

| |
|--|
| |
| |
| |
| |

HALAMAN PENGESAHAN USUL PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL

1. Judul Penelitian : Prospek vanadium sebagai antidiabetik oral yang poten melalui penghambatan aktivitas tirosin fosfatase
2. Ketua Peneliti
- a. Nama : Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. NIP : 197010221995121001
 - d. Pangkat/Golongan : III/d
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - f. Bidang Keahlian : Farmakologi Molekular
 - g. Fakultas : Farmasi
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

| | | | | |
|---|---------------------------------------|-----------------|------------|-----------------------|
| 1 | Drs. Didik Hasmono, MS | Farmakokinetika | Farmasi | Universitas Airlangga |
| 2 | Bambang Subakti Z, S.Si, M.Clin.Pharm | Farmasi Klinis | Farmasi | Universitas Airlangga |
| 3 | Dr. Imam Susilo, dr, SpPA(K) | Histopatologi | Kedokteran | Universitas Airlangga |

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
 - b. Jumlah biaya yang usulkan : Rp. 50.000.000,-
 - c. Jumlah Biaya yang disetujui tahun 2010 : Rp 35.000.000,-



Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

(Dr. Umi Athijah, MS, Apt)
(NIP. 195604071981032001)



Menyetujui,

(Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi, Apt)
(NIP.195908051987011001)

Surabaya, Nopember 2010
Ketua Peneliti,

(Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D)
(NIP. 197010221995121001)

RINGKASAN

PROSPEK VANADIUM SEBAGAI ANTIDIABETIK ORAL YANG POTEN MELALUI PENGHAMBATAN AKTIVITAS TIROSIN FOSFATASE

Diabetes mellitus (DM) merupakan gangguan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia, berhubungan dengan proses metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak yang tidak normal sehingga menyebabkan komplikasi kronik seperti mikrovaskular, makrovaskular, serta neuropati. WHO mengestimasi bahwa lebih dari 180 juta penduduk di dunia menderita *diabetes mellitus* dan diperkirakan akan menjadi lebih dari dua kalinya pada tahun 2030. *Diabetes mellitus* (DM) berdasarkan etiologinya dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu DM tipe 1 dan DM tipe 2. Kematian sel β akibat apoptosis merupakan komponen utama penyebab *diabetes mellitus*. DM tipe 1 dikarakterisasi oleh tidak dihasilkannya insulin akibat kerusakan autoimun pada sel β . Sedangkan DM tipe 2 dikarakterisasi oleh kegagalan sel β untuk mengatasi resistensi insulin yang berakibat terjadinya kondisi hiperglikemia dan diabetes. Pada islet Langerhans pankreas DM tipe 2, terjadi kehilangan 20%-50% massa sel β . Terapi yang biasa diberikan pada pasien DM tipe 1 adalah insulin sedangkan untuk DM tipe 2 adalah OAD seperti : golongan sulfonilurea, biguanida, thiazolidinedione, dan α -glukosidase inhibitor. Terapi insulin jangka panjang dapat menimbulkan efek hipoglikemia dan peningkatan berat badan. Pada akhirnya, pemakaian insulin dan OAD dapat menyebabkan resistensi insulin.

Diperlukan alternatif terapi *diabetes mellitus* dengan mekanisme aksi lebih selektif sehingga dapat meminimalkan efek samping yang mungkin terjadi selama terapi. Salah satu alternatif terapi obat untuk mengatasi *diabetes mellitus* adalah vanadil sulfat. Vanadil sulfat merupakan bentuk garam inorganik dari logam vanadium, mekanisme aksinya adalah menghambat aktivitas *protein tyrosine phosphatase* (PTPase) pada *insulin signaling pathway*. Sehingga waktu terjadinya *insulin signaling* menjadi lebih panjang dan penurunan kadar gula dalam darah dapat berjalan dengan lebih optimal. Vanadil sulfat juga dapat meningkatkan perbaikan dari sel β pankreas hingga mendekati kondisi normal pada dosis tertentu. Vanadil sulfat dapat menghambat kerja dari PTPase sehingga dapat memperlama *insulin signaling*. Perpanjangan waktu *insulin signaling* berimplikasi pada aktivasi Akt/ PKB yang merupakan protein yang berperan dalam proliferasi sel dan memiliki efek anti-apoptosis teraktivasi lebih lama. Pada penelitian ingin dilakukan pembuktian efek vanadil sulfat pada peningkatan proliferasi sel β pankreas mencit dengan *diabetes mellitus*.

Untuk menginduksi diabetes, mencit jantan galur Balb-C diinjeksi secara intraperitoneal, *streptozotocin* dosis 100 mg/kg BB pada hari ke-1 dan dosis 50 mg/kg BB pada hari ke-14. *Streptozotocin* dilarutkan dalam pembawa dapar sitrat pH 4.8 Glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14 dan 21. Rata-rata kadar glukosa darah acak (GDA) pada mencit meningkat secara bermakna pada hari ke-21 dari 112.35 ± 4.51 mg/dL menjadi 226.12 ± 17.25 mg/dL ($F_{(1,19)} = 8.042$; $p = 0.011$).

Mencit yang telah mengalami *diabetes mellitus* diberikan suspensi vanadil sulfat dalam CMC Na sekali sehari selama 7 hari berturut-turun dengan dosis 5, 30, atau 100 mg/kg BB. Kadar GDA kemudian diukur pada hari ke-28. Hasil pengukuran GDA setelah mencit mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat menunjukkan penurunan

kadar GDA secara bermakna ($F_{(4,20)} = 13.716$, $p < 0.001$). Berikut adalah penurunan kadar GDA pada mencit yang menerima vanadil sulfat : dosis 5 mg/kg BB, GDA menurun dari 281.80 ± 35.45 mg/dl menjadi 95.60 ± 20.43 mg/dl ($p < 0.001$); dosis 30 mg/kg BB, GDA menurun dari 232.25 ± 21.09 mg/dl menjadi 110.25 ± 22.14 ($p < 0.001$) mg/dl; dosis 100 mg/kg BB, GDA menurun dari 242.67 ± 30.07 mg/dl menjadi 62.67 ± 21.61 mg/dl ($p < 0.001$). Kemudian mencit dimatikan dan diambil jaringan otot, hepar, adiposa dan pankreas. Jaringan difiksasi dalam dapar formalin pH 6.8 untuk kemudian dipreparasi secara histokimia dan imunohistokimia dengan antibodi reseptor insulin dan *glucose transporter 4*.

Pada pengamatan histokimia, tampak bahwa vanadil sulfat dapat memperbaiki atrofi dan nekrosis pada serabut otot serta regenerasi inti dan hambatan lipolisis sel lemak, serta perbaikan struktur dan pelemakan pada hepar. Sementara itu, dari pemeriksaan secara imunohistokimia diketahui bahwa vanadil sulfat dapat meningkatkan aktivitas reseptor insulin pada membran sel dan translokasi GLUT4 dari sitoplasma menuju ke permukaan membran sel otot. Hal ini ditandai dengan warna kecoklatan pada jaringan otot. Perbandingan dapat dilakukan dengan parameter intensitas warna maupun *cell-containing* masing-masing sampel dari tiap kelompok. Untuk mendukung penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lain untuk memperoleh metode analisis secara kuantitatif pengaruh vanadil sulfat terhadap aktivitas GLUT4 pada jaringan target insulin selain otot. Pada pengamatan kualitatif dengan mikroskop, perbaikan dan proliferasi ditandai dengan meningkatnya granul sel β yang tersusun rapat dengan batas antar sel yang jelas pada islet Langerhans pankreas. Pemberian vanadil sulfat pada mencit dengan diabetes memberikan peningkatan yang bermakna pada jumlah sel β tiap islet Langerhans ($F_{(4,20)} = 17.123$, $p < 0.001$) dan juga pada diameter islet Langerhans pankreas ($F_{(4,37)} = 16.696$, $p < 0.001$). Jumlah rata-rata sel β dalam islet Langerhans mencit diabetes adalah 41.60 ± 2.20 sedangkan diameter isletnya adalah 93.33 ± 9.68 μm . Jumlah sel β pankreas dan diameter islet Langerhans mencit yang menerima vanadil sulfat mengalami kenaikan bila dibandingkan dengan kelompok diabetes. Berikut adalah jumlah sel β pankreas dan diameter islet Langerhans mencit yang menerima vanadil sulfat : dosis 5 mg/kg BB, jumlah sel β 49.80 ± 11.01 ($p=0.881$) dan diameter islet 106.25 ± 8.07 μm ($p=0.529$); dosis 30 mg/kg BB, jumlah sel β 94.80 ± 13.54 ($p < 0.001$) dan diameter islet 207.50 ± 15.49 μm ($p=0.004$); dosis 100 mg/kg BB, jumlah sel β 132.80 ± 12.48 ($p < 0.001$) dan diameter islet 216.25 ± 23.38 μm ($p < 0.001$).

Peningkatan jumlah sel β tiap islet Langerhans dan diameter islet Langerhans yang bermakna menunjukkan adanya peningkatan proliferasi sel β pankreas mencit diabetes yang mendapatkan vanadil sulfat. Pada kondisi homeostasis normal, diperlukan adanya keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sebagai mekanisme yang meregulasi populasi sel. Oleh karena itu dilakukan pengamatan apoptosis sel β pankreas pada mencit diabetes yang menerima *treatment* vanadil sulfat. Pengamatan dilakukan secara molekuler pada proses fragmentasi DNA menggunakan pewarnaan BrdU dengan metode TUNEL. Peningkatan dosis vanadil sulfat menunjukkan semakin berkurangnya sel β pankreas yang mengalami apoptosis dan terlabeli oleh BrdU. Dari hasil pengamatan baik secara histokimia maupun imunohistokimia, tampak efek perlindungan vanadil sulfat terhadap jaringan otot, hepar, adiposa dan sel β pankreas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF VANADIUM AS APOTENT ANTIDIABETIC ORAL THROUGH INHIBITION OF TYROSINE PHOSPHATASE

The present study was designed to investigate the effects of vanadyl sulphate (VS) toward both histochemistry and immunohistochemistry — related to glucose transporter 4 (GLUT4) activity — alteration of skeletal muscle and adipose tissue in diabetic mice. Forty mice were divided into five groups, which were positive control (normal) group, negative control (diabetic) group, and three groups differed by vanadyl sulphate's doses (5 mg/kg BW, 30 mg/kg BW, or 100 mg/kg BW). Mice were made in diabetic condition by two streptozotocin inductions. The first induction, 100 mg/kg BW, was given on the first day. While the second, 50 mg/kg BW, was given on the 14th day. Diabetes occurred on day 21 after streptozotocin injection and glucose level raised significantly from 112.35 ± 4.51 mg/dL to 226.12 ± 17.25 mg/dL ($F_{(4,20)} = 13.716$, $p < 0.001$). Administration of three different dose of vanadyl sulfate for 7 days were all significantly reducing blood glucose concentration. Blood glucose concentration of diabetic mice given vanadyl sulfate : dose 5 mg/kg, reduced from 281.80 ± 35.45 mg/dl to 95.60 ± 20.43 mg/dl ($p < 0.001$); dose 30 mg/kg, reduced from 232.25 ± 21.09 mg/dl to 110.25 ± 22.14 mg/dl ($p < 0.001$); dose 100 mg/kg, reduced from 242.67 ± 30.07 mg/dl to 62.67 ± 21.61 mg/dl ($p < 0.001$). On the day 28, skeletal muscle, adipose, liver and pancreatic tissues were harvested and checked histochemically by *haematoxyllin-eosin* or *aldehyde fuchsin* staining. The results of histochemistry showed that VS can improve an atrophy and necrosis in muscle condition. In adipose tissue, VS inhibits lipolysis and restores the morphology of adipocyte cells. While the results of immunohistochemistry showed that VS can increase insulin receptor activity and GLUT4 translocation from cytoplasm to the surface membrane of muscle cell, therefore the activity of this protein is rising. In pancreatic islets of the diabetic group, damage islet, decline islet size, and degenerative pancreas β cells were observed in comparison to the diabetic group. On the other hand, pancreatic islets of the diabetic group given vanadyl sulfate showed a higher number of the prominent β cells, intact islet, increased islet size in comparison to the diabetic group. Administration of three different doses of vanadyl sulfate were all significantly enhance islet Langerhans' diameter and the number of β cells on single islet, respectively ($F_{(4,37)} = 16.696$, $p < 0.001$) and ($F_{(4,20)} = 17.123$, $p < 0.001$). In diabetic mice, the number of β cells on single islet was 41.60 ± 2.20 and islet Langerhans' diameter was 93.33 ± 9.68 μ m. The number of β cells and islet Langerhans' diameter were significantly increased by repeated treatment with VS (dose 5 mg/kg, were 49.80 ± 11.01 ($p=0.881$) and 106.25 ± 8.07 μ m ($p=0.529$); dose 30 mg/kg BB, were 94.80 ± 13.54 ($p < 0.001$) and 207.50 ± 15.49 μ m ($p=0.004$); dose 100 mg/kg BB, were 132.80 ± 12.48 ($p < 0.001$) and 216.25 ± 23.38 μ m ($p < 0.001$), respectively). We also found that repeated treatment with VS induced a decreasing in the number of apoptotic cells compare to the diabetic group.

Keyword(s) : diabetic mice, vanadyl sulfate, streptozotocin, *diabetes mellitus*, proliferation, pancreatic beta cell.

PRAKATA

Saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian beserta laporan dapat terselesaikan sekitar 80%. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan kesempatan dan pendanaan untuk melakukan seluruh aktivitas penelitian ini.

Dengan terselesaikannya laporan penelitian ini, saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada:

1. Ketua Departemen Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Ketua Departemen Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas segala bantuan dan perkenannya untuk menggunakan fasilitas yang ada di kedua departemen sehingga penelitian ini dapat diselesaikan sesuai dengan perencanaan. Demikian juga dengan pemberian bimbingan, masukan dan saran yang sangat bernilai demi peningkatan kualitas keilmuan penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas perijinan dan penggunaan segala fasilitas di Fakultas Farmasi untuk pelaksanaan penelitian ini
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga atas segala kesempatan dan pendanaan penelitian ini.
4. Rektor Universitas Airlangga untuk kesempatan penelitian yang telah diberikan.
5. Grace Syahriel, Dian Hasianami, Anton Rahman, Eliza Kurnia H, Elvina M Sirait, Elisabet Kasih, Nur Palestin dan Debra Dorotea atas bantuan teknis dalam mendukung penelitian ini.

Kami juga berterima kasih pada seluruh Tim Peneliti atas kerjasamanya selama ini dan diskusi yang bersifat membangun sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik sesuai dengan rencana. Demikian juga teknisi laboratorium yang selalu menyediakan tenaga setiap saat dalam pelaksanaan penelitian ini. Akhirnya, saya berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat dan mohon maaf yang sebesar-besarnya jika ada kesalahan ataupun kekurangan.

Hormat kami,
Peneliti

M I L I K
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAH..... | ii |
| RINGKASAN..... | iii |
| ABSTRACT..... | v |
| PRAKATA..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR TABEL..... | x |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiii |
| BAB 1 PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Masalah..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 4 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA..... | 5 |
| 2.1 <i>Diabetes mellitus</i> | 5 |
| 2.1.1 Definisi dan epidemiologi..... | 5 |
| 2.1.2 Etiologi dan faktor resiko..... | 6 |
| 2.1.3 Manifestasi klinis..... | 8 |
| 2.1.4 Terapi..... | 9 |
| 2.2 Insulin..... | 10 |
| 2.2.1 Struktur insulin..... | 10 |
| 2.2.2 Biosintesis insulin..... | 11 |
| 2.2.3 Sekresi insulin..... | 12 |
| 2.2.4 Efek insulin..... | 14 |
| 2.2.5 Reseptor insulin..... | 17 |
| 2.2.6 Mekanisme aksi insulin terhadap reseptor insulin..... | 18 |
| 2.3 Protein Tyrosine phosphatase (PTPase)..... | 20 |
| 2.4 Bahan Penginduksi <i>Diabetes mellitus</i> Streptozotosin..... | 21 |
| 2.5 Vanadil Sulfat..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Anatomi dan Histologi Jaringan Otot..... | 26 |
| 2.6.1 Otot polos..... | 26 |
| 2.6.2 Otot rangka..... | 28 |
| 2.6.3 Otot jantung..... | 32 |
| 2.7 Jaringan Hepar..... | 35 |
| 2.7.1 Struktur hepar..... | 37 |
| 2.7.2 Efek metabolisme diabetes pada hepar..... | 39 |
| 2.8 Insulin Reseptor sebagai Antibodi Analisis Imunohistokimia..... | 42 |
| BAB 3 METODE PENELITIAN..... | 44 |
| 3.1 Alat..... | 44 |
| 3.2 Bahan..... | 44 |
| 3.3 Protokol Penelitian..... | 46 |
| 3.4 Pengelompokan hewan coba dan <i>timeline</i> kelompok perlakuan..... | 48 |
| 3.5 Kerangka Operasional..... | 49 |
| 3.6 Preparasi dan Pewarnaan Jaringan Otot Rangka dan Hepar..... | 51 |
| 3.7 Metode Analisis Imunohistokimia..... | 53 |
| 3.8 Analisis Hasil..... | 54 |
| BAB 4 HASIL PENELITIAN..... | 55 |
| 4.1 Model Diabetes mellitus..... | 55 |
| 4.2 Profil Pertumbuhan Mencit (<i>Mus musculus</i>) saat <i>Pre-Treatment</i> Vanadil Sulfat..... | 56 |
| 4.3 Hasil Pengamatan Jaringan Otot, Hepar dan pankreas pada Kelompok Kontrol..... | 58 |
| 4.4 Pengamatan Kadar Glukosa Darah pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah <i>treatment</i> Vanadil Sulfat..... | 69 |
| 4.5 Hasil Pengamatan Jaringan Otot, Hepar dan pancreas pada Kelompok Perlakuan..... | 70 |
| 4.6 Hasil Analisis Histopatologi dan Imunohistokimia Preparat Jaringan Pankreas Setelah 7 Hari Treatment Vanadil Sulfat..... | 78 |
| BAB 5 PEMBAHASAN..... | 83 |
| BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN..... | 89 |

| | |
|-------------------------------|----|
| DAFTAR PUSTAKA..... | 90 |
| LAPORAN PENGGUNAAN DANA | 95 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabel 2.1 | Fungsi Hepar Normal..... | 35 |
| Tabel 4.1 | Kadar Glukosa Darah Mencit setelah Injeksi <i>Streptozotocin</i> 100 mg/kgBB Dilanjutkan 50 mg/kgBB..... | 56 |
| Tabel 4.2 | Selisih Antara Berat Badan Mencit setelah Mendapatkan Injeksi <i>Streptozotocin</i> 100 mg/kg BB Dilanjutkan 50 mg/kg BB dengan Berat Badan saat <i>Baseline</i> | 57 |
| Tabel 4.3 | Pengukuran Diameter Serat Jaringan Otot Tungkai Belakang Mencit pada Irisan Membujur..... | 60 |
| Tabel 4.4 | Diameter Rata-Rata Islet Langerhans dan Jumlah Rata-Rata Sel Beta Pankreas Mencit dengan Pewarnaan Aldehid Fuchsin..... | 62 |
| Tabel 4.5 | Kadar Glukosa Darah Mencit setelah Mendapatkan <i>Treatment</i> Selama 7 Hari dengan Vanadil Sulfat Berbagai Dosis..... | 69 |
| Tabel 4.6 | Signifikansi Kadar Glukosa Darah Kelompok <i>Treatment</i> Vanadil Sulfat Berbagai Dosis Selama 7 Hari Dibandingkan dengan Kelompok Diabetes..... | 70 |
| Tabel 4.7 | Pengukuran Diameter Serat Jaringan Otot Tungkai Belakang Mencit pada Irisan Melintang setelah Mendapatkan <i>Treatment</i> Vanadil Sulfat..... | 72 |
| Tabel 4.8 | Diameter Serat Otot Rata-Rata Mencit dengan Berbagai Perlakuan pada Pewarnaan <i>haematoxylin-eosin</i> (HE)..... | 73 |

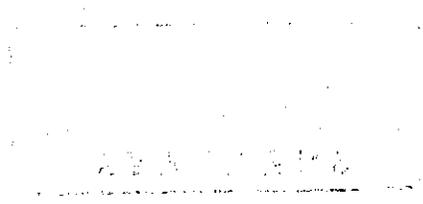
DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Struktur Proinsulin, C-peptida, dan Insulin..... | 11 |
| Gambar 2.2 | Proses Biosintesis Insulin..... | 12 |
| Gambar 2.3 | Proses Sekresi Insulin dari Sel Beta Pankreas..... | 13 |
| Gambar 2.4 | Efek Insulin pada Jaringan Target..... | 16 |
| Gambar 2.5 | Reseptor Insulin..... | 17 |
| Gambar 2.6 | Mekanisme Aksi Insulin..... | 19 |
| Gambar 2.7 | Struktur Kimia <i>Streptozotocin</i> | 21 |
| Gambar 2.8 | Mekanisme Aksi <i>Streptozotocin</i> | 22 |
| Gambar 2.9 | Struktur Kimia Vanadil Sulfat..... | 24 |
| Gambar 2.10 | Skema Proses Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi Senyawa Vanadium dengan Model Umum VOL_2 | 25 |
| Gambar 2.11 | Jaringan Otot Polos Normal Manusia, Perwarnaan <i>Hematoxylin-Eosin</i> | 28 |
| Gambar 2.12 | Jaringan Dinding Otot Polos Manusia dengan Potongan secara Tranversal dan Longitudinal, Pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin</i> | 28 |
| Gambar 2.13 | Otot Rangka pada Lidah Manusia dengan Pemotongan secara Transversal dan Longitudinal, Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> | 29 |
| Gambar 2.14 | Fotomikrograf Serat Otot Lidah Potongan Memanjang, Menampakkan Pita Gelap A yang Diselingi Pita I Terang..... | 30 |
| Gambar 2.15 | Potongan Longitudinal Otot Jantung Manusia Normal, Pewarnaan <i>Hematoxylin – Eosin</i> | 33 |
| Gambar 2.16 | Pewarnaan dengan <i>Hematoxylin-Eosin</i> dari Otot <i>Rectus femoris</i> (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)..... | 35 |
| Gambar 2.17 | Potongan Otot <i>Extensor Digitorum longus</i> dengan Pewarnaan | |

| | | |
|-------------|---|----|
| | H&E pada Tikus yang Telah Diinduksi dengan STZ Menunjukkan Daerah Infiltrasi Sel-Sel Inflamasi Diantara Serabut Otot Normal, b. Potongan Otot <i>Rectus femoris</i> dengan Pewarnaan H&E pada Tikus yang Telah Diinduksi STZ Menunjukkan Nekrosis Serabut Otot (Perbesaran 400x)..... | 35 |
| Gambar 2.18 | Penampang Melintang Hepar Manusia Menggunakan Pewarnaan <i>Haematoxylin-Eosin</i> | 38 |
| Gambar 3.1 | Diagram Pengelompokan Hewan Coba..... | 48 |
| Gambar 3.2 | Diagram <i>timeline</i> Kelompok Perlakuan..... | 48 |
| Gambar 3.3 | Diagram Pengelompokan Hewan Coba dan Perlakuan yang Diberikan pada Tiap Kelompok..... | 49 |
| Gambar 4.1 | Perkembangan Kondisi <i>diabetes mellitus</i> pada Mencit dengan Parameter Kadar Glukosa Darah..... | 56 |
| Gambar 4.2 | Perubahan Berat Badan Mencit pada Perkembangan <i>diabetes mellitus</i> | 57 |
| Gambar 4.3 | Irisan Penampang Melintang Otot Tungkai Belakang Mencit Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Diabetes menggunakan Pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> dengan Perbesaran 100x (A dan C) dan 400x (B dan D). A dan B adalah Kelompok Kontrol Negatif; C dan D adalah Kelompok Diabetes..... | 58 |
| Gambar 4.4 | Irisan Penampang Melintang Hepar Mencit Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Diabetes Menggunakan Pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> dengan Perbesaran 100x (A dan C) dan 400x (B dan D). A dan B adalah Kelompok Kontrol Negatif; C dan D adalah Kelompok Diabetes..... | 60 |
| Gambar 4.5 | Irisan Melintang Pankreas Mencit Menggunakan Pewarnaan Aldehid Fuhsin Kontrol Negatif (A-C); Kelompok Diabetes (B-D)..... | 61 |
| Gambar 4.6 | Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Hepar Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada | |

| | | |
|-------------|---|----|
| | Kelompok Kontrol Negatif (A) dan Kelompok Diabetes (B) dengan Perbesaran 400x..... | 64 |
| Gambar 4.7 | Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Otot Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Kontrol Negatif (A) dan Kelompok Diabetes (B) dengan Perbesaran 400x..... | 65 |
| Gambar 4.8 | Irisan Penampang Melintang Glut-4 Teraktivasi pada Jaringan Otot Mencit Menggunakan Analisis Histokimia Kelompok Kelompok Normal (A) dan Kelompok Diabetes (B) dengan Perbesaran 200x..... | 67 |
| Gambar 4.9 | Pewarnaan Imunohistokimia menggunakan BrdU dengan metode TUNEL pada Irisan Melintang Pankreas Mencit | 68 |
| Gambar 4.10 | Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit setelah Mendapat <i>Treatment</i> Vanadil Sulfat Sekali Sehari Selama 7 Hari pada Berbagai Dosis..... | 70 |
| Gambar 4.11 | Irisan Penampang Melintang Otot Tungkai Belakang Mencit Kelompok Diabetes (A); Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 mg/kg BB Menggunakan Pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> dengan Perbesaran 400x..... | 71 |
| Gambar 4.12 | Irisan Penampang Melintang Jaringan Hepar Mencit Kelompok Diabetes (A); Kelompok Perlakuan Dosis 5mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 mg/kg BB Menggunakan Pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> dengan Perbesaran 400x..... | 73 |
| Gambar 4.13 | Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Hepar Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Diabetes (A) dan Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 (D) mg/kg BB dengan Perbesaran 400x..... | 75 |
| Gambar 4.14 | Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Otot Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | Diabetes (A) dan Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 (D) mg/kg BB dengan Perbesaran 400x..... | 76 |
| Gambar 4.15 | Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Otot Mencit yang Menunjukkan Adanya Glut-4 teraktivasi pada Kelompok Diabetes (A) dan Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 mg/kg BB (D) dengan Perbesaran 400x..... | 78 |
| Gambar 4.16 | Irisan Melintang Pankreas Mencit Dengan Pewarnaan Aldehid Fuchsin dengan pembesaran 400x..... | 79 |
| Gambar 4.17 | Pewarnaan Imunohistokimia Menggunakan BrdU dengan Metode Tunel Pada Irisan Melintang Pankreas | 82 |



BAB 1 PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Masalah

Diabetes mellitus merupakan salah satu jenis penyakit degeneratif kronis yang diperkirakan telah diderita sekitar 20,8 juta penduduk Amerika Serikat atau sekitar 7% dari populasi. Pada tahun 2000, Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *diabetes mellitus* urutan keempat dunia setelah India, China dan Amerika Serikat (Wild *et al*, 2004; WHO, 2009). Diperkirakan tahun 2025, jumlah penderita *diabetes mellitus* di seluruh dunia akan mengalami peningkatan sebesar 35% dan akan mencapai jumlah total 366 juta penduduk dunia pada tahun 2030 (Cook *et al*, 2008). Jumlah penderita *diabetes mellitus* di seluruh dunia tersebut mengalami peningkatan seiring dengan pertumbuhan populasi, urbanisasi serta peningkatan prevalensi obesitas dan aktivitas fisik yang kurang (Wild *et al*, 2004).

