

GRACE SYIARIEL

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

**PENGARUH VANADIL SULFAT TERHADAP  
JARINGAN OTOT DAN ADIPOSE MENCIT (*Mus  
musculus*) DENGAN *DIABETES MELLITUS***



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
BAGIAN ILMU BIOMEDIK FARMASI**

**SURABAYA**

Pengaruh vanadil.....

2007

Skripsi

Grace Syariel

## RINGKASAN

# PENGARUH VANADIL SULFAT TERHADAP JARINGAN OTOT DAN ADIPOSE MENCIT (*Mus musculus*) DENGAN *DIABETES MELLITUS*

(Grace Syiariel)

Berdasarkan perkiraan WHO, saat ini jumlah penderita *diabetes mellitus* mencapai 180 juta jiwa. Pada tahun 2005 tercatat lebih kurang 1,1 juta jiwa meninggal akibat diabetes dan sekitar 80% terjadi di negara berkembang. Terapi awal untuk mengatasi *diabetes mellitus* adalah dengan pengaturan pola makan. Bila pengaturan diet tidak dapat menurunkan kadar gula darah, maka diberikan terapi dengan obat. Terapi untuk pasien diabetes tipe 1 adalah injeksi insulin, sedangkan terapi untuk diabetes tipe 2 antara lain obat golongan sulfonilurea, biguanid dan tiazolidin, serta inhibitor  $\alpha$  glukosidase (Mathur, 2005; Schwinghammer, 2006). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan terapi khususnya untuk *diabetes mellitus* tipe 2 antara lain adalah perubahan kadar glukosa darah yang ditimbulkan oleh tiap obat, kondisi medis lain pada pasien misalnya hipertensi atau hiperlipidemia, efek samping, kontraindikasi, dan kepatuhan pasien dalam menggunakan obat (Mathur, 2005). Efek samping penggunaan insulin dan obat antidiabetes oral terus menerus antara lain menyebabkan hipoglikemia, peningkatan berat badan, resistensi insulin, gangguan pada saluran pencernaan, kulit kemerahan, kolestasis, anemia hemolitik dan berbagai penyakit kardiovaskular serta toleransi (Schwinghammer, 2006). Karena banyaknya efek samping yang dapat ditimbulkan oleh obat-obat anti diabetes tersebut, saat ini dilakukan banyak penelitian untuk mengembangkan obat-obat baru yang memiliki efek samping minimal untuk terapi *diabetes mellitus*.

Resistensi jaringan terhadap insulin yang menyebabkan kondisi *diabetes mellitus* berhubungan dengan peningkatan aktivitas enzim *tyrosine phosphatase*. Enzim ini dalam keadaan normal berfungsi untuk menghentikan transpor glukosa ke dalam jaringan saat kadar glukosa dalam darah telah mencapai kondisi basal dengan cara menghentikan *insulin signaling*. Peningkatan aktivitas *tyrosine phosphatase* menyebabkan terjadinya desensitisasi reseptor insulin di jaringan sehingga sel tidak mampu mengambil glukosa darah sebagai sumber energi, dan mulai beralih untuk memecah glikogen dan membentuk energi dari jalur alternatif seperti pemecahan lemak dan protein yang berakibat turunnya massa otot dan berkurangnya sel-sel lemak pada jaringan adipose. Selain itu jalur alternatif pembentukan energi ini dapat mengarah pada terjadinya komplikasi yang ditimbulkan oleh produk-produk sisa reaksi dari pemecahan lemak dan protein. Pada kondisi *diabetes mellitus*, cadangan energi berupa glikogen dalam hepar dan otot berkurang bahkan habis, pemecahan protein menyebabkan terjadinya atropi otot dan pemecahan lemak menyebabkan mengecilnya ukuran sel lemak dan nekrosis sel lemak pada jaringan adipose. Penghambatan aktivitas *tyrosine phosphatase* mungkin dapat menjadi strategi baru dalam terapi *diabetes mellitus*. Bahan yang menunjukkan kemampuan tersebut salah satunya adalah vanadil sulfat (Arijanto, 2006). Pada penelitian ini diamati pengaruh vanadil sulfat terhadap jaringan otot dan adipose mencit yang menderita *diabetes mellitus*.

Dibandingkan pengaruh berbagai dosis vanadil sulfat terhadap jaringan otot dan adipose mencit yang menderita *diabetes mellitus*.

Model *diabetes mellitus* dibuat dengan cara, mencit jantan galur Balb/c berumur 8 minggu diinjeksi dengan streptozotocin 100 mg/kg secara intra peritoneal. Injeksi streptozotocin diulangi dengan dosis 50 mg/kg 14 hari setelah injeksi pertama. Untuk memantau perkembangan *diabetes mellitus*, glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14 dan 21 dengan *On Call Now blood glucose monitoring system*. Setelah terjadi *diabetes mellitus* pada mencit (pada hari ke-21), diberikan suspensi vanadil sulfat dalam CMC Na sekali sehari selama 7 (tujuh) hari dengan dosis 5, 30 dan 100 mg/kg. Kadar glukosa darah kemudian diukur pada hari ke-28, kemudian mencit dimatikan, diambil jaringan otot kaki belakang dan adipose dari bawah perut dan bawah kulit dan disimpan dalam formalin dengan dapar pH netral untuk kemudian dipreparasi secara histokimia dengan *hematoxylin-eosin* untuk diamati di bawah mikroskop cahaya.

Hasil pengukuran glukosa darah setelah mencit mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat selama 7 (tujuh) hari menunjukkan penurunan kadar glukosa darah secara bermakna ( $F_{(4,43)} = 8,004$ ;  $p = 0,000$ ). Penurunan kadar glukosa darah signifikan mulai vanadil sulfat dosis 5 mg/kg ( $n = 4$ ;  $p = 0,007$ ), lebih rendah pada dosis 30 mg/kg ( $n = 7$ ;  $p = 0,000$ ), demikian pula pada dosis 100 mg/kg ( $n = 6$ ;  $p = 0,000$ ). Ini menunjukkan bahwa vanadil sulfat efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah pada kondisi *diabetes mellitus*.

Setelah dilakukan pengamatan terhadap perubahan jaringan otot dan adipose mencit pada kelompok kontrol (dapar sitrat), diabetes (STZ) serta perlakuan (STZ + vanadil sulfat), diperoleh bahwa induksi *diabetes mellitus* dengan streptozotocin mengakibatkan terjadinya nekrosis atropi pada serabut otot serta terjadi perubahan bentuk sel-sel lemak pada jaringan adipose. Setelah pemberian vanadil sulfat sekali sehari selama 7 (tujuh) hari, terjadi perbaikan kondisi atropi sel pada jaringan otot serta mengurangi nekrosis sel otot. Pada jaringan adipose, vanadil sulfat mengurangi pengambilan lipid dari dalam jaringan dan meningkatkan regenerasi sel-sel lemak yang baru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vanadil sulfat mampu menurunkan kadar glukosa darah dengan memperpanjang waktu *insulin signaling pathway*, sehingga glukosa dapat digunakan sebagai sumber energi utama tubuh, dan proses transpor glukosa ke dalam sel tetap terjadi. Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai pengaruh vanadil sulfat pada perubahan jaringan otot dan adipose mencit yang mengalami *diabetes mellitus* perlu dilakukan penelitian kuantitatif terhadap ukuran sel, kerapatan sel, jumlah penumpukan glikogen pada jaringan, terutama jaringan otot dan hepar.



## ABSTRACT

### **Influence of Vanadyl Sulfate on Muscular and Adipose Tissue Alteration in Diabetic Mice**

The present study was designed to investigate histochemical alteration of muscular and adipose tissue influenced by vanadyl sulfate in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetic model was induced by twice intraperitoneal injection of streptozotocin 100 mg/kg followed with 50 mg/kg on the day 14. Diabetes occurred on day 21 after streptozotocin injection and it was represented with the increasing blood glucose concentration from  $151,5 \pm 4,4$  mg/dL to  $224,6 \pm 9,9$  mg/dL ( $n = 28$ ). Administration of three different dose of vanadyl sulfate were all significantly reduce blood glucose concentration (5 mg/kg,  $p = 0,007$ ; 30 mg/kg,  $p = 0,000$  and 100 mg/kg,  $p = 0,000$ ). The muscular and adipose tissue were harvested on day 28 and stained on routine histology staining, hematoxylin-eosin, for morphological qualitative analysis. The results showed that vanadyl sulfate restore atrophic condition of muscular cells and inhibit cell necrosis in muscular tissue. In adipose tissue, vanadyl sulfate inhibits the lipid storage usage for energy and increase lipid cells regeneration.

**Keyword(s) :** vanadyl sulfate, streptozotocin, *diabetes mellitus*, muscular, adipose

## DAFTAR SINGKATAN

4E-BPI	<i>eIF4E binding protein</i>
ADP	<i>adenosine diphosphate</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosine Mono Phosphate</i>
CMC Na	<i>Carboxymethylcelulose Natrium</i>
DNA	<i>Deoxyribosome Nucleic Acid</i>
GLUT2	<i>glucose transporter type 2</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GS	<i>glycogen synthase</i>
GSK 3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
m-RNA	<i>messenger Ribosome Nucleic Acid</i>
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the young</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
p70s6k	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
PAS	<i>periodic acid Schiff</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI 3-kinase	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP <sub>3</sub>	<i>phosphatidyl-inositol(3,4,5)P<sub>3</sub></i>
PTPase	<i>Protein tyrosine phosphatase</i>
RNA	<i>Ribosome Nucleic Acid</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SREBP	<i>steroid regulatory element-binding protein</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

9. Kepala Bagian Kimia Farmasi Universitas Airlangga dan Kepala Bagian Farmasetika Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan dukungan dan bantuan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.
10. Para dosen di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah mendidik dan mengajarkan ilmunya.
11. Pak Mahfud Afandi dan Pak Sukadi dari laboratorium hewan percobaan yang telah banyak membantu saya dalam melakukan kegiatan penelitian.
12. Kedua orangtua dan saudari- saudari saya, Brigitta, Lydia dan Joice yang telah sangat memberikan dukungan dan doa selama ini.
13. Shinta Leo, Yustine Tansil, Ni Nengah Marwinary, Mayorina FG, Linda K., Mario S., Sylvy MD., Restu P. sebagai sahabat yang selalu mendukung dan memberi semangat kepada saya.
14. Benyamin Kumaladarya, David Setiawan dan Henokh Wiranegara yang selalu siap membantu dan mendukung saya.
15. Dian Hasiannami dan saudara-saudari saya di Persekutuan Doa Pharma yang selalu mendukung dan mendoakan saya.
16. Seluruh keluarga ceria Reg A 2003 yang selalu memberikan semangat untuk terus belajar.
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan dukungannya.

Akhir kata, semoga Tuhan senantiasa menganugerahkan rahmatNya yang berlimpah serta memberkati bapak, ibu, serta saudara-saudari sekalian. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi banyak orang dan dapat memberikan sumbangan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan ilmu kefarmasian di masa yang akan datang.

Surabaya, 22 Agustus 2007

Penyusun

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR SINGKATAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
RINGKASAN	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 LATAR BELAKANG	1
1.2 RUMUSAN MASALAH	3
1.3 TUJUAN PENELITIAN	3
1.4 MANFAAT PENELITIAN	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Diabetes mellitus</i>	4
2.2 Insulin	
2.2.1 Struktur insulin	5
2.2.2 Biosintesis dan sekresi	6
2.2.3 Efek farmakologi insulin dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein	9
2.3 Reseptor insulin	12
2.3.1 Struktur reseptor insulin	12
2.3.2 <i>Insulin signaling pathway</i>	13
2.4 <i>Protein Tyrosine Phosphatase (PTPase)</i>	15
2.5 Bahan penginduksi terjadinya <i>diabetes mellitus</i>	17
2.6 Vanadil sulfat	19
2.7 Histopatologi jaringan otot dan adipose pada <i>diabetes mellitus</i>	21
2.7.1 Jaringan otot	22
2.7.2 Jaringan adipose	30

<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	<b>34</b>
3.1 Kerangka konseptual	34
3.2 Hipotesis penelitian	36
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Alat	37
4.2 Bahan	
4.2.1 Vanadil sulfat	37
4.2.2 Streptozotocin	37
4.2.3 Dapar sitrat	37
4.2.4 <i>Carboxymethyl Cellulose Natrium</i> (CMC Na)	38
4.2.5 <i>Neutral Buffered Formalin</i>	38
4.2.6 <i>Periodic Acid Schiff</i>	38
4.2.7 <i>Hematoxylin-eosin</i>	38
4.2.8 Binatang percobaan	38
4.3 Protokol penelitian	39
4.4 Pengelompokan hewan coba dan timeline kelompok perlakuan	40
4.5 Kerangka operasional	41
4.6 Preparasi histokimia jaringan otot dan jaringan adipose	43
4.7 Analisis preparat histokimia	44
<b>BAB V. HASIL PENELITIAN</b>	<b>45</b>
<b>BAB VI. PEMBAHASAN</b>	<b>57</b>
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>63</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>64</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>68</b>



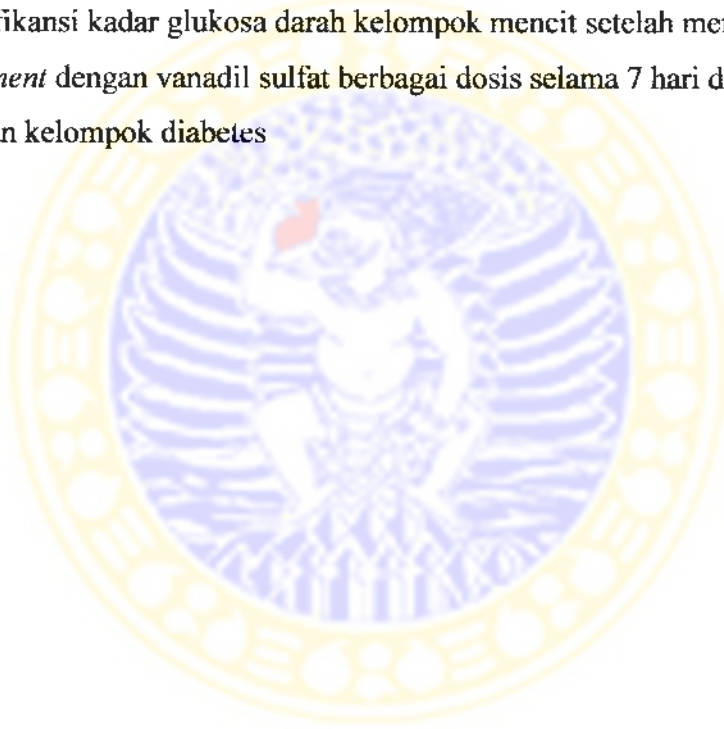
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Insulin	6
2.2. Biosintesis insulin	7
2.3. Mekanisme sekresi insulin dari sel $\beta$ pankreas	8
2.4. Sekresi bifasik insulin dengan adanya peningkatan glukosa darah	9
2.5. Efek insulin pada hati dan jaringan adipose	10
2.6. Struktur reseptor insulin	13
2.7. Mekanisme aksi insulin	14
2.8. Peran <i>tyrosine phosphatase</i> pada proses <i>insulin signaling</i>	17
2.9. Streptozotocin	18
2.10. Vanadil sulfat	19
2.11. Struktur kimia fosfat dan vanadat	20
2.12. Hasil isolasi serabut otot polos normal pada usus marmot	23
2.13. Jaringan otot polos normal pada apendiks manusia	24
2.14. Hasil isolasi otot skelet marmot normal	25
2.15. Otot skelet normal pada lidah manusia	25
2.16. Otot normal ventrikel jantung manusia	27
2.17. Glikogen pada serabut otot skelet	28
2.18. Perubahan awal nekrosis otot	28
2.19. Penampang melintang dan membujur otot normal dan diabetes	29
2.20. Proses nekrosis otot pada diabetes	29
2.21. Degenerasi sel-vakuolisasi sitoplasma	30
2.22. Jaringan <i>areolar</i> kelinci	30
2.23. Jaringan adipose coklat normal pada monyet	31
2.24. Jaringan lemak putih normal pada manusia	32
3.1. Diagram kerangka konseptual	34
4.1. Diagram pengclompokan hewan coba	40
4.2. Diagram <i>timeline</i> kelompok perlakuan	40
4.3. Diagram pengelompokan hewan coba dan perlakuan yang diberikan pada <small>Skripsi Pengaruh fanadil.....</small> <small>Grace Syaher</small> tiap kelompok	41

5.1. Perkembangan kondisi <i>diabetes mellitus</i> pada mencit dengan parameter kadar glukosa darah	46
5.2. Perubahan berat badan mencit pada perkembangan <i>diabetes mellitus</i>	47
5.3. Jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 100x	48
5.4. Penampang jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 400x	49
5.5. Penampang melintang jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> . Perbesaran 100x	50
5.6. Penurunan kadar glukosa darah mencit setelah mendapat terapi selama 7 (tujuh) hari dengan vanadil sulfat pada berbagai dosis	51
5.7. Penampang membujur jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 100x	53
5.8. Penampang membujur jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 400x	54
5.9. Penampang melintang jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 100x	54
5.10. Jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna <i>hematoxylin-eosin</i> , dengan perbesaran 400x	56

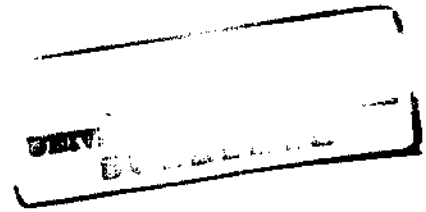
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
V.1 Kadar glukosa darah mencit setelah injeksi streptozotocin 100 mg/kg	45
V.2 Berat badan mencit setelah injeksi streptozotocin 100 mg/kg dilanjutkan 50 mg/kg.	46
V.3 Kadar glukosa darah mencit setelah mendapatkan perlakuan selama 7 hari dengan vanadil sulfat berbagai dosis.	51
V.4 Signifikansi kadar glukosa darah kelompok mencit setelah mendapatkan <i>treatment</i> dengan vanadil sulfat berbagai dosis selama 7 hari dibandingkan dengan kelompok diabetes	52



# BAB I

## PENDAHULUAN



### 1.1 LATAR BELAKANG

Berdasarkan perkiraan WHO, saat ini jumlah penderita *diabetes mellitus* mencapai 180 juta jiwa. Pada tahun 2005 tercatat lebih kurang 1,1 juta jiwa meninggal akibat diabetes dan sekitar 80% terjadi di negara berkembang. Data tersebut juga menunjukkan bahwa hampir setengah kematian terjadi pada usia di bawah 70 tahun dan 55% terjadi pada wanita. Oleh sebab itu, tanpa tindakan lebih lanjut, maka dalam kurun waktu 10 tahun ke depan diperkirakan jumlah kasus kematian akibat diabetes akan meningkat lebih dari 50% (Anonim, 2006).

*Diabetes mellitus* adalah suatu gangguan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Diabetes tipe 2 ditemui pada 90% dari seluruh kasus diabetes (Schwinghammer, 2003). Faktor genetik juga dapat berpengaruh terhadap terjadinya diabetes tipe 2, hal ini ditunjukkan dengan adanya perbedaan persentase terjadinya diabetes tipe 2 pada ras yang berbeda pada penelitian di Amerika Serikat, yaitu 6% pada ras kaukasia, 10% pada keturunan Afrika dan Asia, 15% pada keturunan Spanyol, dan 20% hingga 50% pada suku pendatang lainnya (Mathur, 2005). Terapi awal *diabetes mellitus* adalah dengan pengaturan pola makan. Bila pengaturan diet tidak dapat menurunkan kadar gula darah, maka diberikan terapi dengan obat. Terapi untuk pasien diabetes tipe 1 adalah injeksi insulin, karena sel  $\beta$  pankreas rusak atau tidak mampu menghasilkan insulin. Sedangkan terapi untuk diabetes tipe 2 memiliki beberapa tujuan, antara lain untuk meningkatkan sekresi insulin oleh pankreas dengan obat golongan sulfonilurea, menurunkan jumlah glukosa yang diproduksi di hati dan meningkatkan sensitifitas sel terhadap insulin dengan obat golongan biguanid dan tiazolidin, serta menurunkan absorpsi karbohidrat dari usus atau saluran pencernaan dan memperlambat waktu pengosongan lambung dengan inhibitor  $\alpha$  glukosidase (Mathur, 2005; Schwinghammer, 2003). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan terapi khususnya untuk *diabetes mellitus* tipe 2 antara lain adalah perubahan kadar glukosa darah yang ditimbulkan oleh tiap obat,



kondisi medis lain pada pasien misalnya hipertensi atau hiperlipidemia, efek samping, kontraindikasi, dan kepatuhan pasien dalam menggunakan obat (Mathur, 2005). Efek samping penggunaan insulin terus menerus antara lain menyebabkan hipoglikemia, peningkatan berat badan dan resistensi insulin. Sedangkan oral anti diabetes selain dapat mengakibatkan hipoglikemia, peningkatan berat badan dan resistensi insulin, dapat juga menyebabkan gangguan pada saluran pencernaan, kulit kemerahan, kolestasis, anemia hemolitik, dan berbagai penyakit kardiovaskular. Selain itu pemakaian insulin dan oral anti diabetes dapat menyebabkan toleransi (Schwinghammer, 2003). Karena banyaknya efek samping yang dapat ditimbulkan oleh obat-obat anti diabetes tersebut, saat ini dilakukan banyak penelitian untuk mengembangkan obat-obat yang bekerja lebih spesifik dan memiliki efek samping minimal.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, vanadil sulfat dapat secara efektif menurunkan kadar glukosa darah pada mencit dengan *diabetes mellitus* tipe 2 yang diinduksi dengan streptozotocin (Arijanto, 2006). Penelitian lain menunjukkan bahwa vanadil sulfat dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus (*rat*) dengan meningkatkan toleransi glukosa tanpa meningkatkan konsentrasi insulin plasma dan meningkatkan kadar glikogen pada hati (Aharon *et al.*, 1998). Vanadil sulfat dalam tubuh akan diubah menjadi vanadium yang merupakan analog fosfat dan bekerja pada hambatan terhadap enzim *tyrosine phosphatase* secara spesifik, yang dapat mencegah desensitisasi reseptor insulin sehingga dapat memfasilitasi pemasukan glukosa dari darah ke jaringan dan menurunkan kadar glukosa darah (Asante-Appiah & Kennedy, 2003). Namun hingga saat ini, vanadil sulfat di Amerika Serikat masih digolongkan sebagai suplemen untuk mengatasi hiperglikemia dan untuk pembentukan otot (Anonim, 2004).

Hal ini terkait dengan kurangnya penelitian yang menunjukkan data-data farmakokinetika maupun farmakodinamika dari vanadil sulfat. Melihat potensi vanadil sulfat dalam menurunkan kadar glukosa darah, maka memungkinkan obat tersebut digunakan sebagai *anti diabetic agent* pada keadaan *diabetes mellitus* tipe 2. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian mengenai mekanisme kerja penurutan glukosa darah pada kondisi *diabetes mellitus* dengan model hewan,

terutama pengaruhnya terhadap penghambatan enzim *tyrosine phosphatase* di jaringan adipose dan otot yang merupakan jaringan target dari kerja insulin.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Apakah terdapat perubahan pada jaringan otot dan adipose mencit (*Mus musculus*) *diabetes mellitus* setelah diinduksi dengan streptozotocin dan mendapatkan terapi vanadil sulfat?

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

Mengetahui perubahan morfologi jaringan otot dan adipose mencit *diabetes mellitus* tipe 2 yang diinduksi dengan streptozotocin dan pemberian vanadil sulfat dengan metode histokimia menggunakan *hematoxylin-eosin*.

