

Pajanan Hipoksia Hipobarik Intermiten Menurunkan Metabolisme Anaerobik pada Tikus Jantan Spraque Dawley

*Achmad Hidayat¹, Kahdar Wiradisastra², Bethy S. Hernowo²,
Tri Hanggono Achmad²*

¹ Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa Dr Saryanto,
Jalan MT Haryono Kav. 26 Jakarta Selatan 12810 Indonesia

² Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran,
Jl.Eijkman No. 38 Bandung 40161 Indonesia

Abstrak

Hipoksia hipobarik intermiten (HHI) sering dialami oleh para penerbang maupun awak pesawat. Jika hipoksia berlanjut, maka terjadi metabolisme anaerobik yang berlebihan dan gangguan pada mitokondria yang menyebabkan apoptosis. Penelitian ini bertujuan menganalisis efek pajanan HHI terhadap metabolisme anaerobik dengan mengukur ekspresi LDH dan kadar asam laktat sebagai indikator glikolisis serta ekspresi caspase-3 untuk melihat apoptosis sel. Dilakukan penelitian eksperimental selama periode Januari-April 2010 pada tikus jantan Spraque Dawley yang dipajankan HHI satu sampai empat kali dengan interval satu minggu. Satu kelompok kontrol tidak dipajankan hipobarik hipoksia sedangkan empat kelompok perlakuan dipajankan pada hipobarik hipoksia menggunakan *type I chamber flight profile* (ruang udara bertekanan rendah - RUBR) dengan modifikasi. Tekanan RUBR disesuaikan setara ketinggian 35.000 kaki selama 1-2 menit, 25.000 kaki selama 5 menit, dan 18.000 kaki selama 25 menit. Hasil penelitian menunjukkan kadar asam laktat menurun dengan semakin seringnya tikus terpajan HHI. Ekspresi protein LDH dan Caspase-3 dengan imunohistokimia dan *Western Blot* juga menurun dengan semakin seringnya tikus terpajan hipoksia hipobarik. Terdapat korelasi antara penurunan ekspresi protein LDH dan Caspase-3 ($r = 0,522$; $p=0,0031$). Simpulannya adalah pajanan HHI menurunkan metabolisme anaerobik yang ditandai dengan penurunan glikolisis dan apoptosis pada tikus jantan jenis Spraque Dawley.

Kata kunci: hipoksia hipobarik intermiten, metabolisme anaerobik, LDH, asam laktat, Caspase-3

Korespondensi: Achmad Hidayat. E-mail: hidayat_achmad@yahoo.com

Effects of IHH Exposures Towards the Heart by Measuring LDH, Caspase-3 Expressions and Lactic Acid Level

Abstract

Intermittent hypobaric hypoxia (IHH) often experienced by aviators and cabin crews. If hypoxia continues, it will activate anaerobic metabolism and would lead to apoptosis. This study analyzed effects of IHH exposures towards the heart by measuring LDH, caspase-3 expressions and lactic acid level. Experimental study was conducted through out a period of January-April 2010 on Sprague Dawley male mice. They were exposed to IHH once to four times in an interval of one week. One control group was left out from the process of exposures while the four treatment groups were exposed to IHH by using a modified type I hypobaric chamber flight profile. Later the chamber's pressure was adjusted to be equivalent with 35.000 ft altitude for 1-2 minutes, 25.000 ft for 5 minutes and then 18.000 ft for 25 minutes. The result of this research showed that lactic acid level, LDH and Caspase-3 protein expressions decreased with the increasing frequency of IHH exposures,. There was a correlation between the decrease of protein expression LDH and Caspase-3 ($r = 0.522$; $p = 0.0031$). In conclusion, the anaerobic metabolism effect will decrease if there are multiple IHH exposures, which are indicated by the decrease of glycolysis and apoptosis on Sprague Dawley male mice.

