



UNIVERSITAS INDONESIA

**Gambaran elektrokardiogram, ekspresi protein Peroxysome
Proliferator Gamma Coactivator (PGC-1 α) dan Brain Natriuretic
Peptide (BNP) pada Jantung Tikus yang diberi diet defisiensi
vitamin B12**

TESIS

**ADITYA KRISHNA MURTHI
1606839656**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
2019**



UNIVERSITAS INDONESIA

**Gambaran elektrokardiogram, ekspresi protein Peroxysome
Proliferator Gamma Coactivator (PGC-1 α) dan Brain Natriuretic
Peptide (BNP) pada Jantung Tikus yang diberi diet defisiensi
vitamin B12**

TESIS

**ADITYA KRISHNA MURTHI
1606839656**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FISILOGI
JAKARTA
DESEMBER 2019**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
Dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
Telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Aditya Krishna Murthi

NPM : 1606839656

Tanda tangan :



Tanggal : 2 Desember 2019

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Aditya Krishna Murthi
NPM : 1606839656
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Gambaran elektrokardiogram, ekspresi protein Peroxysome Proliferator Gamma Coactivator (PGC-1 α) dan Brain Natriuretic Peptide (BNP) pada jantung tikus yang diberi diet defisiensi vitamin B12.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M.Biomed) pada Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Sophie Yolanda, M.Biomed (.....)

Pembimbing II : Dr. dr. Dewi Irawati Soeria Santoso, MS (.....)

Penguji I : dr. Nurul Paramita, M. Biomed, Sp. KFR (.....)

Penguji II : dr. Wawaimuli Arozal, M. Biomed, PhD (.....)

Penguji III : dr. Bambang Widyanoro, Sp.JP, PhD (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 16 Desember 2019

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik:

Prof. Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



KATA PENGANTAR

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

1. dr. Sophie Yolanda, M. Biomed, selaku pembimbing I dan Dr. dr. Dewi Irawati, MS, selaku pembimbing II yang telah bersedia membimbing, memberikan motivasi, arahan, dan dukungan semangat kepada penulis selama masa studi, penyusunan proposal penelitian, penelitian, hingga ujian tesis.
2. dr. Nurul Paramita, M. Biomed, Sp. KFR, selaku penguji I, dr. Wawaimuli Arozal, M. Biomed, PhD, selaku penguji II dan dr. Bambang Widyanoro, Sp.JP, PhD, selaku penguji III yang telah memberikan saran dan masukan-masukan yang membangun dalam evaluasi proposal tesis dan persiapan serta perencanaan penelitian.
3. Prof. Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI.
4. Seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik FKUI, terutama staf pengajar di departemen/kekhususan Fisiologi, Dr. dr. Ermita Ilyas, MS; drg. Antonia, MS; Dr. dr. Minarma Siagian, MS, AIFM; Dr. dr. Neng Tine Kartinah, MS, AIFO; dr. Trinovita Andraini, M. Biomed, PhD; dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M. Biomed, PhD; dr. Nurhadi Ibrahim, PhD; Gulshan Fahmi El Bayani, S. Gz, M.Biomed. yang telah mengarahkan dan membimbing penulis selama masa studi di kekhususan Fisiologi Kedokteran.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Dr. dr. Raditya Wratsangka, Sp. OG(K), yang telah memberikan dorongan serta dukungan baik moril maupun materiil untuk segera menyelesaikan studi yang ditempuh.
6. Orang tua tercinta, Ibu Sri Lestari yang selalu memberikan dukungan moril serta doa yang tak terputus kepada penulis.

7. Rekan sejawat satu kekhususan Fisiologi Kedokteran, Irena Ujjanti, Heriyanto, Kesit Ivanali, Rena Mailani, Afifah, Yuliana Suryati, Fitriyani Rahayu yang telah membantu dalam penelitian, saling bertukar pikiran, dan memberikan semangat serta dukungan positif dalam penelitian ini.
8. Seluruh staf pengajar bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti atas dukungan moril yang telah diberikan untuk segera menyelesaikan studi ini.
9. Istri tercinta, Ayunita, S.Kep, Ns, yang telah mengorbankan waktu dan tenaganya untuk mendukung saya dengan semangat yang luar biasa dalam menyelesaikan studi dan penelitian ini.
10. Staf Administrasi Departemen Fisiologi FKUI, Ibu Rini, Pak Maksan, Pak Satam dan Pak Sugeng, yang telah banyak membantu penulis selama masa studi.
11. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari kata sempurna, mengingat keterbatasan pengetahuan dan pemahaman penulis. Oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik demi perbaikan tesis ini.

Semoga Allah SWT membalas segala perbuatan baik seluruh pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan dunia kesehatan di Indonesia .

Jakarta, 2 Desember 2019

Aditya Krishna Murthi

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Aditya Krishna Murthi
NPM : 1606839656
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi Kedokteran
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:

**Gambaran elektrokardiogram, ekspresi Protein Peroxisome Proliferator
Gamma Coactivator (PGC-1 α) dan Brain Natriuretic Peptide (BNP) pada
Jantung Tikus yang diberi diet defisiensi vitamin B12**

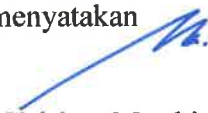
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada Tanggal : 2 Desember 2019

Yang menyatakan


Aditya Krishna Murthi

ABSTRAK

Nama : Aditya Krishna Murthi
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Gambaran elektrokardiogram, ekspresi protein Peroxysome Proliferator Gamma Coactivator (PGC-1 α) dan Brain Natriuretik Peptide pada jantung tikus yang diberi diet defisiensi vitamin B12.

Defisiensi kobalamin dapat menyebabkan berkurangnya donor metil yang berpotensi mengganggu metabolisme jantung. Defisiensi kobalamin dapat terjadi pada pasien dengan malnutrisi, ulkus peptikum, diabetes melitus, dan alkoholisme. Berbagai studi pada defisiensi vitamin B12 masih berfokus pada aterogenesis dan stress oksidatif. Penelitian ini bertujuan mengetahui korelasi defisiensi vitamin B12 dengan penurunan fungsi jantung melalui gambaran EKG, ekspresi protein PGC-1 α dan protein BNP. Empat belas tikus Sprague-Dawley jantan usia 24-28 minggu dibagi dalam 2 kelompok (kontrol dan perlakuan). Kelompok kontrol diberikan pakan standar dengan nutrisi lengkap, sementara kelompok perlakuan diberikan pakan AIN-93M termodifikasi defisien vitamin B12. Kedua kelompok diberikan pakan dalam periode yang sama yakni selama 16 minggu. Pada akhir minggu ke-16 dilakukan pemeriksaan EKG, pemeriksaan ELISA vitamin B12 plasma, Hcy plasma, ekspresi PGC-1 α dan kadar BNP-45 plasma. Hasil penelitian pada kelompok perlakuan menunjukkan terdapat penurunan kadar vitamin B12 plasma, peningkatan kadar Hcy plasma diikuti dengan aritmia pada rekam EKG 2 tikus di kelompok tersebut disertai dengan penurunan ekspresi protein PGC-1 α dan peningkatan kadar BNP-45 plasma. Terdapat korelasi cukup kuat antara penurunan ekspresi PGC-1 α dengan peningkatan BNP-45 plasma. Defisiensi kobalamin terbukti menyebabkan gangguan metabolisme energi kardiomyosit yang berujung pada aritmia dan pembesaran ventrikel kiri.

Kata Kunci: Defisiensi kobalamin, EKG, PGC-1 α , BNP

ABSTRACT

Name : Aditya Krishna Murthi
Study Program : Program Magister Ilmu Biomedik
Title : Electrocardiogram patterns, expression of Peroxysome Proliferator Gamma Coactivator (PGC-1 α) and Brain Natriuretic Peptide (BNP) in heart of cobalamin deficient rats.

Cobalamin deficiency may cause lack of dietary methyl donors which alter heart metabolism. Cobalamin deficiency are common in patients with malnutrition, gastrics ulcers, diabetes mellitus, and alcoholism. Most studies on cobalamin deficiencies are focused on its relationship with oxidative stress and atherogenesis. Therefore, this study aims to find the corelation between cobalamin deficiency and heart function deterioration through analysis of ECG pattern, expression of PGC-1 α protein, and plasma BNP-45 level. Fourteen male Sprague-Dawley rats (age 24-28 weeks) were divided into 2 groups: control group and treatment group. The control group was given standard diet while the treatment group received a modified diet type AIN-93M. Both groups are fed with the same 16-weeks period. ECG and ELISA was performed to evaluate plasma vitamin B12, Hcy levels, expression of PGC-1 α protein and plasma BNP-45 levels in each group at the end of the treatment period. At the end of study period, higher Hcy level was observed in the treatment group with lower plasma cobalamin followed by two rats has developed arrythmias and decreased expression of PGC-1 α protein and also increased in plasma BNP-45 levels. There is a relatively strong correlation between deterioration of PGC-1 α protein with the increased in plasma BNP-45 levels. Cobalamin deficiency has proven to alter cardiomyocytes energy metabolism which resulted in arrythmia and tendency to developed left ventricular hypertrophy.

Keywords: Cobalamin deficiency, ECG, PGC-1 α , BNP

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pernyataan Orisinalitas	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Halaman Pernyataan Persetujuan Publikasi Karya Ilmiah Untuk Keperluan Akademis	vi
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Singkatan	xv
Daftar Lampiran	xvii
BAB 1	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Pertanyaan Penelitian	5
1.4 Hipotesis Penelitian	5
1.5 Tujuan Penelitian	6
1.5.1 Tujuan Umum	6
1.5.2 Tujuan Khusus	6
1.6 Manfaat Penelitian	6
1.7 Kerangka Teori	7
1.8 Kerangka Konsep	8
BAB 2	9
2.1 Vitamin B12/ Kobalamin	9

2.1.1 Struktur Vitamin B12	9
2.1.2 Absorpsi dan metabolisme intraseluler vitamin B12	10
2.1.3 Fungsi vitamin B12	12
2.1.4 Defisiensi vitamin B12	15
2.2 Metabolisme energi pada otot Jantung	23
2.2.1 Fungsi Jantung sebagai “pompa”	23
2.2.2 Peran PGC-1 α pada regulasi energi mitokondria kardiomyosit ..	27
2.3 Kelainan jantung pada defisiensi kobalamin/vitamin B12	37
2.3.1 Gangguan struktur jantung pada defisiensi vitamin B12.....	38
2.3.2 Gangguan fungsional jantung pada defisiensi vitamin B12	40
2.3.3 Perubahan gambaran EKG pada defisiensi vitamin B12	45
2.4 Brain Natriuretic Peptide	46
2.4.1 Struktur BNP	47
2.4.2 Fungsi BNP	50
2.4.3 BNP sebagai biomarker kelainan jantung	51
BAB 3	56
3.1 Desain Penelitian	56
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	56
3.3 Subjek Penelitian	56
3.3.1 Penetapan jumlah hewan coba	56
3.3.2 Kriteria hewan coba	57
3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	58
3.5 Prosedur Penelitian	59
3.5.1 Bahan Penelitian	59
3.5.2 Zat Kimia untuk Penelitian	59
3.5.3 Alat Penelitian	59
3.5.4 Cara Kerja Penelitian	59
3.6 Alur Penelitian	66
3.7 Analisis Data	67
BAB 4	68
4.1 Karakteristik Subjek Penelitian	68

4.2 Hasil Analisis vitamin B12 Metode ELISA	69
4.3 Hasil Analisis kadar Hcy metode ELISA	70
4.4 Hasil EKG tikus putih jantan	71
4.5 Hasil pengukuran tebal miokardium ventrikel kiri	75
4.6 Hasil rasio berat jantung terhadap berat badan tikus putih jantan	76
4.7 Hasil Analisis protein PGC-1 α metode ELISA	77
4.8 Hasil Analisis protein BNP-45 metode ELISA	78
4.9 Analisis korelasi antara ekspresi protein PGC-1 α di otot jantung dengan kadar BNP-45 plasma	79
BAB 5	80
5.1 Hasil ELISA vitamin B12 dan Homosistein	81
5.2 Hasil pemeriksaan EKG	85
5.3 Hasil pemeriksaan tebal miokardium dan rasio berat jantung terhadap berat badan tikus putih jantan	89
5.4 Hasil ELISA PGC-1 α dan BNP-45	90
BAB 6	95
6.1 Kesimpulan	95
6.2 Saran	95
Daftar Pustaka	97
Lampiran	103
Artikel Penelitian	116
Riwayat Hidup	129

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.4. Berbagai kondisi yang menyebabkan defisiensi vitamin B12 dan patogenesis yang mendasari	17
Tabel 2.4.3. Berbagai penanda biologis pada gagal jantung	54
Tabel 3.4. Berbagai variabel penelitian dan definisi operasionalnya	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1. Struktur kimia vitamin B12/ kobalamin	9
Gambar 2.1.2. Absorpsi dan metabolisme intraseluler kobalamin	11
Gambar 2.1.3. Metabolisme vitamin B12 dan folat	13
Gambar 2.1.4. Prevalensi status rendah dan marginal vitamin B12 di Asia dan Afrika	16
Gambar 2.2.1. Struktur jantung manusia	24
Gambar 2.2.1.1. Struktur otot kontraktil jantung	25
Gambar 2.2.1.2. Rangkaian eksitasi-kontraksi dan relaksasi	27
Gambar 2.2.2. Jalur transduksi energi dan sintesis ATP	29
Gambar 2.2.2.1. PGC-1 α sebagai koaktivator transkripsional	32
Gambar 2.2.2.2. Peran PGC-1 α sebagai orkestrator metabolisme energi seluler	33
Gambar 2.2.2.3. Tahapan gen regulator PGC-1 α	35
Gambar 2.2.2.4. Berbagai pengaturan ekspresi PGC-1 α	36
Gambar 2.3.1. Model peningkatan kadar homosistein, stress oksidatif dan mir-188	40
Gambar 2.3.2. Skema representatif hubungan ketidakseimbangan nutrien metil dan kontribusinya dengan risiko gangguan kardiovaskular.....	41
Gambar 2.3.2.1. Skema ketidakseimbangan aktivitas PRMT1 dan SIRT1 akibat defisiensi donor metil	44
Gambar 2.4.1. Struktur peptida natriuretik pada manusia	48
Gambar 2.4.1.1. Bioaktivitas BNP melalui aktivasi GC-A dan cGMP dan bersihan melalui jalur degradasi NPR-C	50
Gambar 2.4.3. Algoritma diagnosis gagal jantung berdasarkan level NP dan ekokardiografi	55
Gambar 4.1.1. Rerata berat badan hewan coba minggu ke-0 dan	

minggu ke-16.....	68
Gambar 4.2.1. Hasil ELISA vitamin B12 hewan coba minggu ke-0 dan minggu ke-16.....	69
Gambar 4.3.1. Hasil ELISA Hcy hewan coba minggu ke-0 dan minggu ke-16	70
Gambar 4.4.1. Denyut jantung kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	71
Gambar 4.4.2. QT corrected interval kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	72
Gambar 4.4.3. RS Amplitudo kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	73
Gambar 4.4.4. QRS-T angle kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	74
Gambar 4.5.1. Tebal miokardium ventrikel kiri kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	75
Gambar 4.6.1. Hasil rasio berat jantung terhadap berat badan tikus putih jantan pada minggu ke-16	76
Gambar 4.7.1. Hasil ELISA PGC-1 α kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	77
Gambar 4.8.1. Hasil ELISA BNP-45 kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16	78
Gambar 4.9.1. Hubungan antara kadar PGC-1 α dan BNP-45	79
Gambar 5.1. Aritmia pada dua tikus percobaan di kelompok defisien	86
Gambar 5.2. Mekanisme pengaruh donor metil terhadap koaktivator PGC-1 α	92

DAFTAR SINGKATAN

ADHERE-AP : Acute Decompensated Heart Failure Registry-International Asia-Pacific.

AdoB12 : Adenosilkobalamin

ALD : Alcoholic Liver Disease

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

ATP : Adenosine Triphosphate

BNP : Brain Natriuretic Peptide

CAD : Coronary Artery Disease

cGMP : cyclic Guanosine Monophosphate

EKG : Elektrokardiografi

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ERR : Estrogen Related Receptor

FADH : Flavin Adenina Dinukleotida tereduksi

GCA : Guanylin Cyclase type A

GERD : Gastro-Esophageal Reflux Disease

GSH : Glutathione

HF : Heart Failure

Hcy : Homocysteine

HHcy : Hyperhomocysteinemia

MeB12 : Metilkobalamin

MMA : Methylmalonic Acid

MMP : Matrix Metalloproteinases

mi-RNA : micro RNA

NADH : Nicotinamide Adenine Dinukleotida tereduksi

NHANES	: National Health and Nutrition Examination Survey
NPR	: Natriuretic Peptide Receptor
NRF	: Nuclear Respiratory Factor
NSAID	: Non- Steroidal Anti Inflammatory Drugs
NYHA	: New York Heart Association
OHO	: Obat Hiperglikemik Oral
OXPHOS	: Oxidative-Phosphorylation
PCr	: Phosphocreatine
PPAR γ	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
PGC-1 α	: PPAR- γ -coactivator-1 α
PPI	: Proton Pump Inhibitor
RISKESDAS	: Riset Kesehatan Dasar
ROS	: Reactive Oxygen Species
SAH	: S-Adenosyl Homocystein
SAM	: S-Adenosyl Methionine
SOD	: Super Oxyde Dismutase
TC	: Transcobalamin
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik

Lampiran 2. Bukti submit jurnal

Lampiran 3. ELISA kit instruction

Lampiran 4. Kandungan gizi pakan standar dan pakan modifikasi AIN-93M

Lampiran 5. Hasil analisis laboratorium pakan tikus

Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian

Lampiran 7. Artikel Penelitian

Lampiran 8. Riwayat Hidup

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di negara Asia, penyebab mortalitas dan morbiditas akibat gagal jantung masih cukup tinggi.⁽¹⁾ Gagal jantung/*Heart Failure* merupakan kondisi terminal penyakit kardiovaskuler yang berdampak pada penurunan kualitas hidup hingga kematian.⁽¹⁾ Gagal Jantung/*payah jantung (fungsi jantung lemah)* adalah ketidakmampuan jantung memompa darah dalam jumlah cukup ke seluruh tubuh yang ditandai dengan sesak napas pada saat beraktifitas dan/atau saat tidur terlentang tanpa bantal, dan/atau tungkai bawah membengkak.⁽²⁾ Dari data Riset Kesehatan Dasar/RISKESDAS tahun 2013, di seluruh Indonesia prevalensi penderita gagal jantung mencapai 0,13% atau sekitar 229.696 orang.⁽²⁾ Dalam studi ADHERE-AP (Asia-Pasifik), dilaporkan bahwa di Asia Tenggara, pasien kelompok usia penderita gagal jantung secara umum lebih muda dengan usia median sebagai berikut; Filipina (53 tahun), Indonesia (60 tahun), Malaysia (61 tahun), Thailand (67 tahun), dan Singapura (71 tahun).⁽¹⁾ Di Asia, penyebab gagal jantung terbanyak adalah: (1) penyakit arteri koronaria/*CAD* sekitar 40-50%, (2) penyakit jantung katup sekitar 20-35%, dan (3) kardiomiopati sekitar 15%.⁽¹⁾

Salah satu faktor risiko gagal jantung adalah ketidakseimbangan diet. Mekanisme molekuler yang mendasari bagaimana konstituen diet berkontribusi terhadap patogenesis gagal jantung/HF masih sangat sedikit diketahui, namun hal tersebut nampaknya melibatkan proses epigenetik. Epigenetik dapat didefinisikan sebagai perubahan pada ekspresi gen yang terjadi tanpa perubahan sekuen/*sequence* DNA.^(3,4) Proses epigenetik meliputi metilasi DNA, modifikasi kromatin (asetilasi dan metilasi *hystone*), dan *miRNA*. Selain itu, perubahan epigenomik juga berespon terhadap perubahan lingkungan seperti halnya perubahan status nutrisi.^(3,4) Faktor nutrisi/diet yang diperlukan untuk reaksi metilasi dinamakan nutrien metil/*methyl nutrients* dan dibutuhkan untuk pembentukan *S-adenosylmethionine/AdoMet* (SAM) yang merupakan kunci donor metil untuk sintesis DNA, RNA, protein dan fosfolipid.^(3,4)

Kobalamin/vitamin B12 merupakan jenis mikronutrien larut air dengan struktur yang paling kompleks di antara jenis vitamin lainnya.^(5,6) Vitamin B12 berikatan dengan protein pada makanan dan tersedia untuk absorpsi setelah dipecah dari protein pembawanya oleh asam hidroklorik yang dihasilkan mukosa lambung. Absorpsi kobalamin di usus bergantung pada ketersediaan faktor intrinsik yang dihasilkan sel parietal lambung.^(6,7) Vitamin B12 memainkan peranan yang penting dalam proses metabolisme.⁽⁶⁻⁸⁾ Struktur cincin *Corrin*-nya memungkinkan vitamin B12 berperan sebagai donor gugus metil dan kofaktor yang mengkatalis berbagai reaksi enzimatik dalam tubuh.^(6,7) Beberapa enzim utama yang terkait dengan vitamin B12 adalah *metionin sintase* dan *metilmalonil KoA mutase*. Metionin sintase mengkatalis perubahan homosistein menjadi metionin yang diperlukan pada sintesis DNA.⁽⁷⁾ Metilmalonil KoA mutase mengkatalis perubahan L-metilmalonil-KoA menjadi *Succinyl CoA* yang diperlukan dalam siklus asam sitrat/siklus asam trikarboksilat.⁽⁶⁻⁸⁾ Baik proses metilasi DNA maupun pembentukan substrat untuk siklus asam sitrat memainkan peranan penting dalam metabolisme energi mitokondria, tidak terkecuali pada kardiomyosit/sel otot jantung. Karena pentingnya vitamin B12 sebagai nutrien metil maka defisiensi vitamin B12 dapat mengganggu proses-proses tersebut dan berdampak sistemik pada homeostasis.

Prevalensi defisiensi vitamin B12 cukup tinggi (sekitar 20%) di negara berkembang terutama di Asia.⁽⁹⁾ Kelompok yang rentan mengalami defisiensi vitamin B12 antara lain: usia lanjut, ibu hamil dan menyusui serta anak-anak dan dewasa muda.⁽⁹⁾ Di Indonesia walaupun belum ada data pasti tentang prevalensi defisiensi vitamin B12, risiko defisiensi vitamin B12 masih cukup tinggi mengingat sebagian besar masyarakatnya masih berada pada tingkat sosio-ekonomi rendah/menengah ke bawah. Hal ini berkaitan dengan kemampuan masyarakat untuk mengkonsumsi daging dan bahan makanan hewani lainnya yang merupakan sumber utama vitamin B12. Selain itu, risiko defisiensi vitamin B12 juga tinggi pada orang-orang dengan gangguan lambung kronis yang menjalani terapi *proton pump inhibitor*/PPI dan pada orang-orang yang mengkonsumsi obat hiperglikemik oral/OHO jangka panjang (pasien DM kronis).^(10,11)

Kebiasaan mengkonsumsi minuman beralkohol/alkoholisme juga merupakan faktor risiko terjadinya defisiensi vitamin B12.⁽¹²⁾ Defisiensi vitamin

B12 menyebabkan peningkatan kadar homosistein/hiperhomosisteinemia. Kadar homosistein yang meningkat terkait dengan stress oksidatif, dislipidemia, proses pembentukan plak pembuluh darah/*atherogenesis*, penyakit arteri koroner/*CAD* serta gagal jantung.^(12,13) Suatu *systematic review* yang dilakukan oleh Pawlak menunjukkan adanya faktor risiko penyakit kardiovaskular berupa *CAD* pada kelompok vegetarian terkait dengan peningkatan kadar homosistein pada kelompok tersebut.⁽¹⁴⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Joseph et al menunjukkan hiperhomosisteinemia menyebabkan hipertrofi ventrikel patologis pada hewan coba.⁽¹⁵⁾ Shomal et al menggunakan hewan coba tikus yang diberi pakan defisien vitamin B12 selama 12 minggu untuk melihat pengaruh defisiensi kobalamin terhadap kondisi gagal jantung.⁽¹⁶⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Garcia et al menunjukkan peran vitamin B12 dalam pengaturan metabolisme energi sel melalui aktivitas protein *Peroxisome Proliferator Gamma Coactivator-1alpha* (*PGC-1α*).⁽¹⁷⁾ Protein *PGC-1α* merupakan koaktivator transkripsi gen yang berperan dalam pembentukan serta pematangan mitokondria dan pengaturan metabolisme energi mitokondria.⁽¹⁷⁾

Defisiensi vitamin B12 menyebabkan defisiensi donor metil sehingga mengakibatkan gangguan metilasi gen-gen yang berperan pada regulasi energi mitokondria dan disfungsi enzimatik substrat yang dipakai sebagai sumber energi utama pada jalur metabolisme energi. Perubahan metabolisme energi mitokondria dapat memengaruhi kinerja kardiomyosit. Perubahan kinerja kardiomyosit dapat menyebabkan perubahan struktur/morfologi. Ketidakseimbangan antara pembentukan energi dengan jumlah energi yang diperlukan oleh kardiomyosit dapat menyebabkan gangguan kontraksi otot jantung. Gangguan kontraksi otot jantung menyebabkan suatu keadaan *kardiomiopati* yang berujung pada gagal jantung/*Heart Failure*. Adanya proses patologis pada jantung tersebut dapat dideteksi dengan adanya perubahan pada biomarker fungsi otot jantung.⁽¹⁸⁾ Salah satu penanda biologis/biomarker fungsi jantung adalah peptida natriuretik/*natriuretic peptide*.^(18,19) Derivat peptida natriuretik yang sering dipakai dalam diagnosis gagal jantung adalah *BNP/Brain Natriuretic Peptide*.^(18,19) *BNP* disekresikan oleh otot ventrikel sebagai respon terhadap peningkatan tegangan pada dinding otot jantung akibat meningkatnya tekanan dan volume darah yang dipompa

oleh jantung. Peningkatan kadar BNP ditemukan pada *hypertrophic cardiomyopathy* dan *left ventricular hypertrophy*.⁽¹⁸⁾ Pada kondisi tersebut, kadar BNP menunjukkan adanya hubungan dengan indeks massa miokardium dan ketebalan dinding otot interventrikular dan posterior.^(18,19) Pemeriksaan BNP merupakan pemeriksaan baku emas/*gold standard* untuk kondisi gagal jantung karena dapat dideteksi serial pada berbagai tahapan gagal jantung sehingga dapat menggambarkan prognosis yang lebih dinamis.^(18,19) Pada tiap tahapan gagal jantung, peningkatan konsentrasi peptida natriuretik memiliki hubungan linear dengan prognosis penyakit yang lebih buruk.^(18,19)

Selain pemeriksaan kadar BNP untuk mendapatkan gambaran fungsi jantung, pemeriksaan EKG juga merupakan salah satu pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk mendapatkan gambaran aktivitas listrik jantung. Elektrokardiografi/EKG merupakan proses merekam aktivitas listrik jantung pada periode waktu tertentu menggunakan elektroda yang ditempatkan pada kulit.⁽²⁰⁾ Elektroda ini mendeteksi perubahan kecil arus listrik pada kulit yang berasal dari pola elektrofisiologi otot jantung berupa depolarisasi dan repolarisasi selama jantung berdenyut.⁽²⁰⁾ Pemeriksaan EKG ini merupakan pemeriksaan sederhana yang sering dilakukan untuk menunjang diagnosis dan bersifat non invasif serta dapat diaplikasikan pada semua pasien. Adanya proses patologis pada jantung dapat diinterpretasikan melalui bentuk gelombang, jarak/lebar antar gelombang, kecepatan maupun amplitudo tiap gelombang yang terekam dan tercetak pada elektrokardiograf.⁽²⁰⁾ EKG dapat dipergunakan untuk memperkirakan terjadinya hipertrofi jantung melalui gambaran: (1) pelebaran kompleks QRS (2) pemanjangan PR Interval dan (3) peningkatan amplitudo RS.⁽²¹⁾

Di Indonesia penelitian tentang pengaruh vitamin B12 terhadap fungsi jantung masih sangat sedikit terutama yang menilai tentang kadar plasma BNP dan evaluasi tingkat ekspresi protein *Peroxisome Proliferator Gamma Coactivator-1alpha* (PGC-1). Sehingga penelitian ini diperlukan untuk memberikan gambaran mengenai pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap risiko terjadinya gagal jantung melalui tinjauan fungsi metabolisme energi jantung. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung yang meneliti tentang efek defisiensi vitamin B12 terhadap fungsi organ jantung, hati dan ginjal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan, morbiditas dan mortalitas akibat gagal jantung masih cukup tinggi. Berbagai penelitian tentang defisiensi vitamin B12 masih berfokus pada peningkatan kadar homosistein dan korelasinya dengan stress oksidatif serta proses atherogenesis pada pembuluh darah namun penelitian tentang dampak defisiensi vitamin B12 terhadap perubahan metabolisme energi jantung masih sangat sedikit. Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, peneliti ingin mengetahui apakah terdapat hubungan antara defisiensi vitamin B12 terhadap penurunan fungsi jantung melalui gambaran perubahan aktivitas listrik jantung (rekam EKG) dan perubahan kadar protein BNP sebagai biomarker serta perubahan ekspresi PGC-1 α sebagai indikator metabolisme energi kardiomyosit.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah defisiensi vitamin B12 dapat memengaruhi gambaran EKG jantung tikus putih jantan?
2. Apa pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap morfologi jantung?
3. Apakah defisiensi vitamin B12 dapat memengaruhi tingkat ekspresi protein PGC-1 α dalam jantung tikus putih jantan?
4. Apakah defisiensi vitamin B12 dapat memengaruhi tingkat ekspresi protein BNP dalam darah tikus putih jantan?

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Defisiensi vitamin B12 menyebabkan perubahan gambaran EKG jantung tikus putih jantan berupa tanda-tanda pembesaran jantung.
2. Defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan rasio berat jantung terhadap berat badan dan peningkatan tebal miokardium.
3. Defisiensi vitamin B12 menyebabkan penurunan ekspresi protein PGC-1 α dalam jantung tikus putih jantan.
4. Defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan kadar protein BNP dalam darah tikus putih jantan.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap gambaran EKG dan protein marker fungsi otot jantung tikus putih *Sprague-Dawley* jantan usia dewasa muda/remaja.

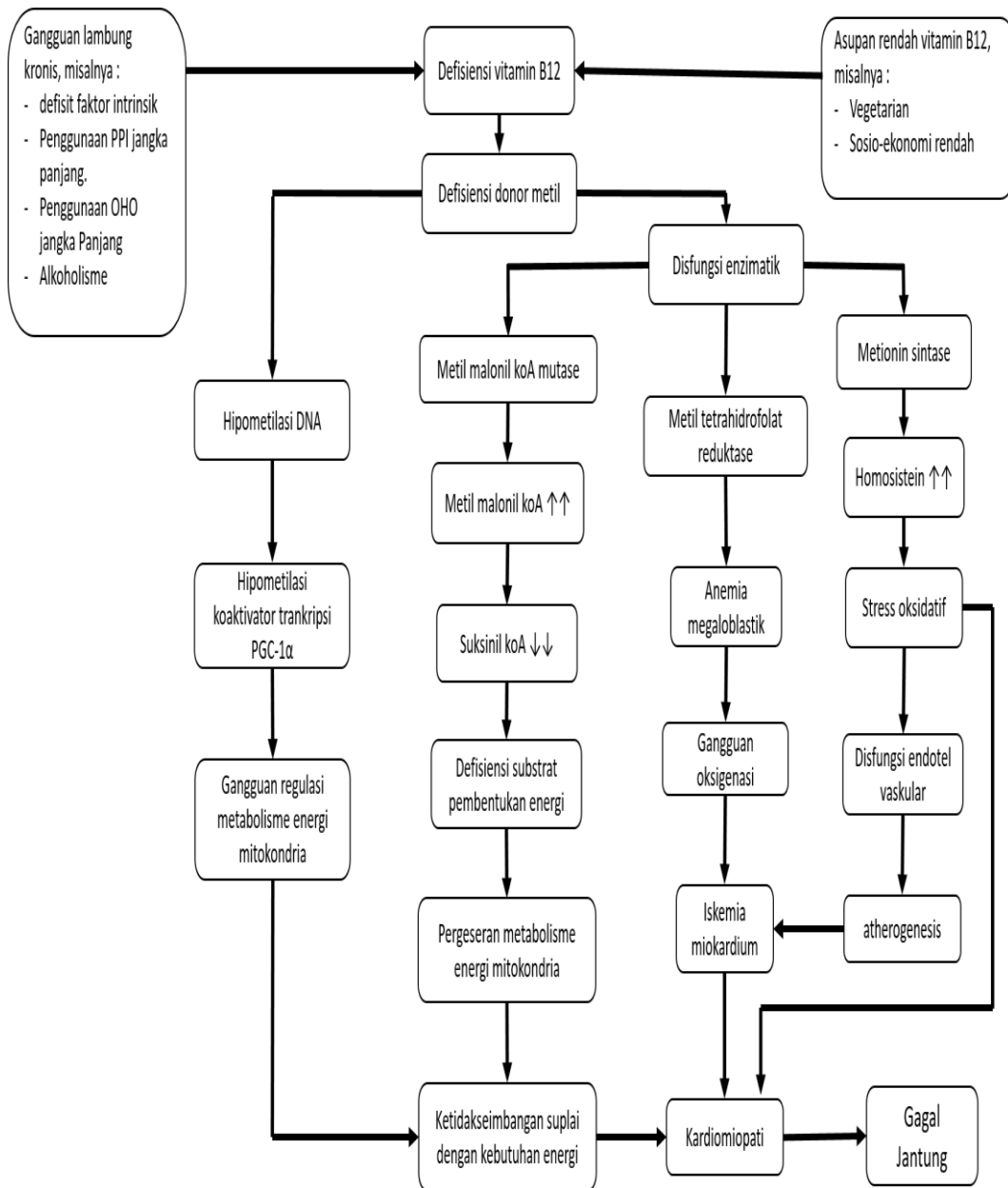
1.5.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap gambaran EKG jantung tikus putih jantan.
2. Menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap rasio berat jantung terhadap berat badan dan tebal miokardium.
3. Menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap ekspresi protein PGC-1 α dalam jantung tikus putih jantan.
4. Menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap kadar protein BNP dalam darah tikus putih jantan.

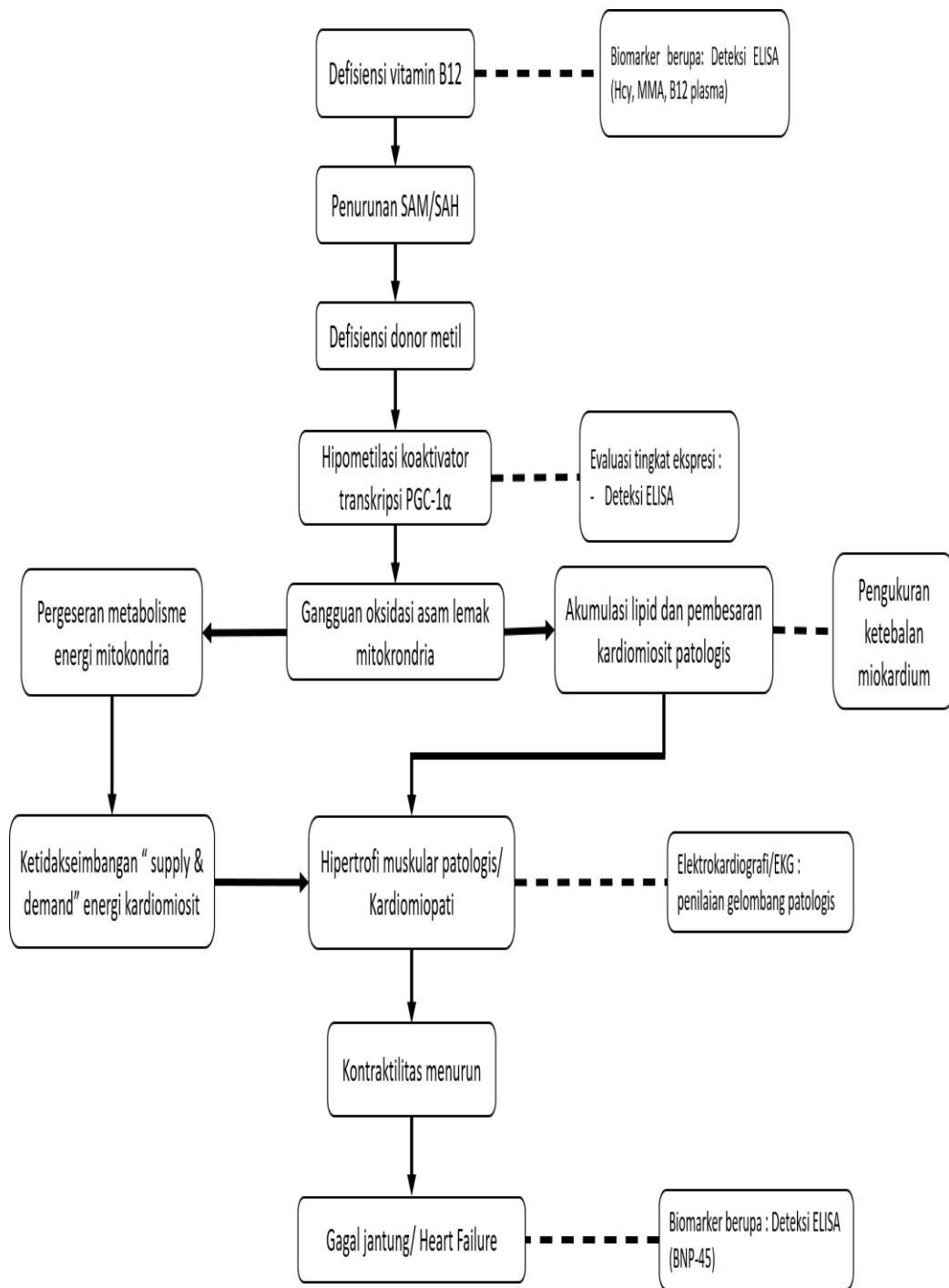
1.6 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap munculnya penurunan fungsi hingga menjadi keadaan gagal jantung, sehingga didapatkan mekanisme perjalanan penyakit yang lebih jelas dan dapat dilakukan langkah-langkah preventif untuk mencegah progresivitas penurunan fungsi tersebut.