## 1.4 MANFAAT PENELITIAN

1. Mengetahui perubahan morfologi jaringan otot dan adipose pada mencit *diabetes mellitus* dan pengaruh pemberian vanadil sulfat.
2. Memberikan sumbangan di bidang farmasi dengan penelitian lebih lanjut untuk terapi *diabetes mellitus* tipe 2 yang lebih spesifik.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Diabetes Mellitus*

*Diabetes mellitus* adalah kelompok gangguan metabolik ditandai oleh hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, protein yang disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin, sensitifitas insulin, atau keduanya dan mengakibatkan terjadinya komplikasi kronis termasuk mikrovaskular, makrovaskular, dan neuropati (Setter *et al*, 2000; Oki & Isley, 2002). Berdasarkan etiologinya, *diabetes mellitus* diklasifikasikan menjadi 2 kelompok besar, yaitu *diabetes mellitus* tipe 1, disebabkan oleh kerusakan sel beta pankreas secara total yang berhubungan dengan sistem imun atau infeksi virus, dan *diabetes mellitus* tipe 2, disebabkan oleh gabungan penurunan sekresi dan kerja insulin (Harris, 2000; Setter *et al*, 2000; Oki & Isley, 2002; Nolte & Karam, 2001).

Diabetes tipe 1 merupakan suatu gangguan katabolisme kronik yang disebabkan karena hampir tidak terdapat insulin dalam sirkulasi, glukagon plasma meningkat dan sel-sel  $\beta$  pankreas gagal merespon semua stimulus insulinogenik. Sehingga diperlukan pemberian insulin eksogen untuk memperbaiki katabolisme, mencegah ketosis, dan menurunkan kadar glukosa darah (Nolte & Karam, 2001). Diabetes tipe 1 dapat disebabkan oleh infeksi virus seperti *myxovirus* dan *coxsackievirus* atau toksin lain yang terdapat pada lingkungan, yang kemudian menjadi faktor pencetus respon antibodi abnormal yang secara genetik merupakan predisposisi untuk terjadinya suatu respon autoimun kuat yang menyerang virus dan antigen sel  $\beta$  pankreas. Gen-gen *Human Leukocyte Antigen* (HLA) yang khusus diduga meningkatkan kerentanan terhadap virus diabetogenik atau dapat dikaitkan dengan gen-gen yang merespon sistem imun tertentu yang menyebabkan terjadinya predisposisi pada penderita sehingga terjadi respon autoimun terhadap sel-selnya sendiri (Nolte & Karam, 2001). Rusaknya sel  $\beta$  pankreas menyebabkan gangguan metabolisme karbohidrat, sehingga tubuh kekurangan sumber energi dan membentuk glukosa melalui jalur pemecahan lemak dan degradasi protein yang menyebabkan kondisi ketoasidosis. Kondisi ini memperparah kondisi pasien,

karena merusak jaringan tubuh dan sistem fisiologi tubuh (Hoogwerf, 2006; Hamilton, 2006).

Diabetes tipe 2 merupakan suatu kelompok heterogen yang terdiri dari bentuk diabetes yang lebih ringan yang terutama terjadi pada orang dewasa dan kadang-kadang terjadi pada usia remaja, yang disebut dengan *maturity-onset diabetes of the young* (MODY). Etiologi *diabetes mellitus* tipe 2 antara lain kurangnya sekresi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas, defisiensi respon sel  $\beta$  pankreas terhadap glukosa, kurangnya jumlah reseptor insulin di jaringan, penurunan sensitifitas reseptor insulin di jaringan, kelainan reseptor, atau gabungan beberapa penyebab tersebut di atas. Umumnya jumlah insulin endogen yang disekresi cukup untuk mencegah terjadinya ketoasidosis tetapi insulin tersebut sering dalam kadar kurang dari normal atau secara relatif tidak mencukupi karena terjadi resistensi reseptor insulin. Faktor resiko utama terjadinya diabetes tipe 2 pada usia dewasa adalah obesitas, kelebihan kalori, dan kurangnya olahraga. Sedangkan diabetes tipe 2 pada usia remaja (MODY) lebih dipengaruhi oleh faktor hereditas (Nolte & Karam, 2001; Schwinghammer, 2006).

## 2.2 Insulin

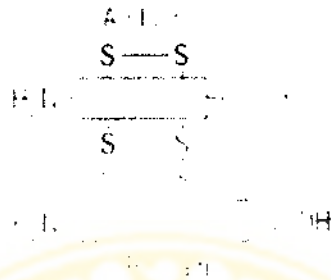
### 2.2.1 Struktur

Insulin adalah suatu polipeptida mengandung 51 asam amino dengan berat molekul 5808 dalton, berupa dua rantai asam amino, yaitu rantai A dan B yang dihubungkan oleh tiga ikatan disulfida. Terdapat sedikit perbedaan pada komposisi asam amino dari molekul spesies yang berbeda. Perbedaan tersebut umumnya tidak cukup mempengaruhi aktivitas biologis insulin secara khusus pada bermacam-macam spesies, sehingga insulin spesies mamalia yang satu hampir dipastikan aktif secara biologis pada spesies mamalia yang lain. Hingga saat ini preparat insulin untuk terapi diekstraksi dari pankreas sapi (*porcin*) dan babi (*bovin*).

Molekul insulin cenderung membentuk dimer dalam larutan karena adanya ikatan hidrogen antara ujung asam (-COOH) pada rantai B dari dua molekul insulin. Dengan tambahan ion *zink*, dimer-dimer insulin membentuk heksamer. Struktur-struktur insulin ini penting dalam menentukan terapi insulin yang



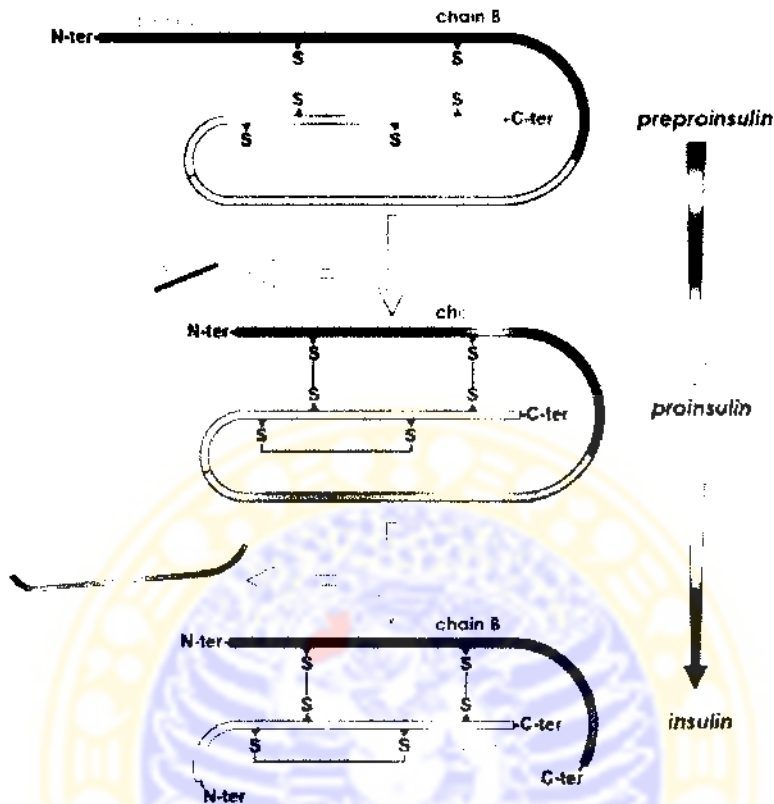
digunakan, dimana struktur monomer dan dimer siap berdifusi dalam darah, sedangkan bentuk heksamer sukar berdifusi. Hal ini berpengaruh terhadap absorpsi dan lama kerja dari preparat-preparat insulin (Bowen, 2004).



Gambar 2.1 Insulin (Snustad *et al*, 1997)

### 2.2.2 Biosintesis dan sekresi

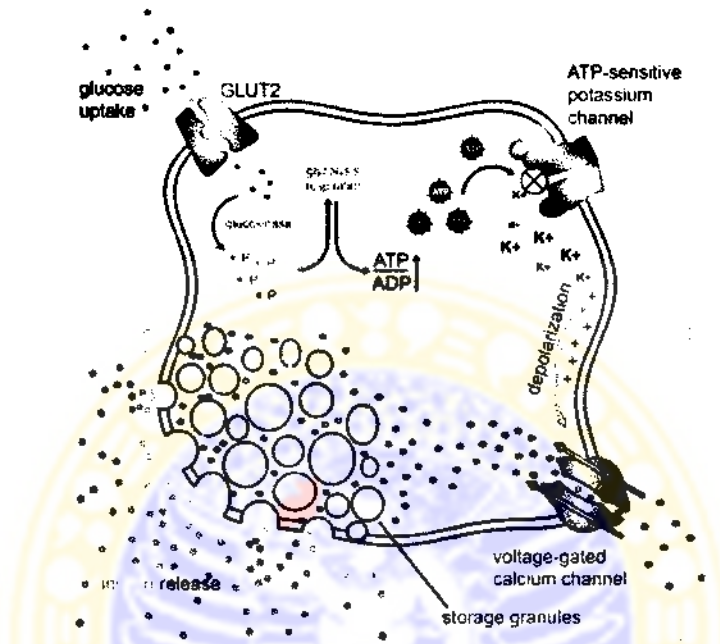
Insulin adalah hormon yang diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas. Sel beta ini terdapat dalam sel-sel yang membentuk pulau yang disebut *islet of Langerhans*. Preproinsulin, prekursor rantai tunggal hasil translasi m-RNA insulin dengan berat molekul 11500 dalton disintesis dalam retikulum endoplasma sel  $\beta$  pankreas, secara bertahap akan dipecah oleh enzim-enzim mikrosomal menjadi proinsulin dengan berat molekul 9000 dalton. Proinsulin terdiri atas rantai A dengan ujung karboksil, rantai B dengan ujung amino, dan dihubungkan oleh 31 asam amino yang disebut *C-peptide*. Proinsulin kemudian dipotong pada dua sisi oleh enzim-enzim peptidase untuk membentuk insulin aktif dan fragmen residual *C-peptide*, yang disimpan dalam vesikel siap sekresi pada badan golgi dan terakumulasi pada sitoplasma. Oleh sebab itu sekresi insulin selalu bersamaan dengan sekresi *C-peptide* dalam jumlah equimolar dan sedikit proinsulin yang belum dihidrolisis atau telah dihidrolisis sebagian (Bowen, 2004; Cartailier, 2006; Guyton & Hall, 1996; Nolte & Karam, 2001).



Gambar 2.2 Biosintesis insulin (Cartailler, 2006)

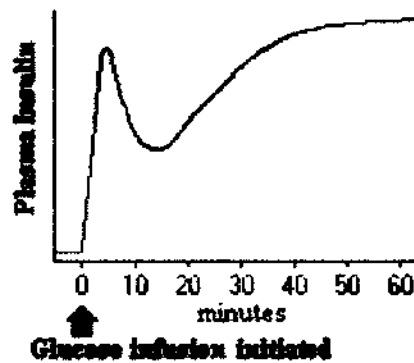
Insulin disekresi terutama karena adanya rangsangan dari peningkatan kadar glukosa darah. Pelepasan insulin juga dapat disebabkan oleh adanya rangsangan saraf seperti sensor penglihatan dan rasa dari makanan, dan peningkatan kadar asam amino dan asam lemak dalam darah. Glukosa masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas secara difusi terfasilitasi dengan bantuan *glucose transporter type 2* (GLUT2). Sebagai bahan awal proses glikolisis, glukosa difosforilasi oleh enzim glukokinase. Hasil fosforilasi tersebut kemudian diproses lebih lanjut untuk menghasilkan energi dalam bentuk ATP. Peningkatan rasio ATP:ADP intraseluler mengakibatkan kanal kalium yang dipengaruhi ATP menutup dan memblokir kalium keluar dari membran sel, muatan di dalam sel menjadi positif dan menyebabkan depolarisasi pada sel  $\beta$ . Keadaan tersebut mengaktifkan kanal kalsium yang dipengaruhi oleh voltage, menyebabkan ion kalsium masuk ke dalam sel sehingga mikrotubulus berkontraksi dan memicu sekresi hormon insulin

melalui proses eksositosis ke dalam aliran darah kapiler pada sel-sel *islet* Langerhans (Bowen, 2004; Nolte & Karam, 2001).



Gambar 2.3 Mekanisme sekresi insulin dari sel  $\beta$  pankreas (Cartailler, 2006)

Sekresi insulin merupakan proses bifasik. Jumlah insulin awal yang dilepaskan saat absorpsi glukosa tergantung dari insulin yang telah ada pada penyimpanan. Bila jumlah tersebut kurang, maka disekresikan insulin fase kedua. Sekresi yang tertunda ini disebabkan karena insulin harus disintesis, diproses, dan disekresi pada saat terjadi peningkatan glukosa darah. Dengan demikian peningkatan kadar glukosa darah tidak hanya mengakibatkan sekresi insulin meningkat, tetapi juga peningkatan pembentukan insulin (Bowen, 2004; Cartailler, 2006).



Gambar 2.4 Sekresi bifasik insulin dengan adanya peningkatan glukosa darah (Bowen, 2004)

### 2.2.3 Efek farmakologi insulin dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein

Glukosa dibebaskan dari karbohidrat yang berasal dari makanan seperti sukrosa dan polisakarida melalui hidrolisis di usus halus, dan kemudian diabsorpsi ke dalam darah. Meningkatnya kadar glukosa dalam darah merangsang sekresi dan kerja insulin pada sel-sel di seluruh tubuh untuk mengambil, menggunakan, dan menyimpan glukosa. Efek insulin pada metabolisme glukosa bervariasi tergantung pada jaringan target. Dua efek penting insulin antara lain insulin memfasilitasi pemasukan glukosa ke dalam otot, adipose, dan beberapa jaringan lain, selain itu insulin juga menstimulasi penyimpanan glukosa oleh hati dalam bentuk glikogen (Bowen, 2004).

Satu-satunya mekanisme masuknya glukosa ke dalam sel adalah dengan difusi terfasilitasi melalui *glucose transporters*. Pada banyak jaringan, terutama pada otot, *glucose transporter type 4* (GLUT4) ditranslokasikan dari vesikel-vesikel di dalam sitoplasma menuju tempat kerjanya di membran plasma melalui kerja dari insulin. Ikatan insulin pada reseptor di sel-sel tersebut menyebabkan larutnya vesikel dalam membran plasma dan GLUT4 menembus membran, dengan demikian memungkinkan sel untuk secara efisien mengambil glukosa dari darah. Saat konsentrasi insulin menurun dalam darah dan tidak lagi mengikat reseptor insulin, GLUT4 kembali masuk ke dalam sitoplasma. Beberapa jaringan tidak memerlukan insulin untuk mengambil glukosa dari darah, misalnya otak dan hati. Kedua jaringan tersebut tidak menggunakan GLUT4 untuk memasukkan



glukosa, tetapi menggunakan transporter lain yang tidak tergantung dari insulin. Pada sel-sel otot, insulin meningkatkan permeabilitas sel otot terhadap glukosa dan menyebabkan transpor glukosa yang cepat ke dalam sel otot. Bila jumlah glukosa yang ditranspor ke otot jumlahnya banyak dan otot tidak bekerja, maka sebagian besar glukosa akan disimpan dalam bentuk glikogen yang dapat digunakan oleh otot untuk menghasilkan energi (Bowen, 2004; Guyton & Hall, 1996).

Sebagian besar glukosa yang diabsorpsi oleh usus halus segera diambil oleh hepatosit, yang mengubahnya menjadi glikogen. Insulin memiliki beberapa efek pada hati yang merangsang pembentukan glikogen. Pertama-tama, insulin mengaktifasi enzim glukokinase yang memfosforilasi glukosa, dan menyimpannya dalam sel. Insulin juga menghambat kerja *glucose-6-phosphatase* dan fosforilase hati, enzim utama yang menyebabkan terpecahnya glikogen dalam hati menjadi glukosa. Beberapa enzim yang berperan langsung dalam proses sintesis glikogen, antara lain *phosphofructokinase* dan *glycogen synthase* diaktifkan oleh insulin sehingga kelebihan glukosa dapat disimpan dalam bentuk glikogen (Bowen, 2004).

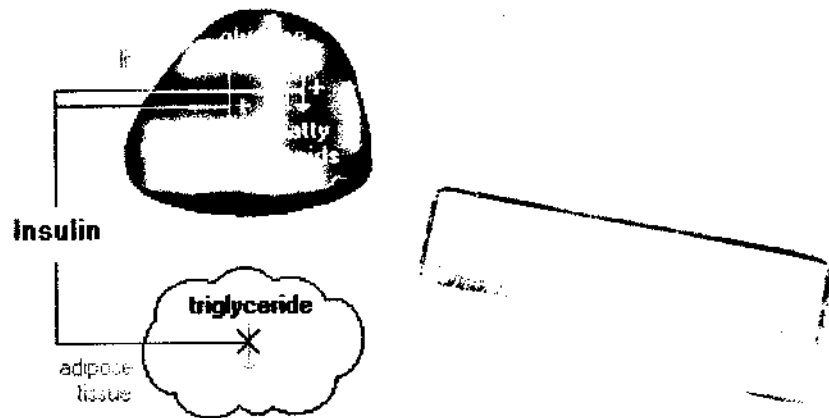
Efek utama insulin adalah untuk menurunkan konsentrasi glukosa dalam darah. Turunnya kadar glukosa dalam darah diikuti turunnya sekresi insulin. Pada saat tidak terdapat insulin, massa sel dalam tubuh tidak mampu lagi mengambil glukosa dari darah, dan mulai beralih untuk menggunakan energi alternatif seperti asam lemak sebagai energi. Pada saat itu pula terjadi penurunan sintesis glikogen pada hati dan peningkatan aktivitas enzim-enzim yang bertanggungjawab memecah glikogen. Pemecahan glikogen tidak hanya dipengaruhi oleh tidak adanya insulin tetapi juga oleh adanya glukagon, yang disekresi saat kadar glukosa darah turun di bawah normal (Bowen, 2004; Schwinghammer, 2003).

Jalur metabolik penggunaan lemak dan karbohidrat sangat kompleks. Efek penting insulin dalam metabolisme lemak antara lain dengan meningkatkan sintesis asam lemak di hati melalui stimulasi terhadap pembentukan glikogen. Bila glikogen ditimbun dalam jumlah yang besar (sekitar 5% dari massa hati), hati menjadi jenuh dengan glikogen. Penambahan glukosa yang diambil oleh hepatosit kemudian digunakan dalam jalur sintesis asam lemak, yang dikeluarkan oleh hati

dalam bentuk lipoprotein. Lipoprotein akan dipecah dalam sirkulasi menjadi asam lemak bebas untuk kemudian digunakan oleh jaringan-jaringan lain, termasuk jaringan adipose, yang mengubahnya menjadi trigliserida. Insulin juga menstimulasi lipoprotein lipase, enzim yang menghidrolisis trigliserida yang terbawa VLDL menjadi asam lemak (Bowen, 2004; Nolte & Karam, 2001).

Pada jaringan adipose, insulin menghambat pemecahan lemak dengan menghambat lipase intraseluler yang menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak. Insulin memfasilitasi pemasukan glukosa ke dalam jaringan adipose, yang kemudian digunakan untuk mensintesis gliserol. Gliserol bersama dengan asam lemak yang dikeluarkan oleh hati digunakan untuk membentuk trigliserida di dalam sel adiposit. Selain memiliki efek penggunaan karbohidrat sebagai energi oleh sel, insulin secara tidak langsung menyebabkan akumulasi lemak pada jaringan adipose sehingga secara keseluruhan insulin memiliki efek menimbun lemak (Bowen, 2004).

Insulin menyebabkan timbulnya pengangkutan secara aktif sebagian besar asam amino ke dalam sel. Insulin juga mempunyai efek langsung meningkatkan translasi m-RNA pada ribosom sehingga terbentuk protein baru. Setelah beberapa waktu, insulin juga meningkatkan kecepatan transkripsi rangkaian genetik DNA tertentu di dalam nukleus sehingga menyebabkan peningkatan jumlah RNA dan beberapa sintesis protein lagi. Kemudian, insulin juga menghambat proses katabolisme protein dengan mengurangi kecepatan pelepasan asam amino dari sel, khususnya dari sel-sel otot. Di dalam hati, insulin menekan kecepatan glukoneogenesis, hal ini terjadi dengan cara mengurangi aktivitas enzim yang dapat meningkatkan glukoneogenesis. Oleh karena bahan yang banyak dipergunakan untuk sintesis glukosa melalui proses glukoneogenesis adalah asam amino dalam plasma, maka proses penekanan glukoneogenesis ini akan menghemat pemakaian asam amino dari cadangan protein dalam tubuh (Bowen, 2004; Guyton & Hall, 1996).



Gambar 2.5 Efek insulin pada hati dan jaringan adipose (Bowen, 2004)

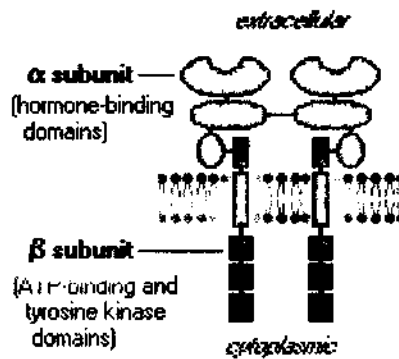
## 2.3 Reseptor Insulin

Reseptor insulin adalah sebuah *tyrosine kinase*, artinya reseptor tersebut berfungsi sebagai enzim yang mengubah gugus fosfat dari ATP menjadi residu tirosin pada protein target di dalam sel. Ikatan insulin pada subunit  $\alpha$  menyebabkan autofosforilasi subunit  $\beta$ , sehingga mengaktifkan kemampuan katalitik reseptor. Reseptor yang teraktivasi tersebut kemudian memfosforilasi sejumlah protein intraseluler, dan mengubah aktivitasnya sehingga timbul respon biologis (Bowen, 2004).

Respon biologis yang dipicu oleh terjadinya kompleks insulin-reseptor hanya dapat diidentifikasi pada beberapa jaringan target seperti hati, otot, dan jaringan lemak (Nolte & Karam, 2001).

### 2.3.1 Struktur reseptor insulin

Reseptor insulin berada pada membran plasma, merupakan sebuah kompleks tetramerik yang terdiri atas dua subunit  $\alpha$  dan dua subunit  $\beta$  yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Rantai  $\alpha$  seluruhnya berada di luar sel, sedangkan rantai  $\beta$  menembus membran plasma dan memiliki aktivitas intrinsik *protein tyrosine kinase* di bagian intraseluler. Subunit-subunit tersebut dihubungkan dengan ikatan disulfida (Bowen, 2004; Acilli *et al.*, 2000).