Keywords: *intermittent hypobaric hypoxia, anaerobic metabolism, LDH, lactic acid, Caspase-3*

Pendahuluan

Pada penerbangan di ketinggian jelajah 30.000 kaki, tekanan udara di dalam kabin pesawat maksimal dapat disesuaikan setara dengan ketinggian 6000-8000 kaki (560-590 mmHg).¹ Jika dipaksakan disesuaikan pada ketinggian permukaan laut (tekanan 720 mmHg), teknologi penerbangan tidak dimungkinkan, karena perlu alat kompresor oksigen yang besar dan kemungkinan terjadi ledakan. Akan tetapi manusia dapat beradaptasi terhadap kekurangan oksigen tersebut, sehingga tidak terjadi gangguan fisiologis.² Adaptasi tersebut dapat dilakukan dengan upaya hipoksia hipobarik intermiten.

Hipoksia hipobarik sering dialami oleh para penerbang maupun awak pesawat. Jika hipoksia berlanjut, maka akan terjadi metabolisme anaerobik yang berlebihan dan gangguan pada mitokondria yang dapat menyebabkan apoptosis sel. Penemuan *master switch*

gene HIF-1 α pada keadaan hipoksia beberapa tahun belakangan ini dapat menjelaskan hubungannya dengan beberapa gen yang terinduksi, antara lain gen yang terlibat dalam apoptosis.^{3,4}

Pada keadaan hipoksia hipobarik intermiten, mekanisme adaptasi untuk mengatasi kekurangan oksigen melalui peran protein yang terkait dengan hipoksia antara lain LDH dan Caspase-3, juga kadar asam laktat di sirkulasi belum banyak diteliti termasuk di Indonesia.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pajanan hipoksia hipobarik intermiten terhadap metabolisme anaerobik jantung tikus dengan menganalisis glikolisis dan apoptosis melalui pemeriksaan ekspresi protein LDH dan caspase-3 serta kadar asam laktat.

Bahan dan cara

Penelitian dilakukan di Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa Dr Saryanto (Lakespra

Saryanto) pada hewan coba tikus jenis Sprague Dawley jantan berumur 8 minggu dengan berat antara 150-200 g. Hewan coba tikus terdiri atas satu kelompok kontrol yang tidak mendapat pajanan hipobarik hipoksia dan empat kelompok yang mendapat pajanan hipobarik hipoksia. Masing-masing kelompok terdiri atas 7 ekor tikus. Semua empat kelompok dipajankan pada hipobarik hipoksia menggunakan *type 1 chamber flight profile* (ruang udara bertekanan rendah - RUBR) dengan modifikasi.⁵ Kelompok perlakuan dimasukkan ke dalam RUBR untuk kemudian tekanan RUBR disesuaikan setara ketinggian 35.000 kaki selama 1-2 menit, disusul ketinggian 25.000 kaki selama 5 menit, dan selanjutnya disesuaikan setara ketinggian 18.000 kaki selama 25 menit.

Keempat kelompok mendapatkan pajanan sebagai berikut: kelompok pertama mendapat satu kali pajanan; kelompok ke-dua mendapat dua kali pajanan; kelompok ke-tiga mendapat tiga kali pajanan; kelompok ke-empat mendapat empat kali pajanan. Untuk kelompok pertama (pada pajanan pertama), setelah tampak gejala hipoksia yang ditandai dengan tidak ada reaksi dan ekor tikus tidak bergerak, maka dilakukan anastesi umum dengan ketamin intra muskuler, 1 cc sampel darah diambil dan organ jantung tikus dikeluarkan untuk sediaan.

Pengambilan sediaan untuk kelompok yang lainnya sebagai berikut: untuk kelompok ke-dua pada pajanan kedua; kelompok ke-tiga pada pajanan ke-tiga; kelompok ke-empat pada pajanan ke-empat.

Kadar asam laktat pada sampel darah diperiksa dengan metode Elisa yang dilakukan di RSMK Jakarta. Sediaan dibagi dua bagian. Bagian pertama dibuat blok parafin untuk

pemeriksaan imunohistokimia LDH dan Caspase-3 di Bagian Patologi Anatomi FK Unpad/RS Hasan Sadikin dan bagian lain digunakan untuk ekstraksi protein dengan *Tripure Isolation Reagent[®]* untuk pemeriksaan *Western Blot* LDH dan Caspase-3 di Lab Biomolekuler FKUI.

