling pathways in liver disease. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005
22. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:167-71
23. Carraway MS. Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 278: 806-812
24. Menchenko G. Handbook of detection of enzyme on electrophoretic gels. United states of America: CRC press. 2003
25. Bishop ML, Fady EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. Lippincott Williams and wilkins. Philadelphia: 2010
26. Hanafiah KA. Rancangan percobaan: teori & aplikasi. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada. 2005
27. Larsen TJ, Myrmel T. Effect of hypoxia on lipolysis in isolated rat myocardial cells. *Molecular and cellular biochemistry.* 1989; 88: 139-144
28. Shen C, Nettleton D. Roles of the HIF-1 hypoxia inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *The journal of biological chemistry.* 2005; 280: 20580-20588.
29. Jusman SW. Respons jaringan hati terhadap hipoksia sistemik kronik: analisis regulasi ekspresi gen sitoglobin [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2010

30. Halim A. Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008
31. Hendrawan S. Ekspresi gen *Hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) dan apoptosis pada jantung yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.
32. Fountain JA, Parks ME, Dickey A, Mckee RW. *Lactate dehydrogenase* isoenzyme in tissue of normal and ehrlich-tette tumor bearing swiss mice. *Cancer Research*. 1970; 30: 998-1002.
33. Koukourakis MI, Giatromanglaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. *Lactate dehydrogenase 5* (LDH5) relates to up-regulates hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colarectal cancer. *Clinical and experimental metastasis*. 2005; 22: 25-30
34. Alexander RR, Griffiths J. *Basic biochemical methods*. New York: A john wiley & sons, Inc. 1993

Lampiran 1. Kadar protein dalam jaringan hati

Kode	A1	A2	Arerata	Kadar	Kadar protein x200 (mg/mL)
K1	0.147	0.159	0.153	0.244	48.841
K2	0.172	0.184	0.178	0.280	55.994
K3	0.166	0.159	0.163	0.258	51.559
K4	0.181	0.183	0.182	0.286	57.139
K5	0.182	0.191	0.187	0.292	58.426
rerata					54.392
II	0.117	0.124	0.121	0.198	39.542
I2	0.133	0.130	0.132	0.213	42.690
I3	0.134	0.129	0.132	0.213	42.690
I4	0.145	0.140	0.143	0.229	45.837
I5	0.133	0.139	0.136	0.220	43.977
rerata					42.947
III	0.173	0.179	0.176	0.277	55.422
II2	0.162	0.173	0.168	0.265	52.990
II3	0.157	0.165	0.161	0.256	51.130
II4	0.162	0.173	0.168	0.265	52.990
II5	0.130	0.145	0.138	0.222	44.406
rerata					51.388
III1	0.146	0.156	0.151	0.241	48.269
III2	0.110	0.119	0.115	0.189	37.825
III3	0.138	0.145	0.142	0.228	45.551
III4	0.144	0.146	0.145	0.233	46.552
III5	0.148	0.156	0.152	0.243	48.555
rerata					45.351
IV1	0.162	0.187	0.175	0.275	54.993
IV2	0.120	0.134	0.127	0.207	41.402
IV3	0.125	0.137	0.131	0.213	42.546
IV4	0.123	0.139	0.131	0.213	42.546
IV5	0.163	0.177	0.170	0.269	53.705
rerata					47.039

Lampiran 2. Kadar glukosa dalam jaringan hati

Kode	Arerata	A- Blanko	Kadar glukosa	Konsumsi glukosa (mg/dL)	Berat jaringan (mg)	Konsumsi glukosa (μ g/mg jaringan)
Blanko	0.020	0.000				
Standar	0.621	0.601				
K1	0.272	0.252	20.941	29.059	101.100	2.87
K2	0.337	0.317	26.395	23.605	100.500	2.35
K3	0.388	0.368	30.641	19.359	107.800	1.80
K4	0.417	0.397	33.056	16.944	106.800	1.59
K5	0.482	0.462	38.426	11.574	108.800	1.06
rerata			29.892	20.108		1.93
I1	0.387	0.367	30.516	19.484	102.600	1.90
I2	0.349	0.329	27.394	22.606	108.100	2.09
I3	0.308	0.288	23.980	26.020	107.200	2.43
I4	0.408	0.388	32.306	17.694	100.500	1.76
I5	0.368	0.348	28.934	21.066	100.800	2.09
rerata			28.626	21.374		2.05
II1	0.380	0.360	29.975	20.025	105.300	1.90
II2	0.353	0.333	27.727	22.273	104.700	2.13
II3	0.365	0.345	28.726	21.274	105.300	2.02
II4	0.337	0.317	26.353	23.647	104.500	2.26
II5	0.333	0.313	26.062	23.938	104.400	2.29
rerata			27.769	22.231		2.12
III1	0.366	0.346	28.768	21.232	107.600	1.97
III2	0.337	0.317	26.353	23.647	103.800	2.28
III3	0.403	0.383	31.848	18.152	103.800	1.75
III4	0.423	0.403	33.555	16.445	106.100	1.55
III5	0.395	0.375	31.182	18.818	103.800	1.81
rerata			30.341	19.659		1.87
IV1	0.303	0.283	23.564	26.436	104.800	2.52
IV2	0.306	0.286	23.772	26.228	102.600	2.56
IV3	0.329	0.309	25.687	24.313	103.000	2.36
IV4	0.339	0.319	26.561	23.439	100.500	2.33
IV5	0.398	0.378	31.432	18.568	103.100	1.80
rerata			26.203	23.797		2.31

