ENZIM LIPOPROTEIN LIPASE SUATU ALTERNATIF PEMERIKSAAN GANGGUAN METABOLISME LEMAK PADA PENDERITA DM TIPE 2 IN VITRO

(LIPOPROTEIN LIPASE ENZYME AS AN ALTERNATIVE TEST TO DIAGNOSE LIPID METABOLISM DISTURBANCES IN DIABETES TYPE 2)

Dian Handayani*, Aulani'Am**, Djoko W. Soeadmadji***, M. Aris Widodo****

*Program D-IV Gizi FKUB, PS Biomedik PPSUB

**Lab. Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

*** Divisi Endokrin, Lab./UPF Ilmu Penyakit Dalam RSSA, FKUB

****Lab. Farmakologi, Biomedik FKUB

ABSTRACT

The biggest population of Diabetes Mellitus is type 2 diabetes. Dyslipidemia is frequently found in type 2 diabetic patients, which is characterized by increased TG plasma levels and decreased HDL. Increased TG levels may be due to LPL activity disturbance, which then lead to impaired lipoprotein metabolism, such as decreased hydrolyzing TGs in VLDL and Chylomicron. LPL is an enzyme which activities are influenced by several factors such as temperature, pH, incubation period, and substrate concentration. LPL attached to vascular endothelium, and can be removed from it by giving heparin intravenous. Heparin acts as lipotropic agent which promote plasma lipid transfer to lipid deposit by secreting lipolytic enzyme such as LPL. After giving information about the objective of this study on the possible site effect of the blood obtaining technique, the patient was asked to give her voluntary consent. Heparin IV 60 IU/Kg BB was given 15 minute before blood sample was drawn. Obtain from aid type 2 diabetes individual and aid from non diabetic control subject. To determine optimal LPL action pH variations (6, 6.4, 6.8 and 7), temperature (30, 32, 35 and 37)°C, and incubation period (5, 10, 15 and 20 minute) was expose in vitro. Determinant of LPL molecular weight used the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrilamid Gel Electrophoresis). The results of this study show that LPL optimal conditions were at pH 6.8 is 33.0403 ± 6.3353 unit (Mean $\pm$ SD); enzyme activity at temperature 32°C is 32.7672 ± 8.5757 Unit (Mean $\pm$ SD); enzyme activity at incubation period 15 minutes is 35.4978 ± 15.2196 Unit (Mean $\pm$ SD); and at optimal activity condition that using concentration substrate 1.5% are: 34.26 ± 3.67 Unit (Mean $\pm$ SD) for type 2 diabetes and 87.37 ± 8.87 Unit (Mean $\pm$ SD) for normal subject. 87.37 ± 8.8665 Unit (Mean $\pm$ SD). Statistical analysis (T test) show significant different between LPL activity type 2 diabetes and normal subject. The electrophoresis show molecular weight of LPL around 71 Kda. There is different thickness and width of the LPL and between individual type 2 diabetes and control group. The different may be due to different enzyme concentration. These results show that for optimization LPL activity test in vitro we need enzyme isolated from post heparin plasma with optimal conditions as follows: temperature 32°C, pH 6.8, and incubation period 15 minutes. In this optimal conditions we can compare LPL activities of diabetic type 2 with normal subjects. LPL activity in diabetic type 2 patients is lower than in normal subjects (34.26 ± 3.67 Unit (Mean $\pm$ SD) VS 87.37 ± 8.87 Unit (Mean $\pm$ SD); ($P < 0.0001$)). The results can be tested at diabetic type 2 cases with various conditions, such as in obesity.

Key words : DM tipe 2, Enzim Lipoprotein Lipase, aterosklerosis, small dense LDL, plasma post heparin.

ABSTRAK

Populasi DM yang terbesar yaitu DM tipe 2. Pada penderita DM tipe 2 sering dijumpai adanya dislipidemi yang ditandai dengan peningkatan kadar serum trigliserida (TG) dan diikuti penurunan HDL. Peningkatan kadar TG disebabkan adanya gangguan aktivitas enzim Lipoprotein lipase (LPL). Selanjutnya mengakibatkan gangguan metabolisme lipoprotein, seperti terjadinya hidrolisis TG pada VLDL dan kilomikron akan menurun. Enzim LPL yang merupakan golongan protein aktivitas kerjanya sangat dipengaruhi oleh adanya faktor suhu, pH, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat. Letak enzim LPL salah satunya terdapat pada endotel dinding pembuluh darah. LPL dapat dilepaskan dari dinding pembuluh darah dengan melalui pemberian heparin intra vena. Heparin bersifat lipotropik, yang memperlancar transfer lemak darah ke dalam depot lemak dengan melepaskan enzim-enzim yang menghidrolisis lemak seperti LPL. Pada penelitian ini menggunakan sampel plasma pascaheparinisasi (yaitu plasma dari subyek penelitian yang sebelumnya telah diberi heparin intravenous dengan dosis 60 IU/kg BB). Subyek penelitian terdiri atas 8 orang tanpa DM tipe 2 (normal) dan 8 orang subyek penelitian dengan DM tipe 2. Karakterisasi LPL dilakukan berdasarkan kondisi optimum dengan memberikan variasi pH (6.4; 6.8; 7 dan 7.4), suhu (30, 32, 35 dan 37 °C, dan waktu inkubasi (5, 10, 15 dan 20 menit). Serta penentuan berat molekul dari LPL menggunakan metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrilamid Gel Elektroforesis). Hasil penelitian menunjukkan bahwa karakter enzim LPL mempunyai kondisi kerja optimum pada pH 6.8, suhu 32 °C, waktu inkubasi 15 menit dan konsentrasi substrat 1.5%. Aktivitas enzim pada pH 6.8 adalah 33.0403 ± 6.3353 unit (Mean $\pm$ SD); aktivitas enzim pada suhu 32 °C adalah 32.7672 ± 8.5757 Unit (Mean $\pm$ SD); aktivitas enzim pada waktu inkubasi 15 menit adalah 35.4978 ± 15.2196 Unit (Mean $\pm$ SD); dan aktivitas