Untuk pemeriksaan imunohistokimia dilakukan sebagai berikut. Reagen yang dipergunakan; Antibodi primer: *LDH Goat polyclonal to Lactate Dehydrogenase* (Abcam[®] nomor katalog ab71494), *Caspase-3 Rabbit polyclonal to Caspase-3* (Abcam[®] katalog ab59388). Antibodi sekunder dengan *Biotinylated universal*. Tiap preparat diinterpretasi dengan memberi skoring berdasarkan nilai rata-rata dari 3 lokasi dengan intensitas (kuat, sedang, lemah, negatif) dan distribusi warna (>80%, 50-80%, 20-50%, <20%). Skoring terendah ialah 0 untuk hasil protein yang tidak terekpresi, sedangkan tertinggi adalah 7 jika ekspresi terkuat. Pada pemeriksaan *Western Blot*, reagen yang dipergunakan ialah antibodi primer: *LDH Goat polyclonal to Lactate Dehydrogenase* (Abcam[®] nomor katalog ab71494), *Caspase-3 Rabbit polyclonal to Caspase-3* (Abcam[®] katalog ab59388), antibodi sekunder: *Goat polyclonal to Rabbit IgG-H&L* (Abcam[®] katalog ab6721). Interpretasi adalah dengan mengonversi pita protein yang terekam dalam gel dengan program Adobe Photoshop.

Analisis statistik menggunakan uji t dan korelasi rank Spearman (r_s) dengan program SPSS versi 13. Penelitian ini mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran (FK Unpad). Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai April 2010.

Hasil dan Pembahasan

Kadar asam laktat

Kadar asam laktat dalam darah tikus didapat dengan mengukur absoransi pada λ 450 nm menggunakan laktat standar sebagai rujukan. Hasil perhitungan kadar asam laktat disajikan pada tabel 1.

Dari tabel 1 dapat dilihat penurunan kadar asam laktat sejalan dengan frekuensi pajanan hipobarik hipoksia, dan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol kadar asam laktat tersebut berbeda secara bermakna dengan kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas glikolisis menurun pada keadaan hipoksia hipobarik intermiten. Pada keadaan hipoksia, untuk mengatasi kekurangan oksigen sebagai bahan untuk sumber energi di mitokondria, dilakukan upaya adaptasi antara lain meningkatkan glikolisis dengan hasil akhir asam laktat.⁷ Dari beberapa penelitian diketahui jika terjadi peningkatan kadar asam laktat, akan terjadi penurunan pengambilan glukosa, dengan demikian jika kondisi hipoksia berlanjut maka glukosa akan menurun dan sumber energi akan diambil dari simpanan sumber energi yang ada di otot jantung seperti kreatinfosfat. Dengan demikian, kadar asam laktat akan makin meningkat dan selanjutnya akan terjadi kerusakan sel. Jika terjadi kondisi hipoksia hipobarik intermiten, maka ada upaya adaptasi

yang *reversible* dan hal ini diduga dipengaruhi oleh aktivitas *master switch gen* yaitu HIF-1 α ,^{8,9} sehingga kadar asam laktat akan menurun sesuai dengan frekuensi pajanan hipoksia.