Lampiran 3. Aktivitas spesifik LDH dalam jaringan hati

Kode	A0	A1	A2	A3	ΔA	$\Delta A/3$	Aktivitas LDH (U/L)	Rerata	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik LDH (U/ μ g protein)
K1	0.244	0.238	0.232	0.229	0.015	0.005	40.475	39.126	48.841	0.80
	0.239	0.233	0.231	0.225	0.014	0.0047	37.777			
K2	0.323	0.319	0.313	0.308	0.015	0.005	40.475	40.475	55.994	0.72
	0.307	0.301	0.297	0.292	0.015	0.005	40.475			
K3	0.237	0.232	0.229	0.226	0.011	0.0037	29.682	31.031	51.559	0.60
	0.241	0.236	0.233	0.229	0.012	0.004	32.380			
K4	0.323	0.319	0.313	0.308	0.015	0.005	40.475	40.475	57.139	0.71
	0.312	0.301	0.297	0.297	0.015	0.005	40.475			
K5	0.278	0.266	0.262	0.259	0.019	0.0063	51.268	44.523	58.428	0.76
	0.291	0.283	0.278	0.277	0.014	0.0047	37.777			
rerata							39.126		54.392	0.72
I1	0.255	0.252	0.248	0.245	0.01	0.0033	26.983	28.333	39.542	0.72
	0.289	0.283	0.28	0.278	0.011	0.0037	29.682			
I2	0.202	0.195	0.192	0.192	0.01	0.0033	26.983	29.682	42.690	0.70
	0.2	0.189	0.188	0.188	0.012	0.004	32.380			
I3	0.241	0.236	0.234	0.233	0.008	0.0027	21.587	24.285	42.690	0.57
	0.258	0.251	0.248	0.248	0.01	0.0033	26.983			
I4	0.227	0.227	0.223	0.221	0.006	0.002	16.190	20.238	45.837	0.44
	0.24	0.238	0.232	0.231	0.009	0.003	24.285			
I5	0.207	0.204	0.201	0.2	0.007	0.0023	18.888	28.333	43.977	0.64
	0.222	0.217	0.213	0.212	0.01	0.0033	26.983			
rerata							25.095		42.947	0.61
II1	0.269	0.262	0.259	0.255	0.014	0.0047	37.777	36.428	55.422	0.66
	0.264	0.258	0.255	0.251	0.013	0.0043	35.078			
II2	0.269	0.258	0.254	0.249	0.02	0.0067	53.967	52.618	52.990	0.99
	0.273	0.261	0.259	0.254	0.019	0.0063	51.268			
II3	0.28	0.269	0.264	0.26	0.02	0.0067	53.967	56.665	51.130	1.11
	0.3	0.288	0.281	0.278	0.022	0.0073	59.363			
II4	0.272	0.259	0.251	0.247	0.025	0.0083	67.458	67.458	52.990	1.27
	0.27	0.254	0.249	0.245	0.025	0.0083	67.458			
II5	0.257	0.248	0.244	0.24	0.017	0.0057	45.872	47.221	44.406	1.06
	0.387	0.375	0.371	0.369	0.018	0.006	48.570			
rerata							52.078		51.388	1.02
III1	0.268	0.263	0.259	0.256	0.012	0.004	32.380	31.031	48.269	0.64
	0.254	0.25	0.246	0.243	0.011	0.0037	29.682			
III2	0.216	0.213	0.211	0.209	0.007	0.0023	18.888	17.539	37.825	0.46
	0.226	0.223	0.222	0.22	0.006	0.002	16.190			
III3	0.233	0.23	0.228	0.227	0.006	0.002	16.190	20.238	45.551	0.44
	0.238	0.234	0.232	0.229	0.009	0.003	24.285			
III4	0.219	0.214	0.212	0.211	0.008	0.0027	21.587	21.587	46.552	0.46
	0.23	0.227	0.225	0.222	0.008	0.0027	21.587			
III5	0.229	0.226	0.224	0.223	0.006	0.002	16.190	14.841	48.555	0.31
	0.233	0.232	0.23	0.228	0.005	0.0017	13.492			
rerata							21.047		45.350	0.46

Kode	A0	A1	A2	A3	DA	DA/3	Aktivitas LDH (U/L)	Rata-rata	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik LDH (U/mg protein)
IV1	0.187	0.184	0.183	0.181	0.006	0.002	16.190	17.539	54.993	0.32
	0.247	0.246	0.243	0.24	0.007	0.0023	18.888			
IV2	0.236	0.231	0.229	0.227	0.009	0.003	24.285	22.936	41.402	0.55
	0.236	0.233	0.228	0.228	0.008	0.0027	21.587			
IV3	0.221	0.214	0.213	0.212	0.009	0.003	24.285	22.936	42.546	0.54
	0.231	0.229	0.226	0.223	0.008	0.0027	21.587			
IV4	0.231	0.228	0.225	0.223	0.008	0.0027	21.587	20.238	42.546	0.48
	0.262	0.26	0.257	0.255	0.007	0.0023	18.888			
IV5	0.27	0.266	0.264	0.261	0.009	0.003	24.285	26.983	53.705	0.50
	0.276	0.268	0.266	0.265	0.011	0.0037	29.682			
rerata							22.126		47.038	0.48



Lampiran 4. Perhitungan densitas LDH5, LDH4, LDH3, LDH2 dan LDH1 pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Kelompok	Fraksi protein	Mean	Pixel	Nilai densitas (pixel)
Kontrol	LDH5	242.79	2200	534138
	LDH4	237.52	1700	522544
	LDH3	227.78	975	222086
	LDH2	143.99	975	140390
	LDH1	129.72	600	77832
Hipoksia 1 hari	LDH5	243.44	2200	535568
	LDH4	241.08	1700	409836
	LDH3	232.90	975	227078
	LDH2	163.60	975	159510
	LDH1	138.46	600	83076
Hipoksia 3 hari	LDH5	243.53	2200	535766
	LDH4	240.99	1700	409683
	LDH3	243.24	975	237159
	LDH2	203.23	975	198149
	LDH1	156.97	600	94182
Hipoksia 7 hari	LDH5	244.12	2200	537064
	LDH4	244.26	1700	415242
	LDH3	241.98	975	235931
	LDH2	205.54	975	200402
	LDH1	197.08	600	118248
Hipoksia 14 hari	LDH5	244.03	2200	536866
	LDH4	243.05	1700	413185
	LDH3	236.10	975	230198
	LDH2	167.47	975	163283
	LDH1	148.05	600	88830