1.7 Kerangka Teori



1.8 Kerangka Konsep



----- = yang dilakukan pemeriksaan

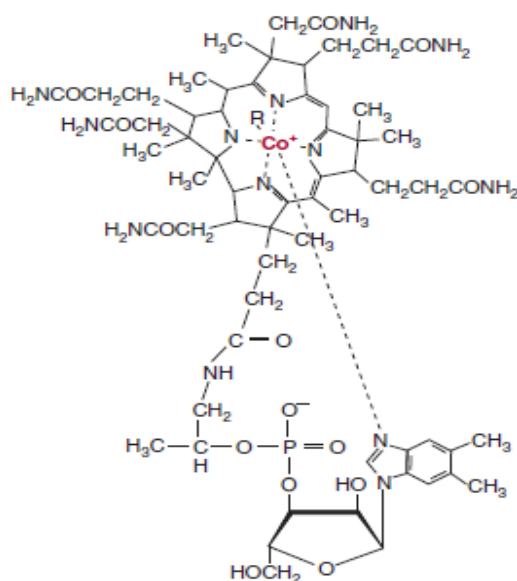
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vitamin B12/Kobalamin

2.1.1 Struktur Vitamin B12

Vitamin B12 atau lebih dikenal dengan nama kobalamin/*cobalamin* merupakan jenis mikronutrien yang larut dalam air.^(5,6) Kobalamin memiliki struktur kimia yang paling kompleks dibandingkan dengan vitamin lainnya. Struktur vitamin B12 didasarkan pada cincin *corrin* yang mirip dengan cincin *porphyrin* yang ditemukan pada *heme*, *chlorophyll*, dan *cytochrome*.^(6,7) Ion logam dibagian sentral berupa *cobalt*. Empat dari enam situs koordinasi disediakan oleh cincin *corin*, dan yang kelima disediakan oleh gugus *dimethylbenzimidazole*.^(6,7) Situs koordinasi keenam, pusat reaktivitas, merupakan variabel, dapat berupa gugus *cyano* (-CN), gugus *hydroxyl* (-OH), gugus *methyl* (-CH₃), atau gugus *5'-deoxyadenosyl* (atom C5' bentuk deoksiribosa membentuk ikatan kovalen dengan kobalt).⁽⁵⁻⁷⁾ Secara historis, ikatan kovalen C-Co merupakan salah satu contoh pertama ikatan carbon-logam yang ditemukan secara biologi. Enzim hydrogenase dan sesuai kebutuhannya, enzim yang terkait dengan penggunaan kobalt, melibatkan ikatan karbon dengan logam.^(6,7)



Gambar 2.1.1. Struktur kimia vitamin B12/Kobalamin.⁽⁵⁾

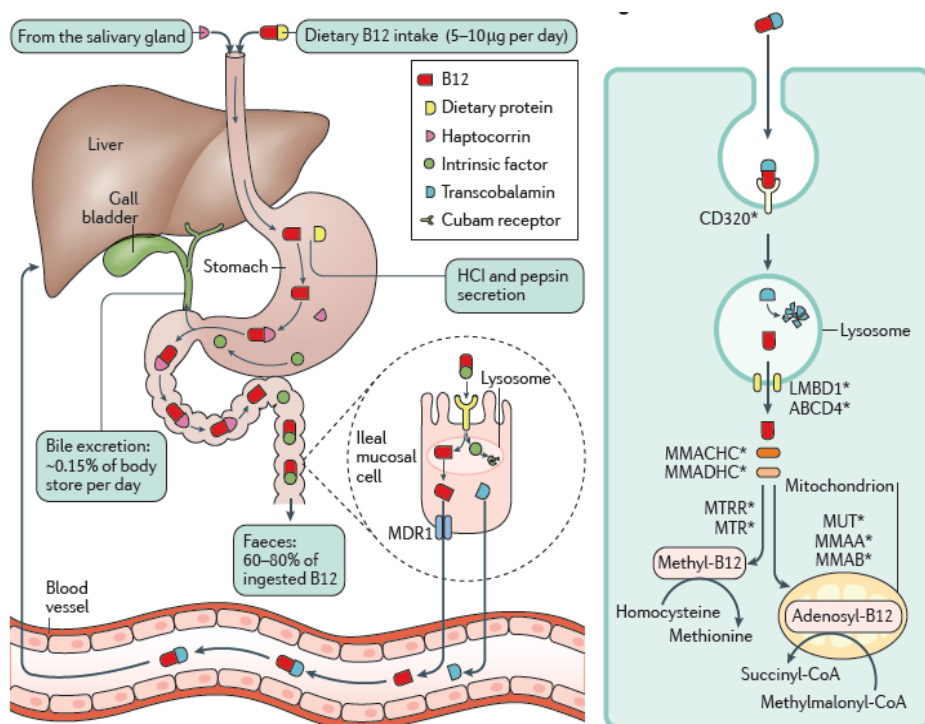
Keempat bentuk vitamin B12 berwarna kristal kemerahan saat dilarutkan dengan air, hal ini disebabkan warna yang dibentuk oleh kompleks ikatan kobalt-corrin. Beberapa bentuk vitamin B12 tersebut akan dijelaskan sebagai berikut:⁽⁶⁾

- Sianokobalamin/cyanocobalamin, bentuk ini normalnya tidak terdapat secara alami, namun merupakan produk sampingan bentuk lain B12 di mana terjadi penambahan gugus sianida (-CN) saat proses purifikasi oleh bakteri. Karena sianokobalamin merupakan bentuk yang mudah dikristalkan dan tidak sensitif terhadap oksidasi oleh udara, bentuk ini tipikal digunakan sebagai zat tambahan makanan dan berbagai jenis multivitamin. Sianokobalamin murni memiliki warna merah muda yang disebabkan oleh kompleks kobalt oktahedral dan kristal terbentuk sempurna dan sangat mudah bertambah ke ukuran milimeter.⁽⁶⁾
- Hidroksikobalamin/hydroxycobalamin, merupakan bentuk lain B12 yang sering terdapat dalam sediaan farmakologik, namun normalnya tidak terdapat dalam tubuh manusia. Bentuk B12 ini merupakan bentuk yang dihasilkan oleh bakteri dan dapat dikonversi menjadi sianokobalamin. Hidroksikobalamin memiliki afinitas yang tinggi terhadap ion sianida dan sering digunakan sebagai antidotum pada keracunan sianida. Hidroksikobalamin lebih mudah dikonversi menjadi bentuk enzim aktif B12 daripada sianokobalamin dan memiliki waktu retensi lebih panjang di dalam tubuh.^(6,7)
- Adenosilkobalamin (AdoB12) dan metilkobalamin (MeB12), merupakan bentuk kofaktor enzim aktif yang normalnya terdapat dalam tubuh. Sebagian besar cadangan dalam tubuh berupa adoB12 dalam hati. Bentuk ini dikonversi menjadi bentuk lain metilkobalamin ketika diperlukan.⁽⁶⁾ Bentuk adenosil dan metilkobalamin inilah yang paling banyak digunakan pada berbagai reaksi tingkat seluler dalam tubuh manusia.

2.1.2 Absorpsi dan metabolisme intra seluler Vitamin B12

Vitamin B12 terutama berasal dari bahan makanan hewani. Mengikuti asupan, kobalamin akan dilepaskan dari protein pembawanya dengan cara proteolisis dalam suasana asam di dalam lambung, di mana dia akan berikatan dengan *haptocorrin*.⁽²²⁾ Haptocorrin diproduksi oleh kelenjar saliva dan memproteksi vitamin B12 dari degradasi oleh asam lambung. Degradasi

haptocorrin dan perubahan pH pada duodenum memudahkan terjadinya ikatan antara vitamin B12 dengan *intrinsic factor*, yang diproduksi oleh sel parietal lambung.^(22,23) Komplek ikatan kobalamin-faktor intrinsik kemudian berikatan dengan reseptor *cubam* (yang terdiri dari *cubilin* dan *amnionless*). Reseptor ini memediasi ambilan kompleks faktor intrinsik-vitamin B12 oleh enterosit pada bagian distal ileum/terminal ileum melalui mekanisme *endocytosis* yang dimediasi reseptor. Perlu diketahui, di sini terdapat peran ion kalsium untuk mengaktifasi endositosis cubilin, dikenal dengan istilah *calcium-dependent endocytosis*. Setelah pelepasan *lysosomal*, B12 keluar melalui membran basolateral enterosit, difasilitasi oleh protein MDR-1/*multi drug resistance type 1* kemudian berikatan dengan *transcobalamin*, protein yang bertanggung jawab membawa vitamin B12 ke seluruh tubuh untuk metabolisme seluler.^(22,23) Ilustrasi absorpsi dan metabolisme intraseluler kobalamin dapat dilihat pada gambar 2.1.2.



Gambar 2.1.2. Absorpsi dan metabolisme intraseluler kobalamin.^(22,23)

Vitamin B12 masuk ke dalam sirkulasi sekitar 3-4 jam dan kemudian membentuk transkobalamin (TC). Vitamin B12 disekresi oleh empedu dan direabsorpsi melewati siklus enterohepatik oleh reseptor ileal yang memerlukan

faktor intrinsik, sehingga defisiensi vitamin B12 berkembang lebih cepat pada pasien anemia pernisiiosa dikarenakan kekurangan faktor intrinsik tersebut.⁽⁷⁾ Vitamin B12 diekskresikan melalui feses yang terdiri dari vitamin B12 bilier yang tidak diserap, sekresi dan sel gastrointestinal, dan vitamin B12 yang disintesis oleh bakteri di kolon.⁽²³⁾ Diperkirakan kehilangan vitamin B12 harian berada dalam proporsi yang seimbang dengan jumlah persediaan dalam tubuh sekitar 0,1% eksresi per hari. Kelebihan vitamin B12 dalam sirkulasi (misalnya pasca pemberian intravena) biasanya akan melebihi kapasitas pengikatan transkobalamin dan akan diekskresikan melalui urin.^(7,23)

Ambilan seluler vitamin B12 melibatkan reseptor CD230 yang terdapat pada berbagai tipe sel.^(22,23) Studi pada tikus yang di-*knocked out* pada gen CD230 menunjukkan adanya reseptor lain yang berperan dalam ambilan transkobalamin. Beberapa gangguan hereditas berkaitan dengan mutasi yang terjadi pada gen pengkode protein yang berperan dalam metabolisme B12 intraseluler, antara lain: 2 protein lisosomal *lysosomal cobalamin transporter/LMBD1* dan *lysosomal membrane transporter/ABCD4*; *methylmalonic aciduria* dan *homocystinuria type C protein* (MMACHC dan MMADHC), yang fungsinya belum diketahui pasti.⁽²³⁾ Ilustrasi dapat dilihat pada gambar 2.1.2.

2.1.3 Fungsi Vitamin B12

Peran metabolik vitamin B12/kobalamin pada sel eukariotik ditandai melalui dua jalur. Metilkobalamin/MethylCbl merupakan kofaktor *methionine synthase* di sitoplasma dan adenosilkobalamin/AdoCbl merupakan kofaktor *methylmalonyl coenzyme A mutase* di mitokondria. Kedua reaksi ini memainkan peran penting dalam metabolisme seluler.⁽⁸⁾ Metilmalonil koenzim A mutase merupakan langkah terakhir dalam degradasi oksidatif beberapa asam amino. Enzim tersebut memastikan konversi *methylmalonic acid* ke *succinyl co-enzyme A* yang akan masuk ke dalam siklus Krebs atau dikenal juga sebagai siklus asam sitrat/*TCA cycle* yang merupakan proses penting dalam metabolisme energi. Pada penurunan vitamin B12, aktivitas metilmalonil KoA mutase mengalami penurunan sehingga konsentrasi substratnya, metilmalonil Koa mengalami peningkatan dan membentuk asam metilmalonil/MMA yang akan diekskresikan ke dalam sirkulasi

intermediet biosintesis normal asam amino metioin (melalui reaksi demetilasi) dan sistein. Homosistein berada di plasma dalam empat bentuk yang berbeda: sekitar 1% bersirkulasi dalam bentuk thiol bebas, 70-80% tetap dalam bentuk disulfida yang berikatan dengan protein plasma terutama albumin dan 20-30% berikatan dengan sesamanya membentuk dimer atau bersama thiol lainnya.⁽²⁴⁾ Telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya bahwa homosistein merupakan kunci utama siklus metionin. Homosistein akan dimetilasi menjadi metionin, kemudian mengalami S-adenosilasi membentuk *S-adenosylmethionine*/SAM.⁽²⁴⁾ SAM merupakan donor metil yang utama untuk semua reaksi metilasi di dalam sel.^(23,24) Kondensasi metionin dengan ATP memicu pembentukan SAM. Gugus metil akan berikatan dengan sulphur tersier SAM dapat ditransfer untuk kemudian berpindah-pindah dan menyebabkan metilasi substrat yang lain.⁽²⁴⁾ Proses metilasi ini berbarengan dengan hilangnya energi maka reaksi ini bersifat ireversibel. Reaksi demetilasi memicu pembentukan *S-adenosylhomocysteine*/SAH. SAH merupakan thioether (senyawa sulfur yang berikatan pada dua gugus alkyl atau aryl) analog dengan metionin. Rasio SAM berbanding SAH menggambarkan potensial metilasi dari suatu sel. Hidrolisis SAH memicu pembentukan homosistein dan adenosin.⁽²⁴⁾ Homosistein ini dapat digunakan pada satu atau dua keadaan sebagai berikut: 1) saat terjadi defisiensi metionin, homosistein dapat diremetilasi untuk membentuk metionin. Enzim yang berperan pada reaksi tersebut adalah *N5,N10-methylenetetrahydrofolate reductase*, 2) saat kondisi metionin mencukupi, homosistein dapat dipakai juga untuk membentuk sistein. Reaksi tersebut diperantarai oleh *cystathionine-β-synthase* dan membutuhkan vitamin B6/pyridoxine sebagai kofaktor esensial. Homosistein disintesis dari asam amino esensial metionin, karena itu sistein bukan asam amino esensial selama metionin tersedia dalam jumlah yang cukup.⁽²⁴⁾

Selain pembentukan SAM untuk keperluan metilasi intraseluler, metabolisme metionin di hati juga menghasilkan antioksidan natural berupa *glutathione*/GSH melalui jalur transulfurasi.⁽²⁵⁾ Glutathione memiliki peran yang sangat penting untuk menetralkan berbagai reaksi metabolik yang menghasilkan komponen oksidatif radikal yang berpotensi merusak sel. Beberapa studi dalam dekade terakhir menunjukkan, kekurangan/defisiensi vitamin B12 menyebabkan

peningkatan risiko terjadinya stress oksidatif dikarenakan berkurangnya antioksidan fungsional dalam hal ini glutathion yang dihasilkan dari metabolisme metionin.⁽²⁵⁾

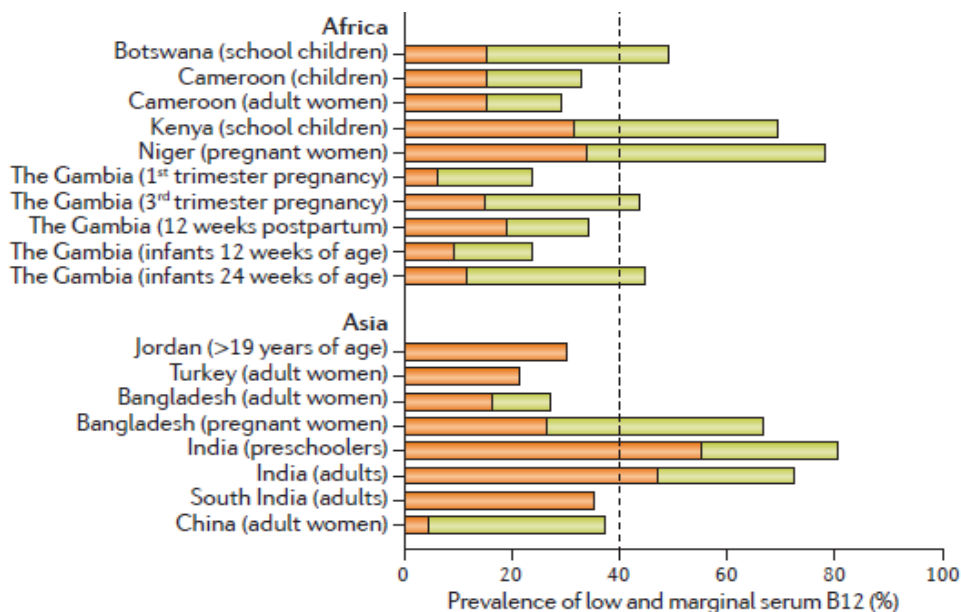
2.1.4 Defisiensi Vitamin B12

Defisiensi kobalamin pertama kali ditemukan pada 1849, dan diperkirakan memiliki luaran yang fatal hingga 1926 ketika diet hati, memiliki kadar vitamin B12 yang tinggi, digunakan untuk menghambat progresivitas penyakit.⁽⁷⁾ Defisiensi vitamin B12 merupakan salah satu defisiensi vitamin tersering di seluruh dunia dan dapat menyebabkan permasalahan kesehatan masyarakat secara umum, namun insiden dan prevalensinya tidak dapat diketahui secara pasti.⁽²⁶⁾ Hal yang mendasari kondisi tersebut adalah perbedaan etnis dan sosiokultural antar individu serta kelompok dan kebiasaan diet mereka.⁽²⁶⁾ Defisiensi vitamin B12 disebabkan oleh berbagai macam kondisi mulai dari gangguan metabolik terkait nutrisi hingga ke defek genetik.⁽²⁶⁾ Pola diet tertentu juga rentan terhadap defisiensi vitamin B12 misalnya vegetarian atau vegan.^(14,26)

Data komprehensif tentang defisiensi vitamin B12 didapat dari kajian yang dilakukan di Afrika, Amerika, Asia Tenggara, Eropa, Timur Tengah dan Pasifik pada 2008.⁽²⁶⁾ Untuk mengetahui status vitamin B12, dapat dilihat dari kadar B12 plasma (pmol/liter) maupun biomarker lainnya yakni Hcy/*Homocysteine* dan MMA/*methyl malonic acid*.⁽²²⁾ Menurut NHANES/*National Health and Nutrition Examination Survey*, terdapat 2 kategori status vitamin B12 yakni rendah/low (<148 pmol/liter) dan marginal (148-221 pmol/liter).⁽²²⁾ Status vitamin B12 di Amerika Serikat menurut data NHANES dari 1999 hingga 2004 mencatat prevalensi vitamin B12 berkategori rendah/low berkisar antara 2.9%, 10.6%, dan 25.7% berdasarkan nilai batas <148, <200, dan <256 pmol per liter.^{y1} Dari data tersebut, prevalensi status B12 rendah meningkat pada rentang usia dewasa muda/*young adults* (usia 19-39 tahun) hingga dewasa tua (>60tahun), dan secara umum prevalensinya juga lebih tinggi pada perempuan dibandingkan pada laki-laki (3.3% berbanding 2.4% dengan kadar B12 serum <148pmol per liter).⁽²²⁾ Berbagai studi di luar Amerika Serikat menunjukkan prevalensi status rendah B12 (<148pmol per liter) dan defisiensi marginal (148-221 pmol per liter) menunjukkan angka jauh lebih tinggi

terutama di Amerika Selatan, Afrika dan Asia (Gambar 2.1.4).^(22,26) Prevalensi status rendah B12 tidak terbatas pada usia dewasa tua saja tapi pada beberapa negara melampaui >40% pada berbagai subpopulasi (anak-anak, dewasa muda, ibu hamil dan menyusui).^(9,22,26)

Di Indonesia sampai saat ini belum ada data pasti defisiensi vitamin B12 pada berbagai kelompok umur dan populasi di setiap daerah. Meskipun tidak ada data yang pasti, risiko defisiensi vitamin B12 masih cukup tinggi mengingat sebagian besar penduduk masih dalam tingkat sosio-ekonomi rendah/menengah ke bawah. Hal ini terkait dengan kemampuan masyarakat untuk mengakses bahan makanan hewani (daging, susu dan telur) serta suplementasi nutrisi yang menjadi sumber vitamin B12.



Gambar 2.1.4. Prevalensi status rendah dan marginal vitamin B12 di Asia dan Afrika.⁽²²⁾

Defisiensi vitamin B12 berkaitan erat dengan serangkaian mekanisme patofisiologi yang dapat terjadi mulai periode neonatal, masa anak-anak, remaja dan dewasa.⁽²²⁾ Keseluruhannya dapat memengaruhi suplai vitamin B12, tingkat kebutuhan vitamin B12 maupun kedua-duanya.^(22,23) Defisiensi seluler terhadap vitamin B12 disebabkan oleh asupan inadekuat, malabsorpsi, inaktivasi kimiawi atau gangguan genetik yang diwariskan baik transpor B12 dalam darah maupun

metabolisme intraseluler.^(22,23) Berbagai penyebab defisiensi vitamin B12 dirangkum lebih lanjut pada tabel 2.1.4.

Tabel 2.1.4. Berbagai kondisi yang menyebabkan defisiensi vitamin B12 dan patogenesis yang mendasarinya.⁽²²⁾

No	Kondisi yang menyebabkan defisiensi vitamin B12 dan korelasi patogenesis yang mendasari
1.	Anemia perniosa : penurunan absorpsi B12 yang disebabkan oleh defisiensi faktor intrinsik lambung (biasa ditemukan pada gangguan yang bersifat autoimun).
2.	Penyakit lambung atau pembedahan (gastrektomi parsial maupun lengkap atau pembedahan volume lambung); yang menyebabkan defisiensi faktor intrinsik.
3.	Gastritis atrofi kronik (inflamasi kronik yang menyebabkan hilangnya sel-sel yang memproduksi asam lambung) dan penggunaan obat-obatan yang mempengaruhi sekresi asam lambung atau pH lambung (misalkan, <i>proton pump inhibitor</i> , <i>histamine receptor 2 antagonist</i> dan <i>antacids</i>); B12 tidak dapat dilepaskan dari komponen makanannya pada kondisi asam lambung dan aktivitas pepsin yang rendah.
4.	Penyakit pankreas atau pankreatektomi: B12 tidak dapat dilepaskan dari kompleks <i>haptocorrin</i> pada kondisi penurunan aktivitas enzim pankreas.
5.	Penyakit intestinal lainnya, reseksi ileal, infestasi parasitik, dan pertumbuhan berlebihan bakteri : menyebabkan gangguan absorpsi B12-kompleks faktor intrinsik.
6.	Obat-obatan yang mempengaruhi absorpsi dan metabolisme B12: penurunan kadar B12 serum melalui mekanisme yang belum diketahui pasti (sebagai contoh, <i>cholestyramine</i> dan <i>metformin</i>)
7.	Faktor diet seperti malnutrisi, diet vegetarian atau vegan, dan alkoholisme kronik akan berujung pada penurunan konsumsi B12.
8.	Gangguan hereditas: penurunan ekspresi, penurunan afinitas ikatan reseptor dan protein yang terlibat dalam jalur metabolisme B12.
9.	Penyebab lainnya: termasuk infeksi HIV dan penggunaan anestesia nitro-oksida.

Secara umum, konsentrasi vitamin B12 mengalami penurunan seiring bertambahnya usia sehingga prevalensi defisiensi kobalamin/vitamin B12 akan meningkat seiring dengan penuaan. Pada studi kohort *Framingham*, prevalensi defisiensi kobalamin diperkirakan antara 12% dan 20% dari populasi dewasa secara umum. Beberapa peneliti melaporkan prevalensinya mencapai 40% pada pasien lansia.⁽²⁷⁾ Studi lainnya menunjukkan prevalensi defisiensi vitamin B12 pada kelompok usia lanjut berkisar diantara 5% sampai 40% tergantung kepada definisi defisiensi vitamin B12 yang dijadikan acuan.⁽²⁸⁾ Yang paling sering dipakai sebagai acuan adalah kadar B12 serum/plasma dengan nilai patokan telah terjadi defisiensi B12 adalah sebesar 150 pmol/L atau sekitar 203 pg/ml. Dengan memakai standar tersebut, prevalensi defisiensi vitamin B12 diperkirakan berada pada rentang 5% sampai 10%.⁽²⁹⁾

Sebagaimana telah diketahui, kelompok usia lanjut berisiko mengalami defisiensi vitamin B12. Penyebab utamanya dapat dibagi menjadi dua kategori yakni: asupan diet inadekuat dan gangguan absorpsi vitamin B12. Di negara berkembang, penyebab utama defisiensi vitamin B12 pada lansia adalah asupan yang inadekuat. Namun, studi menunjukkan hal yang sedikit berbeda dari kenyataan. Suatu studi di Perancis menunjukkan sebanyak 172 pasien usia lanjut yang mengalami defisiensi vitamin B12, hanya sekitar 2% yang diketahui memiliki asupan inadekuat, sementara itu sebuah studi berbasis rumah sakit di China, dari sekitar 52 pasien hanya 3.8% (usia median 73.5 tahun) menderita anemia megaloblastik (98%nya mengalami defisiensi vitamin B12) yang memiliki riwayat asupan inadekuat.⁽²⁸⁾ Meskipun begitu hal ini dapat menjadi permasalahan yang serius pada kelompok diet ketat vegetarian karena hanya bahan makanan hewani yang menjadi sumber vitamin B12. Secara normal 2 sampai 3 mg vitamin B12 disimpan di hati dan kebutuhan harian kobalamin hanya berkisar antara 2 sampai 3µg per harinya. Sehingga meskipun dalam kebiasaan diet vegan, defisiensi secara umum terjadi dalam waktu beberapa tahun.⁽²⁹⁾ Seringkali defisiensi vitamin B12 terjadi pada lansia yang mengonsumsi daging dan protein hewani lainnya, hal ini disebabkan oleh malabsorpsi. Telah diketahui sebelumnya bahwa vitamin B12 dari sumber makanan hewani berikatan dengan protein dan setelah proses pencernaan awal akan dipecah oleh lambung melalui pepsin dan asam hidroklorida untuk

menjadi molekul vitamin B12 bebas. Gastritis atrofik merupakan salah satu penyebab malabsorpsi kobalamin pada lansia. Di dalam lambung, kondisi hipoklorhidria berkaitan dengan gastritis atropik yang berpengaruh pada pelepasan vitamin B12 dari makanan dan menyebabkan pertumbuhan berlebihan bakteri intestinal sehingga menimbulkan kompetisi ambilan vitamin B12 yang berujung pada menurunnya kadar vitamin B12 dalam tubuh. Infeksi kronik *Helicobacter pylori* juga sering terjadi pada lansia dan hal ini terkait juga dengan gastritis atrofik. Studi menunjukkan pada 56% pasien yang mengalami defisiensi vitamin B12, hasil kultur dari sediaan biopsi lambung menunjukkan jumlah koloni *H.pylori* yang meningkat dari kondisi normal.⁽²⁹⁾

Telah disinggung pada bagian sebelumnya bahwa diet vegetarian memerlukan periode waktu untuk menimbulkan defisiensi vitamin B12. Suatu perspektif yang berbeda muncul dalam penelitian yang dilakukan oleh Pawlak et al.⁽³⁰⁾ Penelitian tersebut merupakan suatu meta-analisis dan studi kohort tentang prevalensi defisiensi vitamin B12 pada populasi dengan karakteristik diet vegetarian dan vegan di berbagai negara. Hasil dari berbagai studi tersebut sangat bervariasi. Beberapa studi melaporkan prevalensi yang rendah bahkan tidak ada defisiensi sama sekali, sementara itu pada studi yang lain melaporkan prevalensi defisiensi kobalamin yang tinggi sekitar 45% pada bayi hingga balita sampai 86% pada dewasa.⁽³⁰⁾ Pawlak et al juga menemukan defisiensi kobalamin berada pada rentang 25-86% usia anak-anak, 21-41% usia remaja, 11-90% lansia, dan 62% pada wanita hamil.^(14,30) Pada berbagai studi tersebut ditemukan bahwa tingkat defisiensi yang terjadi bergantung pada tipe diet vegetarian yang diikuti selain juga faktor lainnya seperti etnis dan lokasi geografis.⁽³⁰⁾ Diet vegetarian tipe ketat/*strict vegan* yang tidak mengonsumsi sumber makanan hewani dan tanpa fortifikasi/suplementasi B12 memiliki prevalensi defisiensi yang tinggi. Sementara itu, diet vegetarian yang lebih moderat memiliki prevalensi defisiensi yang sedikit lebih rendah dibandingkan *strict vegan*.⁽³⁰⁾ Hal ini dikarenakan diet moderat masih mengonsumsi sumber makanan hewani walaupun dalam jumlah yang sedikit dan umumnya masih mendapatkan fortifikasi/suplementasi vitamin B12. Fakta yang cukup unik ditemukan pada *systematic review* yang dilakukan juga oleh Pawlak et al yang menunjukkan adanya faktor risiko penyakit kardiovaskular berupa penyakit

arteri koroner/*CAD* pada kelompok vegetarian terkait dengan peningkatan kadar homosistein pada kelompok tersebut.⁽¹⁴⁾

Prevalensi defisiensi kobalamin pada wanita hamil berbeda-beda dan tergantung pada trimester kehamilannya. Meskipun kadar serum vitamin B12 mengindikasikan adanya defisiensi pada trimester ke-3 lebih rendah bila dibandingkan dengan trimester ke-1 dan 2 ($< 100\text{pmol/L}$, dibandingkan $<120\text{pmol/L}$ dan $<130\text{pmol/L}$), wanita hamil pada trimester ke-3 ternyata memiliki prevalensi defisiensi kobalamin yang tinggi (39% vs 33% dan 17% untuk trimester ke-1 dan 2).^(9,30) Walaupun penurunan kadar vitamin B12 serum pada kehamilan dapat dijelaskan sebagian karena adanya fenomena penambahan volume/hemodilusi, namun pada wanita hamil trimester ke-3 bukan itu mekanisme yang mendasarinya. Volume darah akan mencapai maksimal pada usia gestasi 34-36 minggu dan menetap hingga menjelang persalinan. Defisiensi kobalamin yang tinggi pada kehamilan trimester ke-3 lebih mengindikasikan pada berkurangnya cadangan vitamin B12 daripada penambahan volume darah.^(9,30) Status rendah vitamin B12 pada wanita hamil vegetarian/vegan dapat menyebabkan status defisiensi kobalamin pada bayi. Defisiensi tersebut sering berasosiasi dengan beberapa gejala, termasuk gagal tumbuh, ketidakmampuan menerima asupan makanan padat, dan keterlambatan tumbuh kembang. Hal inilah yang menyebabkan mengapa wanita hamil harus mendapat fortifikasi dan suplementasi B12 dalam jumlah yang mencukupi.^(9,30)

Beberapa kebiasaan seperti konsumsi minuman beralkohol juga dapat menyebabkan defisiensi vitamin B12. Kebiasaan mengonsumsi minuman beralkohol dalam jumlah dan frekuensi yang cenderung meningkat dikenal sebagai alkoholisme. Beberapa studi terkini menunjukkan bahwa alkoholisme kronik berkaitan erat dengan insiden perlemakan hati alkoholik atau yang lebih dikenal sebagai *Alcoholic Liver Disease/ALD*. Alkoholisme kronik memiliki prevalensi hampir 10% dari total populasi di Amerika Serikat, dan sekitar 8% di antaranya berkembang menjadi komplikasi ALD yang termasuk 10 peringkat mortalitas utama di Amerika Serikat.^(12,25) Selama beberapa dekade ALD telah dikaitkan sebagai salah satu penyakit akibat penyalahgunaan alkohol, namun saat ini terdapat banyak sekali bukti yang menunjukkan defisiensi nutrisi multipel pada

gangguan klinis ini, malnutrisi kalori-protein dan defisiensi berbagai vitamin seperti: folat, vitamin B6 dan vitamin B12.^(12,25) Penelitian yang dilakukan oleh Charles et al menunjukkan bahwa paparan alkohol dalam jangka panjang menyebabkan perubahan fungsi metabolisme hati. Patogenesis konvensional ALD yang telah dipahami selama bertahun-tahun adalah ethanol menginduksi translokasi enterotoksin LPS dari intestinal ke hati, yang akan menstimulasi pelepasan sitokin inflamasi terutama TNF- α yang berasal dari makrofag terspesialisasi di jaringan hati, sel Kupffer.⁽²⁵⁾ Sel tersebut memfasilitasi jalur kerusakan hepatosit yang diinduksi oleh etanol. Jalur yang termasuk di dalamnya termasuk sitokrom P4502E1 yang sama-sama memetabolisme ethanol dan menghasilkan *Reactive Oxygen Species*/ROS yang menyebabkan inflamasi jaringan hati dan nekrosis hepatosit.^(25,31) Respon oksidatif metabolisme ethanol secara seimbang akan dilawan oleh antioksidan dasar yakni *gluthation*/GSH. GSH dihasilkan dari serangkaian metabolisme asam amino metionin. Baik pada studi klinis maupun studi pada hewan coba menunjukkan efek yang berbeda pada paparan alkohol kronik terhadap enzim regulator yang berperan dalam metabolisme metionin yang menghasilkan peningkatan homosistein serta SAH dan penurunan SAM serta antioksidan GSH.^(25,31) Kadar vitamin B12 akan menurun pada hati yang mengalami ALD meskipun kadar serum normal atau meningkat yang disebabkan karena menurunnya kemampuan ambilan dan berkurangnya kapasitas untuk mencadangkan akibat proses peradangan kronis yang berlangsung lama dan kerusakan hepatosit yang luas.^(25,31)

Beberapa jenis obat dapat memengaruhi absorpsi maupun metabolisme vitamin B12, antara lain *proton pump inhibitor*/PPI, metformin, anestesi nitro oksida, beberapa obat epileptik dan kolkisin.⁽⁷⁾ Medikasi PPI sering digunakan untuk terapi *gastro-oesophageal reflux disease*/GERD pada lansia maupun dewasa.^(7,10,23) Penghambat pompa proton/PPI juga sering digunakan pada pasien dengan riwayat pemakaian NSAID/*Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs*, penyakit Barret's esofagus dan gangguan hipersekresi asam lambung lainnya seperti sindroma Zollinger-Ellison.⁽²³⁾ PPI bekerja sebagai penghambat pompa proton di sel parietal lambung sehingga mengurangi sekresi asam lambung dan pepsin sehingga menyebabkan suatu keadaan yang dinamakan *hypochlorhydria*.^(7,10,23,28)

Secara teoretik hal ini dapat menyebabkan penurunan absorpsi vitamin B12 yang berikatan pada protein makanan/protein-bound.^(10,23,28) Pada beberapa studi, penggunaan PPI jangka panjang harus disertai juga dengan suplementasi vitamin B12 yang cukup.⁽²³⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Jameson et al menunjukkan terdapat defisiensi vitamin B12 pada pasien yang mengkonsumsi PPI selama 2 tahun dibandingkan pasien yang tidak mengkonsumsinya (OR, 1.65[95% CI, 1.58-1.73]).⁽²⁸⁾ Selain penggunaan PPI, pemakaian obat anti reseptor histamin type 2/*antagonist H2* juga berkontribusi dalam penurunan absorpsi vitamin B12. Defisiensi vitamin B12 juga ditemukan pada pasien-pasien gangguan lambung yang menggunakan terapi anti reseptor histamin tipe-2 selama 2 tahun/H₂RA (OR, 1.25[95% CI, 1.17-1.34]).⁽²⁸⁾

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang bersifat kronis dengan prevalensi yang terus meningkat selama beberapa dekade terakhir. Berdasarkan data dari *International Federation of Diabetes*, diabetes melitus tipe 2 merupakan bentuk yang paling sering ditemui dan diderita oleh hampir 382 juta individu di seluruh dunia dan diprediksi akan meningkat sampai 35% pada tahun 2035.⁽³²⁾ Metformin merupakan obat hiperglikemik oral/OHO golongan biguanid yang biasa digunakan untuk terapi non-insulin dependent diabetes melitus.^(7,11,32) Efektivitas, tingkat keamanan, dan berbagai keuntungan metabolik maupun kardiovaskular dari metformin telah menempatkan obat hiperglikemik oral ini sebagai terapi lini pertama untuk pengobatan diabetes melitus tipe 2.^(11,32) Efek samping metformin yang sering dilaporkan adalah rasa tidak nyaman pada gastrointestinal bersamaan dengan reaksi lainnya yang non signifikan. Suatu studi menunjukkan prevalensi defisiensi vitamin B12 pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang mendapat terapi metformin berada pada kisaran 5.8% hingga 33%.⁽³²⁾ Suatu meta-analisis dan review sistematis oleh Niafar et al, sebanyak 29 studi telah dilakukan dengan total sekitar 8.015 pasien berfokus pada defisiensi vitamin B12 pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang mendapat terapi metformin.⁽³²⁾ Luaran primer menunjukkan terjadi peningkatan prevalensi defisiensi vitamin B12 pada kelompok yang mendapat metformin, dan luaran sekunder menunjukkan penurunan kadar serum vitamin B12 juga pada kelompok yang sama.⁽³²⁾ Metformin diketahui dapat menyebabkan perubahan motilitas intestinal maupun pertumbuhan berlebihan

bakteri yang berkompetisi untuk vitamin B12 di traktus gastrointestinal.^(7,11,32) Penelitian Ko S-H et al menunjukkan penggunaan metformin jangka panjang merupakan faktor risiko yang konsisten untuk defisiensi vitamin B12 sehingga pasien yang rutin mendapat terapi metformin dianjurkan untuk rutin melakukan skrining vitamin B12, terutama yang mendapat metformin dosis tinggi (dosis >1000mg dan pemberian selama ≥ 4 tahun).⁽¹¹⁾ Beberapa studi lainnya juga dilakukan untuk melihat sejauh mana pengaruh durasi terapi dan jumlah dosis pemberian metformin dengan defisiensi vitamin B12. Penelitian Joline et al mengobservasi 550 pasien diabetes melitus tipe 2 yang diberikan terapi metformin. Penanda defisiensi kobalamin yang digunakan adalah kadar serum kobalamin dan holotranskobalamin.⁽³³⁾ Pada studi tersebut ditemukan prevalensi defisiensi kobalamin sebesar 28.1% (penanda serum kobalamin) dan sebesar 3.9% (penanda holotranskobalamin).⁽³³⁾ Sekitar 15 pasien (3.9%) mengalami defisiensi dengan kedua penanda tersebut. Baik dosis kumulatif maupun dosis rata-rata harian metformin berhubungan secara signifikan dengan konsentrasi kobalamin total.⁽³³⁾ Durasi penggunaan metformin tidak memiliki kaitan dengan konsentrasi kobalamin maupun holotranskobalamin.

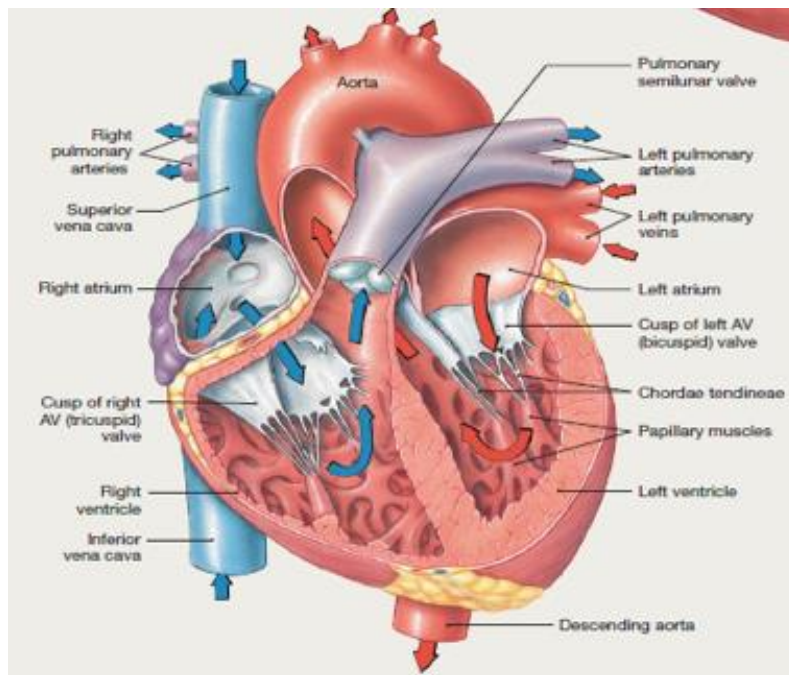
Gas anestetik nitro oksida berperan menginaktivasi vitamin B12 secara kimiawi melalui oksidasi ireversibel bentuk koenzim, metilkobalamin, pada situs aktif reaksi metionin sintase yang bergantung pada vitamin B12.^(7,22) Namun karena penggunaan obat anestetik ini berdurasi singkat maka efek yang muncul tidak signifikan untuk membuat defisiensi vitamin B12 yang berdampak sistemik.