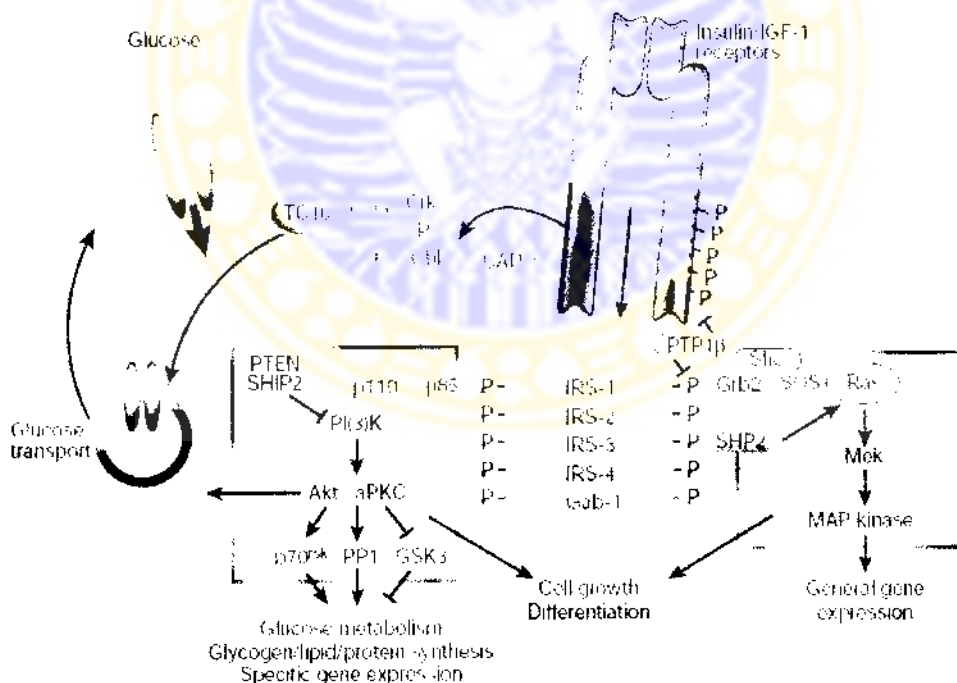
Gambar 2.6 Struktur reseptor insulin (Bowen, 2004)

### 2.3.2 Insulin Signaling Pathways

Molekul-molekul insulin yang disekresi oleh sel beta pankreas segera didegradasi oleh hati sebanyak 50%, sisanya berada dalam sirkulasi darah hingga terikat pada reseptor insulin. Kompleks insulin-reseptor ini segera terinternalisasi, mengalami autofosforilasi, dan selanjutnya memfosforilasi molekul *signaling* intraseluler seperti *Insulin Receptor Substrate* (IRS). IRS-1 terfosforilasi berperan sebagai protein penghubung untuk protein yang memiliki gugus *Src homology 2* (SH2). Salah satu protein yang memiliki gugus SH2 adalah *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI 3-kinase). PI 3-kinase adalah suatu heterodimer yang terdiri atas subunit p85 dan p110. Subunit p85 memiliki 2 gugus SH2 yang kemudian terikat pada IRS-1 terfosforilasi (Davis & Granner, 2001). PI 3-kinase mengkatalisis fosforilasi *phosphoinositide* pada posisi 3 membentuk *phosphatidylinositol-3-phosphates*, terutama *phosphatidyl-inositol(3,4,5)P<sub>3</sub>* (PIP<sub>3</sub>) yang dapat berikatan dengan gugus *pleckstrin homology* (PH). *Phosphatidylinositol-3-phosphates* meregulasi beberapa molekul sinyal, salah satunya adalah *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) yang kemudian memfosforilasi dan mengaktifasi Akt. Akt ini diperlukan untuk transpor glukosa ke dalam sel melalui *glucose transporter* (Kahn & Saltiel, 2001). Akt teraktivasi masuk ke dalam sitoplasma dan menyebabkan fosforilasi dan inaktivasi *glycogen synthase kinase 3* (GSK3). Substrat GSK3 adalah *glycogen synthase* (GS) yang berfungsi mengkatalisis tahap akhir pembentukan glikogen. Oleh karena itu, inaktivasi GSK3 menghentikan sintesis glikogen, sehingga glikogen dapat disimpan sebagai cadangan sumber energi di dalam sel (Lizcano & Alessi, 2002)



Selain itu jalur PI 3-kinase dapat merangsang translokasi GLUT4 ke membran plasma yang meningkatkan ambilan glukosa dari darah. Jalur yang kedua ini melibatkan fosforilasi Cbl, yang selalu diasosiasikan dengan protein *adapter* yaitu CAP. CAP terikat pada bagian Cbl yang kaya prolin melalui ujung karboksil SH3. Pada saat fosforilasi, kompleks Cbl-CAP berpindah pada bagian lipid pada membran plasma (*lipid raft*). Translokasi Cbl terfosforilasi menyebabkan pengambilan protein *adapter* Crk ke *lipid raft*. Crk membentuk kompleks dengan *guanyl nucleotide exchange protein* C3G. Setelah berpindah ke *lipid raft*, C3G akan menarik protein TC10 dan mengkatalisis perubahan GTP menjadi GDP yang selanjutnya mengaktivasi TC10. TC10 yang teraktivasi memberikan sinyal pada GLUT4 untuk bergerak menuju ke membran sel. Jalur PI 3-kinase dan jalur Cbl berlangsung secara paralel (Kahn & Saltiel, 2001).



Gambar 2.7 Mekanisme aksi insulin (Kahn & Saltiel, 2001)

Pada perannya dalam metabolisme protein, insulin menstimulasi pengambilan asam amino dalam sel, menghambat degradasi protein dengan mekanisme yang masih belum diketahui, dan meningkatkan sintesis protein (Kahn

& Saltiel, 2001). Pada keadaan basal, aktivitas pembentukan GSK3 menyebabkan fosforilasi dan inhibisi faktor pengubah nukleotida guanin eIF2B, yang meregulasi pembentukan awal translasi protein. Karena itu efek insulin yang menginaktivasi GSK3 oleh Akt menyebabkan fosforilasi eIF2B sehingga terjadi translasi atau pembentukan protein dan penyimpanan asam amino (Lizcano & Alessi, 2002). Akt juga mengaktivasi *mammalian target of rapamycin* (mTOR), yang meningkatkan sintesis protein melalui *p70 ribosomal S6 kinase* (p70s6k) dan penghambatan *eIF4E binding protein* (4E-BP1) (Asnaghi *et al*, 2004).

Insulin meningkatkan sintesis lemak melalui peningkatan faktor transkripsi *steroid regulatory element-binding protein* (SREBP)-1c (Shimomura *et al*, 1999). Insulin juga menghambat metabolisme lipid melalui penurunan konsentrasi cAMP dalam sel-sel adiposit (Kitamura *et al*, 1999).

Terminasi jalur PIP3 terutama dipengaruhi oleh enzim *tyrosine phosphatase* (PTPase), yaitu homolog tensin pada kromosom 10 (PTEN) dan senyawa SH2 yang mengandung protein inositol 5' fosfatase (SHIP1 dan SHIP2) (Lazar & Saltiel, 2006). Enzim-enzim PTPase tersebut mendegradasi PIP3 (tris-fosforilasi) menjadi *phosphatidylinositol (4,5) P2* atau *phosphatidylinositol (3,4) P2*. Penghentian *signaling* insulin juga dicapai dengan internalisasi kompleks reseptor insulin ke endosom dan degradasi insulin oleh *insulin degrading enzyme* (IDE) (Bevan, 2001).

#### 2.4 Protein Tyrosine Phosphatase (PTPase)

Autofosforilasi kompleks insulin-reseptor terjadi pada residu *tyrosine* yang spesifik. Studi mengenai aktivasi reseptor kinase insulin menunjukkan bahwa mula-mula terjadi fosforilasi Tyr-1158 dan Tyr-1162 atau Tyr-1163. Reseptor yang terfosforilasi secara mono atau bis memberikan aktivasi minimal pada aktivitas kinase sub unit  $\beta$ . Fosforilasi residu *tyrosine* yang ketiga terjadi secara cepat setelah bis-fosforilasi dan langsung memberikan aktivasi penuh terhadap reseptor kinase (Goldstein, 2000).

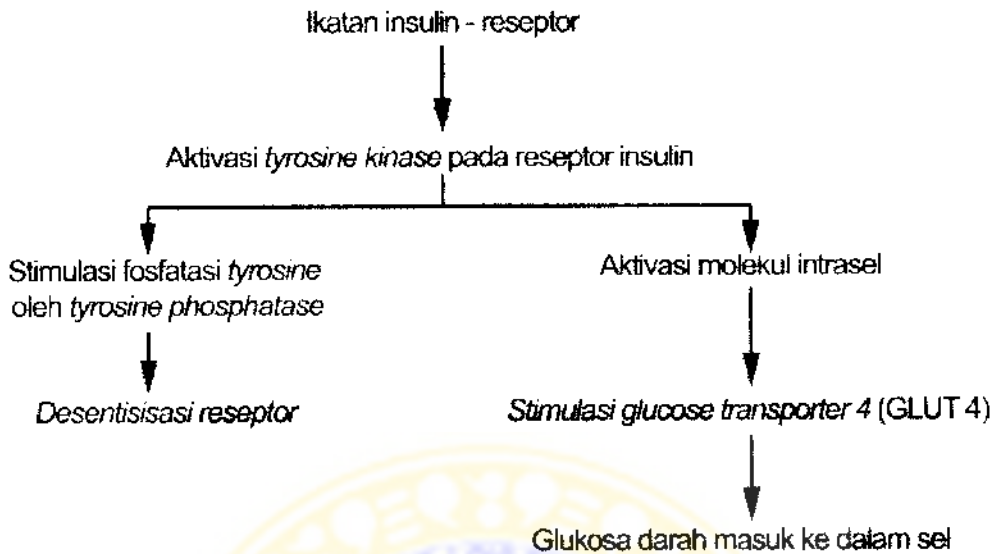
Reseptor yang telah mengalami tris-fosforilasi merupakan substrat yang paling cocok untuk enzim PTPase. PTPase selanjutnya menyebabkan deaktivasi kinase dan menentukan tingkat *steady state* aktivasi reseptor secara *in vivo*. Pada

penelitian menggunakan fraksi subseuler liver tikus *in vitro*, reseptor yang mengalami tris-fosforilasi ternyata lebih cepat terdefosforilasi daripada reseptor yang mengalami bis-fosforilasi (Goldstein, 2000).

PTPase dibagi menjadi 2 golongan yaitu tipe reseptor dan tipe non-reseptor. PTPase tipe reseptor memiliki struktur menyerupai reseptor membran, memiliki bagian ekstraseluler, segmen transmembran, dan satu atau dua gugus katalitik PTPase. Sedangkan tipe non-reseptor memiliki gugus tunggal PTPase dan segmen protein tambahan. PTPase tipe non-reseptor adalah PTP1B, SHP-2, dan MKP-1; sedangkan tipe reseptor adalah RPTP- $\alpha$ , LAR, dan LCA (Goldstein, 2000).

Pada penelitian mengenai regulasi reseptor insulin, reseptor insulin *in vitro* yang telah dimurnikan ternyata tidak dapat terdefosforilasi secara otomatis dan tetap mempertahankan keadaan autofosforilasi meskipun insulin sudah dihilangkan dari tempat ikatan. Lain halnya dengan studi *in situ*, menggunakan sel yang utuh atau terpermeabilisasi dengan baik, disosiasi insulin dari reseptor segera diikuti dengan defosforilasi subunit  $\beta$  dan secara bersamaan menyebabkan deaktivasi reseptor kinase. Di sini ditunjukkan bahwa PTPase seluler memiliki fungsi penting dalam regulasi aksi insulin, dengan jalan mendefosforilasi dan menginaktivasi reseptor kinase dengan tujuan untuk menyeimbangkan dan menghentikan *insulin signaling*. Pada keadaan resistensi insulin, aktivitas PTPase menunjukkan peningkatan, sehingga *insulin signaling* berhenti lebih cepat dan menyebabkan keadaan *diabetes mellitus* (Goldstein, 2000).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, PTPase yang terlibat dalam proses *insulin signaling* adalah PTP1B. Tikus yang mengalami defisiensi PTP1B mengalami peningkatan aktivitas insulin sehingga dapat dikatakan bahwa PTP1B merupakan *negative regulator* untuk *insulin signaling* (Asante-Appiah & Kennedy, 2003; Galic *et al*, 2004).



Gambar 2.8 Peran *tyrosine phosphatase* pada proses *insulin signaling*

## 2.5 Bahan penginduksi terjadinya *diabetes mellitus*

Aloksan dan streptozotocin merupakan dua bahan yang banyak digunakan untuk menginduksi *diabetes mellitus* pada hewan coba. Aloksan dan streptozotocin menginduksi diabetes melalui perusakan secara spesifik pada sel  $\beta$  pankreas. Sifat sitotoksik ini disebabkan oleh pembentukan spesies oksigen yang reaktif, baik oleh aloksan maupun streptozotocin.

Aloksan diberikan secara parenteral dan biasanya digunakan untuk membuat model *diabetes mellitus* tipe 1 pada hewan coba. Di dalam tubuh, aloksan akan secara cepat masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas untuk kemudian direduksi. Hasil reduksinya adalah asam dialurat yang kemudian akan dioksidasi kembali menjadi aloksan dalam suatu siklus redoks dan membentuk radikal superoksida. Radikal superoksida ini dapat membebaskan ion  $\text{Fe}^{3+}$  dari ferritin dan mereduksi ion tersebut menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ . Selain itu, radikal tersebut juga dapat diubah menjadi hidrogen peroksida. Dengan adanya  $\text{Fe}^{2+}$  dan hidrogen peroksida, akan terbentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif (Szkudelski, 2001).

Aloksan dapat mengoksidasi berbagai komponen dalam sel yang memiliki gugus  $-\text{SH}$ , termasuk gugus  $-\text{SH}$  yang dimiliki oleh glukokinase sehingga enzim ini menjadi terhambat aktivitasnya. Aloksan juga mampu meningkatkan pemasukan  $\text{Ca}^{2+}$  dari ekstraselular ke intraselular, sehingga keseimbangan kalsium

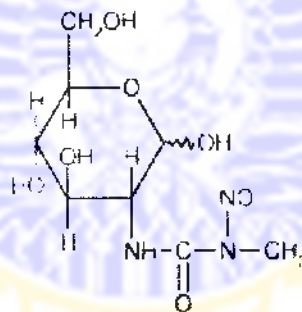


intraseluler akan terganggu dan terjadi pelepasan insulin dari sel  $\beta$  pankreas secara besar-besaran (Szkudelski, 2001).

Proses-proses di atas yaitu oksidasi gugus  $-SH$ , hambatan aktivitas glukokinase, pembentukan radikal bebas, dan gangguan keseimbangan kalsium intraselular merupakan penyebab efek toksik aloksan pada sel  $\beta$  pankreas yang pada akhirnya menimbulkan *diabetes mellitus*.

Streptozotocin (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) disintesis oleh *Streptomyces achromogenes* dan juga digunakan untuk menginduksi diabetes pada hewan coba (Szkudelski, 2001).

Streptozotocin memiliki efek diabetogenik poten pada beberapa spesies binatang termasuk mencit, tikus, anjing, dan ker. Diabetes yang dipicu oleh streptozotocin pada binatang bersifat ireversibel dan mewakili *diabetes mellitus* tipe 2 pada manusia (McEvoy, 2002).



Gambar 2.9 Streptozotocin

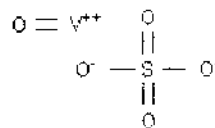
Streptozotocin masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas melalui *glucose transporter*

2. Streptozotocin bukan merupakan donor *nitric oxide* (NO) spontan tetapi harus dimetabolisme dahulu di dalam sel sehingga dapat melepaskan molekul NO yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan DNA sel  $\beta$  pankreas. Akan tetapi, beberapa penelitian menunjukkan adanya penyebab yang lain di samping NO, yaitu pembentukan spesies oksigen yang reaktif. *Anion superoxide* dihasilkan dari aksi streptozotocin pada mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Streptozotocin menghambat siklus Krebs sehingga mengurangi konsumsi oksigen mitokondria yang selanjutnya membatasi produksi ATP. Peningkatan defosforilasi

ATP menyebabkan peningkatan substrat bagi xantin oksidase sehingga meningkatkan produksi asam urat. Kemudian, xantin oksidase akan mengkatalisa suatu reaksi yang menghasilkan *anion superoxide* dan sebagai akibat dari pembentukan *anion superoxide*, akan terbentuk radikal hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Szkudelski, 2001).

Perusakan DNA sel  $\beta$  pankreas yang diinduksi oleh streptozotocin mengaktivasi poli ADP-ribosilasi. Proses ini menyebabkan pengurangan  $\text{NAD}^+$  intrasel secara drastis, penurunan jumlah ATP, dan kemudian diikuti oleh hambatan sintesis dan sekresi insulin. Dosis streptozotocin yang lazim digunakan untuk menginduksi diabetes tipe 2 adalah sebesar 40 – 100 mg/kg (Szkudelski, 2001). Penelitian sebelumnya menunjukkan dosis tunggal streptozotocin 75 mg/kg belum cukup untuk menginduksi diabetes tipe 2 pada mencit setelah tujuh hari, dan ditambahkan dosis kedua streptozotocin sebesar 50 mg/kg. Hal ini disebabkan karena perbedaan lingkungan dan genetik hewan coba yang digunakan (Arijanto, 2006). Streptozotocin stabil pada pH 4,0 dan terdegradasi cepat pada pH yang lebih asam atau lebih basa daripada pH stabilitasnya. Untuk pemberian intravena pada tikus, streptozotocin dilarutkan dalam dapar sitrat dingin dengan pH 4.5 (Anonim, 1997). Pada penelitian sebelumnya digunakan induksi diabetes pada mencit dengan rute intraperitoneal (Arijanto, 2006).

## 2.6 Vanadil sulfat

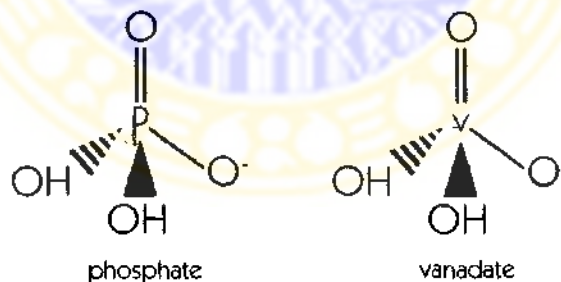


Gambar 2.10 Vanadil sulfat

Vanadil sulfat adalah senyawa garam inorganik dari vanadium. Vanadium merupakan *trace element* dan ditemukan dalam konsentrasi rendah pada jaringan mamalia (Tsiani *et al*, 1998). Vanadium termasuk logam transisi pada golongan VB dan memiliki beberapa macam valensi, yaitu -3, -1, 0, +1, +2, +3, +4, dan +5. Pada sistem biologis, vanadium banyak ditemukan dalam bentuk vanadil (+4) dan vanadat (+5). Sekitar 90% vanadium yang terdapat dalam plasma akan terikat pada protein, terutama transferrin. Vanadium yang diberikan secara oral

ditransformasi menjadi  $VO^{+2}$  di saluran pencernaan dan tetap berada dalam bentuk tersebut sampai melewati duodenum. Setelah pemberian secara intraperitoneal, vanadium akan didistribusikan ginjal, hati, dan terbanyak di tulang (Cadene *et al*, 1996; Verma *et al*, 1998; PDR health, 1999).

Pada penelitian mengenai efek vanadium secara *in vivo* menunjukkan bahwa vanadium mampu memperbaiki keadaan resistensi insulin. Pemberian vanadium secara kronik juga mampu memperbaiki abnormalitas enzim yang digunakan untuk proses glikolisis, misalnya enzim glukokinase. Secara *in vitro* vanadium mempengaruhi berbagai aspek yang berperan dalam jalur *insulin signaling*, antara lain adalah menstimulasi autofosforilasi reseptor insulin, meningkatkan aktivitas *tyrosine kinase*, dan meningkatkan ikatan reseptor insulin. Efek menyerupai insulin yang dimiliki oleh vanadium berkaitan dengan mekanismenya yang berperan sebagai analog fosfat yang dapat menghambat *tyrosine phosphatase* sehingga terjadi stimulasi fosforilasi *tyrosine*. Hal ini menyebabkan *insulin signaling* bertahan lebih lama dan terjadi penurunan kadar glukosa darah (Verma *et al*, 1998; Anonim, 1999).



Gambar 2.11 Struktur kimia fosfat dan vanadat (Huyer *et al*, 1997)

Selama ini, vanadil sulfat banyak digunakan dalam sediaan suplemen makanan. Dosis yang digunakan bervariasi antara 10  $\mu\text{g}$  sampai dengan 10 mg per hari (Anonim, 1999). Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa dosis optimum untuk menurunkan glukosa darah pada mencit dengan diabetes tipe 2 yang diinduksi streptozotocin adalah 30 mg/kg BB (Arijanto, 2006).

## 2.7. Histologi Jaringan Otot dan Adipose

Histologi termasuk ilmu anatomi mikroskopi, mencakup bidang ilmu yang mempelajari tentang struktur dan fungsi sel, jaringan, dan organ. Pengetahuan mengenai kondisi normal dibutuhkan untuk mempelajari keadaan abnormal yang menyangkut perubahan struktur dan fungsi tubuh, termasuk organ, jaringan, dan sel yang ada di dalamnya oleh adanya patogen (Leeson & Leeson, 1970).

Dalam proses pembelajaran mengenai histologi, terdapat dua hal penting berkaitan dengan metodologi, yaitu jenis mikroskop yang digunakan dan preparasi jaringan atau organ agar dapat menampilkan hasil yang tepat dan sesuai dengan mikroskop tertentu. Untuk pengamatan dengan mikroskop cahaya terdapat bermacam-macam jenis reagen yang dapat menimbulkan reaksi warna dengan potongan jaringan tergantung dari sifat dan jenis bahan yang akan diamati. Reagen merupakan senyawa garam netral yang dapat menghasilkan radikal asam atau radikal basa dan menunjukkan warna bila bereaksi dengan bahan dalam potongan jaringan. Reagen digolongkan berdasarkan sifat radikal yang dihasilkannya menjadi pewarna asam atau pewarna basa. Reaksi antara reagen dan bahan yang akan diwarnai terjadi berdasarkan afinitas kimia, reaksi oksidasi, dan afinitas fisika (Leeson & Leeson, 1970).

Lemak dapat dideteksi dengan pewarna Sudan III, Sudan IV, dan Sudan Black B melalui adsorpsi reagen pada permukaan lemak. Dengan pewarnaan Sudan Black, sel-sel lemak berwarna biru hingga hitam dan nukleus berwarna merah. Sudan Black adalah pewarna yang agak basa dan akan mengikat gugus asam pada lemak, sehingga juga dapat memberikan warna pada fosfolipid (Leeson & Leeson, 1970; Klatt, 2006). Sedangkan glikogen paling baik direaksikan dengan pewarnaan *periodic acid Schiff* (PAS). Glikogen terdapat pada kulit, hati, kelenjar paratiroid, otot skelet dan jantung. Pewarnaan PAS digunakan untuk menunjukkan membran basal dan pewarnaan rutin pada biopsi hati dan ginjal. Dengan reagen ini, glikogen berwarna magenta dan nukleus berwarna biru. Pewarnaan PAS adalah reaksi histokimia dimana *periodic acid* mengoksidasi ikatan karbon-karbon dan membentuk aldehid yang bereaksi dengan asam fuchsin-sulfur menghasilkan warna magenta (Klatt, 2006). Hasil penelitian secara histologis harus dapat menggambarkan struktur sel tiga dimensi dari potongan dua



dimensi, atau diinterpretasikan pada keadaan atau fungsi sel tersebut, karena itu perlu diketahui keadaan jaringan otot dan lemak normal (Leeson & Leeson, 1970).