enzim pada suhu, pH dan waktu inkubasi optimum serta konsentrasi substrat 1.5 % adalah : 87.37 ± 8.8665 Unit (Mean $\pm$ SD). Berat molekul LPL hasil isolasi adalah 71 Kda. Dari hasil elektroforesis juga nampak adanya perbedaan ketebalan pita protein pada kelompok sampel normal dan DM tipe 2. Perbedaan ketebalan pita ini diduga karena adanya perbedaan jumlah enzim LPL pada masing-masing kelompok. Dari hasil analisis uji statistik (uji t) menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($P < 0.0001$) antara aktivitas LPL pada sampel plasma orang DM tipe 2 dan orang normal dengan nilai aktivitas pada kelompok DM tipe 2 (34.26 ± 3.67 Unit (Mean $\pm$ SD)) dan pada kelompok normal (87.37 ± 8.87 Unit (Mean $\pm$ SD)). Dari hasil penelitian ini untuk optimalisasi uji aktivitas LPL in vitro dibutuhkan enzim yang diisolasi dari plasma post heparin dan diberlakukan kondisi optimum sebagai berikut: suhu optimum 32 °C, pH 6.8 dan waktu inkubasi 15 menit. Dengan kondisi optimum ini dapat dibedakan aktivitas LPL pada orang dengan DM tipe 2 dan kelompok normal. Aktivitas LPL pada pasien DM tipe 2 lebih kecil bila dibandingkan dengan aktivitas LPL pada kelompok normal ($P < 0.0001$). Hasil diatas dapat diujicobakan pada berbagai kasus DM tipe 2 dengan berbagai kondisi misalnya pada kasus obesitas.

Kata kunci: DM tipe 2, Enzim Lipoprotein Lipase, aterosklerosis, small dense LDL, plasma post heparin

PENDAHULUAN

Salah satu faktor timbulnya penyakit jantung koroner (PJK) adalah dislipidemia (1). Salah satu tanda kondisi dislipidemia adalah adanya peningkatan serum lipid baik itu kolesterol maupun trigliserida serta penurunan HDL (2). Selain dislipidemia faktor resiko yang dapat menyebabkan timbulnya PJK adalah usia jenis kelamin, stress, faktor keturunan serta Diabetes mellitus (DM), kegemukan dan hipertensi.

Pada diabetes mellitus tipe 2 (NIDDM) yang merupakan populasi terbesar pada penderita DM (lebih dari 90%) biasanya diikuti dengan gangguan metabolisme lemak, yang ditandai dengan hiperglikemia kronik dan hal ini terjadi pada DM tipe 2 dengan glukosa darah terkendali maupun tidak terkendali. Menurut Framingham Heart Study, peningkatan kadar TG dan VLDL yang disertai dengan HDL yang rendah lebih sering dijumpai pada pasien diabetes (baik laki-laki maupun wanita) dibandingkan pasien non diabetes. Kondisi dislipidemia pada DM tipe 2 akan menyertai timbulnya komplikasi jangka panjang (3).

Kadar TG yang meningkat dapat diakibatkan karena adanya gangguan aktivitas enzim Lipoprotein lipase (LPL), dan *abdominal obesity* serta peningkatan kadar *small dense LDL* diduga mempunyai hubungan yang erat dengan adanya kenaikan trigliserida, penurunan HDL kolesterol dan peningkatan ratio kolesterol dan HDL kolesterol. Hal ini merupakan faktor resiko adanya *acute coronary syndrome*. Dugi et.al,1996 yang telah melakukan penelitian tentang aktivitas LPL pada kelompok familial hypercholesterolemia, dan berkesimpulan bahwa LPL merupakan enzim yang penting dalam metabolisme lemak dan gangguan terhadap enzim ini akan mengarah pada terjadinya aterosklerosis (4).

Mengingat pengukuran *small dense LDL* membutuhkan biaya yang mahal untuk dilakukan maka pengukuran aktivitas enzim LPL merupakan salah satu cara sederhana yang dapat digunakan untuk mengetahui penyebab tingginya kadar TG pada DM tipe 2.

Menurut David dan Hazel, 1993, penelitian enzim yang terkandung di dalam plasma darah merupakan hal yang diperlukan di dalam biokimia klinik untuk mengawasi proses metabolisme yang normal dan mendeteksi tingkat abnormalitas dari enzim yang diproduksi oleh tubuh (5). Dalam Lehninger, 1995 dikatakan bahwa enzim memiliki kondisi optimum tertentu untuk dapat beraktivitas secara optimum karena itu dalam penelitian ini akan digunakan suatu metode uji aktivitas LPL pada penderita DM tipe 2 dengan tahapan sebelumnya mengisolasi

enzim LPL dari plasma post heparin dilanjutkan dengan mencari kondisi kerja optimum enzim LPL pada orang normal meliputi suhu, waktu inkubasi, pH dan konsentrasi substrat optimum (6). Dengan cara sentrifugasi dan titrasi enzim LPL diharapkan dapat diketahui aktivitas LPL pada metabolisme lemak baik pada kelompok subyek penelitian normal maupun dengan DM tipe 2.

Berdasarkan uraian di atas, maka dirumuskan suatu permasalahan, bagaimana kondisi optimum (meliputi pH, waktu inkubasi dan suhu) reaksi enzimatik dari LPL hasil isolasi dari plasma darah subyek penelitian, karakter LPL berdasarkan kinetika reaksi enzimatik (K_m , V_m), aktivitas dan berat molekulnya (SDS - PAGE) dan bagaimana perbedaan aktivitas enzim LPL dari plasma post heparin orang normal dan DM tipe 2 terhadap substrat.

Dengan penelitian ini diharapkan diperoleh suatu manfaat yaitu mendapatkan kondisi optimum metoda pemeriksaan enzimatik LPL pada penderita DM tipe 2 dan mendapatkan alternatif teknik pemeriksaan gangguan metabolisme lemak pada penderita DM tipe 2 melalui pemeriksaan LPL.