2.2 Metabolisme energi pada otot jantung

2.2.1 Fungsi Jantung sebagai “pompa”

Manusia merupakan organisme kompleks yang mempertahankan homeostasis. Salah satu sistem yang berperan mempertahankan homeostasis adalah sistem kardiovaskular. Secara sederhana, sistem kardiovaskular adalah serangkaian pipa (pembuluh darah) berisi cairan (darah) dan dihubungkan dengan pompa (jantung).^(34,35) Tekanan yang dihipunkan jantung akan mendorong darah melalui sistem tersebut secara terus menerus.⁽³⁵⁾

Fungsi utama sistem kardiovaskular adalah transpor materi dari dan menuju ke seluruh bagian tubuh. Substansi yang ditranspor dapat dibagi menjadi (1) nutrien, air dan gas yang masuk ke dalam tubuh dari lingkungan luar, (2) materi yang bergerak dari satu sel ke sel lain di dalam tubuh, dan (3) sisa metabolisme yang dikeluarkan dari sel.^(34,35)



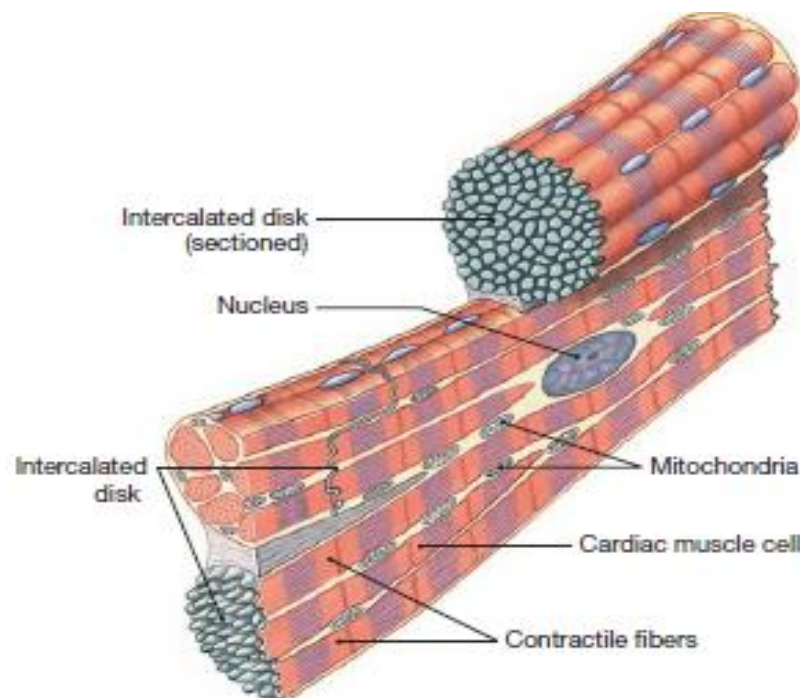
Gambar 2.2.1. Struktur jantung manusia.⁽³⁵⁾

Jantung merupakan organ Muskular, dengan ukuran kira-kira sebesar satu kepalan tangan. Jantung terletak di dalam rongga toraks dan terbagi atas dua bagian utama yaitu (1) apeks dan (2) basis.^(34,35) Jantung dibungkus oleh suatu membran yang dinamakan perikardium. Lapisan tipis di dalam perikardium berisikan cairan jernih yang berfungsi melumasi lapisan terluar jantung saat berdenyut di dalam rongga perikardium. Jantung sendiri tersusun atas sebagian besar otot/miokardium, dilapisi oleh selapis epitel pada lapisan luar dan jaringan penyokong pada lapisan dalam. Tampilan luarnya, bagian terbesar ada di sisi bawah (apeks) dengan lapisan otot yang lebih tebal yakni ventrikel kanan dan ventrikel kiri, bagian yang lebih tipis terletak di atas kedua ventrikel yaitu atrium kanan dan atrium kiri.^(34,35)

Darah mengalir melewati jantung berjalan searah, hal ini dijaga oleh dua pasang katup jantung yakni sepasang katup atrioventrikular (menghubungkan

ventrikel dengan atrium) dan katup semilunaris (menghubungkan ventrikel dengan pembuluh darah arteri).^(34,35) Meskipun kedua katup ini memiliki struktur yang berbeda, namun memiliki fungsi yang sama yakni mencegah darah mengalir berbalik arah.⁽³⁴⁾

Sebagian besar otot jantung bersifat kontraktile (mampu melakukan kontraksi secara mandiri), namun sekitar 1% sel miokardium terspesialisasi untuk menghasilkan potensial aksi secara spontan. Tipe sel ini dikenal sebagai sel autoritmik/*pacemaker cell*. Sel autoritmik memiliki struktur yang berbeda dengan sel kontraktile, ukuran sel autoritmik lebih kecil dan memiliki serabut kontraktile yang jauh lebih sedikit. Dikarenakan tidak memiliki sarkomer, sel autoritmik tidak berkontribusi pada kekuatan kontraksi jantung.^(34,35)



Gambar 2.2.1.1. Struktur otot kontraktile jantung.⁽³⁵⁾

Sel otot kontraktile jantung memiliki kemiripan dengan sel otot rangka, namun terdapat beberapa perbedaan yaitu:^(34,35)

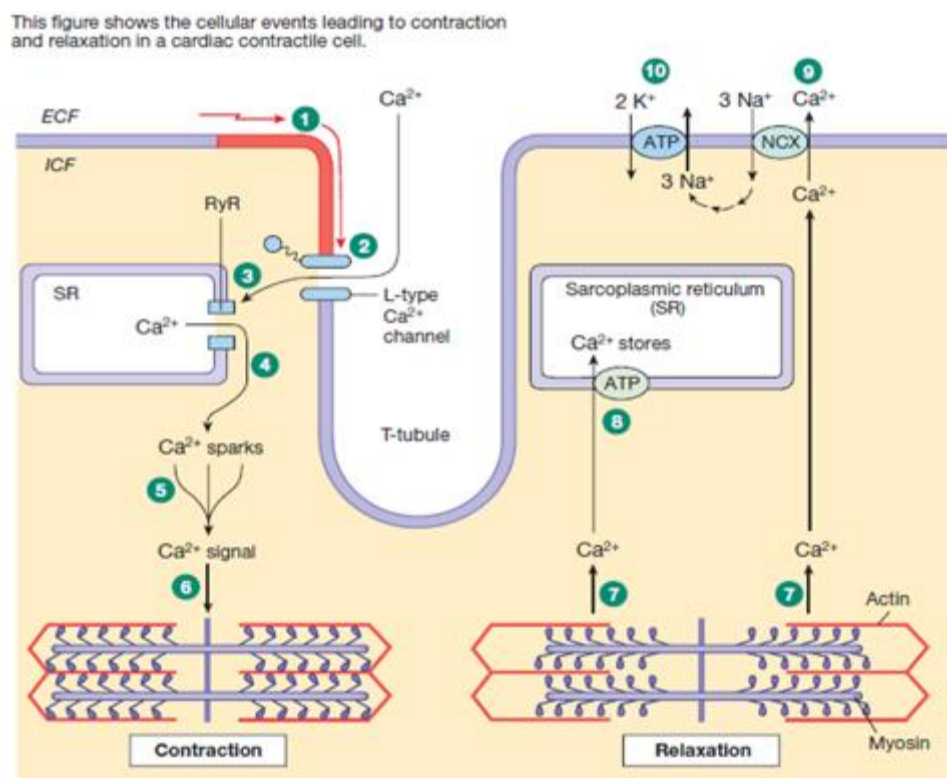
1. Serabut otot jantung berukuran lebih kecil dari serabut otot rangka dan hanya memiliki satu nukleus setiap satu serat otot.

2. Cabang-cabang sel otot jantung saling terhubung satu sama lain membentuk jaringan yang kompleks. Taut antar sel, diskus interkalaris memiliki dua komponen: *desmosome* dan *gap junction*. Desmosome merekatkan antar sel dengan sangat kuat memungkinkan kekuatan dari satu sel dapat dihantarkan ke sel yang lain.
3. Gap junction dalam diskus interkalaris menghubungkan lisrik sel otot jantung satu dengan yang lainnya. Sifat ini memungkinkan gelombang depolarisasi menyebar secara cepat dari sel ke sel sehingga sel otot jantung dapat berkontraksi secara simultan.
4. Tubulus-t sel miokardium berukuran lebih besar dari sel otot rangka dan bercabang hingga ke bagian dalam sel miokardium.
5. Retikulum sarkoplasma sel miokardium berukuran lebih kecil dari sel otot rangka. Hal ini menunjukkan otot jantung bergantung pada ion Ca^{2+} ekstraseluler untuk memulai kontraksi.
6. Mitokondria menempati sepertiga volume sel pada serabut kontraktile jantung. Hal ini menunjukkan kebutuhan energi yang besar pada sel ini. Diperkirakan otot jantung mengonsumsi 70-80% oksigen yang dihantarkan oleh darah melebihi dua kali kebutuhan sel lainnya dalam tubuh.

Kontraksi otot jantung dimulai dari potensial aksi yang dicetuskan sel autoritmik kemudian diteruskan ke seluruh serabut otot kontraktile melewati gap junction dan memulai keseluruhan proses *excitation-contraction coupling*. Rangkaian proses tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut:⁽³⁵⁾

1. Sebuah potensial aksi memasuki sel kontraktile dan bergerak melewati sarkolema dan masuk ke dalam tubulus-t.
2. Potensial aksi yang menjalar tersebut membuka kanal ion Ca^{2+} tipe -L berpintu listrik di membran sel.
3. Ion Ca^{2+} masuk ke dalam sel dan membuka kanal pelepasan Ca^{2+} reseptor ryanodine/RyR di retikulum sarkoplasma.
4. Ketika kanal RyR terbuka, deposit ion Ca^{2+} mengalir keluar dari retikulum sarkoplasma ke sitosol menciptakan letupan influks ion Ca^{2+} .
5. Letupan yang berasal dari kanal RyR yang berbeda dan menciptakan penjumlahan letupan yang menciptakan sinyal ion Ca^{2+} .

6. Kalsium berdifusi melewati sitosol menuju ke elemen kontraktile di mana ion akan berikatan dengan troponin dan menginisiasi siklus pembentukan jembatan silang dan pergerakan.
7. Ketika konsentrasi ion Ca^{2+} sitoplasma menurun, ion Ca^{2+} terlepas dari troponin, myosin melepaskan aktin, dan filamen kontraktile bergeser kembali ke posisi relaksasinya.
8. Sama seperti otot rangka, ion Ca^{2+} ditranspor kembali ke dalam retikulum sarkoplasma dengan bantuan Ca^{2+} -ATPase.
9. Pada otot jantung, ion Ca^{2+} dipindahkan dari sel kemudian bertukar dengan ion Na^+ melalui Na^+ - Ca^{2+} exchanger/NCX.
10. Sodium yang masuk ke dalam sel selama pertukaran ini kemudian dipindahkan lagi ke luar sel oleh Na^+ - K^+ -ATPase.



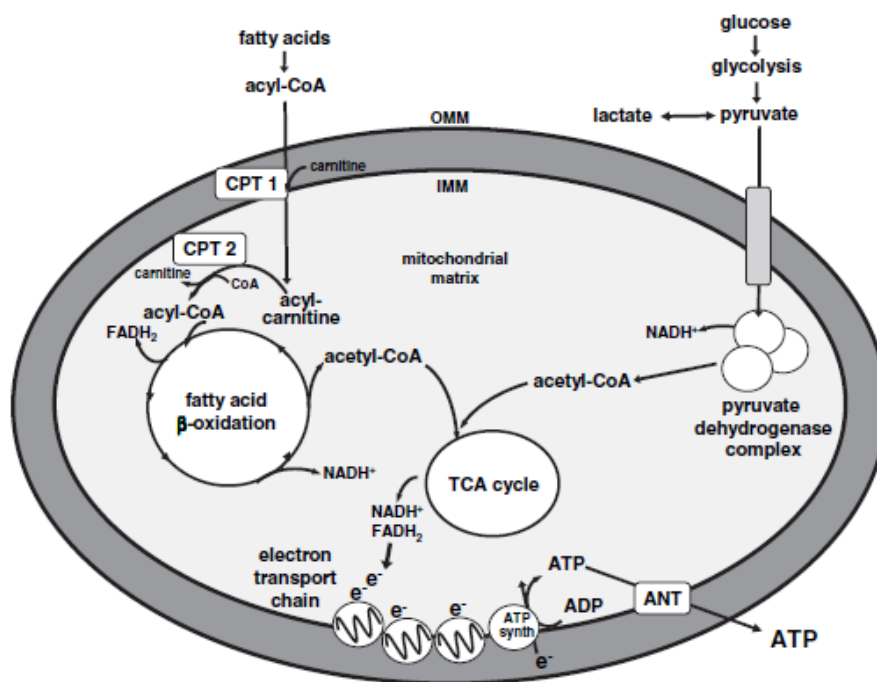
Gambar 2.2.1.2. Rangkaian eksitasi-kontraksi dan relaksasi.⁽³⁵⁾

2.2.2 Peran PGC-1 α pada regulasi energi mitokondria kardiomyosit

Setiap sel yang hidup memerlukan energi untuk menjalankan aktivitasnya tidak terkecuali kardiomyosit. Kardiomyosit memiliki karakteristik: (1) peka terhadap rangsang, (2) mampu berkontraksi dan (3) menghasilkan impuls listrik

secara mandiri.^(34,35) Berbagai karakteristik tersebut tidak terlepas dari peran mitokondria sebagai pengatur metabolisme energi.⁽³⁶⁾ Energi yang dipakai oleh kardiomyosit berasal dari molekul ATP, suatu senyawa fosfat berenergi tinggi dan *phosphocreatine/PCr* yang dibentuk dari fosforilasi kreatin ATP oleh *creatin kinase/CK*.^(37–39) Jantung pada dasarnya merupakan organ yang bersifat “substrate omnivore” yang artinya mampu untuk mengoksidasi asam lemak, karbohidrat, benda keton, laktat dan bahkan asam amino.^(37,38) Fleksibilitas metabolik jantung adalah kemampuannya untuk merespon perubahan beban kerja, ketersediaan substrat, pengaruh hormon yang bersirkulasi, laju aliran koroner, metabolisme bahan bakar dengan menggunakan substrat yang tepat dan pada waktu yang tepat.^(37,38) Jantung yang bekerja memompa darah dari dan ke seluruh tubuh secara konstan membutuhkan sistem mitokondria berkapasitas tinggi untuk menyesuaikan produksi ATP dengan kebutuhan fungsionalnya.^(37–39) Jantung mengkonsumsi sekitar 1mM ATP/detik. Hal ini berarti semua ATP dan PCr harus diperbarui setiap 20 detik.^(37,38) Pada jantung mamalia dewasa ATP disintesis terutama dari oksidasi lengkap asam lemak/fatty acid dan glukosa di mitokondria.^(36,38) Jalur metabolik mitokondrial diregulasi pada berbagai tingkatan.^(36,38) Kecepatan aliran oksidatif mitokondrial dimodulasi oleh konsentrasi substrat dan metabolit intermediet dan oleh modifikasi pascatranslasi enzim katalisator kunci.^(37,38,40) Tidak kalah penting, kapasitas metabolisme energi oksidatif mitokondrial juga diregulasi pada tingkat transkripsi gen.^(38,40)

Mitokondria merupakan organel sel yang berperan sebagai “mesin” sintesis ATP yang efisien mengubah secara cepat cadangan energi yang terdapat pada asam lemak, glukosa, dan laktat menjadi fosfat berenergi tinggi yang menyediakan bahan bakar untuk berbagai proses seluler lainnya di dalam kardiomyosit.^(37,40) Asam lemak masuk ke dalam mitokondria secara utuh dan dikatabolisme di dalam spiral beta oksidasi asam lemak mitokondrial. Oksidasi asam lemak pada jalur ini memproduksi ekuivalen tereduksi (NADH dan FADH₂) dan Acetyl-CoA, suatu molekul dengan 2 atom karbon yang dapat masuk ke dalam siklus asam trikarboksilat untuk oksidasi lebih lanjut.⁽³⁶⁾ Skema ilustrasi penggunaan substrat oleh mitokondria dan jalur transduksi energi mitokondria disajikan pada gambar 2.2.2.



Gambar 2.2.2. Jalur transduksi energi dan sintesis ATP mitokondrial.⁽³⁶⁾

Glukosa sebelum masuk ke jalur oksidasi di dalam mitokondria, pertama harus mengalami metabolisme anaerobik di sitosol kardiomiosit dan diubah menjadi piruvat. Molekul intermediet dengan 3 atom karbon ini kemudian dapat diubah menjadi laktat di luar mitokondria atau dioksidasi di dalam matriks mitokondria untuk menghasilkan acetyl-CoA yang diperlukan dalam siklus asam trikarboksilat.⁽³⁶⁾ Oksidasi acetyl-CoA akan memproduksi NADH dan FADH₂ yang berperan sebagai pembawa elektron pada rantai transpor elektron.^(36,38) Rantai transpor elektron akan memproduksi ATP melalui proses yang dikenal sebagai “fosforilasi oksidatif”/*oxydative phosphorylation* (OXPHOS). ATP hasil sintesis mitokondria dikeluarkan ke sitosol untuk digunakan dalam banyak sekali reaksi enzimatik dan proses selular khusus seperti *excitation-contraction coupling* dan menjaga keseimbangan ion.^(36–38)

Pada otot rangka maupun otot jantung, kapasitas metabolisme oksidatif dan fungsi pernapasan mitokondrial dikendalikan secara dinamik oleh gen regulator.^(36,38) Telah diobservasi bahwa terdapat peningkatan bermakna dalam jumlah dan aktivitas mitokondria selama periode perkembangan postnatal.⁽³⁶⁾

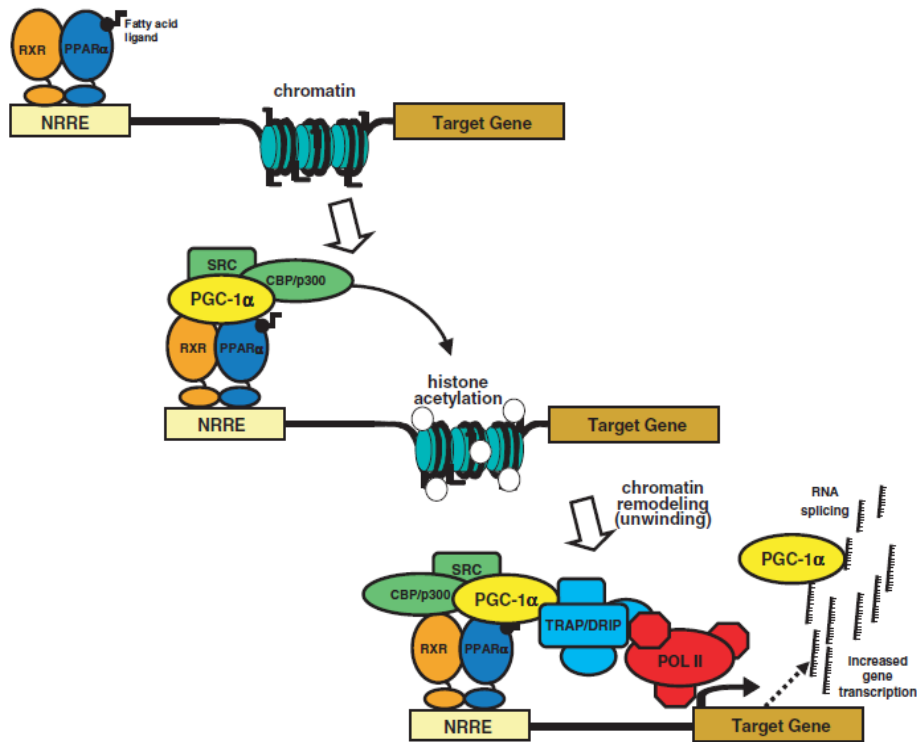
Ekspansi cepat kapasitas mitokondrial melibatkan aktivasi bertingkat dari gen regulator yang mengoordinasikan replikasi genom dengan ditingkatkannya ekspresi gen yang mengkode protein terkait dengan laju katabolik dan sintesis ATP di dalam mitokondria.^(36,37) Respon biogenik mitokondrial ini juga dicetuskan sebagai respon terhadap kebutuhan fisiologis misalnya saat latihan fisik dan dicetuskan juga oleh hormon tiroid. Dengan demikian regulasi kapasitas fungsional kardiomiosit merupakan proses dinamis yang berespon secara fisiologis dan terkait juga dengan asupan nutrisi.⁽³⁶⁾

Pada pembahasan sebelumnya telah dijelaskan bahwa regulasi fungsi mitokondria dipengaruhi juga oleh ekspresi gen yang berperan dalam sintesis ATP. Namun, bagaimana peran yang sebenarnya dari ekspresi gen tersebut? Pertanyaan ini sebagian dapat terjawab dengan ditemukannya famili koaktivator transkripsi PGC-1 α .⁽³⁶⁻⁴⁰⁾ PGC-1 α merupakan singkatan dari *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator*, suatu protein yang meningkatkan aktivitas transkripsional dari faktor transkripsi melalui interaksi protein ke protein secara langsung.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾ PGC-1 α pertama kali ditemukan pada ragi dihybrid oleh Bruce Spiegelman melalui suatu percobaan laboratorium yang didesain untuk menemukan protein regulator yang membedakan jaringan adiposa coklat dengan jaringan adiposa putih.⁽³⁶⁾ Jaringan adiposa coklat kaya akan mitokondria yang terspesialisasi untuk menghasilkan panas melalui respirasi tak berangkai. Sementara itu, jaringan adiposa putih memiliki mitokondria yang sangat sedikit.^(36,40) PGC-1 α merupakan protein penginduksi yang memiliki kemampuan untuk mengatur biogenesis mitokondria dan respirasi tak berangkai di jaringan adiposa coklat. Kemudian PGC-1 α menunjukkan mampu menginduksi produksi mitokondria yang mampu melakukan respirasi berangkai tingkat tinggi dan memproduksi ATP pada kardiomiosit.^(36,38,40)

Karena protein PGC-1 α tidak dapat berikatan/berinteraksi dengan DNA secara langsung, koaktivator ini bekerja melalui interaksi dengan faktor transkripsi yang berikatan dengan elemen DNA spesifik pada area promotor gen (gambar 10).^(36,38) Studi terkini pada gen kontrol transkripsional menunjukkan faktor transkripsi terikat DNA berinteraksi dengan kompleks protein koaktivator dan korepresor, beberapa darinya memiliki aktivitas enzimatis yang menyebabkan

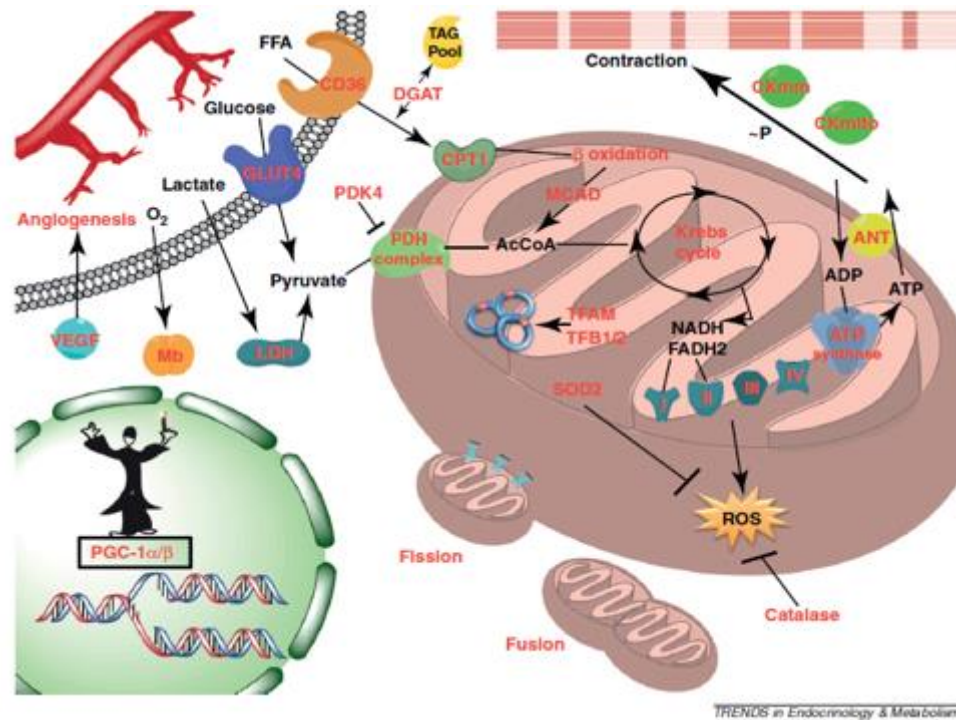
modifikasi kromatin (misal, asetilasi dan metilasi).^(36,38) Fungsi modifikasi kromatin oleh kompleks koaktivator adalah meningkatkan probabilitas sebuah gen akan ditranskripsikan oleh kompleks RNA polimerase II (gambar 10).⁽³⁶⁾ Koaktivator lainnya bekerja dengan berinteraksi langsung pada mekanisme RNA polimerase (misal RNA polimerase II atau kompleks TRAP/DRIP).^(36,38) PGC-1 α tidak memiliki aktivitas enzimatis intrinsik yang umum pada berbagai koaktivator protein lainnya. Sebagai gantinya, fungsi PGC-1 α sebagai adaptor atau perantara/*scaffold* untuk merekrut protein koaktivator lain yang berperan dalam memodifikasi kromatin.^(36,38,39)

PGC-1 α juga berikatan dengan protein yang dikenal sebagai *menage-a-trois1*, yang merupakan komponen dari kompleks cyclin-dependent kinase-7 yang memfosforilasi RNA polimerase II dan memodulasi selektif enzim tersebut. Sebagai tambahan, PGC-1 α diketahui juga berinteraksi langsung dengan kompleks TRAP/DRIP untuk berikatan dengan RNA polimerase II (gambar 9).⁽³⁶⁾ Akhirnya, PGC-1 α mengikat *RNA processing domain* yang juga berkontribusi terhadap fungsi regulator transkripsional.^(36,40) PGC-1 α berinteraksi dengan dan mengaktifkan berbagai jenis faktor transkripsi reseptor inti dan faktor transkripsi non inti untuk mentransduksi stimulus perkembangan, nutrisi dan fisiologi untuk mengendalikan sejumlah jalur metabolisme energi yang berbeda (gambar 2.2.2.1).



Gambar 2.2.2.1. PGC-1 α sebagai koaktivator transkripsional.⁽³⁶⁾

PGC-1 α merupakan koaktivator yang luar biasa pada berbagai program genetik yang luas. Tidaklah berlebihan menganggap protein PGC-1 α sebagai *orchestrator* pada berbagai metabolisme sel. Berbagai studi yang telah dilakukan pada sistem ini berfokus pada biogenesis mitokondrial dan fungsinya, sebuah program yang membutuhkan ratusan bahkan ribuan gen.⁽³⁸⁾ Secara luar biasa, PGC-1 α meregulasi tidak hanya fungsi mitokondrial saja tapi juga program lainnya yang krusial dan berkaitan langsung dengan mitokondria. Mitokondria dapat mengkonsumsi bahan bakar dalam jumlah besar untuk menghasilkan ATP secara efisien. Peran protein PGC-1 α sebagai orkestrator dirangkum pada gambar 2.2.2.2.⁽³⁸⁾



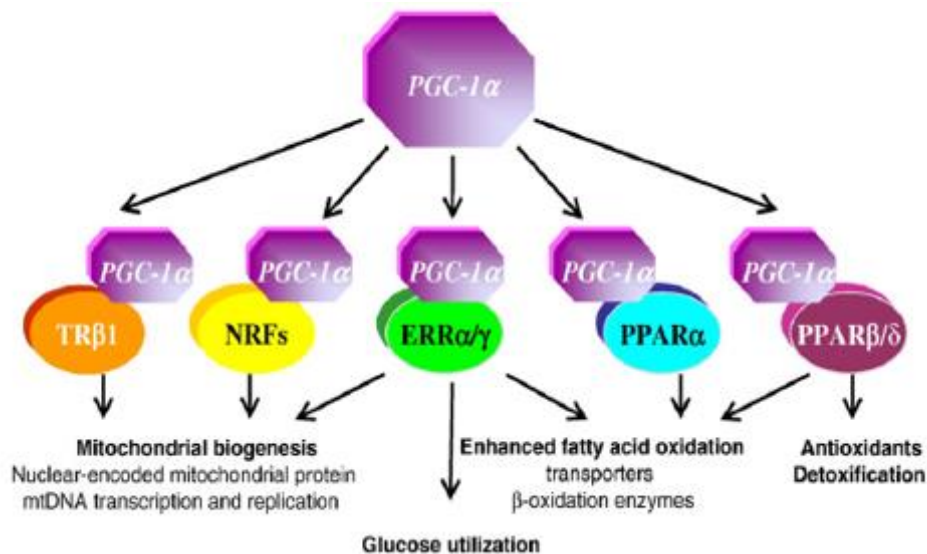
Gambar 2.2.2.2. Peran PGC-1 α sebagai orkestrator metabolisme seluler.⁽³⁸⁾

PGC-1 α mengaktifkan ekspresi gen di dalam nukleus untuk meregulasi berbagai program biologik mitokondrial dan program tambahan lainnya yang terkait. Protein pengkode gen dan proses yang terkait merupakan target PGC-1 (berwarna merah). GLUT4 dan CD36 memfasilitasi masuknya bahan bakar ke dalam sel dimana transpor CPT1 dan PDH mengaktifkan bahan bakar ke mitokondria. Beta oksidasi asam lemak akan menghasilkan asetil KoA yang akan memasuki siklus Krebs, menghasilkan ekuivalen tereduksi yang dapat memberikan elektron ke sistem rantai transport elektron, pada akhirnya mengkonversi ADP menjadi ATP. ANT mengeluarkan ATP ke dalam sitoplasma, di mana transpor kreatin (CKmito dan CKmm) memfasilitasi transpor ikatan fosfat berenergi tinggi untuk berikatan dengan miofibril, tempat utama konsumsi ATP. Sekresi faktor angiogenik poten/VEGF menstimulasi neovaskularisasi, meningkatkan kapasitas jaringan vaskuler untuk memepertahankan asupan tinggi bahan bakar ke kardiomyosit dan mitokondria.⁽³⁸⁾ Produk sampingan respirasi mitokondria termasuk di dalamnya ROS akan diikat oleh enzim seperti SOD dan katalase. Biogenesis mitokondrial itu sendiri membutuhkan replikasi genom mitokondrial,

melalui TFAM dan TFB1/2, sedangkan homeostasis mitokondrial melibatkan proses fusi dan fisi yang konstan.⁽³⁸⁾

Di jantung, 3 faktor transkripsi utama yang berpasangan dengan PGC-1 α .⁽³⁶⁻³⁹⁾ Faktor pertama yang teridentifikasi sebagai target PGC-1 α adalah PPAR- α /peroxisome proliferator activated receptor- α . Terdapat berbagai sub tipe famili PPAR diantaranya PPAR- β dan PPAR- γ yang masing-masing juga berinteraksi dengan PGC-1 α . PPAR- γ berperan penting dalam adipogenesis dan diferensiasi, sedangkan PPAR- α dan PPAR- β memegang peranan penting dalam mengontrol oksidasi asam lemak.⁽³⁶⁻³⁹⁾ Peran biologis utama kompleks PPAR-PGC-1 α pada miokardium adalah kontrol transkripsional enzim yang terlibat dalam ambilan oksidasi asam lemak.^(38,39)

Famili reseptor terkait estrogen/Estrogen Related Receptor (ERR) juga merupakan target utama PGC-1 α .^(36,39,40) Suatu hal yang menarik, sangat berbeda dengan pasangan faktor transkripsi PGC-1 α lainnya, aktivitas dari ERR tergantung dari ada atau tidaknya PGC-1 α . Hal ini menunjukkan bahwa PGC-1 α berperan sebagai protein ligand terhadap ERR- α .^(37,39) Ekspresi berlebihan ERR- α mengendalikan peningkatan ekspresi gen yang mengkode oksidasi asam lemak dan enzim fosforilasi oksidatif/OXPHOS dalam bentuk yang disebabkan kehadiran bermakna dari protein PGC-1 α .⁽³⁷⁻³⁹⁾ Aktivasi berbagai target gen yang terlibat dalam oksidasi asam lemak yang dimediasi oleh ERR- α bergantung juga pada ada atau tidaknya PPAR- α , di mana PPAR- α sendiri secara transkripsional dipengaruhi oleh ERR- α . Hal ini menunjukkan bahwa ERR- α memediasi efeknya pada oksidasi asam lemak setidaknya dengan mengaktifkan ekspresi PPAR- α . Kompleks PGC-1 α /ERR- α juga berperan sebagai regulator langsung pada gen yang terlibat dalam oksidasi glukosa. Pada dasar target gen dan efek ekspresi PPAR- α telah jelas bahwa ERR- α memainkan peran sentral pada tahapan gen regulator PGC-1 α di jantung.⁽³⁷⁻³⁹⁾

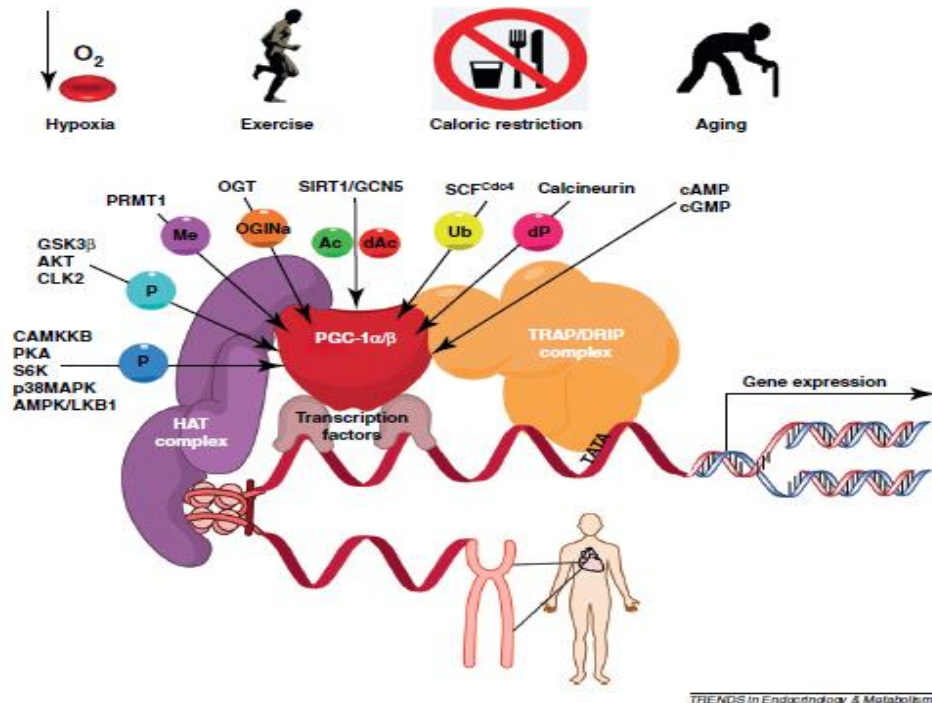


Gambar 2.2.2.3. Tahapan gen regulator PGC-1 α .⁽³⁷⁾

Bagaimana PGC-1 α meregulasi replikasi dan transkripsi DNA mitokondrial? Sebuah studi menunjukkan bahwa PGC-1 α mengaktifkan biogenesis mitokondrial dengan mengaktivasi *Nuclear Respiratory Factor 1* (NRF-1). Studi lanjutan menunjukkan bahwa mekanisme ini juga relevan terjadi di jantung. NRF-1 merupakan faktor transkripsi dikode inti yang diaktivasi oleh PGC-1 α untuk meregulasi transkripsi gen yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif mitokondrial, transkripsi DNA mitokondrial, dan biogenesis mitokondrial. Yang tidak kalah pentingnya, NRF-1 juga menstimulasi ekspresi faktor transkripsi mitokondria yang telah teraktivasi sehingga mengendalikan transkripsi dan replikasi genom mitokondria. Pentingnya NRF-1 pada proses ini telah dibuktikan oleh penelitian dimana kotransfeksi NRF-1cDNA negatif yang dominan menghambat respon biogenik mitokondria terhadap PGC-1 α .^(37,38) Demikian melalui hilir target faktor transkripsi, PGC-1 α memicu aktivasi terkoordinasi ini dan gen mitokondrial yang mengendalikan biogenesis dan peningkatan kapasitas oksidasi asam lemak dan fosforilasi oksidatif (gambar 2.2.2.3).^(37–39)

Berdasarkan uraian yang telah disampaikan , dapat disimpulkan bahwa PGC-1 α berperan sebagai regulator utama dalam metabolisme oksidatif mitokondrial yang mengatur kapasitas dari tiap langkah yang diperlukan dalam sintesis ATP. Namun hal ini masih memunculkan pertanyaan berikutnya yakni

“siapaakah yang mengatur tingkat ekspresi PGC-1 α ?”. Ilustrasi pengaturan ekspresi PGC-1 α dirangkum pada gambar 2.2.2.4.



Gambar 2.2.2.4. Berbagai pengaturan ekspresi PGC-1 α .⁽³⁸⁾

Beberapa studi yang dilakukan dalam satu dekade terakhir menunjukkan bahwa regulasi PGC-1 α dipengaruhi oleh:^(38–40)

1. Isyarat fisiologik, misalkan hipoksia akan menginduksi PGC-1 α untuk meningkatkan angiogenesis. Restriksi kalori dan olahraga juga akan menginduksi PGC-1 α untuk meningkatkan proses oksidasi asam lemak untuk membentuk energi. Sementara itu proses penuaan/ageing akan menurunkan PGC-1 α .
2. Modifikasi pasca-translasional, termasuk di dalamnya adalah proses fosforilasi-defosforilasi, asetilasi-deasetilasi, metilasi dan ubiquitinasi. Fosforilasi PGC-1 α diperankan oleh AMPK, p38MAPK, Akt, GSK-3,CLK2, CAMKK β , PKA, S6K. Defosforilasi diperankan oleh calcineurin. Asetilasi diperankan oleh SIRT1 sedangkan de-asetilasi diperankan oleh GCN5. Metilasi diperankan PRMT1. Untuk ubiquitinasi diperankan oleh SCF dan modifikasi kombinasi asetilasi-glikosilasi diperankan oleh OGT.

Proses tersebut tidak dapat berjalan sendiri-sendiri namun memiliki keterkaitan satu sama lain sehingga mampu mempengaruhi tingkat ekspresi PGC-1 α secara utuh.

2.3 Kelainan Jantung pada defisiensi Kobalamin/Vitamin B12

Salah satu dampak defisiensi vitamin B12 adalah peningkatan kadar homosistein atau yang lebih dikenal hiperhomosisteinemia. Selain disebabkan oleh defisiensi vitamin B12, hiperhomosisteinemia juga disebabkan oleh beberapa hal antara lain: 1) asupan protein yang banyak mengandung metionin, 2) hiperaktivitas demetilasi metionin dan metil transferase, 3) sifat polimorfisme (heterozigot/homozigot) aktivitas cystathione β synthase, 4) defisiensi vitamin B6 (transulfurasi), 5) stenosis renovaskuler yang berujung pada retensi volume (gangguan ginjal, hipertensi dan diabetes).⁽⁴¹⁾ Kadar homosistein plasma merupakan salah satu faktor risiko yang berperan penting dalam morbiditas dan mortalitas kardiovaskuler.⁽⁴²⁾ Saat ini kadar plasma homosistein juga merupakan faktor risiko berkembangnya gagal jantung pada individu yang tidak memiliki riwayat infark miokard, terutama wanita.^(42,43)

Data prospektif berdasarkan komunitas dari studi *Framingham* menganalisis 2491 pasien menunjukkan terdapat peningkatan insiden gagal jantung pada individu dengan level Hcy >11-12 $\mu\text{mol/L}$.⁽⁴³⁾ Dalam suatu analisis multivariat untuk mengontrol faktor risiko permanen untuk gagal jantung termasuk kejadian miokard infark selama mengikuti proses studi, level Hcy di atas nilai median terkait jenis kelamin spesifik berasosiasi dengan tingkat bahaya gagal jantung sebesar 1.93 pada laki-laki dan 1.84 pada perempuan.⁽⁴³⁾ Studi yang dilakukan oleh Hermann et al menunjukkan bahwa hiperhomosisteinemia tidak hanya berkorelasi dengan insiden gagal jantung namun juga tingkat keparahan penyakitnya. Pada studi tersebut diinvestigasi 95 pasien gagal jantung dan 18 orang sehat sebagai kontrol. Median Hcy (nilai batas atas studi 12 $\mu\text{mol/L}$) meningkat bertahap dengan meningkatnya kelas menurut NYHA (kontrol: 8.5 $\mu\text{mol/L}$, NYHA I: 10.3 $\mu\text{mol/L}$, NYHA II: 12.1 $\mu\text{mol/L}$, NYHA III: 13.5 $\mu\text{mol/L}$, NYHA IV: 17.4 $\mu\text{mol/L}$) dan analisis korelasi (termasuk pasien dan kontrol) menunjukkan relasi signifikan antara Hcy, ambilan oksigen maksimum, uji jalan 6 menit, NT-proBNP, dan fraksi

ejeksi/EF.⁽⁴³⁾ Hasil tersebut menunjukkan bahwa Hcy terkait dengan klinis, parameter ekokardiografik dan laboratorik yang menggambarkan hubungan kadar Hcy dengan tingkat keparahan gagal jantung. Studi ini juga didukung oleh tiga studi lainnya yang menggambarkan relasi signifikan antara kadar Hcy dengan struktur dan fungsi ventrikel kiri.^(24,42,44)

Homosistein juga menyebabkan disfungsi jantung melalui mekanisme iskemia.⁽⁴²⁾ Hiperhomosisteinemia menyebabkan berbagai perubahan patologis yang erat kaitannya dengan sistem kardiovaskular. Fokus pembahasan gangguan struktural maupun fungsional jantung pada bagian ini adalah yang disebabkan oleh hiperhomosisteinemia terkait defisiensi vitamin B12 serta keterkaitannya dengan defisiensi donor metil.

