

TESIS

**EFEK PEMBERIAN SIMVASTATIN TERHADAP KADAR
PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR
GAMMA COACTIVATOR 1-ALPHA (PGC-1 α) OTOT
SKELETAL DAN OTOT JANTUNG TIKUS WISTAR (*Rattus
Norvegicus*)**

Disusun dan diajukan oleh

ZULFAHMIDAH

P062191021



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**EFEK PEMBERIAN SIMVASTATIN TERHADAP KADAR
PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR
GAMMA COACTIVATOR 1-ALPHA (PGC-1 α) OTOT
SKELETAL DAN OTOT JANTUNG TIKUS WISTAR (*Rattus
Norvegicus*)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi
Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

ZULFAHMIDAH

kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

EFEK PEMBERIAN SIMVASTATIN TERHADAP KADAR PEROXISOME
PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA COACTIVATOR 1-
ALPHA (PGC-1 α) OTOT SKELETAL DAN OTOT JANTUNG TIKUS
WISTAR (*Rattus Norvegicus*)

Disusun dan diajukan oleh

ZULFAHMIDAH

P062191021

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu
Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 4 Februari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D
Nip. 196712121999031002

Pembimbing Pendamping,

Dr. dr. Syahrijuita Kadir, Sp.THT-KL, M.Kes
Nip. 196812301998032001

Ketua Program Studi,

Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc
Nip. 197701212003122003

Dekan Sekolah Pascasarjana,



Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, MSc
Nip. 196703081990031001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zulfahmidah
NIM : P062191021
Program Studi : Ilmu Biomedik
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Efek Pemberian Simvastatin Terhadap Kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α)* Otot Skeletal dan Otot Jantung Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*)

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa tesis yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Makassar, Februari 2021

Yang Menyatakan



Zulfahmidah

PRAKATA

Dengan memanjatkan puji dan syukur kepada Allah *Subhaanahu Wata'ala*, atas segala berkat, karunia serta perlindungan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagaimana mestinya sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis bermaksud memberikan informasi ilmiah mengenai Efek Pemberian Simvastatin Terhadap Kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) Otot Skeletal dan Otot Jantung Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*). Tulisan ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk menambah wawasan, aplikasi klinis dan menjadi bahan rujukan untuk penelitian selanjutnya.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada **dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D** sebagai pembimbing I dan **Dr. dr. Syahrjuita Kadir Sp.THT-KL, M.Kes** sebagai pembimbing II atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian ini, pelaksanaan sampai dengan penulisan tesis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada **dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp.PD, KHOM, dr. Gita Vita Soraya, Ph.D,** dan **Dr.dr. Alfian Zainuddin, MKM** sebagai penyanggah yang memberikan kritik dan saran dalam menyempurnakan penelitian ini.

Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

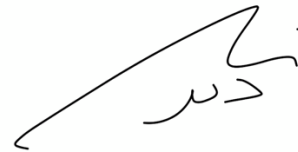
1. Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc** ;Ketua Program Studi **Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc**; seluruh staf pengajar beserta pegawai di Program Studi Ilmu Biomedik dan Sekolah Pascasarjana yang memberikan arahan, dukungan dan motivasi kepada penulis selama pendidikan.
2. Ibu saya, **Hj. Siti Hajrah**, suami saya, **Fajriansyah**, kedua buah hati saya, **Ghaziya Alula Farzana** dan **Galila Azka Hafidzah**, dan keluarga besar penulis yang telah memberikan restu untuk penulis melanjutkan pendidikan, disertai dengan doa, kasih sayang, pengertian dan dukungan yang luar biasa selama penulis menjalani pendidikan.
3. Teman sejawat peserta S2 Ilmu Biomedik 2019-1, terkhusus teman satu penelitian **dr. Abdi Dzul Ikram** dan **dr. Desi Dwi Rosalia** atas bantuan, dukungan dan kerjasamanya selama proses pendidikan dan penelitian.
4. Laboran dan staf Laboratorium Biofarmasi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang membantu dalam melaksanakan proses penelitian.
5. Laboran dan staf Laboratorium penelitian RSP UNHAS yang membantu dalam melaksanakan proses penelitian, khususnya

pemrosesan dan analisis jaringan spsimen.

6. Semua pihak yang namanya tidak tercantum namun telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Semoga tesis ini memberikan manfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya serta Ilmu Biomedik - Biokimia pada khususnya di masa yang akan datang.

Makassar, Februari 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of a long, sweeping horizontal stroke followed by a series of loops and a final upward stroke.

Zulfahmidah

ABSTRAK

ZULFAHMIDAH. *Efek Pemberian Simvastatin Terhadap Kadar Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α) Otot Skeletal dan Otot Jantung Tikus Wistar (Rattus Norvegicus)* (dibimbing oleh Marhaen Hardjo dan Syahrijuwita Kadir)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian simvastatin terhadap kadar peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor gamma koaktivator 1-alfa (PGC-1 α) otot skeletal dan otot jantung tikus.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dengan *post test only*, dengan menggunakan hewan coba tikus galur wistar betina berusia 8-10 minggu dengan berat 100-150 gram. Sampel penelitian sebanyak 24 tikus wistar yang akan dibagi ke dalam tiga kelompok secara acak yakni kelompok K, S₁₀, dan S₅₀ mendapatkan plasebo metilselulosa 0,1% 2 ml, simvastatin 10 mg/KgBB, dan simvastatin 50 mg/KgBB selama 30 hari berturut-turut segera dimatikan dan diambil jaringannya otot skeletal dan otot jantungnya. Setelah perlakuan, dilakukan pemeriksaan kadar PGC1Alfa dengan menggunakan metode ELISA. Analisis statistik menggunakan metode *One Way Anova* dengan nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa simvastatin tidak mempengaruhi perubahan profil antropometri, seperti berat badan dan *body mass index* (semuanya bernilai $p > 0,05$). Pada otot skeletal tikus kontrol yang mendapatkan plasebo, simvastatin 10 mg/kgBB, dan simvastatin 50 mg/kgBB ditemukan kadar PGC-1 Alfa 4.89 ± 0.51 , 4.26 ± 0.51 , dan 4.01 ± 0.42 berturut-turut, sehingga perbedaan tersebut signifikan pada uji *One Way ANOVA* ($p=0,005$). Pada otot jantung tikus kontrol yang mendapatkan plasebo, simvastatin 10 mg/kgBB, dan simvastatin 50 mg/kgBB ditemukan kadar PGC-1 Alfa 3.99 ± 0.43 , 3.85 ± 0.26 , dan 4.20 ± 0.44 berturut-turut, sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada uji *One Way ANOVA* ($p=0,215$).