Lampiran 4. Perhitungan densitas LDH5, LDH4, LDH3, LDH2 dan LDH1 pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Kelompok	Fraksi protein	Mean	Pixel	Nilai densitas (pixel)
Kontrol	LDH5	242.79	2200	534138
	LDH4	237.52	1700	522544
	LDH3	227.78	975	222086
	LDH2	143.99	975	140390
	LDH1	129.72	600	77832
Hipoksia 1 hari	LDH5	243.44	2200	535568
	LDH4	241.08	1700	409836
	LDH3	232.90	975	227078
	LDH2	163.60	975	159510
	LDH1	138.46	600	83076
Hipoksia 3 hari	LDH5	243.53	2200	535766
	LDH4	240.99	1700	409683
	LDH3	243.24	975	237159
	LDH2	203.23	975	198149
	LDH1	156.97	600	94182
Hipoksia 7 hari	LDH5	244.12	2200	537064
	LDH4	244.26	1700	415242
	LDH3	241.98	975	235931
	LDH2	205.54	975	200402
	LDH1	197.08	600	118248
Hipoksia 14 hari	LDH5	244.03	2200	536866
	LDH4	243.05	1700	413185
	LDH3	236.10	975	230198
	LDH2	167.47	975	163283
	LDH1	148.05	600	88830

Lampiran 5. Uji normalitas

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
keadar protein (mg/mL)	.110	25	.200(*)	.958	25	.375

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)	.099	25	.200(*)	.979	25	.856

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
aktivitas spesifik LDH (U/ug protein)	.159	25	.105	.924	25	.062

a Lilliefors Significance Correction

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LDH5	.199	5	.200(*)	.924	5	.555
LDH4	.448	5	.001	.594	5	.001
LDH3	.208	5	.200(*)	.944	5	.697
LDH2	.239	5	.200(*)	.890	5	.357
LDH1	.256	5	.200(*)	.888	5	.346

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Lampiran 6. Uji parametrik

6.1 Kadar protein

Test of Homogeneity of Variances
kadar protein (mg/mL)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.813	4	20	.053

ANOVA
kadar protein (mg/mL)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	427.790	4	106.947	5.175	.005
Within Groups	413.340	20	20.667		
Total	841.130	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar protein (mg/mL)

LSD

(I) lama hipoksia (hari)	(J) lama hipoksia (hari)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	hipoksia 1 hari	11.44460(*)	2.87520	.001	5.4470	17.4422
	hipoksia 3 hari	3.00420	2.87520	.309	-2.9934	9.0018
	hipoksia 7 hari	9.04140(*)	2.87520	.005	3.0438	15.0390
	hipoksia 14 hari	7.35340(*)	2.87520	.019	1.3558	13.3510
hipoksia 1 hari	kontrol	-11.44460(*)	2.87520	.001	-17.4422	-5.4470
	hipoksia 3 hari	-8.44040(*)	2.87520	.008	-14.4380	-2.4428
	hipoksia 7 hari	-2.40320	2.87520	.413	-8.4008	3.5944
	hipoksia 14 hari	-4.09120	2.87520	.170	-10.0888	1.9064
hipoksia 3 hari	kontrol	-3.00420	2.87520	.309	-9.0018	2.9934
	hipoksia 1 hari	8.44040(*)	2.87520	.008	2.4428	14.4380
	hipoksia 7 hari	6.03720(*)	2.87520	.049	.0396	12.0348
	hipoksia 14 hari	4.34920	2.87520	.146	-1.6484	10.3468
hipoksia 7 hari	kontrol	-9.04140(*)	2.87520	.005	-15.0390	-3.0438
	hipoksia 1 hari	2.40320	2.87520	.413	-3.5944	8.4008
	hipoksia 3 hari	-6.03720(*)	2.87520	.049	-12.0348	-.0396
	hipoksia 14 hari	-1.68800	2.87520	.564	-7.6856	4.3096
hipoksia 14 hari	kontrol	-7.35340(*)	2.87520	.019	-13.3510	-1.3558
	hipoksia 1 hari	4.09120	2.87520	.170	-1.9064	10.0888
	hipoksia 3 hari	-4.34920	2.87520	.146	-10.3468	1.6484
	hipoksia 7 hari	1.68800	2.87520	.564	-4.3096	7.6856

* The mean difference is significant at the .05 level.

6.2. Kadar glukosa

Test of Homogeneity of Variances konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.169	4	20	.036

ANOVA konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.597	4	.149	1.002	.430
Within Groups	2.978	20	.149		
Total	3.575	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)

LSD

(I) lama hipoksia (hari)	(J) lama hipoksia (hari)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	hipoksia 1 hari	-.12000	.24407	.628	-.6291	.3891
	hipoksia 3 hari	-.18600	.24407	.455	-.6951	.3231
	hipoksia 7 hari	.06200	.24407	.802	-.4471	.5711
	hipoksia 14 hari	-.38000	.24407	.135	-.8891	.1291
hipoksia 1 hari	kontrol	.12000	.24407	.628	-.3891	.6291
	hipoksia 3 hari	-.06600	.24407	.790	-.5751	.4431
	hipoksia 7 hari	-.18200	.24407	.465	-.3271	.6911
	hipoksia 14 hari	-.26000	.24407	.299	-.7691	.2491
hipoksia 3 hari	kontrol	.18600	.24407	.455	-.3231	.6951
	hipoksia 1 hari	.06600	.24407	.790	-.4431	.5751
	hipoksia 7 hari	.24800	.24407	.322	-.2611	.7571
	hipoksia 14 hari	-.19400	.24407	.436	-.7031	.3151
hipoksia 7 hari	kontrol	-.06200	.24407	.802	-.5711	.4471
	hipoksia 1 hari	-.18200	.24407	.465	-.6911	.3271
	hipoksia 3 hari	-.24800	.24407	.322	-.7571	.2611
	hipoksia 14 hari	-.44200	.24407	.085	-.9511	.0671
hipoksia 14 hari	kontrol	.38000	.24407	.135	-.1291	.8891
	hipoksia 1 hari	.26000	.24407	.299	-.2491	.7691
	hipoksia 3 hari	.19400	.24407	.436	-.3151	.7031
	hipoksia 7 hari	.44200	.24407	.085	-.0671	.9511