2.3.1 Gangguan struktural jantung pada defisiensi vitamin B12

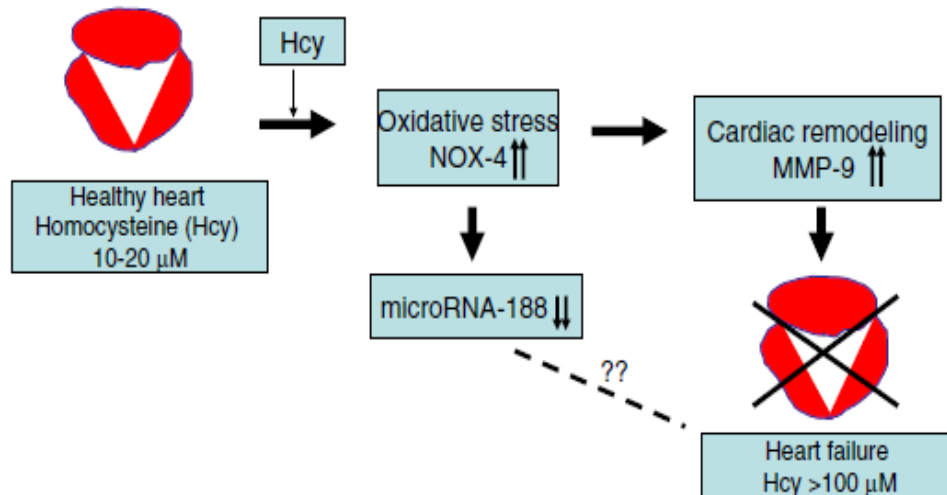
Hiperhomosisteinemia dapat memicu hipertrofi ventrikel kiri melalui mekanisme vaskuler maupun non-vaskuler. Homosistein memiliki efek memicu pertumbuhan serta stimulasi produksi kolagen pada sel otot polos dan menghambat pertumbuhan sel endotelial.^(41,42) MMP/*Matrix metalloproteinases* merupakan anggota famili *zinc endopeptidase* yang memiliki struktur domain yang sama, namun berbeda dalam spesifisitas substrat, sumber seluler, dan induksibilitas.^(41,42,44) Remodeling matriks ekstra seluler/ECM pada penyakit kardiovaskuler terutama bergantung pada MMP-2 dan MMP-9.^(41,44) MMP secara laten merupakan hal yang normal di miokardium, namun selama gagal jantung kongestif dan hiperhomosisteinemia MMP akan teraktivasi (Tyagi et al).⁽⁴¹⁾ Homosistein menginduksi disfungsi endokardial-endotelial dan mengganggu fungsi sel endotel mikrovaskuler in vivo (Ungravi et al). Efek ini dimediasi oleh ekspresi MMP-9 terinduksi Hcy. Aktivasi MMP-9 sangat penting pada remodeling vaskular, meskipun jalur regulatoriknya belum diketahui pasti.⁽⁴¹⁾

Sebagai tambahan pada efek terhadap vaskuler, homosistein memiliki efek yang juga merugikan terhadap miokardium pada studi eksperimental, memengaruhi matriks ekstraseluler lebih besar daripada kompartemen kardiomyosit. Homosistein secara langsung memicu fibrosis dan aktivitas MMP jantung, yang berujung pada disfungsi diastolik secara perlahan-lahan.⁽⁴²⁾ Pada manusia, kadar homosistein

plasma berkorelasi positif dengan massa ventrikel kiri pada kasus-kasus penyakit ginjal kronik stadium akhir.⁽⁴²⁾ Penelitian Sundstrom et al menunjukkan bahwa peningkatan kadar homosistein akan diikuti dengan peningkatan massa ventrikel kiri secara linier.⁽⁴²⁾

Peningkatan kadar homosistein juga sering terkait dengan peningkatan stress oksidatif. Tingkat stress yang bersifat kronik pada miokardium akan menginisiasi proses adaptasi yang akan berujung pada hipertrofi ventrikel kiri disertai remodeling fungsional maupun metabolik.⁽³⁷⁾ Namun, ketika tingkat stress melampaui kapasitas adaptasi atau berlangsung dalam jangka waktu yang sangat lama, hal tersebut dapat diikuti oleh hipertrofi maladaptif yang berlebihan, dilatasi ventrikuler progresif, disfungsi kontraktilitas dan akhirnya menjadi gagal jantung.⁽³⁷⁾

Penelitian yang dilakukan oleh Mishra et al menunjukkan pada keadaan hiperhomosisteinemia terjadi peningkatan ekspresi NOX-4, suatu penanda terjadinya stress oksidatif.⁽⁴⁵⁾ HHcy pada kardiomyosit menunjukkan peningkatan MMP-2-9 dan TIMP-1-3 dan penurunan ekspresi TIMP-4. Hal tersebut mengarah kepada suatu proses remodeling jantung yang disebabkan oleh stress oksidatif. Pada penelitian tersebut pemeriksaan mikro RNA menunjukkan 11 mikroRNA memiliki ekspresi yang berbeda, salah satu yang utama adalah miR-188. Pada hiperhomosisteinemia, ditemukan penurunan ekspresi miR-188 yang bersifat dramatis. Hal ini menunjukkan terdapat keterlibatan ekspresi miR-188 pada remodeling jantung yang diinduksi oleh peningkatan kadar Hcy.⁽⁴⁵⁾ Pada gambar 2.3.1 diilustrasikan suatu model tentang keterkaitan kadar homosistein, stress oksidatif dan miR-188.

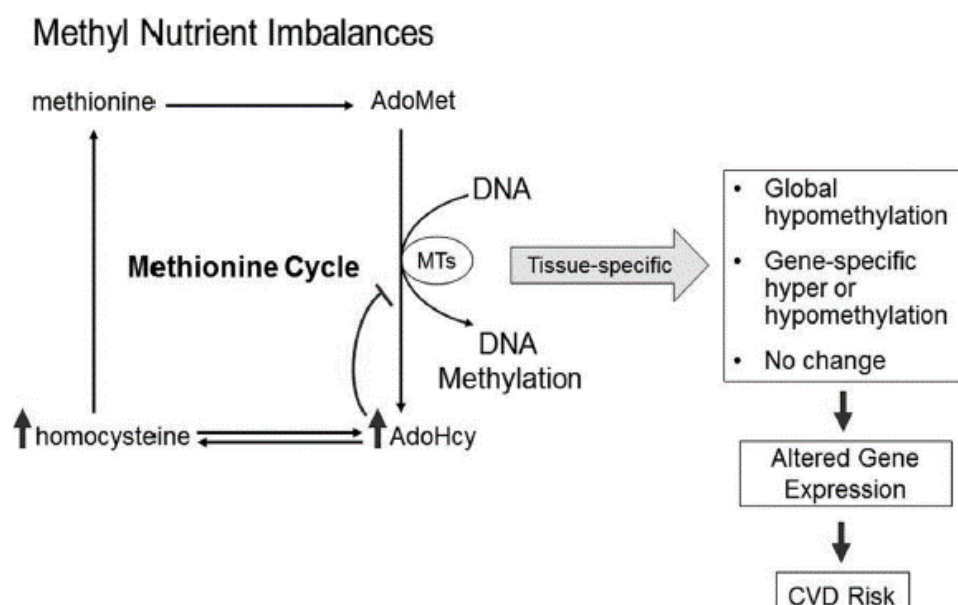


Gambar 2.3.1. Model peningkatan kadar homosistein, stress oksidatif dan mir-188.⁽⁴⁵⁾

2.3.2 Gangguan fungsional jantung pada defisiensi vitamin B12

Seperti telah disampaikan pada pembahasan sebelumnya, fungsi jantung sebagai pompa merupakan hal yang paling vital dalam mempertahankan homeostasis pada makhluk hidup yang kompleks seperti halnya manusia. Untuk menunjang fungsi vital tersebut maka jantung harus memiliki ketersediaan energi yang cukup. Sel jantung/kardiomyosit sama seperti sel tubuh lainnya dalam hal metabolisme yakni menggunakan ATP sebagai sumber energi. Ketersediaan ATP dalam jumlah yang mencukupi dipenuhi oleh salah satu organel sel yang dinamakan mitokondria. Agar mampu menjalankan fungsinya dengan optimal, jalur metabolisme mitokondria diregulasi mulai pada tingkat substrat, modifikasi pasca translasi enzim yang berperan hingga ke tingkat genetik. Keseluruhan aspek tersebut terutama regulasi tingkat genetik tidak terlepas dari pentingnya donor metil. Donor metil ini didapat dari komponen diet yang dikenal sebagai *methyl nutrients*. Nutrien metil yang termasuk di dalamnya adalah: vitamin (kobalamin/B12, folat/B9, riboflavin, piridoksin/B6), kolin, dan beberapa asam amino seperti metionin, sistein, glisin dan serin.^(3,4) Nutrien metil secara metabolik diperlukan untuk membentuk AdoMet atau dikenal juga S-adenosyl metionin/SAM, suatu donor metil utama untuk DNA, RNA, protein dan lipid.^(3,24)

Berbagai studi terkini mulai mengarah pada keterkaitan antara defisiensi donor metil dengan patomekanisme gangguan kardiovaskular. Mekanisme yang mendasarinya baru sebagian kecil saja diketahui, namun tidak dipungkiri dapat melibatkan proses epigenetik. Proses epigenetik dapat didefinisikan sebagai proses yang menyebabkan perubahan ekspresi gen yang terjadi tanpa disertai perubahan pada sekuen DNA.^(3,4) Yang termasuk di dalam proses epigenetik antara lain, metilasi DNA, modifikasi kromatin (metilasi histon, asetilasi) dan miRNA/microRNA.⁽³⁾ Proses ini menyediakan suatu “penanda” di genom dimana suatu gen akan ditranskripsikan aktif atau nonaktif, ditransmisikan dari sel induk ke sel keturunannya selama proses mitosis. Namun, penanda epigenomik juga responsif pada perubahan lingkungan seperti perubahan status nutrisi. Perubahan pada pola metilasi DNA juga berdampak pada patologi sistem kardiovaskular. Konsep ketidak- seimbangan nutrisi metil dan dampaknya terhadap risiko gangguan sistem kardiovaskular diilustrasikan pada gambar 2.3.24.^(3,4)



Gambar 2.3.2. Skema representatif hubungan ketidakseimbangan nutrisi metil dan kontribusinya dengan risiko gangguan kardiovaskular.⁽³⁾

Donor metil, folat dan vitamin B12 diperlukan dalam metabolisme karbon tunggal untuk remetilasi homosistein/Hcy menjadi metionin, suatu prekursor

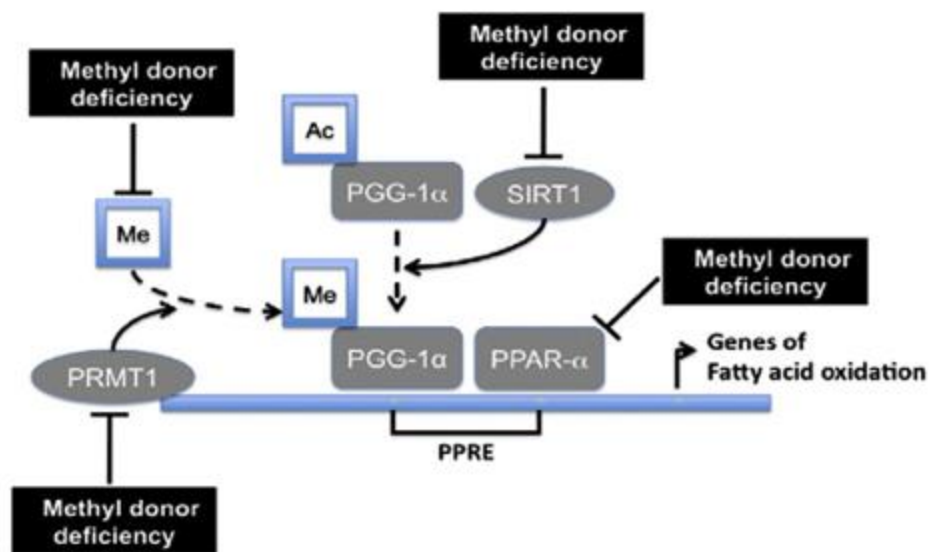
langsung S-adenosilmetionin.⁽¹⁷⁾ Studi laporan kasus pada beberapa populasi menunjukkan adanya hubungan antara kardiomiopati dengan defisiensi donor metil.^(8,17) Kardiomiopati dilatasi prenatal merupakan manifestasi defisiensi Cb1C, suatu kegagalan metabolisme intraseluler vitamin B12 pada masa kehamilan.^(8,17) Dalam berbagai studi beberapa tahun terakhir terdapat hubungan antara kadar homosistein dan vitamin B12 dengan massa ventrikel kiri dan disfungsi sistolik ventrikel kiri.^(8,17) Folat dan vitamin B12 masing-masing bertindak sebagai ko-substrat dan ko-faktor terhadap aktivitas metionin sintase (MTR). Betaine-homocysteine methyltransferase dan cystathionine-b-synthase terdeteksi di dalam kardiomyosit, keduanya memainkan peran yang terbatas dalam sintesis SAM.⁽¹⁷⁾ Defisiensi donor metil menyebabkan apoptosis dan stress seluler pada hati dan otak hewan coba, namun efek pada metabolisme energi belum diketahui secara menyeluruh, meskipun dalam beberapa penelitian terdapat peran SAM terhadap aktivasi PGC-1 α (*peroxysome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1*), suatu molekul protein yang berperan dalam regulasi energi di mitokondria.^(17,46) SAM/S-adenosilmetionin merupakan substrat universal yang terlibat dalam proses epigenetik dan pada metilasi koregulator yang terlibat dalam oksidasi asam lemak.⁽¹⁷⁾

Ketidakmampuan jantung untuk menjalankan fungsinya sebagai pompa akan mengarah pada suatu kondisi yang dinamakan gagal jantung. Mekanisme patologi yang mendasari gagal jantung pada dasarnya masih suatu misteri yang belum terpecahkan secara tuntas, namun nampaknya perubahan metabolisme energi pada sel otot jantung memainkan peranan yang penting dalam perkembangan sindroma klinis tersebut.⁽⁴⁷⁾ Memang telah didemonstrasikan secara luas bahwa gagal jantung berkaitan dengan gangguan metabolisme energi yang signifikan, termasuk di dalamnya inhibisi oksidasi asam lemak bebas dan fosforilasi oksidatif.⁽⁴⁷⁾ Dalam satu dekade terakhir dihipotesiskan bahwa ekspresi protein PGC-1 α mengalami penurunan pada gagal jantung. Protein ko-aktivator ini meregulasi fungsi berbagai faktor transkripsi yang terlibat dalam jalur metabolisme energi seperti oksidasi asam lemak dan biogenesis mitokondrial dan karena itulah dipertimbangkan sebagai regulator utama pada energetika seluler dan terutama pada biogenesis mitokondrial.⁽⁴⁷⁾ Sehingga gangguan pada jalur persinyalan PGC-1 α

dapat sebagian menjelaskan gangguan metabolik yang ditemukan pada pasien gagal jantung. Oleh karena itu, protein ko-aktivator ini dapat pula dipertimbangkan sebagai agen terapeutik yang relevan, sejak stimulasi ekspresinya dan atau fungsinya dapat digunakan untuk menangani defisit energi kronis yang ditemukan pada gagal jantung.

Studi terkini analisis seluler jantung spesifik menggunakan robotik telah dikembangkan untuk mengidentifikasi perangsang ekspresi gen PGC-1 α pada H9c2 kardiomioblas, mengungkap efek positif beberapa komponen pada transkripsi PGC-1 α .⁽⁴⁷⁾ Validasi efek molekul tersebut pada isolasi kardiomyosit dewasa menunjukkan bahwa kobalamin/vitamin B12 memiliki peran yang penting pada jalur persinyalan PGC-1 α .⁽⁴⁷⁾ Hal tersebut menggambarkan karakteristik molekul ini sebagai aktivator potensial biogenesis mitokondrial yang dapat digunakan dalam terapi metabolik pada gagal jantung.

Peran potensial kobalamin dalam metabolisme seluler dapat dilihat pada studi sebelumnya yakni penelitian yang dilakukan oleh Garcia et al. Penelitian tersebut menunjukkan defisiensi donor metil (kobalamin dan folat) pada tikus menginduksi ketidakseimbangan metilasi/asetilasi PGC-1 α oleh protein *arginine methyltransferase 1*/PRMT1 dan deasetilasi protein *sirtuin 1*/SIRT1 di jantung dan di hati.^(17,47) Penelitian yang dilakukan oleh Rodriguez et al menunjukkan defisiensi diet donor metil menyebabkan terjadinya hiperhomosisteinemia dan hipertrofi miokardium yang dihasilkan dari penurunan ekspresi gen oksidasi asam lemak melalui penurunan aktivasi epigenomik dari PGC-1 α .^(17,47) Penurunan aktivasi epigenomik PGC-1 α ini berkaitan dengan hipometilasi terkait PRMT1 dan peningkatan asetilasi SIRT1.^(17,47) Skema ilustrasi ketidakseimbangan aktivitas PRMT1 dan SIRT1 akibat defisiensi donor metil disajikan pada gambar 2.3.2.1.



Gambar 2.3.2.1. Skema ketidakseimbangan aktivitas PRMT1 dan SIRT1 akibat defisiensi donor metil.^(46,47)

Sementara itu, penelitian yang dilakukan oleh Piquereau et al menunjukkan bahwa kobalamin dan folat memiliki efek protektif terhadap mitokondrial pada tikus model gagal jantung dengan teknik *transverse aortic constriction/TAC*.⁽⁴⁷⁾ Pada penelitian tersebut didapati bahwa pemberian suplementasi folat dan kobalamin memberikan efek positif terhadap aktivitas PGC-1 pada model hewan coba yang mengalami *pressure overload* yang disebabkan oleh stenosis aorta. Temuan ini mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa modifikasi pascatranslasi PGC-1 berkaitan dengan preservasi fungsi mitokondrial dan nampaknya hal tersebut yang bertanggung jawab terhadap efek protektif kobalamin pada metabolisme energi mitokondrial.⁽⁴⁷⁾

Perubahan pada aktivitas protein PGC-1 α menyebabkan perubahan dalam penggunaan substrat untuk menghasilkan energi. Pada kondisi normal jantung menggunakan oksidasi asam lemak sebagai penghasil energi utamanya.⁽³⁷⁾ Namun, ketika terjadi defisiensi donor metil akan mempengaruhi ekspresi dari PGC-1 α sehingga terjadi fenomena “metabolic shifting” atau pergeseran penggunaan substrat dari oksidasi asam lemak menjadi oksidasi glukosa.^(37,47) Sehingga, gangguan pada metabolisme substrat berkontribusi pada disfungsi kontraktilitas dan karakteristik remodeling gagal jantung.

Dapat disimpulkan berdasarkan hipotesis berbagai studi sebelumnya bahwa defisiensi vitamin B12/kobalamin menyebabkan perubahan metabolisme energi kardiomyosit yang menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara *supply and demand* energi yang dibutuhkan sehingga berpotensi menimbulkan gagal jantung.

2.3.3 Perubahan gambaran EKG pada defisiensi vitamin B12

Pada era kardiologi modern seperti saat ini, stratifikasi risiko tetap diperlukan untuk manajemen gangguan sistem kardiovaskuler yang lebih baik. EKG merupakan salah satu alat yang telah terbukti mampu menstratifikasi pasien dari risiko tinggi ke risiko rendah untuk berbagai morbiditas kardiovaskuler sebagaimana kelebihan EKG yakni biayanya yang murah, noninvasif, dapat dikerjakan dengan cepat dan hasil yang cepat pula.⁽²⁰⁾ Beberapa studi terkini menunjukkan bahwa defisiensi kobalamin/vitamin B12 menyebabkan peningkatan kadar homosistein dan kondisi ini memicu terjadinya proses remodeling ventrikel yang mengarah ke keadaan hipertrofi ventrikel. EKG dapat dipergunakan untuk memperkirakan terjadinya hipertrofi jantung melalui gambaran: (1) pelebaran kompleks QRS (2) pemanjangan PR Interval dan (3) peningkatan amplitudo RS.

Kardiomyosit memiliki karakteristik yakni: bercabang, multinuklear, sel kontraktil yang berkomunikasi melalui *gap junction*/taut celah. Taut celah tersebut dibentuk dari terowongan penghubung berukuran kecil yang dinamakan *connexin*. Enam buah *connexin* bergabung bersama membentuk *connexon* yang melebar hingga ke sisi luar dan tiap membran plasma yang berdekatan membentuk sebuah saluran yang memungkinkan pembentukan potensial aksi yang akurat dan merambat secara cepat ke seluruh bagian jantung.⁽⁴¹⁾

Telah disinggung pada bagian sebelumnya bahwa peningkatan kadar homosistein mempengaruhi aktivitas MMP sehingga dari yang bersifat laten menjadi aktif dan bahkan cenderung hiperaktif.⁽⁴¹⁾ Pada gagal jantung kongestif, MMP yang bersifat laten akan teraktivasi begitu terjadi peningkatan kadar Hcy. Mekanisme bagaimana Hcy mencetuskan aktivasi MMP masih menjadi tanda tanya, namun dipercaya terkait dengan peningkatan stress oksidatif. Studi yang dilakukan oleh Moshal et al menunjukkan Hcy meningkatkan denyut jantung pada hewan coba.⁽⁴¹⁾ Molekul MMP yang spesifik terhadap efek destruktif jantung

adalah MMP-9. Lebih lanjut lagi, degradasi protein taut celah terutama connexin-43/con-43 (pada jantung manusia) disebabkan oleh aktivitas yang berlebihan dari MMP-9 sehingga proses ini dapat mempengaruhi konduksi impuls listrik dan menyebabkan suatu kondisi takikardia.⁽⁴¹⁾

Penelitian yang dilakukan oleh Law et al menggunakan model komputer biofisik menunjukkan terdapat peran fungsional peningkatan homosistein pada tingkat eksitasi atrial.⁽⁴⁸⁾ Pada simulasi percobaan tersebut menunjukkan homosistein menginduksi terjadinya remodeling elektrik yang menandai perubahan aktivitas listrik pada atrium sehingga mempengaruhi propagasi gelombang eksitasi.⁽⁴⁸⁾ Efek pro-aritmogenik peningkatan kadar homosistein sejalan dengan penurunan durasi potensial aksi, penurunan periode refrakter efektif, dan penurunan kecepatan konduksi intra atrial. Aksi integratif sifat sel dan jaringan ini mengurangi panjang gelombang eksitasi atrial sehingga memungkinkan atrium untuk mempertahankan gelombang eksitasi *reentrant* tetap tinggi.⁽⁴⁸⁾ Mekanisme pro-aritmogenik ini mirip dengan fibrilasi atrial yang diinduksi oleh remodeling pada kanal ion. Studi tersebut menjelaskan hubungan antara peningkatan konsentrasi homosistein dan insiden terjadinya fibrilasi atrium pada beberapa pasien.⁽⁴⁸⁾

2.4 Brain Natriuretic Peptide/BNP

Perkembangan studi menggunakan mikroskop elektron pada dekade 1950an menyingkap pengetahuan tentang adanya suatu molekul granula yang memiliki kemiripan dengan molekul yang dihasilkan oleh jaringan kelenjar yang berlokasi di miokardium atrial, suatu konsensus mulai berkembang di sekitar konsep bahwa jantung merupakan bagian dari sistem organ endokrin.⁽¹⁹⁾ Pada 1981, Adolfo de Bold memulai serangkaian studi yang mengarah pada ditemukannya ANP. Studi tersebut mengungkap adanya molekul granula atrial yang berubah densitasnya mengikuti perubahan volume intravaskuler.⁽¹⁹⁾ Eksperimen tersebut dikerjakan dengan menyuntikkan ekstrak miokardial atrium yang diikuti oleh respon cepat diuretik dan respon natriuretik pada tikus.⁽¹⁹⁾ Setelah diisolasi dan identifikasi dari peptida yang berperan pada efek tersebut merupakan deskripsi perdana dari famili NP/*Natriuretic Peptide*.⁽¹⁹⁾

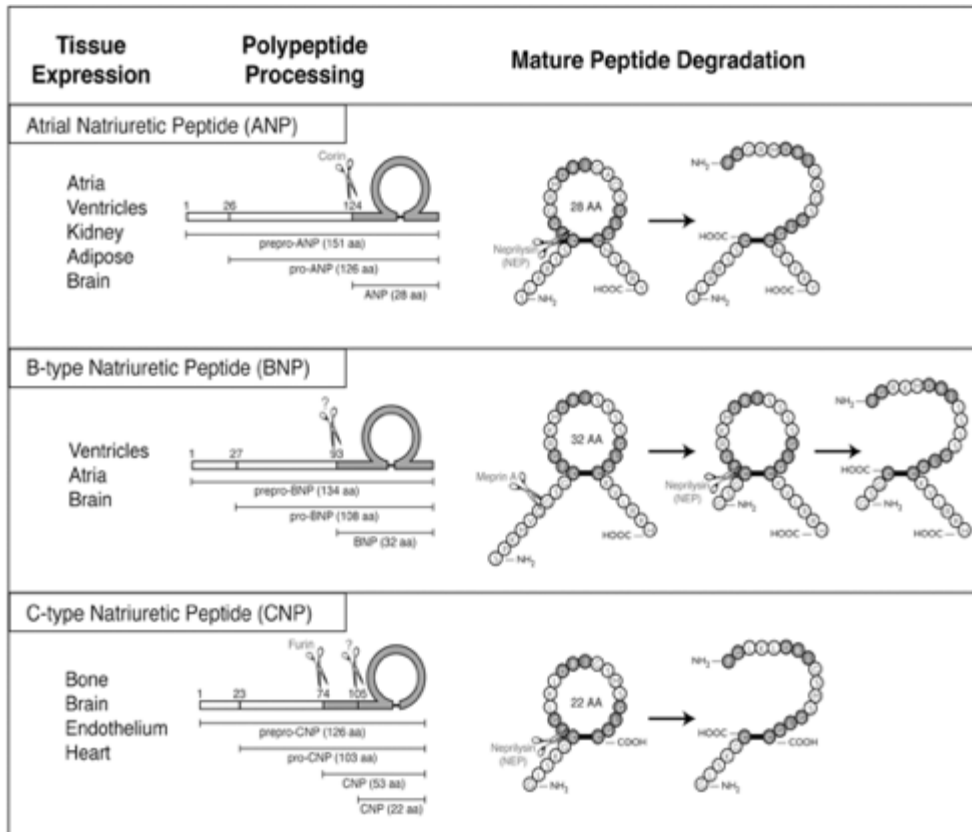
2.4.1 Struktur BNP

BNP pada mulanya dinamakan pBNP/*porcine brain natriuretic peptide* karena pertama kali ditemukan dari isolasi otak babi, pBNP memiliki 26 rangkaian asam amino yang memiliki kemiripan sekuen dengan *alpha human atrial natriuretic peptide*/α-hANP.^(49,50) Bentuk lainnya dengan penambahan enam residu pada *N-terminus*, BNP₁₋₃₂ dan bentuk prekursor yang lebih besar dengan berat 12 kDa telah ditemukan di jantung maupun otak babi.⁽⁴⁹⁾ Setiap gen NP menghasilkan pro-hormone peptida aktif yang dibentuk.^(19,49) Pada ANP, 126 asam amino prekursor awal dipecah untuk membentuk 96 asam amino N-terminal pro-peptida, dan 28 asam amino fragmen C-terminal.⁽¹⁹⁾ Peptida paling akhir adalah yang aktif secara biologik namun dengan waktu paruh yang sangat pendek setelah sekresi dikarenakan mudah terdegradasi.⁽¹⁹⁾ Sampai saat ini belum jelas ditemukan apakah pro ANP₁₋₁₂₆ yang tidak dipecah tetap bersirkulasi dalam jumlah yang signifikan.

Mengikuti translasi gen BNP, suatu produk gen perdana diproduksi, pre-proBNP₁₋₁₃₄. Peptida ini mengalami eliminasi cepat 26 asam amino sinyal peptida yang akan menghasilkan pro-hormon dengan 108 asam amino, proBNP₁₋₁₀₈.^(19,49) Kemudian, proBNP₁₋₁₀₈ dipecah oleh enzim proteolitik *furin* dan *corrin* untuk melepas dua bagian yaitu: 76 rangkaian asam amino terminal, NT-proBNP₁₋₇₆, dan molekul 32 rangkaian asam amino, BNP₁₋₃₂, yang memiliki karakteristik berupa rantai 17 asam amino dengan cincin ikatan disulfida yang penting untuk aktivitas biologik.^(19,49) Baik NT-proBNP₁₋₇₆ maupun BNP₁₋₃₂ dapat ditemukan dan diukur kadarnya di dalam plasma.

Stimulus yang jelas untuk ekspresi gen, transkripsi dan translasi ANP dan BNP adalah: regangan mekanis/*mechanical stretch*, hipoksia, endotelin-1, interleukin-1β, serta agonis alfa dan beta agonis.⁽¹⁹⁾ Sebagian besar ANP disintesa dan disimpan di jaringan atrial. Hal ini sangat kontras dengan BNP yang tampaknya tidak terlalu penting di atrium dibandingkan di ventrikel, 70% BNP cardiac dihasilkan dari ventrikel selama kondisi normal dan mencapai 88% selama kondisi patologis.⁽¹⁹⁾ Sebagai tambahan, sangat kontras dengan ANP, sebagian besar BNP disintesis karena aktivasi stimuli fisiologik yang meningkat secara cepat dan responnya ditingkatkan ketika sinyal sekresi peptida terus muncul dan cenderung untuk tidak disimpan dalam jaringan.⁽¹⁹⁾ Sumber BNP ekstra kardiak pada manusia

ditemukan di otak, paru-paru, ginjal, aorta dan kelenjar adrenal dalam konsentrasi yang lebih kecil.⁽¹⁹⁾ Struktur peptida natriuretik manusia dapat dilihat pada gambar 2.4.1.⁽⁵¹⁾



Gambar 2.4.1. Struktur peptida natriuretik pada manusia.⁽⁵¹⁾

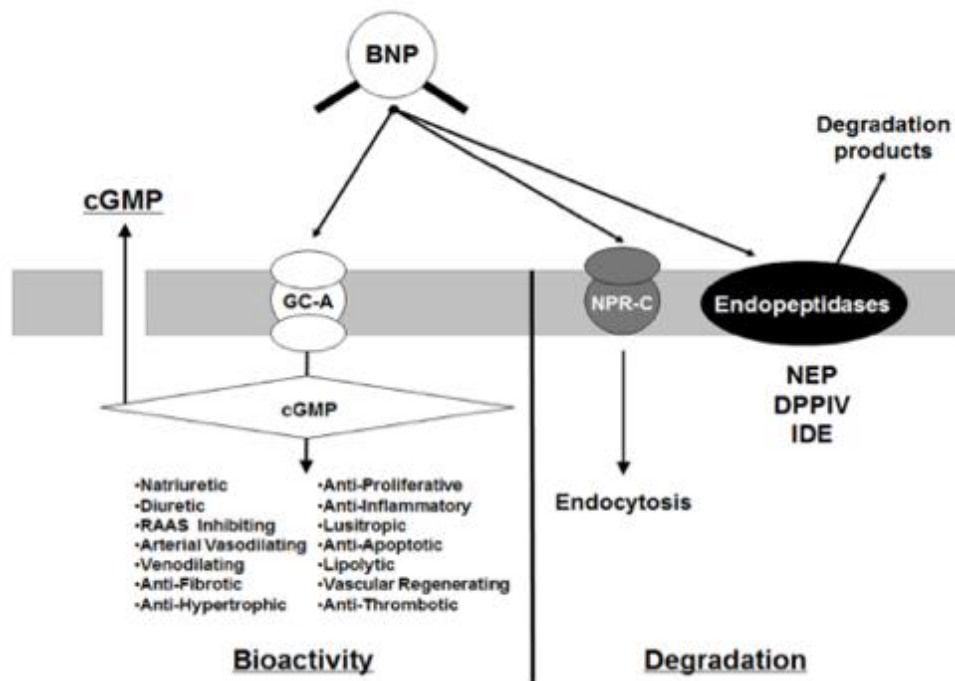
Peptida natriuretik berikatan pada tiga tipe reseptor yang terikat membran (NPR): NPR-A, NPR-B dan NPR-C.⁽⁴⁹⁾ Telah diketahui terdapat tiga protein pengikat peptida natriuretik.⁽⁵¹⁾ Semuanya memiliki domain pengikat ekstraseluler berukuran besar (sekitar 450 asam amino) dan region membran tunggal dengan panjang sekitar 20 residu.⁽⁵¹⁾ Reseptor peptida natriuretik A dan B memiliki domain intraseluler yang terdiri dari domain homolog kinase, domain dimerisasi, dan domain terminal karboksil guanilat siklase. Dengan demikian NPR-A dan NPR-B mencetuskan sinyal dengan mengkatalis sintesis molekul sinyal intraseluler cGMP, berbeda dengan NPR-C yang hanya memiliki 37 residu pada domain intraselulernya dan aktivitas guanilat siklase yang lebih sedikit. Kontrol utama NPR-C pada konsentrasi peptida natriuretik lokal dilakukan melalui internalisasi dan degradasi yang diperantarai reseptor.^(51,52)

Reseptor peptida natriuretik tipe A/NPR-A merupakan reseptor utama untuk peptida natriuretik atrial/ANP dan natriuretik tipe B/BNP. Gen NPR-A pada manusia berlokasi pada kromosom 1q21-22 dan terdiri dari 22 ekson dan 21 intron diantara 16 kilobasa.⁽⁵¹⁾ Dalam kondisi basal, NPR-A difosforilasi pada empat residu serine dan dua residu treonine yang berlokasi di porsi N-terminal domain homolog kinase. Fosforilasi merupakan hal yang penting untuk aktivasi NPR-A dan defosforilasi merupakan mekanisme desensitisasi sebagai respon terhadap pajanan ANP lama atau aktivasi protein kinase C.⁽⁵¹⁾ NPR-A mengikat peptida natriuretik pada perbandingan stoikiometri 2:1 dengan afinitas: $ANP \geq BNP \geq CNP$. NPR-A dan atau mRNAny diekspresikan di ginjal, paru-paru, jaringan adiposa, adrenal, otak, jantung, testis dan jaringan otot polos vaskuler.^(51,52)

Reseptor peptida natriuretik-B/NPR-B merupakan reseptor utama untuk peptida natriuretik tipe C (CNP) dan memiliki topologi, glikosilasi dan pola ikatan disulfida intra molekuler yang sama seperti NPR-A.^(51,52) NPR-B mengikat peptida natriuretik dengan selektivitas preferensi $CNP \geq ANP \geq BNP$.⁽⁵¹⁾ Gen NPR-B pada manusia berlokasi di kromosom 9p12-21. NPR-B dan atau mRNAny diekspresikan di tulang, otak, fibroblas, jantung, ginjal, hati, paru-paru, rahim, dan otot polos vaskuler.

Reseptor peptida natriuretik tipe C/NPR-C domain ligand ekstraselulernya identik sebesar 30-35% dengan NPR-A maupun NPR-B.⁽⁵¹⁾ Tautan dimer disulfida yang dimilikinya diketahui tidak memiliki aktivitas enzimatis namun berperan dalam transduksi sinyal terkait protein-G.⁽⁵²⁾ Sensitivitas ligandnya dimulai dari $ANP \geq CNP \geq BNP$. Bila dibandingkan dengan NPR-A maupun NPR-B, NPR-C memiliki aktivitas yang sedikit lebih ketat dan spesifik pada varian struktural ANP dan akan berikatan dengan afinitas tinggi pada analog ANP. Fungsi utama NPR-C, juga dikenal sebagai klirens reseptor, bertugas untuk membersihkan peptida natriuretik yang bersirkulasi melalui proses internalisasi yang diperantarai reseptor dan degradasi.⁽⁵¹⁾ NPR-C diketahui juga mengikat molekul sitokin yang homolog dengan CNP. Gen NPR-C manusia berlokasi pada kromosom 5p13-14 memiliki 8 ekson dan 7 intron yang membentang lebih dari 65 kilobasa. NPR-C merupakan reseptor yang paling banyak dan paling berlimpah ketersediaannya, hampir 94% tempat berikatan ANP di sel endotelial adalah NPR-C. NPR-C dan mRNAny

diekspresikan di kelenjar adrenal, otak, jantung, ginjal, mesenterium dan otot polos vaskuler.^(51,52) Bioaktivitas BNP dan proses degradasinya diilustrasikan pada gambar 2.4.1.1.⁽⁵²⁾



Gambar 2.4.1.1. Bioaktivitas BNP melalui aktivasi GC-A dan cGMP dan bersihan melalui jalur degradasi NPR-C.⁽⁵²⁾

2.4.2 Fungsi BNP

Peptida natriuretik dan reseptornya memediasi berbagai efek fisiologik mulai dari pengaturan tekanan darah sampai ke osifikasi endokondral. Kemampuan yang luas ini disebabkan respon yang dicapai pada jalur persinyalan melibatkan reseptor guanilat siklase spesifik.^(51,52)

BNP predominan diproduksi miokardium ventrikel kiri sebagai respons terhadap distensi miosit yang disebabkan ekspansi volume ventrikular atau tekanan yang berlebihan.⁽⁴⁹⁾ Mekanisme yang mendasari masih belum pasti diketahui, nampaknya BNP diregulasi oleh proses pasca translasional sehingga produk gen dapat meningkat secara cepat mengikuti respon terhadap stimulus.⁽⁴⁹⁾ Hal tersebut signifikan mengingat ANP yang juga memiliki respon yang sama terhadap stimulus, diregulasi pada tingkat pelepasan granula dari tempat penyimpanannya.

Karena itu respon pelepasan ANP tidak secepat dan tidak sebesar stimulus yang muncul.⁽⁴⁹⁾

Aktivitas BNP sebagai molekul kontra-regulatorik aktivitas sistem renin-angiotensin-aldosteron, untuk meningkatkan laju filtrasi glomerulus dan fraksi filtrasi sehingga berujung pada efek diuretik, natriuretik serta vasodilatasi.⁽⁵⁰⁾ Dengan demikian BNP akan memicu dilatasi pembuluh darah, menurunkan resistensi vaskuler serta memfasilitasi peningkatan stroke volume dan meningkatkan sekresi sodium melalui ginjal, meningkatkan produksi urin bersamaan dengan menurunkan volume dan juga tekanan darah.^(49,50)

2.4.3 BNP sebagai biomarker kelainan jantung

Gangguan kardiovaskuler memiliki rentang yang luas sehingga berujung pada kegagalan jantung untuk memompa darah sehingga menghasilkan suatu sindroma klinis yang dikenal sebagai gagal jantung/*heart failure*.⁽¹⁸⁾ Saat ini diperkirakan sekitar 5,8 juta orang di Amerika Serikat dan sekitar 23 juta orang diseluruh dunia menderita gagal jantung.⁽¹⁸⁾ Gagal Jantung/*payah jantung (fungsi jantung lemah)* adalah ketidakmampuan jantung memompa darah dalam jumlah cukup ke seluruh tubuh yang ditandai dengan sesak napas pada saat beraktifitas dan/atau saat tidur terlentang tanpa bantal, dan/atau tungkai bawah membengkak.⁽²⁾ Dari data Riset Kesehatan Dasar/RISKESDAS tahun 2013, di seluruh Indonesia prevalensi penderita gagal jantung mencapai 0,13% atau sekitar 229.696 orang.⁽²⁾ Dalam studi ADHERE-AP (Asia-Pasifik), dilaporkan bahwa di Asia Tenggara, pasien kelompok usia yang menderita gagal jantung secara umum lebih muda dengan usia median sebagai berikut: Filipina (53 tahun), Indonesia (60 tahun), Malaysia (61 tahun), Thailand (67 tahun), dan Singapura (71 tahun).^(1,53) Di Asia, penyebab gagal jantung terbanyak adalah: (1) penyakit arteri koronaria/*CAD* sekitar 40-50%, (2) penyakit jantung katup sekitar 20-35%, dan (3) kardiomiopati sekitar 15%.^(1,53)

Pasien dengan gagal jantung seringkali tidak menunjukkan gejala yang spesifik sehingga memunculkan diagnosis banding yang bermacam-macam, membuat diagnosis kerja berdasarkan gejala klinis saja seringkali menimbulkan tantangan tersendiri.^{(18)a4} Beberapa gejala seperti sesak napas/*dyspneu*, ortopnea,

dan *paroxysmal nocturnal dyspnea*, disebabkan oleh kongesti sementara gejala lain seperti *fatigue*, kelemahan, dan intoleransi olahraga, disebabkan oleh curah jantung yang tidak adekuat.⁽¹⁸⁾ Heterogenitas gejala inilah yang sering memakan waktu untuk menegakkan diagnosis dan terapi definitif, sehingga keterlambatan tersebut erat kaitannya dengan prognosis yang buruk.⁽¹⁸⁾ Evaluasi terhadap pasien yang dicurigai mengalami gagal jantung menggunakan cara tradisional (riwayat penyakit, pemeriksaan klinis dan foto toraks) seringkali tidak akurat terutama pada stadium awal penyakit. Pada kenyataannya, tanda dan gejala yang tersembunyi sering tidak berkaitan langsung dengan temuan objektif disfungsi jantung. Pemeriksaan *echocardiography* jantung sering dapat mengungkap etiologi gagal jantung, namun sensitivitasnya dalam deteksi fase patologis awal masih belum mencukupi. Hal ini dikarenakan pasien dengan abnormalitas fungsi ventrikel kiri seringkali pencitraan secara radiologis menunjukkan hasil yang normal.⁽¹⁸⁾ Tindakan penunjang diagnostik yang bersifat invasif seperti kateterisasi jantung dapat dipakai untuk mengidentifikasi maupun mengeksklusi gagal jantung. Kateterisasi jantung merupakan baku emas untuk menentukan besaran curah jantung dan tekanan ruang ventrikel, namun seperti yang telah dikatakan sebelumnya, banyak pasien dengan curah jantung dan tekanan ventrikel abnormal tidak memiliki sindrom klinis gagal jantung.⁽¹⁸⁾

Seiring dengan berkembangnya ilmu biomolekuler, teknik pengambilan sampel yang semakin mudah, dan prosedur pemeriksaan sampel yang cepat memungkinkan alternatif penunjang diagnosis gagal jantung menggunakan deteksi penanda biologis atau yang juga dikenal sebagai *biomarker* terbuka lebar.⁽¹⁸⁾ Dalam evolusi perjalanan penyakit dari a) organ berisiko namun normal secara struktur, b) gangguan-kerusakan/*injury* miokardium, c) disfungsi ventrikel, d) progresivitas gejala HF, saat ini dapat diketahui berbagai jalur aktivasi neurohormonal dan perubahan-perubahan struktur/*remodeling* terkait melalui salah satu biomarker berupa peptida natriuretik seperti BNP/*B-type natriuretic peptide* maupun *N-terminal proBNP* (NT-proBNP).⁽¹⁸⁾ Berbagai biomarker pada gagal jantung, aktivasi neurohormonal yang mengikuti dan proses remodeling yang terjadi dirangkum pada tabel 2.

