

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR
(PDD)**



**ANALISIS MEKANISME PENGARUH PREKONDISI DIET GLUKOSA
SECARA KONTINYU-BERTAHAP TERHADAP AKT DAN HSP27
SEL BETA PANKREAS YANG DIPAPAR STRESSOR
DIET TINGGI GLUKOSA**

TAHUN KE - 1 DARI RENCANA 1 TAHUN

Dr. Lilik Herawati, dr, M.Kes

0014037509

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR
(PDD)**

KKA
KK
LP 24/19
Her
a



**ANALISIS MEKANISME PENGARUH PREKONDISI DIET GLUKOSA
SECARA KONTINYU-BERTAHAP TERHADAP AKT DAN HSP27
SEL BETA PANKREAS YANG DIPAPAR STRESSOR
DIET TINGGI GLUKOSA**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 1 TAHUN

Dr. Lilik Herawati, dr, M.Kes

0014037509

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Analisis Mekanisme Pengaruh Prekondisi Diet Glukosa secara Kontinyu-Bertahap terhadap Akt dan Hsp27 Sel Beta Pankreas yang Dipapar Stressor Diet Tinggi Glukosa

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. dr. LILIK HERAWATI, S.Ked, M.Kes

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

NIDN : 0014037509

Jabatan Fungsional : Lektor

Program Studi : Kedokteran

Nomor HP : 08123181104

Alamat surel (e-mail) : lilik_heraw@fk.unair.ac.id

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -

Alamat : -

Penanggung Jawab : -

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun

Biaya Tahun Berjalan : Rp 57,500,000

Biaya Keseluruhan : Rp 57,500,000

Mengetahui,
Dekan FK UNAIR



(Prof. Dr. Soetopo, dr, Sp.U(K))
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 28 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr. dr. LILIK HERAWATI, S.Ked, M.Kes)
NIP/NIK 197503142003122001

Menyetujui,
Ketua LPI UNAIR



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si, PhD)
NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

Konsumsi kalori dari tahun ke tahun menunjukkan peningkatan (WHO, 2016a) . Penambahan kalori 100-150 Kcal/orang/hari telah diketahui dapat meningkatkan risiko penyakit metabolik seperti diabetes mellitus (DM) dan penyakit jantung (AHA, 2014; Basu et al., 2013). Penelitian sebelumnya terkait upaya preventif, banyak berfokus pada prekondisi dengan restriksi kalori menunjukkan hasil positif dapat memperbaiki kondisi DM. Namun, prevalensi DM ternyata masih menunjukkan peningkatan, sehingga diperlukan metode preventif lain yang lebih mudah diaplikasikan seperti metode prekondisi diet dengan penambahan kalori secara bertahap. Prekondisi adalah pemberian *stressor* untuk peningkatan taraf kesehatan. Penelitian prekondisi yang telah dilakukan antara lain prekondisi *ischemic*, prekondisi *heat*, dan prekondisi diet. Penelitian yang berkaitan dengan prekondisi diet, antara lain berupa restriksi diet dan puasa yang menunjukkan hasil dapat meningkatkan angka harapan hidup dan fungsi organ. Namun prekondisi penambahan glukosa secara kontinyu-bertahap sejak usia dini terhadap ketahanan sel beta pankreas belum diketahui terkait pengaruh dan mekanismenya.

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian analisis mekanisme pengaruh prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang kemudian dipapar dengan *stressor* diet tinggi glukosa terhadap ketahanan sel beta pankreas melalui Akt dan Hsp27 sel beta pankreas. Akt berperan dalam merangsang *promoter* insulin dan Hsp27 berperan sebagai penghambat pengaktifan caspase jalur apoptosis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi Akt sel beta dan insulin sel beta menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p \geq 0,05$). Rerata Akt, kelompok prekondisi paling rendah. Rerata ekspresi insulin kelompok 'kontrol prekondisi' mempunyai skor tertinggi. Ekspresi Hsp27 menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,043$), yaitu kelompok kontrol dengan kelompok prekondisi ($x=5,856 \pm 2,1755$; $x=3,822 \pm 0,9615$; $p=0,043$), sedangkan kelompok 'kontrol prekondisi' ($x=5,711 \pm 1,6766$) dan kelompok prekondisi, serta kelompok 'kontrol prekondisi' dan kelompok kontrol, tidak menunjukkan perbedaan bermakna.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap dapat bermanfaat untuk menyiapkan tubuh dalam menghadapi *stressor* yang berat. Mekanisme yang terlibat dalam perlakuan ini adalah melalui ekspresi Hsp27 dan ekspresi insulin sel beta, yang mempengaruhi kadar insulin serum untuk meregulasi kadar glukosa darah. Namun, perlu penyelidikan lebih lanjut untuk menemukan modulator lain yang terlibat untuk mekanisme lebih rinci.

Keywords: prekondisi diet, glukosa, sel beta pankreas, Akt, Hsp27



PRAKATA

Kami panjatkan puji syukur ke hadirat Allah azza wa jalla atas segala karunia dan rahmatNya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan. Salam dan rahmat disampaikan kepada junjungan kami Rasulullaah Nabi Muhammad SAW.

Harapan dari hasil penelitian ini adalah bahwa penelitian ini dapat bermanfaat untuk penelitian berikutnya biomolekul dan lebih jauh kelak dapat diteliti efeknya pada manusia.

Kami, tim peneliti, menyadari bahwa penelitian ini sulit dilaksanakan tanpa bantuan pendanaan dari Kemenristek Dikti yang dikoordinir oleh LPI Unair, serta peran serta berbagai pihak. Untuk itu perkenankan kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang turut membantu dan mendukung penelitian ini.

Surabaya, November 2018

Peneliti



Daftar isi

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
BAB 4 METODE PENELITIAN	10
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	15
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	21
DAFTAR PUSTAKA	22
LAMPIRAN	24
- Bukti accepted oral presentation & potensi publikasi jurnal internasional	

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Konsumsi kalori dari tahun ke tahun menunjukkan peningkatan (Cargill, 2016; WHO, 2016a). Penambahan kalori 100-150 Kcal/orang/hari telah diketahui dapat meningkatkan risiko penyakit metabolik seperti diabetes mellitus (DM) dan penyakit jantung (AHA, 2014; Basu et al., 2013). Pada tahun 2014, diketahui prevalensi pasien DM adalah 422 juta dan diperkirakan pada tahun 2035 jumlah pasien DM menjadi 592 juta (Guariguata et al., 2013; WHO, 2016b).

Penelitian sebelumnya terkait upaya preventif, banyak yang berfokus pada prekondisi dengan restriksi (pembatasan) kalori yang menunjukkan hasil positif karena dapat memperbaiki kondisi DM. Namun dari segi prevalensi DM seperti disebutkan pada paragraf sebelumnya, prevalensi masih menunjukkan peningkatan, sehingga diperlukan metode preventif lain yang mungkin lebih mudah diaplikasikan yaitu metode diet prekondisi (*preconditioning*) dengan penambahan kalori secara bertahap yang dilakukan lebih dini. Preventif lebih dini ini sesuai dengan penemuan pada *Belfast study* yang menyebutkan bahwa penurunan fungsi sel beta sebesar 40%-50% telah terjadi sekitar 15 tahun sebelum terdiagnosis DM (Campos, 2012).

Metode prekondisi sebenarnya telah dilakukan sejak metode pengobatan Cina tradisional, namun berdasarkan karya yang dipublikasikan pada jurnal, baru teridentifikasi sejak tahun 1933 (Giuliano and Winnig, 2014). Prekondisi adalah pemberian *stressor* untuk peningkatan taraf kesehatan. Penelitian prekondisi yang telah dilakukan antara lain prekondisi *ischemic*, prekondisi *heat*, dan prekondisi diet. Penelitian yang berkaitan dengan prekondisi diet, antara lain berupa restriksi diet dan puasa yang menunjukkan hasil dapat meningkatkan angka harapan hidup dan fungsi ginjal (Mitchell et al., 2010). Pemberian diet asam lemak omega 3 yang bertujuan untuk menghadapi iskemia jantung (Abdukeyum, 2010). Prekondisi dengan bahan pengeblok Ca^{2+} dapat meminimalkan kerusakan sel beta akibat diberikan *stressor* hipoksia (Ma et al., 2013). Namun prekondisi penambahan kalori berupa glukosa secara kontinyu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas belum diketahui tentang pengaruh dan mekanismenya.

Ketahanan sel beta pankreas adalah hasil dari keseimbangan antara pembentukan dan apoptosis sel beta pankreas (Choi and Woo, 2010; Murtaugh, 2007). Pada keadaan fisiologis, sel beta yang mengalami apoptosis dapat diimbangi dengan adanya pembentukan sel beta,

sehingga fungsi sel beta dalam memproduksi insulin tetap normal. Ketahanan sel beta dapat ditinjau dari faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan sel maupun fungsi sel agar tetap normal yaitu antara lain faktor yang menghambat apoptosis yaitu *heat shock protein27* (Hsp27) dan Akt sebagai perangsang *promoter* insulin. Penurunan ketahanan sel beta seperti pada penelitian sebelumnya, yaitu pada subjek dengan diet tinggi kalori yang terus menerus (kontinyu) akan merangsang sel beta untuk mensintesis insulin secara berlebihan. Salah satu mekanisme yang melatarbelakangi adalah terjadi suatu keadaan yang disebut *endoplasmic reticulum stress* (ER stres). Telah diketahui bahwa ER bertanggung jawab dalam pengemasan suatu produk sel, termasuk sintesis insulin oleh sel beta. Jika hal tersebut terganggu maka dapat berakibat radikal bebas dan respons inflamasi meningkat, sehingga dapat mempengaruhi faktor-faktor ketahanan sel beta pankreas, dan akibatnya dapat mempengaruhi keseimbangan pembentukan dan apoptosis sel beta pankreas (Concannon et al., 2003; Papa, 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, dilakukan penelitian tentang mekanisme pengaruh prekondisi penambahan kalori berupa glukosa secara kontinyu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas yang dipapar diet tinggi glukosa.