Kondisi *diabetes mellitus* ditandai dengan resistensi sel jaringan target terhadap aksi insulin dan defisiensi insulin. Jaringan yang mengalami resistensi terhadap insulin yang paling signifikan adalah otot rangka dan hepar. Resistensi insulin mengakibatkan peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hepatic serta penurunan pengambilan glukosa otot rangka (Nolte & Karam, 2007; Wang *et al*, 2007). Pada kondisi ini, terjadi penurunan sensitivitas jaringan target terhadap metabolisme efek insulin. Hal tersebut mengakibatkan penurunan *up take* glukosa pada jaringan target insulin yaitu otot, jaringan adiposa, dan hepar (Triplitt *et al*, 2008). Pada keadaan resistensi insulin, terjadi peningkatan aktivitas protein *tyrosine phosphatase* (PTPase) sehingga *insulin signaling* berhenti lebih cepat dan mengganggu pemasukan gula ke dalam sel. PTPase bekerja dengan cara mendefosforilasi dan menginaktivasi reseptor kinase dengan tujuan untuk menyeimbangkan dan menghentikan *insulin signaling*. Akibatnya sel-sel tubuh tidak mampu mengambil glukosa dari darah dan mulai memecah glikogen serta energi dari jalur alternatif yaitu glikogenolisis dan proteolisis (Goldstein, 2000).

Strategi dalam mengurangi bahaya akibat diabetes sangat diperlukan karena bila tidak dilakukan tindakan terapi segera, dalam kurun waktu 10 tahun ke depan jumlah kasus kematian akibat diabetes akan meningkat lebih dari 50% (WHO, 2008). Terapi awal pengobatan diabetes adalah pengaturan pola makan yang sehat, olahraga secara teratur, dan menjaga berat badan agar tetap normal (WHO, 2008). Apabila terapi tersebut gagal, maka perlu dikombinasikan dengan terapi secara farmakologis baik monoterapi maupun kombinasi (Schwinghammer, 2006). Selama ini, terapi farmakologis yang dilakukan untuk mengobati *diabetes mellitus* adalah pemberian sediaan insulin dan analognya, memacu produksi insulin dengan derivat sulfonil urea dan non-sulfonil urea, meningkatkan sensitivitas insulin dengan biguanid, menurunkan resistensi insulin dengan derivat thiazolidindione, dan menurunkan kebutuhan insulin postprandial dengan α -glucosidase inhibitor. Namun, obat-obat tersebut berkerja tidak selektif pada protein tertentu dan kurang mampu meningkatkan perbaikan serta sensitivitas pada jaringan yang mengalami kerusakan akibat *diabetes mellitus* secara spesifik (Nolte & Karam, 2007).

Penelitian obat antidiabetes baru yang sedang dikembangkan saat ini adalah vanadil sulfat. Vanadil sulfat merupakan suatu bentuk oksidatif dari senyawa logam transisi vanadium yang merupakan inhibitor protein tirosin fosfatase. Vanadium bekerja spesifik dengan efek menyerupai insulin yang akan menstimulasi pengambilan glukosa, sintesis glikogen, dan oksidasi glukosa pada sel adiposa serta otot rangka (Cohen, 1995). Vanadium berperan sebagai analog fosfat yang dapat menghambat *tyrosine phosphatase* sehingga akan terjadi stimulasi autofosforilasi reseptor insulin, peningkatan aktivitas *tyrosine kinase* sehingga molekul protein intrasel menjadi aktif dan akan menstimulasi *glucose transporter* yang menyebabkan terjadinya peningkatan *up take* glukosa. Proses *insulin signaling* tersebut akan berjalan lebih lama. Pada penelitian sebelumnya, telah dijelaskan bahwa vanadil sulfat dapat menurunkan kadar glukosa darah secara efektif (Arijanto, 2006). Selain itu, mampu memperbaiki kondisi atropi dan nekrosis jaringan otot serta menstimulasi sintesis glikogen pada jaringan otot, menghentikan ambilan cadangan lipid pada kondisi *diabetes mellitus* dan meningkatkan regenerasi sel-sel lemak pada jaringan adiposa (Syahrieh, 2007;

Rakhman, 2008; Hibah Bersaing, 2008). Serta menghambat glikogenolisis pada jaringan hepar, memulihkan aliran darah sinusoid dan ukuran hepatosit sehingga memperbaiki kondisi *fatty liver* pada mencit yang menderita *diabetes mellitus* melalui induksi *streptozotocin* (Hasiannami, 2008).

Pengaruh vanadil sulfat dalam mempertahankan *insulin signaling* melalui peningkatan aktivitas reseptor insulin belum diketahui dengan jelas. Oleh karena itu, informasi mengenai efektivitas vanadil sulfat masih memerlukan penelitian lebih lanjut pada tingkat molekuler. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap efek vanadil sulfat sebagai senyawa yang dapat menghambat aktivitas PTPase sehingga meningkatkan reseptor insulin yang teraktivasi pada membran jaringan target, khususnya otot rangka dan hepar hewan coba mencit (*Mus musculus*) sebagai pendukung rangkaian penelitian sebelumnya. Diharapkan pemberian vanadil sulfat dapat mempertahankan aktivasi reseptor insulin sehingga menstimulasi terjadinya glukolisis dan glikogenesis. Pengamatan dilakukan secara imunohistokimia dengan menggunakan reseptor insulin sebagai antibodi. Tujuan penggunaan antibodi adalah mengamati peningkatan aktivitas reseptor insulin yang terfosforilasi sebagai protein spesifik pada membran plasma sel jaringan target insulin khususnya otot dan hepar yang berpengaruh dalam kondisi resistensi insulin akibat *diabetes mellitus*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah vanadil sulfat dapat mempunyai efektivitas yang baik dalam menurunkan glukosa darah pada keadaan diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin?
2. Apakah vanadil sulfat dapat memperbaiki jaringan target insulin pada keadaan diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin?
3. Apakah vanadil sulfat dapat memperbaiki sel beta pankreas pada keadaan diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian vanadil sulfat pada penurunan glukosa darah, perbaikan jaringan target dan sel beta pankreas mencit (*Mus musculus*) yang mengalami *diabetes mellitus* setelah diinduksi dengan *streptozotocin*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian vanadil sulfat dalam menurunkan kadar glukosa darah melalui peningkatan aktivitas reseptor insulin pada penyakit *diabetes mellitus*.
2. Sebagai kontribusi penelitian di bidang farmasi dalam pengembangan terapi obat baru pada penyakit *diabetes mellitus* yang bekerja lebih efektif dan spesifik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Diabetes mellitus*

2.1.1 Definisi dan epidemiologi

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolik kronik, ditandai oleh hiperglikemia dan abnormalitas pada metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, sensitivitas insulin, atau keduanya. Gangguan tersebut mengakibatkan ketidakmampuan tubuh menggunakan glukosa sebagai energi serta dapat menimbulkan terjadinya komplikasi kronis termasuk mikrovaskular, makrovaskular dan neuropati (Schwinghammer, 2006).

Kriteria standar untuk diagnosis *diabetes mellitus* antara lain yaitu munculnya gejala diabetes seperti poliuri, polidipsi, polifagi dan penurunan berat badan tanpa penyebab yang jelas serta peningkatan kadar glukosa darah acak ≥ 200 mg/dl, kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dl atau kadar glukosa darah meningkat ≥ 200 mg/dl setelah dua jam adanya *intake* glukosa. Berdasarkan diagnosisnya, *diabetes mellitus* saat ini diklasifikasikan ke dalam empat kategori yaitu: tipe 1, *insulin-dependent diabetes*; tipe 2, *non-insulin-dependent diabetes*; tipe 3, *diabetes mellitus* tipe lain; tipe 4, *gestational diabetes mellitus* (Nolte&Karam, 2007).

Salah satu jenis penyakit degeneratif kronis ini diperkirakan telah diderita sekitar 20,8 juta penduduk Amerika Serikat atau sekitar 7% dari populasi (Cook *et al*, 2008). Berdasarkan studi prevalensi pada tahun 2000, Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *diabetes mellitus* urutan keempat dunia setelah India, China dan Amerika Serikat (Wild *et al*, 2004; WHO, 2009). Jumlah penderita *diabetes mellitus* di seluruh dunia tersebut mengalami peningkatan seiring dengan pertumbuhan populasi, urbanisasi, tingkat usia, gaya hidup, serta peningkatan prevalensi obesitas dan aktivitas fisik yang kurang. Di negara-negara berkembang, yang menderita diabetes umumnya adalah penduduk dengan usia

produktif yaitu dibawah umur 65 tahun dan 25% dari semua penderita diabetes saat dewasa berumur dibawah 44 tahun (Wild *et al*, 2004). Pada tahun 2025, jumlah penderita *diabetes mellitus* di seluruh dunia diperkirakan akan mengalami peningkatan sebesar 35% dan akan mencapai jumlah total 366 juta penduduk dunia pada tahun 2030 (Cook *et al*, 2008).

2.1.2 Etiologi dan faktor resiko

Diabetes mellitus tipe 1 ditandai dengan adanya kerusakan sel beta pankreas selektif yang dimediasi oleh sel limfosit T dan defisiensi insulin akut atau absolut. Kerusakan sel tersebut disebabkan oleh proses autoimun dan idiopatik. Kasus autoimun merupakan penyebab *diabetes mellitus* tipe 1 yang paling banyak dijumpai. Tipe 1 diabetes ini ditemukan dalam semua kelompok etnis dan penderita umumnya adalah anak-anak dan remaja. Meskipun demikian, onsetnya dapat terjadi pada berbagai umur (Nolte&Karam, 2007).

Mediasi sistem imun penyebab diabetes tipe 1 merupakan hasil dari infeksi atau toksik pada seseorang yang secara genetik memiliki respon imun sehat melawan antigen sel beta pankreatik yang berubah, atau melawan molekul sel beta pankreas yang meniru protein virus. Faktor ekstrinsik yang berpengaruh pada fungsi sel beta pankreas antara lain adalah virus (seperti virus *Coxsackie* B4, Rubella, *cytomegalovirus*, adenovirus, dan lain-lain), agen kimia, atau sitotoksin yang merusak, dan antibodi yang dilepaskan oleh *imunosite* yang sensitif. Faktor-faktor tersebut menjadi pencetus respon antibodi abnormal yang secara genetik merupakan predisposisi untuk terjadinya suatu respon autoimun kuat sehingga menyerang virus atau antigen sel beta pankreas (Masharani, 2006).

Marker genetik tertentu dapat diukur untuk memastikan seseorang memiliki resiko terkena diabetes. Keberadaan *human leukocyte antigens (HLAs)*, khususnya HLA-DR yang berhubungan erat dengan perkembangan diabetes tipe 1. Lebih dari 95% pasien dengan DM tipe 1 memiliki marker genetik berupa HLA-DR3 dan HLA-DR4. Selain itu, penderita DM tipe 1 seringkali akan mengalami respon autoimun dengan antibodi yang terdeteksi berupa *islet cell antibody* yang menyerang jaringan inslet pankreas, *insulin autoantibodies* yang bekerja menyerang insulin, atau *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*. Semakin

banyak sel pankreas yang rusak, metabolisme glukosa akan terganggu karena peningkatan kadar glukosa darah tidak diimbangi dengan pelepasan sekresi insulin yang memadai. Ketika fungsi sel pankreas benar-benar hilang, pasien akan mengalami defisiensi insulin total sehingga membutuhkan insulin eksogen lebih banyak lagi (Cook *et al*, 2008).

Diabetes mellitus tipe 2 terjadi pada 90% kasus diabetes yang ditandai dengan resistensi jaringan terhadap aksi insulin dan defisiensi insulin relatif. Meskipun insulin masih dapat diproduksi oleh sel beta, jumlahnya tidak mencukupi untuk mengatasi resistensi dan menyebabkan peningkatan glukosa darah. Resistensi insulin tersebut mempengaruhi metabolisme lipid yang menyebabkan peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas dan level trigliserida serta menurunkan kadar *high-density lipoprotein* (HDL). Selain itu, terjadi peningkatan produksi glukosa hepatic serta penurunan pengambilan glukosa otot rangka (Nolte & Karam, 2007).

Penyebab diabetes ini seringkali dikaitkan dengan kondisi obesitas. Pada tahap awal perkembangan penyakit diabetes tipe 2, pasien mengalami hiperinsulinemia atau peningkatan kadar insulin dalam darah. Insulin akan disekresikan lebih banyak untuk menjaga kadar glukosa darah normal hingga pankreas tidak dapat lagi memproduksi insulin. Kondisi hiperglikemia akan meningkat akibat resistensi insulin yang sangat tinggi serta penurunan kapasitas fungsional sel pankreas sehingga dapat mengurangi kemampuan memproduksi respon insulin tahap awal yang mencukupi untuk memberikan sinyal pada hepar untuk menghentikan produksi glukosa ketika waktu makan. Organ dan jaringan yang secara signifikan mengalami resistensi insulin adalah hepar dan otot. Pada organ hepar terdapat dua aspek yaitu hepar menjadi kurang responsif terhadap insulin ketika ada asupan glukosa dan produksi glukosa selama puasa tidak berhenti. Akibatnya hiperglikemia timbul karena gabungan dua hal berikut yaitu asupan glukosa dan produksi glukosa hepatic yang terjadi secara terus-menerus (Cook, *et al*, 2008).

Faktor resiko *diabetes mellitus* tipe 2 ini meliputi riwayat keluarga, *overweight* atau obesitas, kurang aktivitas, etnis, kondisi pre-diabetes (pernah mengalami ketidakseimbangan kadar glukosa toleran atau kadar glukosa puasa),

hipertensi (tekanan darah \geq 140/90 mmHg), *High density lipoprotein* (HDL) kurang dari 35 mg/dl dan atau kadar trigliserida lebih dari 250 md/dl, riwayat mengalami gestasional diabetes atau melahirkan bayi dengan berat badan lebih dari 4,09 kg, riwayat penyakit vaskular, serta kondisi lain yang berhubungan dengan resistensi insulin (misal: *acanthosis nigricans*) (Cook *et al*, 2008).

Pada kasus diabetes tipe lain dapat disebabkan oleh faktor genetik terutama jika terjadi pada remaja (*maturity-onset diabetes of the young* [MODY]) dengan kromosom dominan sebagai pembawa, proses yang dapat merusak pankreas (pankreatitis), penginduksi resistensi insulin (HIV *protease inhibitor* tertentu), terapi obat tertentu atau peningkatan *counterregulatory hormone* (Cushing's syndrome) (Nolte & karam, 2001; Masharani, 2006).

Gestational diabetes (GDM) adalah abnormalitas pada kadar glukosa darah yang meningkat untuk pertama kali selama masa kehamilan. Ketika hamil, plasenta dan hormon plasenta seperti *chorionic somatomammotropin*, *progesterone*, *cortisol*, dan *prolactin* sehingga membentuk resistensi insulin yang paling banyak terjadi pada trisemester akhir (Nolte & Karam, 2007).

2.1.3 Manifestasi klinis

A. Komplikasi akut

Gangguan metabolisme pada *diabetes mellitus* dapat menimbulkan beberapa komplikasi akut yang meliputi hiperglikemia, diabetes ketoasidosis, hiperosmolar koma, serta hipoglikemia. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan kadar gula darah yang melebihi kemampuan ginjal untuk mereabsorpsi glukosa sehingga terjadi glukosuria dan menyebabkan diuresis osmotik. Oleh karena itu, timbul manifestasi klinik berupa poliuria, polidipsia, dan polifagia (Funk, 2006).

Ketoasidosis terjadi akibat stimulasi lipolisis yang menyebabkan konversi asam lemak menjadi badan keton. Kondisi hiperglikemia dan ketosis timbul pada pasien diabetes tipe 1 yang mengalami kekurangan insulin dan diabetes tipe 2 apabila terjadi infeksi, trauma akut, ataupun stres yang dapat meningkatkan *counterregulatory hormone* sehingga menghambat aksi insulin. Pada kondisi ini, pasien dapat mengalami koma akibat hiperosmolaritas (osmolaritas plasma mencapai 340 mOsm/L). Koma hiperosmolar terjadi akibat penurunan *intake*

cairan hingga dehidrasi akut pada cairan intraselular di otak. Kondisi ini dapat timbul akibat hiperglikemia dengan kadar glukosa darah antara 800-240 (Funk, 2006).

Hipoglikemia (kadar glukosa darah 60 mg/dl) seringkali terjadi akibat aktivitas olahraga atau puasa, efek samping obat oral diabetes, dan dosis insulin eksogen yang tidak tepat. Gejala awal hipoglikemia menyebabkan pelepasan katekolamin (gemetar, berkeringat, palpitasi). Pada saat kadar glukosa darah semakin menurun terjadi gejala neuroglukopenia akibat efek *central nervous system* hingga dapat menimbulkan koma (Funk, 2006).

B. Komplikasi kronis

Dalam jangka waktu lama, diabetes dapat menimbulkan kerusakan dan disfungsi pada sistem organ lain. Komplikasi kronis yang timbul meliputi infeksi luka kaki, penyakit mikrovaskular, dan makrovaskular. Kerusakan vaskular merupakan penyebab utama terjadinya komplikasi tersebut. Penyakit mikrovaskular yang terjadi antara lain retinopati, nefropati mulai dari timbulnya mikroalbuminuria hingga gagal ginjal, dan neuropati (simetri distal polineuropati, otonom neuropati, dan mononeuropati). Sedangkan penyakit makrovaskular yang timbul adalah atherosklerosis (peningkatan insiden infark miokard, stroke, *claudication* dan gangreen pada ekstremitas bawah), peningkatan insiden hipertensi dan hiperlipidemia, serta penyakit serebrovaskular (Funk, 2006).

2.1.4 Terapi

Tujuan terapi *diabetes mellitus* diantaranya adalah mengendalikan kadar glukosa darah sehingga tidak mengalami komplikasi akut hiperglikemia, meminimalkan dan mencegah komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular, menghindari terjadinya hipoglikemia, dan menjaga kualitas hidup pasien secara keseluruhan. Hal tersebut dapat dicapai dengan melakukan terapi nonfarmakologis dan farmakologis. Terapi nonfarmakologis yang dapat dilakukan antara lain pengaturan pola makan yang sehat dan sesuai kebutuhan kalori penderita diabetes perhari untuk pencapaian glukosa darah, profil lipid, tekanan darah yang diharapkan serta menjaga berat badan agar tetap normal, olahraga secara teratur

untuk memperbaiki sensitivitas insulin dan toleransi glukosa, maupun restriksi alkohol dan rokok untuk menghindari lipolisis serta hipertensi (Cook *et al*, 2008).

Terapi farmakologis yang dapat diberikan yaitu pemberian insulin eksogen dan penggunaan obat oral diabetes. Terapi insulin diberikan pada penderita diabetes tipe 1 (IDDM) dan pada diabetes tipe 2 (NIDDM) untuk memenuhi sekresi insulin endogen. Pada penggunaan insulin eksogen, terdapat empat tipe insulin injeksi yang tersedia yaitu *rapid-acting* insulin dengan onset sangat cepat dan durasi singkat, *short-acting* dengan *onset of action* cepat, *intermediate-acting*, dan *long-acting* dengan *onset of action* yang lambat. Pemberian insulin harus memperhatikan *onset of action*, *peak*, serta durasi insulin yang sesuai dengan pola makan dan jadwal aktivitas atau *exercise*. Efek samping yang dapat timbul adalah terjadi hipoglikemia dan *lipodistrophy* pada tempat injeksi (Nolte&Karam, 2007).

Obat diabetes oral diberikan kepada penderita diabetes tipe 2 yang tidak dapat mengontrol kadar glukosa melalui diet dan olahraga. Pengelompokan jenis obat oral antidiabetes ini berdasarkan mekanisme kerjanya. Jenis obat oral antidiabetes yang digunakan antara lain adalah obat yang dapat memacu produksi insulin yaitu derivat sulfonil urea dan non-sulfonil urea, meningkatkan sensitivitas insulin yaitu biguanid, menurunkan resistensi insulin yaitu derivat *thiazolidinedione*, dan menurunkan kebutuhan insulin postprandial yaitu α -*glucosidase inhibitor* (Nolte&Karam, 2007; Cook *et al*, 2008).