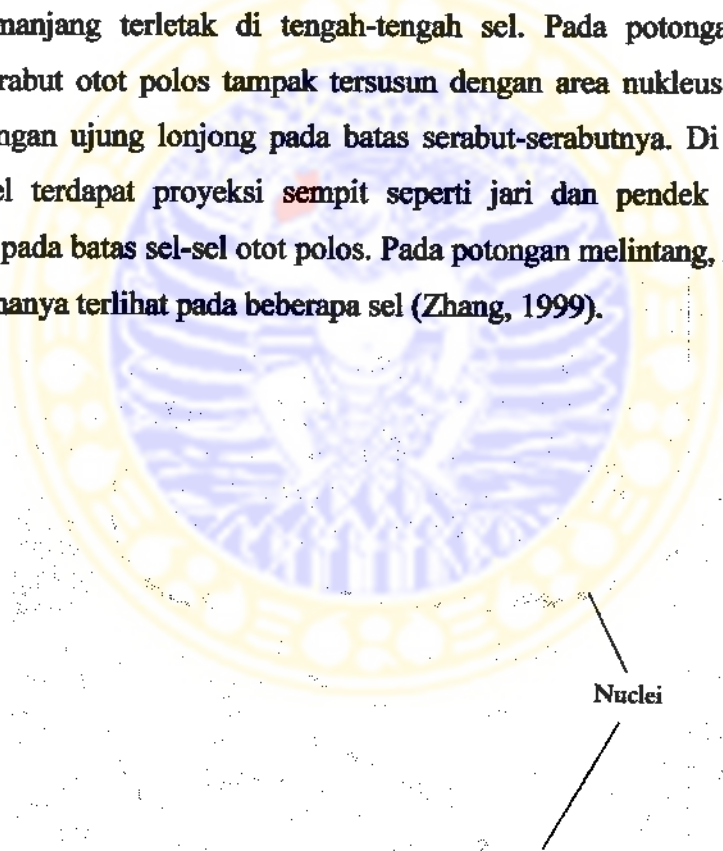
Menurut teori, rangsangan patologis dapat mencapai sel dan jaringan melalui berbagai cara, yaitu secara langsung misalnya trauma dan radiasi, melalui aliran darah atau limfe yang langsung menciderai sel misalnya toksin, secara tidak langsung bila rangsangan bekerja pada dinding pembuluh darah, kemudian gangguan sirkulasi sekunder menyebabkan kerusakan sel, misalnya pada gangguan permeabilitas saraf, rangsangan patologis yang berasal dari saluran seperti saluran pencernaan serta cacat metabolisme primer yang dapat menyebabkan reaksi sel sekunder (Thomas *et al*, 1988).

### 2.7.1. Jaringan otot

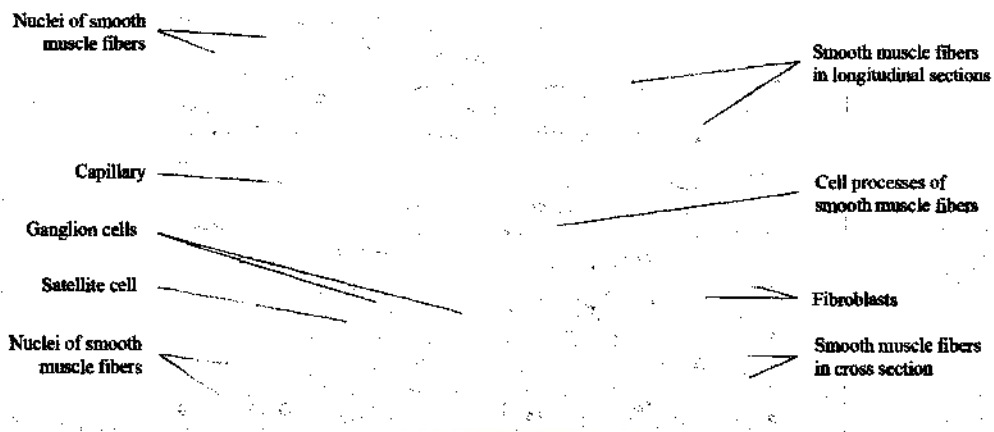
Jaringan otot tersusun atas sel-sel yang dapat berkontraksi dan berelaksasi, yang sering disebut serabut-serabut otot. Setiap serabut otot mengandung sejumlah struktur seperti benang yang dapat diperpanjang, disebut myofibril, yang tersusun atas protein-protein kontraktile dan merupakan unit terkecil dari kontraksi. Pada jaringan otot, serabut-serabut otot biasanya tersusun dalam ikatan-ikatan, dengan ujung memanjang sejajar satu sama lain. Jaringan otot mendapat makanan dari pembuluh-pembuluh kapiler dan ujung-ujung saraf yang meneruskan rangsangan dari dan menuju sistem saraf pusat (Zhang, 1999). Jaringan otot berfungsi untuk pergerakan tubuh secara menyeluruh atau per bagian dalam hubungannya dengan jaringan otot lainnya. Sel-sel otot bekerja secara mekanik, karena itu memerlukan aliran darah yang kaya nutrisi dan oksigen untuk mengeliminasi produk-produk buangan atau toksin. Pembuluh darah berada pada jaringan penghubung antar serabut yang juga berfungsi untuk melekatkan serabut-serabut otot. Jaringan otot diklasifikasikan menjadi tiga jenis, yaitu otot polos, otot bergaris, dan otot jantung (Leeson & Leeson, 1970).

Otot polos terdiri atas kumpulan sel-sel otot *fusiform* berbentuk gelendong yang tidak menunjukkan garis-garis apapun di bawah mikroskop cahaya. Sel-sel tersebut membentuk komponen otot pada dinding organ dalam dan berada pada organ berongga seperti saluran pencernaan, pembuluh darah, saluran limfe, sistem respirasi, sistem urinari, sistem reproduksi, dermis, iris dan badan silinder pada

mata. Otot polos diinervasi oleh serabut saraf otonom, baik simpatis maupun parasimpatis. Serabut otot polos dapat juga berfungsi sebagai unit kontraktile tunggal, seperti sel myoepitel di sekeliling unit sekretori pada kelenjar-kelenjar eksokrin. Sifat kontraksinya terus menerus, pelan dan involunter. Otot polos memungkinkan organ-organ berkontraksi dengan ritme tertentu dan berbentuk ombak dalam waktu yang lama tanpa merasa lelah, contohnya kontraksi ritmis terus menerus dari otot polos pada saluran pencernaan yang menggerakkan isinya sepanjang lumen usus (Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999). Serabut tunggal otot polos berukuran panjang 20 – 500  $\mu\text{m}$  dan lebar 5 – 10  $\mu\text{m}$ , dengan nukleus bulat memanjang terletak di tengah-tengah sel. Pada potongan longitudinal, serabut-serabut otot polos tampak tersusun dengan area nukleus dalam satu sel sejajar dengan ujung lonjong pada batas serabut-serabutnya. Di antara serabut-serabut sel terdapat proyeksi sempit seperti jari dan pendek yang membuat hubungan pada batas sel-sel otot polos. Pada potongan melintang, nukleus tampak bulat dan hanya terlihat pada beberapa sel (Zhang, 1999).



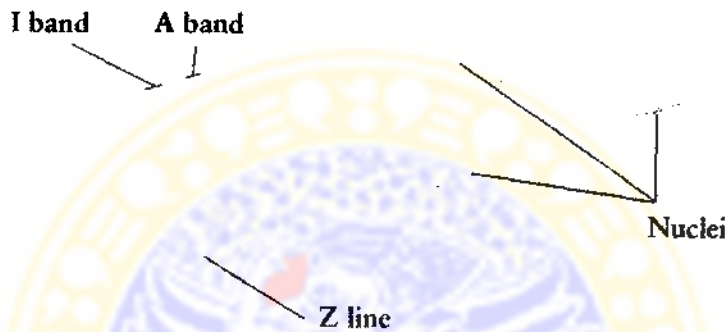
**Gambar 2.12 Hasil isolasi serabut otot polos normal pada usus marmot, tanpa pewarnaan (Zhang, 1999)**



Gambar 2.13 Jaringan otot polos normal pada apendiks manusia, pewarnaan *hematoxylin-eosin* (Zhang, 1999)

Otot bergaris atau otot skelet terdiri atas kumpulan sel-sel otot yang dapat memanjang, silindris dan memiliki banyak nukleus, serta menunjukkan garis-garis melintang yang menonjol. Otot skelet melekat pada tulang dan membentuk daging pada tungkai, lengan, dan dinding tubuh. Bertanggungjawab atas pergerakan rangka serta organ-organ seperti lidah dan bola mata. Kontraksinya dikontrol oleh keinginan atau kesadaran, karena itu berlangsung cepat dan penuh tenaga (Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999). Sel-selnya berukuran panjang 1 – 40 mm dan lebar 10 – 100 mm. Satu serabut dapat mengandung beberapa ratus nukleus bulat panjang yang terletak di tepi sel. Pada sel otot dewasa, nukleus bergerak ke tepi dan berada tidak terlalu dalam di sarkolema. Hampir seluruh sarkolema diisi oleh myofibril dan sarkomer. Mitokondria, cadangan glikogen, dan droplet lemak juga terdapat sangat banyak di sarkolema dan menyediakan energi untuk kontraksi (McKenzie & Klein, 2000; Zhang, 1999). Pada perbesaran tinggi di bawah mikroskop cahaya, tampak garis-garis yang berbeda, yaitu pita-pita terang dan gelap. Pita-pita gelap disebut pita-pita A yang bersifat anisotropik dan pita-pita terang disebut pita-pita I yang bersifat isotropik. Di tengah masing-masing pita I terdapat garis gelap yang sejajar dengan pita A dan I disebut pita Z. Jarak antara dua garis Z disebut satu sarkomer, yang merupakan unit struktural dan fungsional dari alat kontraktile otot. Serabut-serabut tunggal terbungkus oleh lapisan tipis jaringan penghubung yang lembut disebut endomisium, tersusun atas campuran serabut kolagen, serabut elastis dan fibroblas. Di antara serabut-serabut otot

terdapat banyak pembuluh kapiler dan beberapa serabut saraf. Otot skelet diinervasi oleh saraf motorik besar melalui *neuromuscular junctions*, yaitu *motor end plate*. Pada potongan melintang tampak nukleus yang berada pada tepi dan pada potongan longitudinal tampak garis-garis melintang (Zhang, 1999).



Gambar 2.14 Hasil isolasi otot skelet marmot normal, tanpa pewarnaan (Zhang, 1999)



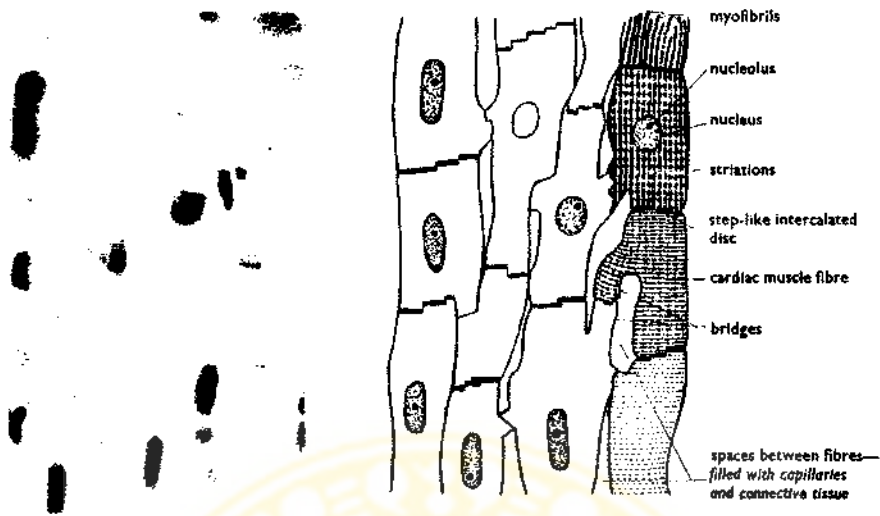
Gambar 2.15 Otot skelet normal pada lidah manusia, pewarnaan *hematoxylin-eosin* (Zhang, 1999)

Otot-otot skelet dapat dipengaruhi oleh kondisi umum suatu penyakit atau dipengaruhi secara bebas. Pada kedua kondisi tersebut, hasilnya adalah degenerasi serabut otot itu sendiri atau keterlibatan sekunder otot akibat perkembangan penyakit utama pada jaringan interstisial. Dalam kasus penyakit degenerasi otot primer, terjadi perubahan degenerasi akut dan mengarah pada proses nekrosis sel



otot. Pengecilan ukuran serabut otot sering menunjukkan tahap awal dari degenerasi otot, seperti yang terjadi pada kelainan sistemik, misalnya degenerasi progresif sel-sel otot perut pada demam tifoid (Braunstein *et al*, 1987). Perubahan awal proses degenerasi sel otot yang paling sering dijumpai adalah *waxy degeneration*, mengarah pada disolusi protein serabut-serabut dan garis-garis melintang pada otot. Secara bertahap, seiring terjadinya degenerasi nukleus, gumpalan-gumpalan agregat tampak, dan setelah sarkoplasma terpisah dan hilang, hanya tertinggal membran sarkolema kosong. Kelompok nukleus tampak berada di tengah, mengindikasikan aktivitas regenerasi (Thomas *et al*, 1984).

Otot jantung terbentuk dari sel-sel silindris dan bercabang, yang juga menunjukkan garis-garis melintang, membentuk dinding jantung dan melebar hingga vena-vena besar yang menuju jantung. Kontraksi otot jantung berirama, otomatis, dan tidak dipengaruhi kesadaran (Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999). Serabut-serabut otot berbentuk silinder, memiliki panjang rata-rata 100 – 150  $\mu\text{m}$  dan lebar 15 – 30  $\mu\text{m}$ . Satu serabut otot memiliki satu atau dua nukleus bulat atau memanjang yang terletak di tengah. Di sekitar nukleus terdapat area *fusiform* dari sarkoplasma yang mengandung banyak organel. Garis-garis melintang tampak kurang jelas dibandingkan dengan serabut-serabut otot skelet. Otot jantung bercabang, terbagi dalam dua cabang dan berhubungan membentuk jaringan tiga dimensi yang kompleks menjadi myokardium. Serabut-serabut otot termasuk cabang-cabangnya terhubung pada bagian ujung, dengan area penghubung yang jelas ditandai dengan *intercalated disc* yang berbentuk seperti jalan serapak. Di antara serabut-serabut otot terdapat selapis jaringan penghubung tersusun atas serabut kolagen, serabut retikuler, pembuluh darah dan fibroblas. Terdapat serabut Purkinje di bawah lapisan subendotel dari endokardium. Serabut tersebut adalah serabut-serabut otot jantung yang berspesialisasi dan termasuk dalam sistem konduksi impuls dari jantung. Sebagai serabut otot jantung, serabut-serabut Purkinje mengandung garis-garis melintang dan *intercalated discs*, tetapi berukuran lebih besar dan lebih tebal dibandingkan dengan serabut otot jantung lainnya dan mempunyai sangat sedikit myofibril dan lebih banyak sarkoplasma sentral (Zhang, 1999).



Gambar 2.16 Otot normal ventrikel jantung manusia, perbesaran 1100x (Freeman *et al*, 1987)

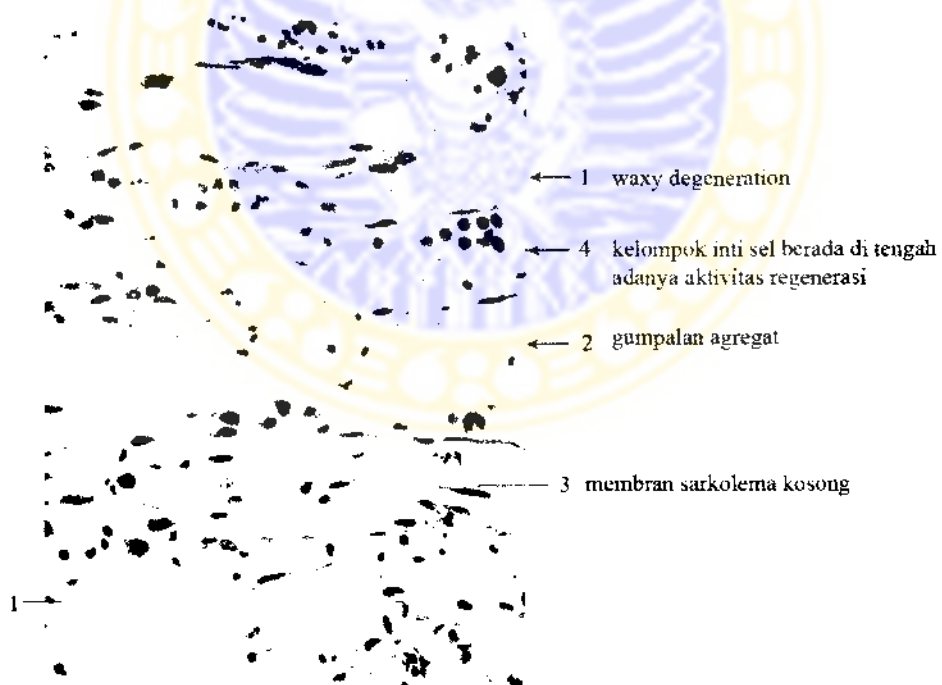
Karena otot polos dan otot jantung tidak banyak dipengaruhi pada keadaan patologis secara umum, maka digunakan otot skelet yang berada pada tungkai menciit. Diagnostik morfologi penyakit-penyakit otot kebanyakan didapatkan pada potongan melintang. Pada diagnosis histologi-histokimia, pada preparat otot diperhatikan perbandingan bagian serabut otot terhadap jaringan ikat, variasi penampang irisan serabut otot, jumlah dan letak nukleus serabut otot, adanya nekrosis serabut tunggal, tampilnya atropi serabut otot di kelompok khusus atau perivasikular, tampilnya infiltrat radang dan hubungannya ke pembuluh darah otot serta anomali etiologi, misalnya massa basofil, vakuolisasi serabut otot, anomali reaksi histokimia, susunan miofibril tidak normal, dominasi suatu jenis serabut, kelompok jenis, ketak-sembarangan jenis, penimbunan substrat (glikogen dan lemak netral) (Thomas *et al*, 1988).

Terdapat tujuh jenis miopati berdasarkan penyebabnya, yaitu atropi neurogen, distropi otot progresif, distropi miotonik, miopati karena metabolisme, miopati struktur, miositida dan miopati toksika. Pada miopati karena metabolisme, penyebab utamanya ialah kekurangan enzim atau kekurangan substrat dengan gambaran histologi-histokimia berupa degenerasi vakuolar, penimbunan glikogen di serabut otot serta penimbunan lemak di serabut otot. Bentuk penyakit yang terjadi adalah kekurangan enzim  $\alpha$ -glikosidase dan fosforilase (Thomas *et al*, 1988). Enzim-enzim tersebut berperan dalam proses glikogenolisis

(Hardjasasmita, 2006), yang terdapat berlebih pada kondisi *diabetes mellitus*. Sehingga gambaran histologis seperti tersebut di atas diharapkan terjadi pada pemberian vanadil sulfat, di mana proses glikogenolisis tidak terjadi.



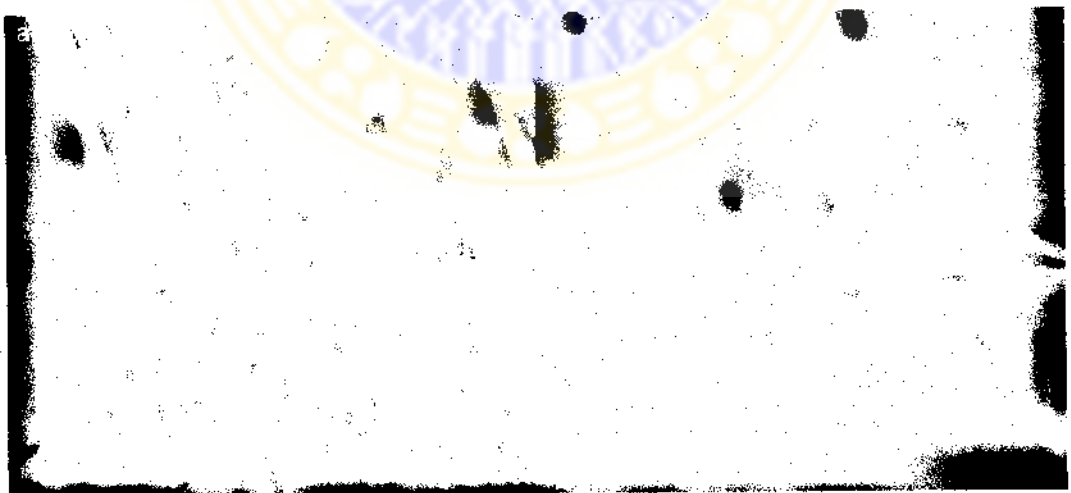
Gambar 2.17 Glikogen pada serabut otot skelet, pewarnaan *periodic acid Schiff*. Perbesaran 220x (Fiore *et al*, 1989)



Gambar 2.18 Perubahan awal nekrosis otot (*hematoxylin-eosin*, 200x) (Thomas *et al*, 1984)



**Gambar 2.19** Pewarnaan dengan *Hematoxylin-eosin* dari otot rectus femoris (tungkai belakang) a. Potongan melintang otot pada tikus normal, b. Potongan melintang otot tikus yang telah diinduksi dengan STZ, c. Potongan membujur otot tikus normal, d. Potongan membujur otot tikus yang telah diinduksi STZ (Perbesaran 400x) (Aughsteen *et al*, 2006)



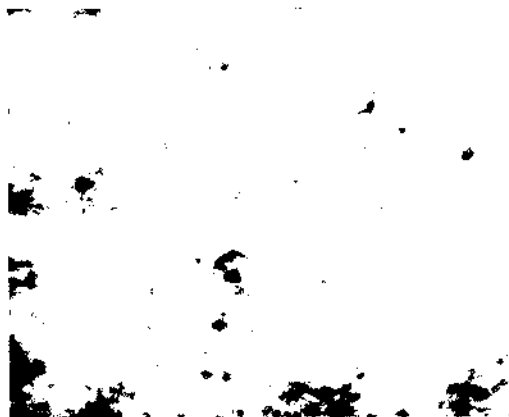
**Gambar 2.20** a. Potongan otot extensor digitorum longus dengan pewarnaan H&E pada tikus yang telah diinduksi STZ menunjukkan daerah dengan infiltrasi sel-sel inflamasi di antara serabut otot normal, b. Potongan otot rectus femoris dengan pewarnaan H&E pada tikus yang telah diinduksi STZ menunjukkan nekrosis serabut otot. (Perbesaran 400x) (Aughsteen *et al*, 2006)



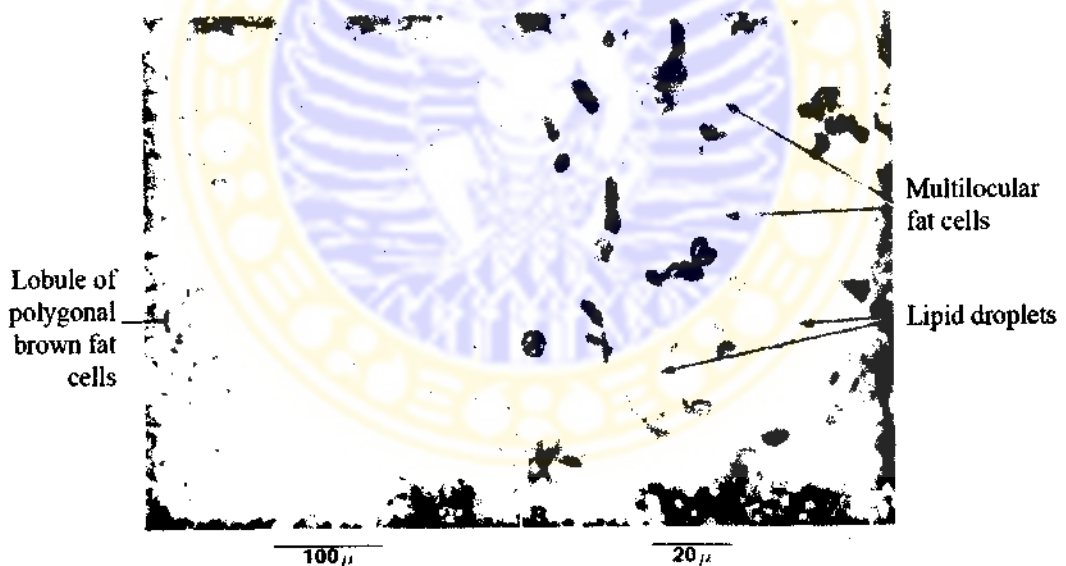
Gambar 2.21 Degenerasi sel-vakuolisasi sitoplasma. Terjadi saat homeostasis ion dan cairan terganggu, menghasilkan influks air. Vakuola biasanya kecil dan tersebar tetapi dapat juga ditemukan vakuola besar dan menggelembung. Pembengkakan nukleus dan sitoplasma yang disebabkan oleh imbibisi air sering menyebabkan warna sitoplasma dan nukleus lebih terang daripada sel-sel normal. Hapusan *renal pelvic*, perbesaran 1000x (Atkinson *et al*, 1992)

### 2.7.2. Jaringan adipose

Sel-sel lemak tersebar dalam jaringan penghubung yang tidak padat (*areolar connective tissue*). Bila sel-sel lemak tersebut bergabung dan membentuk tipe sel tertentu, maka jaringan tersebut disebut jaringan adipose. Setiap sel lemak dipisahkan oleh serabut relikula tipis. Terdapat dua jenis jaringan adipose, yaitu jaringan adipose coklat dan jaringan adipose putih (Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999).