Tabel 1.1 Rencana target capaian tahunan

No	Jenis luaran		Indikator capaian	
			TS	TS+1
1	Publikasi Ilmiah	Jurnal Internasional	accepted	-
		Nasional Terakreditasi		-
2	Pemakalah dalam pertemuan ilmiah	Nasional	-	-
		Internasional	-	-
3	Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah	Nasional	-	-
		Internasional	-	-
4	Visiting Lecturer	Internasional	-	-
5	Hak Kekayaan Intelektual	Paten	-	-
		Paten Sederhana	-	-
		Hak Cipta	-	-
		Merk Dagang	-	-
		Rahasia Dagang	-	-
		Desain Produk Industri	-	-
		Indikasi Geografis	-	-
Perlindungan Varietas Tanaman	-	-		
		Perlindungan Topografi Sirkuit	-	-
6	Teknologi Tepat Guna		-	-
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial		-	-
8	Buku Ajar (ISBN)		-	-
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		Skala 3	-

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah prekondisi penambahan diet glukosa secara kontinyu-bertahap dapat meningkatkan ekspresi Akt dan Hsp27 sel beta pankreas yang dipapar *stressor* diet tinggi glukosa?
2. Bagaimana mekanisme pengaruh prekondisi penambahan diet glukosa secara kontinyu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas?

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pankreas

Pankreas adalah organ kelenjar yang terdapat di rongga abdomen. Pankreas mempunyai fungsi sebagai kelenjar eksokrin yang menghasilkan enzim yang terlibat dalam proses pencernaan dan kelenjar endokrin yang menghasilkan hormon. Bagian pada pankreas dapat dibagi menjadi bagian prosesus uncinatus, kepala, badan, dan ekor (Hall and Guyton, 2016).

Sebagai kelenjar eksokrin, pankreas dapat mensekresi 1-2 liter cairan alkaline, yang juga mengandung sekitar 20 enzim atau prekursor enzim pencernaan (Hall and Guyton, 2016).

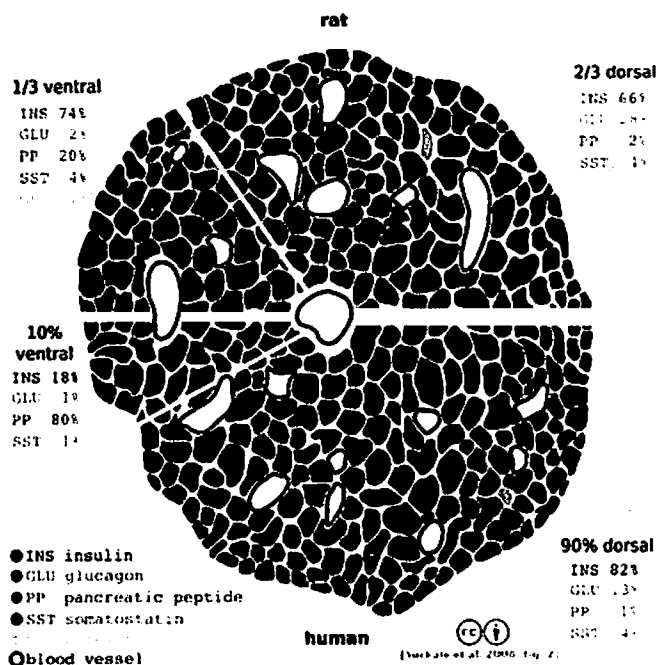
Dari segi embriologi, pankreas mulai terbentuk pada saat fetus berukuran 12-15 mm. Pada saat fetus berukuran 54 mm nampak pulau langerhans. Pada fetus yang telah matur, sel penyusun pulau langerhans mencapai sekitar 33%. Pada pankreas dewasa, sel penyusun pulau langerhans mencapai sekitar 20% dari massa pankreas. Jumlah pulau langerhans sekitar 1 juta dengan jumlah 3000 sel per langerhans. Pulau langerhans dibatasi oleh kelenjar eksokrin dan terdiri dari 4 jenis sel dan ada tambahan penemuan baru 1 jenis sel. Sel-sel tersebut adalah: alfa (terdapat di bagian tepi mengelilingi langerhans); beta (terdapat di bagian sentral), delta (terdapat di bagian tepi), PP (terdapat di bagian tepi), dan sel epsilon yang berfungsi mensekresi ghrelin (Murtaugh, 2007). Pada bagian kepala dan prosesus uncinatus dari pankreas banyak ditemukan sel PP dan sel delta yang mengelilingi sel beta, pada bagian badan dan ekor banyak ditemukan sel alfa dan sel delta, yang mengelilingi sel beta (O'Dowd and Stocker, 2013).

Sel alfa berfungsi mensekresi hormon glukagon, sel beta mensekresi insulin, sel delta berfungsi mensekresi somatostatin, dan sel PP mensekresi polipeptida pankreas (Sherwood, 2013).

Sekresi glukagon akan dirangsang oleh kadar glukosa darah yang menurun dan rangsangan simpatis, sedangkan penghambat sekresi glukagon adalah kadar glukosa darah tinggi, hormon insulin, dan somatostatin. Sel PP mensekresi polipeptida pankreas yang belum diketahui fungsinya, namun biasanya digunakan sebagai marker utama tumor endokrin pankreas (Sherwood, 2013).



Pada sel beta pankreas, banyak ditemukan organela retikulum endoplasma. Hal tersebut berkaitan dengan tugasnya dalam mengemas hormon insulin yang dihasilkan oleh sel beta (Papa, 2012).



Gambar Persentase 5 jenis sel pada langerhan pankreas pada manusia dan tikus (Suckale, 2008).

2.1.1 Pertumbuhan Pankreas

Menurut embriologi, pulau pankreas adalah termasuk organ yang berasal dari endoderm (pancreatic bud endoderm). Fungsi endokrin pulau pankreas ini dapat diukur sejak umur fetus 10-15 minggu. Insulin, glukagon, somatostatin, dan polipeptida pankreas (PP) mulai nampak ekspresinya pada minggu ke-12 s.d13 (Piper et al., 2004).

Sel progenitor yang mengekspresi Neurogenin3 (Ngn3) merupakan sel induk yang kemudian dapat menjadi 5 jenis sel endokrin. Sel-sel tersebut adalah alfa, beta, delta (terdapat di bagian tepi), PP, dan sel epsilon. Pada saat umur embrio mencit sekitar hari ke-11 (E11.5) ekspresi Ngn3 masih jarang, namun mencapai puncak pada sekitar hari ke-13 hingga sekitar hari ke-15 (E13.5-E15.5). Namun pada mencit neonatus dan dewasa tidak didapatkan ekspresi Ngn3 (Murtaugh, 2007; Piper et al., 2004).

Pada fase embryonik (trimester pertama), epitel pankreas mengekspresi *pancreas-duodenum homeobox 1 gene* (PDX1) atau disebut juga *insulin promoter factor* di nukleus dan CK19 di sitoplasma. Selanjutnya ketika sel yang mensekresi insulin terdeteksi, CK19 didapati menurun, namun PDX1 masih terdeteksi di sel beta fetus. Adanya mutasi pada gen

dari PDX1 akan memberikan dampak ekspresi PDX1 yang menurun, didapatkan pada diabetes mellitus (DM) pada usia muda (*maturity onset diabetes of the young* atau MODY) (Piper et al, 2004; O'Dowd et al, 2013). Dalam artikel yang ditulis oleh Murtaugh (2007), embrio mencit pada umur E11.5-E15.5 didapatkan ekspresi PDX1 tersebar di jaringan endoderm. Pada E17.5 mulai lebih spesifik pada langerhans, pada artikel lain (O'Dowd et al, 2013) langerhans lebih jelas nampak pada E18.5. Ketika lahir, terutama saat dewasa ekspresi PDX1 terdapat di langerhans (Murtaugh, 2007).

Pada tikus, setelah lahir, *window period* pertumbuhan langerhans pankreas secara fisiologis terjadi pada minggu ke-1 dan ke-2. Pada awalnya sel beta didapatkan menurun karena apoptosis namun akan digantikan dengan mekanisme neogenesis dari jaringan duktus epitelium (Petrik et al., 2001). Sedangkan pada embrio mencit, sel mulai mengekspresi untuk sel endokrin dimuali sejak E9.5, dengan glukagon lebih dulu diekspresi daripada insulin. Glukagon diketahui mulai terekspresi pada E11.5. namun mulai E15.5 hingga lahir (neonatus dan dewasa) ekspresinya menurun. Sedangkan ekspresi insulin mulai tampak pada E13.5 (masih sangat sedikit) dan lebih jelas terekspresi mulai E15.5 dan saat lahir dan dewasa, ekspresinya lebih banyak dari glukagon (Murtaugh, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Petrik et al (2001) menyebutkan bahwa IGF-II merupakan *islet cell mitogen dan survival factor* yang dapat melindungi sitokin yang menginduksi apoptosis. Dengan bertambahnya umur, kadar IGF-II akan menurun.

2.2 Diet Tinggi Kalori pada Pankreas

Penelitian yang banyak dilakukan yaitu diet tinggi karbohidrat yang diketahui dapat menyebabkan obesitas dan perubahan pankreas. Ketika sejak umur 4 hari anak tikus diberikan diet tinggi karbohidrat akan mengalami obesitas pada umur sekitar 60-100 hari. Sedangkan perubahan pada pankreas diketahui terjadi lebih awal mulai hari ke-6 s.d 24. Perubahan pankreas tersebut berupa peningkatan jumlah pulau langerhans per mm² namun pulau langerhans yang mempunyai luas dengan kategori kecil (<10.000 μm^2) mencapai 95-100%, sedangkan kelompok kontrol antara kategori kecil dan besar (>10.000 μm^2) mempunyai variasi perbandingan 35%:65% atau 50%:50% atau 60%:40% tergantung umur anak tikus. Ekspresi insulin (I) dan glukagon (G) pada pankreas yang dilihat dari rasio I/G terjadi peningkatan pada kelompok yang melakukan diet tinggi karbohidrat. Apoptosis sel juga didapatkan meningkat. Ekspresi IGF-II mRNA dan IGF-II pada langerhans pankreas menurun yang dapat diartikan zat pelindung langerhans berkurang, namun di area duktus

epitelium didapatkan IGF-II lebih tinggi karena daerah tersebut adalah daerah neogenesis (Petrik et al, 2001).