METODOLOGI

Subjek penelitian

Subyek penelitian dikelompokkan dalam dua kelompok yaitu 8 orang dengan DM tipe 2 dan 8 orang dalam kondisi tidak DM. Karakteristik untuk masing-masing kelompok adalah jenis kelamin laki-laki, usia di atas 40 tahun, bukan perokok, *Cloting time* dan *bleeding time* normal, tidak alergi heparin. Setiap subyek penelitian yang akan disertakan dalam penelitian ini telah diberikan *inform consent* dan ditandatangani oleh subyek penelitian. Selain itu juga diberi form ijin pelaksanaan penelitian dari komite etik penelitian. Untuk kelompok normal kriteria ditambah dengan tidak menderita DM tipe 2 secara klinis (gula darah 2 pp normal).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kemurnian p.a, bahan-bahan tersebut adalah Etanol 99%, Sukrosa, PLP (piridoxial p_Hosp_Hat), AET (aminoetiltiosiorium bromid), Na₂-EDTA, Aquades, Buffer p_Hosp_Hat pH=7, Olive oil, NaOH, PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Asam Oleat, Indikator pp, (NH)₂SO₄, Asam asetat glasial, Akrilamida, Bis-akrilamida, Amonium persulfat (APS), N,N,N',N' tetrametietilen diamine (TEMED), Sodium dodesil sulfat (SDS), Bovin Serum Albumin,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HCL , BaCl_2 . Metode penelitian ini adalah deskriptif analitik.

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan setelah subyek penelitian puasa 10 - 12 jam (subyek boleh minum air putih). Sebelum sampel diambil, subyek duduk selama 5 menit, kemudian dilakukan uji alergi heparin dengan cara memberikan heparin yang telah diencerkan menjadi 1/1000, kemudian dilakukan penyuntikan intra kutan dengan heparin yang telah diencerkan hingga berbentuk bulatan kecil, bulatan kecil diberi tanda dengan menggunakan *ballpoint*. Bila bulatan tidak membesar maka dikatakan tidak alergi heparin, demikian pula sebaliknya. Selanjutnya apabila tidak mengalami alergi heparin, subyek diberikan heparin Intra venous 60 IU/KG BB. 15 menit kemudian pengambilan sampel dilakukan dengan melakukan bendungan vena semimimal mungkin. Bahan yang diambil adalah serum.

2. Isolasi Enzim

Isolasi Enzim Lipoprotein Lipase (LPL) dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. (Modifikasi metode oleh Sumner and Myrback, 195 In, Wharton D.C and R.E Casty, 1972) (7).

3. Penentuan Kondisi Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan pada enzim hasil isolasi dari plasma post heparin dengan variasi pH sebesar 6.4; 6.8; 7.0 dan 7.4 dan diukur pada suhu 37°C. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas sebagaimana prosedur. Selanjutnya diplot antara besar pH dengan aktivitas *crude enzyme*. Nilai Unit terbesar menunjukkan tercapainya pH optimum.

Penentuan suhu Optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan pada enzim hasil isolasi dari plasma post heparin dengan variasi suhu sebesar: 30 °C, 32 °C , 35 °C , 37 °C dan diukur pada PH optimum. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas *crude enzyme*. Dan diplot antara besarnya suhu dengan aktivitas *crude enzyme*. Nilai Unit terbesar menunjukkan tercapainya suhu optimum.

Penentuan waktu inkubasi optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan pada enzim hasil isolasi dari plasma post heparin dengan variasi waktu inkubasi sebesar 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit pada pH dan suhu optimum. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas *crude enzyme*. Dan diplot antara besarnya suhu dengan aktivitas *crude enzyme*. Nilai Unit terbesar menunjukkan tercapainya waktu inkubasi optimum.

4. Pemurnian Enzim Kasar Lipoprotein Lipase (LPL)

Enzim kasar LPL dimurnikan dengan metode pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat, dengan fraksi endapan 60-90%. Selanjutnya dilakukan dialisis dengan kantong selofan dan direndam dalam buffer fosfat pH 7 untuk memisahkan enzim dari komponen terlarut lainnya, kemudian dilakukan uji aktivitas.

5. Penentuan Berat Molekul LPL

Elektroforesis, dilakukan untuk mengetahui berat molekul enzim dan untuk menunjukkan bahwa enzim yang diisolasi adalah enzim lipoprotein lipase

Penentuan masa molekul relatif (BM) dari LPL dilakukan dengan SDS PAGE. Untuk menentukan massa molekul relatif enzim, maka dilakukan dengan menghitung R_f (*Retardaction Factor*) dari masing-masing pita, dimana:

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Nilai R_f yang diperoleh diplotkan dengan kurva kalibrasi hubungan antara R_f dengan berat molekul dari protein standar.

6. Penentuan Konstanta Kinetika Reaksi

Penentuan konstanta kinetika reaksi *crude enzyme* LPL yang terdiri dari harga K_m dan V_{maks} . Dilakukan dengan menguji aktivitas *crude enzyme* LPL hasil isolasi dari plasma post heparin, pada kondisi optimum dengan variasi substrat sebesar 0.5%, 1%, 1.5%, dan 2% (dalam % volume per volume). Kemudian dibuat kurva Hanes, yaitu hubungan antara $[S]$ dan $[S]/V_o$. Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung V_{maks} dan K_m *crude enzyme* Lipoprotein lipase.

7. Uji aktivitas *crude enzyme* LPL berdasarkan kondisi optimum

Aktivitas LPL adalah kemampuan LPL dalam menghidrolisa trigliserida (8). Satu unit aktivitas enzim LPL adalah didefinisikan sebagai jumlah mikromol dari asam lemak bebas (FFA) per mililiter enzim permenit perdesiliter darah pada kondisi optimum. Rumus yang digunakan:

$$\text{AKTIVITAS} = \frac{N \text{ NaOH} \times V \text{ NaOH} \times T \times f_p}{V_E \times T}$$

Keterangan

N NaOH : Konsentrasi NaOH

V NaOH : Volume NaOH

f_p : Faktor pengenceran

V_E : Volume Enzim

Aktivitas enzim diukur dengan cara menambahkan enzim pada larutan substrat, kemudian diinkubasikan pada inkubator sesuai dengan kondisi optimumnya, setelah itu enzim dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian dititrasi dengan NaOH 0.1M sampai terjadi perubahan warna. Selanjutnya aktivitas diukur dengan menggunakan rumus di atas.