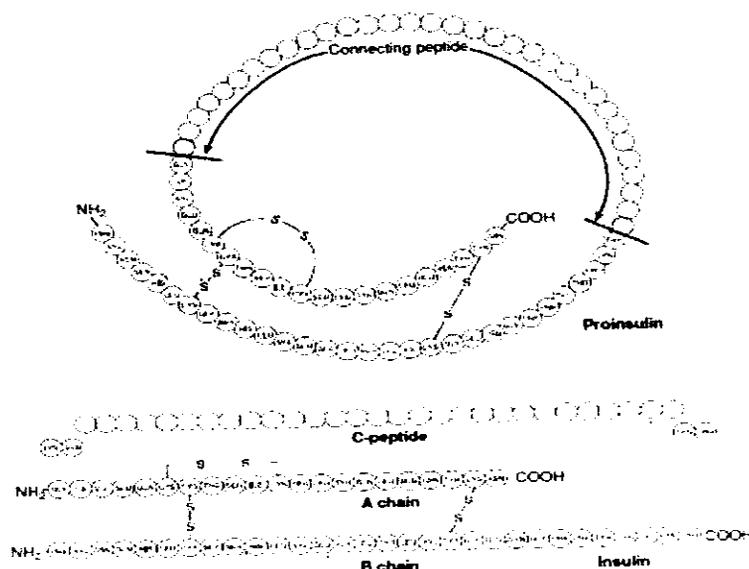
2.2 Insulin

2.2.1 Struktur insulin

Insulin merupakan protein kecil dengan berat molekul sebesar 5808 pada manusia dan mengandung 51 asam amino yang tersusun atas dua rantai peptida yaitu rantai A dan rantai B. kedua rantai tersebut dihubungkan dengan dua ikatan disulfida antara A7 ke B7 dan A20 ke B19. Rantai A terdiri atas 21 asam amino dan memiliki rantai disulfida intrainsulin pada residu nomor 6 dan 11. Rantai B terdiri atas 30 asam amino dan menunjukkan variasi dalam spesies hanya pada asam amino nomor 30 (Funk & Feingold, 1997; Nolte&Karam 2007).

Substitusi asam amino sering kali terjadi pada posisi nomor 8, 9, dan 10 pada rantai A tanpa mempengaruhi bioaktivitasnya. Substitusi asam amino tersebut

merupakan penyebab perbedaan asam amino antar spesies. Akibat tidak adanya pengaruh pada bioaktivitas, insulin spesies mamalia yang satu hampir dapat dipastikan aktif pada spesies mamalia lainnya. Atas dasar itulah insulin sapi dan babi merupakan standar terapi bagi penderita *diabetes mellitus* pada manusia sebelum insulin manusia berhasil diproduksi dengan teknik DNA rekombinan (Nolte&Karam 2007).

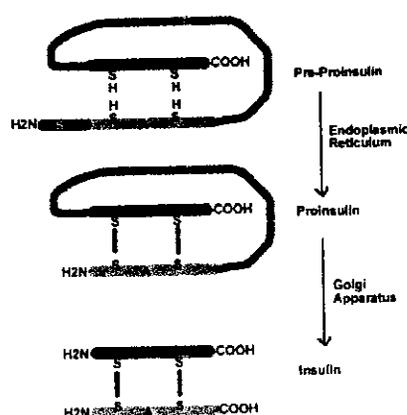


Gambar 2.1 Struktur Proinsulin, C-peptida, dan Insulin (Peavy,2006)

2.2.2 Biosintesis insulin

Gen untuk insulin terletak di lengan pendek kromosom 11 pada manusia. Seperti hormon dan sekresi protein lainnya, insulin pertama kali disintesis oleh ribosom yang berada di retikulum endoplasma kasar sebagai prekursor peptida yang lebih besar kemudian dikonversikan menjadi hormon sebelum disekresikan. Gen insulin memproduksi 110 peptida asam amino yang disebut preproinsulin (prekursor rantai tunggal hasil translasi m-RNA insulin). Terjadi pengeluaran sinyal peptida selama insersi ke dalam retikulum endoplasma kemudian molekul sisanya akan melipat, terbentuk ikatan disulfida sehingga akhirnya membentuk proinsulin. Proinsulin terdiri atas 86 asam amino dengan tiga rantai utama yaitu residu 1 sampai 30 yang menyusun rantai B insulin, residu 31 sampai 65 akan membentuk ikatan peptida yang disebut sebagai *C-peptide* dan residu 66 sampai 86 menyusun rantai A (Peavy, 2006).

Pada proses perubahan proinsulin menjadi insulin, dua pasang residu asam amino dasar akan membentuk insulin dan *C-peptide* yang disimpan dalam granula sekretori pada badan golgi dan terakumulasi dalam sitoplasma. Proses sekresi insulin selalu bersamaan dengan sekresi *C-peptide* dalam jumlah equimolar dan sedikit proinsulin yang belum terhidrolisis atau terhidrolisis sebagian. *C-peptide* dapat diukur dengan *radioimmunoassay* dan kadarnya merupakan indeks fungsi sel beta pada penderita yang mendapatkan terapi insulin eksogen. Meskipun demikian, *C-peptida* tidak memiliki aktivitas biologis (Bowen, 2004; Peavy, 2006).

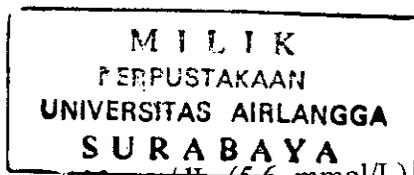


Gambar 2.2 Proses Biosintesis Insulin

2.2.3 Sekresi insulin

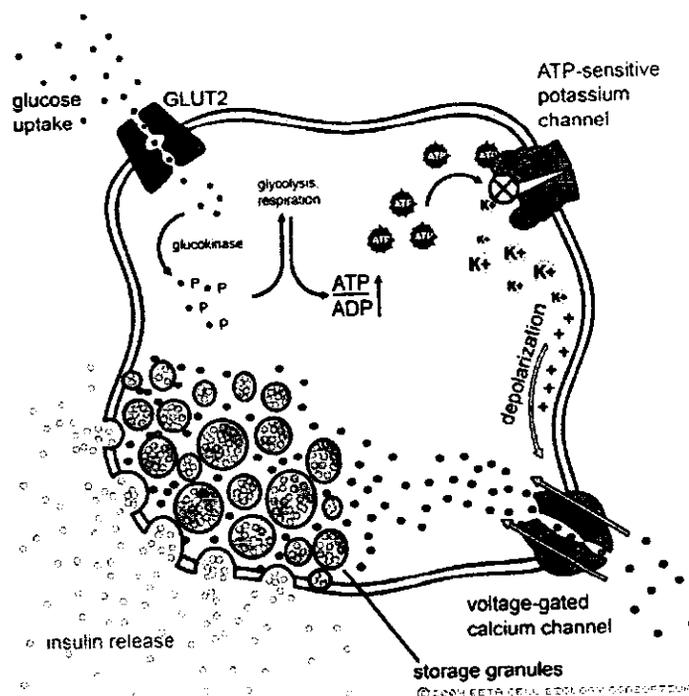
Insulin dirilis dari sel beta pankreas, pada keadaan basal dengan kecepatan rendah dan pada keadaan stimulasi sebagai respon terhadap berbagai stimulus, khususnya glukosa, dengan suatu kecepatan yang lebih tinggi. Stimulan lain seperti gula lain (misal: manosa), asam amino tertentu (misal: leusin, arginin) dan juga dikenal aktivitas vagal (Nolte & Karam, 2001). Beberapa hormon yang disekresikan di saluran pencernaan seperti *gastric inhibitory peptide* (GIP), gastrin, dan sekretin dapat meningkatkan sekresi insulin. Infus asetilkolin ke dalam sirkulasi pankreatik dapat menstimulasi sekresi insulin, hal ini membuktikan peranan inervasi parasimpatis dalam meregulasi sekresi insulin (Peavy, 2006).

Peningkatan glukosa darah merupakan regulator utama pada proses sekresi insulin. Pada manusia, kadar minimal glukosa untuk merangsang sekresi insulin



adalah dengan konsentrasi glukosa plasma sebesar 100 mg/dL (~~5,6 mmol/L~~). Insulin disekresikan secara bifasik sebagai respon terhadap peningkatan kadar glukosa dalam darah. Sekresi insulin awal dalam jumlah besar terjadi pada 5-15 menit pertama yang disebabkan oleh sekresi insulin yang terdapat dalam granula sekretori. Proses tersebut terjadi secara singkat dan jumlah insulin dengan segera mengalami penurunan. Respon ini diikuti oleh sekresi insulin secara bertahap dan diperlambat, yang sebagian besar dilakukan oleh molekul insulin yang baru saja disintesis. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan kadar glukosa di dalam darah tidak hanya menstimulasi sekresi insulin tetapi juga menstimulasi transkripsi gen insulin dan translasi mRNA-nya (Bowen, 2004; Peavy, 2006).

Glukosa ditransportasikan masuk ke dalam sel beta secara difusi terfasilitasi melalui bantuan *glucose transporter type-2* (GLUT-2). Sebagai tahap awal proses glikolisis, glukosa difosforilasi oleh enzim glukokinase yang memiliki afinitas rendah terhadap glukosa untuk membentuk glukosa 6-fosfat. Peningkatan konsentrasi glukosa dalam sel beta pankreas menyebabkan terjadinya depolarisasi membran dan influks kalsium ekstraseluler. Hasil peningkatan kalsium intraseluler menyebabkan insulin yang berada dalam mikrovesikel dapat mendekati mikrotubulus. Setelah itu memicu sekresi insulin melalui proses eksositosis melintasi lamina basalis sel beta pankreas serta kapiler dan endotel berpori untuk masuk ke dalam aliran darah (Bowen, 2004; Peavy, 2006; Nolte & Karam, 2007).



Gambar 2.3 Proses Sekresi Insulin dari Sel Beta Pankreas (Cartailler, 2006)

2.2.4 Efek insulin

Glukosa dibebaskan dari makanan yang mengandung karbohidrat seperti amilum atau sukrosa melalui proses hidrolisis dalam usus halus kemudian diabsorpsi ke dalam darah. Peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah merangsang pelepasan insulin, dan insulin berperan dalam merangsang pengambilan, penggunaan dan penyimpanan glukosa. Efek metabolisme glukosa dari insulin sangat tergantung pada jaringan target. Dua efek penting dari insulin antara lain adalah memfasilitasi pemasukan glukosa ke dalam jaringan otot, adiposa dan beberapa jaringan lain serta insulin merangsang hati untuk menyimpan glukosa dalam bentuk glikogen (Bowen, 2004).

Satu-satunya mekanisme dimana sel dapat mengambil glukosa adalah secara difusi terfasilitasi melalui transporter golongan heksosa (GLUT) yang terdiri atas tujuh transporter yang berbeda dan disebut sebagai GLUT 1 sampai GLUT 7. Transporter utama yang digunakan untuk pengambilan glukosa pada membran plasma jaringan adalah *glucose transporter type 4* (GLUT 4). Ketika konsentrasi insulin rendah, GLUT 4 berada di vesikel-vesikel dalam sitoplasma sehingga tidak dapat digunakan untuk transportasi glukosa. Ikatan antara insulin dengan reseptor dalam sel akan menyebabkan bersatunya vesikel-vesikel tersebut dengan

membran plasma secara cepat dan GLUT 4 dapat menembus membran sehingga memberikan kemampuan kepada sel untuk dapat mengambil glukosa dari darah secara efisien. Pada saat kadar insulin dalam darah menurun dan tidak mengikat reseptor insulin lagi, GLUT 4 akan kembali masuk ke dalam sitoplasma. Pada sel otot, insulin meningkatkan permeabilitas sel otot terhadap glukosa dan menyebabkan transpor glukosa yang cepat ke dalam sel otot. Apabila jumlah glukosa yang ditranspor ke otot dalam jumlah besar tetapi otot tidak bekerja, maka sebagian besar glukosa akan disimpan dalam bentuk glikogen yang dapat digunakan otot untuk menghasilkan energi. Perlu diketahui bahwa beberapa jaringan tidak membutuhkan insulin untuk mengambil glukosa secara efisien, contoh utamanya yaitu otak dan hati. Kedua jaringan tersebut tidak menggunakan GLUT 4 untuk mengambil glukosa namun kemungkinan menggunakan transporter lainnya yang tidak tergantung pada insulin (Guyton & Hall, 1996; Bowen 2004; Peavy, 2006).

Selain merangsang pengangkutan glukosa ke dalam sel, insulin juga merangsang penyimpanannya. Tempat penyimpanan glukosa yang terutama adalah di dalam hepar dan otot bergaris, jaringan adiposa juga merupakan tempat penyimpanan glukosa tetapi hanya dalam jumlah sangat kecil (Peavy, 2006). Sebagian besar glukosa yang telah diabsorpsi dari usus halus akan segera diambil oleh hepatosit yang mengubah glukosa ke dalam bentuk polimer glikogen untuk disimpan. Insulin memiliki beberapa efek pada hepar yang dapat merangsang terjadinya sintesis glikogen. Pertama-tama, insulin mengaktifkan enzim heksokinase yang dapat memfosforilasi glukosa, dan menyimpannya dalam sel. Insulin bekerja menghambat aktivitas glukosa-6-fosfatase secara tidak langsung. Insulin juga mengaktifkan beberapa enzim yang terlibat langsung dalam sintesis glukosa termasuk *phosphofructokinase* dan *glycogen synthase* sehingga kelebihan glukosa dapat disimpan dalam bentuk glikogen (Bowen, 2004).

Efek utama insulin adalah untuk menurunkan konsentrasi glukosa dalam darah. Ketika konsentrasi glukosa darah menurun, akan diikuti oleh penurunan sekresi insulin. Pada saat tidak terdapat insulin, sel-sel tubuh tidak mampu mengambil glukosa dan akan menggunakan sumber energi alternatif seperti perubahan asam lemak menjadi energi. Penurunan kadar insulin darah

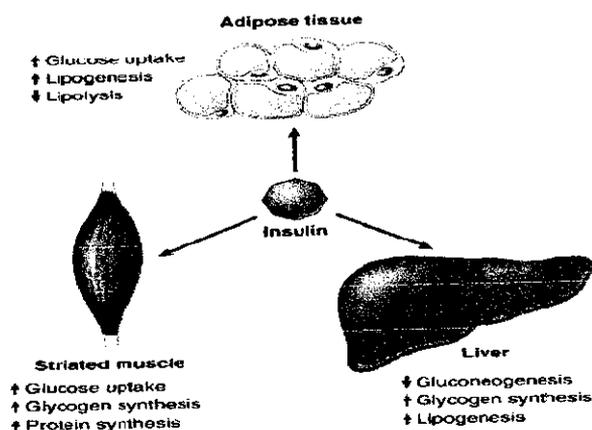
menyebabkan penurunan sintesis glikogen dan enzim akan bekerja untuk memecah glikogen menjadi glukosa. Pemecahan glikogen tersebut juga dapat disebabkan oleh glukagon yang akan disekresikan ketika kadar glukosa darah mengalami penurunan dibawah kadar normal (Bowen, 2004).

Pada metabolisme lemak, insulin memiliki peran utama dalam meningkatkan sintesis asam lemak dalam hepar melalui stimulasi terhadap proses pembentukan glikogen. Apabila glikogen ditimbun dalam jumlah yang besar (sekitar 5% dari massa hati), hepar akan jenuh dengan glikogen sehingga sintesis selanjutnya tidak dilakukan. Penambahan glukosa yang diambil oleh hepatosit kemudian digunakan dalam jalur sintesis asam lemak yang dikeluarkan hati dalam bentuk lipoprotein. Lipoprotein akan dipecah dalam sirkulasi menjadi asam lemak bebas sehingga dapat digunakan untuk jaringan-jaringan lain termasuk jaringan adiposa yang akan menggunakan untuk sintesis trigliserida (Bowen, 2004).

Insulin menghambat pemecahan lemak pada jaringan adiposa dengan cara menghambat lipase intraselular yang menghidrolisis trigliserida untuk melepaskan asam lemak. Insulin memfasilitasi pemasukan glukosa ke dalam adiposit sehingga glukosa dapat digunakan untuk sintesis gliserol. Gliserol tersebut bersama asam lemak yang dikeluarkan oleh hepar digunakan untuk mensintesis trigliserida dalam sel adiposit. Melalui mekanisme tersebut, insulin dapat menyebabkan akumulasi lemak pada jaringan adiposa sehingga secara keseluruhan insulin memiliki efek menimbun lemak (Bowen, 2004).

Efek insulin lainnya adalah meningkatkan pengambilan asam amino yang berperan dalam efek anabolik. Insulin meningkatkan translasi mRNA yang berperan dalam pembentukan protein. Setelah jangka waktu yang lama, insulin akan meningkatkan kecepatan transkripsi rangkaian genetik DNA tertentu di dalam inti sel sehingga meningkatkan jumlah RNA dan menyebabkan beberapa sintesis protein lagi. Insulin juga meningkatkan sintesis protein dalam sel dengan meningkatkan sintesis ribosom. Kemudian insulin menghambat degradasi protein dengan mengurangi aktivitas lisosom sehingga dapat mengurangi pelepasan asam amino dari sel khususnya sel otot. Di dalam hati, insulin menghambat glukoneogenesis di mana asam amino adalah substrat yang berperan dalam proses

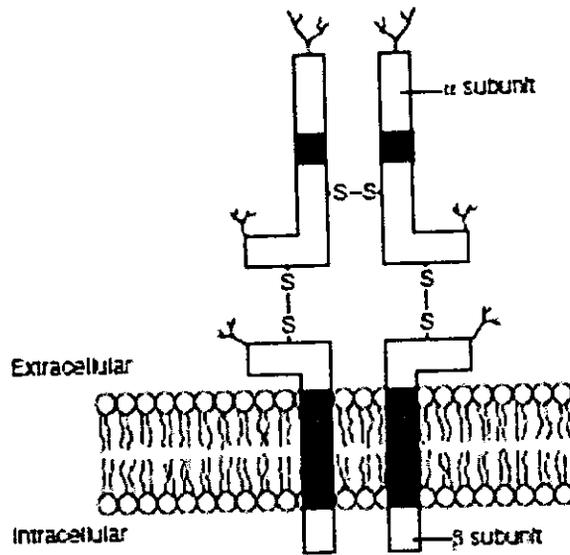
tersebut. Sehingga jika glukoneogenesis dihambat maka asam amino yang ada bisa disimpan menjadi protein dalam tubuh (Guyton & Hall, 2006; Peavy, 2006).



Gambar 2.4 Efek Insulin pada Jaringan Target (Maitra & Abbas, 2006)

2.2.5 Reseptor insulin

Reseptor insulin melekat di membran plasma dan dapat ditemukan pada banyak sel yang berbeda dalam tubuh, termasuk sel yang tidak dipengaruhi insulin dalam meningkatkan pengambilan glukosa darah. Reseptor insulin memiliki berat molekul sekitar 340.000 dan merupakan tetramer yang terdiri atas dua α dan dua β subunit glikoprotein. Struktur tersebut disintesis pada mRNA tunggal kemudian memisah secara proteolitik dan mengikat satu sama lain melalui ikatan disulfida untuk menjadi bentuk β - α - α - β heterotetramer. Gen reseptor insulin memiliki 22 ekson dan terletak pada kromosom 19 manusia. Subunit α mengikat insulin secara ekstraselular kemudian menginduksi perubahan konformasi subunit β yang menembus membran plasma sehingga menghasilkan aktivasi tirosin kinase dan inisiasi respon *cascade* dari substrat intraselular lainnya (Ganong, 2003; Kumar&Clark, 2006; Peavy, 2006).



Gambar 2.5 Reseptor Insulin (Peavy, 2006)

Reseptor insulin adalah tirosin kinase yang memiliki fungsi sebagai enzim pentransfer kelompok fosfat dari ATP ke residu tirosin pada protein target intraselular. Pengikatan insulin terhadap subunit α menyebabkan subunit β melakukan autofosforilasi yang akan mengaktifkan aktivitas katalitik pada reseptor. Reseptor yang telah aktif akan memfosforilasi beberapa protein intraselular sehingga terjadi perubahan aktivitas dan menghasilkan respon biologis (Bowen, 2004).

Ketika insulin mengikat reseptor, insulin akan beragregasi dan masuk ke dalam sel dengan mediasi reseptor endositosis. Akhirnya, kompleks insulin – reseptor memasuki lisosom ketika reseptor rusak atau kembali. Waktu paruh reseptor insulin adalah sekitar 7 jam. Jumlah atau afinitas reseptor insulin dipengaruhi oleh insulin serta hormon lainnya, olah raga, makanan dan faktor-faktor lain (Nolte&Karam, 2007).

2.2.6 Mekanisme aksi insulin terhadap reseptor insulin

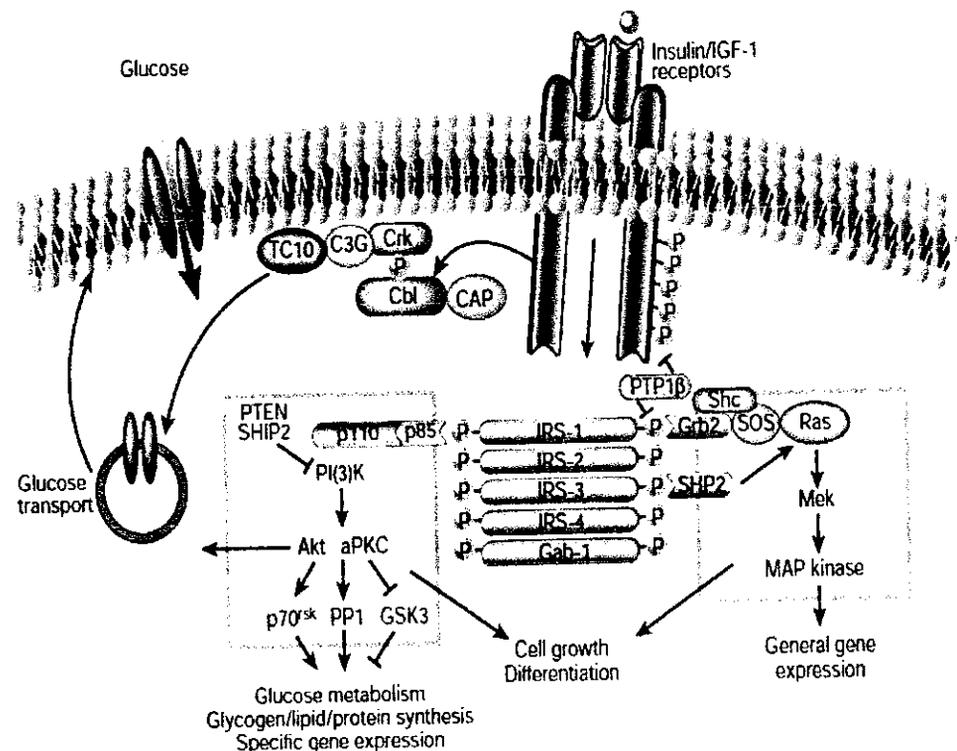
Insulin yang tidak terdegradasi oleh hati ketika disekresikan akan segera memasuki sirkulasi sistemik dan berdifusi ke dalam jaringan yang sebagian besar memiliki reseptor insulin. Reseptor mengikat insulin dengan spesifitas yang tinggi dan memiliki afinitas dalam rentang pikomolar. Kompleks antara insulin dengan reseptor akan segera mengalami internalisasi, 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). *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI 3-kinase) adalah salah satu protein yang memiliki gugus SH2. PI 3-kinase adalah suatu heterodimer yang terdiri atas subunit p85 sebagai subunit regulatori dan p110 sebagai subunit katalisis. Subunit p85 memiliki 2 gugus SH2 yang kemudian terikat pada IRS-1 terfosforilasi (Davis & Granner 2001; Nolte & Karam, 2007).

Aktivasi dari PI 3-kinase dapat menghantarkan beragam sinyal. PI 3-Kinase dapat mengkatalisis fosforilasi dari *phosphoinositide* pada posisi 3 sehingga dapat menghasilkan *phosphatidylinositol-3-phosphates*, terutama *phosphatidyl-inositol (3,4,5)P3* (PIP3), yang berikatan dengan gugus *pleckstrin homology* (PH) dari beragam molekul *signaling* yang dapat mengubah aktivitas atau lokalisasi subseluler. *Phosphatidylinositol-3-phosphates* meregulasi beberapa molekul sinyal, salah satunya adalah *phosphatidylinositide-dependent kinase 1* (PDK 1) yang kemudian akan memfosforilasi dan mengaktifasi protein kinase B (PKB). PKB inilah yang diperlukan untuk transpor glukosa ke dalam sel melalui *glucose transporter* (Kahn & Saltiel, 2001; Lizcano *et al*, 2002).