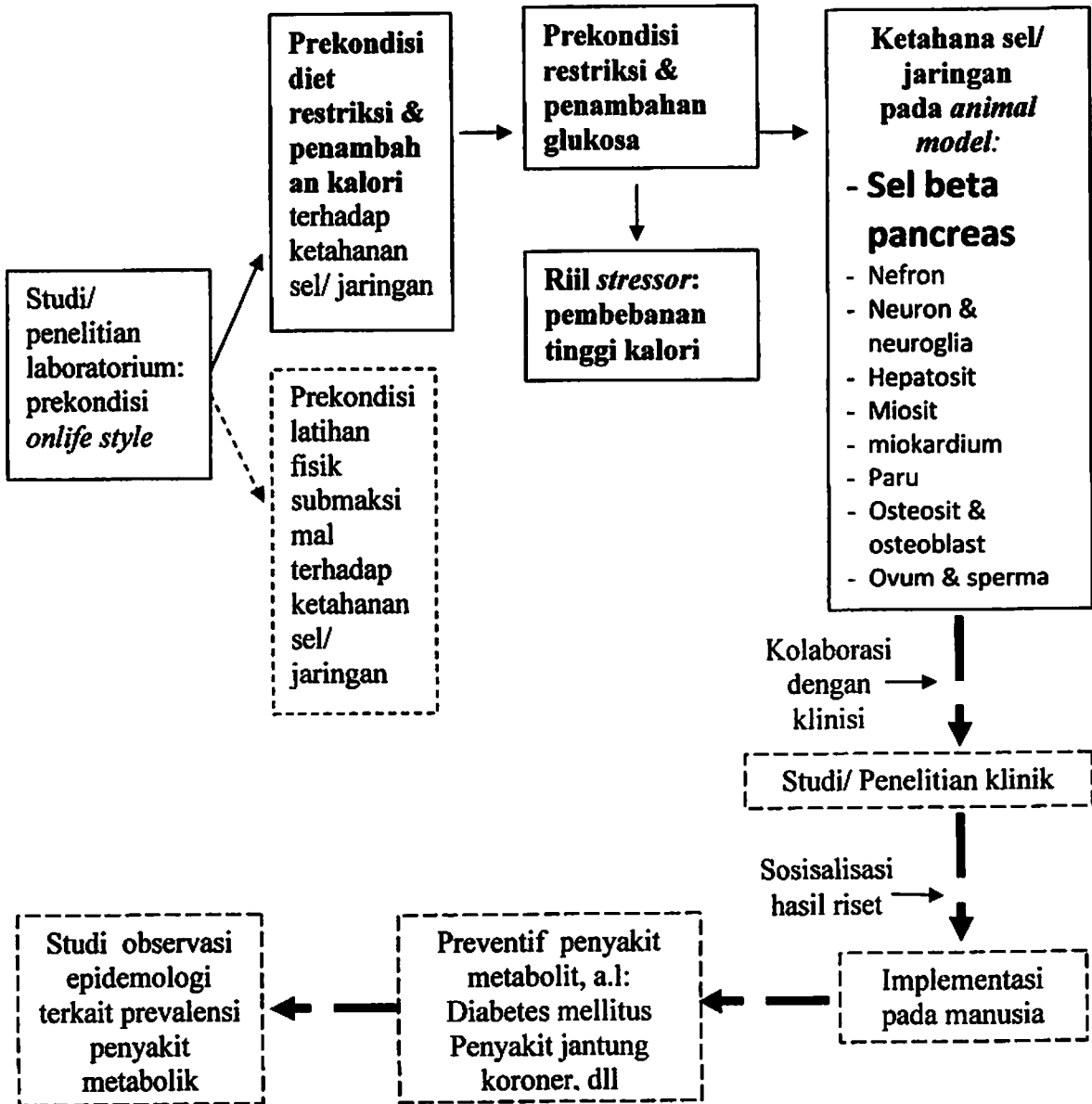
Penelitian yang dilakukan oleh Srinivasan et al. (2001) menyebutkan bahwa diet tinggi karbohidrat yang diberikan pada anak tikus sejak berumur 4 hari, terjadi kondisi hiperinsulinemia dalam 24 jam dan persisten. Hal tersebut dapat disebabkan adanya kompensasi akibat diet dengan tinggi kadar karbohidrat. Hal tersebut didukung dengan data peningkatan transkripsi gen preproinsulin (mRNA proinsulin) pada ekstraksi langerhans secara RT-PCR. Pemeriksaan mRNA PDX1 dan PDX1 yang merupakan *insulin promoter factor* pada pankreas mengalami peningkatan.

Pada induk tikus yang obes atau diberikan diet tinggi karbohidrat dan tikus tersebut bunting, didapatkan induk tikus tersebut dan anak tikus tersebut mengalami intoleransi glukosa, gangguan fungsi sel beta, menurunnya area langerhans, dan ekspresi PDX1 yang menurun (O'Dowd et al, 2013).

Diketahui pula, gula dengan jenis D-glukosa pada dosis 0,5-10mM (9-180mg) meningkatkan pertumbuhan sel yang mengekspresi insulin sebesar 20 kali lebih tinggi daripada media kultur pankreas tanpa glukosa yang diambil dari embrio tikus pada usia bunting E13.5. Media tersebut diamati dan dibandingkan pada hari pertama dan hari ke-7. Glukosa ini tidak memodifikasi pola Ngn3 yang merupakan penanda awal untuk sel progenitor endokrin, namun penting untuk ekspresi NeuroD yang merupakan target Ngn3 (Guillemain et al., 2007).

Pada pasien cedera otak yang diberi nutrisi perenteral secara konvensional berupa glukosa, dan diukur kadar titer anti Hsp27 dalam darah, didapatkan hasil kadar titer anti Hsp27 lebih tinggi daripada pasien yang diberikan insulin. Hal tersebut menunjukkan bahwa keadaan hiperglikemia dapat menurunkan Hsp27 (Mousavi et al., 2014).

1.4 Road map Penelitian



Keterangan: solid line & bold words : pada usulan penelitian saat ini

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan mekanisme pengaruh prekondisi penambahan diet glukosa secara kontinu-bertahap terhadap ketahanan hidup sel beta pankreas yang dipapar *stressor* diet tinggi glukosa.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pengaruh prekondisi penambahan diet glukosa secara kontinu-bertahap terhadap peningkatan ekspresi Akt dan Hsp27 sel beta pankreas yang dipapar *stressor* diet tinggi glukosa.
2. Menjelaskan mekanisme pengaruh prekondisi penambahan diet glukosa secara kontinu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

1. Dasar penelitian klinis untuk preventif penyakit metabolik DM.

1.4.2 Manfaat aplikatif

2. Diet interval yang tidak memberatkan sehingga dapat diaplikasikan lebih luas.
3. Dapat mencegah penyakit DM, sehingga dapat menurunkan prevalensi dan insiden penyakit DM.

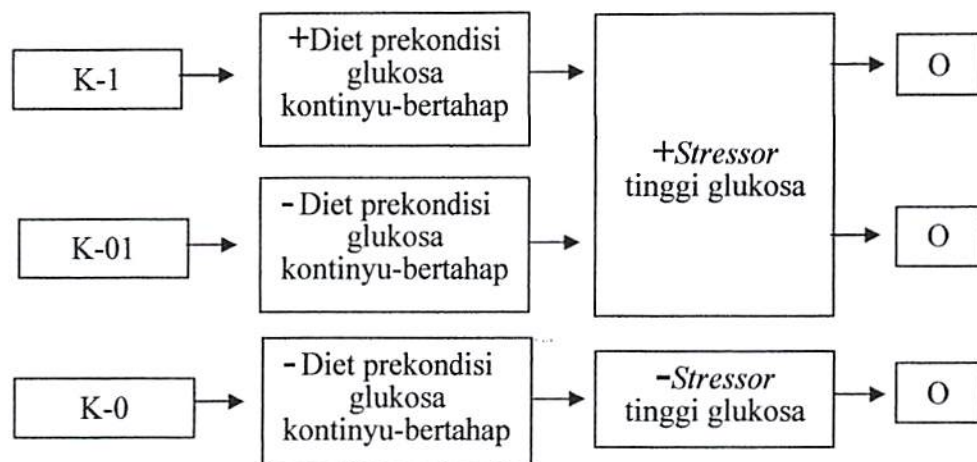


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain penelitian yaitu *post test only control group design*. Dengan skema sebagai berikut:

**Keterangan:**

- K-1 = kelompok kontinyu-bertahap.
 K-01 = kelompok kontrol positif.
 K-0 = kelompok kontrol negatif.
 O = Pengamatan dan penilaian variabel yang diteliti.

Gambar 3.1 Skema kelompok penelitian

4.2 Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jenis kelamin jantan, umur \pm 4 minggu, dan berat badan 15-20 g.

4.2.2 Besar Sampel

Estimasi besar sampel subjek penelitian dengan jumlah 3 kelompok, ditentukan dengan rumus Federer yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 9$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah subjek per kelompok

Berdasarkan hitungan tersebut di atas, didapatkan besar sample 9 subjek per kelompok.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah teknik yang dilakukan dengan cara *simple random*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

4.3.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas terdiri dari: diet prekondisi tambahan sonde glukosa kontinyu-bertahap dan *stressor* tambahan sonde tinggi glukosa setiap hari.

4.3.1.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung terdiri dari: Kadar glukosa darah, ekspresi Akt sel beta pankreas, dan ekspresi Hsp27 sel beta pankreas.