Ekspresi protein LDH

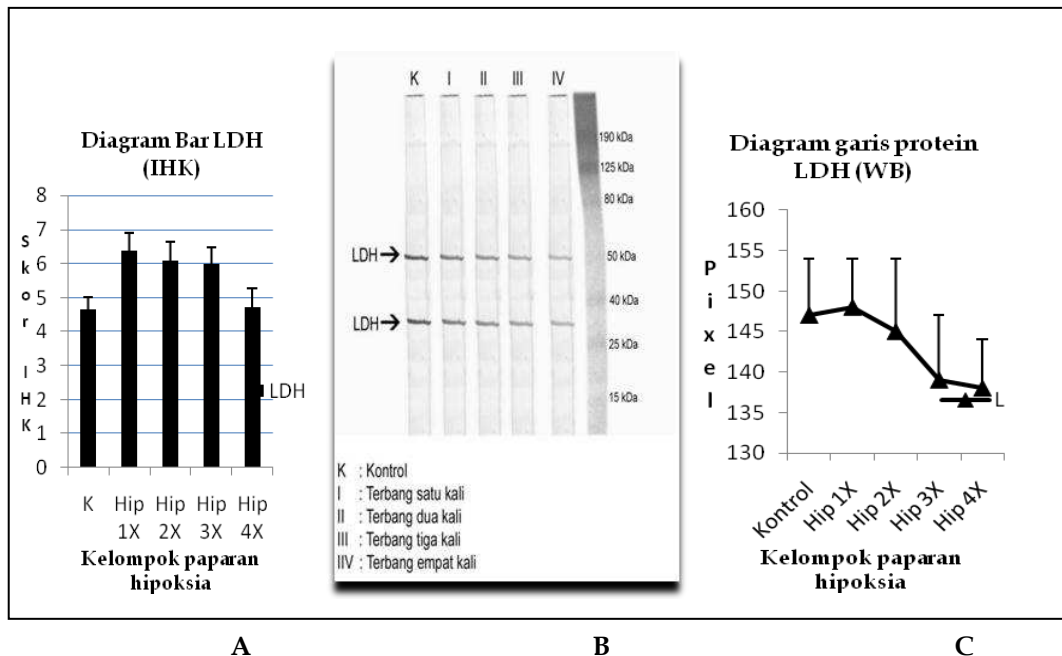
Dari 35 preparat untuk pemeriksaan protein dengan pulasan imunohistokimia, hanya 31 preparat yang dapat diinterpretasi, penyebabnya adalah mungkin masalah teknik pemulasan, yang mana tidak terjadi reaksi antara antibodi primer dengan sediaan, sehingga sediaan tidak berubah warna dan tidak memenuhi kriteria untuk pemberian skoring.⁶

Pada 31 spesimen yang dapat diinterpretasi ekspresi protein LDH, terlihat ekspresi protein LDH tersebut kecenderungan bahwa makin sering terpajan hipoksia hipobarik akan menurun ($p < 0.05$) (Gambar 1 A).

Otot jantung mempunyai lebih banyak LDH dibandingkan dengan otot lainnya. Sehingga jika terjadi keadaan hipoksia, terbentuk asam laktat yang banyak, maka LDH akan diperlukan untuk mengubah laktat menjadi piruvat yang digunakan sebagai sumber energi.^{10,11} Jika kondisi hipoksia berlanjut maka diperlukan LDH yang lebih banyak untuk mengubah asam laktat menjadi piruvat.

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian Menurut Jumlah CD4

Jumlah CD4	Nilai Statistik (n=123)
Rerata	324,38 (202,33)/ μ L
Median	325 / μ L
Minimum-Maksimum	8 – 909 / μ L
< 200 /Ml	38(30,9%)
200-499 / μ L	60 (48,8%)
\geq 500 / μ L	25(20,3%)
Total	123 (100%)