Terdapat jalur lain sebagai tambahan aktivitas dari PI 3-K yang dibutuhkan dalam menstimulasi pengambilan glukosa. Jalur kedua ini melibatkan *tyrosine phosphorylation* dari protoonkogen Cbl. Pada sel yang dipengaruhi oleh insulin, Cbl selalu diasosiasikan dengan protein adapter yaitu CAP. CAP berikatan dengan sekuens Cbl yang kaya akan prolin melalui ujung gugus karboksil-terminal SH3. Pada saat fosforilasi, kompleks Cbl-CAP berpindah pada bagian lipid dari membran plasma (*lipid raft*), proses ini dimediasi oleh bagian dari CAP yaitu *sorbin homology* (SoHo) bersama dengan protein flotillin. Translokasi Cbl terfosforilasi menyebabkan pengambilan protein adapter CrkII ke *lipid raft*. Crk II kemudian akan membentuk kompleks dengan *guanyl nucleotide exchange protein* C3G. Setelah perpindahan C3G ke *lipid raft*, protein tersebut akan menarik TC10 G protein dan mengkatalisa perubahan GTP menjadi GDP yang selanjutnya akan mengaktifasi TC10. Lokalisasi dan aktivasi TC 10 inilah yang memberikan sinyal kedua dalam sekresi insulin. TC10 teraktivasi akan memberikan sinyal pada

glucose transporter 4 (GLUT-4) menuju ke membran sel. Jalur PI 3-kinase serta jalur Cbl ini berlangsung secara paralel (Kahn & Saltiel, 2001).



Gambar 2.6 Mekanisme Aksi Insulin (Kahn & Saltiel, 2001)

2.3 Protein Tyrosine Phosphatase (PTPase)

PTPase merupakan enzim yang mampu menghilangkan gugus fosfat dari residu *tyrosine* yang berperan penting sebagai protein *signaling in vivo* (Asante-Appiah & Kennedy, 2003). Autofosforilasi kompleks insulin-reseptor terjadi pada residu *tyrosine* yang spesifik. Studi mengenai aktivasi reseptor kinase insulin menunjukkan bahwa fosforilasi Tyr-1158 dan Tyr-1162 atau Tyr-1163 terjadi lebih dahulu. Reseptor yang terfosforilasi secara mono atau bis memberikan aktivasi minimal pada aktivitas kinase sub unit β . Fosforilasi residu *tyrosine* yang ketiga, terjadi secara cepat setelah bis-fosforilasi dan langsung memberikan aktivasi penuh terhadap reseptor kinase (Goldstein, 2000).

Substrat yang paling cocok untuk enzim PTPase adalah reseptor yang telah mengalami tris-fosforilasi. Selanjutnya, PTPase menyebabkan deaktivasi kinase dan menentukan tingkat *steady-state* aktivasi reseptor secara *in vivo*. Berdasarkan penelitian yang menggunakan fraksi subseluler hepar 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 yang memiliki struktur menyerupai reseptor membran, mempunyai bagian ekstraseluler, segmen transmembran, dan satu atau dua gugus katalitik PTPase. Pada 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- α , LAR, dan LCA (Goldstein, 2000).

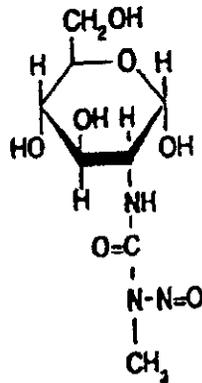
Pada penelitian mengenai regulasi reseptor insulin, reseptor insulin *in vitro* yang telah dimurnikan ternyata tidak dapat terdefosforilasi secara otomatis dan tetap mempertahankan keadaan autofosforilasi meskipun insulin sudah dihilangkan pada tempat ikatan. Lain halnya pada studi *in-situ*, yang menggunakan sel yang utuh dan terpermeabilisasi dengan baik, disosiasi insulin dari reseptor segera diikuti dengan defosforilasi subunit β dan secara bersamaan menyebabkan deaktivasi reseptor kinase. Hal ini menunjukkan bahwa PTPase seluler memiliki fungsi penting dalam regulasi aksi insulin yaitu dengan cara mendefosforilasi dan menginaktivasi reseptor kinase. Hal tersebut ditujukan untuk menyeimbangkan dan menghentikan *insulin signaling*. Aktivitas PTPase mengalami peningkatan pada kondisi resistensi insulin sehingga *insulin signaling* berhenti lebih cepat dan menyebabkan keadaan *diabetes mellitus* (Goldstein, 2000).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, PTPase yang terlibat dalam proses mekanisme aksi insulin adalah PTP1B. Defisiensi PTP1B pada tikus menghasilkan peningkatan sensitivitas insulin. Selain itu, terjadi peningkatan insulin yang menstimulasi fosforilasi IR pada otot dan hepar. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa PTP1B merupakan negatif regulator untuk mekanisme aksi insulin (Assante-Appiah & Kennedy, 2003).

2.4 Bahan Penginduksi *Diabetes mellitus Streptozotocin*

Streptozotocin (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) yang digunakan untuk menginduksi terjadinya diabetes disintesis oleh *Streptomyces achromogenes* dan digunakan untuk menginduksi *insulin-*

dependent dan *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM dan NIDDM) (Szkudelski, 2001). *Streptozotocin* memiliki efek diabetogenik poten pada binatang seperti mencit, tikus, anjing dan kera bersifat irreversibel dan mewakili *diabetes mellitus* tipe 2 pada manusia (McEvoy, 2002).

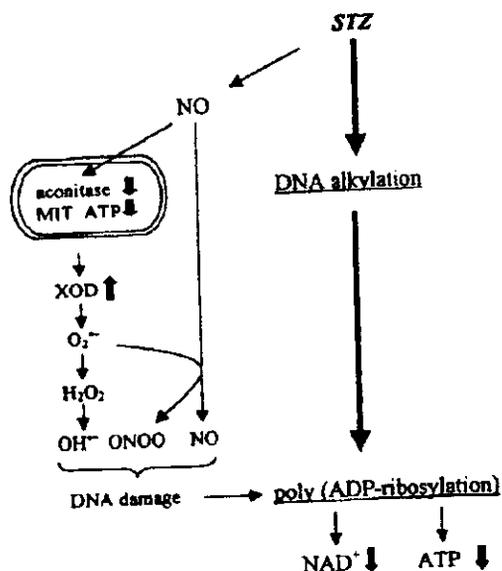


Gambar 2.7 Struktur Kimia *Streptozotocin* (Konrad, *et al.*, 2001)

Pemasukan STZ ke dalam sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2. STZ akan membatasi ekspresi GLUT2 secara *in vivo* dan *in vitro* ketika diberikan pada pemberian dosis ganda. Mekanisme aksi STZ secara intraselular menghasilkan perubahan DNA secara alkilasi pada sel β pankreas. Aktivitas alkilasi DNA oleh STZ berhubungan dengan nitrosourea khususnya pada posisi O⁶ guanin (Szkudelski, 2001).

STZ merupakan donor *nitric oxide* (NO) dan NO merupakan molekul yang menyebabkan destruksi sel islet pankreas serta menginduksi kerusakan DNA. Paparan STZ mengubah karakteristik dari aksi NO seperti meningkatkan aktivitas *guanylyl cyclase* dan meningkatkan pembentukan cGMP. STZ bukan merupakan donor *nitric oxide* (NO) secara spontan, tetapi molekul ini dilepaskan ketika STZ dimetabolisme di dalam sel sehingga dapat menyebabkan perusakan DNA sel β pankreas. Namun, hasil dari beberapa penelitian menyatakan bahwa NO bukanlah molekul satu-satunya yang menyebabkan efek sitotoksik pada STZ. STZ dapat menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif yang juga berperan dalam fragmentasi DNA dan menimbulkan perubahan lainnya pada sel. Anion *superoxide* dihasilkan melalui mekanisme aksi STZ pada mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. STZ mampu menghambat siklus Krebs sehingga konsumsi oksigen mitokondria berkurang dan akhirnya menurunkan

produksi ATP. Peningkatan defosforilasi ATP menyebabkan peningkatan jumlah substrat bagi xantin oksidase sehingga dapat meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase kemudian akan mengkatalisis reaksi pembentukan *superoxide anion*. *Superoxide* anion kemudian akan meningkatkan pembentukan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Szkudelski, 2001).

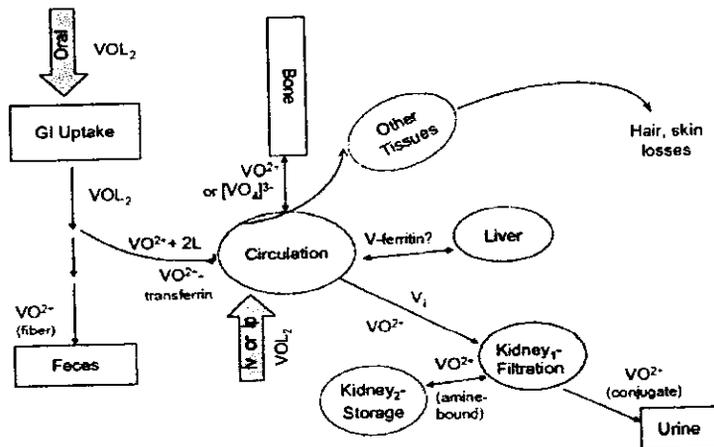


Gambar 2.8 Mekanisme Aksi *Streptozotocin* (Szkudelski, 2001)

STZ menginduksi kerusakan DNA dengan mengaktivasi poli ADP-ribosilasi. Proses ini menyebabkan pengurangan NAD⁺ seluler, penurunan jumlah ATP, dan diikuti oleh hambatan sintesis serta sekresi insulin (Szkuldeski, 2001). Ketika gangguan pada sel β pankreas menjadi faktor primer yang berperan dalam perubahan hiperglikemia moderat menjadi berat pada mencit, maka resistensi insulin berkembang menjadi faktor sekunder dan defisiensi insulin sejumlah tertentu juga dapat menginduksi terjadinya resistensi insulin (Arulmozhi, 2004).

Penentuan dosis STZ yang sesuai dalam pembuatan model diabetes pada mencit perlu diperhatikan. Dosis yang sesuai akan memberikan kerusakan sebagian pada masa sel β pankreas dan menghasilkan defisiensi insulin ringan sesuai dengan yang dikehendaki. Dosis yang tidak sesuai akan menyebabkan perbaikan bertahap atau bahkan menuju ke arah *diabetes mellitus* tipe 1 (Lian, *et al.*, 2007).

STZ terpilih karena merupakan agen toksik yang spesifik terhadap sel β pankreas namun sensitivitas ini bergantung pada spesies, galur, jenis kelamin,



Gambar 2.10 Skema Proses Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi Senyawa Vanadium dengan Model Umum, VOL₂ (Thompson *et al*, 2009)

Berdasarkan studi secara *in vitro* dan *in vivo*, vanadium memiliki efek seperti insulin pada jaringan otot bergaris, hepar dan jaringan adiposa. Pada konsentrasi yang relatif tinggi, vanadium dapat menghambat *phosphotyrosine phosphatase* (PTPase) sehingga dapat meningkatkan fosforilasi reseptor insulin dan aktivitas tirosin kinase. Beberapa studi menyatakan pula bahwa vanadium dapat merangsang pengambilan glukosa dengan tidak tergantung pada perubahan aktivitas tirosin kinase (Cusi *et al*, 2001).

Pada penelitian dengan menggunakan tikus sebagai hewan coba, vanadium dapat meningkatkan metabolisme glukosa melalui pengembalian sensitivitas insulin secara normal pada hepar dan jaringan otot bergaris. Di hepar, senyawa vanadium dapat menghambat lipogenesis dan glukoneogenesis serta dapat merangsang glikolisis dan sintesis glikogen. Vanadium juga dapat meningkatkan pengambilan glukosa di jaringan otot dengan cara merangsang pembentukan glikogen (Cusi *et al*, 2001). Penelitian efek farmakologi vanadium lainnya menunjukkan bahwa vanadium juga mampu memperbaiki keadaan resistensi insulin. Pemberian vanadium secara kronik 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*, meningkatkan ikatan reseptor insulin, menghambat aktivitas *phosphotyrosine phosphatase* (Verma *et al*, 1998).

Vanadium merupakan analog fosfat yang dapat menghambat protein *tyrosine phosphatase* (PTPase) secara spesifik. Enzim PTPase yang seharusnya mengubah fosfat ternyata tidak mengambil fosfat melainkan vanadium sehingga enzim tidak berfungsi sebagaimana mestinya. Enzim yang telah dihambat tidak bisa memberikan aktivitas yang semestinya dan untuk menggantikan enzim yang telah dihambat diperlukan sintesis enzim baru dengan jumlah cukup dalam waktu yang lama. Hambatan terhadap enzim PTPase ini menyebabkan reseptor insulin tetap berada dalam keadaan teraktivasi yaitu stimulasi fosforilasi *tyrosine kinase* tetap dapat berjalan. Selain itu juga mempertahankan *insulin signaling* berjalan lebih lama dan tetap menstimulasi *glucose transporter 4* (GLUT-4) agar tetap berada di permukaan membran sehingga pemasukan glukosa dari darah ke jaringan tetap berjalan dan terjadi penurunan kadar glukosa darah. Melalui rangkaian *insulin signaling* post-reseptor tersebut, vanadium dikatakan memiliki aktivitas menyerupai insulin (*insulinomimetic agent*) (Verma, 1998; Asante-Appiah & Kennedy, 2003; Rehder, 2003).

Vanadil sulfat meniru kerja insulin di hepar, otot rangka, dan jaringan adiposa yang dapat mengakibatkan hambatan *phosphotyrosin phosphatase* (PTPase) dan meningkatkan aktivitas fosforilasi reseptor insulin dan *tyrosine kinase*. Vanadil sulfat mempengaruhi metabolisme glukosa dengan mengembalikan sensitivitas insulin di jaringan target (Cusi *et al*, 2001).

Selama ini, vanadil sulfat banyak digunakan dalam sediaan suplemen makanan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa dosis optimum untuk menurunkan glukosa darah pada mencit dengan *diabetes mellitus* tipe 2 yang diinduksi *streptozotocin* adalah 30 mg/kg BB (Arijanto, 2006).

2.6 Anatomi dan Histologi Jaringan Otot

Pada jaringan otot, serabut-serabut otot biasanya tersusun dalam ikatan dengan ujung sejajar satu sama lain. Jaringan otot berfungsi untuk pergerakan tubuh atau per bagian sebagai hubungannya dengan jaringan otot lainnya. Sel-sel otot bekerja secara mekanik, oleh karena itu memerlukan aliran darah yang kaya nutrisi dan oksigen untuk mengeliminasi toksin atau produk buangan. Pembuluh darah yang terdapat pada jaringan penghubung antar serabut dapat berfungsi

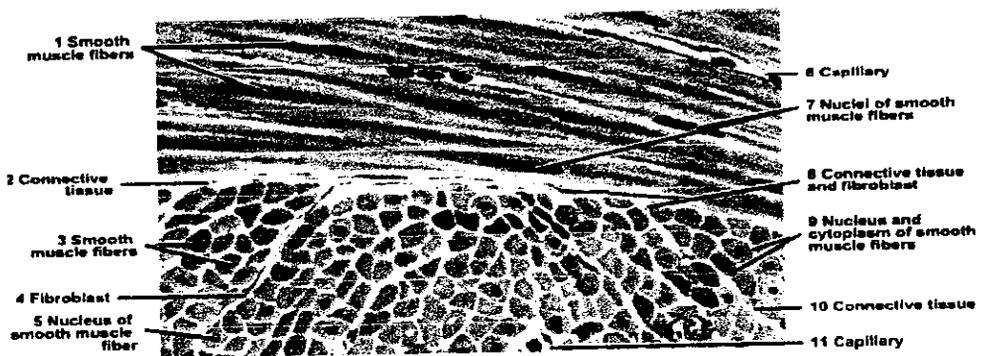
untuk melekatkan serabut-serabut otot. Pada umumnya, sel otot berasal dari mesoderm kecuali *myoepithelium* dan berdeferensiasi terutama terjadi melalui proses pemanjangan secara berangsur-angsur, disertai pembuatan protein miofibril (Junqueira *et al*, 1998; Childs, 2002). Jaringan otot pada vertebra secara umum dibagi menjadi tiga jenis, yaitu otot polos, otot bergaris, dan otot jantung (Ganong, 2003).

2.6.1 Otot polos

Secara anatomi, otot polos berbeda dari otot bergaris dan otot jantung karena tidak memiliki garis-garis melintang. Otot polos terdiri atas kumpulan sel otot *fusiform* berbentuk gelendong yang tidak menunjukkan garis-garis apapun di bawah mikroskop cahaya. Sel otot polos merupakan sel yang panjang, tidak bergaris melintang, masing-masing dibungkus oleh lamina basalis dan jalinan serat retikulin (Junqueira *et al*, 1998). Sel tersebut mempunyai aktin dan miosin-II yang berfungsi untuk kontraksi namun tidak tersusun seperti pada otot rangka dan otot jantung. Otot polos mengandung tropomyosin dan retikulum sarkoplasma tetapi tidak mengalami perkembangan. Pada kutub-kutub inti sel otot polos berkumpul mitokondria, ribosom bebas, sisterna retikulum endoplasma kasar dan kompleks golgi (Junqueira *et al*, 1998). Namun, umumnya otot polos mengandung sedikit mitokondria dan sangat membutuhkan proses glikolisis untuk memenuhi kebutuhan metabolismenya (Ganong, 2003).

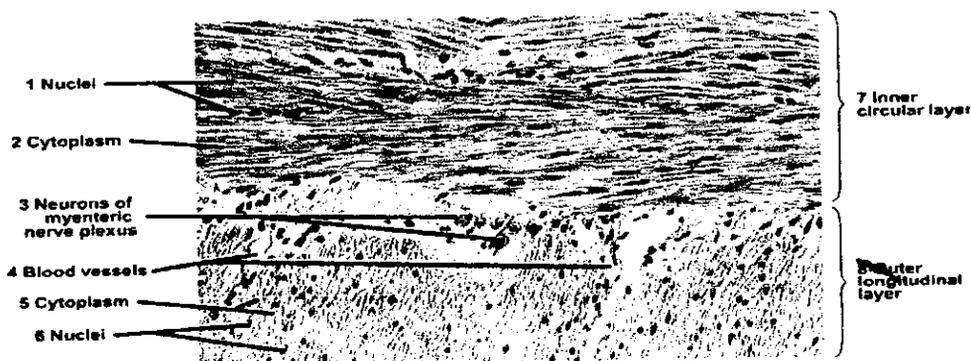
Berdasarkan fungsi dan jenisnya, otot polos dapat dibagi menjadi otot polos viseral dan otot polos multi-unit. Otot polos viseral terdapat pada permukaan yang lebar, memiliki jembatan dengan resistensi rendah diantara sel otot individual dan berfungsi secara *syncytial*. Jembatan tersebut merupakan pertemuan antara membran dua sel yang berdekatan dan melakukan fusi untuk membentuk *gap junction*. Otot polos viseral terutama berada pada dinding rongga visera seperti usus, uterus, dan ureter. Otot polos multi-unit terbentuk dari unit individual tanpa jembatan penghubung. Terdapat dalam struktur iris mata sehingga dapat menyebabkan kontraksi. Otot tersebut tidak dibawah kontrol namun memiliki banyak persamaan fungsi dengan otot rangka (Ganong, 2003).

Serabut tunggal otot polos memiliki ukuran panjang 20-500 μ m dan lebar 5-10 μ m serta memiliki inti sel yang memanjang di tengah-tengah sel. Serabut otot polos akan tampak tersusun dengan area nukleus dalam satu sel sejajar dengan ujung lonjong pada batas serabut-serabutnya apabila dilihat pada potongan longitudinal. Diantara serabut sel tersebut terdapat proyeksi sempit seperti jari dan pendek yang membuat hubungan pada batas sel otot polos. Namun, pada potongan melintang nukleus akan tampak bulat dan hanya terlihat pada beberapa sel (Zhang, 1999).



Gambar 2.11 Jaringan Otot Polos Normal Manusia, Perwarnaan *Hematoxylin-Eosin* (Eroschenko,2005)

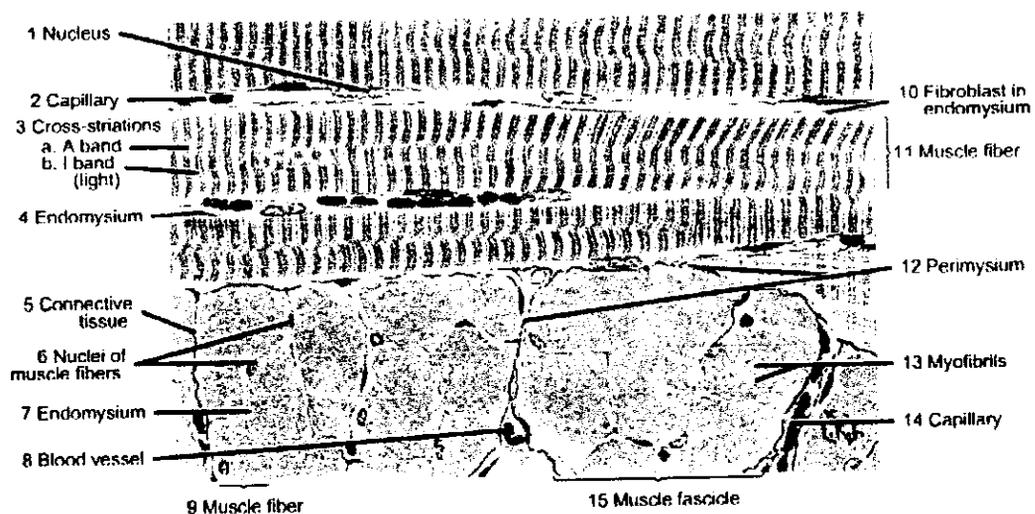
Otot polos diinervasi oleh serabut saraf otonom, baik simpatis maupun parasimpatis. Serabut otot polos dapat juga berfungsi sebagai unit kontraktile tunggal, seperti sel myoepitel di sekeliling unit sekretori pada kelenjar-kelenjar eksokrin. Sifat kontraksinya terus-menerus, pelan dan involunter. Otot polos dapat menyebabkan organ-organ berkontraksi dengan ritme tertentu serta dalam waktu yang lama tanpa merasa lelah, contohnya kontraksi ritmis terus menerus dari otot polos pada saluran cerna yang menggerakkan isi sepanjang lumen usus (Leeson & Leeson, 1970; Zhang, 1999).



Gambar 2.12 Jaringan Dinding Otot Polos Manusia dengan Potongan secara Transversal dan Longitudinal, Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (Eroschenko,2005)

2.6.2 Otot rangka

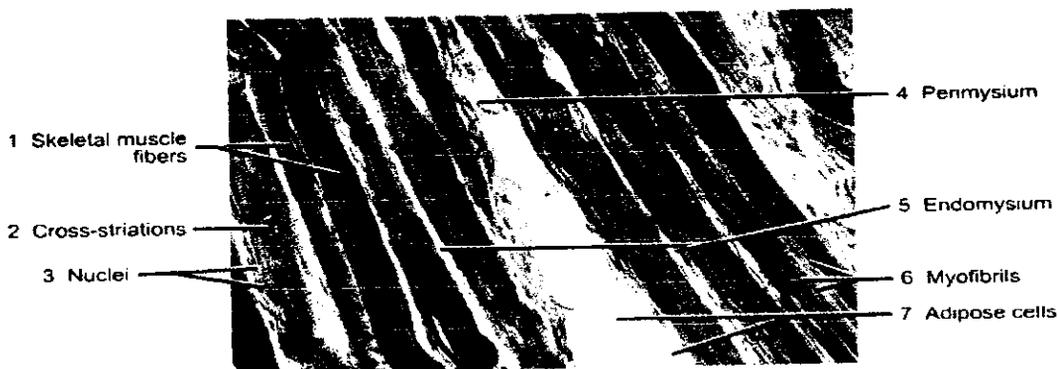
Otot rangka merupakan serabut otot individual yang umumnya berawal dan berakhir di tendon dan serabut otot tersusun secara paralel diantara ujung *tendinous* sehingga menghasilkan kontraksi yang aditif. Tiap serabut otot merupakan sel tunggal yang memiliki banyak nukleus, panjang, silindris dan dikelilingi oleh membran sel. Serabut otot terdiri atas myofibril yang terbagi atas filamen-filamen tunggal. Filamen tersebut mengandung protein kontraktile (Ganong, 2003). Sel-sel otot rangka berukuran panjang 1 - 40 mm dan lebar 10 - 100 μ m. Satu serabut dapat mengandung beberapa ratus nukleus bulat panjang yang terletak di tepi sel. Inti yang banyak itu terjadi akibat peleburan mioblas (prekursor sel otot) mononukleus embrional (Junquiera *et al*, 1998). Pada sel otot dewasa, nukleus akan bergerak ke tepi dan berada tidak terlalu dalam di sarkolema yaitu membran plasma serat otot. Pada potongan otot rangka secara melintang akan tampak nukleus yang berada pada tepi dan pada potongan longitudinal akan tampak garis-garis melintang (Junquiera *et al*, 1998).