Sebuah studi di Amerika yang bernama *The Breathing Not Properly* mengukur kadar BNP pada 1586 pasien yang berkunjung ke departemen emergensi dengan keluhan dispnea. Investigator menemukan bahwa pasien yang secara klinis didiagnosa gagal jantung memiliki kadar BNP yang lebih tinggi dibandingkan pasien yang tidak memiliki gagal jantung (mean 675 ± 450 vs. 110 ± 225 pg/mL, $p < 0.001$). Menurut NYHA/*New York Heart Association*, meningkatnya keparahan gagal jantung sesuai dengan kelas fungsional yang ditentukan, berkorelasi secara langsung dengan peningkatan konsentrasi BNP ($p < 0.001$).^(18,54) BNP merupakan prediktor tunggal terbaik untuk diagnosis akhir gagal jantung dibandingkan dengan riwayat penyakit individual, pemeriksaan fisik, foto toraks, dan hasil laboratorium.⁽¹⁸⁾ Peningkatan konsentrasi BNP plasma juga telah diobservasi pada kardiomiopati hipertrofik, disfungsi diastolik dan hipertrofi ventrikel kiri. Pada subjek ini, level BNP berkaitan dengan indeks massa miokardial dan ketebalan dinding interventrikular dan posterior.⁽⁵⁴⁾

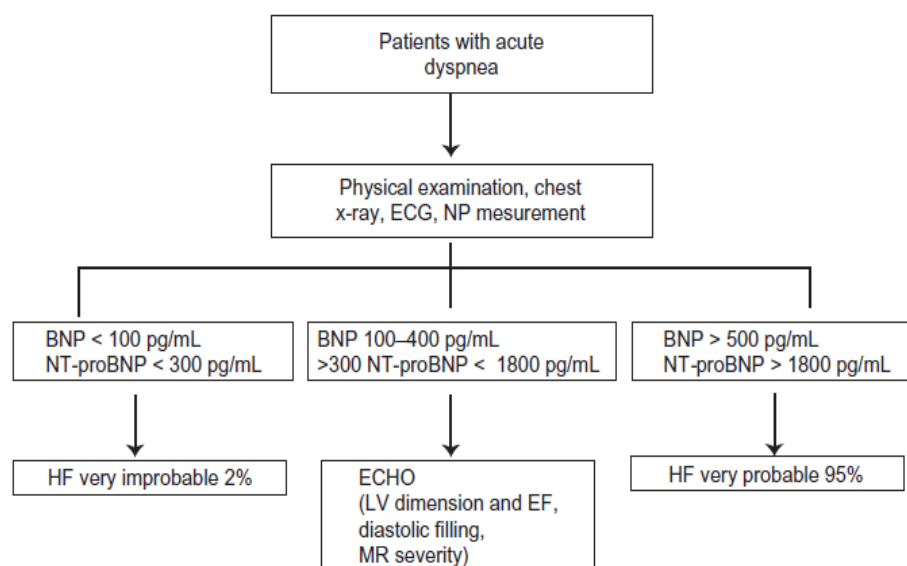
NT-proBNP dilepaskan melalui mekanisme yang berbeda dan memiliki waktu paruh yang lebih lama dibandingkan BNP (70 menit berbanding 20 menit), namun dipercaya memiliki kemampuan yang sama untuk mengevaluasi pasien dengan kecurigaan gagal jantung. Penggunaan NT-proBNP untuk mendiagnosis gagal jantung terdekompensasi pertama kali ditunjukkan pada studi PRIDE/*The ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department*, di mana NT-proBNP memiliki AUC/area under the curve sebesar 0.94 ($p < 0.01$) untuk mendiagnosis gagal jantung, membandingkan dengan suplementasi penilaian klinis seperti yang dilakukan BNP pada studi *The Non Breathing Properly*.⁽¹⁸⁾ Pada studi ADHERE/*Acute Decompensated Heart Failure National Registry*, pada sekitar 48.629 pasien yang dirawat karena gagal jantung akut terdekompensasi, terdapat hubungan linear antara peningkatan kadar BNP dengan peningkatan mortalitas di rumah sakit setelah memperhitungkan faktor risiko klinis dan laboratoris. Doust et al menampilkan hasil 19 studi yang melihat kemampuan prognostik BNP terhadap kematian atau kejadian kardiovaskuler, dan menemukan bahwa tiap kenaikan 100pg/mL BNP berhubungan dengan peningkatan 35% pada risiko relatif kematian (95% CI 22-49%, $p = 0.096$). Pada kasus gagal jantung kronik, baik BNP maupun NT-proBNP bermanfaat untuk mendeterminasi prognosis. Peningkatan BNP atau

NT-proBNP juga merupakan prediktor yang baik untuk kemungkinan terjadinya gagal jantung di kemudian hari maupun kejadian kardiovaskuler lainnya pada pasien yang asimtomatik dan tanpa tanda klinis yang jelas.⁽¹⁸⁾ Algoritma diagnosis gagal jantung berdasarkan level peptida natriuretik dan ekokardiografi dirangkum dalam gambar 2.4.3.

Tabel 2.4.3. Berbagai penanda biologis pada gagal jantung.⁽¹⁸⁾

Perubahan miokardial	Aktivasi neurohormonal	Remodeling
Regangan miosit • NT-proBNP, BNP, MR-proANP	Sistem renin-angiotensin • Renin, angiotensin II, aldosteron	Inflamasi • <i>C-reactive protein, tumor necrosis factor α, interleukin, osteoprotegrin, adiponectin</i>
Cedera miokardium • Troponin T, Troponin I	Sistem saraf simpatis • Norepinefrin, <i>chromogranin A</i>	Hipertrofi/fibrosis • <i>Matrix metalloproteinase, collagen propeptide, galectin 3, soluble ST2</i>
Stress oksidatif • <i>Meyloperoxidase, oxidized low-density lipoprotein, MR-pro ADM</i>	Sistem arginin-vasopresin • Arginin vasopresin	Apoptosis • GDF-15

Keterangan : BNP= *B-type natriuretic peptide*, GDF-15= *growth differentiation factor-15*, MR-proADM= *midregional pro adrenomodulin*, MR-proANP= *mid-regional pro atrial natriuretic peptide*, NT-proBNP= *N-terminal pro- B-type natriuretic peptide*.



Gambar 2.4.3. Algoritma diagnosis gagal jantung berdasarkan level NP & ekokardiografi.⁽⁵⁴⁾

Panduan Uni Eropa pada 2008 menekankan peran peptida natriuretik/NP sebagai penanda potensial untuk gagal jantung.⁽⁵⁴⁾ Oleh karena itu, peptida natriuretik nampaknya menjadi prediktor independen mortalitas pada pasien gagal jantung kongestif. Meskipun banyak studi menunjukkan BNP merupakan penanda dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi, aplikasinya dalam praktek klinis sering terhambat karena tidak adanya nilai normal yang secara universal dapat diterima.⁽⁵⁴⁾ Determinasi tunggal BNP pada berbagai waktu selama progresifitas gagal jantung kronik secara klinis sangat bermanfaat untuk stratifikasi risiko. Karena hal itulah beberapa pusat studi merekomendasikan pemeriksaan BNP dapat dilakukan berulang atau serial untuk memonitor progresifitas penyakit dan mengevaluasi klinis dari terapi yang telah diberikan.⁽⁵⁴⁾

Dengan demikian, pemeriksaan BNP maupun NT-proBNP merupakan *gold standard* untuk penanda terjadinya gagal jantung serta dapat digunakan juga untuk mengevaluasi progresifitas penyakit dan kemajuan hasil terapi. Namun, agar diagnosis dapat lebih akurat maka hasil pemeriksaan BNP juga harus dikombinasikan dengan pemeriksaan penunjang yang lain seperti *echocardiography*, EKG, dan foto toraks.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi eksperimental *in vivo* pada tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* usia 24-28 minggu yang dibagi secara acak/random menjadi 2 kelompok yaitu: (1) kelompok Kontrol (K), dan (2) kelompok perlakuan (P).

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pemberian perlakuan pada hewan coba yang dilakukan di Laboratorium hewan coba LITBANGKES KEMENKES RI pada bulan Oktober 2017 hingga Januari 2018, dilanjutkan dengan pemeriksaan EKG di Laboratorium Departemen Farmakologi FKUI dan analisis ELISA bertempat di Laboratorium Terpadu FKUI.

3.3 Subyek Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih *Sprague Dawley* jantan usia 6-7 bulan dengan berat badan 250-350 gram yang dibiakkan di Laboratorium LITBANGKES Kemenkes RI Jakarta. Sebelum dan selama perlakuan, hewan coba ditempatkan di dalam kandang dengan kebersihan yang dijaga dengan baik. Penerangan kandang diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap. Makanan dan minuman diberikan secara terukur dan jumlahnya disesuaikan dengan kebutuhan perharinya. Suhu lingkungan dipertahankan pada suhu 25°C. Hal-hal lainnya yang berkaitan dengan perlakuan hewan coba disesuaikan dengan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba. Desain dan metode pada penelitian ini telah lolos kaji etik oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI dengan nomor 704/UN.2F1/ETIK/VI/2018 tanggal 25 Juni 2018.

3.3.1 Penetapan Jumlah Hewan Coba

Jumlah sampel hewan coba pada penelitian ini ditentukan menggunakan rumus *Mead*, yaitu:

$$E = N - T - B$$

Dengan:

$E = \text{degree of freedom}$ yang berkisar antara 10-20

N = total hewan coba yang digunakan (diurangi 1)

$B = \text{blocking component}$ menggambarkan pengaruh lingkungan yang diperbolehkan dalam penelitian (dianggap 0)

T = jumlah kelompok perlakuan (dikurangi 1)

Perhitungan sebagai berikut:

$$E = N - T - B$$

$$10 = (N-1) - 0 - (2-1)$$

$$10 = N - 2$$

$$N = 12$$

$$E = N - T - B$$

$$20 = (N-1) - 0 - (2-1)$$

$$20 = N - 2$$

$$N = 22$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka didapatkan jumlah sampel/hewan coba sebanyak 12-22 ekor. Pada penelitian ini terdapat 2 kelompok (1 kelompok kontrol dan 1 kelompok perlakuan) dengan 6 sampel untuk setiap kelompok maka didapat jumlah total sampel adalah 12 ekor tikus. Jumlah sampel berada di rentang 12-22, sesuai dengan rumur perhitungan menurut Mead. Jumlah hewan coba ini sesuai dengan anjuran dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.3.2 Kriteria Hewan Coba

Hewan coba yang menjadi subjek penelitian harus memenuhi kriteria yang telah ditetapkan sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi

Tikus (*Rattus noervegicus*) jantan, galur *Sprague Dawley*, pada awal perlakuan berumur 9 bulan dengan berat badan awal 300-350 gram.

2. Kriteria eksklusi

Sakit, tidak aktif, mati bukan akibat perlakuan.

3. Kriteria Drop out

Sakit, tidak aktif, mati bukan akibat perlakuan.

3.4 Variabel penelitian dan definisi operasional

Pada penelitian ini terdapat dua variabel yakni variabel bebas dan variabel terikat sebagai berikut:

Tabel 3.4. Berbagai variabel penelitian dan definisi operasionalnya.

Variabel	Nama Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Satuan
Bebas	Defisiensi kobalamin/ vitamin B12	Suatu keadaan penurunan vitamin B12 plasma, peningkatan homosistein plasma, dan peningkatan asam metilmalonil plasma	ELISA	ng/L (nanogram /liter)
Terikat	Elektro-kardiogram/ EKG	Rekaman aktivitas listrik jantung dalam bentuk gelombang P, kompleks QRS, dan gelombang T	Elektro-kardiograf	mm (milimeter) dan miliVolt (mV)
Terikat	Tebal miokardium	Satuan yang menggambarkan ukuran/ tebal jaringan	Micro-caliper	mm (milimeter)
Terikat	Protein PGC-1 α kardiomyosit	Protein koaktivator transkripsi yang berperan dalam regulasi energi mitokondria	ELISA	ng/mL per total protein
Terikat	Protein BNP-45 plasma	Protein derivat peptida natriuretik yang disekresikan oleh kardiomyosit	ELISA	pg/mL (picogram/ mililiter)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah plasma darah dan protein yang diekstraksi dari jantung hewan coba.

3.5.2 Zat kimia untuk Penelitian

Zat kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah; larutan NaCl 0.9% (Otsuka), larutan PBS/*phosphate buffer saline* pH 7.4 (BioRad), larutan anestesi umum Ketamine-Xylazine (Biofarma), larutan Bradford (BioRad), alkohol 70%, larutan formalin 10%, larutan *chrommasie brilliant blue/CBB*, kit ELISA Rats VitB12 (MyBioSource 731816), kit ELISA Rats Hcy (MyBioSource 109432), kit ELISA Rats PGC-1alpha (MyBiosource 2885172) dan kit ELISA Rats BNP-45 (AssayPro).

3.5.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: peralatan bedah minor (bisturi/scalpel, pinset, gunting), spuit 3cc dan 5cc, timbangan digital, jangka sorong/*microcaliper*, mikropipet, tube *Eppendorf*, *storage box*, cuvette, underpad, *cold centrifuge*, *petri dish*, *ultrasonic disrupter*, inkubator, vorteks, *stopwatch*, meja operasi, ELISA reader, spektrofotometer, *freezer*, dan kamera perekam (Asus ZenMax).

3.5.4 Cara Kerja

3.5.4.1 Perlakuan Subjek Penelitian

Pada penelitian ini hewan coba diambil secara acak dan dibagi dalam dua kelompok, yaitu:

1. Kelompok Kontrol (K), diberikan pakan jenis AIN-93M standar/ dengan kandungan nutrisi yang lengkap (non-defisien vitamin B12).
2. Kelompok Perlakuan (P), diberikan pakan jenis AIN-93M termodifikasi (defisien vitamin B12 dan ditambahkan zat *pectin* sebanyak 5% perKg untuk menghambat absorpsi kobalamin).

Kedua kelompok diberikan perlakuan selama 16 minggu. Seluruh kelompok hewan coba dilakukan penimbangan berat badan setiap minggu sebelum diberikan pakan dan setelah diberikan pakan.

3.5.4.2 Pemeriksaan EKG

Elektrokardiografi dilakukan pada hewan coba sebelum dekapitasi pada minggu ke-16. Sebelum EKG dilakukan, terlebih dahulu dilakukan anestesi umum dengan teknik yang sama namun dengan dosis yang lebih sedikit tujuannya untuk memberi efek sedasi yang reversibel. Setelah efek sedasi tercapai dan hewan coba dalam kondisi rileks, dilakukan restrain di atas meja operasi pada keempat ekstremitas menggunakan perekat adhesive. Elektroda berupa jarum akupunktur yang telah dilengkapi *patch* dipasang dan diletakkan subkutan pada keempat ekstremitas yakni lengan kanan/AVR, lengan kiri/AVF, tungkai kiri/AVF, dan tungkai kanan sebagai ground. Selain itu elektroda juga diletakkan pada area toraks/sandapan *precordial* pada titik proyeksi V1 di garis midsternalis kanan dan titik proyeksi V6 di garis aksilaris kiri. Setelah elektroda terpasang dengan baik, elektroda dihubungkan dengan alat EKG dan kecepatan rekam kertas diatur pada level 10mV/detik. Perekaman EKG dilakukan selama satu siklus jantung hingga didapatkan gelombang dengan pola sinus yang dapat diinterpretasi dengan baik dan jelas. Alat EKG yang digunakan adalah tipe BTL-08MT Plus (USA).

3.5.4.3 Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel darah diambil sebelum perlakuan pada minggu ke-0 dan pada akhir perlakuan minggu ke-16 kemudian hewan coba didekapitasi untuk diambil jantungnya untuk selanjutnya dilakukan analisis morfologi dan biomolekulernya. Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, dilakukan tindakan anestesi umum menggunakan zat anestesia berupa campuran ketamine dan xylazine (ketamine dosis 100 mg/KgBB + xylazine dosis 5 mg/KgBB). Penyuntikan zat anestesia dilakukan secara *intraperitoneal*. Pengambilan sampel darah dilakukan melalui 2 cara yakni: (1) dari area sudut belakang mata/*sinus orbitalis* menggunakan kanul dan (2) dari *intracardiac* menggunakan spuit 3cc (dilakukan saat dekapitasi). Sampel darah kemudian disimpan dalam *vacuette* yang telah berisi antikoagulan

EDTA. Setelah disimpan dalam tabung EDTA, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma darah murni. Setelah didapatkan plasma darah murni, dilakukan *pipetting* dan plasma dipindahkan ke microtube *Eppendorf*. Sampel ditaruh di dalam *storage box* dan disimpan pada suhu -80°C .

Pengambilan sampel jaringan dilakukan bersamaan dengan proses dekapitasi dengan metode *embedding*. Pertama-tama dilakukan anestesi umum dengan dosis dan cara yang sama. Setelah hewan coba cukup tenang kemudian diretraksi pada keempat ekstremitas di atas meja diseksi. Setelah hewan coba diretraksi, kemudian dilakukan sayatan pada bagian abdominal hingga ke torakal lapis demi lapis hingga tampak struktur organ bagian dalam. Jantung diidentifikasi, lalu sampel darah diambil dengan menusukkan spuit 3cc ke ventrikel kiri. Ligasi dilakukan dengan benang nylon ukuran 3.0 pada pembuluh aorta dan vena kava superior. Jaringan sekitar jantung dibebaskan lalu pada bagian distal dari simpul ikatan pembuluh darah dipotong. Setelah jantung didapatkan kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0.9% hingga bersih dan dikeringkan lalu diukur serta ditimbang menggunakan neraca dengan skala akurasi 0.1-100 gram. Kemudian dilakukan diseksi organ jantung dengan menyusuri pembuluh darah aorta hingga ke bagian apeks/ventrikel kiri. Setelah didapatkan jantung yang sudah terbuka, diidentifikasi empat ruang sesuai anatomi yang ada lalu dilakukan pemotongan sebagian kecil area ventrikel kiri untuk mendapatkan jaringan yang akan dibuat homogenat. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam tube dan ditaruh di dalam *storage box* serta disimpan juga pada suhu -80°C .

3.5.4.4 Pembuatan Homogenat Jaringan Jantung

Jaringan jantung/ventrikel kiri yang telah ditimbang dan disamakan beratnya 0.15 gram (berat jaringan terkecil yang diperbolehkan) kemudian dihomogenasi dengan merujuk pada petunjuk/*manual kit* ELISA dari MyBiosource dan AssayPro. Jaringan dicuci dan dibilas dalam larutan PBS bersuhu dingin untuk menghilangkan darah yang masih tersisa. Jaringan dimasukkan ke dalam tabung berisi 5-10ml larutan PBS. Tabung diletakkan di dalam sebuah gelas berisi serbuk es kemudian sampel siap dikerjakan. Proses homogenasi dikerjakan dengan teknik

sonikasi menggunakan *ultrasound cell disrupter*. Setelah didapat larutan yang cukup homogen, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000G selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan yang terbentuk kemudian dipisahkan dengan pelletnya dan dibuat menjadi *aliquot*. Homogenat jaringan dan aliquot kemudian disimpan pada suhu $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

3.5.4.5 Pemeriksaan protein total/Bradford protein assay

Larutan sampel homogenat yang telah dihomogenasi/aliquot akan diukur kadar protein totalnya menggunakan metode Bradford. Larutan sampel yang akan diukur diencerkan sebanyak 3-5 kali. Larutan standar dibuat dari *dye reagent* dengan mendilusi 1 bagian reagen konsentrat dengan 4 bagian aquadestilata atau larutan PBS. Reagen difilter menggunakan filter Whatmann untuk menghilangkan partikulat. Dimasukkan 10 μL larutan standard dan sampel ke dalam well yang berbeda. Ditambahkan 200 μL larutan dye reagen yang telah diencerkan ke dalam masing-masing well. Dicampur menggunakan shaker atau dengan cara resuspensi dengan pipet saat memasukkan sample. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama minimal 5 menit, dan tidak lebih dari 1 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595nm. Hasil dari larutan standar dibuat kurva standar dan diplot ke nilai absorbansinya untuk mendapatkan nilai protein total.

3.5.4.6 Prosedur Pemeriksaan kadar Vitamin B12 plasma dan Homocystein plasma dengan ELISA

Pengukuran kadar vitamin B12/kobalamin dan penanda defisiensi B12 berupa homosistein/Hcy, dilakukan menggunakan reagen kit ELISA produk MyBioSource. Plasma darah dan kit ELISA diambil dari tempat penyimpanan dan dibiarkan berada dalam suhu ruangan (18-25°C) sebelum digunakan. *Microtiter plate*/sumur berjumlah 96 buah yang sudah terlapisi antibodi disiapkan. Sampel dikerjakan dengan cara duplo. Sembilan puluh enam sumur pada plate dibagi menjadi sumur kosong/blanko, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel yang akan diuji. Urutan prosedural dalam mengerjakannya sebagai berikut:

- 1) Sumur kosong, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel uji pada plate disiapkan.
- 2) Dimasukkan 100 μ L larutan standar (kocok larutan secara lembut menggunakan pipet dengan cara naik turun berulang sebanyak 3 kali) atau sampel pada sumur yang dikehendaki. Dimasukkan 100 μ L larutan PBS (pH 7.0-7.2) pada sumur blanko.
- 3) Dimasukkan 50 μ L konjugat pada setiap sumur (kecuali sumur blanko). Dicampur dengan baik kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.
- 4) Microtiter plate dicuci dengan cara sebagai berikut:
 - a. Pencucian manual: campuran yang telah terinkubasi dihilangkan dengan mengaspirasi isinya ke kontainer pencuci yang telah disediakan. Tiap well diisi dengan 1x larutan pencuci kemudian aspirasi diulang dengan cara yang sama. Prosedur ini diulang sampai 5 kali. Setelah dicuci, plate dibalikkan dan dikeringkan dengan mengetuk-ketukan ke alas kertas penyerap atau handuk penyerap sampai kelembaban tidak terjadi. Bagian sisi plate dipegang dengan baik agar seluruh sumur tetap pada tempatnya dan tidak tercerai berai.
 - b. Pencucian otomatis: Plate dicuci 5 kali dengan larutan pencuci (350-400 μ L/well/sekali cuci) menggunakan pencuci otomatis. Setelah pencucian, dikeringkan dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Sangat direkomendasikan pencucian dilakukan selama 10 detik dan digoyangkan selama 5 detik di antara setiap pencucian.
- 5) Dimasukkan 50 μ L substrat A dan 50 μ L substrat B pada setiap well termasuk well untuk blanko/kontrol kemudian ditutup dan diinkubasikan selama 10-25 menit pada suhu 37°C (usahakan tidak terpajan sinar matahari)
- 6) Dimasukkan 50 μ L larutan penghenti/stop solution pada setiap well termasuk well untuk blanko dan dicampur dengan baik.
- 7) Pembacaan densitas optik dilakukan pada panjang gelombang 450nm menggunakan *microplate reader* sesegera mungkin.

Larutan di sumur kosong dianggap sebagai blanko, larutan standar dibuatkan kurva standarnya, kemudian larutan uji ditentukan nilai konsentrasinya berdasarkan nilai absorbansi yang diplot ke kurva standar.

3.5.4.7 Prosedur Pemeriksaan protein PGC-1alpha dan BNP-45 dengan ELISA

Pengukuran kadar protein PGC-1alpha dilakukan menggunakan reagen kit ELISA produk MyBioSource. Homogenat dan kit ELISA diambil dari tempat penyimpanan dan dibiarkan berada dalam suhu ruangan. Mikrotiter plate berjumlah 96 buah yang sudah terlapisi antibodi disiapkan. Sampel dikerjakan dengan cara duplo. Sembilan puluh enam sumur pada plate dibagi menjadi sumur kosong/blanko, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel yang akan diuji. Urutan prosedural dalam mengerjakannya sebagai berikut:

- 1.) Sumur kosong, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel uji pada plate disiapkan.
- 2.) Dimasukkan 100µL larutan standar, blanko, dan sampel pada tiap sumur yang dikehendaki. Ditungkap dengan perekat dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C.
- 3.) Cairan pada tiap well dihilangkan, namun tidak dicuci. Dimasukkan 100µL reagen deteksi A di setiap sumur. Ditungkap dengan perekat dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Bila reagen deteksi A terlihat keruh, dihangatkan dengan suhu ruangan dan dicampur perlahan-lahan hingga larutan tampak homogen.
- 4.) Setiap sumur diaspirasi kemudian dicuci, proses pencucian diulang sebanyak 3 kali. Pencucian dilakukan dengan mengisi setiap sumur dengan larutan pencuci menggunakan pipet multikanal atau dengan mesin pencuci otomatis dan diberi jeda 1-2 menit antara tiap proses pencucian. Setelah proses pencucian, larutan pencuci yang tersisa dibersihkan dengan cara menepuk-nepuk plate/membalikkan ke kertas pengering yang bersih.
- 5.) Dimasukkan reagen deteksi B sebanyak 100µL pada setiap sumur. Ditungkap dengan perekat yang baru dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
- 6.) Proses aspirasi diulang, kemudian dicuci dengan cara yang sama sebanyak 5 kali.
- 7.) Dimasukkan 90µL larutan substrat pada tiap sumur, ditungkap dengan perekat yang baru dan diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C. Dilindungi dari cahaya matahari.

- 8.) Dimasukkan 50 μ L larutan penghenti pada setiap sumur. Jika perubahan warna tidak sama maka diketuk-ketuk secara perlahan hingga larutan tercampur secara bersamaan.
- 9.) Pembacaan densitas optik dilakukan pada panjang gelombang 450nm menggunakan microplate reader sesegera mungkin.

Larutan di sumur kosong dianggap sebagai blanko, larutan standar dibuatkan kurva standarnya, kemudian larutan uji ditentukan nilai konsentrasinya berdasarkan nilai absorbansi yang di plot ke kurva standar.

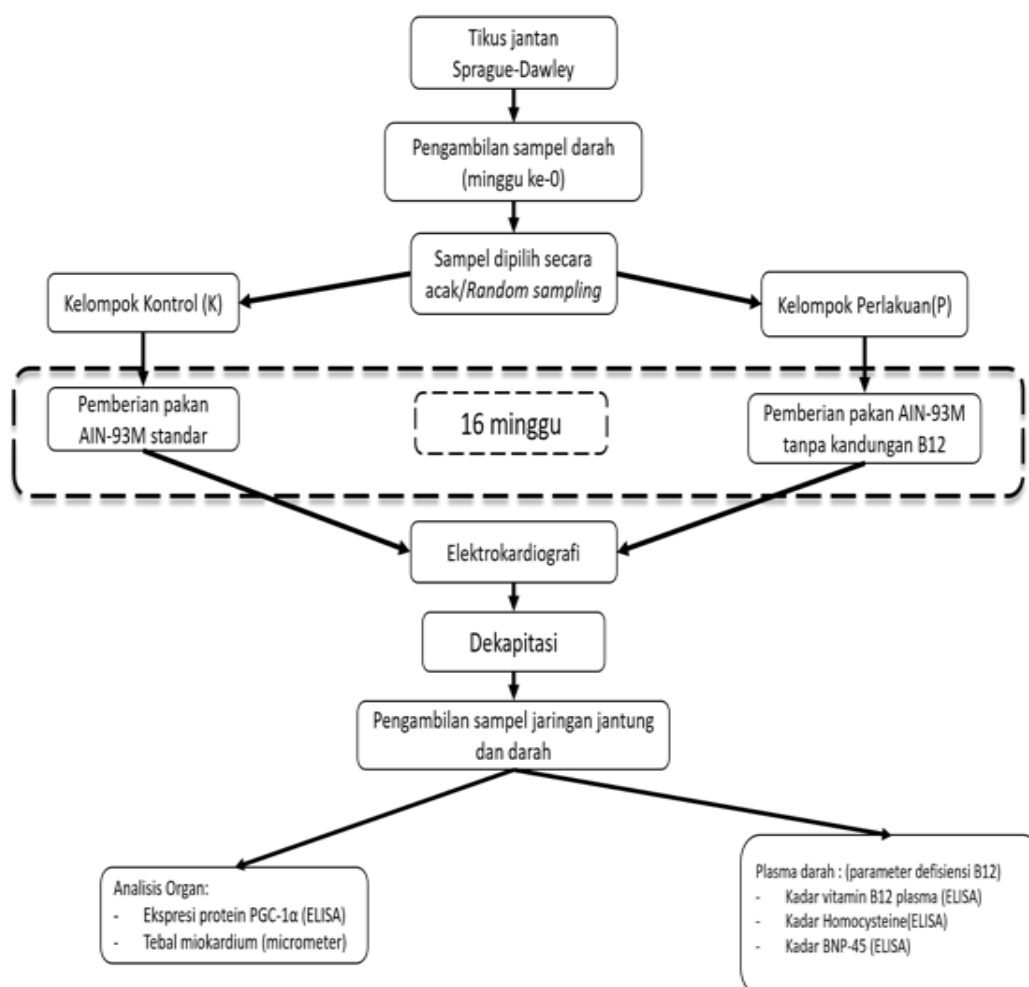
Pengukuran kadar BNP-45 dilakukan menggunakan reagen kit ELISA produk AssayPro. Plasma darah dan kit ELISA diambil dari tempat penyimpanan dan dibiarkan berada dalam suhu ruangan. Mikrotiter plate berjumlah 96 buah yang sudah terlapisi antibodi disiapkan. Sampel dikerjakan dengan cara duplo. Sembilan puluh enam sumur pada plate dibagi menjadi sumur kosong/blanko, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel yang akan diuji. Urutan prosedural dalam mengerjakannya sebagai berikut:

- 1.) Sumur kosong, sumur untuk larutan standar, dan sumur untuk sampel uji pada plate disiapkan.
- 2.) Dimasukkan 50 μ L larutan standar atau sampel pada tiap sumur. Plate diketuk dengan seksama sampai larutan menutupi seluruh sumur. Gelembung yang muncul dipecahkan. Ditutup dengan perekat dan diinkubasi selama 2 jam.
- 3.) Microplate dicuci secara manual atau otomatis menggunakan pencuci. Plate dibalik kemudian ditepuk-tepuk pada alas penyerap sebanyak 4-5 kali untuk menghilangkan cairan. Jika memakai pencuci, dicuci sebanyak 6 kali dengan 300 μ L larutan pencuci pada tiap sumur. Pengeringan diulang dengan cara yang sama.
- 4.) Dimasukkan 50 μ L antibodi BNP-45 terbiotinilasi pada setiap sumur. Plate diketuk-ketuk secara perlahan. Setiap gelembung yang muncul dipecahkan. ditutup dengan perekat dan diinkubasi selama 30 menit. Alat pembaca dinyalakan dan dipilih program yang sesuai.
- 5.) Microplate dicuci sesuai dengan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

- 6.) Dimasukkan 50 μ L kromogen substrat pada tiap sumur. plate diketuk-ketuk perlahan-lahan. Tiap gelembung yang timbul dipecahkan. Diinkubasi selama 8 menit atau sampai muncul densitas warna biru yang optimal.
- 7.) Dimasukkan 50 μ L larutan penghenti pada tiap sumur. Warna akan berubah dari biru menjadi kuning. Plate kembali diketuk perlahan-lahan. gelembung yang terbentuk dihilangkan.
- 8.) Pembacaan densitas optik dilakukan pada panjang gelombang 450nm menggunakan microplate reader sesegera mungkin.

Larutan di sumur kosong dianggap sebagai blanko, larutan standar dibuatkan kurva standarnya, kemudian larutan uji ditentukan nilai konsentrasinya berdasarkan nilai absorbansi yang di plot ke kurva standar.

3.6 Alur Penelitian



3.7 Analisis Data

Seluruh data hasil penelitian diuji normalitasnya dengan uji Saphiro-Wilk. Uji homogenitas data menggunakan uji Levenne. Data berat badan dianalisis menggunakan uji T-berpasangan/*paired-T test*. Pada variabel EKG terdapat empat parameter yakni: (1) *Heart rate*/HR dianalisis menggunakan uji T-independen, (2) *QTcorrected interval*/QTc dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*, (3) *RS amplitude* dianalisis menggunakan uji T-independen, dan (4) *QRS-T angle* dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*. Untuk data variabel tebal miokardium dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*. Parameter vitamin B12 plasma dianalisis menggunakan uji T-berpasangan/*paired-T test*. Parameter homosistein/Hcy plasma dianalisis menggunakan uji T-berpasangan dan uji T-independen. Parameter PGC-1 α jantung dianalisis menggunakan uji T-independen. Parameter BNP-45 plasma dianalisis menggunakan uji T-independen. Korelasi antara parameter PGC-1 α dengan parameter BNP-45 dianalisis menggunakan uji *Pearson*. Data penelitian ini diolah menggunakan program statistik SPSS versi 21.

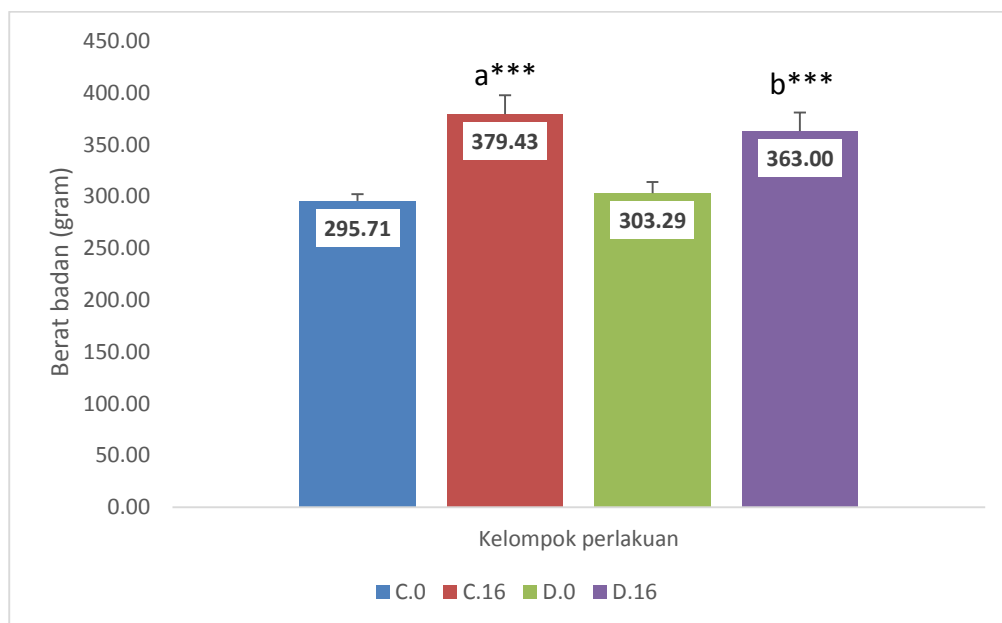
BAB 4

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12 terhadap fungsi jantung tikus putih jantan ditinjau dari gambaran EKG jantung, ekspresi protein PGC-1 α jantung dan kadar protein BNP-45 plasma. Perlakuan pada hewan coba dilakukan selama 16 minggu yang bertempat di Laboratorium hewan coba Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan/LITBANGKES Kementerian Kesehatan RI bekerja sama dengan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/FKUI.

4.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Pada permulaan penelitian, berat badan tikus pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan homogen secara statistik. Selama periode waktu perlakuan 16 minggu, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan menunjukkan adanya pertambahan berat badan seiring dengan bertambahnya umur. Data rerata berat badan tikus pada minggu ke-0 dan minggu ke-16 pada masing-masing kelompok disajikan pada gambar 4.1.1.



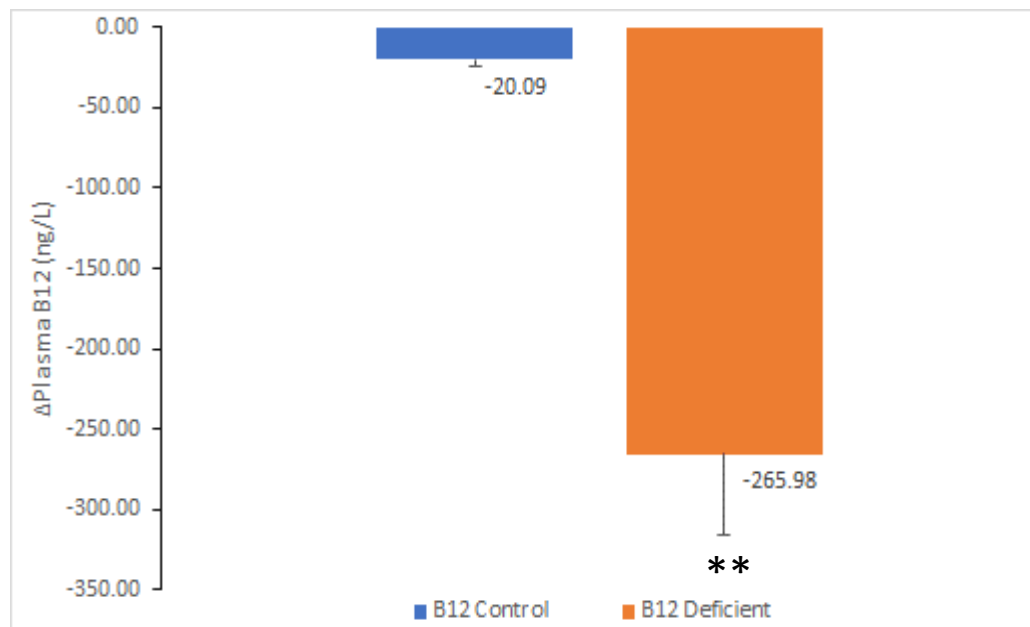
Gambar 4.1.1. Rerata berat badan hewan coba minggu ke-0 dan minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, $a^{***}p<0.001$ vs C.0, $b^{***}p<0.001$ vs D.0.

Berdasarkan gambar 4.1.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara berat badan pada minggu ke-0 kelompok kontrol maupun kelompok defisien. Namun pada minggu ke-16, terdapat perbedaan berat badan yang bermakna pada kelompok kontrol maupun kelompok defisien, $p=0.0001$ (C.16 vs C.0 & D.16 vs.D.0, $p<0.001$).

4.2 Hasil analisis vitamin B12 metode ELISA

Pada penelitian ini, pengukuran kadar vitamin B12 dilakukan untuk mengkonfirmasi telah terjadi defisiensi kobalamin pada hewan coba. Pengukuran dilakukan dengan metode *direct competitive* ELISA. Hasil ELISA vitamin B12 plasma disajikan pada gambar 4.2.1.



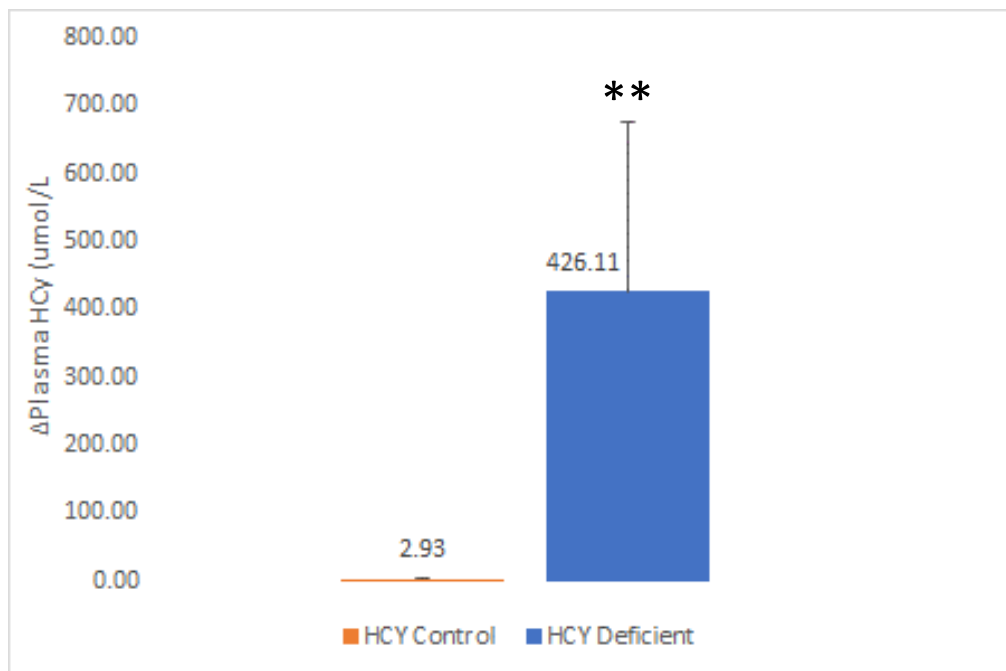
Gambar 4.2.1. Hasil ELISA vitamin B12 hewan coba kelompok kontrol dan kelompok defisien pada akhir studi.

Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, $** p<0.01$.

Berdasarkan gambar 4.2.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa terdapat kadar vitamin B12 yang lebih rendah dan bermakna secara statistik pada kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol, $p=0.002$.