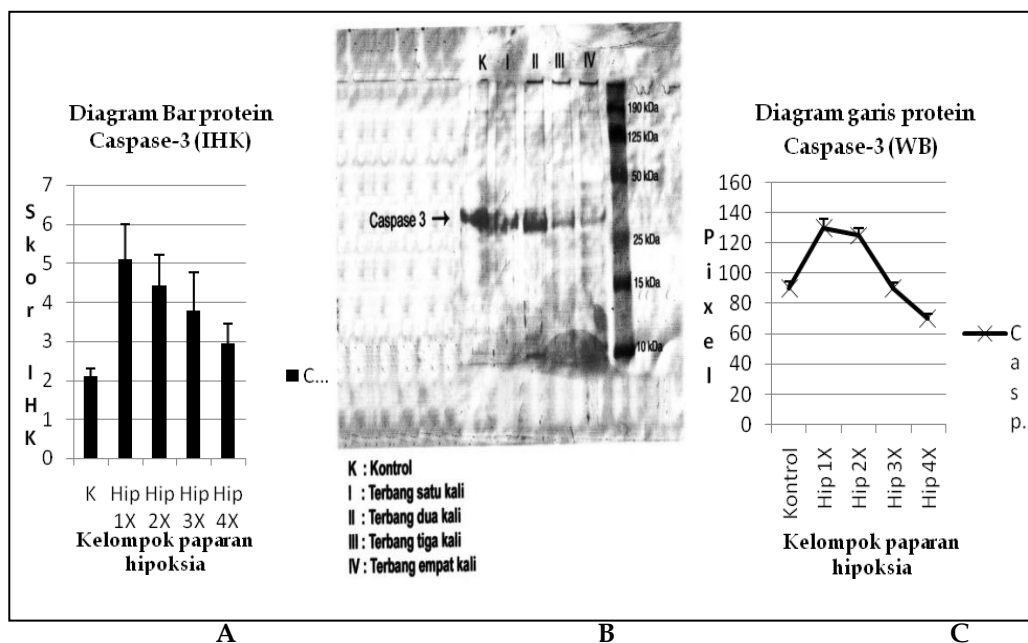
Gambar 1. Skor ekspresi protein LDH dengan pulasan IHK dan *Western Blot*
Ket: A. Skoring IHK protein LDH dari 4 kelompok perlakuan dan kontrol
B. Pita protein LDH dengan *Western Blot* dari 4 kelompok perlakuan dan kontrol
C. Dengan program Adobe P, pita pada B dikonversi dalam angka

Ada mekanisme lain untuk mengatasi kekurangan oksigen, yaitu mengkatalisis fosfokreatin yang banyak tersimpan di dalam otot jantung sehingga fosfat akan difosforilasi dan mengikat ADP membentuk ATP.¹² Pada keadaan kekurangan oksigen, sel akan beradaptasi dengan meningkatkan metabolisme anaerobik. Selanjutnya jika keadaan hipoksia kembali ke keadaan normoksia, maka gen HIF-1 α sebagai *master switch gene* akan berubah dari keadaan stabil menjadi terdegradasi. Karena LDH sebagai salah satu gen juga terpengaruh oleh gen HIF-1 α , maka ekspresi LDH pun akan berubah tergantung ada atau tidak adanya pajanan hipoksia¹³ sehingga

pada hipoksia hipobarik intermiten akan terlihat ekspresi LDH akan menurun sejalan dengan makin frekuensi pajanan hipoksia hipobarik di dalam otot jantung. Demikian pula dengan hasil *Western Blot*, pita elektroforesis semakin tipis yang berarti ekspresi protein LDH cenderung menurun seiring dengan peningkatan frekuensi pajanan hipoksia hipobarik (Gambar 1B, 1C).

Ekspresi protein Caspase-3

Pada spesimen yang dapat diinterpretasi terlihat ekspresi protein Caspase-3 menurun sejalan dengan semakin sering terpajan hipoksia hipobarik ($p < 0.05$) (Gambar 2).