Kata kunci: *simvastatin, peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor gamma koaktivator 1-alfa, otot skeletal, otot jantung*

ABSTRACT

ZULFAHMIDAH. *Effect Of Simvastatin On Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α) Levels Of Skeletal Muscle And Heart Muscle Rat.* (Supervised by **Marhaen Hardjo** and **Syahrijuwita Kadir**)

This aim of this study is to determine the effect of simvastatin on skeletal and heart muscle PGC-1 α .

Twenty four female Wistar rats (8-10 weeks of age) were randomized into three groups, i.e control group (n=8), simvastatin 10mg/kg/BW group(n=8), and simvastatin 50mg/kg/BW group .For 30 days, the simvastatin group was exposed to simvastatin at a dose of 10 and 50 mg/kg/day. Meanwhile, control group animals only received 0.5% methyl cellulose. Skeletal and heart muscles were collected and PGC-1 α levels was evaluated by using ELISA Kit. Statistical analysis using the One Way Anova method with a p value of <0.05 was considered significant.

The results of the research indicate that simvastatin does not affect changes in an anthropometric profiles, such as body weight and body mass index (all p values > 0.05). In the skeletal muscle of control rat that receives placebo, simvastatin 10 mg / kg, and simvastatin 50 mg / kg BW, PGC-1 α levels are found to be 4.89 ± 0.51 , 4.26 ± 0.51 , and 4.01 ± 0.42 , respectively, in which these differences are significant in One Way ANOVA (p = 0.005). In the heart muscle of control rats that receives placebo, simvastatin 10 mg / kgBW, and simvastatin 50 mg / kgBW indicate the levels of PGC-1 α 3.99 ± 0.43 , 3.85 ± 0.26 , and 4.20 ± 0.44 respectively, in which there is no significant difference in One Way ANOVA (p = 0.215). It can be concluded that simvastatin causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscles.

Keywords: simvastatin, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, skeletal muscle, heart muscle

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Statin.....	5
B. Metabolisme Reactive oxygen species (ROS) di Mitokondria .	12
C. Mitokondrial Biogenesis	15
D. Mitohormesis.....	20
E. Kerangka Teori & Kerangka Konsep	23
F. Hipotesis Penelitian	24
G. Definisi Operasional.....	24

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian	26
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	26
C. Populasi dan Sampel	27
D. Tahapan Penelitian	28
E. Alur Penelitian	33
F. Analisis Data	34

BAB IV HASIL PENELITIAN

A. Efek Simvastatin Terhadap Kadar PGC-1 α pada Otot Skeletal	36
B. Efek Simvastatin Terhadap Kadar PGC-1 α pada Otot Jantung	38
C. Perbandingan Kadar PGC-1 α otot Skeletal dan Otot Jantung	40

BAB V PEMBAHASAN

41

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

48

DAFTAR PUSTAKA

50

LAMPIRAN

58

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Definisi Operasional	24
Tabel 2 Efek Simvastatin Terhadap Profil Antropometri	36
Tabel 3 Efek Simvastatin Terhadap Kadar PGC-1 α pada Otot Skeletal	37
Tabel 4 Efek Simvastatin Terhadap Kadar PGC-1 α pada Otot Jantung	39
Tabel 5 Perbandingan Kadar PGC-1 α pada Otot Skeletal dan Otot Jantung	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme Kerja Statin Sebagai penghambat HMG-CoA pada jalur mevalonate	8
Gambar 2. Mekanisme statin menginduksi myopathy	11
Gambar 3. Mitokondrial Biogenesis	16
Gambar 4. Mekanisme ROS menginduksi mitohormesis	21
Gambar 5. Kerangka Teori Penelitian	23
Gambar 6. Kerangka Konsep	24
Gambar 7. Diagram Alur Penelitian	35
Gambar 8. Efek pemberian plasebo, simvastatin 10 mg/kgBB, dan simvastatin 50 mg/kgBB terhadap kadar PGC-1Alfa pada otot skeletal tikus	37
Gambar 9. Efek pemberian plasebo, simvastatin 10 mg/kgBB, dan simvastatin 50 mg/kgBB terhadap kadar PGC-1Alfa pada otot jantung tikus	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Rekomendasi Persetujuan Etik Penelitian	59
Lampiran 2. Surat Keterangan Selesai Penelitian	60
Lampiran 3. Dokumentasi Prosedur Penelitian	61
Lampiran 4. Output Hasil analisis statistik	65
Lampiran 5. Jurnal Publikasi Ilmiah	66

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Statin termasuk obat yang penggunaannya sangat luas. Statin banyak digunakan untuk menurunkan kolesterol LDL dan prevensi primer dan sekunder penyakit kardiovaskular.(Node *et al.*, 2003) Statin mengurangi morbiditas dan mortalitas kardiovaskular pada pasien dengan atau tanpa penyakit arteri koroner.(Jasińska, Owczarek and Orszulak-Michalak, 2007) Telah banyak penelitian mengatakan bahwa statin memiliki efek menguntungkan pleiotropik pada tingkat kardiovaskular dengan cara meningkatkan bioavailabilitas dari *NOS-derived NO*. Penggunaan statin yang luas masih terkendala dengan adanya toksisitas atau intoleransi yang dihasilkan, di mana hal itu mempengaruhi angka kepatuhan obat. Toksisitas atau intoleransi statin berkisar antara 10-15%.(Banach *et al.*, 2015) Bahkan dalam penelitian lainnya bisa toksisitasnya bisa mencapai 30% (Laufs, Scharnagl and März, 2015). Toksisitas statin yang tersering adalah *statin-associated muscle symptoms* (SAMSs). (Beltowski, Wojcicka and Jamroz-Wisniewska, 2009; Laufs, Scharnagl and März, 2015) Masih sedikit penelitian tentang mekanisme molekuler statin yang memiliki efek proteksi otot jantung namun justru meningkatkan toksisitas pada otot rangka.(Bouitbir *et al.*, 2012)

Pada kardiomyosit, Jones *et al.* menunjukkan bahwa simvastatin melindungi mitokondria dari stres oksidatif.(Jones *et al.*, 2003) Pada otot

rangka, penelitian *in vitro* telah menunjukkan bahwa simvastatin menghambat kompleks I dari rantai transpor elektron mitokondria. (Sirvent, Bordenave, *et al.*, 2005) Selain itu, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa sebagian besar kerusakan mitokondria mengakibatkan toksisitas statin. (Kaufmann *et al.*, 2006; Sirvent, Mercier and Lacampagne, 2008)

Peran mitokondria selain sebagai penghasil energi, juga merupakan tempat pembentukan radikal bebas (ROS), yang dapat bertindak sebagai *second messenger* atau sebagai sumber kerusakan seluler, tergantung pada tingkat produksi ROS-nya. Sebagai organ vital yang kaya akan mitokondria dan penggunaan oksigen yang tinggi, jantung rentan terhadap kerusakan oksidatif. Selain itu, jalur metabolik dan apoptosis bertemu pada mitokondria dan keduanya memainkan peran utama dalam penyakit. (Sirvent, Bordenave, *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007)

Pada beberapa penelitian, terdapat sebuah konsep baru bahwa mitokondrial biogenesis dapat dipicu oleh dosis rendah ROS mitokondria yang dapat mengatasi stresor dan mengembalikan kondisi homeostasis. Konsep ini disebut hormesis mitokondria atau 'mitohormesis'. (Sano and Fukuda, 2008) *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator* (PGC-1 α) merupakan regulator utama mitokondrial biogenesis. (Gems and Partridge, 2008) Oleh karena itu penting untuk mengetahui efek pemberian simvastatin terhadap kadar *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) otot skeletal dan otot jantung.

B. Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi rumusan masalah dari penelitian ini adalah: Bagaimana efek pemberian simvastatin terhadap kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot skeletal dan otot jantung tikus galur wistar?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek pemberian simvastatin terhadap kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot skeletal dan otot jantung tikus galur wistar.

2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui efek pemberian simvastatin pada dosis 10mg/KgBB dan 50mg/KgBB terhadap kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot skeletal tikus
- b. Mengetahui efek pemberian simvastatin pada dosis 10mg/KgBB dan 50mg/KgBB terhadap kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot jantung tikus
- c. Mengetahui perbandingan kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) antara otot skeletal dan otot jantung tikus.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Keilmuan

Menambah pengetahuan dan wawasan tentang efek pemberian simvastatin terhadap kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot skeletal dan otot jantung tikus galur wistar.

2. Manfaat Praktis

Adanya pengetahuan mengenai miotoksisitas simvastatin ini akan mengarahkan pada *adjusting dose* simvastatin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Statin

1. Penggunaan Statin

Statin termasuk obat yang penggunaannya sangat luas. Statin banyak digunakan untuk menurunkan kolesterol LDL dan prevensi primer dan sekunder penyakit kardiovaskular.(De Pinieux *et al.*, 1996; Takemoto *et al.*, 2001) Penggunaan Statin meningkat pada usia ≥ 40 tahun dan pasien dengan resiko tinggi *Cardio Vascular Disease* aterosklerotik. (Harrison *et al.*, 2018) Hasil meta analisis menunjukkan bahwa dengan pengurangan kadar kolesterol LDL setiap 1 mmol/L nya (38,7 mg/dl) maka akan terjadi pengurangan 22% resiko relatif kejadian vascular dan koroner mayor secara signifikan.(Silverman *et al.*, 2016)

Penggunaan statin juga sudah direkomendasikan dalam berbagai *guideline*. *American Heart Association* (AHA) dan *American College of Cardiology* (ACC) pada tahun 2018 mengeluarkan *guideline* tentang manajemen kolesterol darah, di mana statin direkomendasikan penggunaannya pada populasi pasien ateroskelrotik CVD klinis, diabetes mellitus, dan hiperlipidemia dengan target pengurangan kadar kolesterol $\geq 50\%$.(Grundy *et al.*, 2019)

2. Klasifikasi Statin

Statin dapat diklasifikasikan berdasarkan sumber, metabolisme di hati, sifat fisika-kimia, dan aktivitas spesifik. Berdasarkan sumbernya,

Statin yang diperoleh dari fermentasi fungi yaitu, lovastatin (Mevacor), pravastatin (Lipostat, Pravachol) and simvastatin (Zocor); dari proses sintesis yaitu, fluvastatin (Lescol), atorvastatin (Sortis, Lipitor), dan cerivastatin (Baycol, Lipobay). Secara klinik statin yang digunakan yaitu: lovastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, dan Fluvastatin. (Schachter, 2005)

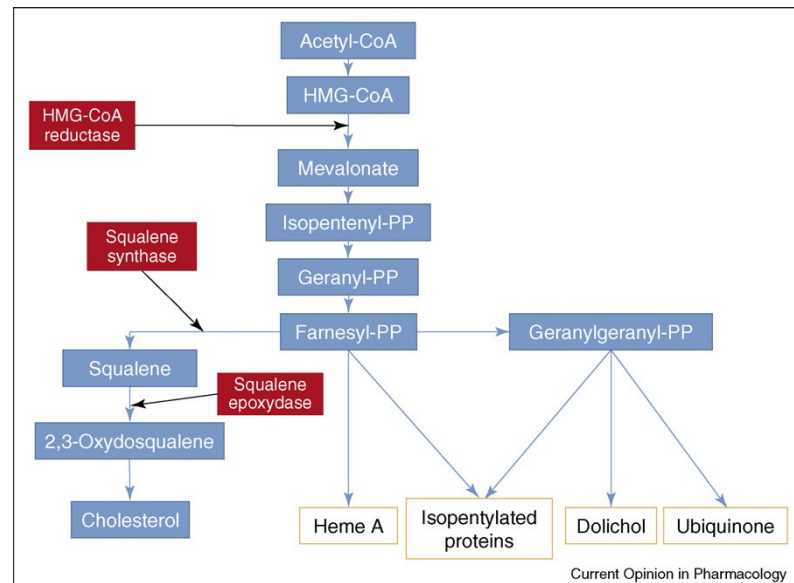
Berdasarkan metabolisme di hati, semua statin mempunyai organ target di hati. Untuk metabolismenya, lovastatin, simvastatin, atorvastatin, dan cerivastatin dimetabolisme oleh sitokrom P450 (CYP 3A4). Fluvastatin dimetabolisme oleh CYP 2C9 dan pravastatin dimetabolisme dengan cara berbeda. Berdasarkan sifat fisika-kimia, Pravastatin sangat hidrofilik; fluvastatin mempunyai karakteristik intermediat; lovastatin, simvastatin, atorvastatin, dan cerivastatin adalah lipofilik. Statin lipofilik sangat mudah melewati membrane sel sehingga mempengaruhi hepatik dan extrahepatik HMGCoA reduktase. Statin hidrofilik mudah berpenetrasi ke dalam hepatosit melalui *organic anion transporter*. Berdasarkan aktivitas spesifik, Atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, dan pravastatin diberikan dalam bentuk senyawa aktif (*acid form*). Lovastatin dan simvastatin diberikan dalam bentuk inaktif (*lactone*) dan membutuhkan enzim hidrolisis untuk mengubah menjadi bentuk aktif. (Crespo, 2015; Harrison *et al.*, 2018)