4.3.2 Definisi operasionalvariabel

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel penelitian	Definisi operasional	Metode pengukuran	Skala data
Variabel independen				
1	Diet prekondisi tambahan sonde glukosa kontinyu-bertahap	Mencit diberikan diet standar dan setiap hari diberikan tambahan sonde glukosa dengan dosis yang dinaikkan bertahap setiap minggu. Dosis glukosa minggu ke-1= 0,05 g/g BB; minggu ke-2= 0,07 g/g BB; minggu ke-3= 0,09g/g BB; dan minggu ke-4=0,011 g/g BB. Jumlah volume larutan yang disonde sekitar 0,3-1 ml	Diberikan sonde atau tidak	Nominal
2	<i>Stressor</i>	Setelah diberikan diet prekondisi (pada	Diberik	Nomi-

	tambahan sonde tinggi glukosa setiap hari	minggu ke-5 s.d ke-8), mencit diberikan diet standar dan setiap hari diberikan tambahan sonde glukosa dengan dosis tinggi (0,013g/g BB), setiap hari, selama 4 minggu. Jumlah volume larutan yang disonde sekitar 0,3-1 ml	an sonde atau tidak	nal
Variabel dependen				
1	Kadar glukosa darah	Diukur pada awal perlakuan, pertengahan (sekitar akhir minggu ke-4), dan akhir perlakuan (sekitar minggu ke-8). Diukur dengan alat accucheck performa Roche, satuan kadar adalah mg/dl	Glucometer	Rasio
2	Ekspresi Akt	Diukur dengan cara menghitung jumlah sel beta yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoclonal anti Akt. Penghitungan dilakukan pada 2 slide dan tiap slide dilihat pada lima pulau Langerhans yang berbeda dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Jumlah sel beta yang positif mengekspresi Akt dihitung dari rerata 10 pulau Langerhans.	Imunohistokimia (IHC)	Rasio
2	Ekspresi Hsp27	Diukur dengan cara menghitung jumlah sel beta yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoclonal anti Hsp27. Penghitungan dilakukan pada 2 slide dan tiap slide dilihat pada lima pulau Langerhans yang berbeda dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Jumlah sel beta yang positif mengekspresi Hsp27 dihitung rerata dari 10 pulau Langerhans.	Imunohistokimia (IHC)	Rasio

4.4 Bahan Penelitian

Bahan penelitian ini antara lain adalah:

1. Hewan coba mencit (*Mus musculus*) Balb/c jantan, sehat, umur \pm 4 bulan, berat badan sekitar 15-20 g, diberi pakan pelet.
2. Larutan glukosa yaitu larutan dextrose 40 (D40) merk Otsu yang berisi *glucose monohydrate*.
3. Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat imunohistokimia dan preparat Hematoxylin-Eosin.

4.5 Instrumen Penelitian

Beberapa instrumen penelitian yang digunakan antara lain:

1. Kandang mencit individual, ukuran 15x15x25 cm, terbuat dari plastik ditutup kawat kasa, dilengkapi botol minum,
2. Timbangan digital, untuk menimbang berat badan mencit dan pakan.
3. Sonde dengan ukuran 1cc, pot kecil tempat jaringan, kertas label, alat tulis, *micropipette*, *microwell plat*, alat sentrifugasi, alat inkubasi, kertas tissue, sarung tangan, masker, gelas obyek biasa, gelas obyek berlapis poly-L lysine, *cover glass*.
4. *Surgery set*
5. Glukometer accucheck
6. Mikroskop cahaya merek Olympus.
7. *Software image J* dan *image Raster*

4.6 Lokasi Penelitian

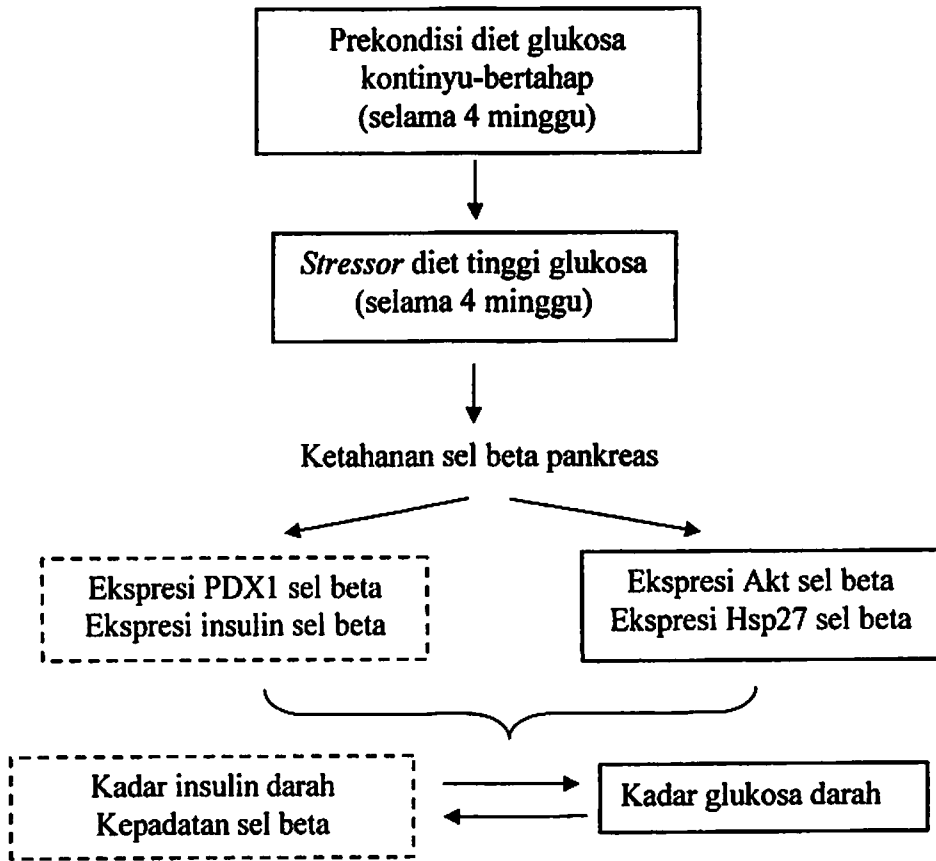
Penelitian dilakukan di unit hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

4.7 Pengolahan dan Analisis Data

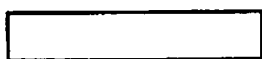
Data hasil penelitian diolah dan dianalisis dengan uji statistik deskriptif, uji normalitas, uji homogenitas, dan uji beda. Besar taraf signifikansi ditetapkan 5%.

4.8 Bagan Penelitian

“Mekanisme Pengaruh Prekondisi Diet Glukosa secara Kontinyu-Bertahap terhadap Ketahanan Sel Beta Pankreas yang Dipapar Diet Tinggi Glukosa”



Keterangan:



Diajukan pendanaan Penelitian Disertasi Doktor



Variabel lain dari disertasi

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Varibale penelitian berupa ekspresi Akt, Hsp27, dan insulin pada sel beta dapat dilihat pada tabel 5.1. Perbedaan bermakna terjadi pada ekspresi Hsp27, sedangkan yang lain tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Pembahasan setiap variabel pada sub bab berikut.

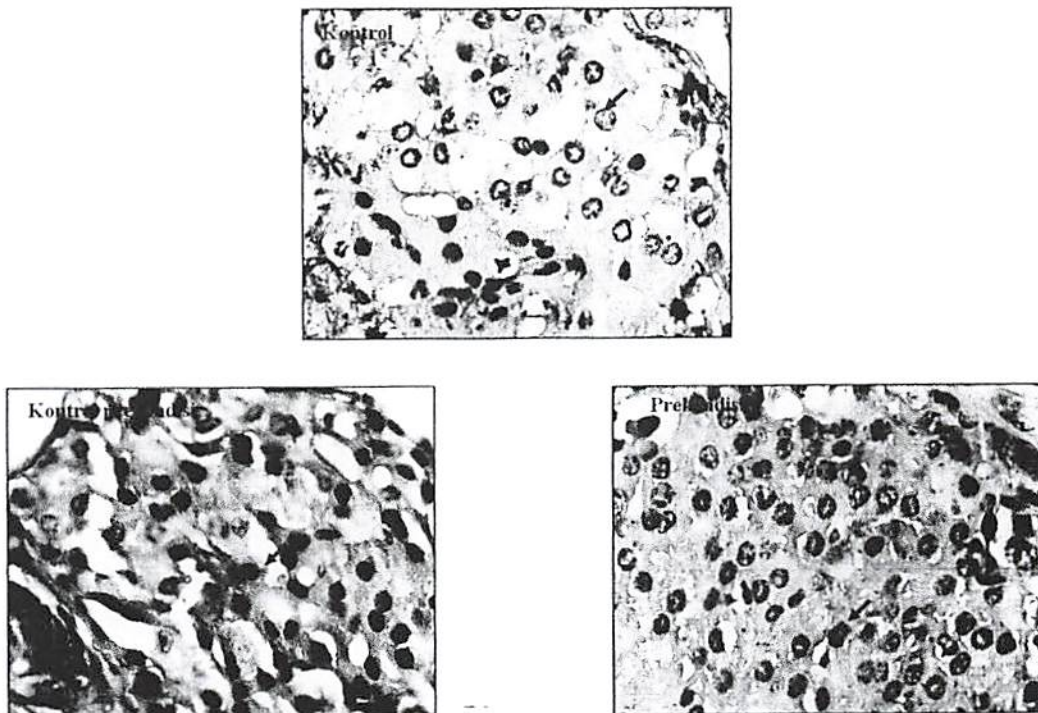
Tabel 5.1 Rerata variabel penelitian

Kelompok	n	Ekspresi		
		Akt	Hsp27	Insulin
Kontrol	9	5,69±2,86	5,86±2,18 ^a	5,29±1,29
Kontrol prekondisi	9	6,02±2,00	5,71±1,68 ^a	6,55±1,31
Prekondisi	9	5,44±2,24	3,82±0,96 ^b	5,49±1,30
	p	0,877	0,029	0,106

Superscript berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

5.1 Ekspresi Akt Sel Beta

Rerata skor ekspresi Akt sel beta paling tinggi adalah kelompok 'kontrol prekondisi', sedangkan skor ekspresi terendah adalah kelompok prekondisi. Meski demikian, secara statistik tidak ada perbedaan bermakna.