6.3. Aktivitas spesifik LDH

Test of Homogeneity of Variances
aktivitas spesifik LDH (U/ug protein)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.105	4	20	.382

ANOVA
aktivitas spesifik LDH (U/ug protein)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.030	4	.257	14.1	.000
Within Groups	.366	20	.018		
Total	1.396	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: aktivitas spesifik LDH (U/ug protein)
LSD

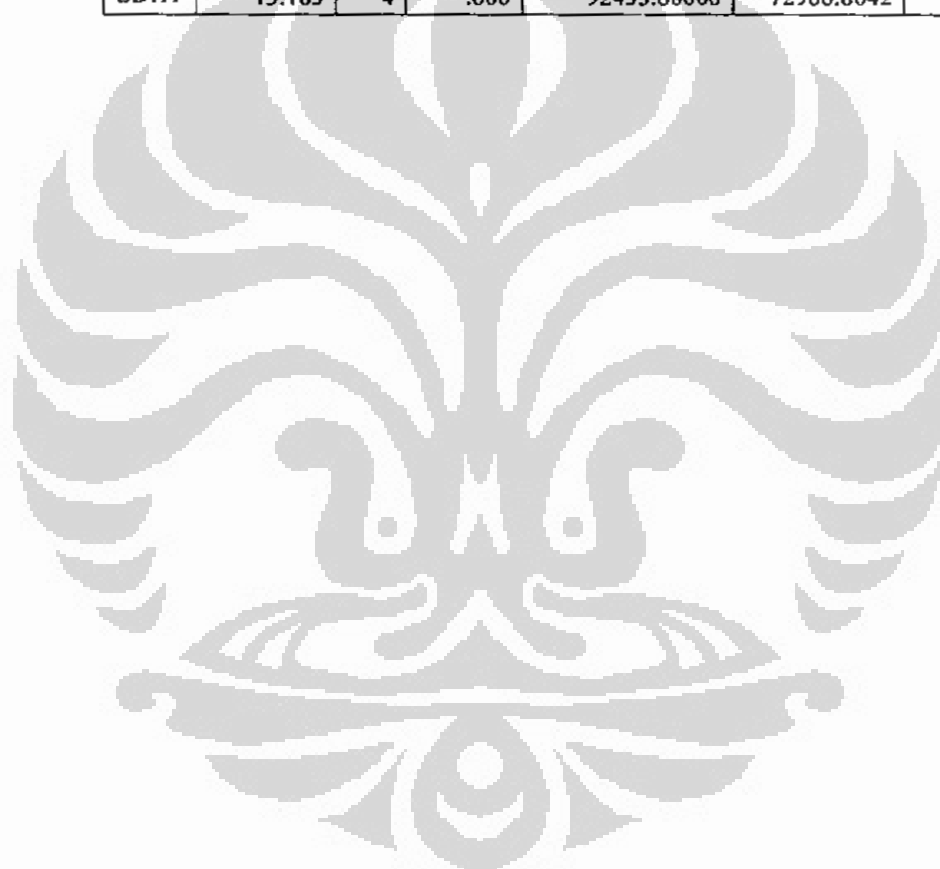
(I) lama hipoksia (hari)	(J) lama hipoksia (hari)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	hipoksia 1 hari	.10400	.08561	.239	-.0746	.2826
	hipoksia 3 hari	-.30000(*)	.08561	.002	-.4786	-.1214
	hipoksia 7 hari	.25600(*)	.08561	.007	.0774	.4346
	hipoksia 14 hari	.24000(*)	.08561	.011	.0614	.4186
hipoksia 1 hari	kontrol	-.10400	.08561	.239	-.2826	.0746
	hipoksia 3 hari	-.40400(*)	.08561	.000	-.5826	-.2254
	hipoksia 7 hari	.15200	.08561	.091	-.0266	.3306
	hipoksia 14 hari	.13600	.08561	.128	-.0426	.3146
hipoksia 3 hari	kontrol	.30000(*)	.08561	.002	.1214	.4786
	hipoksia 1 hari	.40400(*)	.08561	.000	.2254	.5826
	hipoksia 7 hari	.55600(*)	.08561	.000	.3774	.7346
	hipoksia 14 hari	.54000(*)	.08561	.000	.3614	.7186
hipoksia 7 hari	kontrol	-.25600(*)	.08561	.007	-.4346	-.0774
	hipoksia 1 hari	-.15200	.08561	.091	-.3306	.0266
	hipoksia 3 hari	-.55600(*)	.08561	.000	-.7346	-.3774
	hipoksia 14 hari	-.01600	.08561	.854	-.1946	.1626
hipoksia 14 hari	kontrol	-.24000(*)	.08561	.011	-.4186	-.0614
	hipoksia 1 hari	-.13600	.08561	.128	-.3146	.0426
	hipoksia 3 hari	-.54000(*)	.08561	.000	-.7186	-.3614
	hipoksia 7 hari	.01600	.08561	.854	-.1626	.1946

• The mean difference is significant at the .05 level

6.4. Densitas isozim LDH

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
LDH5	1020.127	4	.000	535880.40000	534421.9131	537338.8869
LDH4	19.610	4	.000	434098.00000	372637.7201	495558.2799
LDH3	82.412	4	.000	230490.00000	222724.8599	238255.1401
LDH2	14.776	4	.000	172346.85000	139962.3517	204731.3483
LDH1	13.183	4	.000	92433.60000	72966.8042	111900.3958