4.3 Hasil analisis kadar Homosistein/Hcy metode ELISA

Pada penelitian ini, pengukuran kadar homosistein dilakukan untuk memastikan telah terjadi defisiensi vitamin B12 pada hewan coba. Homosistein merupakan hasil metabolisme metionin yang reaksinya diperantarai oleh kobalamin. Pengukuran dilakukan dengan metode *direct competitive* ELISA. Hasil ELISA homosistein/Hcy plasma disajikan pada gambar 4.3.1.



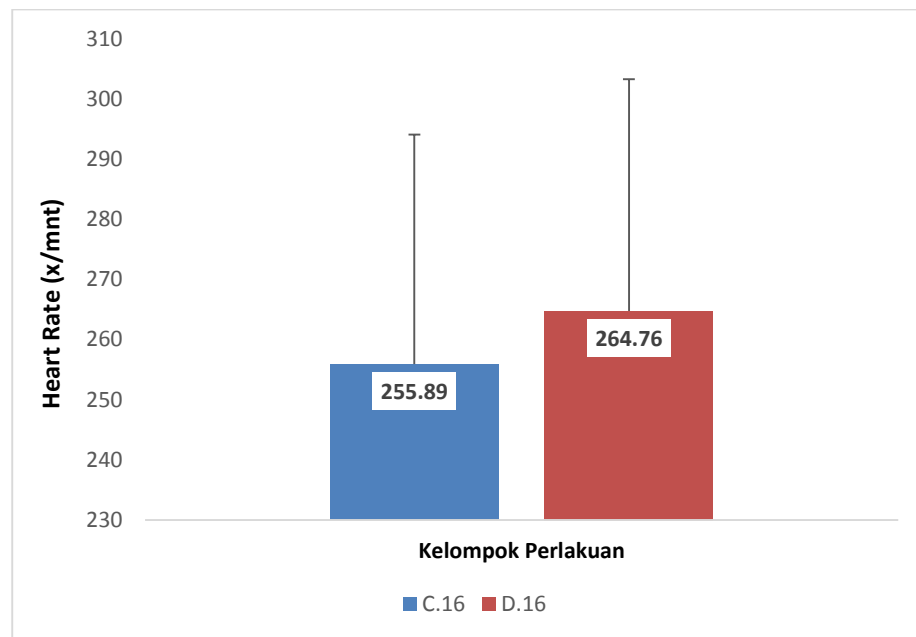
Gambar 4.3.1. Hasil ELISA Hcy hewan coba kelompok kontrol dan kelompok defisien pada akhir studi.

Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, $**p < 0.01$.

Berdasarkan gambar 4.3.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa terdapat kadar Hcy yang lebih tinggi dan bermakna secara statistik pada kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol, $p=0.004$.

4.4 Hasil EKG tikus putih jantan

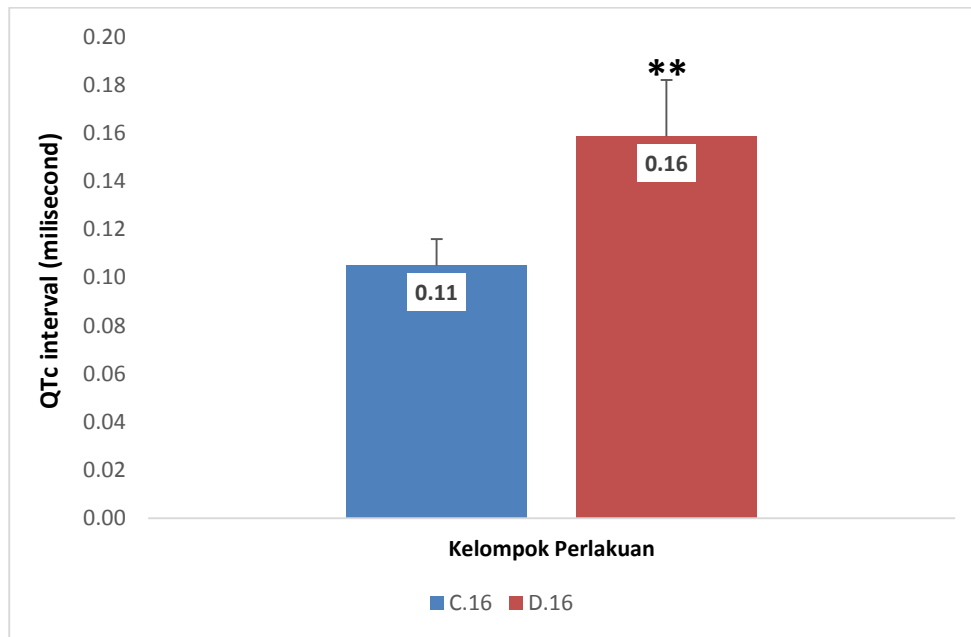
Pada penelitian ini, empat parameter EKG digunakan untuk mewakili gambaran aktivitas ventrikel kiri jantung adalah: (1) Denyut jantung/*heart rate*, (2) QTcorrected interval/QTc, (3) RS Amplitude, dan (4) QRS-T angle. Data denyut jantung disajikan pada gambar 4.4.1, data QTc interval disajikan pada gambar 4.4.2, data RS Amplitude disajikan pada gambar 4.4.3, dan data QRS-T angle disajikan pada gambar 4.4.4.



Gambar 4.4.1. Denyut jantung kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku

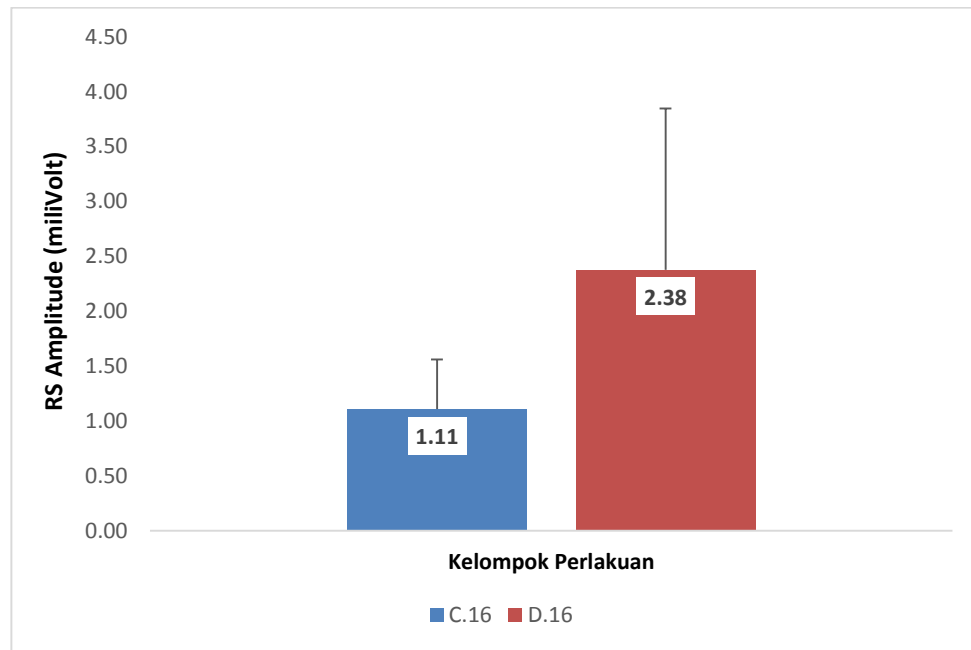
Berdasarkan gambar 4.4.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 tidak terdapat perbedaan yang bermakna denyut jantung antara kelompok kontrol dengan kelompok defisien, $p=0.673$ (D.16 vs C.16, $p>0.05$).



Gambar 4.4.2. QTcorrected interval kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, ** $p < 0.01$.

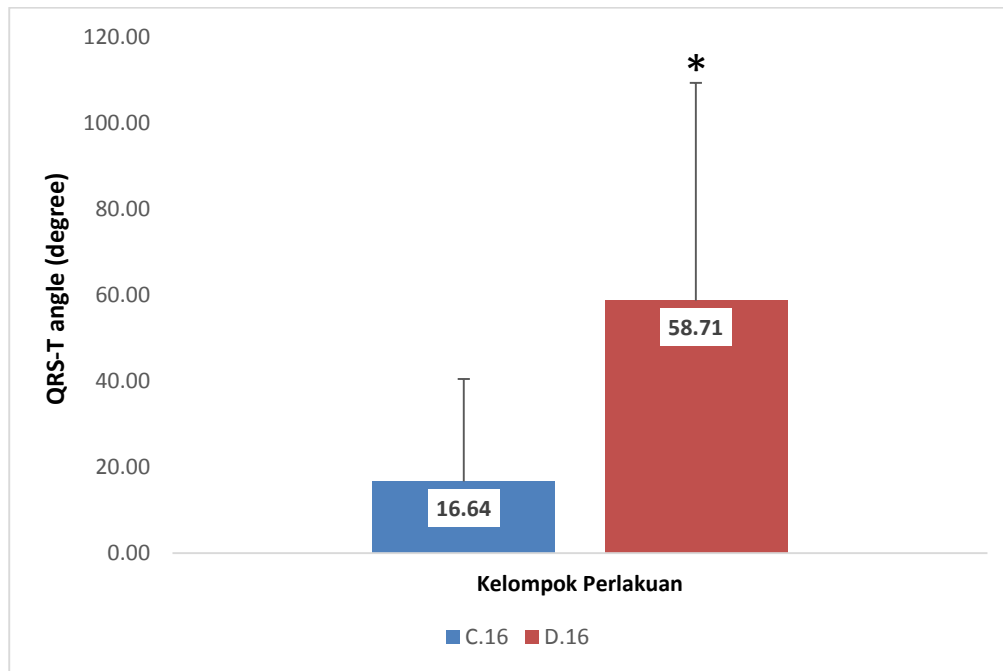
Berdasarkan gambar 4.4.2 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat perbedaan yang bermakna QTcorrected interval antara kelompok kontrol dengan kelompok defisien, $p = 0.002$ (D.16 vs C.16, $p < 0.01$).



Gambar 4.4.3. RS Amplitude kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku.

Berdasarkan gambar 4.4.3 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 tidak terdapat perbedaan yang bermakna RS amplitude antara kelompok kontrol dengan kelompok defisien, $p=0.084$ (D.16 vs C.16, $p>0.05$).



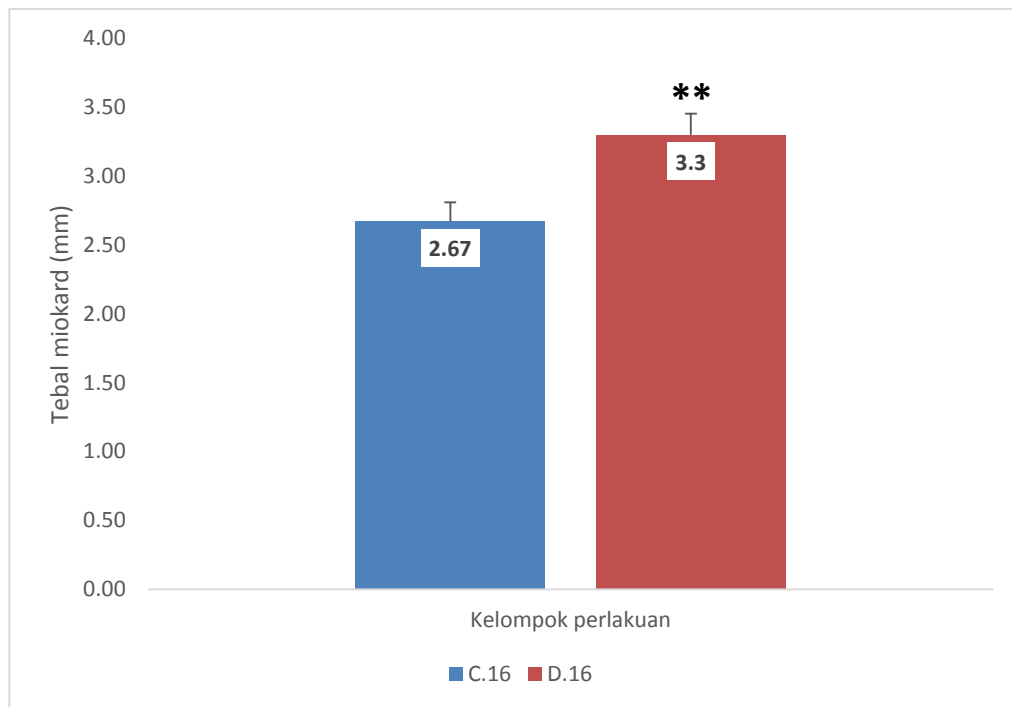
Gambar 4.4.4. QRS-T angle kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, * $p < 0.05$.

Berdasarkan gambar 4.4.4 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat perbedaan yang bermakna QRS-T angle antara kelompok kontrol dengan kelompok defisien, $p = 0.015$ (D.16 vs C.16, $p < 0.05$).

4.5 Hasil pengukuran tebal miokardium ventrikel kiri tikus putih jantan

Pada penelitian ini, tebal miokardium diukur untuk mengetahui apakah terdapat penebalan pada dinding ventrikel kiri. Pengukuran dilakukan menggunakan *microcaliper*/jangka sorong berukuran kecil dengan tingkat akurasi pembacaan skala sebesar 0.001mm. Hasil pengukuran ventrikel kiri disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 4.5.1.



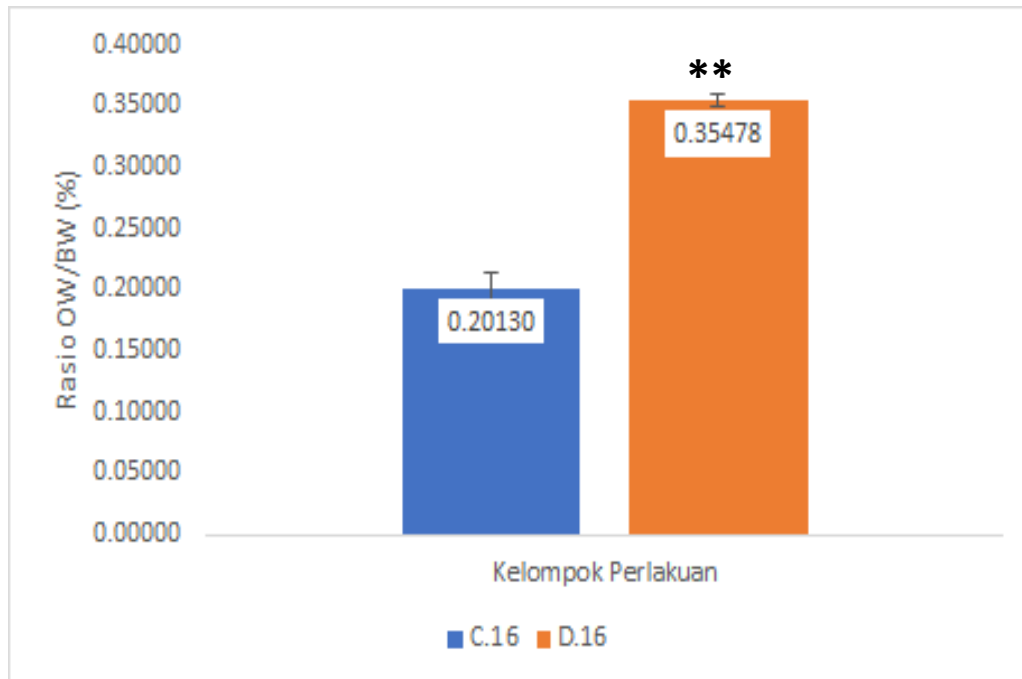
Gambar 4.5.1. Tebal miokardium ventrikel kiri kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, ** $p < 0.01$.

Berdasarkan gambar 4.5.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat perbedaan yang bermakna pada tebal miokardium ventrikel kiri antara kelompok kontrol dengan kelompok defisien, $p = 0.001$ (D.16 vs C.16, $p < 0.01$).

4.6 Hasil rasio berat jantung terhadap berat badan tikus putih jantan

Pada penelitian ini, berat jantung diukur dan dibandingkan dengan berat badan tikus secara keseluruhan. Pengukuran dilakukan menggunakan neraca berat dengan tingkat ketelitian sampai 1 microgram/mcg. Hasil rasio berat jantung terhadap berat badan disajikan pada gambar 4.6.1



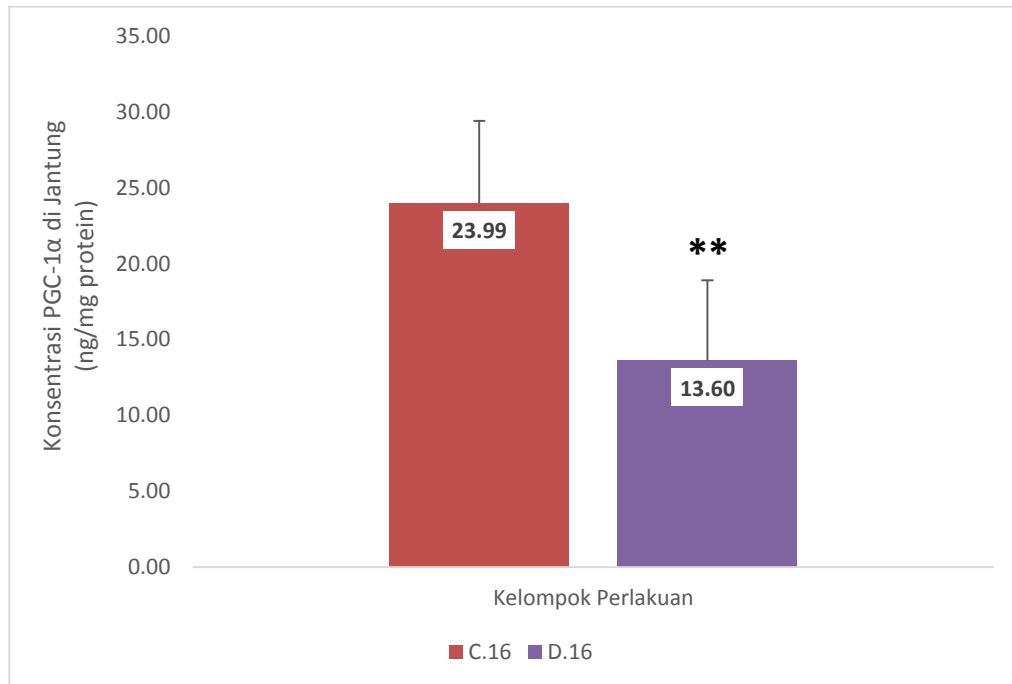
Gambar 4.6.1. Hasil rasio berat jantung terhadap berat badan kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, ** $p < 0.01$.

Berdasarkan gambar 4.6.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat rasio berat jantung terhadap berat badan yang lebih tinggi dan bermakna statistik pada kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol, $p = 0.002$ (D.16 vs C.16, $p < 0.01$).

4.7 Hasil analisis protein PGC-1 α metode ELISA

Pada penelitian ini, pengukuran kadar PGC-1 α dilakukan utk mengetahui gambaran penggunaan energi pada kardiomiosit hewan coba. Pengukuran dilakukan dengan metode *direct competitive* ELISA. Hasil ELISA PGC-1 α disajikan pada gambar 4.7.1.



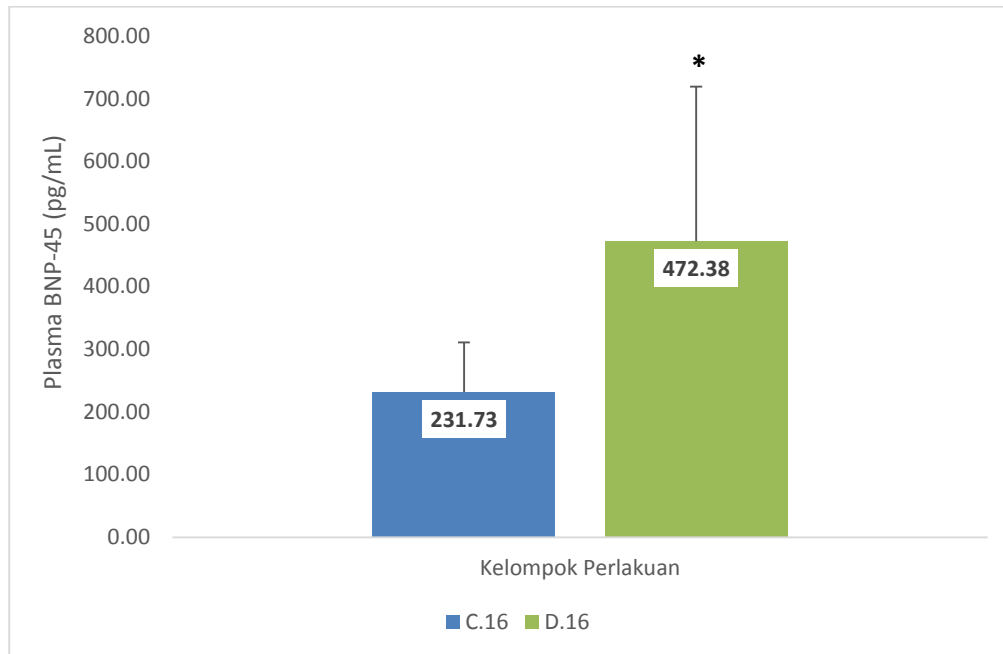
Gambar 4.7.1. Hasil ELISA PGC-1 α kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, ** $p < 0.01$.

Berdasarkan gambar 4.7.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat konsentrasi PGC-1 α yang lebih rendah dan bermakna secara statistik pada kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol, $p = 0.003$ (D.16 vs C.16, $p < 0.01$).

4.8 Hasil analisis protein BNP-45 metode ELISA

Pada penelitian ini, pengukuran kadar BNP-45 dilakukan untuk mengevaluasi kondisi gagal jantung pada hewan coba. Pengukuran dilakukan dengan metode *sandwich* ELISA. Hasil ELISA BNP-45 disajikan pada gambar 4.8.1.



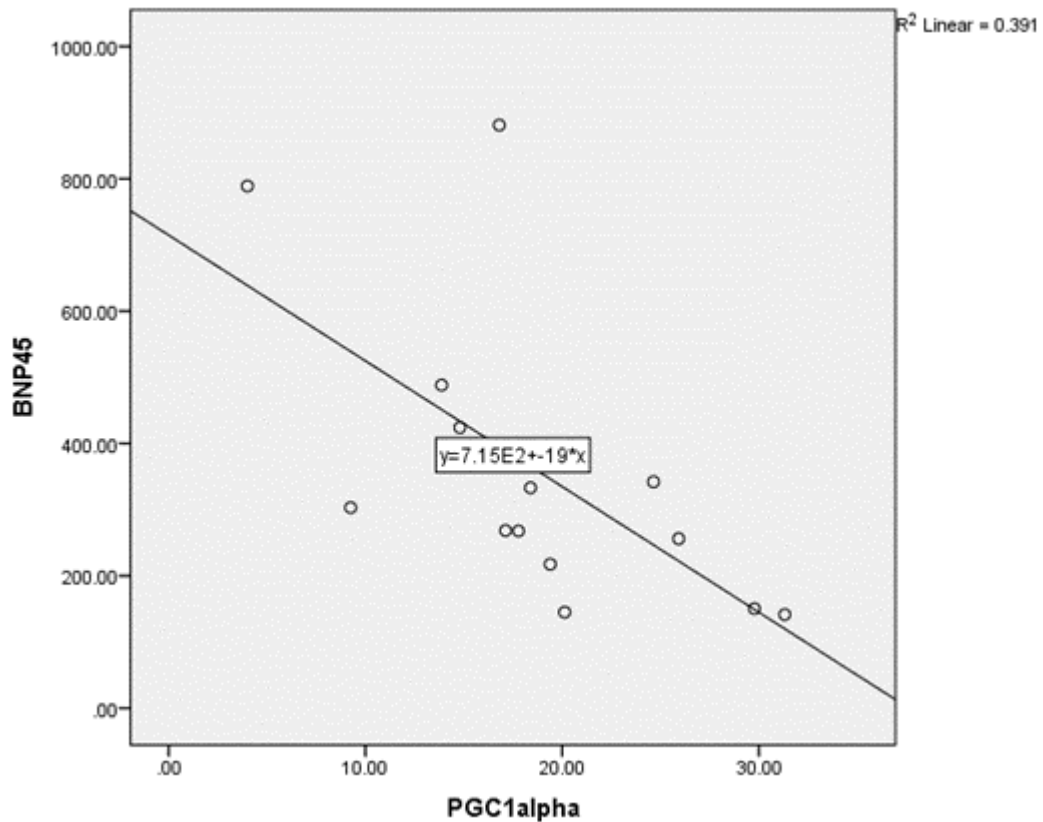
Gambar 4.8.1. Hasil ELISA BNP-45 kelompok kontrol dan kelompok defisien pada minggu ke-16.

C.0: kelompok kontrol minggu ke-0; C.16: kelompok kontrol minggu ke-16; D.0: kelompok defisiensi minggu ke-0; D.16: kelompok defisiensi minggu ke-16. Data dalam rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku, * $p < 0.05$.

Berdasarkan gambar 4.8.1 melalui hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-16 terdapat kadar BNP-45 yang lebih tinggi dan bermakna secara statistik pada kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol, $p = 0.046$ (D.16 vs C.16, $p < 0.05$).

4.9 Analisis Korelasi antara ekspresi protein PGC-1 α di otot jantung dengan kadar BNP-45 plasma

Hasil ELISA protein PGC-1 α dari otot jantung kemudian dikorelasikan dengan hasil BNP-45 plasma dan disajikan pada gambar 4.9.1.



Gambar 4.9.1. Hubungan antara kadar PGC-1 α dan BNP-45.

Dari hasil analisis statistik diperoleh nilai $r = -0.626$ ($p = 0.017$) yang menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif bermakna dengan kekuatan sedang antara kadar protein PGC-1 α dengan protein BNP-45.

BAB 5

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan studi eksperimental yang bertujuan menganalisis pengaruh defisiensi vitamin B12/kobalamin terhadap fungsi jantung yang ditinjau dari gambaran EKG, protein marker PGC-1 α pada otot jantung, dan protein BNP-45 pada plasma darah. Kobalamin/vitamin B12 merupakan mikronutrien yang penting dalam proses metabolisme seluler.⁽⁵⁵⁾ Perannya sebagai salah satu nutrisi yang memiliki gugus metil menyediakan donor metil pada berbagai reaksi tingkat seluler tidak terkecuali dalam metabolisme energi.^(3,4,8) PGC-1 α merupakan protein koaktivator yang berperan besar dalam metabolisme energi.^(17,46) Protein BNP-45 merupakan salah satu penanda biologis utama terjadinya proses patologi di jantung,^(49,50) sehingga dilakukan pengukuran kadar vitamin B12 plasma serta parameter defisiensi lainnya berupa homosistein/Hcy plasma. Selain itu dilakukan juga perekaman aktivitas listrik jantung tikus menggunakan EKG dan pemeriksaan kadar PGC-1 α jantung dan protein BNP-45 plasma di akhir periode studi. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini berupa tikus Sprague-Dawley jantan usia rata-rata 24-28 minggu. Tikus berjenis kelamin laki-laki dipilih karena memiliki sistem hormonal yang cenderung stabil (menghindari siklus estrus yang terjadi sangat cepat pada tikus berjenis kelamin perempuan) sehingga tidak memengaruhi hasil pemeriksaan. Tikus usia 6-7 bulan atau sekitar usia 17-18 tahun pada manusia diharapkan sudah memiliki maturasi organ cukup (pada periode tersebut perbandingan umur yang ekuivalen terhadap manusia adalah 1 tahun manusia = 10.5 hari tikus) sehingga dapat diberikan perlakuan yang bersifat metabolik selama periode studi.⁽⁵⁶⁾

Selain usia, data karakteristik subjek pada penelitian ini, dinilai juga dari berat badan awal tikus pada minggu ke-0. Berat badan tikus Sprague-Dawley jantan usia 6-7 bulan dapat bervariasi bergantung pada pemeliharaannya. Sebagai kriteria inklusi berat badan tikus berkisar antara 250-350 gram sesuai dengan berat badan rata-rata tikus Sprague-Dawley jantan usia 6-7 bulan,⁽⁵⁶⁾ untuk menghindari adanya hewan coba yang obesitas atau kekurangan gizi. Pada awal penelitian berat badan tiap tikus ditimbang untuk memastikan kesesuaian dengan kriteria inklusi agar bisa

digunakan sebagai subjek dalam penelitian ini. Hasil pengukuran pada awal penelitian didapatkan rerata berat badan tikus pada rentang 295-303 gram. Data ini sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditetapkan. Hasil uji homogenitas yang dilakukan pada kedua kelompok (kontrol dan perlakuan) menunjukkan rerata berat badan tikus awal penelitian tidak berbeda bermakna antar kelompok, yang menunjukkan bahwa berat badan kedua kelompok homogen. Selama 16 minggu periode studi, kelompok kontrol diberikan pakan standar dengan kadar nutrisi yang lengkap, sementara kelompok perlakuan diberikan pakan modifikasi yang tidak mengandung vitamin B12. Pada pakan modifikasi tersebut ditambahkan zat pectin sebesar 5% untuk menghambat absorpsi vitamin B12. Pada minggu ke-16 baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan berat badan yang bermakna secara statistik. Hal ini konsisten dengan pertumbuhan dan perkembangan normal rata-rata tikus Sprague-Dawley.⁽⁵⁷⁾ Peningkatan berat badan berkaitan langsung dengan bertambahnya umur (*“from weaning to old”*) hingga tikus memasuki usia lansia atau periode *senescence* ketika massa tubuhnya akan mulai menurun.⁽⁵⁷⁾ Berdasarkan hasil tersebut, maka pemberian pakan standar maupun pakan defisien kobalamin tidak memengaruhi aspek pertambahan berat badan pada hewan coba.

5.1 Hasil ELISA Vitamin B12 dan Homosistein

Vitamin B12/kobalamin merupakan salah satu vitamin larut air yang diperlukan pada berbagai metabolisme tingkat seluler. Kobalamin memegang peranan sebagai donor metil utama untuk memperantarai reaksi enzimatik terutama pada adenosyl transferase dan metionin sintase. Manusia tidak mampu mensintesis kobalamin secara mandiri sehingga kebutuhan akan mikronutrien ini dipenuhi dari asupan makanan harian dan melalui rute intraseluler yang kompleks serta mekanisme pencernaan yang rumit hingga nutrisi ini sampai ke tempat dimana dia dibutuhkan.⁽⁵⁸⁾ Defisiensi vitamin B12 dikarenakan malabsorpsi dan asupan yang inadekuat merupakan masalah kesehatan masyarakat hampir di seluruh dunia. Berbagai kelompok yang rentan terhadap defisiensi mikronutrien ini antara lain; ibu hamil dan menyusui, anak-anak, lansia, dan vegetarian/vegan.^(58,59) Oleh karena itu sebagai bagian upaya preventif maupun upaya untuk menegakkan diagnosa yang

tepat, pemeriksaan status vitamin B12 menjadi suatu hal yang tidak kalah penting. Pemeriksaan penanda/*marker* defisiensi kobalamin yang akurat dan representatif dengan status vitamin B12 *in vivo* mutlak dibutuhkan untuk akurasi diagnosis dan evaluasi terapi. Terdapat beberapa pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk mendapatkan gambaran status vitamin B12 *in vivo* antara lain: total serum/plasma vitamin B12, kadar homosistein/Hcy plasma, kadar *methylmalonic acid*/MMA serum/plasma, dan total serum holo-transkobalamin/holo-TC. Empat parameter tersebut sering dikerjakan di berbagai laboratorium baik untuk keperluan diagnostik maupun untuk keperluan riset. Selain empat parameter yang telah disebutkan juga terdapat pemeriksaan tambahan lainnya yang dapat bermakna untuk membantu diagnosis yakni: *propionylcarnitine* (C3) serta rasionya berbanding dengan *acetylcarnitine* (C3/C2) dan *palmitoylcarnitine*(C3/C16).⁽⁵⁸⁾ Defisiensi vitamin B12 menyebabkan akumulasi dari *propionylcarnitine* yang merupakan penanda dari *methylmalonic aciduria* dan *propionic acidemia*. Berbagai studi sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan parameter tunggal (misal total serum/plasma kobalamin) saja untuk menegakkan diagnosis defisiensi seringkali tidak mampu menggambarkan kondisi *in vivo* yang sebenarnya. Temuan pada beberapa kasus menunjukkan kadar total plasma kobalamin yang rendah tidak selalu mencerminkan defisiensi, namun seringkali defisiensi fungsional mikronutrien ini malahan memberikan gambaran serum vitamin B12 yang normal atau meningkat.^(58,59) Telah disinggung sebelumnya bahwa defisiensi vitamin B12 merupakan kondisi yang multifaktorial mulai dari intake inadekuat, gangguan absorpsi (baik terkait defek genetik atau kondisi patologis lainnya), dan gangguan pada jalur transport intraseluler (defisiensi fungsional).⁽⁵⁸⁾ Studi yang dilakukan oleh Miller et al menunjukkan kombinasi penggunaan penanda defisiensi kobalamin berupa total plasma kobalamin dengan holotranskobalamin meningkatkan akurasi diagnosis hingga 15% dibandingkan pemeriksaan tunggal antara keduanya.⁽⁵⁹⁾ Studi yang dilakukan oleh Hannibal et al membandingkan efektivitas antara pemeriksaan holotranskobalamin dengan total serum kobalamin, hasilnya holo-TC memiliki efektivitas yang lebih baik dibandingkan dengan total serum kobalamin. Pada penelitian tersebut juga dipaparkan bahwa kombinasi pemeriksaan antara total serum kobalamin dengan kadar homosistein cukup efektif

untuk menggambarkan status defisiensi secara *in vivo*.⁽⁵⁸⁾ Sementara itu, pemeriksaan dengan menggunakan kombinasi parameter yang lain seperti total serum kobalamin dengan kadar MMA plasma juga memberikan akurasi yang cukup baik.^(58,59)

Oleh karena itu pada penelitian ini, kami tidak menggunakan pemeriksaan penanda defisiensi kobalamin secara tunggal melainkan kombinasi pemeriksaan antara kadar plasma/serum kobalamin dengan kadar homosistein plasma/serum untuk mendapatkan gambaran yang cukup representatif defisiensi vitamin B12 pada hewan coba.. Hasil penelitian ini menunjukkan pada minggu ke-16 kelompok defisien terdapat penurunan kadar vitamin B12 plasma yang bermakna secara statistik terhadap kadar vitamin B12 plasma kelompok defisien minggu ke-0. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Shomal et al, penggunaan pakan modifikasi jenis AIN-93M selama 12 minggu dikombinasikan dengan penambahan zat pectin sebanyak 5% terbukti menyebabkan kondisi defisiensi kobalamin pada hewan coba.⁽¹⁶⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Patwa et al menunjukkan bahwa pemberian pakan AIN-93M selama 4 dan 12 minggu juga memberikan gambaran defisiensi kobalamin pada tikus Sprague-Dawley.⁽⁶⁰⁾ Pemberian zat pectin sebanyak 5% pada pakan modifikasi nampaknya cukup efektif untuk mencegah absorpsi vitamin B12 di luar dari yang terkandung dalam pakan yang diberikan Terdapat fenomena yang cukup menarik pada penelitian ini yaitu pada minggu ke-16 kelompok kontrol juga ditemukan penurunan kadar vitamin B12 plasma yang bermakna secara statistik terhadap kadar vitamin B12 plasma pada minggu ke-0 di kelompok yang sama. Mekanisme yang mungkin mendasari fenomena ini adalah pada kelompok kontrol walaupun tidak diberikan pakan yang termodifikasi untuk menciptakan kondisi defisiensi, seiring bertambahnya umur/*senescence* defisiensi kobalamin dapat terjadi secara alamiah pada hewan coba.. Meskipun antara kelompok defisien dengan kelompok kontrol tidak terdapat penurunan kadar vitamin B12 yang bermakna secara statistik pada minggu ke-16 namun, kecenderungan penurunan kadar vitamin B12 plasma masih lebih besar pada kelompok defisien bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Homosistein merupakan metabolit metabolisme karbon tunggal yang akan mengalami remetilasi oleh *MeCbl-dependent MS* atau oleh *betaine-homocysteine*

methyltransferase sebagai bagian dari siklus metionin dan akan didegradasi oleh *cystathionine β -synthase* (CBS) pada jalur transulfurasi. Konversi Hcy menjadi metionin oleh metionin sintase membutuhkan ketersediaan baik vitamin B12 maupun folat dan defisiensi pada salah satu komponen tersebut menyebabkan akumulasi Hcy pada serum maupun urin. Kondisi gangguan metabolisme bawaan yang mengganggu jalur pemrosesan dan transport B12 maupun folat juga menyebabkan hiperhomosisteinemia. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hannibal et al, serum memiliki kadar homosistein yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan plasma, hal ini dikarenakan pelepasan ikatan Hcy ke komponen seluler.⁽⁵⁸⁾ Atas dasar inilah maka sebaiknya serum tidak digunakan untuk menentukan kadar homosistein. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara kadar homosistein plasma kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok defisien didapatkan peningkatan kadar homosistein. Temuan pada penelitian ini memiliki kesesuaian dengan penelitian lain yang dilakukan oleh: Green et al, Pawlak et al, Siddiqua, Piquereau et al, Glier et al, Anderson, Gueant et al, Hughes, dan Scott yang menunjukkan bahwa defisiensi vitamin B12/kobalamin menyebabkan peningkatan kadar homosistein secara *in vivo*.^(3,4,8,9,14,22,23,47,55) Berdasarkan analisis hasil yang ada bahwa pemberian diet termodifikasi selama 16 minggu cukup untuk menimbulkan defisiensi vitamin B12 pada tikus Sprague-Dawley jantan usia 10-12 bulan dan hasil pemeriksaan yang didapat sesuai dengan teori metabolik yang menjadi acuan.

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan dalam hal waktu perlakuan pakan defisiensi yang baru bisa dikerjakan selama 16 minggu. Berdasarkan studi yang pernah dilakukan sebelumnya, defisiensi vitamin B12 umumnya bermakna secara klinis apabila telah terjadi dalam periode waktu yang cukup lama. Karena hal tersebut, maka idealnya pada penelitian selanjutnya durasi perlakuan pakan defisiensi sebaiknya dikerjakan selama lebih dari 16 minggu.

5.2 Hasil pemeriksaan EKG

EKG merupakan pemeriksaan yang digunakan untuk merekam aktivitas listrik jantung pada periode waktu tertentu menggunakan elektroda yang diletakkan pada permukaan kulit.⁽²⁰⁾ Elektroda ini mendeteksi perubahan kecil arus listrik dari otot jantung (depolarisasi dan repolarisasi) selama jantung berkontraksi.⁽²⁰⁾ Abnormalitas pada metabolisme energi jantung dapat berujung pada abnormalitas konduksi listrik sehingga dapat dideteksi sebagai abnormalitas pada pola gelombang EKG. Pada studi ini dilakukan pemeriksaan EKG dengan empat parameter yang digunakan untuk menggambarkan aktivitas ventrikel kiri.

Parameter EKG yang pertama adalah denyut jantung/heart rate. Denyut jantung menggambarkan frekuensi jantung berdetak per satuan waktu.⁽²⁰⁾ Denyut jantung rata-rata tikus Sprague-Dawley dewasa berkisar antara 330-480 denyut/menit.⁽⁵⁷⁾ Pada penelitian ini didapatkan rerata denyut pada kelompok kontrol sebesar 255 denyut/menit, sedangkan pada kelompok defisien sebesar 264 denyut/menit. Hasil uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada denyut jantung antara kelompok defisien berbanding kelompok kontrol. Dari hasil tersebut tampak ada penurunan frekuensi denyut jantung pada kedua kelompok bila dibandingkan dengan rentang nilai normal. Hal ini disebabkan oleh penggunaan obat anestetik kombinasi ketamine dan xylazine ($\pm 100\text{mg/kg}$ dan $\pm 5\text{mg/kg}$) untuk memberikan efek sedasi pada tikus saat akan direstrain dan memudahkan pemasangan alat EKG. Temuan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Maggie et al dan Giroux et al yang menunjukkan pemberian dosis kombinasi ketamine dan xylazine menyebabkan penurunan denyut jantung.^(61,62) Pada penelitian ini juga, dua dari tujuh tikus pada kelompok defisien memperlihatkan tanda-tanda aritmia dari hasil rekaman EKG. Hasil rekam EKG pada kedua tikus tersebut dapat dilihat pada gambar 5.1. Temuan aritmia pada penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yakni Law et al dan Moshal et al bahwa peningkatan kadar homosistein/hiperhomosisteinemia menyebabkan gangguan pada konduktivitas listrik jantung.^(48,63)

Parameter EKG yang kedua adalah QTcorrected interval/QTc. Interval QT terkoreksi merupakan pengukuran yang merupakan kombinasi fase depolarisasi dan repolarisasi jantung meliputi kompleks QRS dan interval QT.⁽⁶⁴⁾ Keterlambatan

konduksi pada segmen ventrikuler seringkali berkaitan dengan pemanjangan interval QT.⁽⁶⁴⁾ Berdasarkan uji statistik, pada penelitian ini terdapat perbedaan bermakna antara QTc kelompok defisien dengan kelompok kontrol. Pada kelompok defisien terdapat QTc interval yang lebih panjang dibandingkan dengan QTc interval kelompok kontrol. Hasil tersebut menunjukkan kelompok defisien mengalami gangguan depolarisasi-repolarisasi sehingga menyebabkan keterlambatan konduksi ventrikuler. Mekanisme patologi yang paling mendekati adalah kadar homosistein yang meningkat akan menginduksi proses remodeling jantung.^(42,63) Keterlambatan konduksi ventrikuler merupakan pertanda awal terjadinya hipertrofi muskular pada jantung. Hasil QTc interval tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Joseph et al dan Walker et al yang menunjukkan bahwa hiperhomosisteinemia menyebabkan hipertrofi yang bersifat patologis pada jantung.^(15,65) Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Law et al yang menunjukkan bahwa peningkatan kadar homosistein berkaitan erat dengan efek pro-aritmogenik yang meliputi penurunan durasi potensial aksi, penurunan periode refrakter efektif, dan penurunan kecepatan konduksi atrial.⁽⁴⁸⁾



Tikus 3



Tikus 7

Gambar 5.1. Aritmia pada dua tikus percobaan di kelompok defisien.