Gambar 2.13 Otot Rangka pada Lidah Manusia dengan Pemetongan secara Transversal dan Longitudinal, Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (Eroschenko,2005)

Perbedaan indeks refraksi dari bagian yang berbeda-beda pada serat otot berpengaruh pada karakteristik garis-garis melintang yang terlihat pada otot

rangka. Oleh karena itu, pada perbesaran tinggi dibawah mikroskop cahaya akan tampak garis-garis yang berbeda yaitu pita-pita terang dan gelap. Pita gelap disebut sebagai pita A yang bersifat anisotropik, sedangkan pita terang disebut 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. Panjang sarkomer kurang lebih 2,5 μm pada otot yang istirahat. Sarkoplasma atau sitoplasma sel otot akan dipenuhi oleh berkas-berkas filamen silindris panjang yang disebut myofibril. Myofibril memiliki diameter 1-2 μm serta tersusun paralel terhadap sumbu panjang serabut otot, yang terdiri atas deretan sarkomer dengan susunan seperti rantai dari ujung ke ujung (Junquiera *et al*, 1998; Zhang, 1999).



Gambar 2.14 Fotomikrograf Serat Otot Lidah Potongan Memanjang, Menampakkan Pita Gelap A yang Diselingi Pita I Terang (Eroschenko,2005)

Masa serat yang menyusun berbagai tipe otot tersusun dalam berkas-berkas teratur, dikelilingi oleh epimysium yaitu sebuah selubung luar dari jaringan ikat padat yang mengelilingi seluruh otot. Dari epimysium, septa tipis jaringan ikat memanjang ke bagian dalam, mengelilingi berkas serat dalam otot. Jaringan ikat di sekitar setiap berkas serat otot disebut perimysium (Junquiera *et al*, 1998). Serabut-serabut tunggal terbungkus oleh lapisan tipis jaringan penghubung yang lembut yaitu endomysium, tersusun atas campuran serabut kolagen, serabut elastis dan fibroblas. Di antara serabut-serabut otot terdapat banyak pembuluh kapiler dan beberapa serabut saraf. Pembuluh darah bercabang-cabang dalam epimysium dan menembus septa dari perimysium serta membentuk dalam endomysium

anyaman kapiler sekitar setiap serat otot. Kapiler akan berkelok untuk menyesuaikan diri terhadap perubahan panjang serat dengan agak melurus selama relaksasi dan akan lebih berkelok lagi selama kontraksi (Fawcett, 2002).

Organel-organel sel umumnya terletak di dalam sarkoplasma. Organel tersebut diantaranya adalah kompleks golgi kecil yang terdapat pada satu kutub inti, mitokondria atau disebut juga sarkosom yang mengumpul di sarkoplasma jugtanukleus dan tersebar berupa barisan memanjang di antara myofibril yang merupakan tempat energi bagi kontraksi otot. Tetes lipid terdapat dalam jumlah kecil diantara myofibril atau diantara mitokondria kutub inti. Glikogen dapat diamati secara mikroskopik dan terdapat pada seluruh sarkoplasma dengan menggunakan pewarnaan PAS. Selain itu, terdapat mioglobin yang merupakan protein pengikat-oksigen dan memberikan warna coklat muda pada otot (Fawcett, 2002).

Diperlukan suatu energi untuk dapat melakukan kontraksi otot. Sumber energi cepat otot adalah derivat organik fosfat kaya energi yang terdapat didalam otot, sedangkan sumber energi utama adalah hasil metabolisme karbohidrat dan lemak intermediet. Energi berupa ATP diresintesis dari ADP melalui penambahan grup fosfat, dimana reaksi endotermik ini akan terjadi melalui pemecahan glukosa menjadi CO_2 dan H_2O serta senyawa fosforilkreatin yang dihidrolisis menjadi kreatin dan grup fosfat sehingga dapat memberikan tambahan energi pada periode yang singkat. Proses hidrolisis fosforilkreatin akan berlangsung selama olahraga di antara bagian kepala myosin dan aktin yang membentuk ATP dari ADP sehingga otot dapat melakukan kontraksi (Ganong, 2003).

Pada keadaan istirahat dan olahraga ringan, sumber energi didapatkan dari lemak otot dalam bentuk *free fatty acid* (FFA). Namun, seiring dengan peningkatan intensitas olahraga, lemak tersebut tidak cukup mampu menghasilkan energi dengan cepat sehingga dibutuhkan pemecahan karbohidrat sebagai campuran energi untuk otot. Glukosa yang terdapat di aliran darah akan masuk ke dalam sel yang akan terdegradasi melalui reaksi kimia tertentu dan menghasilkan piruvat. Sumber glukosa interselular lainnya adalah glikogen yang merupakan polimer karbohidrat dan banyak terdapat pada jaringan otot dan hepar. Metabolisme glukosa atau glikogen tersebut menjadi CO_2 dan H_2O menyebabkan

pelepasan energi yang memadai untuk membentuk ATP dari ADP dalam jumlah yang besar (Ganong, 2003).

Perubahan awal proses degenerasi sel otot yang paling sering dijumpai adalah *waxy degeneration* yang mengarah pada pelarutan protein serabut dan garis melintang otot, kemudian secara bertahap terjadi degenerasi nukleus serta akan tampak gumpalan-gumpalan agregat, pemisahan dan hilangnya sarkoplasma sehingga yang tertinggal hanya membran sarkolema kosong. Selanjutnya, aktivitas regenerasi dapat ditandai dengan adanya kelompok nukleus yang tampak berada di tengah (Thomas *et al*, 1984).

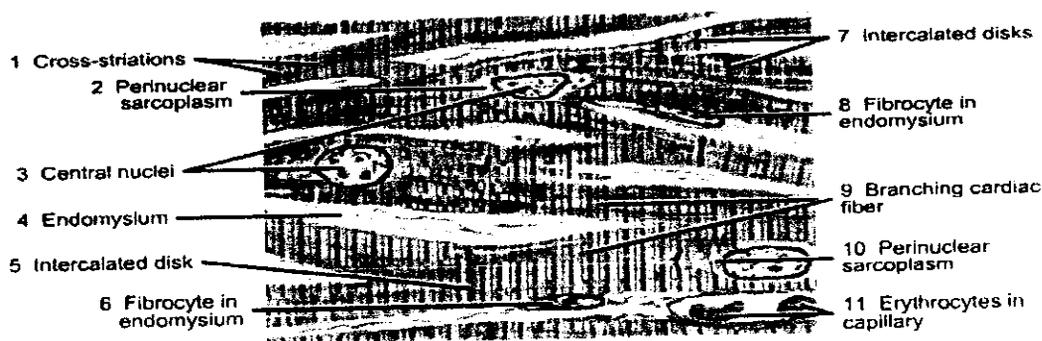
2.6.3 Otot jantung

Otot jantung memiliki susunan sel bercabang, yang tiap selnya terdapat satu nukleus, dan menunjukkan sedikit garis-garis melintang. Serabut otot jantung seluruhnya disebut sebagai miokardium yang membentuk dinding jantung dan melebar hingga vena-vena besar yang menuju jantung. Membran sel pada tiap ujung selnya akan membentuk berkas dan sesuai dengan lipatan membran pada sel selanjutnya. Oleh karena itu, serabut-serabut otot serta percabangannya yang terhubung pada bagian ujung tersebut memiliki area penghubung yang disebut *intercalated disc* sehingga dapat memperbolehkan impuls elektrik dari kontraksi otot untuk melewati dari satu sel ke sel lainnya dengan cepat. Kontraksi otot jantung berirama, otomatis dan tidak dipengaruhi kesadaran yang akan menghasilkan tekanan darah dan menjaga sirkulasi darah dalam tubuh (Zhang, 1999; Davis, 2007).

Serabut-serabut otot berbentuk silinder, dengan panjang rata-rata 100 – 150 μm dan lebar 15 – 30 μm . Di sekitar inti sel terdapat area *fusiform* dari sarkoplasma yang mengandung banyak organel. Garis-garis melintang pada otot jantung sama dengan otot rangka, namun tampak kurang jelas. Otot jantung memiliki mitokondria yang diperpanjang dalam jumlah besar dan berdekatan dengan fibril otot. Serat ototnya bercabang yang terbagi dalam dua cabang dan berhubungan membentuk jaringan tiga dimensi yang kompleks dengan tiap kelompok sel dikelilingi oleh membran sel (Zhang, 1999).

Intercalated disks merupakan area penghubung yang kuat, terletak diantara serat otot untuk menjaga kohesi dari sel ke sel lain sehingga dapat menyalurkan

transmitter dari satu unit kontraktile hingga sel – sel berikutnya. Diantara serabut-serabut otot terdapat selapis jaringan penghubung tersusun atas serabut kolagen, serabut retikuler, pembuluh darah dan fibroblas. Serabut purkinje merupakan serabut otot jantung yang berspesialisasi dan termasuk dalam sistem konduksi impuls dari jantung, terletak di bawah lapisan subendotel dari endokardium. Serabut purkinje juga memiliki garis-garis melintang dan *intercalated disks*, namun berukuran lebih besar dan lebih tebal dibandingkan serabut otot jantung lainnya dan mempunyai myofibril yang sangat sedikit dan sarkoplasma sentral yang lebih banyak (Zhang, 1999; Ganong, 2003).

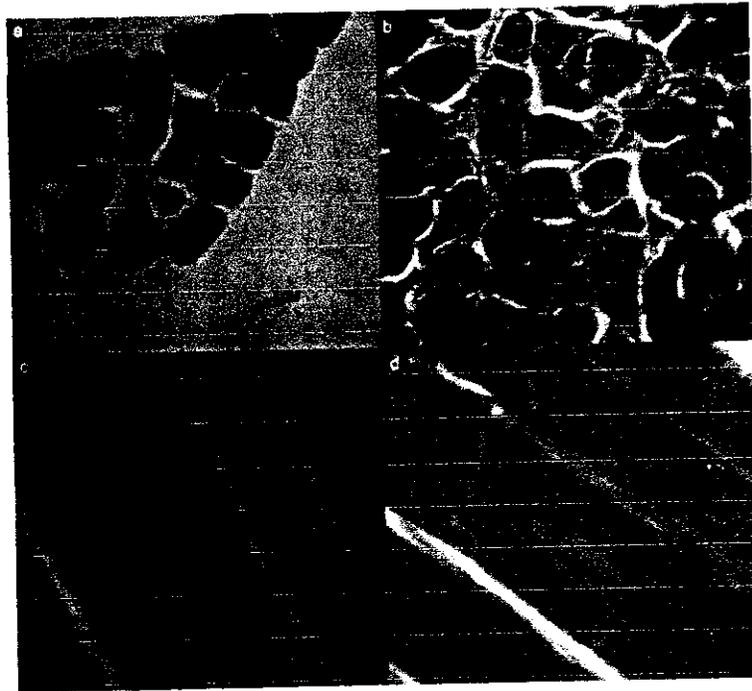


Gambar 2.15 Potongan Longitudinal Otot Jantung Manusia Normal, Pewarnaan *Hematoxylin – Eosin*. (Eroschenko,2005)

Serat otot jantung dilapisi oleh suatu sarkolema tipis yang hampir sama dengan otot rangka dan terdapat sarkoplasma yang dipenuhi oleh mitokondria. Sarkoplasma otot jantung mengandung lebih banyak endapan glikogen daripada yang terdapat pada otot rangka. Namun, otot jantung memiliki jaringan ikat yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan otot rangka dan hanya terdapat diantara serat-serat berupa endomisium yang penuh dengan kapiler darah. Hal tersebut menyebabkan otot jantung lebih tahan terhadap trauma bila dibandingkan dengan otot jenis lainnya, tetapi setelah mengalami cedera hampir tidak ada tanda-tanda regenerasi dan otot jantung yang rusak akan diperbaiki dengan meninggalkan jaringan parut (Leeson *et al*, 1996).

Otot jantung dan otot polos umumnya tidak banyak dipengaruhi oleh keadaan patologis. Oleh karena itu, dilakukan pengamatan pada otot rangka mencit yang berada pada tungkai bagian belakang. Pada diagnosis histologi-

histokimia, pengamatan dilakukan terhadap preparat otot melalui perbandingan bagian serabut otot terhadap jaringan ikat, variasi penampang irisan serabut otot, jumlah dan letak nukleus serabut otot, adanya nekrosis serabut tunggal, tampilnya atrofi serabut otot, tampilnya infiltrat radang dan hubungannya ke pembuluh darah otot (Thomas *et al*, 1984).



Gambar 2.16 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 2.17 Potongan Otot *Extensor Digitorum longus* dengan Pewarnaan H&E pada Tikus yang Telah Diinduksi dengan STZ Menunjukkan Daerah Infiltrasi Sel-Sel Inflamasi Diantara 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)

2.7 Jaringan Hepar

Hepar terletak pada kuadran sebelah kanan atas dari abdomen di dalam rongga peritoneal, di bawah diafragma bagian kanan dan tulang rusuk. Hepar menerima hampir 25% *cardiac output*, sekitar 1500 mL aliran darah per menit, melalui dua sumber, yaitu: aliran vena dari vena porta yang memiliki peran penting dalam menyelenggarakan fungsi-fungsi vital hepar serta aliran arteri dari arteria hepatica yang berperan penting dalam oksigenasi hepar dan sistem bilier. Pembuluh-pembuluh darah ini berkumpul di hepar, selanjutnya kombinasi aliran darah yang keluar dari vena sentralis (yang disebut juga vena terminal) akan menuju vena hepatica dan berakhir pada *vena cava inferior* (Lingappa *et al*, 2006) Adapun fungsi hepar ialah sebagai berikut:

Tabel 2.1 Fungsi Hepar Normal (Lingappa *et al*, 2006)

| No. | Fungsi Hepar |
|-----|--|
| 1. | <p>Metabolisme energi dan perubahan substrat</p> <ul style="list-style-type: none"> - Produksi glukosa melalui glukoneogenesis dan glikogenolisis. - Ambilan glukosa lewat jalur sintesa glikogen, sintesa asam lemak, glikolisis, dan siklus asam trikarbosiklik (TCA). - Sintesa kolesterol dari asetat, sintesa trigliserida dari asam lemak, dan sekresi keduanya dalam partikel VLDL (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>) - Ambilan kolesterol dan trigliserida melalui endositosis partikel-partikel HDL (<i>High Density Lipoprotein</i>) dan LDL (<i>Low Density Lipoprotein</i>) dengan ekskresi kolesterol di empedu, beta oksidasi dari asam lemak, dan konversi kelebihan asetil Ko-A menjadi keton. - Deaminasi asam amino dan konversi amonia menjadi urea lewat siklus |

| | |
|----|--|
| | <p>urea.</p> <p>- Transaminasi dan sintesis <i>de novo</i> asam-asam amino non esensial.</p> |
| 2. | <p>Sintesis protein</p> <p>-Sintesis dari berbagai macam protein-protein plasma, termasuk albumin, faktor-faktor pembekuan darah, protein-protein pengikat, apolipoprotein, angiotensinogen, dan insulin-like growth factor I.</p> |
| 3. | <p>Solubilisasi, transpor, dan penyimpanan</p> <p>-Detoksifikasi obat dan toksin lewat reaksi biotransformasi fase I dan fase II serta ekskresi di empedu.</p> <p>-Solubilisasi lemak dan vitamin-vitamin larut lemak di empedu untuk diambil oleh enterosit.</p> <p>-Sintesis dan sekresi VLDL dan partikel-partikel lipoprotein pra-HDL, serta clearance HDL, LDL, dan sisa-sisa kilomikron.</p> <p>-Sintesis dan sekresi dari bermacam-macam protein pengikat, termasuk transferin, globulin pengikat hormon steroid, globulin pengikat hormon tiroid, ceruloplasmin, dan metallothionein.</p> <p>-Pengambilan dan penyimpanan vitamin A, D, B12, serta folat.</p> |
| 4. | <p>Proteksi dan clearance</p> <p>-Detoksifikasi amonia melalui siklus urea.</p> <p>-Detoksifikasi obat-obatan melalui oksidasi mikrosomal dan sistem konjugasi.</p> <p>-Sintesis dan ekspor glutation. . .</p> <p>-<i>Clearance</i> dari sel-sel dan protein yang rusak, hormon, obat-obatan, serta faktor-faktor pembekuan yang teraktivasi dari sirkulasi portal.</p> <p>-<i>Clearance</i> dari bakteri dan antigen dari sirkulasi portal.</p> |

2.7.1 Struktur hepar

A. Stroma

Hepar dibungkus oleh simpai tipis jaringan ikat (Kapsula Gibson) yang menebal di hilum, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hepar, duktus hepaticus kiri dan kanan, serta tempat keluarnya pembuluh limfe. Pembuluh-pembuluh dan duktus ini dikelilingi oleh jaringan ikat sepanjang jalannya (akhir

atau awal) di daerah portal, diantara lobulus hepar klasik. Pada titik ini, jalinan serat retikular halus yang terbentuk menunjang hepatosit dan sel endotel sinusoid dari lobulus hepar (Junqueira *et al*, 1998).

B. Lobulus hepar

Lobul hepar ialah unit struktural dari hepar yang terdiri dari sel-sel parenkim yang disebut hepatosit. Sel hati (hepatosit) merupakan komponen struktural utama dari hepar. Sel epitelial ini berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan. Lobulus hati dibentuk oleh massa jaringan berbentuk poligonal berukuran 0,7 x 2 mm. Lobulus manusia saling berhubungan, sehingga sukar ditetapkan batas-batas antara lobuli. Tetapi pada beberapa daerah, lobulus ini dibatasi oleh jaringan ikat yang mengandung duktus biliaris, pembuluh limfe, pembuluh saraf, dan pembuluh darah. Daerah ini, celah portal, terdapat pada sudut lobulus dan dihuni oleh *triad portal*. Hepar manusia memiliki 3-6 *triad portal* per lobulus, masing-masing mengandung sebuah venul (cabang vena porta), sebuah arteriol (cabang arteri hepatica), satu duktus (bagian dari sistem duktus biliaris), serta pembuluh limfe (Junqueira, 1998; Zhang, 1999).

C. Aliran darah

Hepar memperoleh aliran darah dari dua sumber: 80% dari aliran darahnya berasal dari vena porta yang mengangkut darah rendah oksigen dan kaya nutrisi dari visera abdominal (usus, pankreas, dan limpa); serta 20% sisanya berasal dari arteri hepatica yang memasok darah kaya oksigen (Junqueira, 1998; Lingappa, 2006). Terbagi menjadi dua sistem, yaitu:

- a. Sistem vena porta: vena porta seringkali bercabang dan menjulurkan venul halus, vena porta, ke *triad portal*. Venul porta ini kadang-kadang disebut "cabang interlobular", bercabang menjadi vena distribusi yang berjalan di tepian lobulus. Dari vena distribusi, venul ceruk halus mencurahkan isinya ke dalam sinusoid. Sinusoid ini berjalan radial menuju ke pusat lobulus untuk membentuk vena sentralis atau sentrolobular.
- b. Sistem arteri: arteri hepatica bercabang berulang kali dan menghasilkan arteri interlobular. Beberapa memperdarahi struktur dari kanal portal dan lainnya dari arteriol yang berakhir langsung dalam sinusoid pada jarak yang

berbeda dari celah portal, sehingga dengan demikian dapat menyediakan darah arterial dan darah venosa (portal) bagi sinusoid.

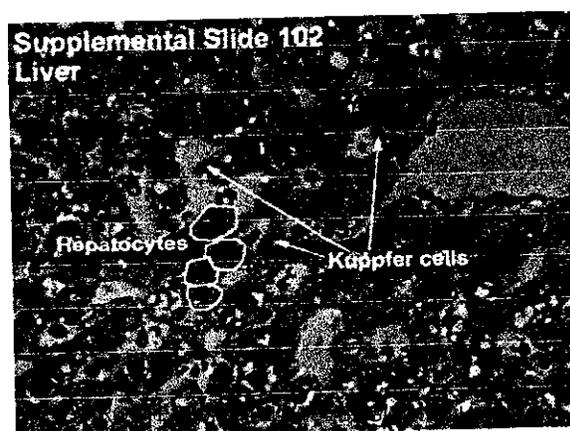
D. Hepatosit

Sel-sel hepar berbentuk polihedral dengan enam atau lebih permukaan dan garis tengah lebih kurang 20-30 μm . Pada pewarnaan HE, sitoplasma hepatosit akan bersifat eosinofilik, terutama karena banyaknya mitokondria dan sejumlah retikulum endoplasma halus. Sel hepar seringkali mengandung glikogen. Polisakarida ini tampak sebagai granul kasar dan kedap-elektron yang seringkali terkumpul pada kelompok retikulum endoplasma halus di bawah mikroskop. Pada sediaan yang dipulas dengan reaksi Schiff-asam periodat terhadap karbohidrat, daerah sitoplasma banyak mengandung endapan glikogen (Junqueira *et al*, 1998).

Hepatosit mengandung lipid dalam jumlah bervariasi dalam tetes padat-elektron, yang tidak dibatasi membran. Dalam hepar normal, jumlahnya hanya sedikit, namun akan sangat meningkat setelah mengkonsumsi alkohol atau substansi hepatotoksik lain. Pengumpulan lipid umumnya dimulai di dalam sel-sel zona 3 (sel-sel dekat ujung asinus), dengan banyak tetes kecil yang kemudian menyatu, dan pada keadaan toksisitas berat, sel-sel tersebut dapat menggelembung menjadi satu tetes lipid sangat besar (Junqueira *et al*, 1998).

E. Sinusoid hepar

Sinusoid ialah pembuluh darah yang menerima darah dari percabangan arteri hepatic terminal dan vena porta pada bagian perifer lobulus untuk dibawa ke vena sentralis. Jika terjadi gangguan atau perubahan ukuran pada hepatosit, maka sinusoid juga akan mengalami perubahan ukuran. Di endotel sinusoid, banyak melekat makrofag (sel Kupffer) yang berproyeksi ke dalam lumen (Zhang, 1999; Ganong, 2003).



Gambar 2.18 Penampang Melintang Hepar Manusia Menggunakan Pewarnaan *Haematoxylin-Eosin*

Terdapat ruang antara lapisan endotel sinusoid dengan hepatosit yang disebut dengan *space of Disse*. *Space of Disse* terhubung dengan sinusoid melalui ruang antara sel-sel endotel dari dinding sinusoid. Sel endotel sinusoidal mudah untuk dilewati, sehingga aliran plasma terjadi tanpa hambatan dari pembuluh darah sinusoid menuju *space of Disse*. Akibatnya, hepatosit akan terbasahi oleh plasma berisi metabolit dan nutrisi yang dibawa dalam jumlah besar dari usus halus, dan plasma yang terkumpul dalam *space of Disse* akan mengalir kembali ke vena porta, terkumpul dalam pembuluh darah limfatik dan membentuk sejumlah besar aliran menuju ke seluruh tubuh (Zhang, 1999).

Terdapat juga sel-sel penyimpanan lemak (*ito cell*) yang berlokasi di antara hepatosit-hepatosit atau pada *space of Disse*. Sel ini lebih kecil daripada hepatosit dan memiliki sebuah nukleus berbentuk oval. Sitoplasma tampak pucat dan selalu berisi tetesan-tetesan lemak. Sel ini memiliki paling tidak dua sisi yang terbasahi oleh plasma darah di dalam *space of Disse*. Sel-sel penyimpan lemak berpengaruh pada saat terjadi akumulasi lemak dan produksi vitamin A, demikian juga dalam memproduksi kolagen dan serat-serat retikular. Pada keadaan patologis, sel ini dapat berubah menjadi sel-sel adiposa atau fibroblas (Zhang, 1999).

2.7.2 Efek metabolisme diabetes pada hepar

Pada kondisi diabetes, metabolisme karbohidrat dan lemak dipengaruhi oleh resistensi insulin dan defisiensi sekresi insulin. Resistensi insulin menurunkan ambilan glukosa pada otot rangka dan meningkatkan lipolisis jaringan adiposit. Lipolisis tersebut mengakibatkan peningkatan sirkulasi asam lemak bebas dalam plasma yang akan semakin memperparah resistensi insulin, termasuk menginduksi terjadinya resistensi insulin perifer. Akibatnya, akan meningkatkan penyimpanan lemak dalam hepar (Tolman *et al*, 2004).