Lampiran 7. Uji korelasi

		kadar protein (mg/mL)	konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)	aktivitas spesifik ldh (U/ug protein)
kadar protein (mg/mL)	Pearson Correlation	1	-.351	.251
	Sig. (2-tailed)	.	.085	.226
	N	25	25	25
konsumsi glukosa (ug/mg jaringan)	Pearson Correlation	-.351	1	.101
	Sig. (2-tailed)	.085	.	.629
	N	25	25	25
aktivitas spesifik ldh (U/ug protein)	Pearson Correlation	.251	.101	1
	Sig. (2-tailed)	.226	.629	.
	N	25	25	25

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Agus Evendi
NPM : 0706170734
Tempat/Tanggal Lahir : Jakarta, 4 Agustus 1983
Alamat : Jalan Penggilingan Rt. 005/011
Cakung Jakarta Timur



Riwayat Pendidikan :
2001-2006 : S1 Biologi Universitas Diponegoro Semarang
1998-2001 : SMUN 44 Klender Jakarta
1995-1998 : MTs Assya'iriyah Attahiriyah VI Jakarta
1989-1995 : MI Assya'iriyah Attahiriyah VI Jakarta
Riwayat Pekerjaan :
2007-2008 : Staf Analis Mikrobiologi, PT. Frisian Flag Indonesia
2006-2007 : Staf Analis Mikrobiologi, PT. CS2 Pola Sehat
Sumber Dana : Pribadi

Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim Lactate Dehydrogenase (LDH) pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Agus Evendi, Sri Widia A. Jusman, Dwirini Retno G., Frans Ferdinal, Mohamad Sadikin

Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran,
Universitas Indonesia
Jalan Salemba 6, Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH dan pola isozim LDH pada kondisi hipoksia sistemik kronik. Penelitian dilakukan terhadap hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1, 3, 7 dan 14 hari. Konsumsi glukosa diukur dengan metode enzimatik Trinder. Aktivitas spesifik LDH diukur dengan metode *German Society of Clinical Chemistry* (DGKC). Pola isozim LDH dianalisis dengan elektroforesis *Titan Gel*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi glukosa pada hipoksia sistemik kronik cenderung meningkat walaupun tidak berbeda dengan kontrol. Aktivitas spesifik LDH ditemukan paling tinggi pada hipoksia 3 hari sedangkan pola elektroforesis isozim LDH menunjukkan perbedaan pada hari ke-3 dan ke-7 hipoksia dengan kontrol. Tidak terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH.

Kata kunci: Hipoksia sistemik kronik, konsumsi glukosa, aktivitas spesifik LDH, elektroforesis

ABSTRACT

The aim of this study was to observe glucose consumption, specific activity of LDH and electrophoretic LDH isoenzyme patterns on systemic chronic hypoxia. The study was carried out with liver tissue of rats exposed to systemic hypoxia for 1, 3, 7 and 14 days. Glucose consumption was measured by Trinder method. The specific activity of LDH was performed using *German Society of Clinical Chemistry* (DGKC) method, while LDH isoenzyme patterns were analyzed using *Titan Gel* electrophoresis. Results indicated that glucose consumption showed tendencies to increase compared to control group, although the difference were not significant. The specific activity of LDH was highest on day 3 of the hypoxic group. Electrophoretic patterns of LDH isoenzyme showed differences on day 3 and day 7 of hypoxia with control. It is concluded that glucose consumption is not related to specific activity of LDH.

Key words: systemic chronic hypoxia, glucose consumption, LDH specific activity, electrophoresis

1. Pendahuluan

Hipoksia merupakan suatu kondisi dimana suplai oksigen tidak mencukupi untuk keperluan sel, jaringan atau organ. Kondisi ini akan mengaktivasi suatu faktor transkripsi yang dinamakan *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). *Hypoxia inducible factor-1* merupakan protein heterodimer, terdiri dari subunit HIF-1 α dengan berat molekul 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar oksigen dan subunit HIF-1 β dengan berat molekul 91-94 kDa yang merupakan protein konstitutif. HIF-1 β juga dikenal sebagai *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT). *Hypoxia inducible factor-1 α* merupakan protein yang tidak stabil karena pada kondisi normoksia didegradasi oleh sistem ubiquitin proteasom dan mengalami stabilisasi sebagai respon terhadap hipoksia. Selanjutnya, HIF-1 α membentuk kompleks dengan HIF-1 β , bertranslokasi ke inti dan kemudian terikat pada *hypoxia response element* (HRE) pada promoter gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen. Banyak gen yang terlibat dalam konsumsi glukosa dan glikolisis ternyata merupakan gen sasaran dari HIF-1. *Hypoxia inducible factor-1* antara lain meregulasi ekspresi gen *glucose transporter* (GLUT) serta *lactate dehydrogenase* (LDH).^{1,2,3}

GLUT merupakan protein transporter yang berperan mentransport glukosa dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Aktivitas transport bergantung pada kadar glukosa dan jumlah protein transporter di membran sel.⁴ Pada kondisi hipoksia, peningkatan ekspresi gen GLUT akan meningkatkan jumlah GLUT sehingga menyebabkan peningkatan

konsumsi glukosa, yang merupakan salah satu mekanisme untuk memenuhi kebutuhan molekul *adenosine triphosphate* (ATP).³

Pada kondisi hipoksia terjadi penurunan molekul ATP sehingga kebutuhan energi tidak dapat dipenuhi. Untuk mengatasinya, metabolisme akan beralih menjadi anaerob yang ditandai dengan peningkatan aktivitas spesifik LDH.³ Enzim ini merupakan enzim yang berperan mengkatalisis reaksi interkonversi piruvat dan laktat, tergantung pada ketersediaan oksigen.^{5,6}