Gambar 5.1. Perbandingan Ekspresi Akt Sel Beta (panah) Antar Kelompok. Pada slide diatas nampak bahwa ekspresi Akt pada kelompok kontrol prekondisi lebih kuat (persentase sel positif dan intensitas warna) dibandingkan dengan kelompok lain. Pewarnaan immuno histokimia (IHC), Pembesaran 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel

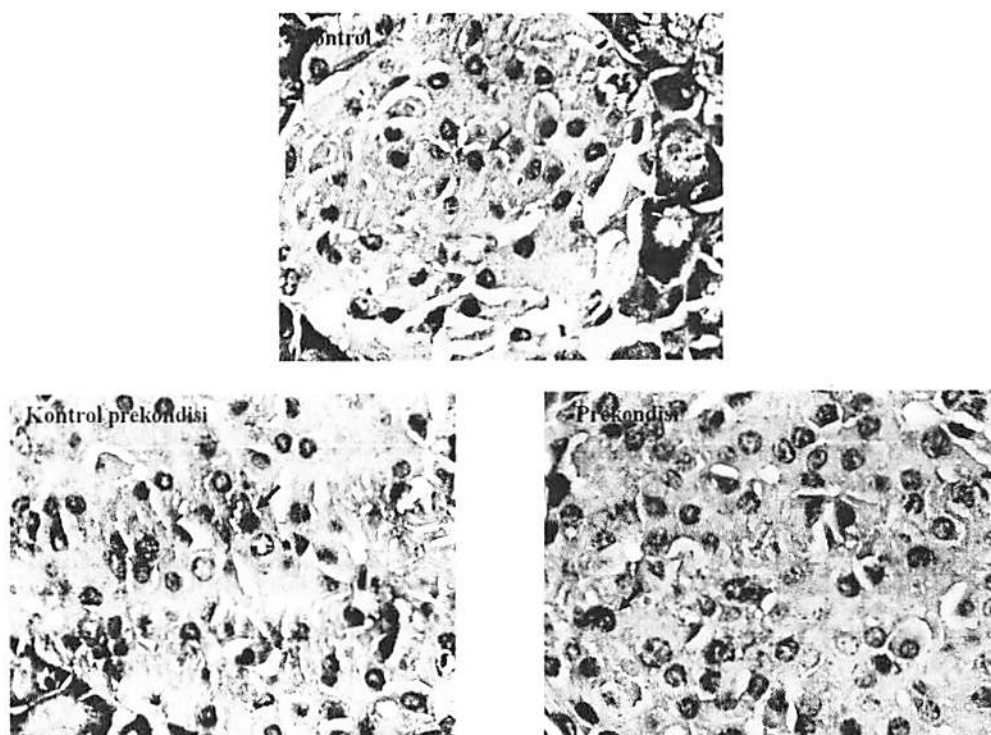
Perbedaan ekspresi Akt sel beta yang tidak bermakna dan dengan selisih skor antar kelompok yang kecil yaitu 0,33-0,58 menunjukkan bahwa prekondisi ini belum mampu memberikan pengaruh pada Akt.

Pada penelitian sebelumnya, terkait Akt menunjukkan hasil yang berbeda tergantung organ yang diperiksa. Penelitian dengan diet glukosa selama 24 minggu rasio phospho-Akt/Akt pada hepar menunjukkan peningkatan yang tidak berbeda dengan kontrol, dan pada otot skelet menunjukkan sedikit penurunan yang tidak berbeda bermakna daripada kontrol (Forbes *et al.*, 2013).

Akt diketahui juga berperan sebagai mediator insulin dalam metabolisme glukosa. Ada beberapa positif regulator yang berperan pada Akt antara lain Hsp27. Rangsangan oleh glukosa yang berkepanjangan (*prolong*) dapat mengaktivasi signal Akt. Insulin pun juga dapat mengaktivasi Akt (Elghazi *et al.*, 2007). Pada penelitian ini, ekspresi Akt menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna, sehingga kadar glukosa darah, kadar insulin, dan kadar Hsp27 yang berbeda antar kelompok, kemungkinan melalui jalur lain selain jalur melalui Akt. Tidak adanya keterlibatan Akt dalam mekanisme pada perlakuan ini juga diperkuat dengan hasil statistik regresi analisis jalur, yang menunjukkan bahwa perlakuan ini tidak memberikan perbedaan bermakna pada Akt. Hal tersebut dapat disebabkan perlakuan yang diberikan berbeda dengan penelitian sebelumnya, yaitu menggunakan hewan coba mencit yang dimanipulasi secara genetik (faktor internal). Sedangkan pada penelitian ini yang dimanipulasi adalah faktor eksternal berupa pemberian diet.

5.2 Ekspresi Hsp27 Sel Beta

Rerata skor ekspresi Hsp27 sel beta menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok. Pada kelompok prekondisi skor ekspresi Hsp27 menunjukkan skor yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain. Rerata ekspresi Hsp27 sel beta yang paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol yang berbeda bermakna dengan kelompok prekondisi, tetapi tidak berbeda bermakna dengan kelompok 'kontrol prekondisi'. Kelompok prekondisi pun, meskipun skor nilai ekspresi Hsp27 lebih rendah, menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna dengan kelompok 'kontrol prekondisi'.



Gambar 5.2. Perbandingan Ekspresi Hsp27 Sel Beta (panah) Antar Kelompok. Pada slide diatas nampak bahwa ekspresi Hsp27 pada kelompok prekondisi lebih lemah (persentase sel positif dan intensitas warna) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pewarnaan immuno histokimia (IHC), Pembesaran 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel.

Berdasarkan kepadatan sel juga didapatkan bahwa dengan penurunan Hsp27, tidak didapatkan perbedaan bermakna pada kepadatan sel. Hal tersebut dapat berarti apoptosis tidak terjadi, tetapi Hsp27 menurun. Fenomena ini dapat dijelaskan karena dalam sel beta, selain Hsp27 terdapat Hsp yang lain yang bersifat protektif seperti Hsp90 yang pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan.

Hsp27 merupakan *ATP-independent* yang berperan antara lain sebagai *anti-apoptotic*. Hsp27 diinduksi oleh HSFs (*heat shock transcription factors*) akibat adanya stressor (Wang *et al.*, 2014). Namun pada keadaan diet prekondisi glukosa, ekspresi Hsp27 sel beta mengalami penurunan. Hal tersebut dapat disebabkan karena karakter Hsp27 yang *ATP-independent* sehingga pada keadaan yang telah ‘dibiasakan’ mempunyai energi (ATP) yang lebih banyak karena paparan glukosa, menjadikan ekspresi Hsp27 sel beta menjadi lebih rendah. Sedangkan pada ‘kontrol prekondisi’ yang langsung diberikan *stressor* diet tinggi glukosa, belum ada respon terhadap perubahan yang mendadak tersebut, sehingga ekspresi Hsp27 sel beta hanya sedikit lebih rendah dari kelompok kontrol.

Ekspresi Hsp27 yang disebutkan sebagai *anti-apoptotic agent*, namun di sisi lain peningkatan Hsp27 juga disebutkan dapat meningkatkan *tumorigenesis* seperti pada kasus

keganasan pada kanker paru, didapatkan peningkatan ekspresi Hsp27 pada jaringan paru (B. Sheng *et al.*, 2017). Pada penelitian prekondisi diet glukosa ini, ekspresi Hsp27 tidak menunjukkan peningkatan, bahkan lebih rendah dari kontrol sehingga mekanisme *anti-apoptotic agent* lebih kuat dan sulit sekali untuk sampai memberikan efek peningkatan massa sel beta, apalagi sampai terjadi *tumorigenesis*.

Dari literatur disebutkan bahwa glukosa darah yang tinggi dapat memicu reaksi glikasi dengan produk berupa *glyoxal*, *3-deoxyglucosone*, dan *methylglyoxal* (MG) (Nowotny *et al.*, 2015). Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa reaksi tersebut dapat memodifikasi Hsp27 sehingga terbentuk modifikasi *methylglyoxal* (MG) dari Hsp27 (Oya-Ito Tomoko *et al.*, 2011; Sakamoto *et al.*, 2000). Produk tersebut berperan sebagai anti apoptosis (Sakamoto *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini, kelompok prekondisi dapat pula memberikan proteksi sejak awal melalui Hsp27 untuk sel beta sehingga secara fungsional Hsp27 yang sebelumnya banyak terekspresi, ketika adanya paparan diet glukosa, Hsp27 banyak digunakan, sehingga Hsp27 yang tersisa dan terukur menjadi rendah. Sedangkan kelompok kontrol, mekanisme proteksi tersebut tidak banyak diperlukan, sehingga skor ekspresi Hsp27 sel beta mempunyai skor yang paling tinggi dan secara struktural dan fungsional sel beta dalam mensekresi insulin dalam keadaan baik. Pada kelompok 'kontrol prekondisi', paparan diet glukosa terjadi lebih akhir dibandingkan kelompok prekondisi, sehingga Hsp27 belum banyak yang memberikan efek proteksi sel beta, sehingga ekspresi Hsp27 yang terbaca masih lebih tinggi daripada kelompok prekondisi. Hal tersebut juga tampak dari kadar insulin serum yang rendah pada kelompok 'kontrol prekondisi'. Meskipun kepadatan sel beta dan skor ekspresi insulin sel beta pada kelompok 'kontrol prekondisi' masih tinggi, yang artinya secara struktural masih teridentifikasi sel beta, namun secara fungsional terkait sekresi insulin telah mengalami gangguan, yang kemungkinan akibat adanya *ER stress*.