A. Metabolisme karbohidrat

Peningkatan jumlah asam lemak bebas dalam plasma sebagai akibat dari resistensi insulin menyebabkan gangguan keseimbangan glukosa, yaitu peningkatan produksi glukosa oleh hepar dan penurunan *clearance* perifer (DeFronzo *et al*, 1982). Dalam kondisi normal, sebagai kompensasi terhadap hiperinsulinemia, tubuh akan menekan proses glikogenolisis dan glukoneogenesis hepatic, sehingga terjadi pemulihan keseimbangan glukosa. Akan tetapi, pada kondisi diabetes terjadi resistensi *suppressive effects of insulin* (Lewis *et al*, 1999). Bertambahnya jumlah asam lemak bebas tidak meningkatkan jumlah insulin plasma secara mencukupi untuk mengatasi efek resistensi insulin pada hepar dan perifer (Boden, 1997). Akibatnya, terjadi penurunan pemakaian glukosa yang menimbulkan hiperglikemia (Tolman *et al*, 2004).

B. Metabolisme lemak

Sebagian besar lipid plasma relatif tidak larut dalam larutan air dan tidak beredar dalam bentuk bebas. Asam-asam lemak bebas atau *free fatty acids* (FFA) terikat pada albumin, sementara kolesterol, trigliserida, dan fosfolipid ditranspor dalam bentuk kompleks lipoprotein. Ada enam keluarga lipoprotein, yaitu: kilomikron, sisa kilomikron, VLDL, LDL, IDL, dan HDL. Kandungan protein pada lipoprotein disebut apoprotein. Apoprotein utama ialah apoE, apoC, dan apoB. Kilomikron dibersihkan dari sirkulasi oleh kegiatan lipoprotein lipase. Enzim tersebut mengkatalisis pemecahan trigliserida (TG) di dalam kilomikron menjadi FFA dan gliserol, yang kemudian masuk ke sel-sel adiposa dan direesterifikasi (Ganong, 2003).

Kilomikron dan sisa kilomikron merupakan suatu sistem transpor untuk lipid eksogen yang dikonsumsi. Sistem endogen yang terdiri dari VLDL, LDL, IDL, dan HDL, mengangkut TG dan kolesterol ke seluruh tubuh. VLDL terbentuk di hepar untuk mengangkut TG yang terbentuk dari asam lemak dan karbohidrat di hepar ke jaringan ekstrahepatik. VLDL dibentuk menjadi IDL oleh lipoprotein lipase. Beberapa IDL diambil oleh hepar, sementara sisanya kemudian akan melepaskan lebih banyak TG dan protein (kemungkinan di sinusoid-sinusoid hepar) dan menjadi LDL (Ganong, 2003).

Pada diabetes tipe 2 sering terjadi dislipidemia yang ditandai oleh peningkatan jumlah TG dalam plasma, penurunan jumlah HDL, dan peningkatan jumlah VLDL. Kondisi ini sering dijumpai pada *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) (Cassader *et al*, 2001). Pada penyakit perlemakan hepar, dapat dijumpai droplet-droplet besar trigliserida yang terdepo di hepatosit (Belfiore & Iannello, 2000). Penyebab utama hipertrigliseridemia ialah overproduksi VLDL kaya trigliserida dan apoB yang disebabkan oleh hiperinsulinemia dan peningkatan availabilitas *free fatty acid substrate*. Pada manusia sehat, insulin menurunkan pelepasan VLDL-1 apoB. Penurunan aktivitas lipoprotein lipase dalam lemak dan otot rangka berpengaruh pada penurunan *clearance* lipoprotein kaya TG (Tolman *et al*, 2004).

Resistensi insulin akan meningkatkan lipolisis trigliserida dan menghambat esterifikasi asam lemak bebas dalam jaringan adiposa. Hasilnya ialah peningkatan jumlah asam lemak bebas dalam serum yang akan terdepo pada hepar. Sintesis trigliserida hepatic dikendalikan oleh peningkatan influks FFA dan didukung oleh *insulin upregulated lipogenic transcription factors*, seperti *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) dan *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) – 1c. Metabolisme alternatif dari asam lemak bebas dengan cara oksidasi dihambat oleh insulin. Ekspor TG melalui VLDL dihambat oleh penurunan sintesis apolipoprotein B (apoB) atau pengurangan ikatan TG dengan apoB oleh MTP (Adams *et al*, 2005). Asam lemak menginduksi sitokrom P450 4A dan 2E1 *isoenzymes-lipoxygenases* yang membentuk radikal bebas. Spesi oksigen reaktif memicu perkembangan penyakit melalui kedua peroksidasi lipid dan induksi sitokin. Peroksidasi lipid melepaskan *malondialdehyde* dan *4-hydroxynonenal*. Kedua senyawa tersebut mengakibatkan kematian sel dan *protein cross-linkage*, menghasilkan bentukan *Mallory's hyaline* dalam hepatosit. Mereka juga mengaktifkan *stellate cells*, yang memicu sintesis kolagen dan fibrosis. Induksi sitokin memicu inflamasi. Hal-hal tersebut menunjukkan bentuk-bentuk karakteristik histologi NAFLD (Tolman *et al*, 2004).

2.8 Reseptor Insulin sebagai Antibodi Analisis Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah suatu metode yang digunakan untuk menunjukkan keberadaan dan lokasi protein pada potongan jaringan. Meskipun metode ini kurang kuantitatif dibandingkan dengan *Western blotting* atau ELISA, imunohistokimia dapat memberikan pengamatan pada proses jaringan yang masih hidup. Imunohistokimia khususnya digunakan untuk memperkirakan tingkat kemajuan dan terapi pada penyakit seperti kanker. Umumnya, informasi yang didapatkan dari imunohistokimia dikombinasikan dengan studi secara mikroskopi yang menyediakan gambaran jaringan dalam ukuran besar (Abcam, 2010).

Pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini ditambahkan dengan antibodi berupa insulin reseptor sehingga dapat mengenali protein target. Antibodi bersifat sangat spesifik sehingga hanya akan berikatan dengan protein yang dikehendaki pada sampel potongan jaringan. Interaksi antigen-antibodi akan divisualisasikan menggunakan deteksi kromogenik, dimana enzim berkonjugasi dengan antibodi dan akan memecah substrat yang menghasilkan presipitan berwarna pada lokasi protein tersebut. Deteksi dengan fluoresensi juga dapat dilakukan dengan cara fluorofor berkonjugasi dengan antibodi dan dapat divisualisasikan menggunakan mikroskopi fluoresensi (Abcam, 2010).

Antibodi insulin reseptor adalah suatu glikoprotein heterotetrametrik membran yang memiliki aktivitas *tyrosine-protein kinase*, yang terdiri atas subunit ikatan disulfida menjadi bentuk β - α - α - β heterotetramer. Subunit α mengikat insulin secara ekstraselular kemudian menginduksi perubahan konformasi subunit β yang menembus membran plasma sehingga menghasilkan aktivasi tirosin kinase dan inisiasi respon *cascade* dari substrat intraselular lainnya (Ganong, 2004; Kumar&Clark, 2006; Peavy 2006). Pengikatan insulin dengan insulin reseptor akan merangsang mediator lainnya di dalam jaringan termasuk IRS-1 dan PI3K sehingga menyebabkan terjadinya *up take* glukosa (Abcam, 2010).

Biosintesis reseptor insulin dimulai dengan proses transkripsi dari gen tersebut dan *splicing* dari 22 ekson yang menjadi dua transkrip (dengan atau tanpa ekson 11). Ekson 1-12 mengkode subunit alfa dan ekson 13-22 mengkode subunit beta. Kemudian translasi dari IR mRNA diikuti oleh insersi membran melalui rangkaian asam amino 27, yang selanjutnya membelah. Kedua subunit alfa dan

beta merupakan rantai polipeptida 1355 asam amino. Pro-reseptor rantai karbohidrat termodifikasi, dimerisasi dan membentuk formasi ikatan disulfida serta pemisahan antara subunit alfa dan subunit beta terjadi. Subunit alfa yang matur merupakan 735 asam amino dan memiliki besar 125 kDa oleh gel elektroforesis natrium dodesilsulfat-poliakrilamid. Subunit beta terdiri atas 620 asam amino dan memiliki berat 95 kDa. Transit reseptor yang matur dari jaringan golgi ke membran plasma dikontrol secara terpisah dari internalisasi dan mungkin dibatasi pada tahap awal biosintesis. Pada membran plasma, reseptor insulin akan berikatan dengan insulin lalu terjadi autofosforilasi pada residu *tyrosine*. Internalisasi reseptor juga disebabkan oleh ikatan insulin. Insulin dipindahkan dari sirkulasi oleh IR melalui endositosis. Endosom akan menjadi *acidified*, lalu menyebabkan pelepasan insulin. Waktu paruh IR normal adalah 8-16 jam, tergantung pada tipe sel dan degradasi dipercepat dengan adanya ikatan insulin (Kohenski, 2002).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan :

- Alat-alat gelas Pyrex
- Jarum suntik Terumo 26G
- S spuit injeksi Terumo 1 mL
- Kandang mencit dan perlengkapannya
- Gunting dan pisau bedah
- Neraca analitik Ohaus
- pH meter
- Sonde
- *On Call Plus Blood Glucose Monitoring System*[®]
- Mikrotom
- Mikroskop cahaya dengan *digital camera*

3.2 Bahan

3.2.1 Vanadil sulfat

Pada penelitian ini digunakan vanadil sulfat yang diperoleh dari Fluka dalam 3 dosis yang berbeda, yaitu: 5 mg/kg, 30 mg/kg, dan 100 mg/kg BB. Bahan ditambah CMC Na 0,6% untuk dibuat larutan masing-masing 10 mL. Campuran diaduk sampai membentuk suspensi dan diambil sesuai dengan berat badan mencit.

3.2.2 *Streptozotocin*

Bahan ini digunakan untuk menginduksi hewan percobaan mencit agar menderita *diabetes mellitus* tipe 2. Dosis *streptozotocin* yang digunakan dalam penelitian ini 100 mg/kg BB yang diberikan secara intraperitoneal. Dibuat larutan *streptozotocin* dalam dapar sitrat sebanyak 10 mL (100 mg/10 mL). Larutan yang diambil disesuaikan dengan berat badan mencit. *Streptozotocin* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sigma.

3.2.3 Dapar sitrat

Dapar sitrat sebagai pelarut *streptozotocin* dibuat dari asam sitrat dan natrium sitrat dengan pH 4,8. Diambil sebanyak 32,56 mL asam sitrat 0,1 M yang dibuat dengan cara melarutkan 1,05 gram asam sitrat ke dalam 50 mL aquadest, kemudian ditambahkan dengan 17,44 mL natrium sitrat 0,2 M yang dibuat dengan cara melarutkan 2,82 gram natrium sitrat ke dalam 50 mL aquadest. Kemudian dicek pH-nya untuk mencapai pH dapar 4,8 dengan pH meter.

3.2.4 *Carboxymethyl cellulose natrium* (CMC Na)

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

3.2.5 *Neutral buffer formalin*

Bahan ini digunakan untuk preparasi fiksasi potongan jaringan sebelum dilakukan pewarnaan. Konsentrasi formalin yang digunakan adalah 10%. Dapar formalin ini memiliki pH = 6,8 dan terdiri dari 4,0 g NaH_2PO_4 ; 6,5 g Na_2HPO_4 ; dan 100,0 mL formaldehid 37% dalam 900,0 mL aquadest.

3.2.6 *Haematoxyllin-Eosin* (HE)

Bahan ini digunakan untuk melihat morfologi jaringan adiposa dan hepar. Digunakan *haematoxyllin-eosin* dari Baxter.

3.2.7 *Phosphate buffer saline* (PBS)

Bahan ini digunakan untuk analisis rutin imunohistokimia dan pengenceran antibodi. Pembuatan PBS dilakukan sehari sebelum eksperimen imunohistokimia. PBS 0,1 M dipreparasi dengan 30,441 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ yang ditambah dengan aquadest hingga 850 mL. Selanjutnya dibuat larutan NaH_2PO_4 , yaitu sebanyak 3,450 gram NaH_2PO_4 ditambah dengan aquadest hingga 250 mL. Kemudian kedua larutan tersebut dicampur dan di-adjust sampai mencapai pH 7,4. Diambil sebanyak 900 mL larutan PBS 0,1 M yang telah dibuat lalu ditambah dengan 9 gram NaCl dan aquadest hingga 1000 mL.

3.2.8 Antibodi Insulin reseptor dan *glucose transporter* GLUT4 (IF8)

Bahan ini merupakan protein rekombinan parsial terhadap insulin reseptor / GLUT4 dan digunakan sebagai antibodi untuk berikatan dengan insulin reseptor / GLUT4 sebagai antigen spesifik reseptor insulin. Konsentrasi tiap *batch* yang tersedia berkisar pada rentang antara 0,48-0,50 mg/mL. Selama penyimpanan dapat digunakan *buffer* pengawet 0,02% *sodium azide* dengan konstituen berupa 1% BSA, PBS (pH 7,4). Untuk analisis secara imunohistokimia, dilakukan pengenceran sebesar 1 : 2000 selama 1 jam.

3.2.9 Hewan 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

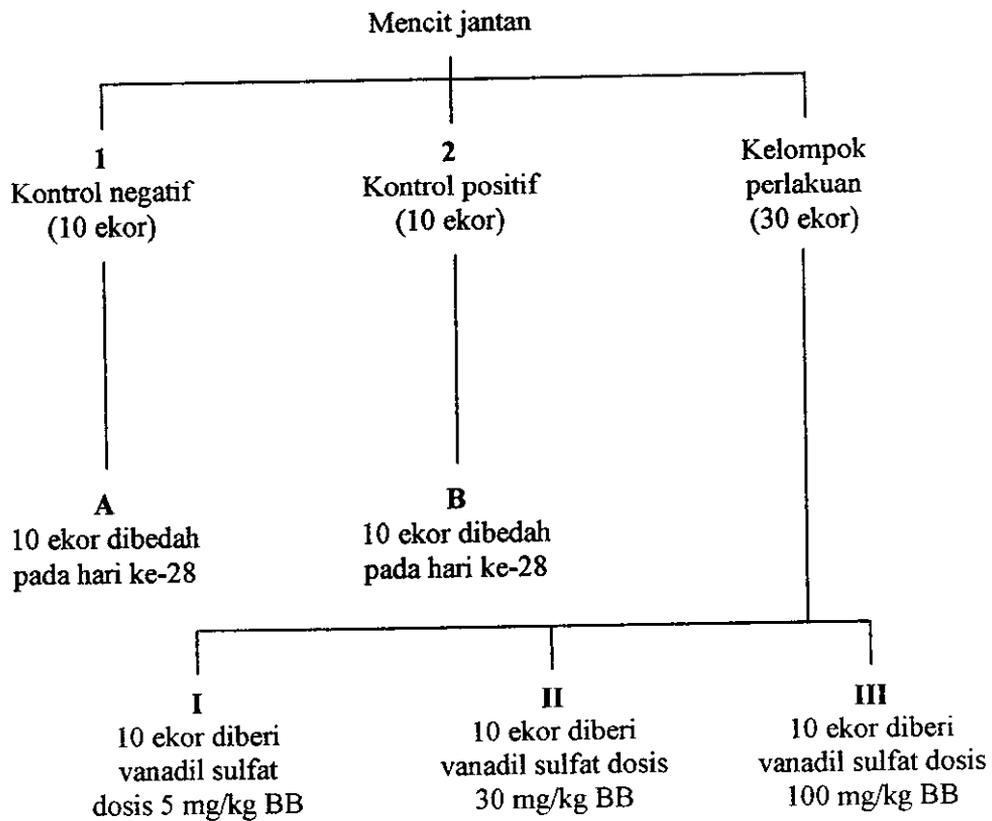
3.3 Protokol Penelitian

Mencit jantan berumur delapan minggu ditempatkan secara berkelompok dalam kandang dengan temperatur ruangan 30 ± 1 °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 diberi 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 BB 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

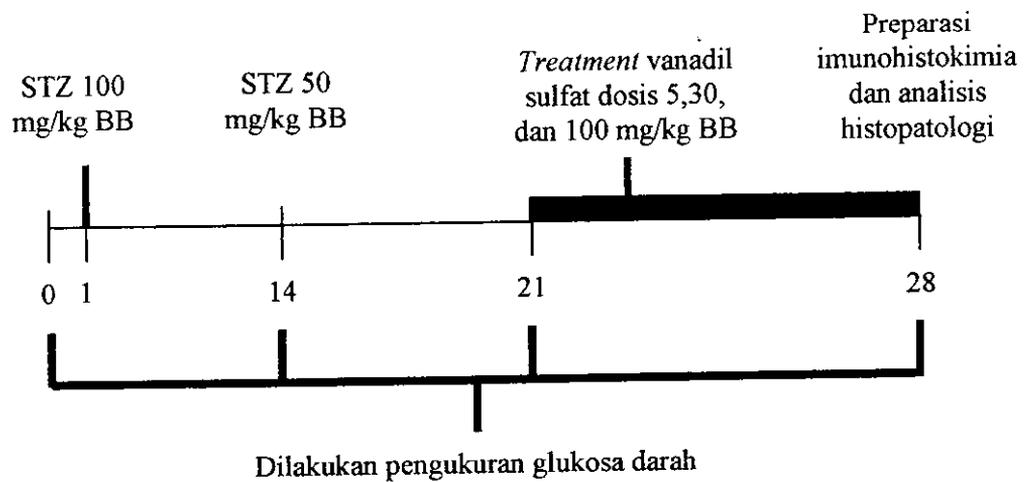
melalui ekor dengan cara melukai ekor. Kadar glukosa darah diukur dengan menggunakan *On Call Plus Glucose Monitoring System*[®].

Pada hari ke-28, setelah pengukuran glukosa darah, dilakukan pembedahan dan pemotongan jaringan adiposa dan hepar tiap kelompok dengan mikrotom. Jaringan kemudian dipreparasi dengan melakukan fiksasi menggunakan *neutral buffer formalin*. Setelah itu, pemotongan dan pewarnaan secara imunohistokimia akan dilakukan oleh Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo. Analisis dan pemotretan akan dilakukan dengan bantuan ahli patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.4 Pengelompokan Hewan Coba dan *Timeline* Kelompok Perlakuan

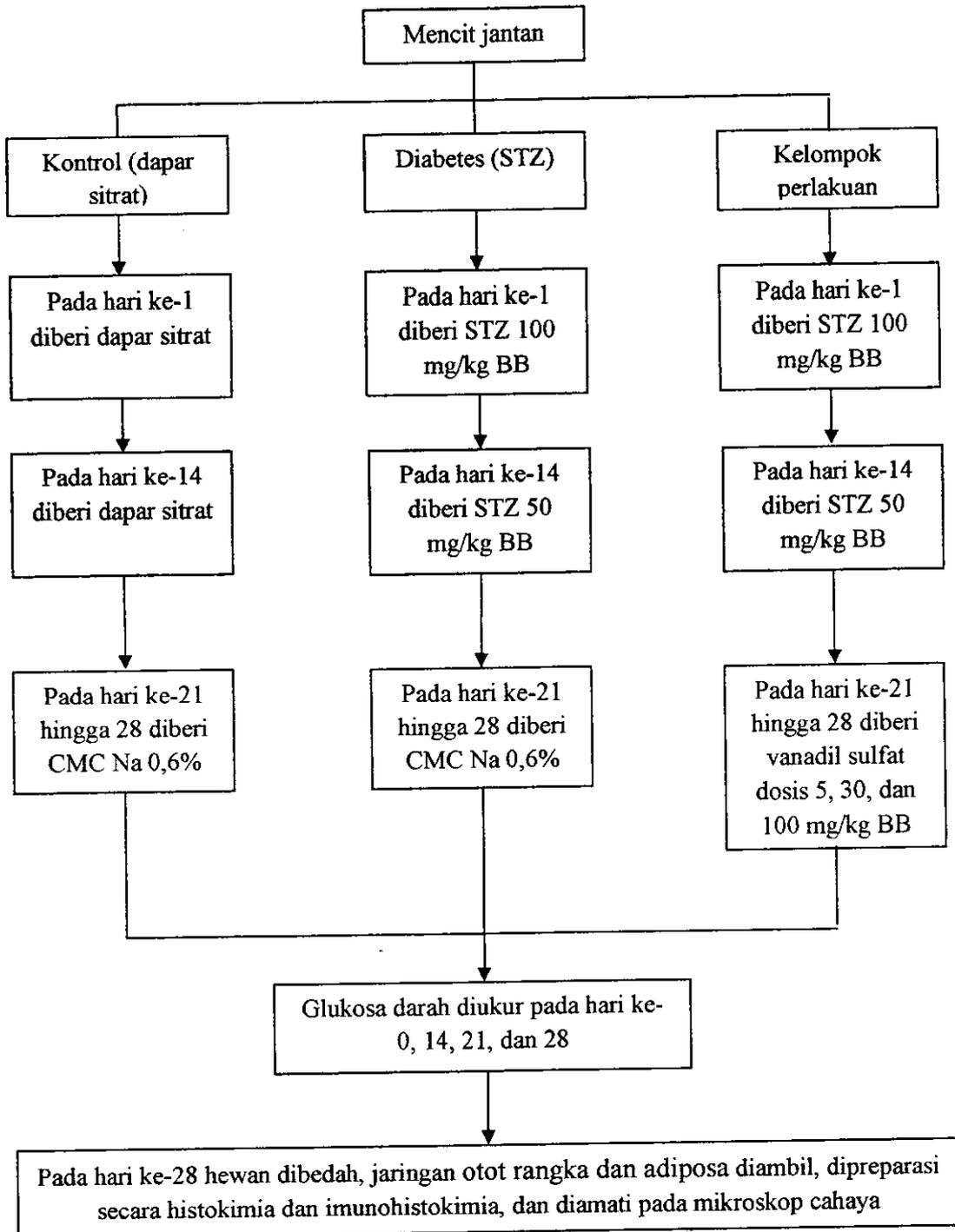


Gambar 3.1 Diagram pengelompokan hewan coba



Gambar 3.2 Diagram *timeline* kelompok perlakuan

3.5 Kerangka Operasional



Gambar 3.3 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.
- Pada hari ke-21, mencit diberi CMC Na 0,6 % sekali sehari selama 7 hari secara *per oral*.
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14, 21, dan 28.
- 10 ekor mencit dibedah pada hari ke-28. Dipilih 3 sampel jaringan otot rangka dan adiposa mencit untuk dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

II. Kelompok Kontrol Positif (Diabetes):

- Pada hari ke-1, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 100 mg/kg BB secara intraperitoneal.
- Pada hari ke-14, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 50 mg/kg BB secara intraperitoneal.
- Pada hari ke-21, mencit diberi CMC Na 0,6% sekali sehari selama 7 hari secara *per oral*.
- Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0, 14, 21, dan 28.
- 10 ekor mencit dibedah pada hari ke-28. Dipilih 3 sampel jaringan otot rangka dan adiposa mencit untuk dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

III. Kelompok Perlakuan:

a) Perlakuan 1

- Pada hari ke-1, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 100 mg/kg BB secara intraperitoneal.
- Pada hari ke-14, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 50 mg/kg BB 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 rangka dan adiposa diambil. Dipilih 3 sampel jaringan otot rangka dan adiposa mencit untuk dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

b) Perlakuan 2

- Pada hari ke-1, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 100 mg/kg BB secara intraperitoneal.
- Pada hari ke-14, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 50 mg/kg BB 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 adiposa diambil. Dipilih 3 sampel jaringan otot rangka dan adiposa mencit untuk dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

c) Perlakuan 3

- Pada hari ke-1, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 100 mg/kg BB secara intraperitoneal.
- Pada hari ke-14, mencit diberi injeksi *streptozotocin* 50 mg/kg BB 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 adiposa diambil. Dipilih 3 sampel jaringan otot rangka dan adiposa mencit untuk dipreparasi dengan pewarna, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

3.6 Preparasi dan Pewarnaan Jaringan Otot, hepar dan pankreas

Mencit yang akan diambil jaringannya diberi anestesi eter dan dibedah. jaringan otot rangka, hepar dan pankreas diambil, kemudian difiksasi dalam *neutral buffer formalin* 10%. Formalin diserap cukup baik oleh jaringan dalam waktu relatif lama, yaitu 1-4 jam. Dapar dalam formalin berfungsi untuk 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 objek untuk direaksikan dengan pewarna.