Ada dua jenis subunit LDH yang berbeda pada organisme yaitu subunit H terutama diekspresikan di jaringan otak dan otot jantung, dan subunit M terutama diekspresikan di jaringan hati dan otot skelet, yang disandi oleh gen yang berbeda. Oleh karena itu, masing-masing organ tersebut mempunyai pola isozim LDH yang spesifik.⁷

Untuk mempelajari pola isozim LDH di jaringan hati pada hipoksia sistemik kronik dilakukan induksi hewan coba dengan hipoksia sistemik kronik. Pada penelitian ini hewan coba dimasukkan ke dalam *hypoxic chamber* yang mengandung gas campuran (oksigen 10% dan nitrogen 90%) selama 1, 3, 7 dan 14 hari. Organ yang diamati pada penelitian ini adalah hati karena organ ini merupakan organ yang metabolismenya sangat aerob dengan fungsi yang sangat vital sehingga perlu diteliti bagaimana perubahan metabolisme glukosa yang terjadi di hati pada kondisi hipoksia sistemik kronik.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen *in vivo* pada hewan coba

tikus (*Rattus norvegicus L.*) galur *Sprague Dawley*. Bahan yang diperiksa adalah organ hati. Organ hati diperoleh dari 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok hipoksia 1, 3, 7, 14 hari dan kontrol.

Jaringan hati ditimbang dan dibuat homogenat dengan larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4. Pengukuran konsumsi glukosa dilakukan menurut metode Trinder menggunakan glukosa ST kit (ST Reagensia Catalog No. 013-0248). Pengukuran aktivitas spesifik LDH dilakukan menurut metode *German Society of Clinical Chemistry* (DGKC) menggunakan LDH FS kit (DGKC Catalog No. 1970). Pengukuran isozim LDH dilakukan dengan metode *Titan Gel LD Isoenzyme*.

3. Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan penelitian terhadap kadar glukosa, aktivitas spesifik LDH dan pola isozim LDH jaringan hati tikus kontrol dan jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

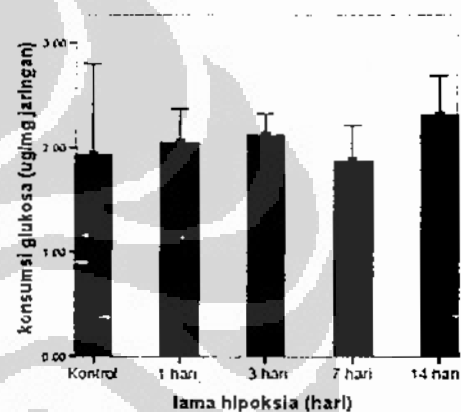
3.1. Konsumsi glukosa

Dari perhitungan didapatkan sebaran nilai konsumsi glukosa jaringan hati tikus kontrol dan jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari.

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan uji Saphiro-Wilk, didapat hasil bahwa konsumsi glukosa berdistribusi normal ($p > 0,05$). Karena data berdistribusi normal maka dilakukan analisis statistik parametrik yaitu menggunakan *analysis of variance* (ANOVA). Hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan

bermakna konsumsi glukosa antara kelompok perlakuan ($p > 0,05$).

Meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, namun terlihat bahwa konsumsi glukosa pada kelompok hipoksia 1, 3 dan 14 hari cenderung lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, kecuali pada kelompok hipoksia 7 hari. Konsumsi glukosa paling tinggi terjadi pada kelompok hipoksia 14 hari (Gambar IV.1).



Gambar IV.1. Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Peningkatan konsumsi glukosa yang tidak berbeda bermakna ini diduga disebabkan karena adanya sumber energi lain yang digunakan untuk menghasilkan energi, yaitu melalui oksidasi beta asam lemak, yang berasal dari pemecahan TAG di jaringan adiposa. Pada penelitian Larsen (1989), ditemukan peningkatan gliserol pada kondisi hipoksia, gliserol yang dilepaskan dari TAG ini kemudian dikonversi menjadi gliserol-3-fosfat oleh gliserol kinase.²⁷ Shen (2005), gliserol kinase ternyata diregulasi oleh HIF-1 α pada kondisi hipoksia.²⁸

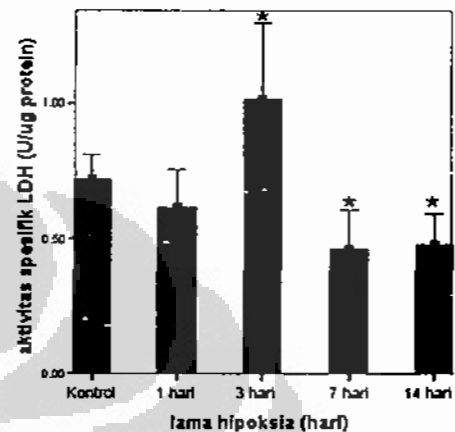
3.2. Aktivitas spesifik LDH

Perhitungan aktivitas LDH dilakukan duplo untuk tiap sampel dan kemudian dihitung aktivitas spesifiknya per mikrogram protein.

Analisis statistik terhadap aktivitas spesifik LDH jaringan hati menggunakan uji Saphiro-Wilk menunjukkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Oleh karena itu dilakukan analisis parametrik, yaitu uji ANOVA. Pada uji ANOVA tampak adanya perbedaan bermakna antar semua kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana saja yang saling berbeda bermakna dilakukan uji *least significant difference* (LSD). Tampak bahwa terdapat perbedaan bermakna aktivitas spesifik LDH antar kelompok perlakuan. Pada awal hipoksia (kelompok hipoksia 1 hari), aktivitas spesifik LDH lebih rendah tidak bermakna dibanding kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa hipoksia belum berpengaruh terhadap metabolisme glukosa di jaringan hati.