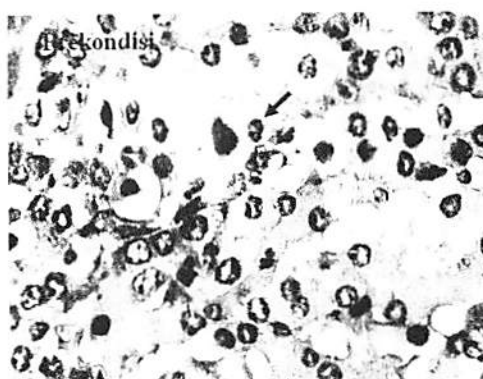
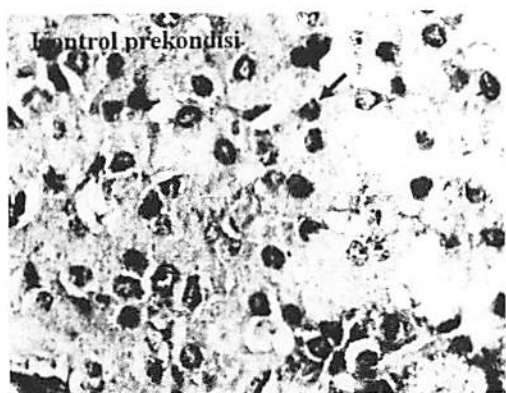
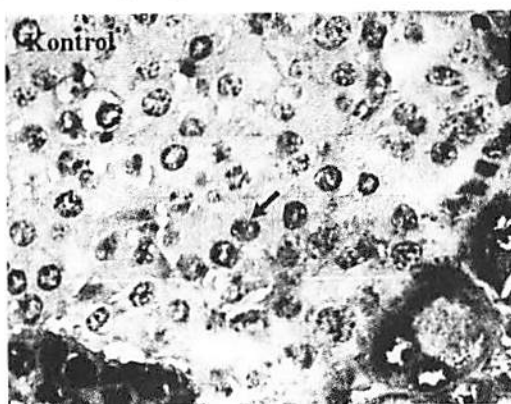
Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Mousavi *et al.* (2014) tentang efek kadar glukosa terhadap Hsp27 pada pasien cedera otak di ICU. Mousavi menyebutkan bahwa Hsp27 adalah faktor stress, dan dengan menurunkan kadarnya, sebagai indikator penurunan stres.

Studi oleh Pourhamidi *et al.* (2014) pada pasien DM tipe 1 dengan memeriksa Hsp27 serum didapatkan bahwa kadar Hsp27 DM tipe 1 lebih rendah daripada subjek kontrol yang sehat. Kadar Hsp27 diperiksa pada pasien DM tipe 1 yang rerata telah diderita selama sekitar 20 tahun dan diulang pemeriksaanya setelah 13 tahun atau telah menderita DM sekitar 33 tahun, kadar Hsp27 serum mempunyai kecenderungan yang menurun dan diketahui juga

berhubungan dengan gangguan pada saraf. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Pourhamidi *et al.* (2014) tersebut, meskipun dengan tempat pengambilan spesimen yang berbeda. Nampaknya, tidak sekedar dosis glukosa yang masuk ke dalam tubuh yang harus diperhatikan, durasi paparan diet tinggi glukosa perlu dipertimbangkan pula.

5.3 Ekspresi Insulin Sel Beta

Skor ekspresi insulin sel beta menunjukkan rerata yang paling tinggi pada kelompok 'kontrol prekondisi' dan yang terendah adalah kelompok kontrol, tetapi perbedaan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik.



Gambar 5.3. Perbandingan Ekspresi Insulin Sel Beta (panah) Antar Kelompok. Pada slide diatas nampak bahwa ekspresi insulin pada kelompok kontrol prekondisi lebih kuat (persentase sel positif dan intensitas warna) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pewarnaan immuno histokimia (IHC), Pembesaran 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel.

Rerata ekspresi insulin sel beta kelompok kontrol menunjukkan kecenderungan yang lebih rendah, namun jika dibandingkan dengan kadar insulin serum mempunyai kadar yang paling tinggi. Pada kelompok 'kontrol prekondisi', ekspresi insulin sel beta menunjukkan nilai yang paling tinggi, namun tidak sejalan dengan kadar insulin serum yang mempunyai kadar terendah.

Hasil tersebut berbeda dengan riset yang menggunakan *drosophila* yang diberi diet tinggi karbohidrat. Pada *drosophila* dengan diet tinggi karbohidrat, didapatkan sel yang memproduksi insulin tidak ada perubahan. Namun terjadi peningkatan DILPs (*Drosophila* insulin-like Peptides) yang artinya terjadi kompensasi dari keadaan hiperglikemia tersebut (Musselman *et al.*, 2011).

Review oleh Fu *et al.* (2013) dan literatur oleh Suckale (2008) menjelaskan bahwa glukosa penting sebagai regulator sintesis protein. Pada riset invitro menunjukkan bahwa pada keadaan dengan kondisi kadar glukosa yang rendah, terjadi penurunan insulin mRNA dan pada kadar glukosa tinggi terjadi peningkatan. Insulin mRNA yang terlibat translasi sehingga dapat mempengaruhi ekspresi insulin pada sel beta.

Hal tersebut menimbulkan suatu pertanyaan yaitu mungkin ada mekanisme lain yang memicu pelepasan insulin oleh sel beta ke sirkulasi yang berkaitan dengan perlakuan ini. Mekanisme tersebut mungkin berkaitan dengan *ER stress*, dimana kondisi paparan glukosa tinggi akan memicu radikal bebas akibat reaksi glikasi dan laju metabolisme yang tinggi, kemudian mengganggu dalam pengemasan insulin untuk dilepaskan ke sirkulasi (Papa, 2012). Oleh karena itu, meskipun skor ekspresi insulin sel beta pada kelompok 'kontrol prekondisi' paling tinggi, namun secara fungsional dalam mensekresi insulin ke sirkulasi terjadi gangguan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang selanjutnya diberikan *stressor* diet tinggi glukosa, tidak meningkatkan ekspresi Akt sel beta, namun, menurunkan ekspresi Hsp27 sel beta. Hal tersebut sebagai mekanisme proteksi akibat adanya hiperglikemia supaya regulasi kadar glukosa darah relatif tetap terjaga.
2. Mekanisme pengaruh prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang selanjutnya diberikan *stressor* diet tinggi glukosa, diketahui melalui jalur Hsp27 yang kemudian merangsang ekspresi insulin sel beta, namun selanjutnya menurunkan kadar insulin serum. Meskipun kadar insulin serum menurun, namun dengan prekondisi diketahui masih lebih baik daripada tidak diberikan prekondisi.

6.2 Saran

Walaupun hasil penelitian ini dapat memberikan tambahan informasi ilmiah mengenai pengaruh dan mekanisme prekondisi diet glukosa kontinyu-bertahap, tetapi masih banyak pertanyaan yang muncul sehingga penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk memperluas penjelasan teoritik dan kelak penerapannya antara lain:

1. Penelitian lanjutan dengan memeriksa variabel lain yang terlibat dalam mekanisme prekondisi diet glukosa kontinyu-bertahap sehingga didapatkan mekanisme yang relatif lengkap sebagai upaya preventif atau antisipasi gangguan metabolik terutama berkaitan dengan glukosa.
2. Pengembangan penelitian prekondisi diet berupa kombinasi diet dosis tinggi kalori dengan interval restriksi kalori, seperti pada kondisi puasa, terhadap ketahanan sel beta.
3. Pengembangan penelitian prekondisi diet terhadap organ lain selain pankreas misal ginjal, otak, otot, jantung, hepar, dan pembuluh darah.



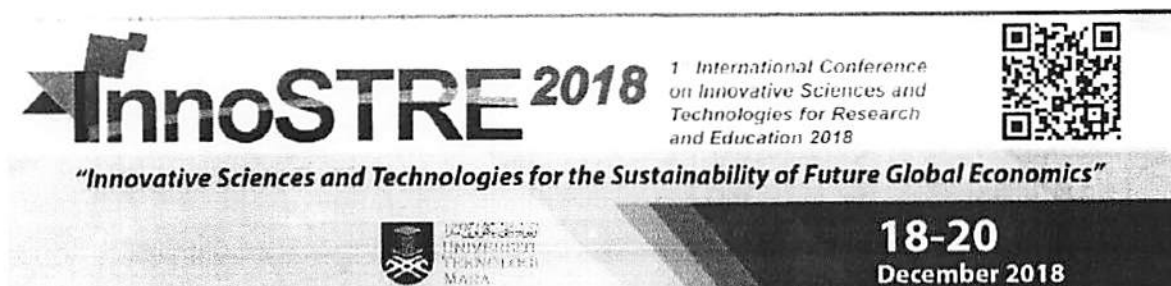
DAFTAR PUSTAKA

- Abdukeyum, G.G., 2010. Dietary omega-3 fatty acids, nutritional preconditioning of the heart against ischemic injury. Dr. Philos. Univ. Wollongong. University of Wollongong.
- AHA, 2014. Added Sugars Add to Your Risk of Dying from Heart Disease [WWW Document]. URL http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyEating/Nutrition/AddedSugarAddtoYourRiskofDyingfromHeartDisease_
- Basu, S., Yoffe, P., Hills, N., Lustig, R.H., 2013. The Relationship of Sugar to Population-Level Diabetes Prevalence: An Econometric Analysis of Repeated Cross- Sectional Data. *PLoS One* 8.
- Campos, C., 2012. Chronic Hyperglycemia and Glucose Toxicity: Pathology and Clinical Sequelae. *Postgrad. Med.* 124, 1–8.
- Cargill, 2016. Changes in food security: A 50 - year view. *World Trends in Daily Calorie Consumption* [WWW Document]. URL <http://www.cargill.com/corporateresponsibility/>
- Choi, D., Woo, M., 2010. Executioners of apoptosis in pancreatic β -cells: not just for cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, 735–741.
- Concannon, C.G., Gorman, A.M., Samali, A., 2003. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61–70.
- Giuliano, V., Winnig, M., 2014. Preconditioning-Adaptive Response In Biology and Medicine [WWW Document]. 2014 Annu. Meet. Int. Dose Response Soc. URL <http://www.antiagingfirewalls.com/2014/05/07/preconditioning?adaptive?response?in?biology?and?medicine?report?on?the?2014?annual?meeting?of?the?int...>
- Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 103, 137–149.
- Guillemain, G., Filhoulaud, G., Silva-xavier, G. Da, Rutter, G.A., Scharfmann, R. I., 2007. Glucose Is Necessary for Embryonic Pancreatic Endocrine Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* 282, 15228–15237.
- Hall, J.E., Guyton, A.C., 2016. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 13th ed, Journal of Chemical Information and Modeling. Elsevier, Philadelphia.
- Ma, Z., Moruzzi, N., Catrina, S.B., Hals, I., Oberholzer, J., Grill, V., Björklund, A., 2013. Preconditioning with Associated Blocking of Ca^{2+} Inflow Alleviates Hypoxia-Induced Damage to Pancreatic β -Cells. *PLoS One* 8, 1–12.
- Mitchell, J.R., Verweij, M., Brand, K., Ven, M. van de, Goemaere, N., Engel, S. van den, Chu, T., Forrer, F., Müller, C., Jong, M. de, Ijcken, W. van, IJzermans, J.N.M., Hoeijmakers, J.H.J., Bruin, R.W.F. de, 2010. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* 9, 40–53.
- Mousavi, S.N., Samini, F., Nematy, M., Philippou, E., Tavallaie, S., Norouzy, A., 2014. Hyperglycemia and antibody titres against heat shock protein 27 in traumatic brain injury patients on parenteral nutrition. *Iran J Basic Med Sci* 17, 119–122.
- Murtaugh, L.C., 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134, 427–438.
- O'Dowd, J.F., Stocker, C.J., 2013. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Front Physiol.* 4, 1–16.
- Papa, F.R., 2012. Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic β -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2a007666 2, 1–18.
- Petrik, J., Srinivasan, M., Aalinkeel, R., Coukell, S., Arany, E., Patel, M.S., Hill, D.J., 2001. A Long-Term High-Carbohydrate Diet Causes an Altered Ontogeny of Pancreatic Islets of Langerhans in the Neonatal Rat. *Pediatr. Res.* 49, 84–92.