Jaringan otot rangka dan adiposa mencit yang telah diberi parafin dipotong dengan mikrotom setebal 4-5 μm dan diletakkan pada gelas objek. Gelas objek diletakkan di tempat hangat selama 15 menit agar potongan jaringan lebih melekat pada gelas objek. Tahap awal pewarnaan jaringan otot rangka dengan *periodic acid Schiff* adalah proses deparafinasi (penghilangan parafin), 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 *haematoxyllin* sebagai *counterstain* selama 3 menit, lalu dicuci dengan air, *haematoxyllin* biru, dan aquadest. Tahap terakhir adalah dehidrasi potongan jaringan dengan alkohol, dibersihkan dan ditutup dengan gelas penutup. Potongan jaringan otot rangka mencit siap dianalisis. Pewarnaan *periodic acid Schiff* merupakan reaksi histokimia dimana 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 hepar dan otot, dibutuhkan pewarnaan rutin menggunakan pereaksi *haematoxyllin-eosin* (Fawcett, 2002) sementara untuk pankreas diperlukan aldehyd fuhsin. Tahap awal pewarnaan jaringan adalah deparafinasi (penghilangan parafin), dilakukan dengan mengalirkan aquadest pada potongan jaringan. Potongan jaringan dialiri air, kemudian ditempatkan dalam *haematoxyllin* 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 alkohol 1% selama 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. Pada prinsipnya, *haematoxyllin* dioksidasi menjadi hematein dan bergabung membentuk kompleks dengan mordant, ion logam seperti aluminium. Muatan positif dari kompleks tersebut berikatan dengan muatan negatif dari ion fosfat asam nukleat dan membentuk warna biru keunguan, warna yang khas untuk *haematoxyllin*. Hasil yang tampak ialah inti sel berwarna biru kehitaman, sitoplasma berwarna merah muda, serabut otot berwarna merah muda gelap hingga merah tua, fibrin berwarna merah muda gelap, dan sel darah merah tampak jingga atau merah tua (Lowe, 1997).

3.7 Preparasi Imunohistokimia

Adapun preparasi imunohistokimia dapat diterangkan sebagai berikut:

1. Diambil *slide* yang mengandung sampel dari tempat penyimpanan (*freezer*, 30 °C).
2. Dicairkan selama 20 menit (tiap *chamber* berisi 9 slide).
3. Bagian bawah *object glass* dibersihkan menggunakan kain yang sesuai sebanyak 2 kali.
4. Bagian bawah *object glass* ditandai dengan penanda yang *water proof*.
5. Dibiarkan selama 15 sampai 20 menit.
6. Dicuci dengan PBS selama 5 menit dan dikeringkan dengan cara penirisan.
7. Diblok dengan menggunakan 10% *horse serum*.
8. Antibodi diencerkan dengan PBS.
9. Sampel ditambahkan dengan antibodi.
10. Preparat diinkubasi selama kurang lebih 3 hari pada suhu 4 °C.
11. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali (masing-masing sekitar 5 menit) dan dikeringkan.
12. *Chamber* dibungkus dengan aluminium *foil*.
13. Preparat ditambahkan dengan *second antibody* yang telah diencerkan dengan PBS sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki.
14. Preparat dicuci sebanyak 3 kali.
15. Preparat diamati di bawah mikroskop.

*) Keterangan: Untuk pewarnaan ganda, tahap 8-15 diulangi sekali lagi.

3.8 Analisis Hasil

3.8.1 Analisis glukosa darah

Hasil pengukuran kadar glukosa darah diuji secara statistik dengan Anova. Uji ini digunakan untuk mengetahui adanya kenaikan kadar glukosa darah pada mencit setelah diinduksi dengan *streptozotocin* dan penurunan kadar glukosa darah setelah di-*treatment* dengan vanadil sulfat secara bermakna.

3.8.2 Analisis preparat imunohistokimia

Hasil pewarnaan jaringan diamati di bawah mikroskop dan diambil gambarnya. Dilakukan perbandingan antara kelompok kontrol (dapat sitrat), diabetes (STZ), dengan kelompok diabetes yang diberi *treatment* vanadil sulfat (dosis 5, 30, dan 100 mg/kg BB) dengan bantuan ahli patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, antara lain mengenai perubahan morfologis jaringan, yaitu jumlah dan ukuran sel jaringan otot, hepar dan sel beta pankreas.

Hasil imunohistokimia preparat jaringan otot rangka dan adiposa dengan antibodi GLUT4 menghasilkan warna yang intensitasnya akan diukur untuk mengetahui banyaknya reseptor insulin / *glucose transporter 4* yang bereaksi dengan antibodi tersebut. Semakin banyak reseptor insulin / *glucose transporter 4* yang bereaksi, maka intensitas warna yang dihasilkan semakin terang. Jumlah reseptor insulin / *glucose transporter 4* inilah yang akan dijadikan dasar pertimbangan efektivitas vanadil sulfat dalam menurunkan glukosa darah pada jaringan target insulin (terutama otot rangka dan hepar).

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1 Model *Diabetes Mellitus*

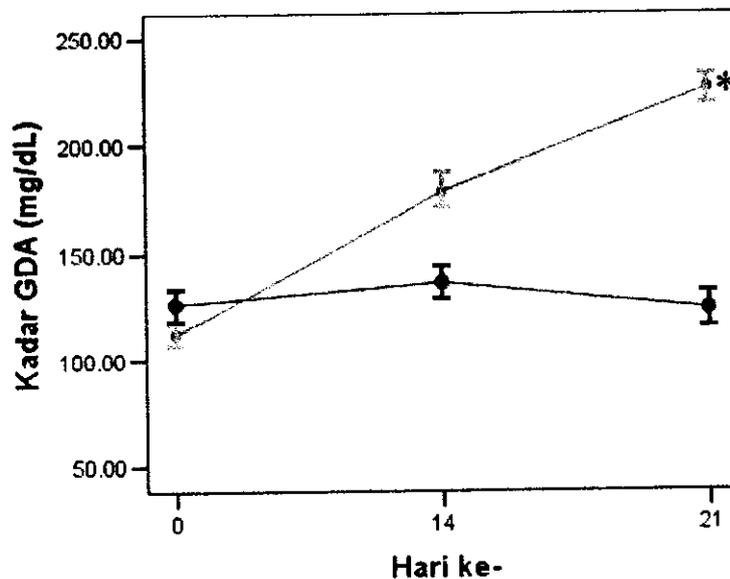
Telah dilakukan penelitian mengenai efek pemberian vanadil sulfat terhadap sel β pankreas mencit (*Mus musculus*) dengan *diabetes mellitus*. Mencit jantan dari galur Balb-C yang telah berumur 8 minggu sejumlah 50 ekor dibagi dalam 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (dapar sitrat), kelompok kontrol positif (streptozotocin), dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan vanadil sulfat dengan tiga dosis yang berbeda (5 mg/kg BB, 30 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB). Pada hari ke-1 diberikan injeksi streptozotocin 100 mg/kg BB dalam pembawa dapar sitrat dengan pH 4,8 secara intraperitoneal untuk menginduksi *diabetes mellitus*. Pada hari ke-14, diberikan injeksi kedua streptozotocin 50 mg/kg dalam pembawa dapar sitrat pH 4,8 secara intraperitoneal. Kadar glukosa darah acak (GDA) diukur pada hari ke-0, 14, dan 21.

Perubahan kadar GDA pada mencit yang diberi injeksi intraperitoneal streptozotocin 100 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB tampak pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1. Pada kelompok kontrol negatif yang hanya mendapat injeksi dapar sitrat intraperitoneal pH 4,8, rata-rata GDA dari hari ke-0 sampai hari ke-21 tidak menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan. Sedangkan rata-rata GDA kelompok mencit yang mendapatkan injeksi streptozotocin mengalami peningkatan secara signifikan dari 112.35 ± 4.51 mg/dL menjadi 226.12 ± 17.25 mg/dL. Dengan analisis statistika ANOVA satu arah didapatkan bahwa injeksi streptozotocin meningkatkan kadar GDA secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($F_{(1,19)} = 8.042$; $p = 0.011$).

Tabel 4.1 Kadar GDA Mencit setelah Injeksi Streptozotocin 100 mg/kgBB Dilanjutkan 50 mg/kgBB.

| Kelompok | Kadar GDA hari ke- (mg/dL ± SD) | | |
|------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| | 0 | 14 | 21 |
| Kontrol (dapar sitrat) | 126.75 ± 9.18 | 136.75 ± 12.46 | 124.25 ± 18.92 |
| Diabetes (STZ) | 112.35 ± 4.51 | 178.24 ± 16.26 | 226.12 ± 17.25 [#] |

p = 0,011 vs kontrol negatif (dapar sitrat)



● Kontrol (Dapar Sitrat) — Diabetes (Streptozotocin)

* $F_{(1,19)} = 8.042$; $p = 0.011$ ($p < 0,05$)

Gambar 4.1. Perkembangan Kondisi *Diabetes Mellitus* pada Mencit dengan Parameter Kadar GDA

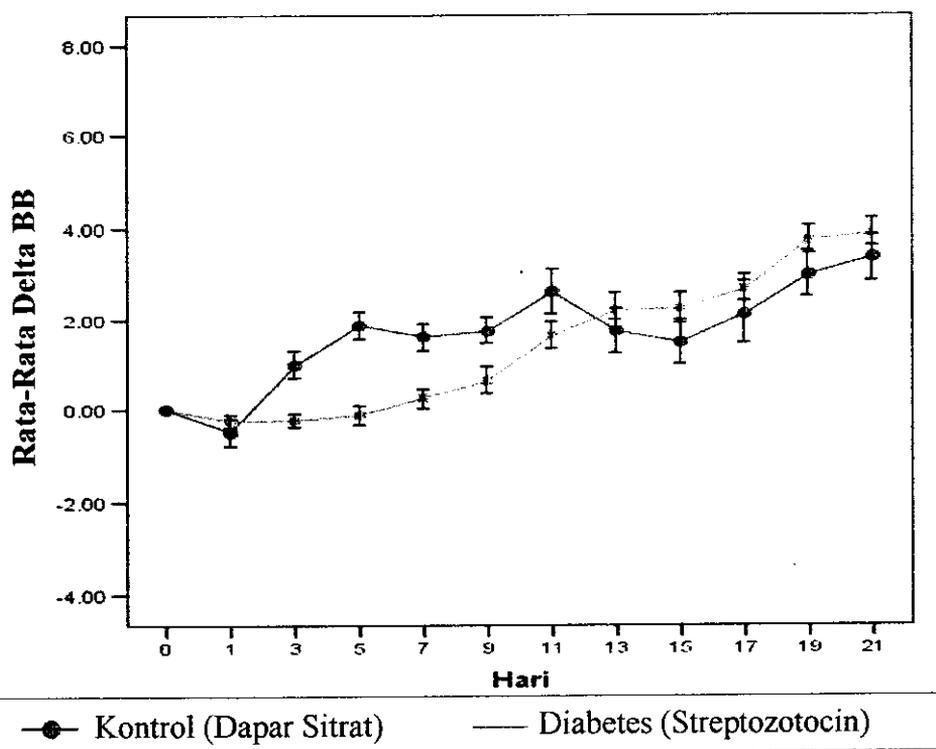
5.2 Profil Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus*) pada Hari ke-0 hingga ke-21 (*Pretreatment Vanadil Sulfat*)

Selama *pretreatment* vanadil sulfat yaitu hari ke-1 hingga ke-21, dilakukan pengamatan berat badan mencit. Kemudian dicari delta berat badan antara berat badan setiap hari penimbangan dengan berat badan hari ke-0 (*base line*). Delta berat badan mencit kelompok diabetes kemudian dibandingkan dengan delta berat badan mencit kelompok kontrol negatif seperti terlihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.2. Dari analisis statistika dengan ANOVA satu arah, diperoleh tidak ada

perbedaan delta berat badan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok diabetes $F_{(1,19)} = 0,270$; $p = 0,608$ ($p > 0,05$). Hal tersebut mengindikasikan bahwa induksi streptozotocin dan kondisi selama *pretreatment* vanadil sulfat tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan normal mencit.

Tabel 4.2 Delta Berat Badan Mencit selama Hari ke-1 hingga Hari ke-21

| Hari ke- | Delta berat badan mencit (g ± SE) | |
|----------|-----------------------------------|----------------|
| | Kontrol (Dapar sitrat) | Diabetes (STZ) |
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 1 | -0.50 ± 0.58 | -0.26 ± 0.17 |
| 3 | 1.00 ± 0.67 | -0.24 ± 0.28 |
| 5 | 1.88 ± 0.60 | -0.12 ± 0.35 |
| 7 | 1.63 ± 0.64 | 0.26 ± 0.38 |
| 9 | 1.75 ± 0.50 | 0.65 ± 0.53 |
| 11 | 2.63 ± 0.95 | 1.65 ± 0.62 |
| 13 | 1.75 ± 1.30 | 2.21 ± 0.79 |
| 15 | 1.50 ± 1.45 | 2.26 ± 0.84 |
| 17 | 2.13 ± 1.96 | 2.68 ± 0.85 |
| 19 | 3.00 ± 2.42 | 3.74 ± 0.83 |
| 21 | 3.38 ± 2.60 | 3.88 ± 0.88 |



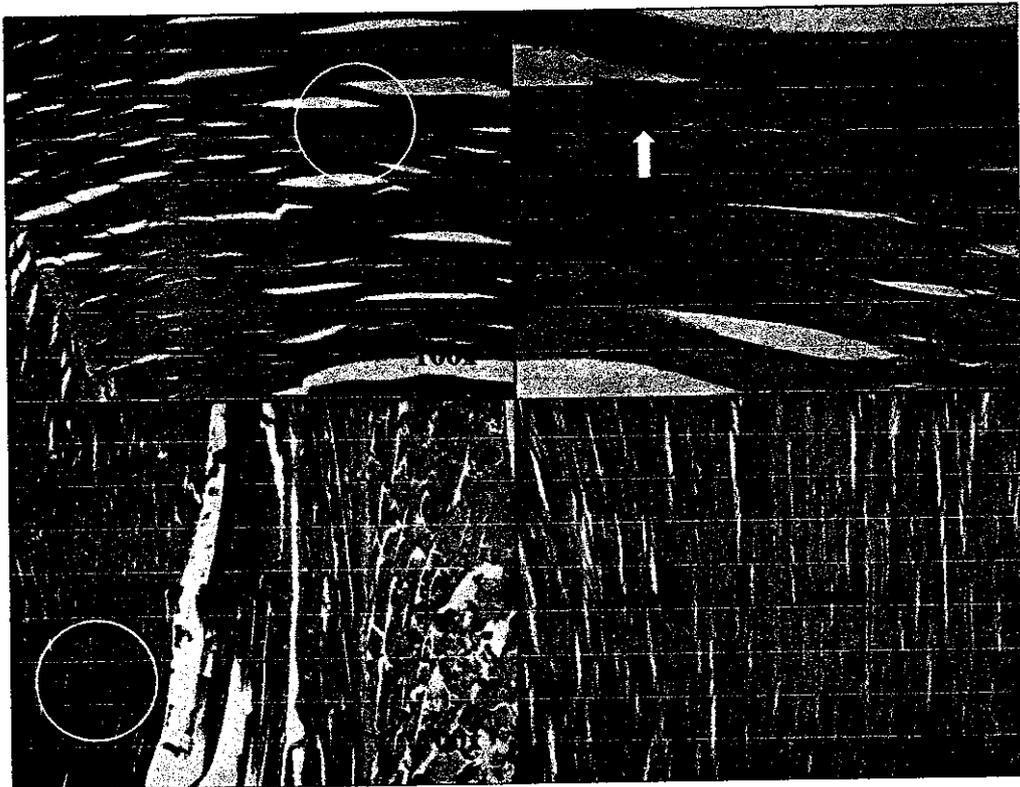
$F_{(1,19)} = 0.270$; $p = 0.608$

Gambar 4.2 Delta Berat Badan Mencit pada Perkembangan Diabetes

4.3 Hasil Pengamatan Jaringan Otot, Hepar dan Adiposa pada Hewan Normal dan Diabetes Mellitus

4.3.1 Pengamatan Histokimia

Untuk mengetahui perubahan morfologi jaringan otot dan hepar mencit akibat *diabetes mellitus*, maka pada hari ke-28 dilakukan pembedahan mencit dari kelompok kontrol maupun kelompok *diabetes mellitus* untuk pemeriksaan histokimia dengan pewarnaan *haematoxyllin-eosin* (HE). Jaringan otot yang diambil dari tungkai belakang (*rectus femoris*) mencit serta jaringan hepar dipotong dengan irisan melintang. Perbedaan gambaran secara histopatologi jaringan otot antara kelompok kontrol dan kelompok diabetes tampak pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Irisan Penampang Membujur Otot Tungkai Belakang Mencit Kelompok Kontrol Negatif (A dan B) dan Kelompok Diabetes (C dan D) menggunakan Pewarnaan *hematoxylin-eosin* dengan Perbesaran 100x (A dan C) dan 400x (B dan D).

- Tanda : inti sel berwarna tajam dan berbentuk lonjong
Tanda ➡ : inti sel tampak pucat dan pipih
Tanda ➡ : sel-sel radang
Tanda : Bagian jaringan yang diperbesar 400x

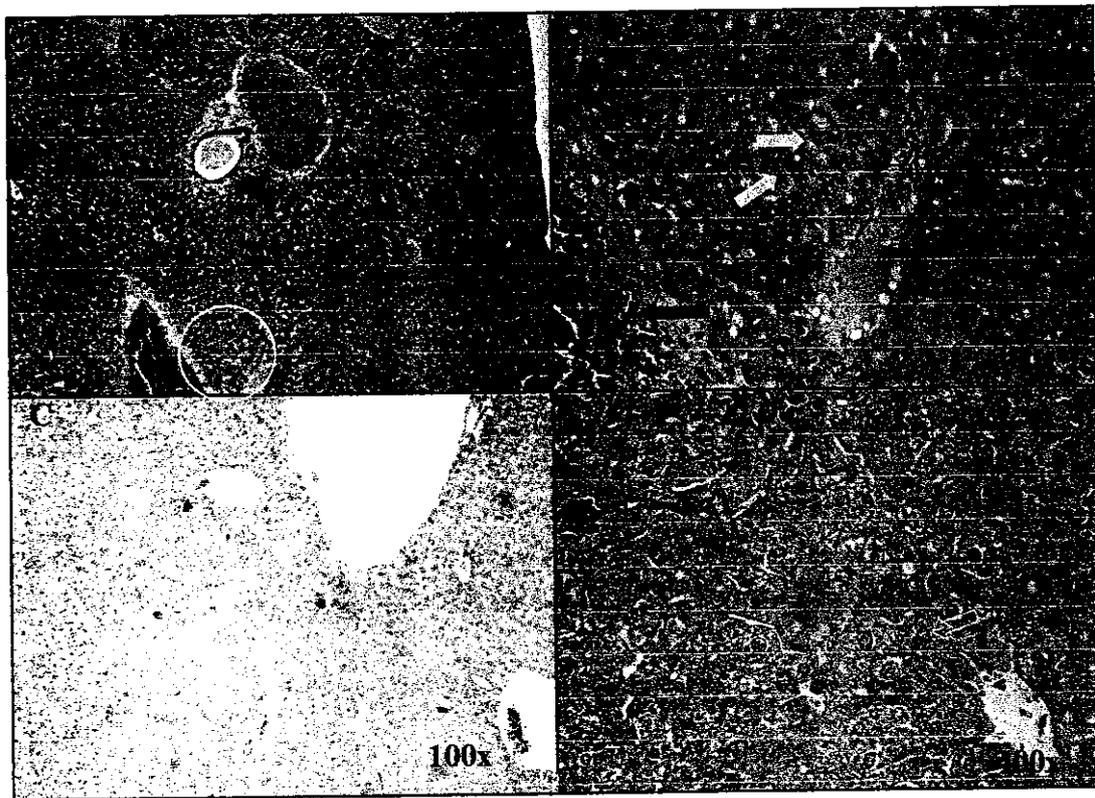
Pada morfologi jaringan otot mencit kelompok kontrol negatif (gambar 4.3. B), antar berkas otot tidak diisi oleh jaringan ikat. Inti serat otot lebih jelas (warnanya tajam) dan berbentuk lonjong, warna serat ototnya lebih cerah dibandingkan kelompok diabetes Pada kelompok diabetes, inti serat otot terlihat lebih kecil, pipih dan warnanya tidak tajam (gambar 4.3.D). Pada irisan melintang kelompok diabetes terlihat adanya jaringan fibroblas yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh sel-sel yang rusak akan diisi komponen jaringan lain seperti jaringan ikat, sel-sel radang, maupun sel lipid. Pada perbesaran 100x tampak adanya bagian yang berwarna lebih merah dari sekitarnya, warna merah ini disebabkan oleh pembuluh darah pada jaringan otot yang ruptur akibat terjadinya *diabetes mellitus*.

Pengamatan morfologi jaringan otot mencit juga dilakukan secara semikuantitatif dengan mengukur diameter serat otot pada perbesaran 100x. Metode yang digunakan dalam pengukuran ini adalah Feret's diameter jarak maksimal dengan menggunakan lensa skala *graticule*. Pengukuran diameter serat otot yang dilakukan pada 5 sampel membuktikan bahwa terjadi atrofi pada kelompok mencit diabetes. Rata-rata diameter serat otot mencit kelompok normal ($209,17 \pm 1,51$) lebih besar dibandingkan dengan mencit kelompok diabetes ($91,25 \pm 1,40$). Hasil pengukuran ini dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4.3 Pengukuran Diameter Serat Jaringan Otot Tungkai Belakang Mencit pada Irisan Membujur

| Sampel serat otot ke- | Diameter serat otot (μm) kelompok | |
|-----------------------|--|------------------------|
| | Normal | Diabetes (induksi STZ) |
| 1 | 205 | 90 |
| 2 | 200 | 90 |
| 3 | 160 | 100 |
| 4 | 240 | 130 |
| 5 | 220 | 110 |
| 6 | 235 | 100 |
| 7 | 210 | 90 |
| 8 | 200 | 70 |
| 9 | 240 | 110 |
| 10 | 220 | 90 |
| 11 | 210 | 60 |
| 12 | 170 | 55 |
| Rata-rata \pm SE | $209,17 \pm 1,51$ | $91,25 \pm 1,40$ |

Pada jaringan hepar kelompok mencit normal, analisis secara histokimia menunjukkan adanya batas antar hepatosit yang jelas dengan bentuk hepatosit yang homogen, vena sentralis yang berisi darah, sinusoid-sinusoid yang mengalirkan darah dan nutrisi ke dalam hepar tampak jelas serta tidak terlihat adanya tetesan lipid. Sitoplasma hepatosit tampak eusinofilik, inti hepatosit terlihat lebih tajam, dalam satu hepatosit terdapat dua inti yang berbentuk bulat, dengan jarak antar nukleus berjauhan.

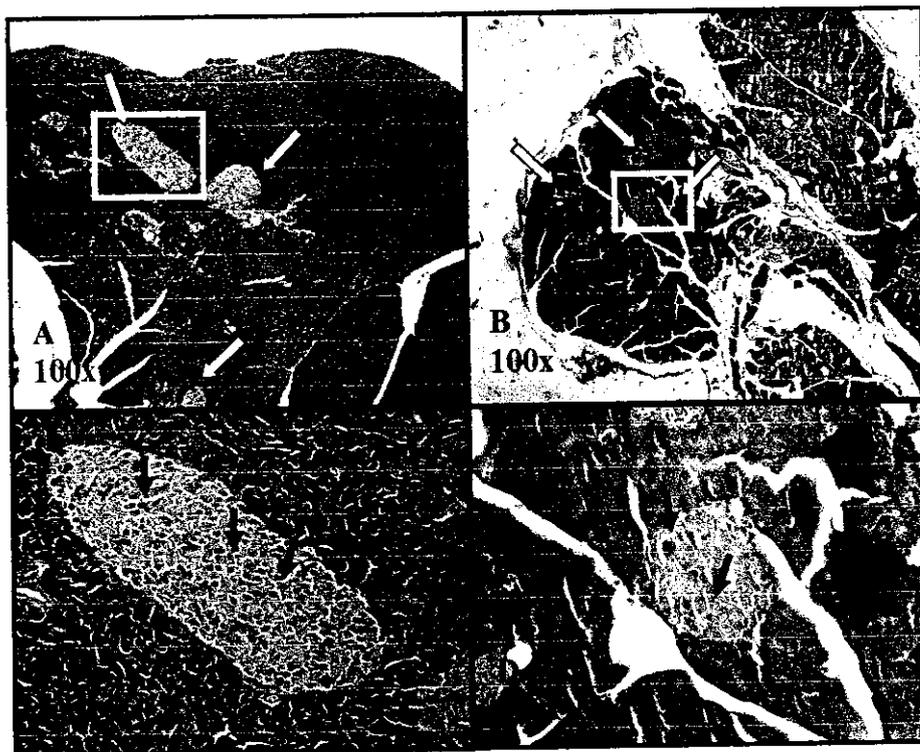


Gambar 4.4 Irisan Penampang Melintang Hepar Mencit Kelompok Kontrol Negatif (A dan B) dan Kelompok Diabetes (C dan D) Menggunakan Pewarnaan *hematoxylin-eosin* dengan Perbesaran 100x (A dan C) dan 400x (B dan D).