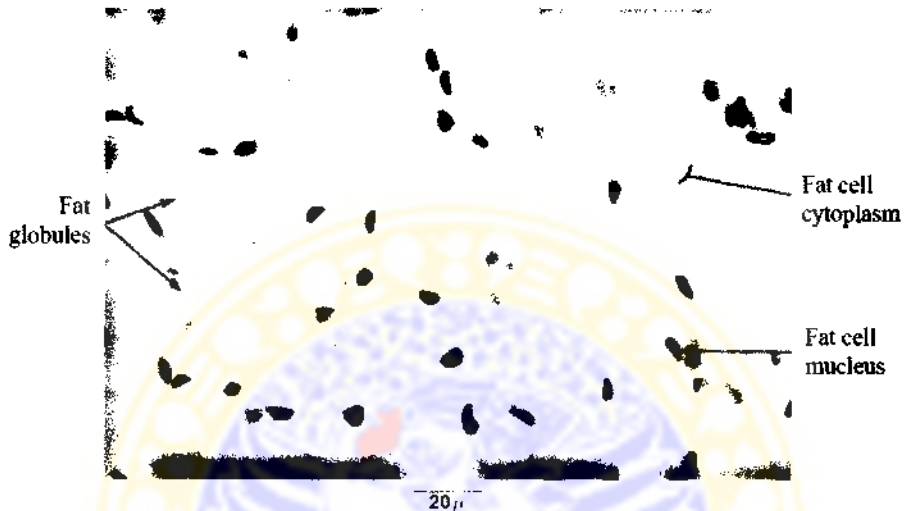
Jaringan adipose coklat dibedakan dari jaringan adipose putih karena organisasi lemak dan warnanya yang khas. Jaringan adipose coklat banyak terdapat pada mamalia yang berhibernasi. Pada manusia, jaringan ini terdapat pada fetus, tetapi hampir tidak ada pada usia dewasa. Jaringan ini terdistribusi utamanya pada bahu dan terdiri atas sel-sel lemak coklat yang tersusun rapat. Sitoplasmanya terdiri atas sejumlah tetes lemak dengan ukuran yang berbeda, karena itu jaringan ini disebut juga jaringan adipose multilokuler. Pada sitoplasma juga terdapat banyak mitokondria dan lisosom, yang memberikan warna coklat pada jaringan. Nukleusnya berbentuk bundar, terletak di tengah atau agak ke tepi. Di antara sel-sel adipose terdapat banyak kapiler. Pada hewan yang berhibernasi dan fetus manusia, jaringan adipose coklat menghasilkan panas untuk menjaga tubuh tetap hangat selama suhu dingin (Zhang, 1999).



Gambar 2.23 Jaringan adipose coklat normal pada monyet, dipreparasi dengan cairan Helly dan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Perbesaran A 162x dan B 612x (Bergman *et al*, 1974)

Jaringan adipose putih terdiri atas sel-sel adipose yang tersusun rapat. Masing-masing sel adipose terdiri atas satu tetes besar lemak, karena itu disebut unilokuler. Lemak terlarut oleh alkohol selama proses preparasi, meninggalkan vakuola-vakuola besar. Sel adiposit memiliki nukleus pipih dan sitoplasma seperti <sup>Skripsi</sup>lembaran, yang telah terdorong <sup>Bersifat</sup>menjadi <sup>lingkaran</sup> yang mengelilingi tetesan <sup>lingkaran</sup>minyak tersebut. Di antara sel-sel adipose terdapat kapiler-kapiler dan sejumlah

kecil jaringan penghubung dengan serabut tipis, yang dapat dilihat dengan impregnasi perak. Pada jaringan jenis ini, sel-sel adiposit biasanya terpisah dalam lobulus-lobulus oleh bagian jaringan penghubung yang mengandung pembuluh darah dan serabut-serabut saraf.



Gambar 2.24 Jaringan lemak putih normal pada manusia, dipreparasi dengan formalin 10% dan pewarnaan *hematoxylin eosin*. Perbesaran 612x (Bergman *et al*, 1974)

Lemak yang tersimpan dalam jaringan adipose dibentuk dari tiga cara melalui kerja insulin, yaitu dari karbohidrat, dari asupan lemak yang ada dalam makanan, dan dari asam lemak yang diproduksi oleh hati dan diambil oleh sel lemak dari darah berupa serum lipoprotein. Lemak dalam tubuh selalu mengalami pergantian yang lama dengan yang baru, dengan kata lain lemak berada dalam keadaan yang dinamis (Hardjasasmita, 2006), keseimbangan antara penyimpanan dan peruraian lemak dipengaruhi oleh hormon dan sistem saraf otonom. Hormon insulin menghambat lipase sehingga lipolisis tidak terjadi, sedangkan bila insulin kurang, misalnya pada keadaan diabetes, aktivitas hormon-hormon lain meningkat. Hormon-hormon tersebut menyebabkan terjadinya proses lipolisis dengan meningkatkan aktivitas adenilat siklase sehingga produksi cAMP pun meningkat, cAMP bersifat mengaktifkan enzim protein kinase, yaitu enzim yang mengaktifkan lipase. Jaringan adipose terdapat di seluruh tubuh kecuali kelopak mata, penis dan skrotum, dan secara khusus tertimbun di bawah kulit, di bawah perut, daerah peritoneal dan di sekeliling ginjal. Jaringan adipose putih yang

menyusun 20% berat badan pria dewasa normal dan 25% berat bada wanita normal ini berperan sebagai tempat penyimpanan dan sumber metabolik dari lemak netral, sebagai perlindungan terhadap syok mekanik dan pemisah untuk mencegah kehilangan atau penambahan panas yang berlebih melalui kulit (Hardjasasmita, 2006; Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999).

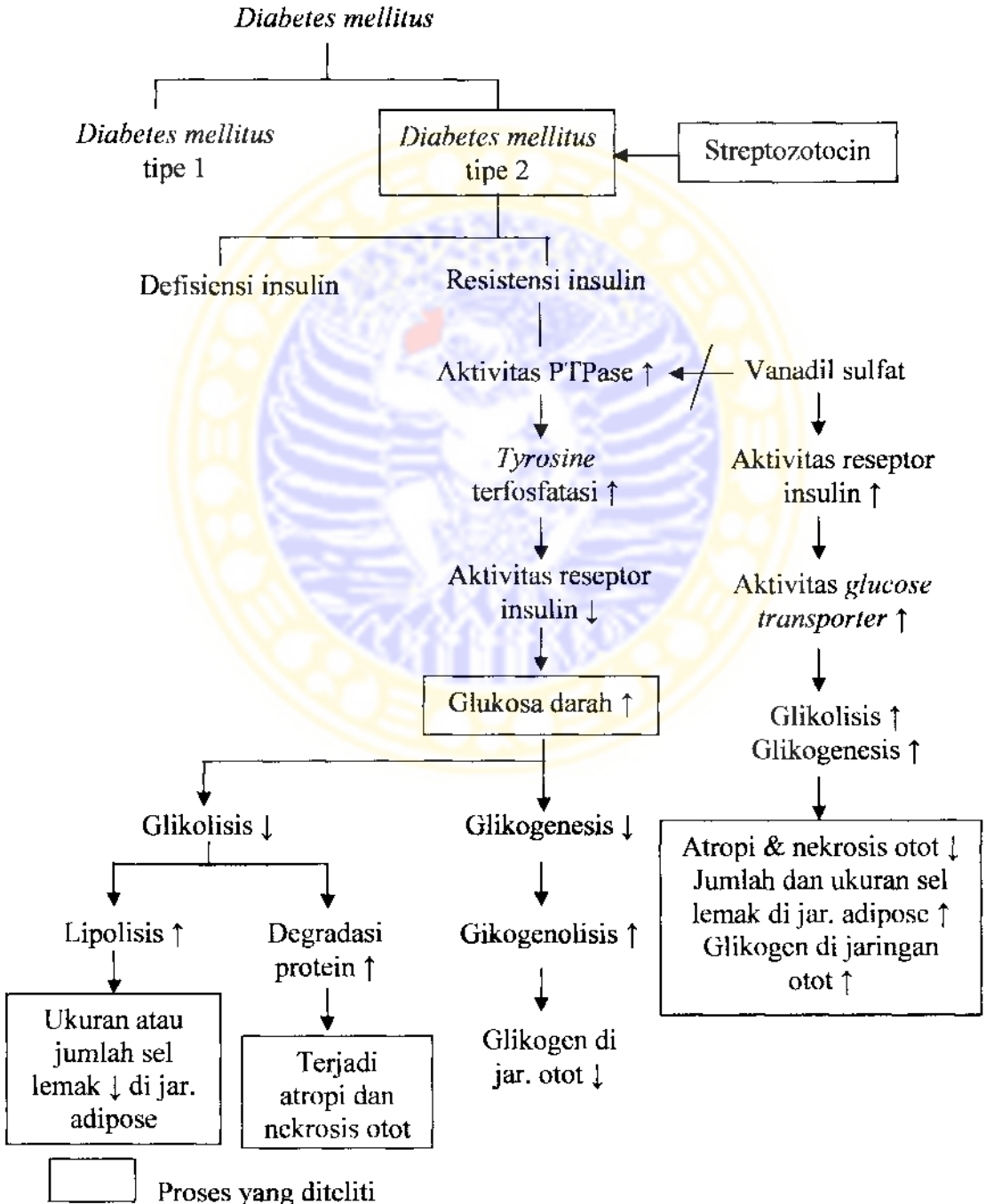




### BAB III

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka konseptual



Gambar 3.1. Diagram kerangka konseptual

*Diabetes mellitus* adalah suatu gangguan metabolik ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Dari seluruh kasus diabetes, 90% merupakan *Diabetes mellitus* tipe 2. Penyebab umumnya adalah resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif (Schwinghammer, 2003). Salah satu faktor penyebab utama resistensi insulin adalah adanya peningkatan pada aktivitas enzim *protein tyrosine phosphatase* (PTPase) dalam sel sehingga pemasukan glukosa ke dalam sel menjadi terganggu (Goldstein, 2000).

Secara fisiologis, terbentuknya kompleks insulin dengan insulin reseptor akan segera mengaktifasi *tyrosine kinase* yang ada pada sub unit  $\beta$ . Untuk dapat mengaktifasi aktivitas *tyrosine kinase* secara maksimal maka reseptor harus berada dalam keadaan tris-fosforilasi (PIP3). PIP3 kemudian menjadi substrat bagi PTPase, yang selanjutnya menyebabkan *tyrosine* terfosfatasi dan *insulin signaling* akan berhenti. Pada keadaan normal, fenomena ini penting untuk mempertahankan keseimbangan dan menghentikan *signaling pathway* sebagai akibat ikatan insulin dengan reseptornya sehingga hasil pembentukan glikogen dapat disimpan di dalam sel. Tetapi, pada keadaan resistensi insulin, terjadi peningkatan aktivitas PTPase. Karena aktivitas PTPase yang meningkat ini maka *insulin signaling* berlangsung lebih singkat dan tidak dapat memberikan efek metabolik, khususnya terhadap aktivitas *glucose transporter* untuk memasukkan glukosa ke dalam jaringan otot atau lemak serta metabolisme glukosa seperti glikolisis dan glikogenesis (Goldstein, 2000; Bowen, 2004). Pada saat reseptor insulin tidak aktif, massa sel dalam tubuh tidak mampu mengambil glukosa dari darah, dan mulai beralih untuk memecah glikogen dan membentuk energi dari jalur alternatif seperti pemecahan lemak dan protein (Bowen, 2004). Penggunaan glikogen sebagai sumber energi akan menurunkan kadar glikogen dalam jaringan otot dan adipose, lipolisis akan menyebabkan berkurangnya sel-sel lemak dalam jaringan adipose, dan degradasi protein akan menurunkan ukuran sel-sel otot (Braunstein *et al*, 1987). Hal ini ditunjukkan oleh hasil perbandingan berat badan mencit kelompok diabetes terhadap kelompok normal yang cenderung lebih rendah (Arijanto, 2006). Penghambatan terhadap aktivitas PTPase dengan menggunakan *tyrosine phosphatase inhibitor*, yaitu vanadil sulfat diharapkan

dapat mempertahankan aktivasi reseptor insulin dan *insulin signaling* sehingga efek aktivitas *glucose transporter*, glikolisis dan glikogenesis tetap terjadi. Dengan demikian, glikogen di jaringan otot meningkat ditandai dengan adanya penimbunan glikogen, dan terjadi pembesaran serabut otot dan penambahan sel lemak di jaringan adipose (Braunstein *et al*, 1987; Thomas *et al*, 1988).

### 3.2 Hipotesis penelitian

1. Terdapat perubahan pada jaringan otot menciit dari kondisi normal setelah induksi *diabetes mellitus* dengan streptozotocin serta pemberian *treatment* vanadil sulfat.
2. Terdapat perubahan pada jaringan adipose menciit dari kondisi normal setelah induksi *diabetes mellitus* dengan streptozotocin serta pemberian *treatment* vanadil sulfat.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan:

- Alat-alat gelas
- Jarum suntik 26G
- *Syringe* 1 ml
- Kandang mencit dan perlengkapannya
- Gunting bedah
- Neraca analitik
- *On Call Now Blood Glucose Monitoring System*
- Mikrotom
- Mikroskop cahaya dengan *digital camera*

#### **4.2 Bahan**

##### **4.2.1 Vanadil sulfat**

Pada penelitian ini digunakan vanadil sulfat yang diperoleh dari Fluka. Bahan ditambah CMC Na 0,6% kemudian diaduk sampai membentuk suspensi. Digunakan treatment vanadil sulfat dengan tiga dosis berbeda, yaitu 5, 30 dan 100 mg/kg BB.

##### **4.2.2 Streptozotocin**

Bahan ini digunakan untuk menginduksi binatang percobaan mencit agar menderita *diabetes mellitus* tipe 2. Streptozotocin yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sigma. Diberikan dosis tunggal Streptozotocin 100 mg/kg BB secara intraperitoneal.

##### **4.2.3 Dapar sitrat**

Dibuat dapar sitrat dengan pH 4,5 sebagai pelarut streptozotocin. Komposisi dapar sitrat adalah 55,05 mL larutan asam sitrat 0,1M dan 44,95 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M. Larutan streptozotocin dibuat segera sebelum digunakan.



#### **4.2.4 Carboxymethyl Cellulose Natrium (CMC Na)**

Bahan ini digunakan untuk membuat suspensi vanadil sulfat, konsentrasi CMC Na yang digunakan adalah 0,6%.

#### **4.2.5 Neutral Buffered Formalin**

Bahan ini digunakan untuk preparasi fiksasi potongan jaringan sebelum dilakukan pewarnaan, merupakan larutan hipotonik dengan konsentrasi 10%. Dapar formalin ini memiliki pH 6,8 dan terdiri atas  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4,0 gram,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,5 gram dan 37% formaldehid 100,0 mL dalam 900,0 mL aquadest.

#### **4.2.6 Periodic Acid Schiff**

Bahan ini digunakan untuk pewarnaan jaringan otot yang mengandung glikogen. Penggunaannya diikuti dengan pencucian dengan *counterstain Hematoxylin*. Pewarna PAS yang digunakan diperoleh dari Baxter, komposisinya terdiri atas *Periodic acid* 0,5 gram dalam 100,0 mL aquadest.

#### **4.2.7 Hematoxylin-eosin**

Bahan ini digunakan untuk melihat morfologi jaringan otot dan adipose. Digunakan *Hematoxylin* dari Baxter.

#### **4.2.8 Binatang percobaan**

Dalam penelitian ini digunakan mencit yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Universitas Airlangga, dengan kriteria sebagai berikut:

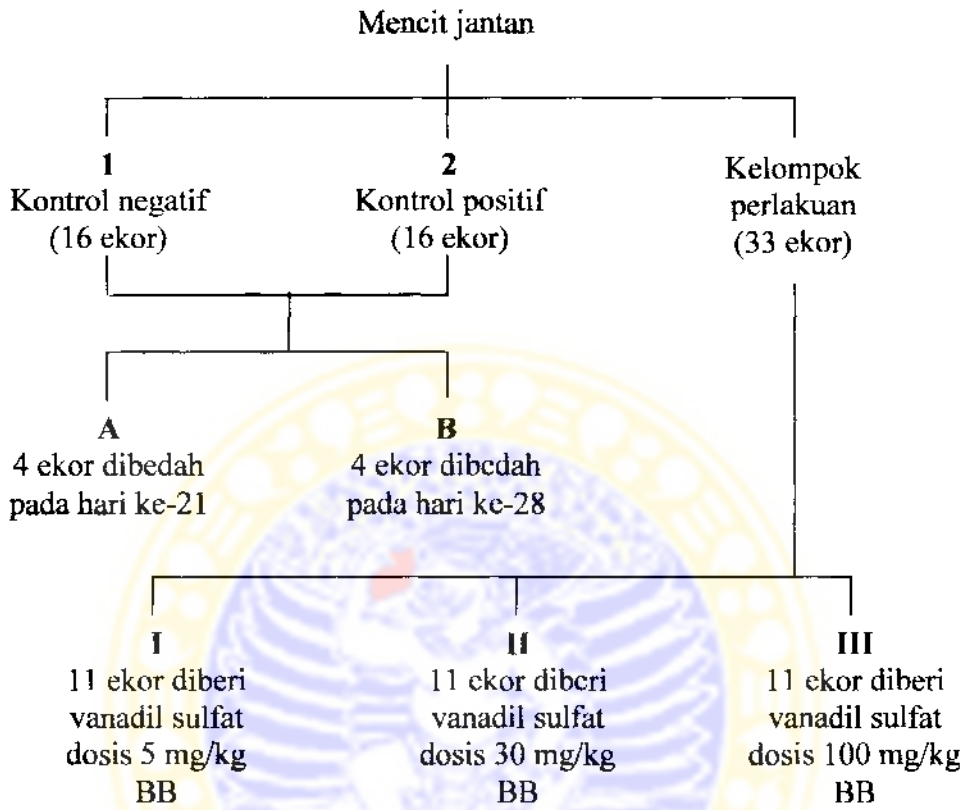
- berjenis kelamin jantan
- berasal dari satu galur (galur Balb-C)
- berumur 8 minggu
- berat badan 20 – 30 gram
- berada dalam keadaan sehat dan normal

### 4.3 Protokol penelitian

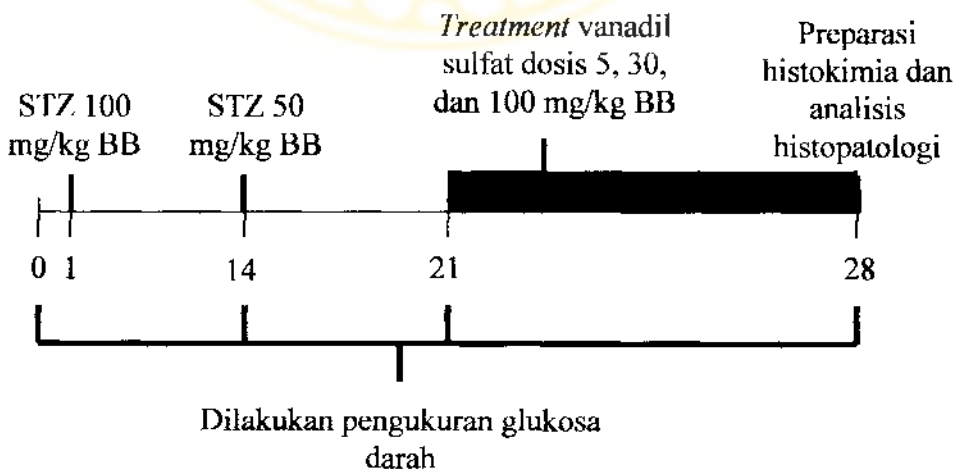
Mencit jantan berumur delapan minggu ditempatkan secara berkelompok dalam kandang dengan temperatur ruangan  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai jam enam pagi sampai jam enam malam). Selama penelitian, kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang berlebih. Pada hari pertama mencit diberikan injeksi streptozotocin 100 mg/kg dalam pembawa dapar sitrat secara intraperitoneal untuk menginduksi terjadinya *diabetes mellitus*. Pada hari ke-14, diberikan injeksi kedua streptozotocin dengan dosis 50 mg/kg. Pada hari ke-21, suspensi vanadil sulfat diberikan secara oral kepada kelompok perlakuan dengan dosis 5, 30, dan 100 mg/kg sekali sehari selama 7 (tujuh) hari. Glukosa darah dievaluasi pada hari ke-0, 14, 21 dan 28 untuk mengetahui efek induksi streptozotocin dan pemberian vanadil sulfat terhadap glukosa darah mencit. Sampel darah diambil melalui ekor dengan cara melukai ekor. Kadar glukosa darah diukur dengan menggunakan *On Call Now Blood Glucose Monitoring System*.

Pada hari ke-28, setelah pengukuran glukosa darah, dilakukan pembedahan dan pemotongan jaringan otot dan adipose tiap kelompok dengan mikrotom. Jaringan kemudian dipreparasi dengan melakukan fiksasi menggunakan *neutral buffered formalin*, setelah itu pemotongan dan pewarnaan secara histokimia akan dilakukan oleh laboratorium patologi anatomi RSUD Dr. Sutomo. Analisis dan pemotretan akan dilakukan dengan bantuan ahli patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan metode *blind test*.