3. Mekanisme Kerja Statin

Dislipidemia dan hiperkolesterolemia dikontrol oleh liver. Hepatosit mengambil 50% kolesterol dari sirkulasi. Peningkatan aktivitas

reseptor kolesterol di hepatosit merupakan metode untuk menurunkan kadar kolesterol LDL plasma. Statin memiliki target di hepatosit dengan menghambat HMG-CoA reduktase, enzim yang mengkonversi HMG-CoA menjadi asam mevalonat yang merupakan prekursor kolesterol. Statin secara kompetitif terikat pada sisi aktif enzim. Selanjutnya mengubah konformasi dari enzim sehingga mencegah HMG-CoA reduktase untuk menjalankan fungsinya secara normal. Perubahan konformasi pada sisi aktif enzim membuat obat sangat efektif dan spesifik. Ikatan statin dengan HMGCoA reduktase bersifat *reversible*. Penghambatan HMG-CoA reduktase menghasilkan penurunan kolesterol intraseluler, menginduksi aktivasi *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) dari retikulum endoplasma. Aktivasi SREBPs dapat meningkatkan ekspresi gen reseptor LDL. Penurunan kolesterol hepatosit dapat meningkatkan *hepatic* LDL *receptors* sehingga dapat menurunkan kadar LDL di sirkulasi dan prekursor LDL (*intermediate density* - IDL dan *very low density*- VLDL *lipoproteins*). (De Pinieux *et al.*, 1996; Jasińska, Owczarek and Orszulak-Michalak, 2007)

Mekanisme kerja statin bisa dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme Kerja Statin Sebagai penghambat HMG-CoA reductase pada jalur mevalonat.(De Pinieux *et al.*, 1996)

Selain itu, statin memiliki efek pleiotropik yang tidak berhubungan dengan kerja menurunkan kolesteronya. Efek tersebut diantaranya peningkatan fungsi endotel, stabilisasi plak aterosklerotik, anti inflamasi, imunomodulator, antitrombotik, efek pada metabolisme tulang, dan pengurangan resiko demensia. Hal ini dimungkinkan karena adanya penghambatan sintesis isoprenoid yang memperantarai jalur mevalonat.(Liao and Laufs, 2009)

4. Efek pleiorotropik statin

Hipertrofi jantung adalah respons adaptif jantung terhadap tekanan yang berlebihan. Pada miokardium, protein kecil yang mengikat GTP, Ras, Rho, dan Rac, dan stres oksidatif terlibat dalam respons jantung yang berkaitan dengan hipertrofi jantung. Penelitian pada hewan menunjukkan bahwa NADPH oksidase tipe fagosit merupakan sumber ROS yang relevan

dalam miokardium.(MacCarthy *et al.*, 2001) Produksi ROS yang bergantung pada NADPH oksidase terlibat dalam hipertrofi jantung sebagai respons terhadap tekanan berlebih, peregangan , angiotensin II, dan stimulasi α -adrenergik.(Li *et al.*, 2002; Nakagami, Takemoto and Liao, 2003)

Meskipun dampak utama terapi statin pada penyakit kardiovaskular tampaknya sebagian besar vaskular, penelitian pada hewan dan manusia menunjukkan bahwa statin mungkin juga memiliki efek menguntungkan pada miokardium. Karena Rac1 diperlukan untuk aktivitas NADPH oksidase dan hipertrofi jantung dimediasi, sebagian, oleh stres oksidatif miokard, statin dapat menghambat hipertrofi jantung melalui mekanisme antioksidan yang melibatkan penghambatan *Rac1 geranylgeranylation*. Statin menghambat stres oksidatif yang diinduksi angiotensin II dan hipertrofi jantung pada tikus. (Takemoto *et al.*, 2001)

ROS yang dimediasi NADPH-oksidase meningkat pada miokardium ventrikel kiri dari pasien dengan gagal jantung dan berkorelasi dengan peningkatan aktivitas Rac1 GTPase, dan terapi statin oral mampu menurunkan fungsi Rac1 di jantung manusia(Maack *et al.*, 2003)

Dalam sebuah penelitian prospektif, *double blind*, pasien dengan kardiomiopati dilatasi yang simtomatik, non-epidemi secara acak dibagi menjadi dua kelompok yang menerima statin atau plasebo selama 14 minggu. Meskipun pasien yang menerima statin menunjukkan sedikit penurunan kadar kolesterol serum dibandingkan dengan pasien yang menerima plasebo, pasien yang menerima statin menunjukkan peningkatan

yang signifikan dalam daya tahan olahraga dibandingkan dengan pasien yang menerima plasebo. Hal ini berhubungan dengan peningkatan fraksi ejeksi ventrikel kiri pada kelompok statin (33 ± 4 hingga $41 \pm 4\%$, $P < 0,01$), tetapi tidak pada kelompok plasebo. Selain itu, konsentrasi plasma *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), IL-6, dan *brain natriuretic peptide* (BNP) lebih rendah pada kelompok statin dibandingkan dengan kelompok plasebo. Studi ini menunjukkan bahwa terapi statin jangka pendek meningkatkan fungsi jantung, ketidakseimbangan neurohormonal, dan gejala yang terkait dengan kardiomiopati dilatasi idiopatik. (Node *et al.*, 2003)