- Piper, K., Brickwood, S., Turnpenny, L.W., Cameron, I.T., Ball, S.G., Wilson, D.I., Hanley, N.A., 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J. Endocrinol.* 181, 11–23.
- Sherwood, L., 2013. *Human Physiology: From Cells to Systems*, 8th ed. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont.
- Srinivasan, M., Song, F., Aalinkeel, R., Patel, M.S., 2001. Molecular adaptations in islets from neonatal rats reared artificially on a high carbohydrate milk formula. *J. Nutr. Biochem.* 12, 575–584.
- Suckale, J., 2008. Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Front. Biosci.* Volume, 7156.
- WHO, 2016a. Global and regional food consumption patterns and trends [WWW Document]. URL http://www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/print.html
- WHO, 2016b. *Global Report on Diabetes*, WHO Library. France.

LAMPIRAN

Artikel (status submit): pada pertemuan ilmiah yang berpotensi dipublikasikan di jurnal internasional)



Our Ref : 100-UiTMKS(innoSTRE2018/presenter/ID037)

Date : 9 November 2018

Lilik Herawati,
Department of Physiology,
Faculty of Medicine, Universitas Airlangga,
Jl. Prof Moestopo 47, Surabaya,
60131, Indonesia

Dear Prof/Dr/Mr/Ms,

SUBJECT: ACCEPTANCE OF PAPER FOR ORAL PRESENTATION

The 1st International Conference on Innovative Sciences and Technologies for Research and Education 2018 (InnoSTRE 2018) is pleased to inform you that your paper entitled “**High Glycemic Index Diet Decrease Insulin Secretion Without Altering Akt and Pdx1 Expression on Pancreatic Beta Cells Mice**” has been accepted for oral presentation at InnoSTRE2018. The conference will be held in Kuching, Sarawak, Malaysia from 18th to 20th December 2018.

All accepted papers will be submitted for publication in Scopus indexed *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences/ Scopus indexed International Journal of Phytomedicines and Related Industries/ International Journal of Service Management and Sustainability (indexed by MyJurnal)/ other indexed journals. The publication decision will be made by the conference technical committee based on panel reviewers' recommendation, taking into account the quality and content suitability of the articles submitted.*

Authors of accepted papers are invited to register, make payment, attend and present their research paper. It will be the responsibility of the presenter/ participant to arrange own accommodation and transportation for this conference.

We look forward to seeing you at the conference.

Best regards,

Associate Professor Dr Khong Heng Yen
Local Chair of InnoSTRE2018

ANALISIS MEKANISME PENGARUH PREKONDISI DIET GLUKOSA SECARA KONTINYU-BERTAHAP TERHADAP AKT DAN HSP27 SEL BETA PANKREAS YANG DIPAPAR STRESSOR DIET TINGGI GLUKOSA



Peneliti

LILIK HERAWATI

Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga
lilik_heraw@fk.unair.ac.id

GADIS MEINAR SARI

Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga

ROEDI IRAWAN

Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga



Ringkasan Eksekutif

Konsumsi kalori dari tahun ke tahun menunjukkan peningkatan (WHO, 2016a). Penambahan kalori 100-150 Kcal/orang/hari telah diketahui dapat meningkatkan risiko penyakit metabolik seperti diabetes mellitus (DM) dan penyakit jantung (AHA, 2014; Basu et al., 2013). Penelitian sebelumnya terkait upaya preventif, banyak berfokus pada prekondisi dengan restriksi kalori menunjukkan hasil positif dapat memperbaiki kondisi DM. Namun, prevalensi DM ternyata masih menunjukkan peningkatan, sehingga diperlukan metode preventif lain yang lebih mudah diaplikasikan seperti metode prekondisi diet dengan penambahan kalori secara bertahap. Penelitian prekondisi yang telah dilakukan antara lain prekondisi *ischemic*, prekondisi *heat*, dan prekondisi diet. Penelitian yang berkaitan dengan prekondisi diet, antara lain berupa restriksi diet dan puasa yang menunjukkan hasil dapat meningkatkan angka harapan hidup dan fungsi organ. Namun prekondisi penambahan glukosa secara kontinyu-bertahap sejak usia dini terhadap ketahanan sel beta pankreas belum diketahui terkait pengaruh dan mekanismenya.

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian analisis mekanisme pengaruh prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang kemudian dipapar dengan *stressor* diet tinggi glukosa terhadap ketahanan sel beta pankreas melalui Akt dan Hsp27 sel beta pankreas. Akt berperan dalam merangsang *promoter* insulin dan Hsp27 berperan sebagai penghambat pengaktifan caspase jalur apoptosis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi Akt sel beta dan insulin sel beta menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p \geq 0,05$). Rerata Akt, kelompok prekondisi paling rendah. Rerata ekspresi insulin kelompok 'kontrol prekondisi' mempunyai skor tertinggi. Ekspresi Hsp27 menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,043$), yaitu kelompok kontrol dengan kelompok prekondisi ($x=5,856 \pm 2,1755$; $x=3,822 \pm 0,9615$; $p=0,043$), sedangkan kelompok 'kontrol prekondisi' ($x=5,711 \pm 1,6766$) dan kelompok prekondisi, serta kelompok 'kontrol prekondisi' dan kelompok kontrol, tidak menunjukkan perbedaan bermakna.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap dapat bermanfaat untuk menyiapkan tubuh dalam menghadapi *stressor* yang berat. Mekanisme yang terlibat dalam perlakuan ini adalah melalui ekspresi Hsp27 dan ekspresi insulin sel beta, yang mempengaruhi kadar insulin serum untuk meregulasi kadar glukosa darah. Namun, perlu penyelidikan lebih lanjut untuk menemukan modulator lain yang terlibat untuk mekanisme lebih rinci.

Kata kunci: prekondisi diet, glukosa, sel beta pankreas, Akt, Hsp27



HKI dan Publikasi

1. Publikasi Ilmiah dan

Latar Belakang

Konsumsi kalori dari tahun ke tahun menunjukkan peningkatan (Cargill, 2016; WHO, 2016a). Penambahan kalori 100-150 Kcal/orang/hari telah diketahui dapat meningkatkan risiko penyakit metabolik seperti diabetes mellitus (DM) dan penyakit jantung (AHA, 2014; Basu et al., 2013). Pada tahun 2014, diketahui prevalensi pasien DM adalah 422 juta dan diperkirakan pada tahun 2035 jumlah pasien DM menjadi 592 juta (Guariguata et al., 2013; WHO, 2016b).

Metode prekondisi sebenarnya telah dilakukan sejak metode pengobatan Cina tradisional, namun berdasarkan karya yang dipublikasikan pada jurnal, baru teridentifikasi sejak tahun 1933 (Giuliano and Winnig, 2014). Penelitian yang berkaitan dengan prekondisi diet, antara lain berupa restriksi diet dan puasa yang menunjukkan hasil dapat meningkatkan angka harapan hidup dan fungsi ginjal (Mitchell et al., 2010). Namun prekondisi penambahan kalori berupa glukosa secara kontinyu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas belum diketahui tentang pengaruh dan mekanismenya.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, dilakukan penelitian tentang mekanisme pengaruh prekondisi penambahan kalori berupa glukosa secara kontinyu-bertahap terhadap ketahanan sel beta pankreas yang dipapar diet tinggi glukosa.

Metode

Hewan coba yang digunakan penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jenis kelamin jantan, umur \pm 4 minggu, dan berat badan 15-20 g.

Variabel bebas terdiri dari: diet prekondisi tambahan sonde glukosa kontinyu-bertahap dan *stressor* tambahan sonde tinggi glukosa setiap hari. Mencit diberikan diet standar dan setiap hari diberikan tambahan sonde glukosa dengan dosis yang dinaikkan bertahap setiap minggu. Dosis glukosa minggu ke-1 = 0,05 g/g BB; minggu ke-2 = 0,07 g/g BB; minggu ke-3 = 0,09 g/g BB; dan minggu ke-4 = 0,11 g/g BB. Jumlah volume larutan yang disonde sekitar 0,3-1 ml. Setelah diberikan diet prekondisi (pada minggu ke-5 s.d ke-8), mencit diberikan diet standar dan setiap hari diberikan tambahan sonde glukosa dengan dosis tinggi (0,013 g/g BB), setiap hari, selama 4 minggu. Jumlah volume larutan yang disonde sekitar 0,3-1 ml.

Variabel tergantung terdiri dari: Kadar glukosa darah, ekspresi Akt sel beta pankreas, dan ekspresi Hsp27 sel beta pankreas.