**4.4 Pengelompokan hewan coba dan *timeline* kelompok perlakuan**

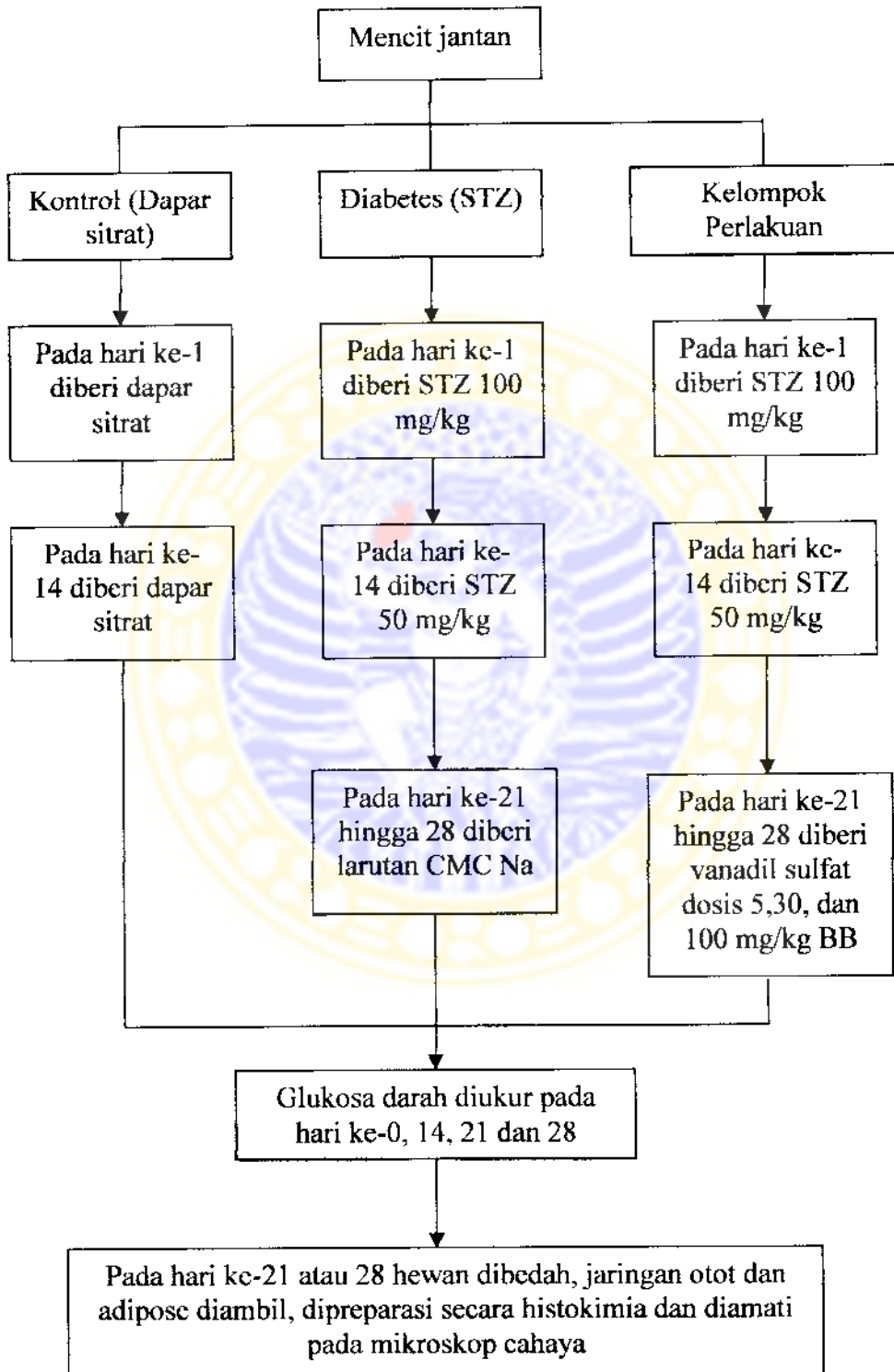


Gambar 4.1 Diagram pengelompokan hewan coba



Gambar 4.2 Diagram *timeline* kelompok perlakuan

#### 4.5 Kerangka operasional



Gambar 4.3 Diagram pengelompokan hewan coba dan perlakuan yang diberikan pada tiap kelompok



### I. Kelompok kontrol negatif

- Pada hari ke-1 mencit diberi injeksi dapar sitrat secara intraperitoneal
- Pada hari ke-14, mencit diberi injeksi dapar sitrat secara intraperitoneal
- 2 ekor mencit dibedah pada hari ke-28 dan dilakukan preparasi secara histokimia
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0,14, 21 dan 28

### II. Kelompok kontrol positif (diabetes)

- Pada hari ke-1 mencit diberi injeksi streptozotocin 100 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-14 mencit diberi injeksi streptozotocin 50 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-21, mencit diberi CMC Na 0,5% sekali sehari selama 7 hari secara per oral
- 2 ekor mencit dibedah pada hari ke-28 dan dilakukan preparasi secara histokimia
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14, 21 dan 28

### III. Kelompok perlakuan :

#### a) Perlakuan I

- Pada hari ke-1 mencit diberi injeksi streptozotocin 100 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-14 mencit diberi injeksi streptozotocin 50 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-21, mencit diberi suspensi vanadil sulfat 5 mg/kg BB sekali sehari selama 7 hari secara per oral
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0,14, 21 dan 28
- Pada hari ke-28 jaringan otot dan adipose diambil dan dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop

#### b) Perlakuan II

- Pada hari ke-1 mencit diberi injeksi streptozotocin 100 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-14 mencit diberi injeksi streptozotocin 50 mg/kg secara intraperitoneal

- Pada hari ke-21, mencit diberi suspensi vanadil sulfat 30 mg/kg BB sekali sehari selama 7 hari secara per oral
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0,14, 21 dan 28
- Pada hari ke-28 jaringan otot dan adipose diambil dan dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop

#### c) Perlakuan III

- Pada hari ke-1 mencit diberi injeksi streptozotocin 100 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-14 mencit diberi injeksi streptozotocin 50 mg/kg secara intraperitoneal
- Pada hari ke-21, mencit diberi suspensi vanadil sulfat 100 mg/kg BB sekali sehari selama 7 hari secara per oral
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0,14, 21 dan 28
- Pada hari ke-28 jaringan otot dan adipose diambil dan dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop

### 4.6 Preparasi histokimia jaringan otot dan jaringan adipose

Mencit yang akan diambil jaringannya diberi anestesi eter dan dibedah. Jaringan otot tungkai belakang dan jaringan adipose di bawah perut diambil, kemudian difiksasi dalam *neutral buffered formalin* 10%. Formalin diserap cukup baik oleh jaringan dalam waktu relatif lama, yaitu 1 – 4 jam. Dapar dalam formalin berfungsi mencegah pengasaman yang dapat menyebabkan autolisis dan presipitasi pigmen dalam jaringan. Setelah itu jaringan dicuci dengan *xylene*, direndam dalam parafin dan dipotong. Jaringan yang sudah dipotong harus segera diletakkan pada gelas obyek untuk dircaaksikan dengan pewarna.

Jaringan otot mencit yang telah diberi parafin dipotong dengan mikrotom setebal 4 – 5 $\mu$ m dan diletakkan pada gelas obyek. Gelas obyek diletakkan di tempat hangat selama 15 menit agar potongan jaringan lebih melekat pada gelas obyek. Tahap awal pewarnaan jaringan otot dengan *periodic acid Schiff* adalah proses deparafinasi (dihilangkan parafinnya), dilakukan dengan mengalirkan aquadest pada potongan jaringan. Setelah itu potongan jaringan direndam dalam asam periodat selama 5 menit dan dibilas dengan aquadest. Ditambahkan reagen

Schiff pada suhu kamar, dibiarkan selama 30 menit, kemudian dipanaskan dengan *microwave* tenaga tinggi selama 45 – 60 detik hingga berwarna magenta tua. Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit kemudian diberi *hematoxylin* sebagai *counterstain* selama 3 menit, dicuci dengan air, *hematoxylin* biru dan aquadest. Tahap terakhir adalah dehidrasi potongan jaringan dengan alkohol, dibersihkan dan ditutup dengan gelas penutup. Potongan jaringan otot mencit siap dianalisis. Pewarnaan periodic acid Schiff merupakan reaksi histokimia di mana asam periodat mengoksidasi ikatan karbon-karbon (C – C) membentuk aldehida yang kemudian bereaksi dengan asam sulfat-fuchsin yang membentuk warna magenta. Pada preparat akan tampak warna magenta yang menandakan adanya glikogen, sedangkan warna biru menunjukkan inti sel (Crookham & Dapson, 1991)

Untuk menganalisis morfologi jaringan otot maupun adipose dibutuhkan pewarnaan rutin menggunakan pereaksi *hematoxylin-eosin* (Fawcett, 2002). Potongan jaringan dialiri air, kemudian ditempatkan dalam *hematoxylin* selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir. Potongan tersebut kemudian diberi warna biru dengan cara direndam dalam litium karbonat dan dibilas dengan air mengalir. Setelah itu potongan diletakkan di dalam asam alcohol 1% untuk beberapa detik sebelum dibilas kembali dengan air mengalir dan direndam dalam eosin selama 5 menit. Setelah dibilas dengan air mengalir, didehidrasi dan dibersihkan, preparat siap digunakan. Hasil yang tampak adalah inti sel berwarna biru kehitaman, sitoplasma merah muda, serabut otot dengan warna merah muda gelap hingga merah tua, fibrin merah muda gelap dan sel darah merah tampak jingga atau merah tua (Lowe, 1997).

#### 4.7 Analisis preparat histokimia

Hasil pewarnaan jaringan diamati di bawah mikroskop dan diambil gambarnya. Dilakukan perbandingan antara kelompok kontrol (Dapar sitrat), diabetes (STZ) dengan kelompok diabetes yang diberi *treatment* vanadil sulfat dengan bantuan ahli patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, antara lain mengenai perubahan morfologis jaringan yaitu jumlah dan ukuran sel-sel lemak pada jaringan adipose bagian bawah perut mencit serta perubahan ukuran sel-sel otot skelet tungkai mencit.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

Penelitian mengenai pengaruh pemberian vanadil sulfat terhadap jaringan otot dan adipose mencit (*Mus musculus*) yang menderita *diabetes mellitus* telah dilakukan. Mencit jantan berumur 8 minggu sejumlah 65 ekor dibagi dalam 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok diabetes dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan vanadil sulfat dengan tiga dosis yang berbeda. Pada hari ke-1 diberikan injeksi streptozotocin 100 mg/kg dalam pembawa dapar sitrat dengan pH 4,5 secara intraperitoneal untuk menginduksi *diabetes mellitus*. Pada hari ke-21, diberikan injeksi kedua streptozotocin 50 mg/kg dalam pembawa dapar sitrat pH 4,5 secara intraperitoneal. Glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14 dan 21.

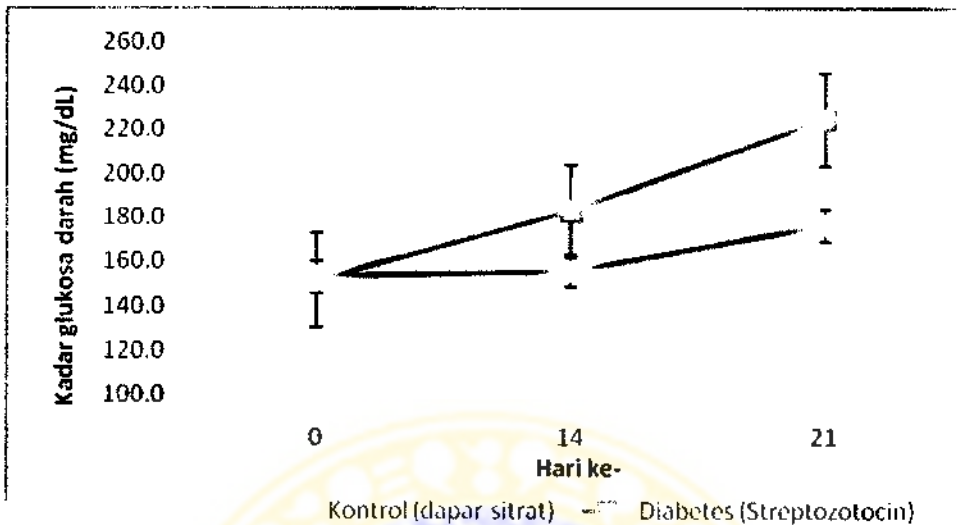
Perubahan kadar glukosa darah pada mencit yang diberi injeksi intraperitoneal streptozotocin 100 mg/kg dan 50 mg/kg tampak pada tabel V.1 dan gambar 5.1. Pada kelompok kontrol yang hanya mendapat injeksi intraperitoneal dapar sitrat pH 4,5 tidak menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa darah, sementara pada kelompok mencit yang mendapatkan injeksi streptozotocin tampak terjadi peningkatan glukosa darah acak rata-rata dari  $151,5 \pm 4,4$  mg/dL menjadi  $224,6 \pm 9,9$  mg/dL.

Tabel V.1 Kadar glukosa darah mencit setelah injeksi streptozotocin 100 mg/kg dilanjutkan 50 mg/kg.

Kelompok	Kadar glukosa darah hari ke- (mg/dL $\pm$ SE)		
	0	14	21
Kontrol (dapar sitrat)	$153,0 \pm 5,5$	$155,7 \pm 12,8$	$176,2 \pm 6,0$
Diabetes (STZ)	$151,5 \pm 4,4$	$182,8 \pm 10,0$	$224,6 \pm 9,9$

Secara statistik dengan Anova didapatkan bahwa injeksi streptozotocin meningkatkan kadar glukosa darah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ( $F_{(1,37)} = 5,332$ ;  $p = 0,023$ ).





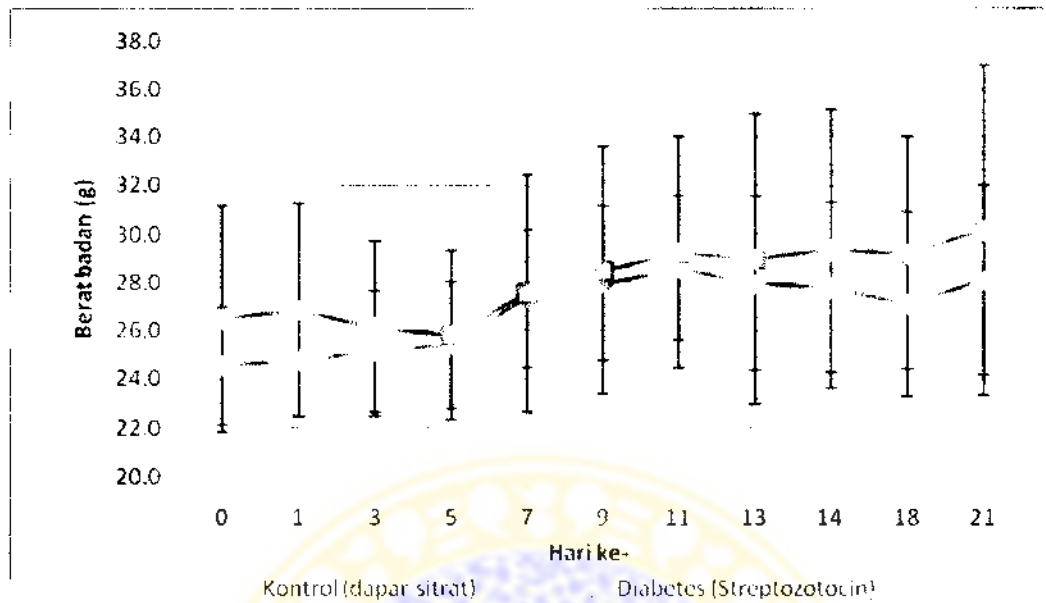
$F_{(1,37)} = 5,332; p = 0,023 (p < 0,05)$  dengan uji anova satu arah.

Gambar 5.1. Perkembangan kondisi *diabetes mellitus* pada mencit dengan parameter kadar glukosa darah

Untuk mengetahui pertumbuhan normal pada hewan coba akibat pemberian streptozotocin, diamati berat badannya selama perkembangan *diabetes mellitus* seperti terlihat pada tabel V.2 dan gambar 5.2.

Tabel V.2 Berat badan mencit setelah injeksi streptozotocin 100 mg/kg dilanjutkan 50 mg/kg.

Hari ke-	Berat badan mencit (g ± SD)	
	Kontrol (Dapar sitrat)	Diabetes (STZ)
0	24,6 ± 2,4	26,5 ± 4,7
1	24,8 ± 2,3	26,9 ± 4,4
3	25,1 ± 2,5	26,1 ± 3,6
5	25,4 ± 2,6	25,8 ± 3,5
7	27,3 ± 2,9	27,5 ± 4,9
9	28,0 ± 3,2	28,5 ± 5,1
11	28,6 ± 3,0	29,2 ± 4,8
13	28,0 ± 3,6	29,0 ± 6,0
14	27,8 ± 3,5	29,4 ± 5,8
18	27,1 ± 3,8	29,2 ± 4,8
21	28,1 ± 3,9	30,2 ± 6,8

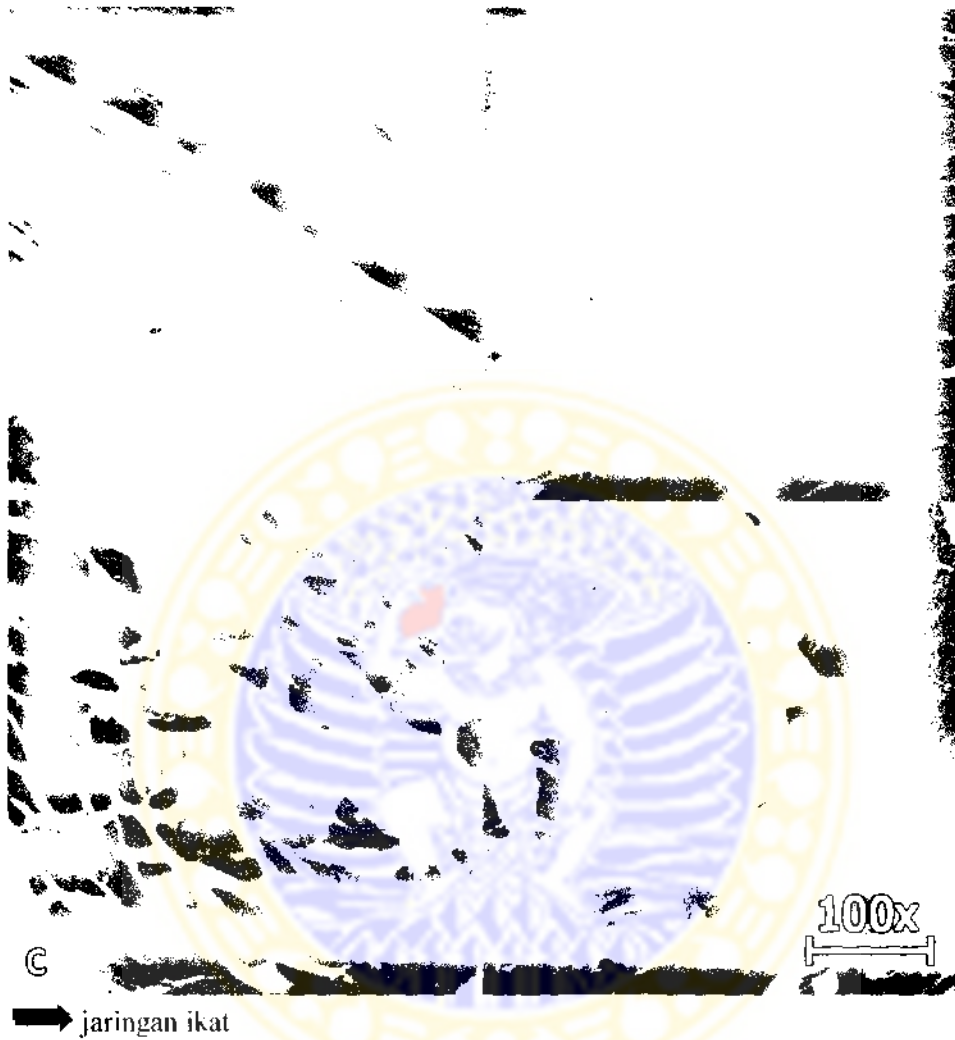


$F_{(1,37)} = 8,571, p = 0,004$  dengan uji anova satu arah.

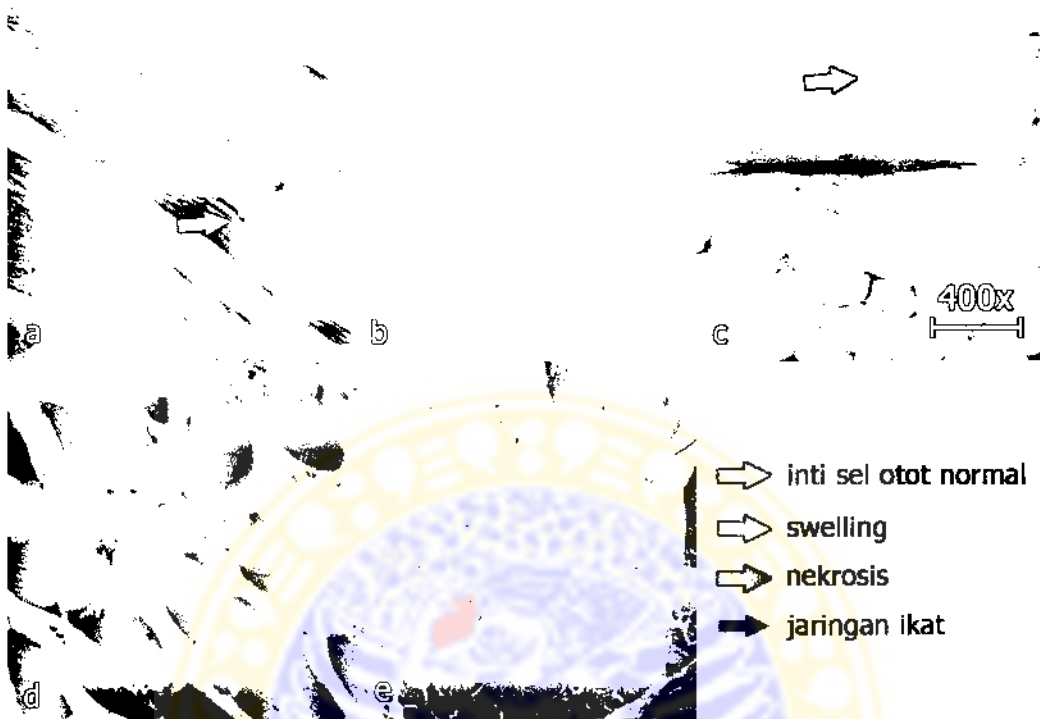
Gambar 5.2. Perubahan berat badan mencit pada perkembangan *diabetes mellitus*

Untuk mengetahui perubahan morfologi jaringan otot dan adipose mencit akibat *diabetes mellitus*, maka dilakukan pembedahan mencit dari kelompok kontrol dan kelompok diabetes untuk dipreparasi secara histokimia dengan pewarna *hematoxylin-eosin*. Jaringan otot diambil dari tungkai belakang dan jaringan adipose diambil dari bawah perut dan bawah kulit. Perbedaan gambaran histopatologi otot dan adipose tampak pada gambar 5.3., 5.4. dan 5.5.

Gambar 5.3. menunjukkan perubahan morfologi yang terjadi pada serabut otot akibat diabetes. Pada irisan otot membujur mencit yang menderita diabetes (b) tampak adanya jaringan ikat fibroblas yang lebih banyak dibandingkan dengan kontrol, selain itu jumlah inti sel otot lebih sedikit. Pada irisan melintang (d) dapat diamati pula adanya jaringan ikat fibroblas (→) dan mengecilnya diameter sel otot.



Gambar 5.3. Jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 100x. Irisan membujur (a) kontrol, (b) dan (c) diabetes. Irisan melintang (d) normal, (e) diabetes.



Gambar 5.4. Penampang jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 400x. Irisan membujur (a) kontrol. (b) dan (c) diabetes. Irisan melintang (d) normal. (e) diabetes.