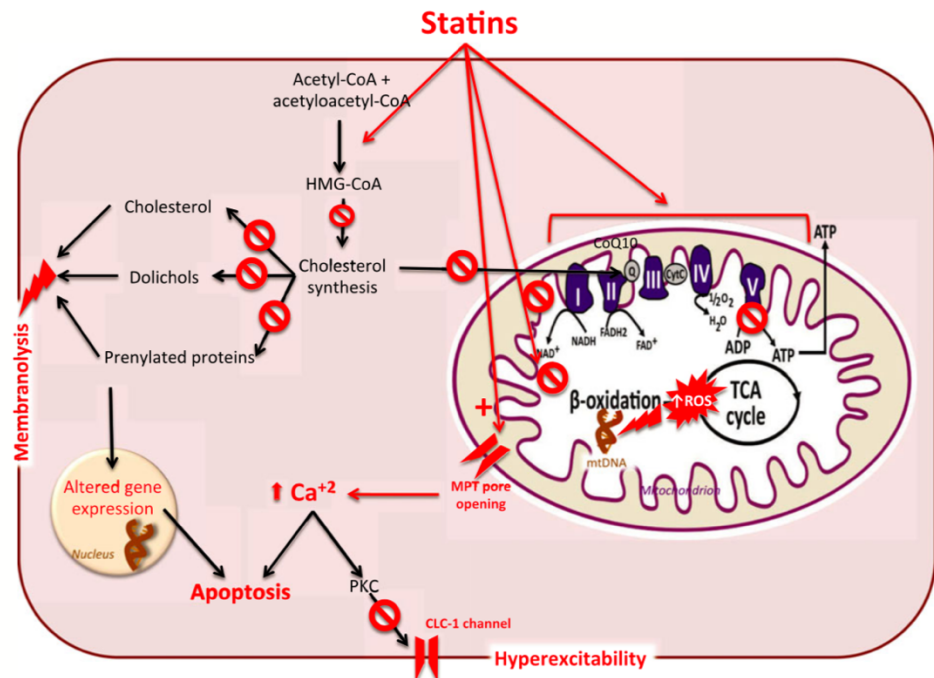
5. Miotoksisitas terkait statin

Kolesterol adalah komponen dasar membran sel, berkontribusi terhadap stabilitas membran sel tersebut. Penurunan kolesterol oleh statin menghasilkan perubahan pada fluiditas membran dan modifikasi kerentanan membran otot. Perubahan membran dapat memodulasi fungsi saluran natrium, kalium, dan klorida, yang kemudian dapat merusak miosit dan menyebabkan miopati. (Baker, 2005; Kaufmann *et al.*, 2006; Sirvent, Mercier and Lacampagne, 2008)

Statin juga menghambat farnesyl pirofosfat dan geranylgeranyl pirofosfat, zat antara jalur mevalonat, yang terlibat dalam modifikasi protein pasca-translasi seperti GTPase kecil dan lamin. GTPase dan lamin memainkan peran penting dalam pemeliharaan sel dan organisasi kromatin. Disprenilasi dari GTPase kecil telah terbukti menyebabkan degenerasi serat otot dan apoptosis, sedangkan disprenilasi lamin dapat menyebabkan

membran nukleus yang rapuh dan menginduksi apoptosis sel otot.
 9,10.(Vaklavas *et al.*, 2009)

Dolichol, zat antara lain dari jalur mevalonate, mempromosikan protein N-glikosilasi. Penghambatan produksi dolichol oleh statin merusak ekspresi reseptor dan produksi protein struktural, yang juga dapat menyebabkan miopati.(Vaklavas *et al.*, 2009) Pengobatan pra-adiposit dengan 10 nmol / L cerivastatin mengakibatkan gangguan produksi protein struktural dan reseptor dengan akumulasi proreseptor dan apoptosis setelah paparan yang lama , menunjukkan gangguan N-glikosilasi, sebagai mekanisme yang mendasari kerusakan sel.(Vaklavas *et al.*, 2009)



Gambar 2. Mekanisme statin menginduksi myopathy(Apostolopoulou, Corsini and Roden, 2015)

Statin juga telah dikaitkan dengan peningkatan ekspresi atrogin-1, gen yang terkait dengan atrofi otot. Ekspresi atrogin-1 terjadi lebih awal selama perkembangan atrofi otot, dan peningkatannya mendahului hilangnya massa otot. Dari catatan, pasien dengan miopati terkait statin menunjukkan peningkatan kadar mRNA atrogin-1 pada biopsi otot paha depan. (Cao *et al.*, 2009)

Selanjutnya, gangguan pensinyalan kalsium juga dapat berkontribusi pada miopati yang diinduksi statin. Statin dapat menginduksi depolarisasi mitokondria dan pelepasan kalsium yang menghasilkan gelombang kalsium sitoplasma dengan pelepasan kalsium yang selanjutnya oleh retikulum sarkoplasma sebagai mekanisme yang memungkinkan aktivasi caspase dan induksi apoptosis. (Sirvent, Mercier, *et al.*, 2005)

B. Metabolisme *Reactive oxygen species* (ROS) di Mitokondria

1. Transpor Elektron pada Mitokondria

Mitokondria merupakan organ tempat produksi ATP melalui proses transpor elektron yang terjadi di kompleks I (NADH: *ubiquinone oxidoreductase*) atau kompleks II (*succinate: ubiquinone oxidoreductase*) setelah pelepasan elektron dari NADH atau FADH₂. Elektron ditransfer sepanjang rantai respirasi untuk menghasilkan H₂O di kompleks IV (*cytochrome c oxidase*). Secara bersamaan, protons (H⁺) dibentuk dan dipompa masuk ke *intermembrane space*. Selama respirasi, elektron

terlepas dari kompleks I dan III (*cytochrome bc₁ complex*) ke dalam matrix mitokondria dan bereaksi dengan O₂ menghasilkan superoksida (O₂^{•-}). Sekitar 75% O₂^{•-} di mitokondria dihasilkan dari proses transfer elektron mulai dari ubiquinol sampai pada *cytochrome c* yang dikatalisis oleh kompleks III. Penghambatan respirasi mitokondria mulai pada kompleks I akan meningkatkan pelepasan elektron dan pembentukan O₂^{•-}. Dengan adanya *superoxide dismutase* (SOD), O₂^{•-} diubah menjadi H₂O₂ dan selanjutnya direduksi menjadi H₂O oleh *catalase* (CAT) dan *glutathione peroxidase* (GPx). H₂O₂ juga keluar dari mitokondria masuk ke dalam sarkoplasma dan mengaktifkan *redox-dependent signalling* atau menyebabkan stress oksidatif (De Pinieux *et al.*, 1996; Handy and Loscalzo, 2012; Görlach *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017)

2. MEKANISME PRO-OKSIDAN STATIN

Secara normal sel memiliki mekanisme *defense* terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas, berupa non-enzim antioksidan (asam askorbat, vitamin E, dan glutathion) dan antioksidan berupa enzim (*thioredoxins*, *superoxide dismutase* (SOD), *catalase*, and *glutathione peroxidase*). Stress oksidatif disebabkan oleh peningkatan produksi radikal bebas yang melebihi sistem pertahanan antioksidan. (Block *et al.*, 2002; Di Meo *et al.*, 2016)

a. Inhibisi Sintesis Ubiquinon

Dampak mitokondria pada miopati yang diinduksi statin awalnya berasal dari temuan CoQ10 yang lebih rendah dalam sirkulasi dan otot

rangka pasien yang diobati dengan statin dan rasio laktat / piruvat yang lebih tinggi, sebagai indikator fungsi mitokondria abnormal. (De Pinieux *et al.*, 1996)