ANALISA DATA

Data lainnya yang diperoleh dianalisis dengan cara membuat deskripsi karakter ezim LPL pada masing-masing subyek dan aktivitas enzim pada kelompok DM tipe 2 dan normal dibandingkan dan diuji secara statistik untuk mengetahui ada beda aktivitas dengan menggunakan uji T.

HASIL

Dari hasil isolasi enzim lipoprotein lipase (LPL) dari plasma post heparin didapatkan *crude enzyme* LPL. Selanjutnya *crude enzyme* ini digunakan untuk mencari kondisi optimum kerja enzim secara in vitro

Penentuan Kondisi Kerja Optimum Enzim LPL Hasil Isolasi

Enzim hasil isolasi ditentukan kondisi optimumnya berdasarkan variasi pH (6.0; 6.4; 7.0; dan 7.4), suhu (30; 32; 35 dan 37 °C), dan waktu inkubasi (10; 15; 20 dan 25) menit.

Penentuan pH Optimum

Dari hasil penentuan pH optimum enzim LPL didapatkan pH optimum sebesar 6,8°C. Aktivitas enzim LPL pada masing-masing variasi pH tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai aktivitas rata-rata *crude enzyme* LPL pada beberapa variasi pH.

No	pH	AKTIVITAS RATA-RATA (UNIT) (MEAN ± SD)	HASIL UJI BEDA
1	6.4	29.8025 ± 3.9040	F = 10.7279 P = 0.0001
2	6.8	33.0403 ± 6.3353	
3	7	23.7562 ± 3.7724	
4	7.4	21.5717 ± 3.7724	

Dari Table 1 terlihat bahwa variasi pH memberikan nilai aktivitas *crude enzyme* LPL yang berbeda-beda. Pada penelitian ini, pH optimum dicapai pada pH 6.8 dengan aktivitas rata-rata *crude enzyme* LPL ini sebesar 33.0403 unit.

Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum enzim LPL dilakukan pada variasi suhu (30; 32; 35; dan 37) °C, dan diukur pada pH 6.8 dan waktu inkubasi selama 15 menit. Aktivitas enzim LPL pada masing-masing variasi suhu tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai aktivitas rata-rata *crude enzyme* LPL pada beberapa variasi suhu pada pH 6.8

No	Suhu (°C)	AKTIVITAS RATA-RATA (UNIT) (MEAN ± SD)	HASIL UJI BEDA
1	30	21.0256 ± 6.0603	F = 4.9184 P = 0.0072
2	32	32.7672 ± 8.5757	
3	35	32.2211 ± 7.0785	
4	37	31.1288 ± 5.8090	

Dari tabel 2 terlihat bahwa variasi suhu memberikan nilai aktivitas *crude enzyme* LPL yang berbeda-beda. Uji aktivitas dimulai pada suhu 30°C kemudian suhu meningkat pada 32°C dan menurun kembali pada suhu 35°C dan 37°C. Pada penelitian ini, suhu optimum dicapai pada suhu 32°C dengan aktivitas rata-rata *crude enzyme* sebesar 32.7672 unit.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum enzim LPL dilakukan pada variasi waktu inkubasi (10; 15; 20; dan 25) menit, dan diukur pada pH 6.8 dan suhu 32°C. Aktivitas enzim LPL pada masing-masing variasi waktu inkubasi tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai aktivitas rata-rata *crude enzyme* LPL pada beberapa variasi waktu inkubasi, pada pH 6.8 dan suhu 32° C

No	Waktu (menit)	AKTIVITAS RATA-RATA (UNIT) (MEAN ± SD)	HASIL UJI BEDA
1	5	30.5827 ± 4.6706	F= 4.9932 P = 0.0067
2	10	26.7599 ± 2.5675	
3	15	35.4978 ± 15.2196	
4	20	20.2064 ± 2.1457	

Dari Tabel 3 terlihat bahwa variasi waktu inkubasi memberikan nilai aktivitas *crude enzyme* LPL yang berbeda-beda. Uji aktivitas dimulai dengan waktu inkubasi 5 menit, kemudian ditingkatkan menjadi 10 menit. Disini tampak adanya sedikit penurunan aktivitas. Selanjutnya waktu inkubasi ditingkatkan kembali menjadi 15 menit, dan aktivitas meningkat kembali selanjutnya waktu ditingkatkan lagi hingga mencapai 20 menit, namun aktivitas enzim menurun kembali. Pada penelitian ini, waktu inkubasi optimum dicapai pada waktu 15 menit dengan aktivitas enzim sebesar 35.4978 unit.

Penentuan Harga KM dan Vmaks

Penentuan harga Harga KM dan Vmaks dilakukan dengan cara mengukur kecepatan rata-rata *crude enzyme* LPL pada posisi optimumnya, dengan variasi konsentrasi substrat yang dinyatakan pada tabel 4.

Tabel 4. Kecepatan reaksi rata-rata *crude enzyme* LPL pada berbagai variasi konsentrasi substrat, pada pH 6.8; suhu 32°C dan waktu inkubasi selama 15 menit

No	[S] %	Kecepatan reaksi (Unit) (Mean ± SD)	Hasil Uji Beda
1	0.5	20.21 ± 5.31889	F = 451,5632 P = 0,0001
2	1.0	47.48 ± 1.46455	
3	1.5	87.37 ± 8.86650	
4	2.0	124.02 ± 6.12760	

Penentuan kinetika enzim menurut Lehninger, 1995 dapat ditentukan berdasarkan pada nilai Km dan VM. Untuk menentukan kecepatan reaksi kinetika enzim dilakukan dengan memberikan variasi konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim tetap. Hal ini karena konsentrasi enzim yang tetap dan konsentrasi substrat yang semakin besar akan menyebabkan kenaikan aktivitas enzim, karena dengan meningkatnya konsentrasi substrat, maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat, sehingga produk yang dihasilkan akan banyak. Meningkatnya aktivitas enzim ini akan mencapai maksimum jika semua enzim telah mengikat substrat atau enzim telah jenuh oleh substrat.

Gambar 1. Pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim LPL

Harga K_M dan V_{maks} ditentukan dengan menggunakan persamaan Hanes. Dari Tabel 4. disubstitusikan harga $[S]$ pada sumbu x dan $[S]/V$ pada sumbu y.