Pada gambar 5.4. dapat diamati lebih detail perubahan yang terjadi akibat diabetes dalam sel otot. Perubahan yang tampak pada irisan membujur terutama adalah perubahan pada inti sel otot. Pada kondisi normal (a) inti otot tampak pipih dan padat, sementara pada keadaan *diabetes mellitus* tampak pembengkakan inti sel (b) serta bergabungnya beberapa inti sel di dalam sitoplasma (c) yang menandakan adanya proses nekrosis sel otot. Pada irisan melintang tampak jelas bahwa diameter sel otot pada kondisi diabetes lebih kecil dibandingkan dengan kontrol, hal ini menunjukkan adanya atropi atau penurunan volume sel otot.





Gambar 5.5. Penampang melintang jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*. Perbesaran 100x (a) kontrol. (b) diabetes. Perbesaran 400x (c) kontrol. (d) diabetes

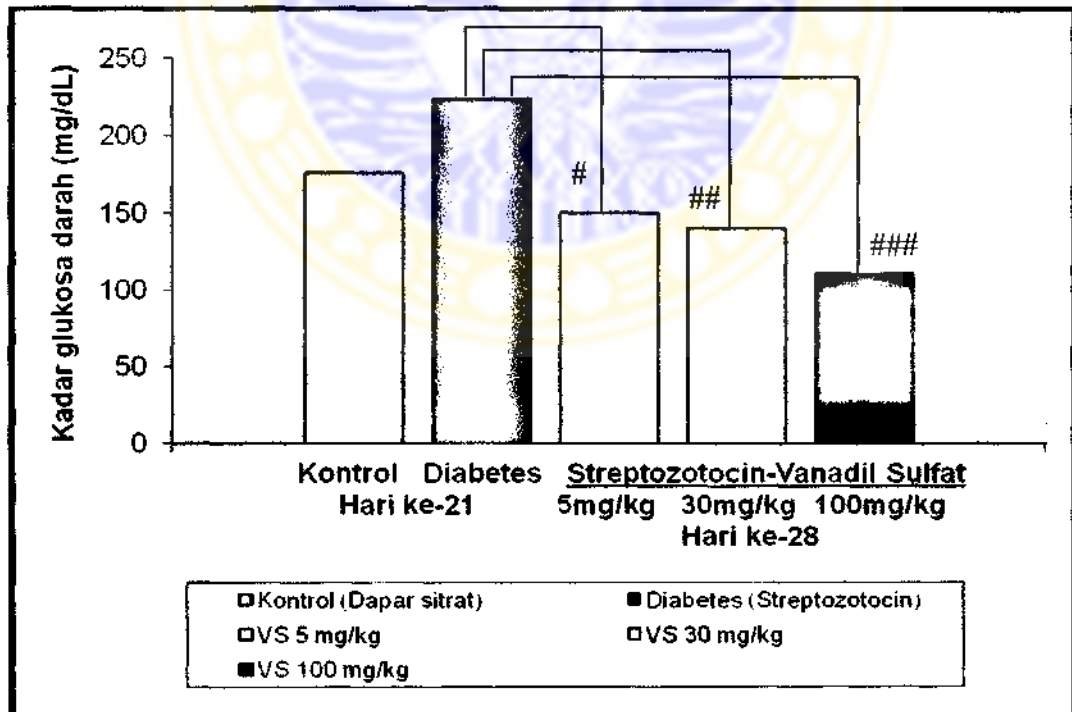
Gambar 5.5. menunjukkan pengaruh kondisi *diabetes mellitus* pada jaringan adipose mencit. Pada perbesaran 100x perubahan yang tampak adalah adanya vakuola yang besar tanpa inti di antara sel-sel lemak lain yang tersusun rapat terjadi pada mencit yang menderita diabetes (b), sementara sel-sel lemak pada jaringan adipose kontrol tampak tersusun rapat. Selain itu diameter sel-sel lemak pada kondisi diabetes lebih kecil dibandingkan keadaan normal. Dengan perbesaran 400x tampak bahwa vakuola tanpa inti tersebut adalah hasil lisis dari sitoplasma sel lemak (d) mengindikasikan adanya degenerasi sel.

Setelah mencit mengalami diabetes akibat induksi oleh streptozotocin selama 21 hari, diberikan suspensi vanadil sulfat dalam larutan CMC Na 0,5% secara oral kepada tiga kelompok perlakuan dengan dosis 5, 30 dan 100 mg/kg sekali sehari selama 7 (tujuh) hari dan larutan CMC Na kepada kelompok diabetes

sebagai kontrol positif. Perubahan kadar glukosa darah diamati pada hari ke-28. Hasil pengukuran kadar glukosa darah tampak pada tabel V.3 dan gambar 5.6.

Tabel V.3 Kadar glukosa darah mencit setelah mendapatkan perlakuan selama 7 (tujuh) hari dengan vanadil sulfat berbagai dosis.

Kelompok	Kadar glukosa darah hari ke- (mg/dL $\pm$ SE)	
	21	28
Kontrol (dapar sitrat)	176,2 $\pm$ 6,0	-
Diabetes (STZ)	224,6 $\pm$ 9,9	-
Vanadil Sulfat 5 mg/kg	228.3 $\pm$ 5.7	151,0 $\pm$ 22.3
Vanadil Sulfat 30 mg/kg	228.3 $\pm$ 10,0	140.7 $\pm$ 19.9
Vanadil Sulfat 100 mg/kg	266.3 $\pm$ 34.3	111.3 $\pm$ 26.7



$F_{(4,43)} = 8,004$ ;  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ )

#  $p = 0,007$ ; ##  $p = 0,000$ ; ###  $p = 0,000$  vs diabetes

Gambar 5.6. Penurunan kadar glukosa darah mencit setelah mendapat terapi selama 7 (tujuh) hari dengan vanadil sulfat pada berbagai dosis.

Tabel V.4 Signifikansi kadar glukosa darah kelompok mencit setelah mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat berbagai dosis selama 7 hari dibandingkan dengan kelompok diabetes

Perbandingan	p	Keterangan
Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 5 mg/kg	0,007	Bermakna
Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 30 mg/kg	0,000	Bermakna
Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 100 mg/kg	0,000	Bermakna

Pada kondisi *diabetes mellitus*, vanadil sulfat ternyata efektif menurunkan kadar glukosa darah pada mencit. Pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-28 kelompok mencit yang mengalami diabetes dan mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat berbagai dosis menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok diabetes yang hanya mendapatkan larutan CMC Na secara oral ( $F_{(4,43)} = 8,004$ ;  $p = 0,000$ ).

Untuk melihat perubahan histopatologi setelah pemberian *treatment* dengan vanadil sulfat berbagai dosis, maka pada hari ke-28 dilakukan pembedahan dan preparasi jaringan otot dan adipose mencit. Hasil pengamatan terlihat pada gambar 5.7. hingga 5.10.



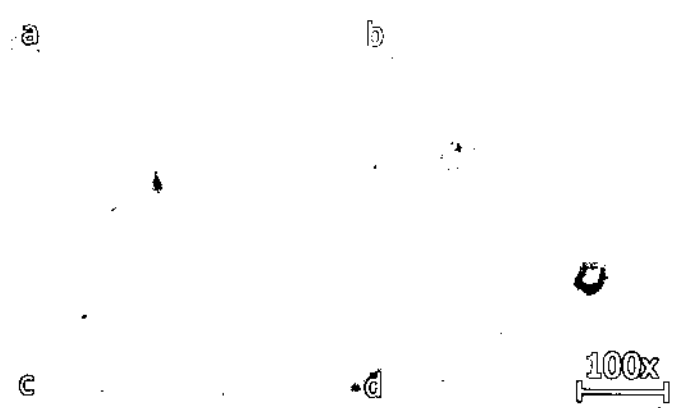
Gambar 5.7. Penampang membujur jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 100x. (a) diabetes. (b) STZ + vanadil sulfat 5 mg/kg. (c) STZ + vanadil sulfat 30 mg/kg. (d) STZ + vanadil sulfat 100 mg/kg

Gambar 5.7. dan 5.8. menunjukkan perubahan yang terjadi pada serabut otot mencit dari kondisi diabetes dan setelah mendapat *treatment* vanadil sulfat dosis 5, 30 dan 100 mg/kg selama 7 hari. Pada jaringan mencit yang mendapat *treatment* vanadil sulfat terjadi penambahan volume sel, tampak dari makin besarnya diameter sel otot dibandingkan dengan kelompok diabetes (a). Ini menunjukkan perbaikan atropi sel otot yang terjadi pada kondisi diabetes, yaitu dengan memperbaiki transpor glukosa dari darah ke jaringan. Inti sel yang tampak di jaringan otot kelompok *treatment* dengan perbesaran 400x pada gambar 5.8. tidak lagi menunjukkan tanda-tanda nekrosis sel otot seperti yang terlihat pada kelompok diabetes.





Gambar 5.8. Penampang membujur jaringan otot tungkai belakang mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 400x. (a) diabetes. (b) STZ + vanadil sulfat 5 mg/kg. (c) STZ + vanadil sulfat 30 mg/kg. (d) STZ + vanadil sulfat 100 mg/kg



Gambar 5.9. Penampang melintang jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 100x. (a) diabetes. (b) STZ + vanadil sulfat 5 mg/kg. (c) STZ + vanadil sulfat 30 mg/kg. (d) STZ + vanadil sulfat 100 mg/kg

Pada gambar 5.9. dan 5.10. diamati perubahan jaringan adipose oleh vanadil sulfat pada keadaan *diabetes mellitus*. Pada jaringan adipose mencit terdapat sel-sel lemak dengan inti lebih dari satu, yang menunjukkan adanya proses regenerasi sel lemak dalam jaringan adipose. Aktivitas regenerasi ini paling banyak ditemui pada mencit yang mendapat *treatment* vanadil sulfat dosis 100 mg/kg (d). Pada perbesaran 400x terlihat bahwa jaringan mencit yang mendapat *treatment* vanadil sulfat juga memiliki bentuk sel lemak yang lebih besar dan rapat dibanding dengan kelompok diabetes, tidak lagi tampak sitoplasma yang lisis atau rusak.





Gambar 5.10. Jaringan adipose putih mencit menggunakan pewarna *hematoxylin-eosin*, dengan perbesaran 400x. (a) diabetes. (b) STZ + vanadil sulfat 5 mg/kg. (c) STZ + vanadil sulfat 30 mg/kg. (d) STZ + vanadil sulfat 100 mg/kg

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Perkembangan pengaruh pemberian streptozotocin pada mencit sebagai *inducer diabetes mellitus* dapat dilihat pada tabel V.1 dan gambar 5.1. Pemberian streptozotocin dosis tunggal 100 mg/kg secara intraperitoneal ternyata hanya mampu menginduksi diabetes pada 14,29% (7 dari 49 ekor mencit) dari seluruh kelompok diabetes. Karena itu diberikan injeksi intraperitoneal kedua streptozotocin dengan dosis 50 mg/kg pada hari ke-14, sehingga pada hari ke-21 terdapat 63,27% yang telah menderita diabetes. Dosis tunggal streptozotocin sebesar 40 – 100 mg/kg lazimnya dapat menginduksi *diabetes mellitus* pada mencit dalam 14 hingga 21 hari (Szkudelski, 2001), namun pada penelitian ini induksi tunggal streptozotocin belum dapat mencapai kondisi *diabetes mellitus*. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya perbedaan kondisi mencit pada pustaka dengan mencit yang digunakan pada penelitian ini, baik perbedaan genetika maupun kondisi laboratorium. Perbedaan genetik yang resisten terhadap streptozotocin pernah diteliti sebelumnya, dimana induksi diabetes dengan dosis 40 mg/kg STZ selama 6 hari berturut-turut pada mencit galur Balb/c tidak dapat menghasilkan *diabetes mellitus* parah (Leiter, 1982; Paik *et al*, 1980), meskipun streptozotocin menyebabkan *diabetes mellitus* dengan merusak DNA sel  $\beta$  pankreas melalui proses pembentukan NO, radikal hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Perusakan DNA ini menstimulasi ribosilasi poli ADP yang selanjutnya menyebabkan deplesi  $\text{NAD}^+$  dan ATP di dalam sel. Akibatnya produksi insulin terganggu dan jumlah insulin yang dihasilkan berkurang, dan perusakan sel  $\beta$  pankreas yang dihasilkannya bertambah berdasarkan waktu serta penambahan dosis STZ (Szkudelski, 2001).

Kelompok mencit yang mendapatkan streptozotocin menunjukkan peningkatan kadar glukosa darah yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol yang mendapatkan dapar sitrat ( $F_{(1,37)} = 5,332$ ,  $p = 0,023$ ) pada hari ke-21 setelah injeksi streptozotocin. Rata-rata kadar glukosa darah acak pada mencit yang menderita *diabetes mellitus* adalah 224,6 mg/dL.

Selama perkembangan *diabetes mellitus*, diamati pula pertumbuhan mencit seperti tampak pada tabel V.2 dan gambar 5.2. Parameter yang digunakan untuk mengamati pertumbuhan mencit adalah berat badan mencit. Pada awal kondisi *diabetes mellitus*, gejala awal yang tampak adalah penurunan berat badan yang drastis dari penderita. Gejala ini disebabkan oleh kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang menyebabkan tubuh menggunakan cadangan energi yang tersimpan dalam sel, akibatnya antara lain cadangan lemak akan menurun di jaringan adipose, cadangan glikogen dalam hepar dan jaringan otot akan berkurang, dan protein yang terdapat pada jaringan otot juga akan berkurang (Ganong, 1999).

Pada kelompok diabetes, penurunan berat badan terendah pada hari ke-5 setelah induksi dengan streptozotocin menunjukkan gejala awal dari diabetes, sedangkan pada kelompok kontrol tetap terjadi kenaikan berat badan. Setelah hari ke-5, berat badan kelompok diabetes kembali meningkat, hingga pada hari ke-21 tetap menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol ( $F_{(1,427)} = 8,571$ ;  $p = 0,004$ ). Hal ini mungkin disebabkan adanya perbaikan oleh sel  $\beta$  pankreas terhadap kerusakan sel. Karena saat awal terjadinya diabetes dan kerusakan sel  $\beta$  pankreas tidak parah, tubuh melakukan kompensasi dengan meningkatkan fungsi dan perbaikan sel  $\beta$  yang juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga produksi insulin tetap normal, maka transpor glukosa dari darah ke jaringan dan penggunaan energi melalui metabolisme karbohidrat tetap terjadi.

Untuk mempelajari perubahan jaringan otot dan adipose akibat kondisi *diabetes mellitus*, maka dilakukan pembedahan serta preparasi jaringan otot dan adipose mencit kelompok kontrol yang hanya mendapat injeksi dapar sitrat dan kelompok *diabetes* yang diinduksi dengan injeksi streptozotocin 100 mg/kg dan 50 mg/kg. Jaringan otot dan adipose diamati perubahan morfologisnya, karena itu tidak diperlukan pewarnaan khusus melainkan diberi warna dengan *hematoxylin-eosin* yang merupakan pewarna rutin preparat histologis (Fawcett, 2002).

Perubahan awal proses nekrosis sel otot yang paling sering dijumpai adalah *waxy degeneration*, mengarah pada disolusi protein serabut-serabut dan garis-garis melintang pada otot. Secara bertahap, seiring terjadinya degenerasi



nukleus, gumpalan-gumpalan agregat tampak, dan setelah sarkoplasma terpisah dan hilang, hanya tertinggal membran sarkolema kosong. Kelompok nukleus tampak berada di tengah, mengindikasikan aktivitas regenerasi (Thomas *et al*, 1984). Setelah itu akan tampak jaringan ikat yaitu fibroblas di antara serabut-serabut otot (Aughsteeen *et al*, 2006). Selain tampak nekrosis sel, pada kondisi *diabetes mellitus* juga akan terjadi atrofi sel otot, yaitu penurunan volume serabut otot yang dapat dilihat dari penurunan diameter sel otot dibandingkan dengan kondisi normal. Kondisi atrofi sel ini menunjukkan adanya penurunan protein yang terdapat di dalam sel otot (Aughsteeen *et al*, 2006; Thomas *et al*, 1984). Dalam jaringan adipose, lipolisis menyebabkan jaringan lemak melepaskan lipid simpanannya dan berubah menjadi jaringan sangat vaskuler terdiri atas sel-sel poligonal atau lonjong kecil dengan banyak sel tetes lipid kecil. Sel yang menyusut permukaannya tampak tidak teratur dengan banyak juluran seperti pseudopodia. Lamina eksterna yang berlebihan tidak lagi sesuai dengan bentuk sel namun berlipat-lipat secara longgar di sekitarnya. Sel-sel lemak tidak pernah berubah menjadi sel-sel fusiform sederhana seperti pre-adiposit atau fibroblas (Fawcett, 2002).

Hasil pengamatan perubahan jaringan otot dan adipose pada kondisi diabetes dapat dilihat pada gambar 5.3., 5.4. dan 5.5. Dibandingkan dengan kelompok kontrol, diameter serabut otot pada jaringan otot mencit yang menderita diabetes tampak mengecil, baik pada penampang membujur maupun melintang. Pada penampang melintang otot dengan perbesaran 100x (Gambar 5.3.b) tampak pula bahwa jumlah inti sel otot berkurang dibandingkan dengan kontrol (Gambar 5.3.a). Pada penampang melintang mulai jelas terlihat adanya jaringan ikat di antara sel-sel otot menggantikan sel-sel otot yang mati (Gambar 5.3.d). Lebih jauh lagi tampak adanya pembengkakan inti sel otot yang dapat dilihat pada perbesaran 400x (Gambar 5.4.b dan c). Pembengkakan inti sel ini merupakan tahap awal nekrosis sel otot yang terjadi pada kondisi diabetes (Aughsteeen, 2006). Ciri-ciri jaringan adipose yang kehilangan simpanan lipidnya tampak pada gambar 5.5. Dengan perbesaran 100x inti sel jaringan adipose mencit yang menderita diabetes kurang tampak jelas (Gambar 5.5.b) dibandingkan dengan kontrol (Gambar 5.5.a).  
Bentuk sel tidak beraturan dan diameternya lebih kecil daripada kontrol. Hal ini

juga tampak pada perbesaran 400x, di mana pada kelompok diabetes permukaan selnya banyak juluran mirip pseudopodia ( $\Rightarrow$  pada Gambar 5.5.d).

Selain itu perubahan jaringan pankreas dan hepar akibat terjadinya diabetes juga diamati. Karena streptozotocin menginduksi diabetes dengan merusak sel  $\beta$  pankreas, maka

Setelah mencit mengalami *diabetes mellitus* pada hari ke-21, diberikan suspensi vanadil sulfat dalam larutan CMC Na sekali sehari selama 7 (tujuh) hari dengan dosis 5, 30 dan 100 mg/kg. Penurunan kadar glukosa darah akibat pemberian vanadil sulfat dapat dilihat pada tabel V.3 dan gambar 5.3. Pemberian vanadil sulfat ternyata dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit yang menderita *diabetes mellitus* ( $F_{(4,43)} = 8,004$ ;  $p = 0,000$ ). Dosis vanadil sulfat optimum untuk menurunkan kadar glukosa darah pada mencit adalah 30 mg/kg (Arijanto, 2006), meskipun demikian, pada penelitian ini dosis 5 mg/kg sudah menunjukkan penurunan kadar yang berarti dibandingkan dengan kelompok diabetes ( $p = 0,007$ ). Penurunan lebih besar tampak pada kelompok yang mendapatkan vanadil sulfat 30 mg/kg ( $p = 0,000$ ) dan 100 mg/kg ( $p = 0,000$ ). Penurunan kadar glukosa darah yang sangat besar pada mencit yang diberi vanadil sulfat 100 mg/kg terjadi setelah 5 hari (hari ke-26), di mana sebagian mencit mengalami kematian dengan glukosa darah  $< 30$  mg/dL. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa vanadil sulfat dosis 100 hingga 200 mg/kg menurunkan glukosa darah secara drastis pada mencit yang menderita *diabetes mellitus* (Arijanto, 2006).

Vanadil sulfat bekerja dengan memperpanjang *insulin signaling pathway* dengan menghambat PTPase, sehingga *glucose transporter 4* aktif mengambil glukosa dari darah lebih lama dan membawanya ke jaringan target insulin, yaitu otot dan adipose. Dengan adanya penurunan kadar glukosa darah yang bermakna oleh vanadil sulfat pada keadaan *diabetes mellitus*, maka diharapkan terjadi perbaikan pada jaringan otot dan adipose. Untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada jaringan tersebut setelah mencit mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat dengan berbagai dosis, dilakukan pembedahan dan preparasi jaringan otot serta adipose mencit dengan hematoxylin-eosin.

Pada penampang membujur jaringan otot mencit dengan perbesaran 100x (Gambar 5.7.) tampak kondisi atrofi sel otot pada keadaan diabetes (a) membaik setelah mendapatkan *treatment* vanadil sulfat. Pertambahan diameter sel otot tampak paling besar pada pemberian dosis vanadil sulfat 100 mg/kg (d), kemudian 30 mg/kg (c) dan 5 mg/kg (b). Meskipun demikian, vanadil dosis 5 mg/kg telah menunjukkan perubahan diameter sel otot yang cukup besar dibandingkan dengan kondisi diabetes. Hal ini membuktikan bahwa vanadil sulfat dapat memperbaiki keadaan atrofi otot pada kondisi *diabetes mellitus*. Di samping memperbaiki atrofi otot, hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa jaringan ikat yang banyak ditemui pada jaringan otot mencit yang menderita diabetes berkurang setelah mencit mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat. Hal ini menunjukkan bahwa vanadil sulfat juga mengurangi atau menghentikan proses nekrosis sel otot pada keadaan diabetes. Pengurangan jumlah nekrosis sel otot ini juga terlihat pada perbesaran 400x (Gambar 5.8.) di mana proses nekrosis yang tampak dari pembengkakan inti sel dan perpindahan inti sel tidak lagi terlihat pada kelompok *treatment*.

Pada penampang melintang jaringan adipose mencit dengan perbesaran 100x (Gambar 5.9.) tampak perbaikan sel-sel adipose, baik dalam bentuk dan permukaannya, besar selnya, serta adanya proses regenerasi yang sedang terjadi. Proses regenerasi ini tampak paling besar pada kelompok yang mendapat *treatment* vanadil sulfat 100 mg/kg (d), di mana inti sel tampak jelas dan banyak terdapat sel-sel lemak yang memiliki lebih dari 1 inti. Dengan perbesaran 400x (Gambar 5.10.) bentuk sel mengalami perbaikan mulai dosis vanadil sulfat 5 mg/kg (b) dibandingkan dengan diabetes (a). Pada dosis vanadil sulfat 30 mg/kg (c) bentuk sel lebih teratur serta mulai tampak adanya regenerasi sel lemak. Sedangkan pada dosis 100 mg/kg, tampak sel sangat rapat dan terus terjadi regenerasi sel lemak (d). Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis 100 mg/kg, vanadil sulfat meningkatkan transpor glukosa dari darah ke jaringan sangat besar, sehingga dapat terjadi efek hipoglikemia. Dari hasil pengamatan jelas bahwa pada jaringan adipose, vanadil sulfat menghentikan proses pengambilan sel lemak dari jaringan adipose dan mengakibatkan terjadinya proses regenerasi sel-sel lemak.