Parameter EKG yang ketiga adalah amplitudo RS. Amplitudo RS merupakan bagian yang integral pada kompleks QRS dan mewakili gambaran aktivitas listrik pada ventrikel jantung (terutama ventrikel kiri). Pada penelitian ini didapatkan hasil amplitudo RS yang tidak signifikan secara statistik antara kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun, pada kelompok defisien tampak tendensi amplitudo RS untuk meningkat. Penelitian yang dilakukan oleh Smith et al menunjukkan amplitudo RS berkaitan erat dengan risiko terjadinya kardiomiopati hipertrofik.⁽⁶⁶⁾ Berdasarkan fenomena tersebut, pada kelompok defisien diperkirakan sedang menuju terjadinya hipertrofi miokardium yang masih dalam skala kecil. Penelitian lanjutan dengan periode yang lebih panjang diperlukan untuk mengonfirmasi teori ini.

Parameter EKG yang keempat adalah sudut QRS-T/*QRS-T angle*. Vektorkardiografi atau dikenal juga dengan *vectorcardiography/VCG* muncul sebagai bagian elektrokardiografi pada tahun 1920 sejak Hubert Mann memperkenalkan konsep “loops” untuk menggambarkan vektor potensial selama siklus jantung.^(67,68) Einthoven juga menyatakan bahwa kuantitas vektor dapat menggambarkan kekuatan listrik dari jantung yang direkam dari permukaan kulit. Sistem sandapan multiple untuk mengukur VCG kemudian dikembangkan oleh Frank pada dekade 1950an dan paling banyak diaplikasikan hingga saat ini. Sudut QRS-T, suatu nilai yang didapat melalui analisis VCG mulai dipelajari secara luas sejak tahun 1934, ketika Wilson et al mengembangkan suatu konsep “ventricular gradient”, yang merupakan penjumlahan vektorial dari spasial sudut QRS-T. Wilson mempostulasikan gradien spasial ventrikuler (1) mengekspresikan heterogenitas morfologi potensial aksi, (2) bersifat independen dari sekuens aktivasi ventrikuler, (3) mencirikan “gelombang T primer”, atau heterogenitas utama dari repolarisasi.^(67,68) Tidak seperti gradien spasial ventrikuler, sudut spasial QRS-T mencirikan “gelombang T sekunder”, yang abnormalitas repolarisasinya mengikuti abnormalitas depolarisasi, misalkan pada perubahan konduksi ventrikuler seperti: *premature ventricular contraction*, *ventricular pacing*, dan *bundle branch block*.⁽⁶⁷⁾ Dalam konteks ini, sudut QRS-T melengkapi gradien ventrikuler yang keduanya dapat digunakan untuk menilai pasien yang memiliki gangguan repolarisasi baik primer, sekunder atau campuran keduanya (misal, hipertrofi ventrikel kiri). Secara

statistik, pada penelitian ini didapat perbedaan yang bermakna pada sudut QRS-T antara kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol (pada kelompok defisien didapatkan sudut QRS-T yang lebih lebar dari kelompok kontrol). Studi yang dilakukan oleh Borleff et al menunjukkan sudut QRS-T yang melebar dapat memprediksi terjadinya aritmia ventrikuler.⁽⁶⁹⁾ Hasil studi ini sejalan dengan temuan sebelumnya yakni dua dari tujuh hewan coba pada kelompok defisien menunjukkan gejala aritmia yang terekam alat EKG. Mekanisme yang mendasari hal ini terkait dengan gangguan aktivitas listrik jantung serta kecenderungan hipertrofi kardiomiopati yang terkait dengan meningkatnya kadar homosistein/hiperhomosisteinemia.

Peningkatan kadar homosistein/hiperhomosisteinemia memiliki peranan yang kompleks pada jejas endotel vaskuler. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wai et al dan Pushpakumar et al menunjukkan bahwa hiperhomosisteinemia berkaitan erat dengan terjadinya jejas/*injury* endotel vaskuler melalui jalur stress oksidatif-disfungsi DNA-proliferasi sel otot polos-penurunan aktivitas *glutathione peroxidase* dan menginduksi inflamasi.^(70,71) Secara klinis hal tersebut dapat bermanifestasi sebagai gangguan vasodilatasi terkait aliran darah dan disebabkan utamanya oleh berkurangnya sintesis dan ketersediaan *nitric oxide*. Efek dari gangguan pelepasan *nitric oxide* dapat memicu terjadinya *atherothrombogenesis* dan stress oksidatif.^(70,71) Proses jejas endotel vaskuler ini juga terjadi pada arteri koronaria sehingga berdampak pada gangguan suplai oksigen dan nutrisi pada miokardium yang berujung pada gangguan metabolisme energi dan aktivitas listrik pada miokardium sehingga dapat memunculkan gambaran perubahan gelombang EKG. Pada penelitian ini gangguan konduktivitas listrik yang terjadi dapat disebabkan oleh gangguan pada metabolisme energi kardiomyosit maupun gangguan suplai oksigen dan nutrisi miokardium akibat jejas endotel vaskuler terkait hiperhomosisteinemia. Oleh karena itu, diharapkan penelitian selanjutnya dapat dilakukan pemeriksaan seperti penanda stress oksidatif pada miokardium dan pemeriksaan penanda metabolisme energi mitokondria seperti GLUT-4 dan FABP yang merupakan *downstream signaling pathway* dari PGC-1 α .

5.3 Hasil pemeriksaan tebal miokardium dan rasio berat jantung terhadap berat badan

Miokardium adalah komponen Muskuler utama yang menyusun jantung sehingga merupakan bagian yang penting agar jantung dapat menjalankan fungsinya sebagai pompa. Miokardium memiliki kemampuan untuk berkontraksi yang ditunjang oleh strukturnya yang sedemikian rupa. Perubahan yang terjadi pada miokardium terkait dengan respon yang bersifat fisiologis maupun patologis. Pembahasan ini tidak akan terfokus pada perubahan yang bersifat fisiologis tapi lebih ke yang bersifat patologis. Perubahan metabolisme energi yang terjadi pada kardiomyosit akan berdampak pada miokardium. Berdasarkan berbagai penelitian terkini, gangguan nutrisi terutama defisiensi donor metil berdampak pada gangguan pada metabolisme energi kardiomyosit sehingga berakibat pada perubahan struktur miokardium. Selain itu kontribusi faktor lainnya seperti stress oksidatif yang terjadi pada defisiensi donor metil juga mengambil peranan pada perubahan struktur miokardium.

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan bermakna secara statistik tebal miokardium antara kelompok defisien dibandingkan pada kelompok kontrol. Pada kelompok defisien didapatkan rata-rata tebal miokardium lebih besar daripada kelompok kontrol. Selain itu terdapat juga perbedaan bermakna secara statistik pada rasio berat jantung terhadap berat badan, pada kelompok defisien rasinya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Joseph et al yang menunjukkan bahwa peningkatan kadar homosistein menyebabkan perubahan struktur miokardium ventrikel kiri ke arah hipertrofi yang ditandai dengan pembesaran ukuran kardiomyosit, peningkatan komposisi kolagen intersitital dan perivaskuler, penebalan dinding arteri koronaria dan infiltrasi sel *mast* ke miokardium.^(72,73) Penelitian yang dilakukan oleh Sundstrom et al juga menunjukkan peningkatan kadar plasma homosistein berkorelasi kuat dengan massa ventrikel kiri dan ketebalan dinding ventrikel kiri.⁽⁴²⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Cao et al menunjukkan bahwa peningkatan kadar homosistein plasma akan menghambat *cytochrome c oxidase* melalui peningkatan ekspresi ATP7a yang berujung pada terjadinya hipertrofi miokardium.⁽⁷⁴⁾ Temuan ini mengindikasikan telah terjadi proses remodeling pada otot ventrikel kiri yang

mengarah ke proses kardiomiopati hipertrofi. Mekanisme yang mendasari temuan ini adalah defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan kadar homosistein atau hiperhomosisteinemia. HHcy menyebabkan proses remodeling jantung dengan menginduksi jalur persinyalan MMP-9 sehingga terjadi perubahan komposisi matriks ekstraseluler miokardium yang berujung pada perubahan struktur dan penambahan volume miokardium.

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan dalam hal pemeriksaan histopatologi kardiomiosit. Pemeriksaan histopatologi seperti morfometri sel memberikan manfaat yang bermakna untuk menilai apakah terjadi pembesaran sel dan perubahan komposisi matriks ekstraseluler yang diakibatkan hiperhomosisteinemia.

5.4 Hasil ELISA PGC-1 α dan BNP-45

Jantung berkontraksi membutuhkan energi yang tak terputus. Suplai energi jantung diperankan oleh organel di dalam kardiomiosit yang dikenal sebagai mitokondria. Mitokondria merupakan organel sel yang berperan sebagai “mesin” sintesis ATP yang efisien mengubah secara cepat cadangan energi yang terdapat pada asam lemak, glukosa, dan laktat menjadi fosfat berenergi tinggi yang menyediakan bahan bakar untuk berbagai proses seluler lainnya di dalam kardiomiosit.^(36–38) Mitokondria menempati lebih dari 30% volume kardiomiosit. Kardiomiosit tersusun rapat di bawah sarkolema dan jalur di antara miofilamen sehingga jarak konstan difusi terbentuk antara mitokondria dan inti dari miofilamen. Bentuk struktur seperti ini memungkinkan dasar bioenergetika untuk kontraksi yang terdiri dari protein sitoskeletal, mitokondria dan retikulum sarkoplasma pada level sarkomer diantara unit energi intraseluler.^(37,38)

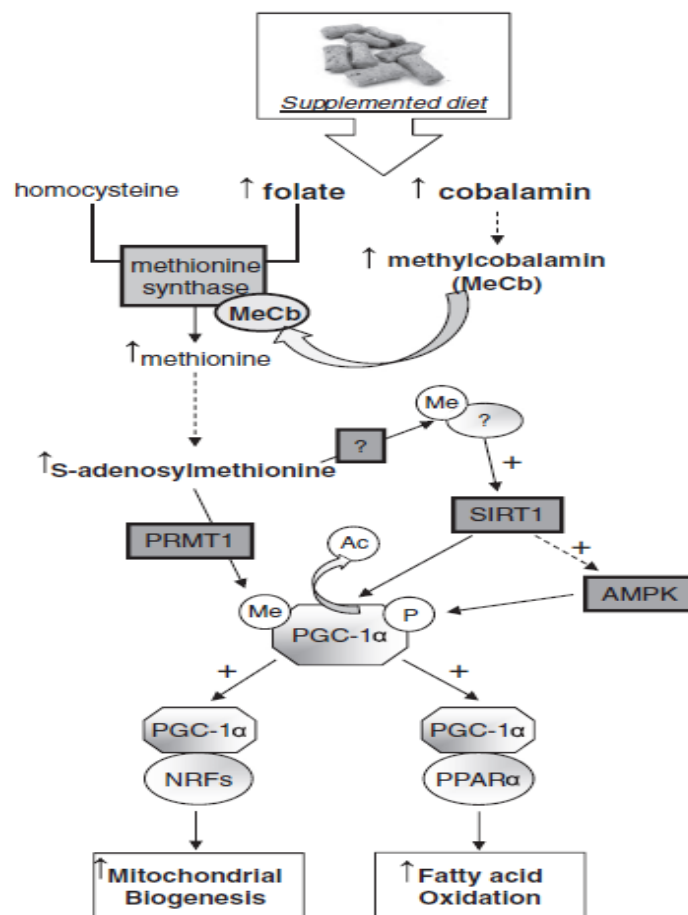
Peran metabolisme energi mitokondria tidak dapat terlepas dari pengaturan yang beraneka ragam mulai dari pemilihan substrat hingga ke tingkat regulasi genetik. Dalam hal ini, kapasitas mitokondria untuk menghasilkan ATP dalam jumlah yang cukup juga melibatkan pengaturan pada tingkat ekspresi gen. Proses pengaturan metabolisme energi mitokondrial pada tingkat ekspresi gen ini dapat lebih mudah dipahami setelah ditemukannya suatu koaktivator transkripsi gen yang dinamakan PGC-1 α /*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator*.

Lebih dari satu dekade yang lalu, Bruce Spiegelman melakukan suatu percobaan pada jaringan adiposa coklat dan jaringan adiposa putih dan menemukan bahwa *thermogenesis* atau proses menghasilkan panas pada *brown adipose tissue* berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan *white adipose tissue*.^(36,40) Setelah dilakukan percobaan menggunakan ragi dihybrid ditemukan bahwa jaringan adiposa coklat memiliki komposisi mitokondria yang lebih banyak dari jaringan adiposa putih.^(36,40) Dalam perkembangan selanjutnya melalui berbagai tahapan studi/riset ditemukan juga bahwa pengaturan ekspresi PGC-1 α diperankan juga oleh protein spesifik terutama PRMT1/*arginine methyltransferase-1* dan SIRT1/*sirtuin-1* melalui proses metilasi dan deasetilasi protein terkait.^(17,46) Beberapa studi terakhir menunjukkan bahwa proses metilasi, asetilasi maupun deasetilasi dari protein-protein yang terkait dalam metabolisme energi mitokondrial tidak terlepas dari peran donor metil yang didapat dari nutrisi terutama metil nutrien seperti vitamin B12. Melalui serangkaian studi dihipotesiskan bahwa ekspresi protein koaktivator transkripsi PGC-1 α dipengaruhi oleh proses metilasi PRMT1 dan deasetilasi SIRT1 yang bergantung pada ketersediaan donor metil dalam jumlah cukup sehingga defisiensi donor metil dapat mengganggu serangkaian proses tersebut yang mengakibatkan gangguan metabolisme energi kardiomyosit sehingga dapat berujung pada keadaan gagal jantung.

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan bermakna secara statistik protein PGC-1 α antara kelompok defisien dibandingkan pada kelompok kontrol. Pada kelompok defisien didapatkan ekspresi protein PGC-1 α yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Temuan penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Garcia et al yang menunjukkan defisiensi donor metil memiliki konsekuensi yang merugikan terhadap miokardium berupa berkurangnya ekspresi pada enzim mitokondrial terutama yang terlibat dalam oksidasi asam lemak dan kompleks respirasi I dan II yang disebabkan oleh ketidakseimbangan asetilasi/metilasi PGC-1 α oleh SIRT1 dan PRMT1 serta gangguan pada ekspresi PPAR- α dan ERR- α .⁽¹⁷⁾ Penelitian lain yang dilakukan oleh Anderson menunjukkan bahwa nutrien metil seperti vitamin B12 berperan dalam metabolisme karbon tunggal yang penting dalam metilasi DNA dalam hal ini metilasi gen yang berkontribusi dalam metabolisme energi di mitokondria.^(4,75)

Penelitian Piquereau et al juga menunjukkan vitamin B12 berperan pada siklus metionin sebagai prekursor donor metil untuk membentuk S-adenosylmethionin/SAM yang berperan dalam metilasi berbagai protein regulator sekunder untuk mengatur ekspresi PGC-1 α .⁽⁴⁷⁾ Mekanisme pengaruh donor metil terhadap koaktivator PGC-1 α yang dirumuskan oleh Piquereau et al dapat dilihat pada gambar 5.2.

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan dalam pemeriksaan ekspresi protein koaktivator transkripsi PGC-1 α yang baru bisa dikerjakan dengan teknik ELISA sehingga hanya didapatkan hasil secara kuantitatif. Evaluasi tingkat ekspresi protein koaktivator transkripsi PGC-1 α seyogyanya dapat dikerjakan dengan teknik imunohistokimia untuk mengetahui sebaran di dalam kardiomyosit dan analisis proteomik untuk evaluasi tingkat ekspresi.



Gambar 5.2. Mekanisme pengaruh donor metil terhadap koaktivator PGC-1 α .⁽⁴⁷⁾

Ketidakseimbangan antara energi yang dihasilkan mitokondria dengan kebutuhan kardiomyosit dalam hal ini miokardium ventrikel kiri untuk berkontraksi memompa darah keseluruh tubuh dapat berujung pada insufisiensi fungsi jantung sebagai pompa. Sebagai konsekuensi dari kegagalan pompa, oksigen dan substrat tidak adekuat terdistribusikan ke perifer dan produk sisa metabolik tidak dapat dibersihkan secara efektif sehingga menciptakan suatu keadaan defisiensi energi pada organisme dan juga terhadap jantung itu sendiri.⁽³⁷⁾ Ketika terjadi proses patologis pada jantung, jantung akan merespon dengan mengekskresikan protein spesifik yang berfungsi sebagai penanda/marker. Diawali pada dekade 1980an, Adolfo de Bold memulai serangkaian studi yang mengarah pada ditemukannya ANP. Studi tersebut mengungkap adanya molekul granula atrial yang berubah densitasnya mengikuti perubahan volume intravaskuler.⁽¹⁹⁾ Eksperimen tersebut dikerjakan dengan menyuntikkan ekstrak miokardial atrium yang diikuti oleh respon cepat diuretik dan respon natriuretik pada tikus. Setelah diisolasi dan identifikasi dari peptida yang berperan pada efek tersebut merupakan deskripsi perdana dari famili NP/*Natriuretic Peptide*.^(19,50) Dalam perkembangan waktu berbagai studi tentang tipe dan aktivitas peptida natriuretik ini mengarah pada protein spesifik yang dikenal sebagai BNP. BNP merupakan varian peptida natriuretik yang predominan diproduksi miokardium ventrikel kiri sebagai respon terhadap distensi miosit yang disebabkan ekspansi volume ventrikuler atau tekanan yang berlebihan.⁽⁴⁹⁾ Berbagai penelitian terkini menunjukkan aktivitas BNP cenderung untuk bersifat sitoprotektif pada miokardium seperti anti-iskemia, anti-hipertrofi dan anti-fibrotik.⁽⁵⁰⁾ Sehingga ketika semua efek tersebut disatukan, aktivitas BNP kontra terhadap abnormalitas fisiologik yang terjadi pada gagal jantung. Peningkatan ekspresi BNP menggambarkan mekanisme kompensasi yang jantung lakukan untuk berusaha mengembalikan kondisinya ke keadaan homeostasis, sehingga semakin meningkatnya kadar BNP menggambarkan progresivitas ke arah keadaan gagal jantung yang lebih buruk.^(18,54)

Hasil uji statistik pada penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar protein BNP-45 antara kelompok defisien dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok defisien didapatkan kadar protein BNP-45 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sejalan dengan

studi yang dilakukan oleh Rodriguez et al yang menyatakan bahwa defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan kadar homosistein yang berdampak pada gangguan oksidasi asam lemak mitokondrial disertai dengan peningkatan ekspresi protein NT-proBNP.⁽⁴⁶⁾ Studi yang dilakukan oleh Patwa et al menunjukkan bahwa defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan ekspresi BNP dan perubahan hematologik yang mengarah pada anemia.⁽⁶⁰⁾ Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan BNP-45 karena merupakan BNP dengan struktur 45 asam amino yang dimiliki oleh tikus Sprague-Dawley sehingga diharapkan dapat bersifat representatif terhadap kondisi patologis yang terjadi pada jantung hewan coba.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian pakan modifikasi defisiensi vitamin B12 pada hewan coba selama 16 minggu terbukti menyebabkan defisiensi kobalamin yang ditandai dengan penurunan plasma kobalamin dan peningkatan homosistein plasma. Hiperhomosisteinemia berkontribusi terhadap proses remodeling jantung yang pada akhirnya memengaruhi konduktivitas listrik jantung sehingga memunculkan gambaran abnormalitas gelombang EKG berupa pemanjangan QTc dan pelebaran QRS-T angle pada hewan coba. Pada penelitian ini ditemukan bahwa defisiensi B12 dan peningkatan kadar homosistein menyebabkan perubahan morfologi ke arah hipertrofi patologis pada otot jantung. Hal tersebut ditandai dengan bertambahnya tebal miokardium serta bertambahnya rasio berat jantung terhadap berat badan pada kelompok defisien. Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa defisiensi vitamin B12 menyebabkan penurunan ekspresi protein *Peroxisome Proliferator Gamma Coactivator-1alpha*/ PGC-1 α pada jantung tikus putih jantan yang berperan dalam regulasi energi di kardiomyosit. Mekanisme yang mendasari hal ini adalah defisiensi vitamin B12 menyebabkan kondisi defisiensi donor metil yang berujung pada hipometilasi protein PGC-1 α . Selain itu, pada penelitian ini juga ditemukan bahwa defisiensi vitamin B12 menyebabkan peningkatan kadar BNP-45 plasma tikus putih jantan. Mekanisme yang mendasari hal ini adalah keadaan hiperhomosisteinemia yang disebabkan oleh defisiensi kobalamin/vitamin B12.

6.2 Saran

Beberapa saran terkait penelitian ini, antara lain :

- Disarankan untuk melakukan pengukuran kardiomyosit melalui teknik morfometri sel dan *Cardiac Surface Area*/CSA untuk lebih meyakinkan terjadinya hipertrofi ventrikel kiri.
- Disarankan untuk melakukan pemeriksaan imunohistokimia/IHK protein PGC-1 α untuk mengetahui lokasi dan sebaran protein tersebut pada kardiomyosit serta

pemeriksaan proteomik untuk mengevaluasi tingkat ekspresi protein PGC-1 α di jantung.

- Disarankan untuk melakukan pemeriksaan imunohistokimia/IHK *Connexin* untuk mengetahui pengaruh peningkatan kadar homosistein (hiperhomosisteinemia) terhadap morfologi *gap junction* dalam konteks konduktivitas listrik pada jantung.
- Disarankan untuk melakukan analisis ekspresi protein penanda spesifik mitokondria yang menjadi *downstream signaling pathway* dari PGC-1 α (misalkan, GLUT-4 dan FABP).
- Disarankan untuk melakukan studi longitudinal dengan durasi studi yang lebih panjang sebagai upaya untuk mempelajari lebih dalam tentang peran vitamin B12 dalam mekanisme konduksi listrik di jantung.
- Disarankan untuk melakukan penelitian yang mengimplementasikan pemberian suplementasi kobalamin/vitamin B12 pada kasus-kasus gangguan kardiovaskuler terutama hipertrofi jantung pada pasien yang memiliki faktor risiko defisiensi vitamin B12, misalkan konsumsi metformin jangka panjang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sakata Y, Shimokawa H. Epidemiology of heart failure in Asia. *Circ J*. 2013;77(9):2209–17.
2. Litbang Kemkes. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. Lap Nas 2013. 2013;
3. Glier MB, Green TJ, Devlin AM. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(1):172–82.
4. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2012;23(8):853–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>
5. Rodwell V, Bender D, Botham K, Kennelly P, Weil A. Harper's Illustrated Biochemistry, 30th Edition. 2006;821.
6. Randaccio L, Geremia S, Demitri N, Wuerges J. Vitamin B12: Unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. *Molecules*. 2010;15(5):3228–59.
7. O'Leary F, Samman S. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*. 2010;2(3):299–316.
8. Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* [Internet]. 2013;95(5):1033–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.020>
9. J Siddiqua T. Vitamin B12 Deficiency in Pregnancy and Lactation: Is there a Need for Pre and Post-natal Supplementation? *J Nutr Disord Ther*. 2014;04(02).
10. Hirschowitz BI, Worthington J, Mohnen J. Vitamin B12 deficiency in hypersecretors during long-term acid suppression with proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(11):1110–21.
11. Ko SH, Ko SH, Ahn YB, Song KH, Han K Do, Park YM, et al. Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*. 2014;29(7):965–72.
12. Fragasso A, Mannarella C, Ciancio A, Sacco A. Functional vitamin B12 deficiency in alcoholics: An intriguing finding in a retrospective study of megaloblastic anemic patients. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2010;21(2):97–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2009.11.012>
13. Solomon LR. Functional cobalamin (vitamin B12) deficiency: Role of advanced age and disorders associated with increased oxidative stress. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2015;69(6):687–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.272>
14. Pawlak R. Is vitamin B<inf>12</inf> deficiency a risk factor for cardiovascular disease in vegetarians? *Am J Prev Med* [Internet]. 2015;48(6):e11–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2015.02.009>

15. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Melchert RB, et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2003;285(2 54-2):679–86.
16. Taban-Shomal O, Kilter H, Wagner A, Schorr H, Umanskaya N, Hübner U, et al. The cardiac effects of prolonged vitamin B12 and folate deficiency in rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2009;9(2):95–102.
17. Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol*. 2011;225(3):324–35.
18. Gaggin HK, Januzzi JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013;1832(12):2442–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.014>
19. Januzzi JL. Natriuretic peptides as biomarkers in heart failure. *J Investig Med*. 2013;61(6):950–5.
20. Kelly J. Review. The electrocardiogram in heart failure. *Age Ageing*. 2000;29(3):203–6.
21. Zago GT, Andreão RV, Rodrigues SL, Mill JG, Filho MS. ECG-based detection of left ventricle hypertrophy. *Rev Bras Eng Biomed*. 2015;31(2):125–32.
22. Green R, Allen L, Bjørke-Monsen A-L, Brito A. Vitamin B12 deficiency Sacramento Area Latino Study on Aging View project. *ResearchGate* [Internet]. 2017;3(17040):1–20. Available from: www.nature.com/nrdp
23. Hughes CF, Ward M, Hoey L, McNulty H. Vitamin B12 and ageing: Current issues and interaction with folate. *Ann Clin Biochem*. 2013;50(4):315–29.
24. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015;14(1):1–10.
25. Halsted CH, Medici V. Vitamin-Dependent Methionine Metabolism and Alcoholic Liver Disease 1. 2011;(6):421–7.
26. Drahansky M, Paridah M., Moradbak A, Mohamed A., Owolabi F, Abdulwahab Taiwo, Asniza M, et al. We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists TOP 1%. Intech [Internet]. 2016;(tourism):13. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
27. Khalid Serraj EA. The Syndrome of Food-Cobalamin Malabsorption: A Personal View in a Perspective of Clinical Practice. *J Blood Disord Transfus*. 2011;02(02).
28. Lam JR, Schneider JL, Zhao W, Corley DA. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013;310(22):2435–42.
29. Wong CW. Vitamin B¹² deficiency in the elderly: Is it worth screening?

- Hong Kong Med J. 2015;21(2):155–64.
30. Pawlak R, Lester SE, Babatunde T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: A review of literature. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2014;68(5):541–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.46>
 31. Waly MI, Kharbanda KK, Deth RC. Ethanol Lowers Glutathione in Rat Liver and Brain and Inhibits Methionine Synthase in a Cobalamin-Dependent Manner. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(2):277–83.
 32. Niafar M, Hai F, Porhomayon J, Nader ND. The role of metformin on vitamin B12 deficiency: a meta-analysis review. *Intern Emerg Med*. 2014;10(1):93–102.
 33. Beulens JWJ, Hart HE, Kuijs R, Kooijman-Buiting AMJ, Rutten GEHM. Influence of duration and dose of metformin on cobalamin deficiency in type 2 diabetes patients using metformin. *Acta Diabetol*. 2015;52(1):47–53.
 34. Sherwood L. *Human Physiology From Cells to System*. 9th ed. Sherwood L, editor. Boston, USA: Cengage Learning; 2016. 1–960 p.
 35. Melorose J, Perroy R, Careas S. *Human Physiology De Unglaub Silverthorn*. 2013.
 36. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007;115(19):2540–8.
 37. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011;1813(7):1360–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.006>
 38. Patten IS, Arany Z. PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;23(2):90–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2011.09.007>
 39. Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2010;107(7):825–38.
 40. Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism Structure and function of PGC-1. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011;43(4):248–57.
 41. Moshal K, Metreveli N, Frank I, Tyagi S. Mitochondrial MMP Activation, Dysfunction and Arrhythmogenesis in Hyperhomocysteinemia. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6(2):84–92.
 42. Sundström J, Sullivan L, Selhub J, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Jacques PF, et al. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: The Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2004;25(6):523–30.
 43. Herrmann M, Taban-Shomal O, Hübner U, Böhm M, Herrmann W. A review of homocysteine and heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(6):571–6.
 44. Herrmann W, Herrmann M, Joseph J, Tyagi SC. Homocysteine , brain natriuretic peptide and chronic heart failure : a critical review. 2007;45(12):1633–44.
 45. Mishra PK, Tyagi N, Kundu S, Tyagi SC. MicroRNAs Are Involved in Homocysteine-

- Induced Cardiac Remodeling. *Cell Biochem Biophys*. 2009;55(3):153–62.
46. Guéant Rodriguez RM, Spada R, Pooya S, Jeannesson E, Moreno Garcia MA, Anello G, et al. Homocysteine predicts increased NT-pro-BNP through impaired fatty acid oxidation. *Int J Cardiol* [Internet]. 2013;167(3):768–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.047>
 47. Piquereau J, Moulin M, Zurlo G, Mateo P, Gressette M, Paul JL, et al. Cobalamin and folate protect mitochondrial and contractile functions in a murine model of cardiac pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2017;102:34–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.11.010>
 48. Law P, Kharche S, Stott J, Zhang H. Effects of elevated homocysteine hormone on electrical activity in the human atrium: A simulation study. *Proc 31st Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc Eng Futur Biomed EMBC 2009*. 2009;3936–9.
 49. Maalouf R, Bailey S. A review on B-type natriuretic peptide monitoring: assays and biosensors. *Heart Fail Rev*. 2016;21(5):567–78.
 50. Ferdinal F, Suyatna FD, Wanandi SI, Sadikin M. Expression of B-type natriuretic peptide-45 (BNP-45) gene in the ventricular myocardial induced by systemic chronic hypoxia. *Acta Med Indones*. 2009;41(3):136–43.
 51. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structure, receptors, physiologic function and therapeutic application. 2009;(191).
 52. Ichiki T, Huntley BK, Burnett JC. BNP Molecular Forms and Processing by the Cardiac Serine Protease Corin. *Adv Clin Chem*. 2013;61:1–31.
 53. Lam CSP. Heart failure in Southeast Asia: facts and numbers. *ESC Hear Fail*. 2015;2(2):46–9.
 54. Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, Nuti R. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): Measurement and relevance in heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6(1):411–8.
 55. Scott JM, Molloy AM. The discovery of vitamin B12. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(3):239–45.
 56. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624–30.
 57. Brower M, Grace M, Kotz CM, Koya V. Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab Anim Res*. 2015;31(4):166.
 58. Hannibal L, Lysne V, Bjorke-Monsen A-L, Behringer S, Grunert SC, Spiekerkoetter U, et al. Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Front Mol Biosci*. 2016;3(27):1–16.
 59. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem*.

- 2006;52(2):278–85.
60. Amani P, Prijanti AR, Jusuf AA, Kartinah NT, Ujianti I, Murthi AK, et al. Cobalamin restriction with AIN-93M chow modification: Hematology and cardiovascular parameter assessment. *AIP Conf Proc.* 2019;2092(April):1–5.
 61. Struck MB, Andrutis KA, Ramirez HE, Battles AH. Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(3):344–8.
 62. Giroux MC, Hélie P, Burns P, Vachon P. Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp Anim.* 2015;64(3):253–60.
 63. Moshal KS, Camel CK, Kartha GK, Steed MM, Tyagi N, Sen U, et al. Cardiac Dys-synchronization and Arrhythmia in Hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res.* 2007;4(4):289–94.
 64. PG P, AAM W. The measurement of the Q-T interval. *Curr Cardiol Rev.* 2014;10(3):287–94.
 65. Walker E, Black J, Parris C, Bryda EC, Cansino S, Hunt L, et al. Effect of experimental hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in the rat. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(2):175–80.
 66. Östman-Smith I, Wisten A, Nylander E, Bratt EL, Granelli ADW, Oulhaj A, et al. Electrocardiographic amplitudes: A new risk factor for sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2010;31(4):439–49.
 67. Andrew Oehler, MD1, Trevor Feldman, BS2, Charles A. Henrikson, MD, MPH2, and Larisa G. Tereshchenko, MD P. QRS-T Angle: A Review Andrew. *Ann Noninvasive electrocardiol.* 2014;19(16):534–42.
 68. Voulgari C, Tentolouris N. Retraction Notice: Assessment of the Spatial QRS-T Angle by Vectorcardiography: Current Data and Perspectives. *Curr Cardiol Rev.* 2010;5(4):251–62.
 69. Schalij MJ, Borleffs CJW, Scherptong RWC, Man SC, Van Welsenes GH, Bax JJ, et al. Predicting ventricular arrhythmias in patients with ischemic heart disease: Clinical application of the ECG-derived QRS-T angle. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2009;2(5):548–54.
 70. Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(1):1–12.
 71. Sathnur Pushpakumar, Sourav Kundu U Sen. Endothelial Dysfunction: The Link Between Homocysteine and Hydrogen Sulfide. *Curr Med Chem.* 2014;21(32):3662–72.
 72. Joseph J, Washington A, Joseph L, Koehler L, Fink LM, Hauer-Jensen M, et al. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2002;283(6 52-6):2567–74.

73. Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Melchert RB, Joseph J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15(2):75–82.
74. Cao Z, Zhang Y, Sun T, Zhang S, Yu W, Zhu J. Homocysteine induces cardiac hypertrophy by up-regulating ATP7a expression. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):12829–36.
75. Takahashi-Iñiguez T, García-Hernandez E, Arreguín-Espinosa R, Flores ME. Role of Vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13(6):423–37.

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor: 704 /UN2.F1/ETIK/VI/2018
Hal : Amandemen dan perpanjangan *ethical approval*

25 Juni 2018

Yth. Aditya Krishna Murthi
Peneliti Utama
Ilmu Biomedik FKUI
Jakarta

Sehubungan dengan surat Saudara pada tanggal 07 Juni 2017 terkait permohonan adendum dan perpanjangan *ethical approval* protokol penelitian dengan rincian adendum sebagai berikut :

No.	Perubahan	Protokol Lama	Protokol Adendum
1.	Judul Penelitian	Dampak Defisiensi Vitamin B12 pada Ginjal dan Jantung Ditinjau dari Fungsi Enzim Methionine Synthase dan Methylmalonyl-CoA Mutase serta Petanda Stress Oksidatif	Pengaruh Defisiensi Kobalamin/ Vitamin B12 terhadap Gambaran EKG, Ekspresi Protein <i>Brain Natriuretic Peptide</i> (BNP) dan <i>Peroxisome Proliferator Gamma Coactivator</i> (PGC-1α)
2.	Peneliti Utama	Dr. dr. Ani Retno Prijanti, M.S	Aditya Krishna Murthi
3.	Penambahan Parameter penelitian yaitu : 1. Pemeriksaan EKG pada hewan coba 2. Pemeriksaan protein BNP-45 dan PGC-1α homogenat jaringan jantung hewan coba.		

Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI-RSCM :

- Menyetujui permohonan amandemen pada protokol penelitian tersebut dan penelitian tersebut dapat dilaksanakan dengan menggunakan surat persetujuan etik (*ethical approval*) sebelumnya dengan nomor : 219/UN2.F1/ETIK/2017, tanggal 13 Maret 2017.
- Memberikan perpanjangan Surat Keterangan Lolos Kaji Etik (*Ethical Approval*) untuk pelaksanaan penelitian yang dimaksud selama satu tahun, terhitung dari 13 Maret 2018 sampai dengan 12 Maret 2019.

Atas laporan dan kerjasamanya, kami ucapkan terima kasih



Prof. dr. Rita Sita Sitorus, SpM(K), PhD
Ketua

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2. Bukti submit jurnal

INNOVARE ACADEMIC SCIENCES PVT. LTD.
B-11, Housing Colony, In front of Bima Hospital,
Mandsaur-458001, Madhya Pradesh, India
www.innovareacademics.in



Registration No: U22120MP2012PTC029431

GST No. 23AADCI2414E1Z9

IAS/EST/2018-19/05/01

Date: 16/05/2019

Letter of Acceptance

To,
Dr. Purwita Wijaya Laksmi, Chairperson of the Committee
The 3rd ICE on IMERI 2018, IMERI Tower, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia
6th Salemba Raya Street, Jakarta, Indonesia 10430
P. +6221 29189160

We are happy to inform you that the 33 manuscripts from the conference ICE on IMERI 2018
have been accepted for the publications.

Director
Innovare Academic Sciences Pvt Ltd

Lampiran 2. Bukti submit jurnal

List of 33 Manuscripts

No	Article ID	Article Title	Corresponding author
1			
2			
3			
4			
5			
6	20150	The Impact of Cobalamin Deficiency on Heart Function; A Study on Abnormalities in Electrocardiography Patterns	Imelda Rosalyn Sianipar
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			

Lampiran 3. ELISA Kit Instruction

Mouse Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1-alpha ELISA Kit

Catalog No: MBS2885172

96 Tests

Operating Instruction

FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

PLEASE READ THROUGH ENTIRE PROCEDURE BEFORE BEGINNING!

Synonyms

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1-alpha, PPAR-gamma coactivator 1-alpha, PPARGC-1-alpha);

Intended use

This immunoassay kit allows for the in vitro quantitative determination of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1-alpha concentrations in serum, Plasma, tissue homogenates and Cell culture supernates and Other biological fluids.

Test principle

The microtiter plate provided in this kit has been pre-coated with an antibody specific to PGC-1-alpha. Standards or samples are then added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated polyclonal antibody preparation specific for PGC-1-alpha and Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. Then a TMB substrate solution is added to each well. Only those wells that contain PGC-1-alpha, biotin-conjugated antibody and enzyme-conjugated Avidin will exhibit a change in color. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of a sulphuric acid solution and the color change is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm $\pm$ 2 nm. The concentration of PGC-1-alpha in the samples is then determined by comparing the O.D. of the samples to the standard curve.

Materials and components

Reagent	Quantity
Assay plate	1
Standard	2
Sample Diluent	1 $\times$ 20ml
Assay Diluent A	1 $\times$ 10ml
Assay Diluent B	1 $\times$ 10ml
Detection Reagent A	1 $\times$ 120 μ l
Detection Reagent B	1 $\times$ 120 μ l
Wash Buffer (25 x concentrate)	1 $\times$ 30ml
Substrate	1 $\times$ 10ml
Stop Solution	1 $\times$ 10ml
Plate sealer for 96 wells	5
Instruction	1

Other supplies required

Microplate reader.
Pipettes and pipette tips.
EP tube
Deionized or distilled water.

Storage of the kits

The **Assay Plate, Standard, Detection Reagent A and Detection Reagent B** should be stored at -20°C upon being received. After receiving the kit, **Substrate should be always stored at 4°C**. Other reagents are kept according to the labels on vials. But for long term storage, please keep the whole kit at -20°C (Except the substrate). The unused strips should be kept in a sealed bag with the desiccant provided to minimize exposure to damp air. The test kit may be used throughout the expiration date of the kit (six months from the date of manufacture). Opened test kits will remain stable until the expiring date shown, provided it is stored as prescribed above.

Note: Because of the inherent stability of lyophilized material, and may ship these materials at ambient temperature.

Sample collection and storage

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes before centrifugation for 15 minutes at approximately 1000 $\times$ g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for 15 minutes at 1000 $\times$ g at 2°C - 8°C within 30 minutes of collection. Store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

-FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES-

Tissue homogenates - The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type. For this assay, tissue was rinsed with 1X PBS to remove excess blood, homogenized in 20 mL of 1X PBS and stored overnight at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. After two freeze-thaw cycles were performed to break the cell membranes, the homogenates were centrifuged for 5 minutes at 5000 x g. Remove the supernate and assay immediately or aliquot and store at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Cell culture supernates and Other biological fluids - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note:

1. Samples to be used within 5 days may be stored at $2-8^{\circ}\text{C}$, otherwise samples must stored at -20°C (1 month) or -80°C (2 months) to avoid loss of bioactivity and contamination.
2. Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts of certain chemicals.
3. Influenced by the factors including cell viability, cell number and also sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.
4. Sample hemolysis will influence the result, so hemolytic specimen can not be detected.
5. When performing the assay slowly bring samples to room temperature.