Dari perhitungan harga K_M dan V_{maks} , diperoleh besarnya kecepatan maksimum (V_{maks}) *crude enzyme* LPL dalam menghidrolisis substrat adalah 4.61017 dalam mmol produk terbentuk/gr protein enzim/detik dan konsentrasi substrat pada saat kecepatan mencapai setengah dari kecepatan maksimum (K_M) adalah 36,6747 mmol/dm³

Dari Gambar 1 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat, maka semakin tinggi pula kecepatan reaksi enzimatik ekstrak kasar enzim LPL sampai pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi akan menghasilkan kecepatan reaksi yang konstan, mengikuti persamaan : $y = -0.0059x + 0.0272$

Penentuan Massa Molekul Relatif

Enzim yang telah dimurnikan pada fraksi endapan ke 3 dilektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamida. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada gambar elektroforegram berikut:

Gambar 2. Elektroforegram dari enzim LPL yang diisolasi dari plasma post heparin kelompok sampel normal dan DM tipe 2

Keterangan :

- M : Marker (Protein standar)
- S1 : Sampel Kontrol/Normal
- S2 : Sampel dengan DM Tipe II

Dari hasil diatas dapat dilihat bahwa nilai massa molekul relatif enzim LPL adalah 71 kDa. Menurut Schomburg (1991), masaa molekul relatif enzim LPL yaang diisolasi dari manusia, tikus dan burung sebesar 34.000-75.000 Dalton, sehingga diduga pita protein tersebut adalah pita protein dari enzim LPL (9).

Pada Gambar 2 di atas nampak adanya perbedaan ketebalan band pada sampel normal dan sampel DM.

Aktivitas LPL Pada Penderita DM

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan pada 8 orang penderita DM tipe 2 menunjukkan nilai rata-rata dari aktivitas enzim LPL adalah sebesar 34.26 unit/menit. Dan hal ini menunjukkan adanya perbedaan dengan nilai aktivitas LPL pada kelompok normal (87.37 unit/menit) seperti tampak pada gambar di bawah ini :

Gambar 3. Perbedaan aktivitas rata-rata enzim LPL pada kelompok DM tipe 2 dan kelompok normal

Selanjutnya dengan menggunakan uji statistik T-test membuktikan adanya perbedaan antara kedua nilai aktivitas di atas dengan p value 0.0001.

PEMBAHASAN

Dari plasma post heparin dapat diisolasi enzim LPL, selanjutnya hasil isolasi ini diuji aktivitasnya. Enzim hasil isolasi ditentukan kondisi optimumnya berdasarkan variasi pH (6.0; 6.4; 7.0; dan 7.4), suhu (30; 32; 35 dan 37)°C, dan waktu inkubasi (10; 15; 20 dan 25) menit. Hal ini mengingat setiap enzim mempunyai kondisi kerja optimum yang berbeda tergantung dari jenis dan sumber enzim tersebut (10). Kondisi kerja optimum LPL ditentukan besar nilai aktivitas enzim yang tertinggi dengan satuan unit. Satu unit aktivitas enzim LPL didefinisikan sebagai jumlah mikromol asam lemak yang dibebaskan permililiter enzim per menit pada kondisi optimumnya.

Dari hasil penentuan pH optimum menunjukkan variasi pH memberikan nilai aktivitas *crude enzyme* LPL yang berbeda-beda. Pada penelitian ini, pH optimum dicapai pada pH 6.8 dengan aktivitas rata-rata *crude enzyme* LPL ini sebesar 32.767 unit/menit. pH optimum merupakan pH dimana enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan, yaitu gugus pemberi dan penerima proton pada sisi aktif enzim berada pada konformasi yang sesuai substrat, sehingga aktivitas enzim untuk mengikat substrat menjadi maksimum.

Pada pH rendah yaitu dibawah pH 6.8, konsentrasi ion H⁺ yang tinggi akan berikatan dengan gugus yang bermuatan

negatif, yaitu gugus amino (NH_2), baik pada substrat maupun pada enzim, sehingga akan membentuk gugus yang bermuatan positif (NH_3^+). Hal ini disebabkan reaksi yang terjadi antara trigliserida (substrat) dengan protein (enzim LPL), sehingga akan terjadi tolakan pada sisi enzim yang bermuatan sama sehingga sisi aktif enzim akan mengalami perubahan konformasi dan enzim menjadi terdenaturasi.

Pada pH tinggi yaitu pH diatas 6.8, diduga terjadi perubahan muatan gugus ionik enzim pada sisi aktifnya, yaitu dengan berubahnya gugus karboksilat (COOH) dari tidak bermuatan menjadi bermuatan negatif (COO^-), karena terjadi pelepasan ion H^+ untuk menyetimbangkan banyaknya ion OH^- yang disebabkan adanya penambahan NaOH . Untuk mengkondisikan pH substrat kemudian ditambahkan buffer fosfat pH yang sesuai dengan pH larutan substrat yang diinginkan. Selanjutnya pH optimum yang didapatkan di atas digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan suhu dan waktu inkubasi optimum.

Penentuan suhu optimum enzim LPL dilakukan pada variasi suhu (30; 32; 35; dan 37) $^{\circ}\text{C}$, dan di ukur pada pH 6.8 dan waktu inkubasi selama 15 menit. Aktivitas enzim LPL pada masing-masing variasi suhu tersebut dapat dilihat pada tabel 4.2. Suhu optimum dicapai pada suhu 32 $^{\circ}\text{C}$ dengan aktivitas enzim rata-rata 32.7672 unit. Peningkatan suhu menyebabkan peningkatan energi kinetik molekul tersebut, sehingga frekuensi tumbukan antara molekul-molekul enzim dengan substrat akan semakin besar dan sehingga mengakibatkan produk enzim LPL yang dihasilkan akan menjadi maksimum.

Suhu di atas dan dibawah suhu optimum memiliki aktivitas enzim yang lebih kecil dari rata 32.7672 unit. Pada suhu di bawah suhu optimum, energi kinetik molekul enzim akibat kenaikan suhu belum mampu menghasilkan daya katalitik yang optimum. Sedangkan pada suhu di atas suhu optimum yaitu 35 $^{\circ}\text{C}$ dan 37 $^{\circ}\text{C}$ kecepatan reaksinya menurun kembali. Hal ini diperkirakan karena ikatan-ikatan pada enzim mulai terputus, sehingga struktur alamiah protein enzim menjadi rusak.