Dengan adanya hasil penelitian ini, diketahui bahwa vanadil sulfat memperbaiki kondisi atropi dan nekrosis pada sel otot serta menghentikan pengambilan sel lemak dan meningkatkan regenerasi sel-sel lemak pada jaringan adipose. Dari mekanismenya pada peningkatan durasi *insulin signaling pathway*, vanadil sulfat efektif menurunkan kadar glukosa darah pada *diabetes mellitus*. Perlu dilakukan berbagai penelitian lanjutan mengenai pengaruh vanadil sulfat terhadap perbaikan pada jaringan otot dan adipose secara kuantitatif, termasuk efeknya terhadap perubahan penimbunan glikogen pada jaringan, terutama jaringan otot dan hepar.





## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada mencit, maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Vanadil sulfat efektif menurunkan kadar glukosa darah pada keadaan *diabetes mellitus*.
2. Vanadil sulfat dapat memperbaiki kondisi atropi dan nekrosis jaringan otot yang terjadi pada *diabetes mellitus*.
3. Vanadil sulfat dapat menghentikan proses pengambilan cadangan lipid pada kondisi *diabetes mellitus* dan meningkatkan regenerasi sel lemak pada jaringan adipose.

#### **7.2. Saran**

Untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh vanadil sulfat terhadap jaringan adipose dan otot, perlu dilakukan penelitian kuantitatif dengan pengukuran peningkatan diameter dan jumlah sel yang telah mendapat vanadil sulfat dibandingkan dengan kondisi diabetes, perubahan kandungan glikogen pada jaringan otot, serta dapat dilakukan penelitian dengan imunohistokimia untuk mengetahui aktivitas GLUT4 dalam jaringan target insulin dengan dan tanpa *treatment* dengan vanadil sulfat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acilli, D., Nakae, J., Flier, J.S., 2000. The Insulin Receptor. *In: D. LeRoith, S.I. Taylor, J.M. Olefsky (Eds.). Diabetes mellitus, A Fundamental and Clinical Text*, Ed. 2<sup>nd</sup>, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 192
- Aharon, Y. Mevorach, M., Shamoon, H., 1998. Vanadyl sulfate does not enhance insulin action in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, Vol. 21, pp. 2194
- Anonim, 1997. *Streptozotocin Mixed Anomer*. Sigma-Aldrich Product Information
- Anonim, 1999. *Vanadium*. <http://www.sigmaaldrich.com>
- Anonim, 2001. *Vanadyl Sulphate Supplement Approval*. U.S. Food and Drug Administration <http://www.fda.gov/cder/ohrtms/doc/01vanadylsulphate.htm>, 11 November 2006
- Anonim, 2006. *Diabetes Fact Sheet N°312*. World Health Organization. <http://www.who.int>, 17 Oktober 2006
- Arijanto, Audrey N., 2006. *Efektivitas Vanadil Sulfat terhadap Penurunan Glukosa Darah pada Mencit (Mus musculus) Diabetes mellitus Tipe 2*. Surabaya: Bagian Ilmu Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Asante-Appiah, E., Kennedy, B.P., 2003. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 284, pp. 663 – 70
- Asnaghi L., Bruno P., Priulla M., Nicolin A., 2004. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol. Res.*, Vol. 50, pp. 545-549.
- Atkinson, Barbara F., 1992. *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. Pennsylvania: W. B. Saunders company, p. 28 – 30 (gbr renal pelvic)
- Aughsteen, Adib A., Khair, Al-Moutascem Billah, Sulciman, Ahmad A., 2006. Quantitative Morphometric Study of the Skeletal Muscles of Normal dan Streptozotocin-Diabetic Rats. *JOP.*, Vol. 7, no. 4, pp. 382 – 389.
- Bevan P., 2001. Insulin signaling. *J. Cell Sci.*, Vol. 114, pp. 1429-1430.
- Bergman, Ronald A., Afifi, Adel K., 1974. *Atlas of Microscopic Anatomy, a companion to Histology and Neuroanatomy*. Philadelphia: W. B. Saunders company, p. 53 – 54

Bowen, R., 2004. **Insulin Mechanism of Action**.  
6 Januari 2007

Braunstein, Herbert., Friedman, Theodore A., Stewart, Robert A., Verity, M. Anthony., 1987. **Outlines and Review of Pathology**, 2<sup>nd</sup> edition. Missouri : C.V. Mosby Company, p.9 – 15, 123 – 129

Cadene, A., Grigorescu, F., Serrano, J., Cros, G., 1996. Characterization of Vanadyl Sulfate Effect on Vascular Contraction: Roles of Calcium and Tyrosine Phosphorylation. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, Vol. 281, No. 1, pp. 491 – 98

Cartailler, Jean-Philippe., 2006. **Insulin and Receptors**.  
11 November 2006

Crookham, J, Dapson, R. 1991. **Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory**, 2nd ED. Anatech

Davis, S.N., Granner, D.K., 2001. Insulin, Oral Hypoglycemic Agents, and The Pharmacology of The Endocrine Pankreas. *In*: J.G. Hardman, L.E. Limbird, Goodman Gilman, A. (Eds.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ed. 10<sup>th</sup>, USA: McGraw-Hill Co., p. 1685 – 86

Fawcett, Don W., 2002. **A textbook of Histology**. 12<sup>th</sup> ed. USA: Chapman & Hall, Inc., p. 130 – 262.

Freeman, W. H., Bracegirdle, Brian., 1987. **An Atlas of Histology**, 2<sup>nd</sup> ed. Hong Kong: Wing King Tong Co. Ltd, p. 22 – 3, 32 – 39

Fiore, S. H. di., Schmidt, Ida G., 1989. **New Atlas of Human Histology**, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 34 – 5

Ganong, William F., 1999. **Review of Medical Physiology**, 19<sup>th</sup> ed. Stamford, Connecticut:Appleton & Lange, p.24 – 25, 60 – 72, 274 – 339.

Goldstein, B.J., 2000. Regulation of Insulin Action by Protein-Tyrosine Phosphatases. *In*: D. LeRoith, S.I. Taylor, J.M. Olefsky (Eds.). **Diabetes mellitus, A Fundamental And Clinical Text**, Ed. 2<sup>nd</sup>, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 206 – 7

Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996. **Textbook of Medical Physiology**, 9<sup>th</sup> ed. USA: W.F. Saunders Company, p.1221 – 31

Hardjasasmita, H. Pantjita., 2004. **Ikhtisar Biokimia Dasar B**. Jakarta: Balai Penerbit FKUI

Harris, M.I., 2000. Definition and Classification of *Diabetes mellitus* and The New Criteria for Diagnosis. *In*: D. LeRoith, S.I. Taylor, J.M. Olefsky (Eds.).

**Diabetes mellitus, A Fundamental and Clinical Text**, Ed. 2<sup>nd</sup>, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 769 – 72

Hoogwerf, B.J., 2006. Exenatide and pramlintide: new glucose-lowering agents for treating *diabetes mellitus*. *Clev Clin J Med.*, Vol. 73, pp. 477-484.

Kahn, C.R., Saltiel, A.R., 2001. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*, Vol. 414, pp. 799 – 806

Kitamura T., Kitamura Y., Kuroda S., Hino Y., Ando M., Kotani K., Konishi H., Matsuzaki H., Kikkawa U., Ogawa W., Kasuga M., 1999. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 19, pp. 6286–6296.

Klatt , Edward C., 2006. **Histology Procedure Manuals.**

15 Januari 2007

Lizcano J. M. Alessi D. R., 2002. The *insulin signaling pathway*. *Curr Biol.*, Vol. 12, pp. 236-238

Leeson, Thomas S., Leeson, C. Roland, 1970. **Histology**. USA: W. B. Saunders Company

Leiter, Edward H., 1982. Multiple Low-dose Streptozocin-induced Hyperglycemia and Insulinitis in C57Bl. Mice: Influence of Inbred Background, Sex, and Thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 79, pp. 630 – 634.

Lowe, James. 1997. **Haematoxylin and Eosin Technique**. United Kingdom:University of Nottingham Medical School Division of Histopathology

Mathur, Ruchi, 2005. [http://www.medicinenet.com/insulin\\_treatment/article.htm](http://www.medicinenet.com/insulin_treatment/article.htm) .13 November 2006

McEvoy, G.K. (Ed.), 2002. **AHFS Drug Information**. USA: American Society of Health System

McKenzie, James C., Klein, Robert M., 2000. **Basic concepts in cell Biology and Histology. A Student's Survival Guide**. Singapore: McGraw-Hill

Nair, K.S., Karki, S.D., 1992. Carbohydrate Metabolism. In: C.M. Smith, A.M. Reynard (Eds.). **Textbook of Pharmacology**, USA: W.B. Saunders Company, p. 748 – 50

Nolte, M.S., Karam, J.H., 2001. Pancreatic Hormone and Antidiabetic Agent. In: B.G. Katzung (Ed.). **Basic & Clinical Pharmacology**, 8<sup>th</sup> ed., New York: Lange Medical Book – Mc Graw Hill, p. 671–705

Oki, J.C., Isley, W.L., 2002. *Diabetes mellitus*. In: J.T. Dipiro, R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells, L.M. Posey (Eds.). *Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach*, Ed. 5<sup>th</sup>, USA: McGraw-Hill Co., p. 1335.

Paik, Sang-gi, Fleischer, Norman, Shin, Seung-Il, 1980. Insulin-dependent *Diabetes mellitus* Induced by Subdiabetogenic Doses of Streptozocin: Obligatory Role of Cell-mediated Autoimmune Processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, No. 10, pp. 6129 – 6133.

Schwinghammer, T.L. (Ed.), 2003. *Diabetes mellitus*. In: B.G. Wells, J.T. Dipiro, T.L. Schwinghammer, C.W. Hamilton (Eds.). *Pharmacotherapy Handbook*, ed. 6<sup>th</sup>, USA: Appleton and Lange

Setter, S.M., White, J.R., and Campbell, K.R., 2000. In: E.T. Herfindal, D.R. Gourlay (Eds.). *Textbook of Therapeutics Drug and Disease Management*, Ed. 7<sup>th</sup>, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 378

Shimomura I., Bashmakov Y., Ikemoto S., Horton J. D., Brown M. S., Goldstein J. L., 1999. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 13656–13661.

Szkudelski, T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pankreas. *Physiol. Res.*, Vol. 50, pp.536–46

Thomas, Carlos. Adler, C. P., Bohm, N., Freudenberg, N., Hagedorn, M., Riede, U. N., Rohrbach, R., Salfelder, K., Richter, G. W., 1984. *Sandritter's Color Atlas and Textbook of Histopathology*, 7th English Ed., Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc., p. 1 – 14, 260 – 263

Verma, S., Cam, M.C., McNeill, J.H., 1998. Nutritional Factors that Can Favorably Influence the Glucose/Insulin System: Vanadium. *Journal of American College of Nutrition*, Vol. 17, No.1, pp. 11 – 18

Zhang, Shu-Xin., 1999. *An Atlas of Histology*. New York: Springer-Verlag New York, Inc., p. 32 – 65



## Lampiran 1

Hasil pengukuran kadar glukosa darah mencit setelah injeksi streptozotocin 100 mg/kg dilanjutkan 50 mg/kg

KELOMPOK	No	Kadar glukosa darah mencit hari ke- (mg/dL ± SE)		
		0	14	21
<b>Kontrol (Dapar sitrat)</b>	1	138,0	180,0	191,0
	2	146,0	103,0	171,0
	3	158,0	134,0	150,0
	4	192,0	182,0	195,0
	5	161,0	160,0	172,0
	6	152,0	175,0	178,0
	7	160,0	-	-
	8	155,0	-	-
	9	123,0	-	-
	10	133,0	-	-
	11	165,0	-	-
<b>Rata-rata ± SE</b>		153,0 ± 5,5	155,7 ± 12,8	176,2 ± 6,0
<b>Diabetes (Streptozotocin)</b>	1	143,0	175,0	216,0
	2	131,0	163,0	192,0
	3	140,0	148,0	170,0
	4	181,0	187,0	283,0
	5	153,0	253,0	180,0
	6	126,0	187,0	223,0
	7	108,0	175,0	165,0
	8	134,0	125,0	215,0
	9	182,0	207,0	141,0
	10	137,0	140,0	228,0
	11	157,0	253,0	168,0
	12	158,0	175,0	233,0
	13	149,0	174,0	227,0
	14	160,0	134,0	213,0
	15	176,0	179,0	240,0
	16	110,0	201,0	202,0
	17	156,0	192,0	279,0
	18	162,0	202,0	243,0
	19	176,0	204,0	233,0
	20	157,0	150,0	219,0
	21	107,0	160,0	209,0
	22	187,0	161,0	213,0
	23	155,0	152,0	255,0
	24	159,0	393,0	429,0
	25	122,0	101,0	271,0
	26	187,0	178,0	230,0
	27	157,0	182,0	197,0
	28	173,0	166,0	216,0
<b>Rata-rata ± SE</b>		151,54 ± 4,4	151,5 ± 10,0	182,8 ± 9,9

Analisis statistik glukosa darah pada perkembangan *diabetes mellitus* hingga hari ke-21 dengan Anova satu arah

**ANOVA**

Glukosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12747.332	1	12747.332	5.332	.023
Within Groups	251008.4	105	2390.556		
Total	263755.7	106			



Lampiran 2

Hasil penimbangan berat badan mencit pada perkembangan *diabetes mellitus*

KELOM- POK	No	Berat badan mencit pada hari ke- (g ± SD)										
		0	1	3	5	7	9	11	13	14	18	21
Kontrol (dapar sitrak)	1	30,5	30,0	30,0	30,0	31,5	31,5	32,0	32,5	32,0	30,5	31,0
	2	23,0	22,5	22,5	21,5	24,0	24,5	24,5	24,0	24,5	25,0	25,5
	3	24,0	23,5	24,0	22,5	24,5	25,0	26,5	26,0	26,5	27,0	27,5
	4	34,5	34,0	33,5	33,0	38,5	40,0	39,5	41,0	40,0	37,0	42,5
	5	26,0	27,0	26,0	26,5	31,0	32,0	32,5	33,5	33,5	32,0	35,5
	6	27,5	28,0	25,5	26,0	29,5	30,0	30,0	31,0	30,5	28,5	32,0
	7	19,5	21,0	23,5	25,5	26,0	26,0	27,0	25,0	25,0	24,5	23,0
	8	21,0	22,5	24,0	24,5	25,0	26,5	28,0	24,5	24,0	24,0	22,5
	9	22,0	22,5	23,5	24,0	24,0	24,5	25,0	23,0	23,0	23,0	23,0
	10	20,5	20,0	21,0	21,5	21,0	21,5	22,0	20,0	19,5	19,5	18,5
	11	21,5	21,5	23,0	24,5	25,5	26,0	27,5	27,0	27,0	27,0	28,0
<b>Rata-rata ± SD</b>		24,6 ± 2,4	24,8 ± 2,3	25,1 ± 2,5	25,4 ± 2,6	27,3 ± 2,9	28,0 ± 3,2	28,6 ± 3,0	28,0 ± 3,6	27,8 ± 3,5	27,1 ± 3,8	28,1 ± 3,9

KELOMPOK	No	Berat badan mencit pada hari ke- (g ± SD)										
		0	1	3	5	7	9	11	13	14	18	21
Diabetes (STZ)	1	28,5	29,0	26,0	24,0	28,0	29,5	29,5	30,0	31,5	32,0	33,5
	2	23,5	24,5	24,0	23,0	26,0	26,0	26,5	26,5	26,5	25,0	27,0
	3	25,0	25,0	24,0	23,0	26,0	26,5	29,5	31,0	31,5	31,0	32,5
	4	24,0	24,5	24,5	23,0	27,0	28,5	30,0	31,0	31,0	30,0	32,0
	5	30,5	31,5	30,5	30,5	31,5	32,5	30,5	31,0	31,0	30,5	30,0
	6	27,0	27,0	25,5	24,5	25,5	25,5	26,5	27,0	27,5	28,5	29,5
	7	26,0	28,0	26,5	26,5	27,5	28,0	29,0	30,0	30,5	30,0	30,0
	8	26,0	25,0	23,0	23,0	27,0	28,0	29,0	29,5	30,5	30,0	30,0
	9	28,0	28,0	28,0	28,0	30,0	30,5	32,0	31,0	31,5	32,0	32,0
	10	23,0	22,0	21,0	20,5	20,5	20,5	21,5	21,0	19,5	19,0	20,0
	11	25,0	26,5	26,0	25,5	25,0	25,5	28,0	26,5	26,5	26,0	27,0
	12	27,5	28,0	28,0	27,0	31,0	31,0	32,5	34,0	34,5	34,0	36,0
	13	23,0	23,5	24,0	25,5	26,0	26,5	27,5	27,0	26,5	26,5	27,0
	14	26,0	26,0	26,0	27,0	28,0	28,0	29,0	28,5	27,0	27,5	29,5
	15	25,0	26,0	25,5	26,0	26,5	27,0	27,0	27,0	26,5	27,5	28,0
	16	32,0	30,5	30,5	29,5	31,5	33,0	33,0	34,5	34,5	34,5	36,0
	17	28,0	28,0	28,5	27,5	31,5	32,0	33,0	34,0	34,0	34,0	35,0
	18	25,0	25,5	24,5	28,5	25,0	26,0	26,0	27,0	27,5	27,0	27,0
	19	27,0	27,0	26,5	25,5	28,5	29,5	30,5	29,5	29,5	30,5	32,5
	20	25,0	25,5	25,0	26,0	27,0	29,0	29,5	29,5	28,5	30,5	32,5
	21	27,0	26,5	26,0	25,5	28,5	28,5	30,0	30,0	29,5	29,5	30,0
	22	27,0	28,5	28,0	28,0	28,5	30,0	32,0	31,0	30,5	31,5	31,5
	23	30,0	30,0	28,5	27,5	31,5	33,5	33,0	31,5	34,5	33,5	33,0
	24	24,5	24,0	20,5	19,5	20,0	20,5	21,5	17,5	21,5	18,5	19,0
	25	22,0	25,0	24,5	24,0	28,0	29,5	29,5	26,0	31,0	29,5	30,5
	26	28,0	28,5	28,0	27,5	27,0	29,5	29,5	28,5	28,5	28,5	30,0
	27	28,0	28,5	28,5	28,5	28,5	31,5	31,5	29,5	30,0	29,0	31,5
	28	30,0	30,0	29,5	28,5	29,5	31,5	31,5	31,5	31,0	31,5	32,0
<b>Rata-rata ± SD</b>		26,5 ± 4,7	26,9 ± 4,4	26,1 ± 3,6	25,8 ± 3,5	27,5 ± 4,9	28,5 ± 5,1	29,2 ± 4,8	29,0 ± 6,0	29,4 ± 5,8	29,2 ± 4,8	30,2 ± 6,8

Analisis statistik pertumbuhan mencit selama perkembangan *diabetes mellitus* dengan Anova satu arah

**ANOVA**

BB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	132.013	1	132.013	8.571	.004
Within Groups	6576.565	427	15.402		
Total	6708.578	428			





## Lampiran 3

Hasil pengukuran glukosa darah mencit setelah mengalami diabetes dan mendapat *treatment* dengan vanadil sulfat berbagai dosis selama 7 (tujuh) hari

KELOMPOK	N0	Kadar glukosa darah hari ke- (mg/dL ± SE)	
		21	28
VS 5 mg/kg	1	233,0	217,0
	2	227,0	134,0
	3	213,0	119,0
	4	240,0	134,0
<b>Rata-rata ± SE</b>		<b>228,3 ± 5,8</b>	<b>151,0 ± 22,3</b>
VS 30 mg/kg	1	202,0	169,0
	2	279,0	205,0
	3	243,0	77,0
	4	233,0	114,0
	5	219,0	159,0
	6	209,0	187,0
	7	213,0	74,0
<b>Rata-rata ± SE</b>		<b>228,3 ± 10,0</b>	<b>140,7 ± 19,9</b>
VS 100 mg/kg	1	255,0	-
	2	429,0	-
	3	271,0	-
	4	230,0	138,0
	5	197,0	58,0
	6	216,0	138,0
<b>Rata-rata ± SE</b>		<b>266,3 ± 34,3</b>	<b>111,3 ± 26,7</b>

Analisis statistik kadar glukosa darah kelompok perlakuan setelah mendapatkan terapi dengan vanadil sulfat selama 7 (tujuh) hari dengan anova satu arah

## ANOVA

Glukosa					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	75935.893	4	18983.973	8.004	.000
Within Groups	101991.4	43	2371.892		
Total	177927.3	47			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Glukosa

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (Dapar sitrat)	Diabetes (STZ)	-48.47619*	21.90949	.032	-92.6609	-4.2915
	VS 5 mg/kg	25.16667	31.43705	.428	-38.2322	88.5655
	VS 30 mg/kg	35.45238	27.09533	.198	-19.1906	90.0953
	VS 100 mg/kg	64.83333	34.43757	.067	-4.6166	134.2833
Diabetes (STZ)	Kontrol (Dapar sitrat)	48.47619*	21.90949	.032	4.2915	92.6609
	VS 5 mg/kg	73.64286*	26.03235	.007	21.1436	126.1421
	VS 30 mg/kg	83.92857*	20.58038	.000	42.4243	125.4329
	VS 100 mg/kg	113.30952*	29.58616	.000	53.6433	172.9757
VS 5 mg/kg	Kontrol (Dapar sitrat)	-25.16667	31.43705	.428	-88.5655	38.2322
	Diabetes (STZ)	-73.64286*	26.03235	.007	-126.1421	-21.1436
	VS 30 mg/kg	10.28571	30.52564	.738	-51.2751	71.8465
	VS 100 mg/kg	39.66667	37.19682	.292	-35.3479	114.6812
VS 30 mg/kg	Kontrol (Dapar sitrat)	-35.45238	27.09533	.198	-90.0953	19.1906
	Diabetes (STZ)	-83.92857*	20.58038	.000	-125.4329	-42.4243
	VS 5 mg/kg	-10.28571	30.52564	.738	-71.8465	51.2751
	VS 100 mg/kg	29.38095	33.60762	.387	-38.3953	97.1572
VS 100 mg/kg	Kontrol (Dapar sitrat)	-64.83333	34.43757	.067	-134.2833	4.6166
	Diabetes (STZ)	-113.30952*	29.58616	.000	-172.9757	-53.6433
	VS 5 mg/kg	-39.66667	37.19682	.292	-114.6812	35.3479
	VS 30 mg/kg	-29.38095	33.60762	.387	-97.1572	38.3953

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

Analisis statistik *t-test* antara kelompok diabetes dengan kelompok perlakuan setelah diberi vanadil sulfat 5 mg/kg selama 7 (tujuh) hari

Skripsi

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t	df	Sig. (2-tailed)	t-test for Equality of Means		
	F	Sig.				Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
						Lower	Upper	
Glukosa	.001	.982	2.672	30	.012	73.64286	27.56541	129.93893
Equal variances assumed								
Equal variances not assumed			3.021	4.278	.036	73.64286	24.37527	139.62108

Pengaruh vanadil.....

Grace Syariel

Analisis statistik *t-test* antara kelompok diabetes dengan kelompok perlakuan setelah diberi vanadil sulfat 30 mg/kg selama 7 (tujuh) hari

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Glukosa Equal variances assumed	.606	.442	3.793	33	.001	83.92857	22.12468	38.91557	128.94157
Glukosa Equal variances not assumed			3.777	9.199	.004	83.92857	22.21909	33.83114	134.02601

Grace Syariel

Analisis statistik *t-test* antara kelompok diabetes dengan kelompok perlakuan setelah diberi vanadil sulfat 100 mg/kg selama 7 (tujuh) hari

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Glukosa Equal variances assumed	.016	.900	3.594	29	.001	113.30952	31.52452	48.83464	177.78441
Glukosa Equal variances not assumed			3.984	2.583	.037	113.30952	28.43880	13.96097	212.65808

Skripsi

Pengaruh vanadil...