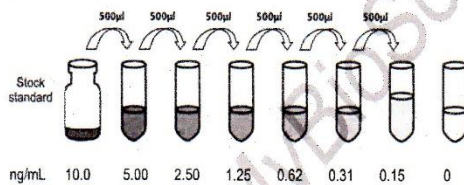
Limitations of the procedure

1. MBS is only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
2. The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
3. Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
4. If samples generate values higher than the highest standard, further dilute the samples with the Sample Diluent and repeat the assay. Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.

Reagent preparation

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 30 mL of Wash Buffer Concentrate into deionized or distilled water to prepare 750 mL of Wash Buffer.

Standard - Reconstitute the Standard with 1.0 mL of Sample Diluent. This reconstitution produces a stock solution of 10.0 ng/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making serial dilutions (Making serial dilution in the wells directly is not permitted). The undiluted standard serves as the high standard (10.0 ng/mL). The Sample Diluent serves as the zero standard (0 ng/mL).



Detection Reagent A and B - Dilute to the working concentration using Assay Diluent A and B (1:100), respectively.

Assay procedure

Allow all reagents to reach room temperature (Please do not dissolve the reagents at 37°C directly.). **All the reagents should be mixed thoroughly by gently swirling before pipetting. Avoid foaming.** Keep appropriate numbers of strips for 1 experiment and remove extra strips from microtiter plate. Removed strips should be resealed and stored at 4°C until the kits expiry date. Prepare all reagents, working standards and samples as directed in the previous sections. Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments.

1. Add 100 µl of **Standard**, **Blank**, or **Sample** per well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 2 hours at 37°C .
2. Remove the liquid of each well, don't wash. Add 100 µl of **Detection Reagent A** working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 1 hour at 37°C . Detection Reagent A working solution may appear cloudy. Warm to room temperature and mix gently until solution appears uniform.
3. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (approximately 400 µl) using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1-2 minutes. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
4. Add 100 µl of **Detection Reagent B** working solution to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 1 hour at 37°C .
5. Repeat the aspiration/wash process for 5 times as conducted in step 3.
6. Add 90 µl of **Substrate Solution** to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate within **15-30 minutes** at 37°C . Protect from light.
7. Add 50 µl of **Stop Solution** to each well. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
8. Determine the optical density of each well at once, using a microplate reader set to 450 nm.

Note:

-FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES-

1. Absorbance is a function of the incubation time. Therefore, prior to starting the assay it is recommended that all reagents should be freshly prepared prior to use and all required strip-wells are secured in the microtiter frame. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption.
2. Please carefully reconstitute Standards or working Detection Reagent A and B according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals have completely dissolved. **The reconstituted Standards Detection Reagent A and B can be used only once.** This assay requires pipetting of small volumes. To minimize imprecision caused by pipetting, ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µl for once pipetting.
3. To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay.
4. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents to the assay plate should not exceed 10 minutes.
5. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
6. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
7. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended.
8. Substrate Solution is easily contaminated. Please protect it from light.
9. The web version of manual is only for reference, subject to the instruction shipping with the kit.

Specificity

This assay recognizes recombinant and natural mouse PGC-1-alpha. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Note:

Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between mouse PGC-1-alpha and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

Detection Range

0.15 ng/mL -10.0 ng/mL.

Calculation of results

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density. Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the x-axis against the concentration on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the PGC-1-alpha concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. It is recommended to use some related software to do this calculation, such as curve expert 1.3. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

Important note:

1. Limited by the current condition and scientific technology, we can't completely conduct the comprehensive identification and analysis on the raw material provided by suppliers. So there might be some qualitative and technical risks to use the kit
2. The final experimental results will be closely related to validity of the products, operation skills of the end users and the experimental environments. Please make sure that sufficient samples are available.
3. Kits from different batches may be a little different in detection range, sensitivity and color developing time. Please perform the experiment exactly according to the instruction attached in kit while electronic ones from our website is only for information.
4. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results.
5. Do not remove microtiter plate from the storage bag until needed.
6. A microtiter plate reader with a bandwidth of 10nm or less and an optical density range of 0-3 OD or greater at 450nm wavelength is acceptable for use in absorbance measurement.
7. Use fresh disposable pipette tips for each transfer to avoid contamination.
8. Do not substitute reagents from one kit lot to another. Use only the reagents supplied by manufacturer.
9. Even the same operator might get different results in two separate experiments. In order to get better reproducible results, the operation of every step in the assay should be controlled. Furthermore, a preliminary experiment before assay for each batch is recommended.
10. Each kit has been strictly passed Q.C test. However, results from end users might be inconsistent with our in-house data due to some unexpected transportation conditions or different lab equipments. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from above factors, too.
11. Kits from different manufacturers for the same item might produce different results, since we haven't compared our products with other manufacturers.
12. The instruction manual also suit for the kit of 48T, but all reagents of 48T kit is reduced by half.
13. Valid period: six months.

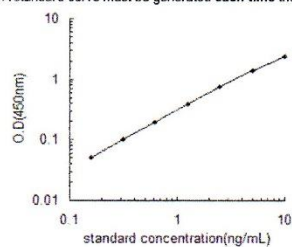
Precaution

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

-FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES-

TYPICAL DATA

This graph data is shown as an example. A standard curve must be generated **each time** the assay is run.



-FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES-

Lampiran 4. Kandungan gizi pakan standar & pakan modifikasi AIN-93M

a. Komposisi pakan kontrol/standar

AIN-93M Maintenance Purified Diet (also known as #5801-M)		58M1
DESCRIPTION		NUTRITIONAL PROFILE ¹
TestDiet® AIN-93M Maintenance Purified Diet is the maintenance diet for rodents recommended by the American Institute of Nutrition. It is formulated to substitute for the previous version (AIN-76A) to improve animal performance. Storage conditions are particularly critical to TestDiet® products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. If long term studies are involved, store the diet at -20° C or colder. Be certain to keep in air tight containers.		
Product Forms Available*	Catalog #	
1/2" Pellet	7603	
1/2" Pellet, Irradiated	1810541	
3/16" Pellet	1812811	
Meal	1810540	
Meal, Irradiated	1810542	
*Other Forms Available By Request		
TYPICAL ANALYSIS		
Protein.....	13.06%	
Fat.....	4.0%	
Fiber.....	5.0%	
Carbohydrate.....	73.8%	
Metabolizable Energy.....	3.83	
INGREDIENTS (%)		
Corn Starch	46.5692	
Dextrin	15.5000	
Casein - Vitamin Free	14.0000	
Sucrose	10.0000	
Powdered Cellulose	5.0000	
Soybean Oil	4.0000	
AIN 93M Mineral Mix	3.5000	
AIN 93 Vitamin Mix	1.0000	
Choline Bitartrate	0.2500	
L-Cystine	0.1800	
t-Butylhydroquinone	0.0008	
FEEDING DIRECTIONS		
Feed ad libitum to mice and rats. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.		
CAUTION:		
Perishable, upon receipt store in a cool dry place, refrigeration recommended.		
For laboratory animal experimental use only, NOT for human consumption.		
2/15/2011		
		Protein, % 13.0
		Arginine, % 0.49 Histidine, % 0.36 Isoleucine, % 0.67 Leucine, % 1.21 Lysine, % 1.02 Methionine, % 0.36 Cystine, % 0.23 Phenylalanine, % 0.67 Tyrosine, % 0.71 Threonine, % 0.54 Tryptophan, % 0.15 Valine, % 0.80 Alanine, % 0.39 Aspartic Acid, % 0.90 Glutamic Acid, % 2.86 Glycine, % 0.27 Proline, % 1.65 Serine, % 0.77 Taurine, % 0.00
		Minerals
		Calcium, % 0.50 Phosphorus, % 0.31 Potassium, % 0.36 Magnesium, % 0.05 Sodium, % 0.13 Chlorine, % 0.20 Fluorine, ppm 1.0 Iron, ppm 39 Zinc, ppm 35 Manganese, ppm 11 Copper, ppm 6.0 Cobalt, ppm 0.0 Iodine, ppm 0.21 Chromium, ppm 1.0 Molybdenum, ppm 0.14 Selenium, ppm 0.22
		Vitamins
		Vitamin A, IU/g 4.0 Vitamin D-3 (added), IU/g 1.0 Vitamin E, IU/kg 78.8 Vitamin K (as menadione), ppm 0.75 Thiamin Hydrochloride, ppm 6.0 Riboflavin, ppm 6.5 Niacin, ppm 30 Pantothenic Acid, ppm 16 Folic Acid, ppm 2.1 Pyridoxine, ppm 5.8 Biotin, ppm 0.2 Vitamin B-12, mcg/kg 28 Choline Chloride, ppm 1,250 Ascorbic Acid, ppm 0.0
		Fat, % 4.1
		Cholesterol, ppm 0 Linoleic Acid, % 2.04 Linolenic Acid, % 0.31 Arachidonic Acid, % 0.00 Omega-3 Fatty Acids, % 0.31 Total Saturated Fatty Acids, % 0.60 Total Monounsaturated Fatty Acids, % 0.88 Polyunsaturated Fatty Acids, % 2.16
		Fiber (max), % 5.0
		Carbohydrates, % 73.0
		Energy (kcal/g) ² 3.77
		From: kcal % Protein 0.518 13.7 Fat (ether extract) 0.368 9.8 Carbohydrates 2.922 77.5
		1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As Fed basis except where otherwise indicated. 2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.



TestDiet
www.testdiet.com

b. Komposisi pakan modifikasi

TEMPORARY SPEC SHEET

LT409

INGREDIENTS (%)		NUTRITIONAL PROFILE ¹	
Corn Starch	41.5692	Protein, %	12.9
Maltodextrin	15.5000	Arginine, %	0.49
Casein - Vitamin Tested	14.0000	Histidine, %	0.36
Sucrose	10.0000	Isoleucine, %	0.67
Pectin	5.0000	Leucine, %	1.21
Powdered Cellulose	5.0000	Lysine, %	1.02
Soybean Oil	4.0000	Methionine, %	0.36
AIN-93M Mineral Mix	3.5000	Cystine, %	0.23
AIN-93 Vitamin Mix w/ no Added	1.0000	Phenylalanine, %	0.67
Vitamin B12		Tyrosine, %	0.71
Choline Bitartrate	0.2500	Threonine, %	0.54
L-Cystine	0.1800	Tryptophan, %	0.15
t-Butylhydroquinone	0.0008	Valine, %	0.80
		Alanine, %	0.39
		Aspartic Acid, %	0.90
		Glutamic Acid, %	2.86
		Glycine, %	0.27
		Proline, %	1.65
		Serine, %	0.77
		Taurine, %	0.00
		Fat, %	4.1
		Cholesterol, ppm	0
		Linoleic Acid, %	2.04
		Linolenic Acid, %	0.31
		Arachidonic Acid, %	0.00
		Omega-3 Fatty Acids, %	0.31
		Total Saturated Fatty Acids, %	0.60
		Total Monounsaturated Fatty Acids, %	0.88
		Polyunsaturated Fatty Acids, %	2.16
		Fiber (max), %	10.0
		Carbohydrates, %	67.2
		Energy (kcal/g) ²	3.57
		From:	kcal %
		Protein	0.516 14.5
		Fat (ether extract)	0.367 10.3
		Carbohydrates	2.688 75.3
		Minerals	
		Calcium, %	0.51
		Phosphorus, %	0.31
		Potassium, %	0.36
		Magnesium, %	0.05
		Sodium, %	0.14
		Chloride, %	0.22
		Fluorine, ppm	1.0
		Iron, ppm	39
		Zinc, ppm	35
		Manganese, ppm	11
		Copper, ppm	6.0
		Cobalt, ppm	0.0
		Iodine, ppm	0.21
		Chromium (added), ppm	1.0
		Molybdenum, ppm	0.14
		Selenium, ppm	0.22
		Vitamins	
		Vitamin A, IU/g	4.0
		Vitamin D-3 (added), IU/g	1.0
		Vitamin E, IU/kg	78.8
		Vitamin K, ppm	0.75
		Thiamin Hydrochloride, ppm	4.8
		Riboflavin, ppm	6.5
		Niacin, ppm	30
		Pantothenic Acid, ppm	16
		Folic Acid, ppm	2.1
		Pyridoxine, ppm	5.8
		Biotin, ppm	0.2
		Vitamin B-12, mcg/kg	3
		Choline Chloride, ppm	1,250
		Ascorbic Acid, ppm	0.0

CAUTION:
Perishable - store properly upon receipt.
For laboratory animal use only, not for human consumption.

2/17/2017



TestDiet
www.testdiet.com

Lampiran 5. Hasil analisis laboratorium pakan tikus

 **PT. SARASWANTI INDO GENETECH**
The First Indonesian Molecular Biotechnology Company
GRAHA SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113, INDONESIA
Phone: +62-251-7532348 (hunting) - 082 111 516 516, Fax: +62-251-7540 927, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis
No: SIG.LHP.VIII.2017.45658

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1.	Vitamin B12	mcg / 100 g	1.96	-	18-12-6/MU/SMM-SIG, LC MSMS

Bogor, August 11, 2017
PT Saraswanti Indo Genetech


Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium

Page 2 of 2

 **PT. SARASWANTI INDO GENETECH**
The First Indonesian Molecular Biotechnology Company
GRAHA SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113, INDONESIA
Phone: +62-251-7532348 (hunting) - 082 111 516 516, Fax: +62-251-7540 927, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis
No: SIG.LHP.VIII.2017.45657

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1.	Vitamin B12	mcg / 100 g	Not detected	0.08	18-12-6/MU/SMM-SIG, LC MSMS

Bogor, August 11, 2017
PT Saraswanti Indo Genetech


Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium

Page 2 of 2

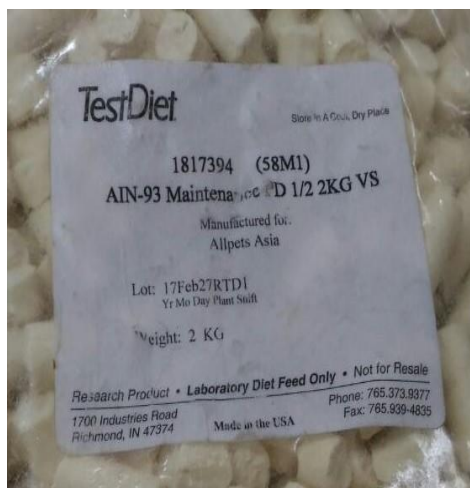
Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



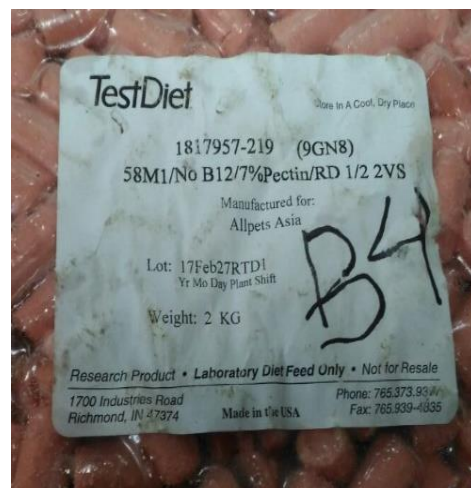
Kandang tikus tampak depan



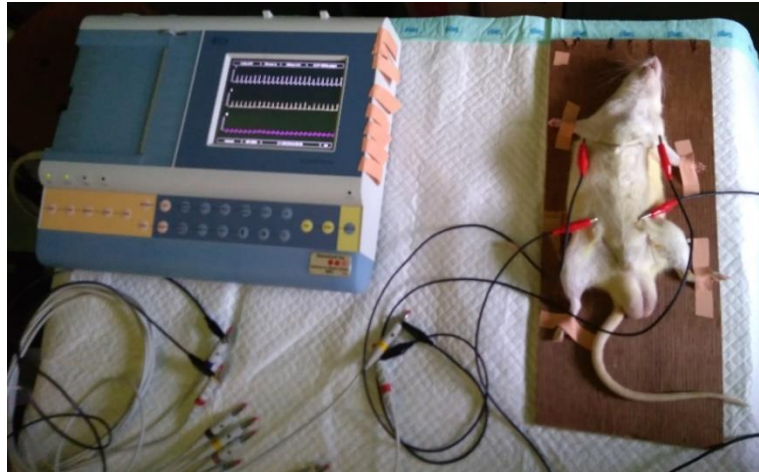
Kandang tikus tampak atas



Pakan kontrol/standard



Pakan defisien/modifikasi



Proses rekam EKG pada tikus



Dekapitasi-diseksi tikus



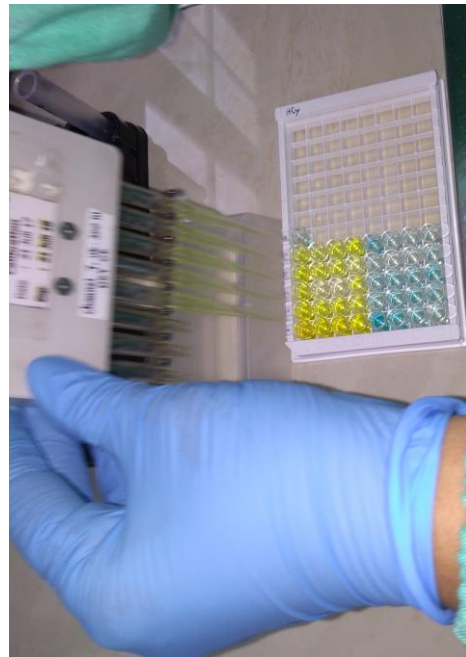
Penanganan spesimen organ tikus



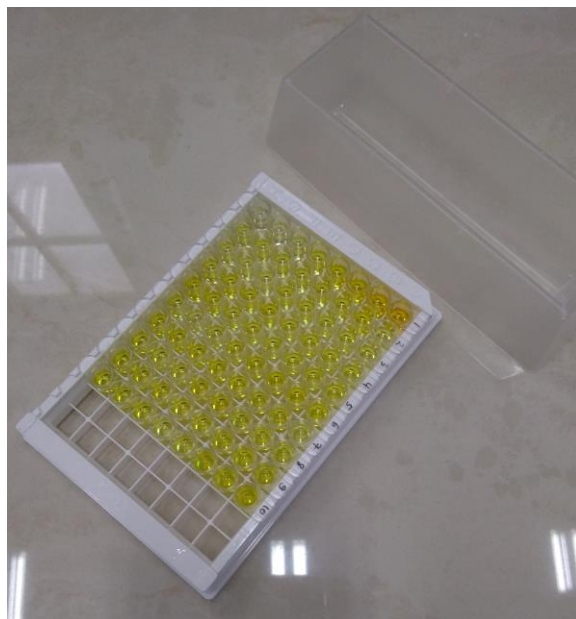
Spesimen jantung tikus



Homogenat jantung



ELISA Hcy plasma



ELISA PGC-1 α jantung

Lampiran 7. Artikel Penelitian

THE IMPACT OF COBALAMIN DEFICIENCY ON HEART FUNCTION; A STUDY ON ABNORMALITIES IN ELECTROCARDIOGRAPHY PATTERNS

DEWI IRAWATI SOERIA SANTOSO¹, ADITYA K MURTHI^{2,3}, SOPHIE
YOLANDA¹, PATWA AMANI², IRENA UJIANI³, IMELDA ROSALYN
SIANIPAR^{1,*}

¹Department of Medical Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia, ²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Trisakti University, Jakarta, Indonesia, ³Graduate Student in Biomedical Sciences, Department of Physiology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia. *Corresponding author: imelda.rosalyn@ui.ac.id

ABSTRACT

Background: Cobalamin deficiency may cause a lack of dietary methyl donors, which alter the heart metabolism. Cobalamin deficiency is common in patients with malnutrition, gastric ulcers, diabetes mellitus, and alcoholism. Most studies on cobalamin deficiency are focused on its relationship with oxidative stress and atherogenesis. Therefore, this study aims to find the correlation between cardiomyocyte's energy metabolism in cobalamin deficiency and the risk of heart abnormalities through analysis of electrocardiography (ECG) patterns.

Materials and methods:—Adult male Sprague-Dawley rats (aged 24-28 weeks) were divided into 2 groups: the control group and cobalamin-deficient group. The control group was given standard diet while the treatment group received a modified diet, type AIN-93M (deficient in cobalamin), for a period of 16 weeks. ECG was performed in both groups on the last day of the 16-week period. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test was also performed to evaluate plasma Hcy and B12 levels in each group at the end of the treatment period.

Results:—At the end of the 16-week period, higher Hcy level and lower plasma B12 level were observed in the treatment group when compared to the control group. ECG patterns showed sinus rhythms in both groups, with a higher QRS amplitude and duration in the treatment group. Two of the seven rats in the treatment group developed cardiac arrhythmia.

Conclusions:–Cobalamin deficiency impairs the heart's energy metabolism with left ventricular enlargement and arrhythmia.

Keywords: Cobalamin deficiency, ECG, Homocysteine, heart abnormality

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is the terminal stage in cardiovascular disease, marked by the inability of the heart to pump blood with normal efficiency.¹ In Asia, mortality and morbidity due to heart failure (HF) is still high.² In the ADHERE-AP (Asian-Pacific) Study, it was reported that HF patients registered in South-East Asia were generally younger (median age of 60 years for Indonesia) as compared with those in East Asia (median age of 77 years for both Hongkong and Taiwan) and in Australia (median age of 77 years). According to the data from Indonesia Basic Health Research (RISKESDAS) 2013, the prevalence of HF in Indonesia is at 0.13% for the total population of approximately 229, 696 people.¹

Most studies on cobalamin deficiencies are still focused on its relationship with oxidative stress and atherogenesis. Recent studies have shown the many classic risk factors for HF, such as smoking, hypertension, dyslipidemia, obesity, and diabetes mellitus.³ One of the risk factors for HF is dietary intake imbalance. A recent study in nutrition and epigenomic/nutrigenomic revealed that some micronutrients are related to cardiovascular metabolism through epigenetic processes.⁴ The micronutrients that may be involved in epigenetic processes are called methyl nutrients such as cobalamin/vitamin B12.^{4,5} Methyl nutrients act as a source of methyl donors needed for DNA methylation, chromatin modification and various enzymatic reactions.⁴ These epigenetic processes affect the activity in mitochondrial cardiomyocytes which regulates the heart's energy metabolism.^{6,7} Thus, deficiency in cobalamin may lead to lack of dietary methyl donors, which will alter the heart metabolism.^{6,7} Cobalamin deficiency may also contribute to an increased plasma Hcy level (Hcy)/hyperhomocysteinemia.⁸ Solomon et al.⁸ observed that high levels of Hcy are related to oxidative stress, dyslipidemia, and

atherogenesis. The prospective Framingham Heart Study observed that the incidents of congestive heart failure (CHF) almost double in individuals with a circulating Hcy concentration above the sex-specific median.⁹ These conditions also may contribute to the risk factors and severity of HF.¹⁰

The prevalence of cobalamin deficiency is high (about 20%) in many developing countries especially in Asia.¹¹ The populations susceptible to cobalamin deficiency are the elderly, pregnant and breastfeeding women, children, and young adults.^{11,12} In Indonesia, although there is no precise data about the prevalence of cobalamin deficiency, the risk is still high because most of its population of a low grade socio-economic status. This is related to the ability to consume meat and other foods with cobalamin content. The risk of B12 deficiency is also high in patients with chronic gastric ulcers who take a proton pump inhibitor as long-term therapy.¹³ A recent study in endocrinology shows that patients with type 2 diabetes mellitus who use metformin as an oral hypoglycemic agents, especially at a higher dose and for a long duration, have developed a risk of cobalamin deficiency.¹⁴ Functional cobalamin deficiency along with megaloblastic anemia is also found in alcohol-dependent patients.¹⁵

This study aims to assess the correlation between cardiomyocyte's energy metabolism in cobalamin deficiency and the risk of heart abnormalities through analysis of ECG patterns. We hypothesized that vitamin B12 deficiency causes hyperhomocysteinemia and induces abnormality of the heart's electrical activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures using animals were approved by the medical research committee of Faculty of Medicine, Universitas Indonesia (219/UN2.FI/ETIK/2017).

Fourteen adult male Sprague-Dawley rats aged 24-28 weeks (provided by The Research and Development division, Ministry of Health, Republic of Indonesia)

were divided into 2 groups: the control group (C; n = 7) and cobalamin-deficient group (D; n 7). Both groups were maintained on a 12 light-dark cycle with free access to food and water. During a 16-week study period, the control group was given a standard diet type, AIN-93M (Harlan Teklad, USA) normal formula while the treatment group received a modified diet based on the same food, AIN-93M but with cobalamin limited. To inhibit unintentional uptake of cobalamin, 5% per kg pectin was added to the modified deficient diet. The rats body weight and food consumption were monitored every month (every 4-week period).

ECG

ECG is a process to record the heart's electrical activity in a period of time using electrodes on the skin.¹⁶ These electrodes detect tiny changes in electrical currents from the heart muscles (depolarization and repolarization) during the heart's contraction.¹⁶ Abnormality in the heart's energy metabolism will result in abnormal electrical conduction, which is expressed as an abnormality in ECG patterns.

ECG was recorded in both groups on the last day of the 16-week period. Before the procedure was carried out, the rats were given intraperitoneal anesthesia with a combined dose of ketamine (100mg/kg) and xylazine (5mg/kg). After anesthetization the rats were restrained on a square board using a small micropore adhesive tape. Electrodes used were acupuncture needles placed subcutaneously on four extremities, on the middle area of the chest and at the upper left axillary region (these ECG points represent lead measurements: I, II, III, aVL, aVR, aVF, V1, and V6). The ECG device used was type BTL-08 MT Plus (USA).

Sample measurements

Blood samples were taken at the beginning and end of the 16-week period. Blood was collected from the *retrobulbar plexus/sinus orbitalis* using a specialized cannula and then stored in the vacuette/vacutainer, which contained Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. Centrifugation was

performed immediately at a speed of 3000 rpm for 15 minutes at room temperature and then plasma was collected by pipetting into a 1.5ml microtube. The samples were stored at -80°C until further analysis was performed.

Plasma Hcy and cobalamin levels were quantified by *direct competitive* Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using polyclonal antibodies against Hcy and cobalamin, respectively. The reagents used were MBS766209 and MBS731816 (MyBioSource, USA). Intra and inter-assay CVs of the Hcy ELISA were <8% and <10%, respectively. Both CVs of the B12 ELISA were <10%. Quality control materials recommended by the manufacturers were used for all samples.

Statistical analyses

Body weight, plasma Hcy, plasma B12, the heart rate, and RS amplitude were analyzed using a t-test (independent t-test for analysis between groups and paired t-test for analysis within a group). The corrected QT interval (QTc) and QRS-T angle were analyzed using a Mann-Whitney test. All data were analyzed with SPSS 21.0 statistic software for Windows (SPSS Inc., USA).

RESULTS

Body weight

At the beginning of the study, the body weight of both the control group and treatment group was statistically homogenous. During the 16-week feeding period, both groups exhibited a significant gain in body weight (C_0 vs C_{16} , ** $p < 0.001$; D_0 vs D_{16} , ** $p < 0.001$) but no significant weight difference was observed between groups (Table 1).

Plasma Hcy and B12 levels

All animals in the treatment group showed a significant increase in plasma Hcy concentration (D_{16} vs D_0 , $p < 0.01$; D_{16} vs C_{16} , ** $p < 0.01$) (Table 1) and a significant

decrease in plasma B12 concentration (D_{16} vs D_0 , $^{**}p < 0.001$) compared to the control group. This condition shows the efficacy of the vitamin deficient model used in this study. Nevertheless, the control group also had a significant decrease in plasma B12 levels (C_0 vs C_{16} , $^{**}p < 0.001$).

ECG

In this study, four parameters of ECG that represented the activity of left ventricle were examined: (1) Heart Rate, (2) QTc, (3) RS amplitude, and (4) QRS-T angle. After a 16-week B12 deficient period, no significant increase in the heart rate was observed, whereas the QTc significantly increased (D vs C , $^*p < 0.05$), the RS amplitude increased, although significantly, and the QRS-T angle significantly increased (D vs C , $^*p < 0.05$) (Table 2). We also observed that two of the seven rats in the treatment group develop cardiac arrhythmias (**fig 1**).

DISCUSSION

The results from this study show that weight gain in both the control group and treatment group after a 16-week study period was consistent with normal growth and development in average Sprague-Dawley rats. Increasing body weight is closely related to advancing age (from “weaning” to “old”) until the rats enter a senescence period, when the body mass starts to decrease.^{17,18} According to the results in this study, feeding rats with either a standard or cobalamin-deficient diet did not affect their weight gain.

Cobalamin is a cofactor that acts as a methyl donor for methionine synthase in the methionine cycle.^{4,5,19} Cobalamin deficiency might impair conversion of Hcy to methionine. Thus, the concentration of Hcy will increase.^{5,19} In this study, we found a statistically significant increase in plasma Hcy concentrations both within the treatment group and between the two groups. These findings are consistent with previous studies on cobalamin which show that deficiency in cobalamin will induce hyperhomocysteinemia.^{20,21}

Measuring plasma or serum cobalamin levels is a gold standard method to determine if a patient is suffering from cobalamin deficiency.^{22,23} There are many causes of cobalamin as such as a *Helicobacter pylori* infection, low dietary intake, gastric malabsorption, and genetic disorders that may result in a low plasma cobalamin concentration.²² In this study, we found that plasma B12 concentrations in the treatment group was significantly decreased. This result is also consistent with previous studies, which states that one of the causes of cobalamin deficiency is low dietary intake and malabsorption (considering the addition of 5% pectin to inhibit unintentional uptake of cobalamin). Meanwhile within the control group, plasma B12 concentration also significantly decreased. This result seemed contradictory because the diet given was standard with no cobalamin deficiency. Even though the plasma B12 levels between the treatment group and the control group was not statistically significant at the end of the treatment, the plasma B12 levels in the treatment groups were still lower than those of the control group (plasma B12 levels in the control group decreased 20.11 pg/ml, while plasma B12 levels in the treatment group decreased 265.98 pg/ml).

ECG was performed to assess the heart's electrical activity. There were four parameters examined in this study. The first parameter was heart rate, in which there was no significant difference between the control group and treatment group. It seems that, diet does not affect heart rate specifically. The normal range of heart rate in adult Sprague-Dawley rats is 330-480 beats/min.²⁴ In this study, the heart rate in both groups was lower than normal. These findings are consistent with a previous study, in which a combination dose of ketamine-xylazine ($\pm 100\text{mg/kg}$ and $\pm 5\text{ mg/kg}$) decreased the heart rate.²⁴ Two of the seven rats in the treatment group developed cardiac arrhythmia. These findings are in line with another study, in which high levels of Hcy/hyperhomocysteinemia impaired the heart's electrical conductivity.^{25,26}

The second parameter examined was the QTc. QTc is a measure of the combination of cardiac depolarization and repolarization as it encompasses both the QRS complex and the J-T interval.²⁷ Ventricular conduction delay is also often associated with (to a lesser degree) lengthening of the QT interval.²⁷ This study shows that

QTc interval in the treatment group was significantly higher when compared to the control group. We may suggest that in the treatment group, the process of depolarization-repolarization was disturbed and might have resulted in delayed ventricular conduction. The most probable explanation was that high levels of Hyc induced the heart remodeling process. Delayed ventricular conduction is the first sign to appear in the heart muscle hypertrophy. This study result supports the pathophysiologic mechanism in cardiac hypertrophy related to hyperhomocysteinemia.^{28,29}

The third parameter examined was the RS amplitude. The RS amplitude is an integral part of the QRS complex and it represents electrical activities in the heart's ventricles (especially left ventricle)³⁰. Previous studies stated that the RS amplitude is closely related to the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy; the higher the RS amplitude, the higher the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy.³⁰ We did not observe any significant increase in the RS amplitude in the treatment group. However, we observed the tendency of increasing RS amplitude in the treatment group. According to this phenomenon, we believe the treatment group was in the process of developing minor hypertrophic cardiomyopathy. Future research with a longer study period is needed to confirm this theory.

The fourth parameter examined was the QRS-T angle. By ECG, one can measure a spatial angle between depolarization and repolarization, specifically an angle between the QRS vector and T vector, namely spatial QRS-T angle.³¹ In previous studies, QRS-T angle has been shown to predict ventricular arrhythmia.³² In this study, the treatment group showed a significant increase in the QRS-T angle. This result is in line with a previous study, as evident in the arrhythmia developed by two of the seven deficient rats. The probable mechanism in this finding is related to hyperhomocysteinemia-induced the heart electrical impairment and is closely related to the possibility of cardiac hypertrophy. In conclusion, this study showed that cobalamin deficiency impairs the heart's energy metabolism with left ventricular enlargement and arrhythmia.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Hibah Publikasi Internasional Terindeks untuk Tugas Akhir Mahasiswa (PITTA) 2018, funded by DRPM Universitas Indonesia No.2089/UN2.R3.1/HKP.05.00/2018. This article was presented at The 3rd International Conference and Exhibition on Indonesian Medical Education and Research Institute (ICE on IMERI 2018). We thank SCRIBENDI English editing service (<https://www.scribendi.com/>) for editing a draft of this manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Riset Kesehatan Dasar-RISKESDAS 2013. Jakarta: Data and Information Center of Ministry of Health, Republic of Indonesia. 2013
2. Sakota Y, Shimokawa H. Epidemiology of heart failure in Asia. *Circ J*. 2013 Sept;77: 2209-17.
3. Kenchaiah S, Narula J, Vasan RS. Risk factors for heart failure. *Medical Clin North Am*. 88. 1145-72.
4. Glier MB, Green TJ, Devlin AM. Methyl nutrients, DNA methylation and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Mar;58:172-82.
5. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics; an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*. 2012 Mar;23: 853-9.
6. Gueant JL, Fofou MC, Hsu SB, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, et al. Molecular and cellular effect of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*. 2013 May;95(5): 1033-40.
7. Garcia MM, Gueant Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, et al. Methyl donors deficiency induce cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol*. 2011 Feb;225: 324-35.
8. Solomon LR. Functional cobalamin (vitamin B12) deficiency: role of advanced age and disorders associated with increased oxidative stress. *Eur J Clin Nutr*. 2015 Jan;69: 687-92.

9. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *J Am Med Association*. 2003;289: 1251-7.
10. Hermann M, Muller S, Kindermann I, Gunther L, Konig J, Bohm M, et al. Plasma B vitamin and their relation to the severity of chronic heart failure. *Am J Clin Nutr*. 2007;85: 117-23.
11. Siddiqua TJ, Allen LH, Raqib R, Ahmed T. Vitamin B12 deficiency in pregnancy and lactation: is there a need for pre and post-natal supplementation?. *J Nutr disorder Ther*. 2014 Sep;4(2): 1-8.
12. Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE. et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ*. 2004 Aug;171(3): 251-9.
13. Hirschowitz BI, Worthington J, Mohnen J. Vitamin B12 deficiency in hypersecretors during long-term acid suppression with proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Feb;27: 1110-21.
14. Ko SH, Ahn YB, Song KH, Park YM, Ko SH, et al. Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*. 2014 Apr;29: 965-72.
15. Fragasso A, Mannarella C, Ciancio A, Sacco A. Functional vitamin B12 deficiency in alcoholics: an intriguing finding in a retrospective study of megaloblastic anemic patients. *Eur J Int Med*. 2010 Jan;21: 97-100.
16. Kelly J, Kelleher K. The electrocardiogram in heart failure. *Age and Ageing*. 2000 Jun; 29: 203-6.
17. Brower M, Grace M, Kotz CM, Koya V. Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab Anim Res*. 2015 Dec;31(4): 166-73.
18. Sengupta P. The laboratory rats: relating its age with humans. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6): 624-30.
19. Bender DA. Special topics: micronutrients, vitamin B12. In: rodwel VW, Bender DA, Botham KM, Kenelly PJ, Weil PA. editors. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 30th ed. NewYork:McGraw-Hill; 2016. p. 558-9.
20. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *PNAS*. 2008 Aug; 105(34): 12474-9.
21. Werder SF. Cobalamin deficiency, hyperhomocysteinemia, and dementia. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2010 May;6: 159-95.
22. Devalia V, Hamilton MS, Malloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol*. 2014 Jun;166: 496-513.
23. Scarpa E, Canditto L, Sartori R, Radossi P, Maschio N, Tagariello G. Undetected vitamin B12 deficiency due to false normal assay results. *Blood Transfus*. 2013 Oct;11(4): 627-9.
24. Giroux MC, Helie P, Patrick B, Vachon P. Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp Anim*. 2015 Mar;64(3): 253-60.
25. Moshal KS, Camel CK, Kartha GK, Steed MM, Tyagi N, Sen U, et al. Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res*. 2007 Nov;4(4): 289-94.

26. Law P, Kharche S, Stott J, Zhang H. Effects of elevated homocysteine hormone on electrical activity in the human atrium: a simulation study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009 Sept; 3936-9.
27. Postema PG, Wilde A. The measurement of the QT interval. *Curr Cardiol Rev.* 2014 Aug;10(3): 287-94.
28. Walker E, Black J, Parris C, Bryda EC, Cansino S, Hunt L, et al. Effect of experimental hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in the rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2004 Feb;34(2): 175-80.
29. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Kennedy RH, et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Feb;285(2): 679-86.
30. Smith OI, Wisten A, Nylander E, Bratt EL, deWahl GA, Oulhaj A, et al. Electrocardiographic amplitudes: a new risk factor for sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2010 Feb;31(4): 439-49.
31. Oehler A, Feldman T, Henrikson CA, Tereshchenko LG. QRS-T angle: a review. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2014 Nov;19(6): 534-42.
32. Berleffs CJW, Scherptong RWC, Man SC, Van Welseness GH, Bax JJ, Van Erven L, et al. Predicting ventricular arrhythmias in patients with ischemic heart disease: clinical application of the ECG derived QRS-T angle. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2009 Jul;2: 548-54.

Table 1: Experimental group characteristics at the beginning and end of the study.

Variable	Control		Deficient	
	C ₀	C ₁₆	D ₀	D ₁₆
Number of samples	7	7	7	7
Body weight (g)	295.71 ± 6.50	379.43 ± 18.28 ^a	303.29 ± 10.56	363.00 ± 17.94 ^b
Hcy (μmol/l)	250.14 ± 27.81	253.07 ± 28.16	416.80 ± 209.77	842.90 ± 373.58 ^{b,c}
B12 (ng/l)	425.60 ± 68.46	405.51 ± 67.43 ^a	654.24 ± 133.88 ^c	388.26 ± 113.29 ^b

Data are mean ± SD. ^a ** p < 0.001 vs C₀; ^b ** p < 0.01 vs D₀; ^c ** p < 0.01 vs C₁₆

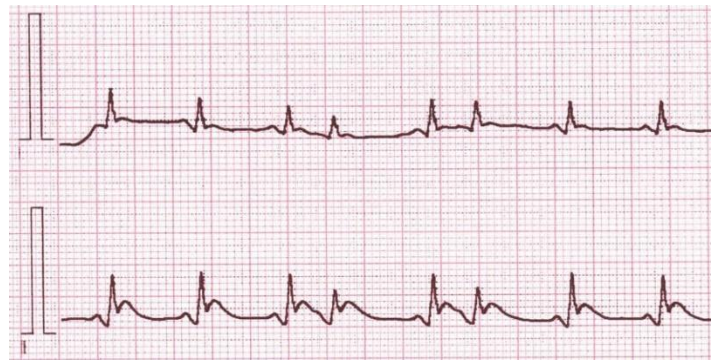
Table 2: Characteristics of ECG after 16 weeks of treatment

Variable	Control	Deficient
	(C)	(D)
Heart rate (pulse/min)	255.89 ± 38.15	264.76 ± 38.51
QTc (ms)	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02*
RS Amplitude (mV)	1.11 ± 0.45	2.38 ± 1.47
QRS-T angle (degree)	19.84 ± 23.13	58.71 ± 50.59*

Data are mean ± SD. *p < 0.05 vs C



Rat 3



Rat 7

Fig. 1: Arrhythmia in the treatment group

RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Aditya Krishna Murthi
NPM : 1606839656
Alamat : Jl.Permai Tengah VII/7B RT05/014 Jurang Mangu
Barat Pondok Aren Tangerang Selatan 15223
Umur / Kelamin / Agama : 31 tahun / Laki laki / Islam
Tempat dan tanggal lahir : Jakarta, 27 Juni 1988
Asal Instansi : UNIVERSITAS TRISAKTI
Alamat Instansi : Jl. Kyai Tapa No.1 Grogol Jakarta Barat
Riwayat Pendidikan :
SD : SD Negeri Rawa Barat 05 Jak-Sel (Lulus Tahun 2000)
SMP : SLTP Negeri 12 Jakarta (Lulus Tahun 2003)
SMA : SMA Negeri 47 Jakarta (Lulus Tahun 2006)
S1 : Dokter Umum FK USAKTI (Lulus Tahun 2012)
Pengalaman Penelitian : -

Publikasi : -

Biaya penelitian berasal dari : Hibah PITTA 2018, Mandiri

DANA PENELITIAN

Dana pada penelitian ini bersumber dari dana hibah PITTA tahun anggaran 2018 dan pembiayaan pribadi/mandiri.