CoQ10 adalah transporter elektron dasar dari rantai pernapasan mitokondria dan produk akhir dari jalur mevalonate. CoQ10 terdiri dari cincin benzoat yang dihasilkan dari tirosin dan poliisopren yang disintesis dari farnesilpirofosfat. Pada manusia CoQ10 mengandung 10 unit isopren, sementara 2-7% dari total adalah CoQ9 yang terdiri dari 9 unit isoprene. Pada rodent bentuk predominan adalah coenzyme Q9 tetapi 10-30% merupakan CoQ10. *Coenzyme Q* tereduksi membentuk ubiquinol atau dioksidasi membentuk ubiquinon. Ubiquinol merupakan antioksidan larut lipid yang melindungi membrane plasma dan lipoprotein plasma dari kerusakan oksidatif. Secara normal >80% *Coenzyme Q* di plasma dan jaringan tersedia dalam bentuk oksidasi. (Beltowski, Wojcicka and Jamroz-Wisniewska, 2009)

b. Aktivasi iNOS

Oxidative stress merupakan ketidak seimbangan antara jumlah *reactive oxygen species* (ROS) dan antioksidan enzimatik serta non-enzimatik yang berperan dalam patogenesis *atherosclerosis*, *arterial hypertension*, dan *heart failure*. Beberapa studi menunjukkan bahwa statin memperbaiki stress oksidatif, tetapi efek prooksidan belum diketahui. *Nitric oxide* (NO) yang diproduksi pada kadar *endothelial NO synthase* (eNOS) yang rendah berperan penting dalam regulasi tonus vascular. Tetapi, NOS

isoform yang lain yaitu *inducible* NOS (iNOS) menghasilkan NO dalam jumlah banyak yang akan bereaksi dengan superoxide membentuk *peroxynitrite* (ONOO⁻). *Peroxynitrite* merupakan radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat merusak protein, lipid dan asam nukleat. Beberapa studi menunjukkan bahwa statin menstimulasi eNOS dan juga iNOS. (Wolin, Ahmad and Gupte, 2005)

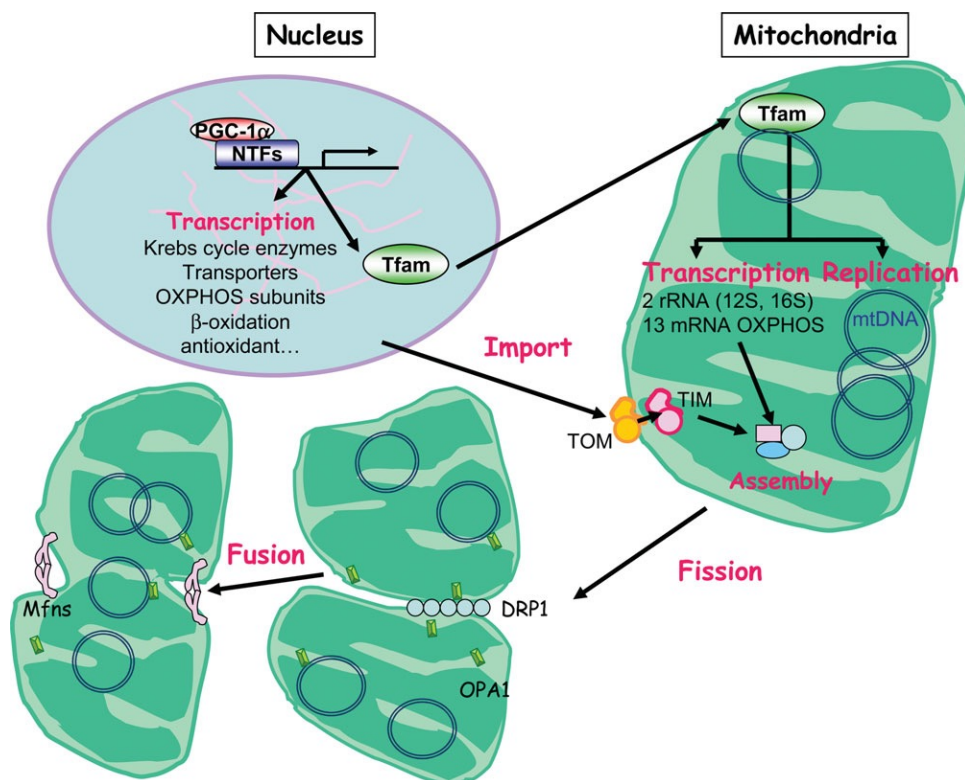
C. Mitokondrial biogenesis

1. Definisi

Mitokondrial biogenesis adalah proses di mana sel-sel meningkatkan ukuran, jumlah maupun massa mitokondria. Kemampuan mitokondria untuk mereplikasi diri berakar pada sejarah evolusinya. Pada awalnya, mitokondria berasal dari sel-sel yang membentuk hubungan endosimbiotik dengan α -protobacteria dan memiliki genom sendiri untuk replikasi. Namun, bukti terbaru menunjukkan bahwa mitokondria telah berevolusi tanpa adanya simbiosis. Mitokondria adalah pengatur utama aktivitas metabolisme sel, dan juga merupakan organel penting dalam produksi dan degradasi radikal bebas. Jumlah salinan mitokondria yang lebih banyak (atau massa mitokondria yang lebih besar) dapat melindungi sel. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008; Dillon, Rebelo and Moraes, 2012)

Mitokondria dihasilkan dari transkripsi dan translasi gen baik dalam genom nukleus maupun genom mitokondria. Mayoritas protein mitokondria berasal dari genom nukleus, sedangkan genom mitokondria mengkodekan

bagian-bagian rantai transport elektron bersama dengan rRNA dan tRNA mitokondria. Mitokondrial biogenesis meningkatkan enzim metabolik untuk glikolisis, fosforilasi oksidatif dan akhirnya kapasitas metabolisme mitokondria yang lebih besar. Namun, tergantung pada substrat energi yang tersedia dan keadaan REDOX sel, sel dapat menambah atau mengurangi jumlah dan ukuran mitokondria. Jumlah dan morfologi mitokondria dapat bervariasi sesuai dengan tipe sel dan, di mana keseimbangan antara fusi / fisi mitokondria mengatur distribusi mitokondria, morfologi, dan fungsinya. (St-Pierre *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007)



Gambar 3. Mitokondrial Biogenesis. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008)

Mitokondrial biogenesis dapat dipicu oleh stress dan lingkungan seperti olahraga, paparan dingin, pembatasan kalori dan stres oksidatif, pembelahan dan pembaruan sel, dan diferensiasi. (Wright *et al.*, 2007)

2. Protein Import

Karena sebagian besar protein mitokondria berasal dari genom nukleus, protein harus ditargetkan dengan tepat dan diangkut ke mitokondria untuk melakukan fungsinya. Pertama, mRNA ditranslasikan di dalam sitosol sel. Protein prekursor yang tidak dilipat yang dihasilkan kemudian dapat mencapai kompartemen mitokondria masing-masing. Protein prekursor akan diangkut ke salah satu dari empat area mitokondria, yang meliputi membran luar, membran dalam, ruang antarmembran, dan matriks. Semua protein akan memasuki mitokondria dengan translocase pada membran mitokondria luar. Beberapa protein memiliki sinyal penargetan terminal-N, dan protein ini akan dideteksi dan diangkut ke dalam matriks, di mana mereka kemudian akan dibelah dan dilipat. Protein lain memiliki informasi penargetan sesuai dengan urutannya dan tidak akan menyertakan sinyal terminal-N. Selama dua dekade terakhir, para peneliti telah menemukan lebih dari tiga puluh protein yang berpartisipasi dalam impor protein mitokondria. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008)