Kerja katalitik enzim sangat dipengaruhi oleh suhu, seperti yang terjadi juga pada reaksi kimia lainnya (11). Pada umumnya suhu semakin tinggi maka aktivitasnya akan meningkat. Namun mengingat enzim merupakan protein, maka peningkatan suhu di atas suhu optimumnya akan berakibat proses inaktivasi akan meningkat pula. Hal ini sesuai dengan pendapat Kusnawijaya, 1983 bahwa pada suhu yang terlalu tinggi untuk enzim yang merupakan protein maka akan terjadi denaturasi yang menyebabkan sisi aktif enzim dan enzim secara keseluruhan mengalami denaturasi (12).

Waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Pada waktu inkubasi yang kecil, maka aktivitas enzim juga akan kecil. Hal ini disebabkan karena waktu untuk berinteraksi antara enzim dan substrat yang kecil mengakibatkan interaksi tidak berlangsung secara keseluruhan sehingga produk yang dihasilkan hanya sedikit. Hal ini nampak pada kecilnya aktivitas *crude enzyme* pada waktu inkubasi 5 dan 10 menit dibandingkan dengan waktu inkubasi 15 menit.

Bila waktu inkubasi diperbesar, maka akan semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat, sehingga produk yang dihasilkan semakin besar, seperti terlihat pada aktivitas *crude enzyme* LPL yang tinggi pada waktu inkubasi 15 menit.

Apabila waktu inkubasi diperbesar maka enzim akan jenuh oleh substrat, dan kelebihan substrat tidak akan diikat oleh enzim, maka produk yang dihasilkan tetap.

Nilai aktivitas akan mengalami penurunan pada waktu 20 menit. Hal ini disebabkan karena perhitungan aktivitas enzim akan melibatkan faktor waktu sebagai pembagi, sehingga makin besar waktu inkubasi akan makin besar pembaginya sehingga nilai aktivitas yang dihasilkan akan semakin kecil. Menurut Montgomery (1993) pemecahan trigliserida dikatalisis oleh lipoprotein lipase. Dalam waktu 15 menit setelah sekresinya, lipoprotein kekurangan sebagian besar trigliseridanya, selanjutnya partikel sisanya akan diambil oleh hati (13).

Selanjutnya waktu inkubasi optimum yang didapatkan di atas, digunakan untuk menentukan harga K_m dan V_{maks} . Penentuan harga K_m dan V_{maks} dilakukan dengan cara mengukur kecepatan rata-rata *crude enzyme* LPL pada posisi optimumnya (pH 6.8, suhu 32 $^{\circ}\text{C}$, dan waktu inkubasi 15 menit), dengan variasi konsentrasi substrat 0.5%, 1.0%, 1.5%, dan 2%. Penentuan kinetika enzim menurut Lehninger 1995 dapat ditentukan berdasarkan pada nilai K_m dan V_{maks} (6). Untuk menentukan kecepatan reaksi kinetika enzim dilakukan dengan memberikan variasi konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim tetap. Hal ini karena konsentrasi enzim yang tetap dan konsentrasi substrat yang semakin besar akan menyebabkan kenaikan aktivitas enzim, karena dengan meningkatnya konsentrasi substrat, maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat, sehingga produk yang dihasilkan akan banyak. Seperti tampak pada Tabel 1 dan Gambar 2, konsentrasi substrat yang semakin besar menyebabkan banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga banyak produk yang dihasilkan. Meningkatnya aktivitas enzim ini akan mencapai maksimum jika semua enzim telah mengikat substrat atau enzim telah jenuh oleh substrat.

Penetapan nilai K_m dan V_{maks} dilakukan dengan membuat grafik $[S]/V$ pada sisi ordinat versus $[S]$ pada sisi aksis. Dari grafik ini ditemukan persamaan grafik $y = -0.0059x + 0.0272$ dan dihasilkan harga $V_{maks} = 36.76471$ dan $K_m = -0.21691$

Harga K_m dan V_{maks} ditentukan dengan menggunakan persamaan Hanes. Dari Tabel 4 disubstitusikan harga $[S]$ pada sumbu x dan $[S]/V$ pada sumbu y.

Penentuan harga K_m dan V_{maks} digunakan regresi linier dengan maksud untuk melihat apakah ada hubungan antara variasi konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi *crude enzyme* LPL. Dari Gambar 1 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat, maka akan semakin tinggi pula kecepatan reaksi enzimatis *crude enzyme* LPL sampai pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi akan menghasilkan kecepatan yang konstan, mengikuti persamaan : $y = -0.0059x + 0.0272$

Berdasarkan nilai V_{maks} diketahui bahwa aktivitas LPL maksimum sangat dipengaruhi oleh $[S]$. Pada kondisi gangguan lipid terjadi peningkatan $[TG]$ sebagai substrat sehingga LPL jenuh terhadap substratnya sehingga terjadi penurunan aktivitas LPL.

Pada Gambar 2 nampak adanya perbedaan ketebalan band pada sampel normal dan sampel DM. Perbedaan ini diduga disebabkan karena jumlah LPL pada orang DM tipe 2 lebih banyak dibandingkan dengan orang normal. Peningkatan jumlah LPL ini dapat dikaitkan dengan tingginya kadar trigliserida pada

orang DM (170mg/dl) dibandingkan dengan kadar trigliserida pada orang normal (152.5 mg/dl).