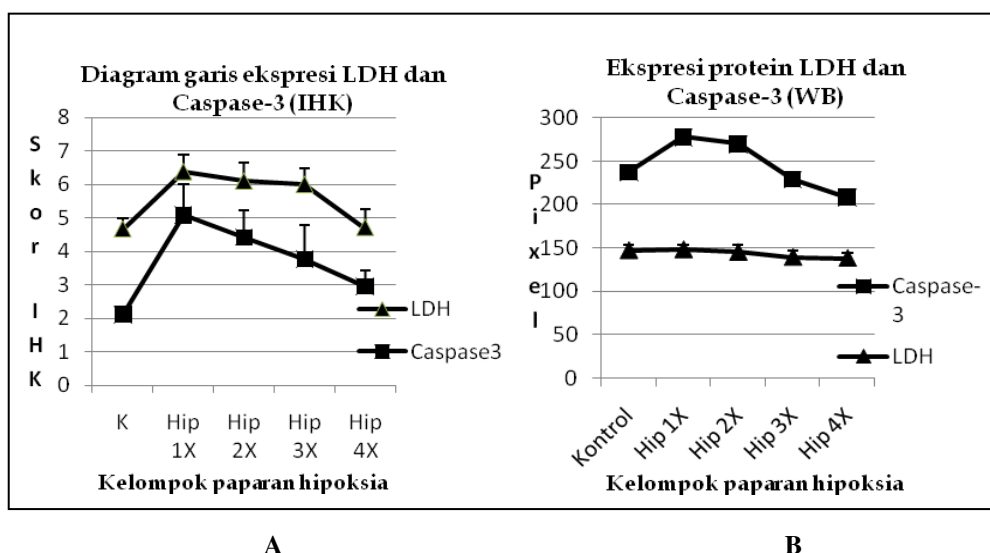
Gambar 2. Skor ekspresi protein Caspase-3 dengan pulasan IHK dan *Western Blot*
 Ket.: A Skoring IHK protein Caspase-3 dari 4 kelompok perlakuan dan kontrol
 B Pita Caspase-3 dengan WB dari 4 kelompok perlakuan dan kontrol
 C Dengan program Adobe P, pita pada B dikonversi dalam angka

Hal ini karena peran Bcl-2 yang juga akan menurun pada keadaan hipoksia. Bcl-2 berfungsi menjaga permeabilitas membran mitokondria, jika Bcl-2 turun maka akan terjadi kebocoran sitokrom-c dan masuk pada kaskade caspase.¹⁴ Ternyata pada keadaan hipoksia, ada gen HIF-1 α yang sangat sensitif pada kekurangan O₂. Kemudian melalui *hypoxia respons element*, maka HIF-1 α akan menginduksi ratusan gen lainnya, termasuk diantaranya adalah BNIP3. Gen BNIP3 akan bersaing dengan Bcl-2, jika rasio BNIP3 dan Bcl-2 lebih besar, maka terjadi pori di membran, selanjutnya akan keluar sitokrom-c dan masuk dalam kaskade caspase. Hipoksia hipobarikintermiten menyebabkan ekspresi HIF-1 α stabil dan terdegradasi secara teratur. Keadaan ini juga memengaruhi

ekspresi ROS yang akan berubah-ubah sehingga ekspresi MnSOD sebagai antioksidan dan Bcl-2 pun berubah sesuai dengan hipoksia intermiten. Selanjutnya protein Caspase-3 pun akan berubah-ubah dan cenderung menurun.¹⁵ Demikian pula dengan hasil *Western Blot* terlihat bahwa ketebalan pita elektroforesis semakin tipis seiring dengan frekuensi pajanan hipoksia hipobarik, berarti ekspresi protein Caspase-3 cenderung menurun (Gambar 2B, 2C).

Korelasi Ekspresi Caspase-3 dengan LDH

Pada Gambar 3A terlihat bahwa semakin turun ekspresi protein LDH terjadi kecenderungan penurunan ekspresi protein Caspase-3 ($r_s = 0,522$; $p=0,0031$). Begitu pula hasil pemeriksaan *Western Blot* (Gambar 3 B).