Hasil dan Manfaat

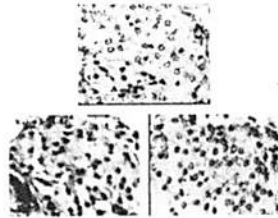
Varibale penelitian berupa ekspresi Akt, Hsp27, dan insulin pada sel beta dapat dilihat pada tabel 5.1. Perbedaan bermakna terjadi pada ekspresi Hsp27, sedangkan yang lain tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Tabel 1 Rerata variabel

Kelompok	n	Ekspresi		
		Akt	Hsp27	Insulin
Kontrol	9	5,69 \pm 2,86	5,86 \pm 2,18*	5,29 \pm 1,29
Kontrol prekondisi	9	6,02 \pm 2,00	5,71 \pm 1,58*	6,55 \pm 1,31
Prekondisi	9	5,44 \pm 2,24	3,82 \pm 0,96*	5,49 \pm 1,30
p		0,877	0,029	0,106

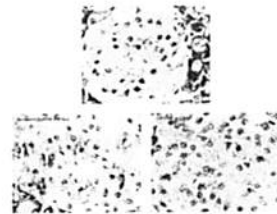
Superscript/berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang selanjutnya diberikan *stressor* diet tinggi glukosa, tidak meningkatkan ekspresi Akt sel beta, namun, menurunkan ekspresi Hsp27 sel beta. Hal tersebut sebagai mekanisme proteksi akibat adanya hiperglikemia supaya regulasi kadar glukosa darah relatif tetap terjaga.



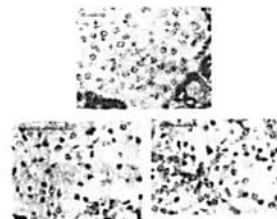
Ekspresi Akt sel beta

Mekanisme pengaruh prekondisi diet glukosa secara kontinyu-bertahap yang selanjutnya diberikan *stressor* diet tinggi glukosa, diketahui melalui jalur Hsp27 yang kemudian merangsang ekspresi insulin sel beta, namun selanjutnya menurunkan kadar insulin serum. Meskipun kadar insulin serum menurun, namun dengan prekondisi diketahui masih lebih baik daripada tidak diberikan prekondisi.



Ekspresi Hsp27 sel beta

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diharapkan dapat memberikan manfaat berupa diet interval yang tidak memberatkan sehingga dapat diaplikasikan lebih luas dan dapat mencegah penyakit DM, sehingga dapat menurunkan prevalensi dan insiden penyakit DM.



Ekspresi insulin sel beta

POSTER

High Glycemic Index Diet Decrease Insulin Secretion Without Altering Akt and Pdx1 Expression on Pancreatic Beta Cells Mice

Lilik Herawati^a, Gadis Meinar Sari^a, Roedi Irawan^b

^aDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Prof Moestopo 47, Surabaya, 60131, Indonesia

^bDepartment of Pediatric, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Prof Moestopo 47, Surabaya, 60131, Indonesia

Abstract

Background: Akt has a role on the IRS-Akt-insulin signal and increases the mass of pancreatic islet. Akt also can induce Pdx1 as insulin promoting factor, through its inhibition effect on GSK-3. However, the role of Akt and Pdx1 on chronic high glycemic index (GI) diet exposed to subjects is not clearly understood.

Aim: This study aims to determine the effect of high GI diet on blood glucose, serum insulin, number of islet cells, Akt, and Pdx1 expression in beta cells.

Methods: Eight weeks-old healthy male Balb/c mice were divided into two groups. Control group was given standard diet. The highGI group was given standard diet added with oral gavage glucose solution everyday for 4 weeks. The dose of glucose solution was 0.013 g/gBW or 3-5% additional calories each day. Randomed blood glucose (BG) was taken before (pre) and after (post) treatment from tail vein. Serum insulin (SI) was taken after treatment from blood cardiac. Islet was also take after treatment. Number of islet cells was counted with Image-J software in HE staining. Akt and Pdx1 was analyzed with IHC Rammele score in IHC staining.

Results: The different changes of body weight before and after treatment showed significant different between groups (0.025). BG post on highGI group increased significantly compared to control ($p = 0.032$). However, SI on highGI decreased significantly compared to control ($p=0.003$). Number of islet cells on highGI decreased not significantly ($p=0.346$). While Akt and Pdx1 increased on highGI did not show significantly ($p=0.729$; $p=0.701$).

Conclusions: A high GI diet can increase blood glucose level but reduce serum insulin level. However, there is no evidence of underlying mechanism of this chronic condition via Akt and Pdx1. Thus, further study is needed such as observing apoptosis and other modulators on beta cells.

Keywords: Glucose; Insulin; Akt; Pdx1; Beta Cells

INTRODUCTION

The prevalence of diabetes mellitus (DM) is increasing. In 2035, the estimation of DM will exceed 592 million (Guariguata et al., 2014). Hyperglycemia or high abnormal level of blood glucose is one of the signs in DM.

Glucose is one of several factors which ecan stimulate several transcription factors in beta cells, like Akt (protein kinase B or serine/ threonine-specific protein kinase) and Pdx-1 (pancreatic duodenal homeobox-1). Akt can stimulate Pdx1 and the Pdx1 is known as the transcription factor identified in the pancreas since embryonal phase dan still expressed in adult (Humphrey et al., 2010; Johnson et al., 2006; Murtaugh, 2007). Pdx1 is also known to play a pivotal role in beta cell growth and adult beta-cell function (Spaeth et al., 2017). However, the mechanism of exposure to the chronic high GI diet on Akt and Pdx1 is not clearly understood. Thus, the objective of this study is to determine the patterns of glucose and serum insulin levels, as well as the role of Akt and Pdx1 in beta cells because of chronic exposure to high GI diet.

METHODE

Eight week-old healthy male Balb/c mice were used for this study. There were two study groups, control group (C) and high glycemic index diet group (highGI). Each group consisted of seven mice. Control group was given standard diet. The highGI group was given standard diet added with daily oral gavage glucose solution 0.013 g/gBW or 3-5% additional calories each day. The duration of the treatment was 4 weeks.

At the end of the treatment, the mice were sacrificed by intraperitoneal anesthesia. The anesthesia cocktail was made up of 1 ml ketamine (100 mg/ml), 0.5 ml xylazine (20 mg/ml), 0.3 ml acepromazine (10 mg/ml), and 8.2 ml of sterile water. The intraperitoneal anesthesia dose was 0.05-0.1 ml/10g body weight.

After the mice were sedated, surgery was performed to take intracardiac blood and then removed pancreatic organ. Histologic preparations were then set by hematoxylin-eosin staining on pancreatic organs to calculate the number of islet cells and immunohistochemical staining (IHC) for Akt and Pdx1.

RESULT

Our study revealed that the chronic high GI diet can increase blood glucose level but reduce serum insulin level. However, there is no evidence of underlying mechanism of this chronic condition via Akt and Pdx1. Thus, further study is needed such as observing other modulators on beta cells.

	Groups	
	Control	highGI
BW_pre (gram)	21.03±0.29	18.67±3.64
BW_post (gram)	21.79±3.62	23.3±3.75
BG_pre (mg/dL)	112.57±16.30	100.00±20.03
BG_post (mg/dL)	98.57±21.87	119.00±14.88*
SI (IU/L)	4.13±0.90	2.76±0.18*
Islet cells (Σ)	51.10±11.75	44.57±12.10
Akt (score)	5.71±2.56	6.17±2.15
Pdx1 (score)	4.36±2.63	5.20±2.10

FORMULIR EVALUASI ATAS CAPAIAN LUARAN KEGIATAN

Ketua : Dr. dr. LILIK HERAWATI S.Ked, M.Kes
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 Judul : Analisis Mekanisme Pengaruh Prekondisi Diet Glukosa secara Kontinyu-Bertahap terhadap Akt dan Hsp27 Sel Beta Pankreas yang Dipapar Stressor Diet Tinggi Glukosa
 Skema : Penelitian Disertasi Doktor
 Waktu Kegiatan : Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun

LUARAN YANG DIRENCANAKAN DAN JUMLAH CAPAIAN

No	Luaran yang Direncanakan	Jumlah Capaian
1	Publikasi ilmiah	1
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding (Pemakalah)	1
3	Buku/Bahan Ajar	1

CAPAIAN DISERTAI DENGAN LAMPIRAN BUKTI-BUKTI LUARAN KEGIATAN**1. PUBLIKASI ILMIAH**

	Keterangan
Artikel jurnal ke-1.	
Nama jurnal yang dituju	Chiang Mai University Journal of Natural Sciences
Klasifikasi jurnal	Internasional
Impact factor jurnal	7
Judul artikel	High Glycemic Index Diet Decrease Insulin Secretion Without Altering Akt and Pdx1 Expression on Pancreatic Beta Cells Mice
Status naskah	Draf artikel

2. BUKU AJAR

	Keterangan
Buku ajar ke-1.	
Judul	-
Penulis	-
Penerbit	-

No ISBN	-

3. PEMBICARA PADA PERTEMUAN ILMIAH (SEMINAR/SIMPOSIUM)

	Keterangan
Pertemuan Ilmiah ke-1.	
Judul Makalah	High Glycemic Index Diet Decrease Insulin Secretion Without Altering Akt and Pdx1 Expression on Pancreatic Beta Cells Mice
Nama Pertemuan Ilmiah	1st International Conference on Innovative Sciences and Technologies for Research and Education (InnoSTRE)
Tempat Pelaksanaan	Kuching, Malaysia
Waktu Pelaksanaan	12/18/2018 12:00:00 AM
Jenis Pertemuan	Internasional
Status naskah	Sudah dikirim

4. SEBAGAI INVITED SPEAKER

	Keterangan

5. UNDANGAN SEBAGAI VISITING SCIENTIST PADA PERGURUAN TINGGI LAIN


	Keterangan

6. CAPAIAN LUARAN LAINNYA

Capaian	Uraian

, 15 - 11 - 2018

Ketua


(Dr. dr. LILIK HERAWATI S.Ked, M.Kes)