Seperti yang dikatakan oleh Tjokropawiro, 1994 pada penderita DM tipe 2 dislipidemia yang sering terjadi adalah adanya peningkatan serum trigliserida dan penurunan serum HDL (14). Namun pada orang DM tipe 2 walaupun jumlah LPL lebih banyak aktivitasnya lebih rendah dibandingkan dengan pada orang normal, hal ini disebabkan karena salah satu aktivator kerja LPL adalah insulin dan pada orang DM tipe 2 terjadi defisiensi insulin akibat kegagalan respon jaringan terhadap insulin (resistensi insulin). Dan adanya gangguan produksi insulin dapat dilihat dari hasil pemeriksaan C-peptide yang menunjukkan adanya penurunan pada kelompok DM (1,005 ng/dl) sedangkan pada orang normal sebesar (2.7 ng/dl). Hal tersebut di atas juga di dukung dengan pendapat Howard & Howard 1994, bahwa pada NDDM, defisiensi insulin terjadi akibat kegagalan respon jaringan terhadap insulin (resistensi insulin) (15). Kelainan yang jelas terlihat adalah adanya peningkatan kadar trigliserida dan VLDL sebagai akibat terjadinya pertambahan mobilisasi glukosa dan asam lemak bebas ke hepar. Selain itu aktivitas LPL juga mengalami penurunan yang mengakibatkan klirens VLDL menjadi terganggu, dan hal ini biasa terjadi pada penderita hiperglikemia berat.

Pada DM tipe II, kadar apo A-I akan menurun tetapi kadar apo-B, apo E serta rasio apo C-III/apoC-II akan meningkat (16). Perubahan komposisi VLDL sebagai akibat bertambahnya proporsi apo E dan glikosilasi apo E mengganggu ikatan apo E/B dan menghambat terjadinya uptake sisa VLDL oleh hepar, disamping adanya proses *enrichment* VLDL oleh apo C-III yang menghambat kerja LPL. Hal-hal tersebut diatas akan mengakibatkan peningkatan kadar VLDL dan juga kilomikron yang berarti juga terjadi peningkatan trigliserida.

Penelitian epidemiologis menunjukkan bahwa hipertrigliseridemia merupakan faktor resiko timbulnya penyakit kardio vaskular pada penderita DM tipe II. Adanya hyper TG akan meningkatkan aktifitas *Hepatic lipase* (HL) sehingga berakibat pada peningkatan katabolisme HDL. Dan telah diketahui bahwa penurunan 1mg HDL akan meningkatkan resiko PJK sampai 3 kali lebih tinggi.

Adanya perbedaan aktivitas LPL pada kelompok normal dan kelompok DM tipe 2 menunjukkan bahwa penurunan aktivitas LPL terjadi pada kelompok DM tipe 2. Rendahnya nilai aktivitas LPL pada orang DM dibandingkan dengan kelompok kontrol diduga disebabkan karena rendahnya aktivitas insulin pada penderita DM seperti tampak pada hasil laboratoriumnya yaitu nilai rata-rata C-Peptide kelompok DM adalah sebesar 0.7 ng/dl sedangkan pada kelompok normal adalah 2.7 ng/dl. Seperti dikatakan oleh Marks, 1996 bahwa salah satu penyebab yang mempengaruhi aktivitas LPL adalah insulin (17). Penurunan aktivitas insulin dapat menurunkan aktivitas LPL. Hubungan

antara resistensi insulin dan metabolisme trigliserida pada *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) dan apo-B adalah bahwa insulin selain berperan pada proses ambilan glukosa juga mempunyai peranan menurunkan *Free Fatty Acid* (FFA) Plasma melalui aktivasi enzim *Lipoprotein Lipase* (LPL). Dan insulin juga berperan pada stimulasi sekresi apo B dari hati. Akibat turunnya aktivitas LPL kadar trigliserida di dalam darah menjadi tinggi. Hal ini mengakibatkan timbulnya bentuk-bentuk abnormal dari HDL dan LDL, dimana bentuk LDL dan HDL menjadi lebih kecil dan mempunyai densitas yang lebih tinggi serta VLDL dan sisa kolesterol mengandung banyak kolesterol. Hal ini disebabkan dengan kadar trigliserida yang tinggi akan memacu kerja CETP untuk memindahkan trigliserida dari VLDL dan IDL ke LDL dan HDL. Dan sebaliknya memindahkan lebih banyak kolesterol kepada VLDL dan IDL. Oleh enzim hepatic lipase (HL), LDL dan HDL yang mengandung banyak trigliserida dihidrolisis sehingga ukuran LDL dan HDL menjadi lebih kecil dan menjadi lebih atherogenik.

Sehingga disimpulkan resistensi insulin mempunyai peran penting terhadap terbentuknya "*Small dense LDL*" yang sangat atherogenik. *Small dense LDL* ini lebih mudah menembus dinding pembuluh darah dan lebih mudah dioksidasi oleh radikal bebas. Komposisi *small dense LDL* yang berbeda dengan LDL biasa juga akan mengakibatkan reseptor LDL tidak mengenali LDL lagi. LDL yang tidak dikenali oleh reseptornya akan diambil oleh makrofag yang selanjutnya akan terbentuk foam cell dan bila keadaan terus berlanjut akan timbul fibrous plak di dinding pembuluh darah sehingga timbulah ateroma dan terjadilah aterosklerosis (18).

KESIMPULAN

1. Untuk uji aktivitas LPL in vitro dibutuhkan enzim yang diisolasi dari plasma post heparin dengan kondisi optimum suhu 32°C, pH 6.8 dan waktu inkubasi 15 menit.
2. Dengan kondisi optimum ini dapat dibedakan aktivitas LPL pada orang dengan DM tipe 2 dan kelompok normal.
3. Aktivitas LPL pada pasien DM tipe 2 lebih kecil bila dibandingkan dengan aktivitas LPL pada kelompok normal ($P < 0.0001$).
4. Berdasarkan hasil elektroforesis nampak bahwa ketebalan pita protein pada sampel dengan DM tipe 2 lebih tebal dibandingkan dengan sampel normal.

SARAN

Untuk menerapkan metode ini sebagai alternatif pemeriksaan gangguan lipid pada DM tipe 2 perlu dikaji lebih luas kasus DM tipe 2 dengan obesitas.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Feher, D. M., and Richmond, W., Lipid and lipid disorders. Times Mirror Int. Pub. Limited. 1997: 17-18, 26.
2. Gotto, A. M., Illingworth, Thomson, G. R., Carlson, L. A., Clinician's Manual on Hyperlipidemia. International Atherosclerosis Society. 1993: 14 – 28.
3. Bell, D.S.H., Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. J. Cardiovascular Risk. 1997: 4: 83 -90
4. Dugi, K. A., Feuerstein, I. M., Hill, Suvimol, Shih, Joana, et. al, Lipoprotein Lipase (LPL) correlates positively and *Hepatic lipase* Inversely With Calcific Atherosclerosis in Homozygous Familial Hypercholesterolemia, American Heart Association, Inc. 1997.