Gambar 3. Skor IHK dan WB ekspresi Caspase-3 dan LDH
Ket.: A Skoring sedian pulasan Imunohistokimia
B Skoring sedian dengan Western Blot

Dari gambar 3 terlihat terdapat korelasi antara kecenderungan penurunan ekspresi protein LDH karena seringnya terpajan hipoksia hipobarik dengan kecenderungan penurunan ekspresi protein caspase-3. Korelasi antara ekspresi LDH dengan ekspresi Caspase-3 sebesar $r_s = 0,522$ dan $p = 0,0031$, menurut kriteria Guilford adalah korelasi sedang (*substantial relationship*) Menurunnya LDH menunjukkan penurunan metabolisme anaerobik, disamping itu pada jalur apoptosis, penurunan ekspresi Bcl-2 menunjukkan permeabilitas membran mitokondria stabil dan dapat mencegah kebocoran sitokrom-c ke sitosol, sehingga ekspresi Caspase-3 menurun. Selanjutnya apoptosis pada sel kardiomyosit akan menurun.¹⁶

Simpulan

Pajanan hipoksia hipobarik intermiten menurunkan metabolisme

anaerobik ditandai dengan penurunan glikolisis dan apoptosis pada tikus jantan galur *Sprague Dawley*. Hal ini yang menyebabkan terjadinya *hypoxia preconditioning*, suatu proses adaptasi natural. Dengan demikian apoptosis sel kardiomyosit menurun, sehingga terhindar dari kerusakan dan malah memberi efek kardioproteksi.

Daftar Pustaka

1. Hidayat A, Wiradisastra K, Hernowo B S, Achmad TH. Kardioprotektif pasca paparan hipoksia hipobarik intermiten pada tikus Sprague Dawley. MKI 2011 In press.
2. Sadikin Mohamad. Alam terkembang jadi guru: kendali genetik terhadap cekaman oksidatif, orasi ilmiah pengukuhan sebagai guru besar ilmu kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta; 2008.
3. Gustafson Asa B, Gottlieb Roberta. Heart mitochondria: gates of life and

- death. *Cardiovasc Res.* 2008; 77(2):334-43.
4. Graham RM, Frazier DP, Thomson JW, Haliko S, Li H, Wasserlauf B. et al. A unique pathway of cardiac myocytes death caused by hypoxia acidosis. *J Exp Biol.* 2004; 207:3189-200.
5. Tentara Nasional Indonesia. Markas Besar Angkatan Udara. Buku penunjuk tehnik TNI AU tentang indoktrinasi dan latihan aerofisiologis awak pesawat ABRI/TNI AU. Jakarta: TNI AU; 1998.
6. Hernowo BS. Laboratory Manual. Workshop biologi molekuler, bioteknologi dan imunohistokimia. FK Unpad. Bandung; 2009.
7. Sat Sarma. Lactic acidosis overview. *E Medicine Critical Care* 2007. (cited 2010 Sept 16) Available from: <http://www.scribd.com/doc/22804508>.
8. Rumley Ag, Rafla N. Serum enzyme changes during 90 hours continous basketball. *Scand.J.Sport Sci.* 1983;5:45-9.
9. Dubouchaud H, Gail EB, Eugene EW, Bryan CB, George AB. Endurance training, expression and physiology of LDH, MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278:E571-9.
10. Carsten J, Andrew PH. Topical review: Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of monocarboxylate transporter. *J.Physiol.* 1999; 517(3):633-42.
11. Brook G. Lactic Acid Not Athlete's Poison, But An Energy Source-If You Know. *Science Daily.* April 21, 2006. *J Physiol Endocrinol Metab.* In press.
12. Eemenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulations of genes expression by HIF-1 alpha, in Wiley, Chichester, Signalling pathways in acute oxygen sensing, Novartis Foundation Symposium. 2005; 272:2-14.
13. Burtcher M, Pachinger M, Ehrenbourg I, Mitterbauer G, Faulhaber M, Puhlinger R et al. Intermitten hypoxia increased exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2004;96(2) :247-54.
14. Derek J, Hausenloy, Marisol Ruiz, Not just the powerhouse of the cell, emerging roles for mitochondria in the heart, *Cardiovasc Research* 2010; 88(1):5-6.
15. Chalah A, Khosrovi Far R. The mitochondria death pathway. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 615:25-45.
16. Gowies Andreas. Caspase are central initiator and executioner of apoptosis. *Apo Review.* 2003 (cited 2010 Sept 16). Available from: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>.