Aktivitas spesifik LDH paling tinggi terjadi pada kelompok hipoksia 3 hari, meningkat secara bermakna dibanding kelompok kontrol dan hipoksia 1 hari. Hal ini diduga disebabkan oleh karena peningkatan mRNA HIF-1 α pada hari pertama hipoksia, yang kemudian diikuti dengan peningkatan kadar protein HIF-1 α pada hari ke-3 hipoksia. Enzim LDH diketahui merupakan salah satu protein yang diregulasi oleh HIF-1 α (Gambar IV.2). Hal ini didukung oleh penelitian Jusman (2010) dari kelompok penelitian yang sama, membuktikan bahwa pada hari pertama hipoksia terjadi peningkatan mRNA HIF-1 α .²⁹ Hal ini diperkuat

oleh penelitian Halim (2008) juga dari kelompok penelitian yang sama, menemukan dengan *Western blot* terjadi peningkatan ekspresi protein HIF-1 α yang signifikan pada hipoksia hari ke-3.³⁰



Gambar IV.2. Aktivitas spesifik LDH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. (*): berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$)

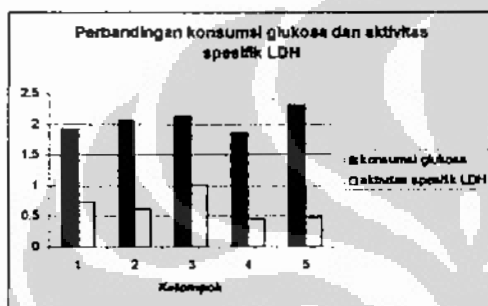
Peningkatan aktivitas spesifik LDH ini disebabkan oleh meningkatnya proses glikolisis untuk memenuhi kebutuhan energi. Pathak (2005), membukukan bahwa terjadi peningkatan LDH beberapa kali lipat lebih tinggi pada proliferasi sel dan sel tumor karena proses glikolisis yang meningkat.⁵

Aktivitas spesifik LDH pada kelompok hipoksia 7 hari dan 14 hari lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Lebih rendahnya aktivitas spesifik LDH setelah hipoksia hari ke-7 ini diduga disebabkan oleh karena telah terjadi apoptosis. Hendrawan (2008), mengemukakan bahwa pemaparan hipoksia secara terus menerus, sel akan memulai tahapan reaksi yang mengarah kepada apoptosis. Jadi dalam lingkungan hipoksia yang berat, sebagian sel mampu beradaptasi terhadap stress

lingkungan tersebut, namun sebagian lagi akan mengalami apoptosis.³¹

3.3. Analisis hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH

Perbandingan konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik LDH di jaringan hati ditampilkan pada Gambar IV.3



Gambar IV.3. Perbandingan konsumsi glukosa dan aktivitas spesifik

Untuk mengetahui adanya korelasi antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH jaringan hati, dilakukan uji korelasi. Karena kedua data berdistribusi normal, maka uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi Pearson. Dari hasil uji korelasi Pearson antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH menunjukkan korelasi positif lemah, tidak bermakna ($r=0.101$, $p>0.05$). Meskipun secara statistik tidak ada korelasi yang bermakna antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH, hasil yang ditunjukkan pada Gambar IV.3, tampak bahwa konsumsi glukosa cenderung meningkat, walaupun tidak bermakna selama hipoksia berlangsung. Konsumsi glukosa yang cenderung meningkat selama hipoksia ini, tidak berkorelasi dengan aktivitas spesifik LDH yang meningkat pada hari ke-3 hipoksia.

3.4. Elektroforesis isozim LDH

Hasil elektroforesis menunjukkan adanya 5 isozim LDH (LDH5, LDH4, LDH3, LDH2 dan LDH1) baik pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik maupun jaringan hati tikus kontrol.

Pada Gambar IV.4 tampak bahwa distribusi pola isozim selalu didominasi oleh isozim LDH5 dan LDH4 diikuti dalam jumlah kecil isozim LDH3, LDH2 dan LDH1, baik pada kelompok hipoksia maupun kelompok kontrol. Fountain (1970), membuktikan bahwa pola isozim LDH selalu didominasi isozim LDH5, baik pada kelompok sel tumor maupun kelompok kontrol.³⁰



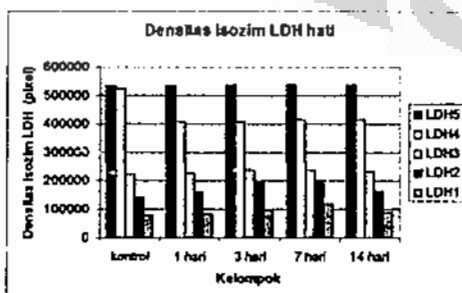
Gambar IV.4. Elektroforesis isozim LDH hati tikus

Terdapat perbedaan pola isozim LDH2 dan LDH1 kelompok hipoksia 3 hari dan 7 hari dengan kelompok kontrol. Isozim LDH2 dan LDH1 masing-masing mempunyai subunit M1H3 dan H4. Isozim LDH2 dan LDH1 mengubah laktat menjadi piruvat. Piruvat yang terbentuk ini kemudian akan dikonversi menjadi asetil KoA oleh PDH dan selanjutnya masuk ke siklus Krebs serta menghasilkan molekul ATP. Peningkatan ekspresi

LDH2 dan LDH1 pada hipoksia 3 dan 7 hari ini, diduga merupakan upaya adaptasi tubuh terhadap kondisi hipoksia yang berlangsung kronik. Penggunaan laktat sebagai sumber energi ini merupakan usaha tubuh untuk menghemat penggunaan glukosa, yang mutlak diperlukan oleh jaringan yang vital seperti sel darah merah. Hal ini sesuai dengan aktivitas spesifik LDH yang paling tinggi pada hari ke-3 hipoksia. Nilai densitas masing-masing ditampilkan pada Tabel IV.3 dan Gambar IV.5.