-
5. David, J.H., and Hazel, P., *Analytical Biochemistry*, 2nd edition, Longman Limited, England. 1993: 261.
 6. Lehninger, A. L., *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid 1, Alih Bahasa: Thenawidjaja, Penerbit Erlangga, Jakarta. 1995: 9, 235 - 237, 242, 253, 255.
 7. Sumner and Myrback, 195 In, Wharton D.C and R.E Casty. 1972.
 8. Merkel, M., Weinstock, P.H., Shaul, T.C., Radner, H., Lipoprotein Lipase Expression Exclusively in Liver. *J. Clin. Invest.* September 1998: 102: 893-901.
 9. Schomburg, D., *Enzyme Handbook*, Springer –Verlag, German. 1990: 4.
 10. Lehninger, A. L., *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid 1, Alih Bahasa: Thenawidjaja, Penerbit Erlangga, Jakarta. 1990: 237, 242, 255.
 11. Dhawale, D. A., Monitoring Enzyme Conversion of Penicillin G in Aqueous Solution, *Hidustan Antibiotics Bulletin*. 1983: 25, 37–41.
 12. Kusnawijaya, K., *Biokimia*. Penerbit: Alumni. Bandung. 1983: 123, 125, 131.
 13. Montgomery, Rex. *Biokimia Jilid II* terjemahan: M Ismiadi, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 1993.
 14. Tjokropawiro, A., Dislipidemia pada Diabetes Mellitus. *Symposium Nasional Diabetes dan Lipid*. 1994: 243-253.
 15. Howard, B. V., & Howard, W. J., Dyslipidemia in Non Insulin -Dependent Diabetes Mellitus. *Endocrin Review*. 1994: 15: 205-213.
 16. Jellesof, N. E., Feinglos, M., Granger, C. B., Callif, R. M., Outcome of Diabetic Patients Following acute Myocardial Infarction: a Review of the Major Trombotic Trials. *J. Cardiovasc. Risk*. 1997.
 17. Marks, B. D., Mark, A. D., Smith, C. M., *Biokimia Kedokteran Dasar*, Alih Bahasa: Brahm U Pendit, EGC. 1996.
 18. Baynes, J.W., And Thorpe, S.R., Role Of Oxidatif Stress in Diabetic Complication A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*. 1999.
 19. Calles, Jorge, Escandon and Cipolla Marilyn, *Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective*. The Endocrin Society. 2001
 20. Fox, P. F., *Food Enzymology*, Elsever Science Publisher LTD, England. 1991: 73 – 75.
 21. Girindra, A., *Biokimia I*. Gramedia, Jakarta. 1988: 91 - 113.
 22. Kusnawidjaja, K., *Biokimia*, Penerbit: Alumni; Bandung. 1983: 123 -125, 131.
 23. Martin, D. W., Mayes, and V.W. Rodwel., *Harper's Review Of Biochemistry*, Large Medical Publications, Singapura. 1983: 62-67, 87-89, 96.
 24. Miller, Z. M., and Litsky, W., *Industrial Microbiology*, Macgraw Hill, Canada. 1976: 188.
 25. Mingrone, G., Henriksen, Finn, L., Greco, Aldo, V., Krogh, Lotte, N., et.al. Triglyceride-Induced Diabetes associated With Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. *Catholic University, Rome*. 1999.
 26. Muchtadi, D., Palupi, dan Astawan, M., *Enzim Dalam Industri Pangan*, Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB, Bogor. 1992: 31-37, 60 –67.
 27. Pickup and Williams., *Textbook Of Diabetes*, Blackwall Science Ltd. 1997.
 28. Poejjadi, A., *Dasar-dasar Biokimia*, UI-Press. 1994: 44 – 67.
 29. Rahayu, K., *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*, PAU Pangan dan Gizi Universitas Gajahmada, Yogyakarta. 1982: 59.
 30. Rhoads, G. G., Gulbrandsen, C. L., Kagan, A., Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii japanese men. *N Engl Med*. 1976: 294, 293 – 298.
 31. Robyt and White, *Biochemical Tehniques Theory and Practise*, Brooks/Cole Publishing Company, California. 1989: 40 – 47.
 32. Soeatmadji, D. W., *Prinsip-prinsip endokrinologi. Kursus Endokrinologi Dasar*. FK. Unibraw. 2001.
 33. Soeatmadji, J. W., Aulani'Am, Arsana, P. M., Rudijanto, A., *Aktivitas LPL dan Profil Lemak Darah Pada DM*. *Majalah Kedokteran Univ. Brawijaya*. 1999: 15(2): 58 – 60.
 34. Soehartono, *Enzim dan Bioteknologi*, Bioteknologi-IPB, Bogor. 1989: 147 – 150.
 35. Soemitro, S. B., Fatchiyah, Rahayu, S., Widyarti, S., Arumningtyas, E.L., *Kursus Teknik-teknik Dasar analisis Protein dan DNA*, Jurusan Biologi, F.MIPA. 1996: 35 – 48.
 36. Sukmawati, I. R., *Mekanisme dan aspek Laboratorium Komplikasi Diabetes Mellitus*. *Forum Diagnosticum*. 1999: 5: 8 – 9.
 37. Voet, D., and Voet, J., *Biochemistry*. Jhon Willey and Sons Inc., New York. 1990: 88 -96.
 38. Widodo, M. A., *Renin Angitensin Peran Fisiologis dan Pada Patomekanisme Penyakit Jantung Pembuluh Darah*, *Kursus Endokrinologi Dasar FK. Unibraw*. 2001.
 39. Wijaya, Andi, *Pemeriksaan Laboratorium Untuk Diagnosis dan Pengelolaan Diabetes Mellitus Up Date*, Prodia Diagnostic Educational Services. 1997.
 40. Winarno, F.G., *Enzim Pangan*, Gramedia, Jakarta. 1996: 48 – 54.
 41. Zubay, G., *Biochemistry*, 2nd ed., Macmillan Publishing Company, Singapore. 1989: 100-115.