3. Fusion dan Fisi

Mitokondria sangat fleksibel dan mampu mengubah bentuknya melalui peristiwa fisi dan fusi. Secara definitif, fisi adalah peristiwa satu

entitas yang terpisah, sedangkan fusi adalah peristiwa dua atau lebih entitas yang bergabung untuk membentuk keseluruhan. Proses fisi dan fusi saling bertentangan dan memungkinkan jaringan mitokondria untuk terus-menerus merombak dirinya. Suatu stimulus yang menginduksi perubahan keseimbangan fisi dan fusi dalam sel dapat secara signifikan mengubah jaringan mitokondria. Misalnya, peningkatan fisi mitokondria akan membuat banyak mitokondria terfragmentasi, yang telah terbukti bermanfaat untuk menghilangkan mitokondria yang rusak dan untuk menciptakan mitokondria yang lebih kecil untuk pengangkutan yang efisien ke daerah-daerah yang membutuhkan energi. Oleh karena itu, mencapai keseimbangan antara mekanisme ini sel untuk memiliki organisasi yang tepat dari jaringan mitokondria selama biogenesis dan mungkin memiliki peran penting dalam adaptasi otot terhadap stres fisiologis. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008)

Pada mamalia, fusi dan fisi mitokondria dikendalikan oleh GTPase dari keluarga dynamin. Proses fisi mitokondria diarahkan oleh Drp1, anggota keluarga dynamin sitosol. Protein ini membentuk spiral di sekeliling mitokondria dan menyempit untuk membelah baik membran luar maupun membrane dalam organel. Di sisi lain, proses fusi diarahkan oleh protein dinamin pada membran yang berbeda dan pada berbagai tingkat mitokondria. Fusi pada tingkat membran mitokondria luar dimediasi oleh Mfn1 dan Mfn2 (Mitofusins 1 dan 2), dan fusi pada tingkat membran mitokondria bagian dalam dimediasi oleh Opa1. Beberapa penelitian

mengamati peningkatan yang berkorelasi antara kapasitas pernapasan mitokondria dengan ekspresi gen Mfn1, Mfn2, dan Drp1 setelah latihan ketahanan. Oleh karena itu, reorganisasi jaringan mitokondria dalam sel otot memainkan peran penting dalam menanggapi latihan. (Bach *et al.*, 2003)

Kemampuan untuk mitokondrial biogenesis telah terbukti menurun dengan bertambahnya usia, dan penurunan fungsi mitokondria tersebut telah dikaitkan dengan berbagai penyakit diantaranya diabetes dan penyakit kardiovaskular. Penuaan dan penyakit dapat menyebabkan perubahan tingkat ekspresi protein yang terlibat dalam mekanisme fisi dan fusi mitokondria, sehingga menciptakan mitokondria yang disfungsi. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008)(Dillon, Rebelo and Moraes, 2012)

4. PGC-1 α sebagai Regulator Utama Mitokondrial Biogenesis

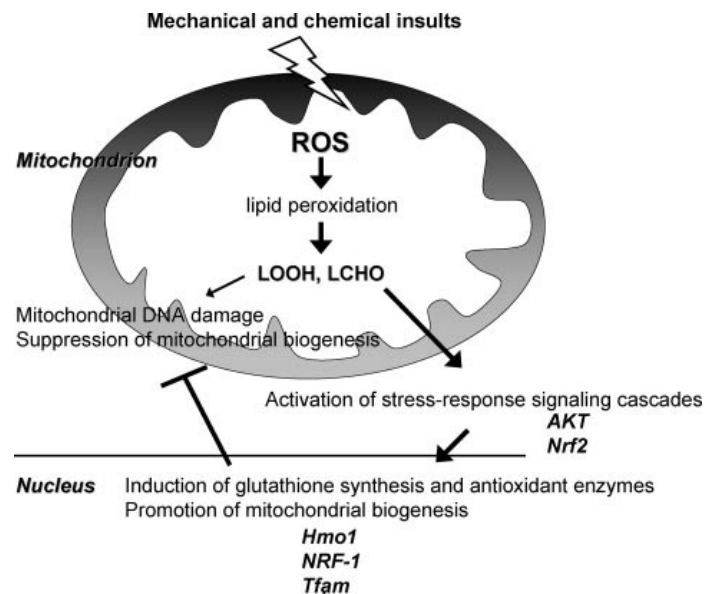
Kemajuan terbaru dalam biologi molekuler telah mulai menjelaskan peristiwa transkripsi yang mengatur mitokondrial biogenesis. Secara khusus, penemuan bahwa *peroxisome proliferator-activated reseptor gamma co-aktivator* (PGC-1 α) merupakan regulator utama mitokondrial biogenesis. Namun, mekanisme molekuler yang mendasari regulasi turunnya PGC-1 α dan penurunan fungsi mitokondria pada gagal jantung masih kurang dipahami. PGC-1 α tidak memiliki aktivitas pengikatan DNA tetapi berinteraksi dengan mengaktifasi berbagai faktor transkripsi termasuk NRF pada mtTFA. Biogenesis dan respirasi

mitokondria dirangsang oleh PGC-1 α melalui induksi kuat ekspresi gen NRF1 dan NRF2. PGC-1 α banyak ditemukan pada jaringan yang memiliki aktivitas oksidatif tinggi seperti jantung dan jaringan adiposa coklat, dan jarang ditemukan pada otot rangka, dan ginjal. PGC-1 α diinduksi dalam kondisi peningkatan energi seperti dingin, olahraga, dan puasa. Ekspresi ektopik PGC-1 α dalam myotubes sangat menginduksi ekspresi faktor transkripsi hilir seperti NRFs dan Tfam. Tidak seperti NRFs atau Tfam, PGC-1 α berkorelasi dengan kapasitas oksidatif otot jantung dan otot rangka. Selama tahap neonatal, ekspresi jantung PGC-1 α diinduksi secara kuat yang mengarah pada peningkatan jumlah dan ukuran mitokondria, bersamaan dengan peningkatan regulasi gen yang terkait dengan mitokondrial biogenesis. (Ventura-Clapier, Garnier and Veksler, 2008)