Koukourakis (2005), membuktikan bahwa pada konsentrasi laktat yang tinggi dapat terjadi reaksi umpan balik reaksi yang dikatalisis oleh LDH5 sehingga konversi piruvat menjadi laktat menurun. Sebaliknya konversi laktat menjadi piruvat yang meningkat, yang dikatalisis oleh LDH1 yang bekerja optimum pada kondisi yang lebih aerob.³³

Penurunan konsumsi glukosa pada hipoksia hari ke-7, disertai oleh penurunan aktivitas spesifik LDH dan peningkatan ekspresi LDH2 dan LDH1. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan glukosa sebagai sumber energi berkurang dan jaringan hati menggunakan laktat sebagai sumber energi.



Gambar IV.5. Nilai densitas isozim LDH jaringan yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Keterangan: Tidak berbeda bermakna antar semua kelompok ($p > 0,05$)

Pada hipoksia hari ke-14, tampak bahwa tidak ditemukan peningkatan ekspresi LDH2 dan LDH1. Diduga kondisi ini disebabkan jaringan hati tidak dapat mempertahankan lingkungan yang kondusif untuk aktivitas LDH2 dan LDH1 yang memerlukan kondisi yang cukup aerob. Sehingga pemakaian glukosa sebagai sumber energi meningkat, yang kemudian dikonversi menjadi piruvat selanjutnya dikatalisis menjadi laktat oleh LDH5

Ada beberapa kendala pada penelitian ini, diantaranya tidak dilakukan pengukuran kadar laktat oleh karena kit untuk pemeriksaan asam laktat tidak diperoleh hingga penelitian berakhir. Oleh karena itu, parameter perubahan metabolisme glukosa pada kondisi hipoksia yang dapat diamati hanya konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola isozim LDH.

4. Kesimpulan

Konsumsi glukosa jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik cenderung meningkat walaupun tidak berbeda bermakna. Aktivitas spesifik LDH pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik paling tinggi pada hipoksia hari ke-3. Pola elektroforesis isozim LDH kelompok tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik menunjukkan perbedaan pada hari ke-3 dan ke-7 dengan kontrol. Tidak terdapat hubungan antara konsumsi glukosa dengan aktivitas spesifik LDH

Daftar Pustaka

1. Lee JW. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α): its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 2004; 36: 1-12
2. Bartrons R, Can J. Hypoxia, glucose metabolism and the warburg's effect. *J. Bioenerg Biomembr.* 2007; 39: 223-229
3. Semenza GL. HIF-1 mediates the warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J. Bioenerg Biomembr.* 2007; 39: 231-234
4. Stryer L. *Biokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000
5. Pathak JW, Vinayak M. Modulation of *lactate dehydrogenase* isozymes by modified base queuine. *Molecular Biology Reports.* 2005; 32: 191-196
6. Wenger R. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB.* 2002; 16: 1151-62
7. Koolman J, Roehm KH. *Color atlas of biochemistry*. Thieme. 2005
8. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.* 1991; 39: 476-500
9. Vaupel P. Tumour hypoxia: causative factors, compensatory mechanism, and cellular response. *Oncologist.* 2004; 9: 4-9
10. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and liver failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-5008
11. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:167-71.
12. Raven PH, Johnson G. *Understanding biology*. USA: Mosby company. 1998
13. Bender D. Carbohydrates of physiologic significance In: *Harper's Illustrated Biochemistry*. USA: McGraw-Hills. 2009
14. Lieberman M, Allan DM. *Basic medical biochemistry*. Philadelphia: Williams and Wilkins. 2009
15. Alberti K. The biochemical consequences of hypoxia. *J. Clin. Path.* 30: 14-20
16. Webster KA. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *The Journal of experimental biology.* 2003; 206: 2911-2922
17. Pison CM, Chauvin C, Fontaine E, Catelloni F, Keriél C, Paramelle B, Leverve XM. Mechanism of gluconeogenesis inhibition in rat hepatocytes isolated after

- in vivo* hypoxia. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1995; 268: 965-973
18. Farco V, Gabrielle A. Lactate as a maker of energy failure in critically ill patients: Hypothesis. Biomed central ltd. 2005
19. Mayes PA. Glycolysis and piruvat oxidation in: Murray, R. K., Granner DK, Rodwell VW., editors Harper's Biochemistry. McGraw-Hills. Newyork: 2003
20. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia harper. Jakarta: Penerbit buku kedokteran. 2000
21. Dufour JF, Clavien PA. Signaling pathways in liver disease. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005
22. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. Curr Opin Cell Biol. 2001;13:167-71
23. Carraway MS. Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000; 278: 806-812
24. Menchenko G. Handbook of detection of enzyme on electrophoretic gels. United states of America: CRC press. 2003
25. Bishop ML, Fady EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. Lippincott Williams and wilkins. Philadelplia: 2010
26. Hanafiah KA. Rancangan percobaan: teori & aplikasi. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada. 2005
27. Larsen TJ, Myrmel T. Effect of hypoxia on lipolysis in isolated rat myocardial cells. Molecular and cellular biochemistry. 1989; 88: 139-144
28. Shen C, Nettleton D. Roles of the HIF-1 hypoxia inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. The journal of biological chemistry. 2005; 280: 20580-20588.
29. Jusman SW. Respons jaringan hati terhadap hipoksia sistemik kronik: analisis regulasi ekspresi gen sitogloblin [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2010
30. Halim A. Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008
31. Hendrawan S. Ekspresi gen *Hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) dan apoptosis pada jantung yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.
32. Fountain JA, Parks ME, Dickey A, Mckee RW. *Lactate dehydrogenase*

isoenzyme in tissue of normal and ehrlich-tette tumor bearing swiss mice. *Cancer Research*. 1970; 30: 998-1002.

33. Koukourakis MI, Giatromanglaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. *Lactate dehydrogenase 5 (LDH5)* relates to up-regulates hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colarectal cancer. *Clinical and experimental metastasis*. 2005; 22: 25-30

34. Alexander RR, Griffiths J. *Basic biochemical methods*. New York: A john wiley & sons, Inc. 1993