D. Mitohormesis

Mitokondria memainkan peran utama dalam produksi energi oksidatif, kontrol reaksi reduksi-oksidasi (redoks) dan homeostasis kalsium. Meskipun mitokondria mengandung DNA dengan gen yang spesifik, sebagian besar protein mitokondria dikodekan oleh nDNA, disintesis dalam sitosol, dan diimpor ke mitokondria. Ekspresi gen nuklear yang mengkode protein mitokondria berfungsi pada jalur metabolisme seperti siklus asam trikarboksilat (TCA), fosforilasi oksidatif, sintesis heme, dan dalam replikasi dan transkripsi DNA mitokondria (misalnya, *mitochondrial transcription*

factor A [Tfam] , diatur secara terkoordinasi oleh PGC-1 α dan PGC-1beta melalui aktivasi *nuclear respiratory factor* (NRF) -1 dan NRF-2.(Sano and Fukuda, 2008; Bhatti *et al.*, 2017)

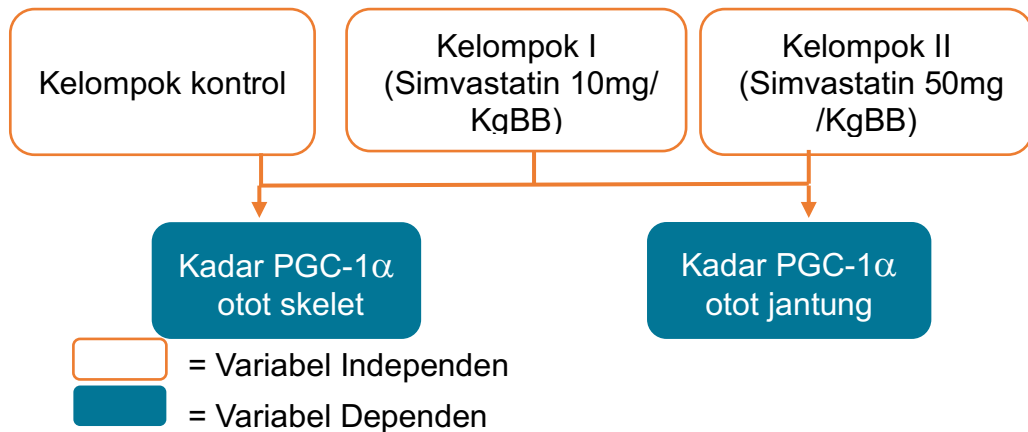


Gambar 4. Mekanisme ROS menginduksi mitohormesis(Sano and Fukuda, 2008)

Dalam penelitiannya, Piantadosi dkk menjelaskan mengenai mekanisme yang mendasari interaksi antara pensinyalan ROS oleh mitokondria dan mitokondrial biogenesis. Pertama, lipid hidroperoksida mengatur ekspresi Tfam melalui fosforilasi NRF-1 melalui aktivasi Akt, yang mempromosikan translasi nuklir NRF-1 dan mengikat ke promotor Tfam.(Piantadosi and Suliman, 2006) Kedua, karbon monoksida (CO) diinduksi mitokondrial biogenesis melalui aktivasi dari Akt1 / PKB dan guanylate cyclase, yang meningkatkan ekspresi gen dan protein NRF-1 dan NRF-2, PGC-1 α . Semakin banyak bukti yang menunjukkan bahwa ROS

mungkin merupakan pedang bermata dua: meskipun mereka bisa menjadi racun bagi sel, mereka juga dapat memainkan peran penting dalam pensinyalan sel yang terlibat dalam pertahanan antioksidan. ROS dihasilkan dari banyak sumber termasuk keluarga Nox dari NADPH oksidase, xanthine oksidase, dan mitokondria, di mana ROS diproduksi sebagai produk sampingan dari produksi energi oksidatif. ROS sangat tidak stabil dan tidak dapat menembus membran lipid; Oleh karena itu mereka disimpan di dalam kompartemen di mana mereka diproduksi. Namun, ROS dapat menyerang asam lemak tak jenuh ganda dari membran dan memicu reaksi berantai peroksidasi lipid, menghasilkan generasi hidroperoksida lipid dan aldehida tak jenuh, seperti 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). Sel mampu merasakan kerusakan makromolekul dan menetralkan kerusakan akibat stress. Produk peroksidasi lipid elektrofilik dapat memicu kaskade jalur yang tahan terhadap stres baik secara jaringan maupun sel. Induksi mekanisme proteksi-stres oleh stres disebut sebagai "stress-response hormesis.". Dalam kultur sel, 4-HNE membunuh sel dengan dosis tinggi, sedangkan pretreatment sel dengan dosis rendah 4-HNE meningkatkan regulasi antioksidan endogen dan memberikan toleransi yang lebih besar terhadap kerusakan oksidatif berikutnya. (Uchida *et al.*, 1999)

2. Kerangka Konseptual



Gambar 6 . Kerangka konseptual yang menjelaskan hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat

F. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

H1: Terdapat perbedaan yang signifikan kadar *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) di otot skeletal dan otot jantung tikus antara kelompok control, kelompok perlakuan simvastatin dosis 10mg/KgBB dan kelompok perlakuan simvastatin 50mg/KgBB

G. Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini bisa dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Definisi operasional variabel penelitian

Jenis Variabel	Parameter	Definisi Operasional	Skala Ukur
----------------	-----------	----------------------	------------

	Dosis simvastatin I (10 mg/KgBB)	Dosis obat simvastatin yang diberikan dengan takaran 10 mg/KgBB yang kemudian dilarutkan pada 2 ml 0,1% metilselulosa, dan diberikan pada hewan coba secara oral melalui sonde. Obat diberikan tiap 24 jam selama 30 hari.	Nominal
Variabel Bebas	Dosis Simvastatin II (50 mg/KgBB)	Dosis obat simvastatin yang diberikan dengan takaran 50 mg/KgBB yang kemudian dilarutkan pada 2 ml 0,1% metilselulosa, dan diberikan pada hewan coba secara oral melalui sonde. Obat diberikan tiap 24 jam selama 30 hari.	Nominal
	Kontrol	Hewan coba yang hanya mendapatkan plasebo, yaitu 2 ml 0,1% metilselulosa yang diberikan secara oral melalui sonde tiap 24 jam selama 30 hari.	Nominal
Variabel Terikat-1	Kadar PGC-1 α otot skeletal	Kadar PGC-1 α per total protein pada jaringan otot skeletal yang telah diberikan 30 hari perlakuan melalui metode ELISA	Rasio
Variabel Terikat-2	Kadar PGC-1 α otot jantung	Kadar PGC-1 α per total protein pada jaringan otot jantung tikus yang telah diberikan 30 hari perlakuan melalui metode ELISA	Rasio