- Tanda **→**: Vena sentralis berwarna merah pada kelompok kontrol negatif
- Tanda **→**: sinusoid-sinusoid
- Tanda **→**: hepatosit dengan inti sel
- Tanda **→**: hepatosit yang berdesakan
- Tanda **→**: infiltrasi limfosit pada sinusoid
- Tanda **→**: degeneratif hepatosit
- Tanda **→**: bagian potongan jaringan yang diperbesar 400x

Pada gambar 4.4.C dan D tampak bahwa ada perubahan jaringan hepar pada kondisi diabetes. Pada perbesaran 400x tampak bentuk hepatosit mulai tidak beraturan, aliran darah pada sinusoid tampak terhambat karena terjadi gangguan pada endotel kapiler, vena sentralis sudah tidak lagi berwarna merah. Banyak terdapat sel radang yang berwarna hitam dengan inti sel kecil dan bergerombol serta adanya vakuola yang berisi lipid meluas pada sitoplasma sehingga mendesak hepatosit. Hal ini terjadi karena kerusakan pada sel hepatosit sehingga komponen-komponen lain akan masuk menggantikan organel yang ada di dalam sitoplasma.

Untuk mengetahui perubahan morfologi jaringan pankreas mencit yang mengalami *diabetes mellitus* akibat induksi streptozotocin, maka dilakukan pembedahan dan preparasi jaringan pankreas mencit dari kelompok kontrol negatif dan kontrol positif (diabetes) secara histokimia dengan pewarnaan *aldehyde fuchsin*. Perbedaan gambaran histopatologi jaringan pankreas kelompok kontrol negatif dan kontrol positif dapat diamati pada Gambar 4.3.



Tanda \Rightarrow : Islet Langerhans
 Tanda \rightarrow : Sel β pankreas

Gambar 4.5 Irisan Melintang Pankreas Mencit Menggunakan Pewarnaan *Aldehyde Fuchsin*.Kelompok Kontrol Negatif (A-B) dan Kelompok Kontrol Positif (B-D)

Morfologi pankreas mencit normal yang tidak menderita diabetes ditunjukkan pada Gambar 4.5 (A). Bagian sel yang ditunjuk dengan tanda panah kuning adalah islet Langerhans. Pada jaringan pankreas banyak dijumpai islet Langerhans. Islet Langerhans tampak utuh, terletak berdekatan dan memiliki diameter yang besar. Pada Gambar 4.5 (C) dengan perbesaran yang lebih optimal (perbesaran 400x), sel-sel β pankreas terdapat dalam jumlah banyak, terletak saling berdekatan, serta mempunyai batas antar sel yang jelas. Pada Gambar 4.5 (B) tampak perubahan morfologi islet Langerhans akibat proses kerusakan oleh bahan penginduksi diabetes yaitu streptozotocin. Pada mencit diabetes, islet Langerhans berukuran lebih kecil. Pada Gambar 4.5 (D) dengan perbesaran yang lebih optimal (perbesaran 400x), sel-sel β pankreas tampak lebih sedikit jumlahnya, terletak saling berjauhan dengan batas antar sel yang tidak jelas.

Pada irisan jaringan pankreas dengan pewarnaan *aldehyde fuchsin* dilakukan pengukuran diameter islet Langerhans dan perhitungan jumlah sel β pada tiap islet Langerhans. Data yang didapat dikombinasikan dengan data jumlah sel β pada tiap islet Langerhans dan diameter islet Langerhans dari kelompok perlakuan dengan vanadil sulfat untuk kemudian dianalisis secara statistika dengan ANOVA satu arah. Hasil uji ANOVA satu arah digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan diameter islet Langerhans dan jumlah sel β pankreas mencit yang bermakna pada kelompok kontrol negatif (dapar sitrat) dan kelompok kontrol positif (STZ).

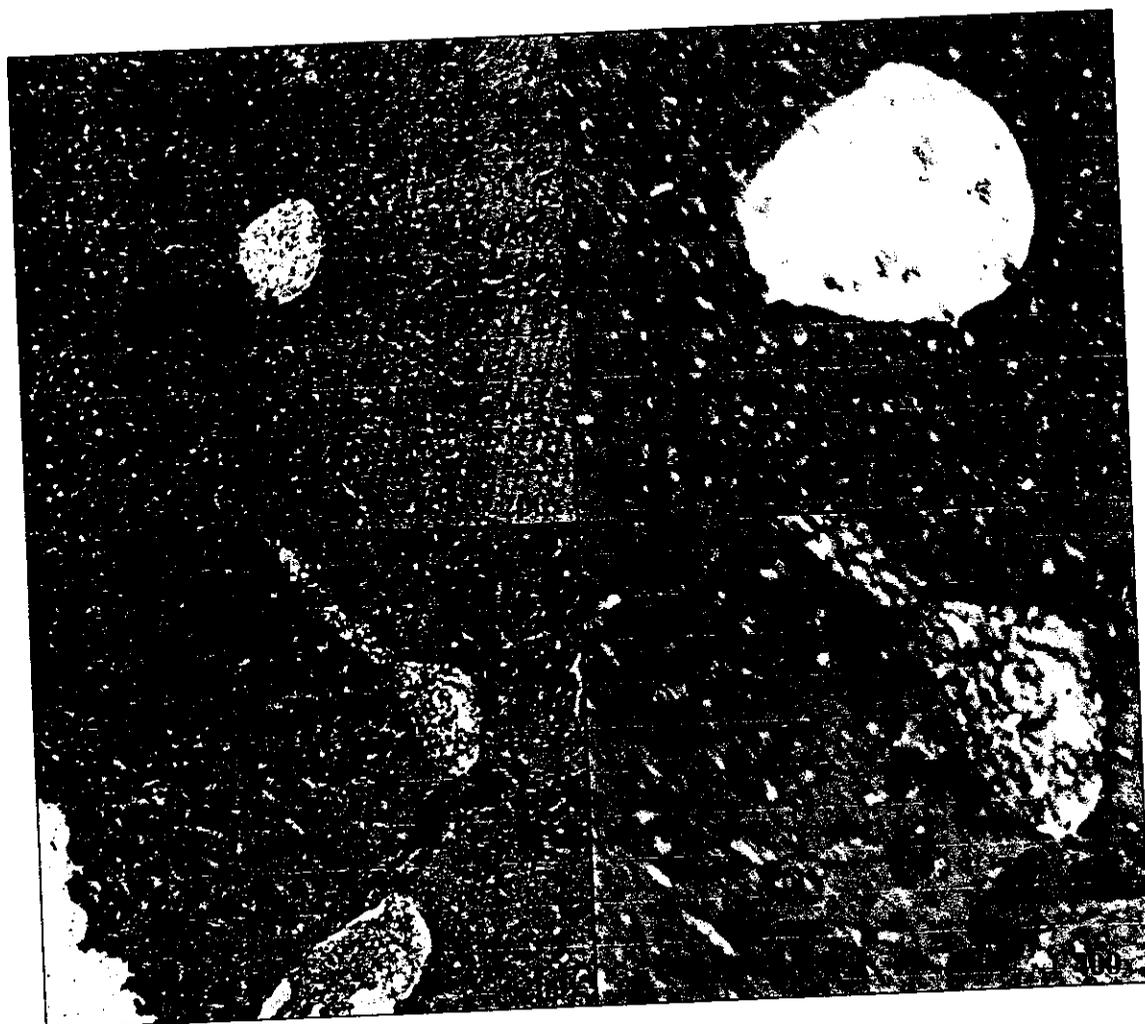
Tabel 4.4 Diameter Rata-Rata Islet Langerhans dan Jumlah Rata-Rata Sel β Pankreas Mencit dengan Pewarnaan *Aldehyde Fuchsin* pada Kelompok Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

| Kelompok | Jumlah rata-rata sel β tiap islet Langerhans \pm SE | Diameter rata-rata islet Langerhans \pm SE (μ m) |
|-----------------|---|---|
| Kontrol positif | 41.60 \pm 2.20 | 93.33 \pm 9.68 |
| Kontrol negatif | 134.40 \pm 11.18 | 194.44 \pm 16.31 |

5.3.2 Pengamatan Imunohistokimia

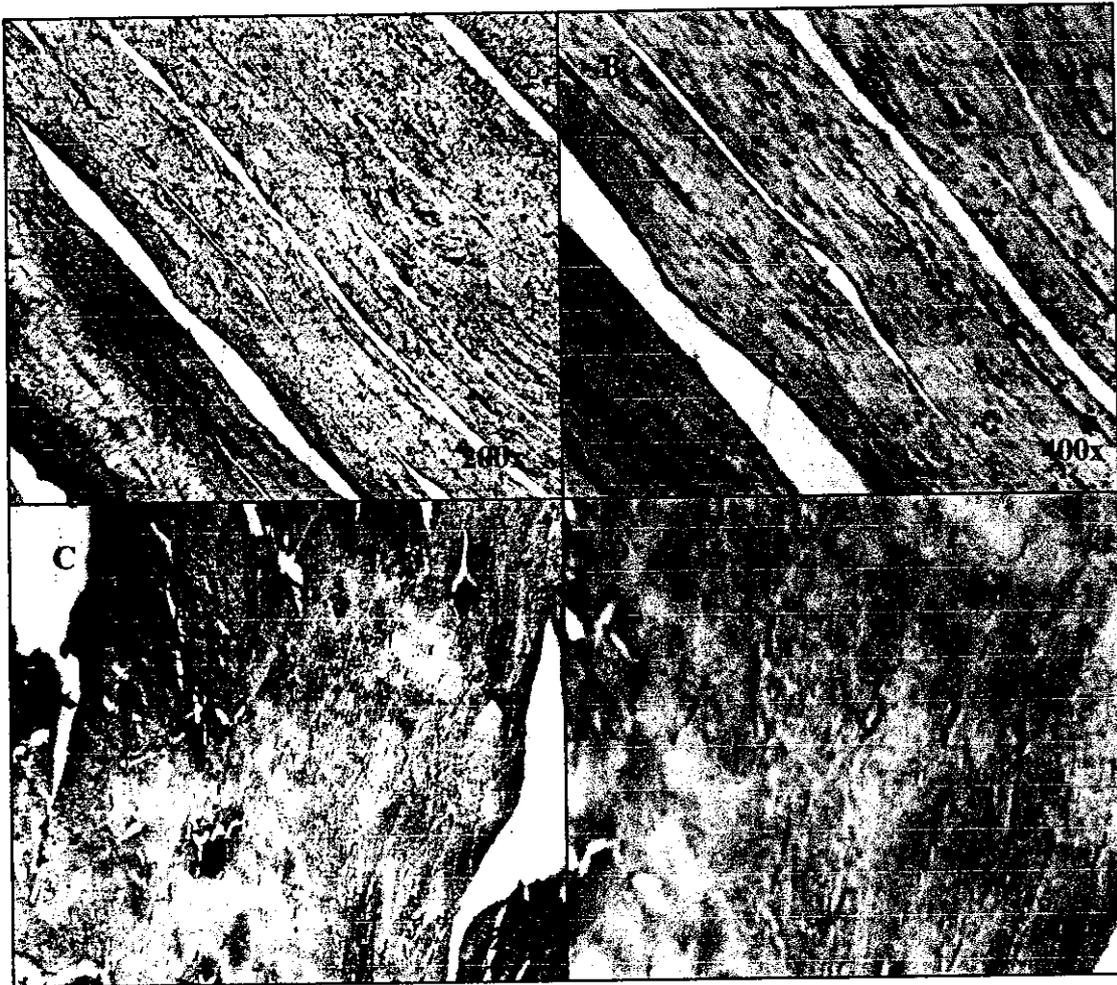
Untuk membuktikan adanya pengaruh pemberian vanadil sulfat secara molekuler pada peningkatan aktivitas reseptor insulin dilakukan pengamatan imunohistokimia. Imunohistokimia merupakan metode yang digunakan untuk menunjukkan keberadaan dan lokasi protein pada potongan jaringan yang melibatkan interaksi antigen-antibodi. Pada penelitian ini antibodi yang digunakan berupa reseptor insulin (IR *antibody* diperoleh dari Novus Biologicals, LLC) yang akan bereaksi spesifik terhadap protein target yaitu reseptor insulin yang teraktivasi pada jaringan otot dan hepar. Jaringan otot diambil dari tungkai belakang (*rectus femoris*) mencit serta jaringan hepar dipotong dengan irisan melintang kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Selanjutnya, dilakukan pengamatan secara kualitatif terhadap kuat-lemahnya intensitas warna yang dihasilkan menunjukkan besar-kecilnya aktivitas reseptor insulin pada jaringan otot dan hepar. Perbedaan gambaran secara imunohistokimia jaringan hepar mencit antara kelompok kontrol dan kelompok diabetes tampak pada gambar 4.6.

Pada gambar 4.6 terlihat bahwa lokasi reseptor insulin ditunjukkan oleh warna coklat pada sel jaringan hepar. Dari hal tersebut, diketahui bahwa pada keadaan normal (4.6.A), reseptor insulin terletak di tepi membran plasma di sekitar hepatosit. Tepi sel di bagian dekat sinusoid akan berwarna coklat yang lebih gelap serta dapat menunjukkan batas antara sel hepar satu dengan lainnya. Pada hasil pengamatan, terlihat bahwa pada sel-sel yang terletak di sekitar vena sentral akan memberikan intensitas warna coklat yang lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi lainnya. Pada keadaan *diabetes mellitus* (4.6.C), terlihat bahwa terdapat intensitas warna coklat yang lebih tinggi memenuhi pada beberapa sitoplasma sel hepar.



Gambar 4.6 Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Hepar Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Kontrol Negatif (A dan B) dan Kelompok Diabetes (C dan D) dengan Perbesaran 200x (A dan C) dan dengan Perbesaran 400x (B dan D)

Hal ini menunjukkan perubahan fisiologis letak reseptor insulin dimana pada keadaan normal lebih terlihat di tepi membran sel hepar, sedangkan pada keadaan diabetes akan nampak berada di dalam sitoplasma pada beberapa sel. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa terjadi inaktivasi reseptor insulin yang terletak di tepi membran sel sehingga akan terjadi reaksi antigen antibodi reseptor insulin yang lebih kuat intensitasnya di dalam membran sitoplasma.



Gambar 4.7 Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Otot Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Kontrol Negatif (A dan B) dan Kelompok Diabetes (C dan D) dengan perbesaran 200x (A dan C) dan dengan Perbesaran 400x (B dan D)

Pada jaringan otot terlihat pula bahwa pada keadaan normal (4.7.A), lokasi reseptor insulin terletak pada tepi permukaan membran sel otot. Hal ini nampak pada bagian tepi yang berwarna lebih coklat apabila dibandingkan dengan lokasi sel lainnya. Gambar 4.7 C menunjukkan bahwa antigen reseptor insulin juga nampak pada keadaan *diabetes mellitus*, pada perbesaran 400x terlihat bahwa warna coklat juga tersebar di dalam sitoplasma sel otot. Intesitas warna coklat yang lebih tinggi di beberapa bagian pada gambar 4.7 C bukan menunjukkan aktivitas reseptor insulin, tetapi akibat *over staining* pada saat proses pewarnaan yang menyebabkan pewarnaan tidak merata dan terlihat lebih gelap pada beberapa bagian tertentu saja.

Untuk mengetahui efek yang ditimbulkan vanadil sulfat terhadap aktivitas *glucose transporter 4* (GLUT4), dilakukan pemeriksaan secara imunohistokimia menggunakan antibodi yang spesifik terhadap GLUT4. Pada penelitian ini pemeriksaan difokuskan pada jaringan otot. GLUT4 yang telah teraktivasi dapat berikatan dengan antibodi GLUT4 yang digunakan pada pemeriksaan imunohistokimia ini, sehingga tampak sebagai bercak-bercak berwarna coklat. Bercak-bercak itulah yang tampak sebagai *marker* positif adanya aktivitas GLUT4. Untuk mengetahui aktivitas GLUT4 secara kualitatif, dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas warna antara tiap preparat jaringan.

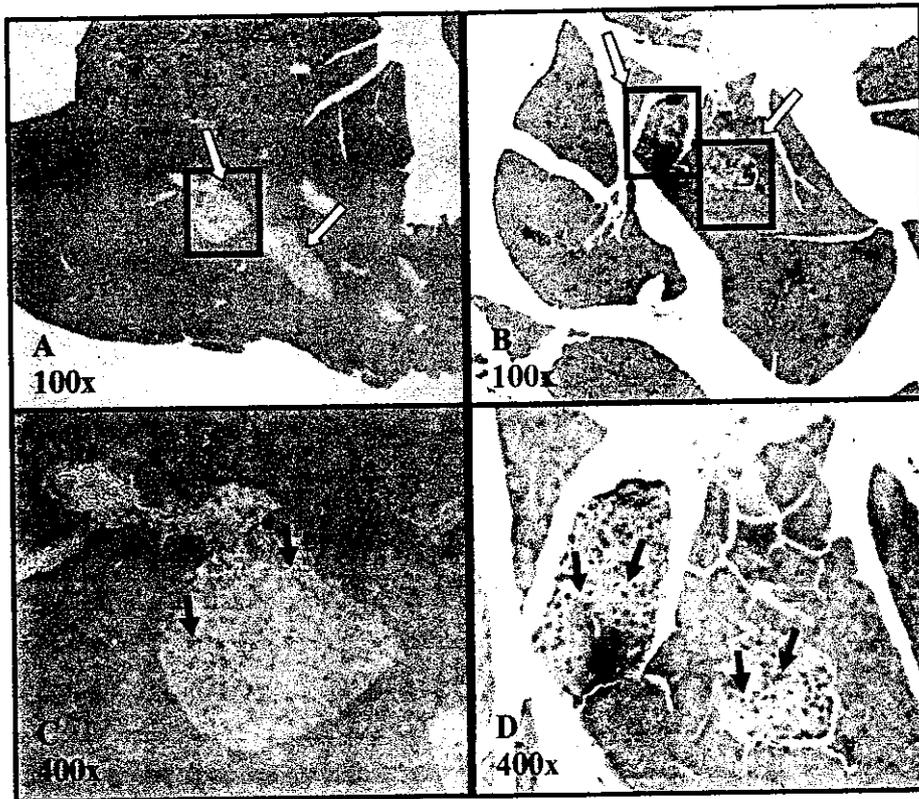
Gambar 4.8 menunjukkan perbandingan tampilan imunohistokimia dengan antibodi GLUT4 dari jaringan otot rangka mencit normal dengan mencit yang menderita *diabetes mellitus*, dimana GLUT4 teraktivasi yang tampak sebagai bercak coklat pekat pada jaringan otot tungkai belakang mencit kelompok normal lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah GLUT4 teraktivasi pada jaringan otot mencit kelompok diabetes. Dalam hal ini tidak dapat dilakukan penghitungan secara tepat jumlah GLUT4 teraktivasi yang dapat diamati, karena data yang tersedia kurang representatif untuk mewakili seluruh kelompok yang ada. Pada kondisi normal, daerah berwarna coklat tampak hampir menyeluruh di penampang melintang jaringan otot, dengan warna coklat yang lebih pekat pada tepian sel-sel tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat GLUT4 teraktivasi yang berada pada permukaan membran sel lebih banyak daripada GLUT4 yang belum teraktivasi yang berada pada sitoplasma sel. Sementara pada irisan melintang jaringan otot mencit kelompok diabetes, lebih banyak terlihat daerah berwarna abu-abu keperakan atau warna yang lebih pucat bila dibandingkan dengan daerah yang berwarna coklat, yang menandakan bahwa GLUT4 teraktivasi yang dapat berikatan dengan antibodi berjumlah lebih sedikit.



Tanda  : Tepi sel otot dengan warna coklat yang lebih pekat

Gambar 4.8 Irisan penampang melintang GLUT4 teraktivasi pada jaringan otot tungkai mencit menggunakan analisis imunohistokimia kelompok kontrol normal (A) dan kelompok diabetes (B) dengan perbesaran 200x

Selain perubahan morfologi pada jaringan pankreas, lebih lanjut dilakukan analisis imunohistokimia menggunakan pewarnaan BrdU dengan metode TUNEL (Gambar 4.9) untuk melihat apakah terjadi peningkatan apoptosis sel β pankreas mencit mencit dari kelompok diabetes dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang tidak mengalami diabetes.



Tanda \Rightarrow : Islet Langerhans
 Tanda \blackrightarrow : Sel β pankreas yang mengalami apoptosis

Gambar 4.9 Pewarnaan Imunohistokimia Menggunakan BrdU dengan Metode TUNEL pada Irisan Melintang Pankreas Mencit, dengan Perbesaran 100x : Kelompok Kontrol Negatif (Dapar Sitrat) (A); Kelompok Kontrol Positif (STZ) (B); dengan perbesaran 400 x : Kelompok Kontrol Negatif (Dapar Sitrat) (C); Kelompok Kontrol Positif (STZ) (D)

Sel β pankreas menyusun hampir 75 % dari massa islet Langerhans dan sebagian besar berada pada bagian tengah islet Langerhans (Nolte & Karam, 2007). Sel β yang mengalami apoptosis terdeteksi oleh pewarnaan BrdU dengan metode TUNEL sebagai sel yang berwarna coklat tua kontras terhadap *background* yang merupakan hasil pewarnaan dari *methyl green*. Pada islet Langerhans mencit dari kelompok kontrol negatif hanya dijumpai sedikit sel yang berwarna coklat tua pada bagian tengah islet. Sedangkan pada islet Langerhans mencit dari kelompok diabetes dijumpai banyak sel yang berwarna coklat tua dan

tidak hanya ditemukan pada bagian tengah sel tetapi juga tersebar hampir pada seluruh bagian islet Langerhans.

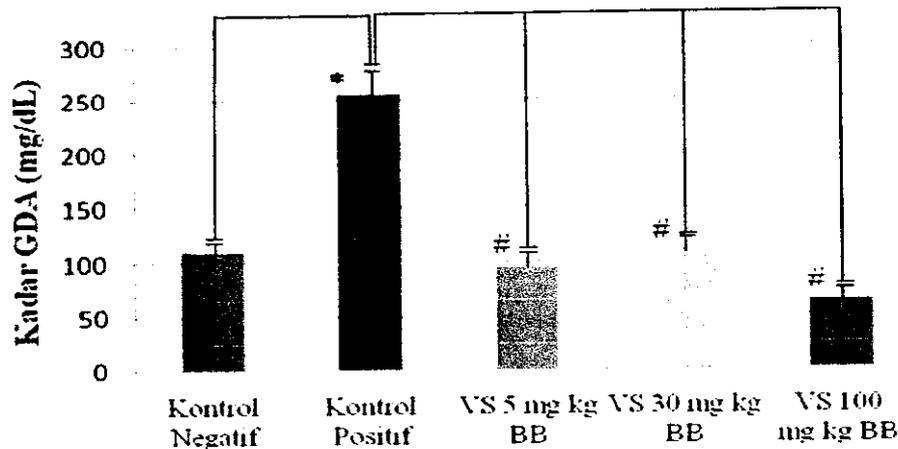
5.4 Data Glukosa Darah Acak (GDA) Mencit (*Mus musculus*) setelah 7 Hari *Treatment* Vanadil Sulfat

Mencit diabetes akibat induksi streptozotocin selanjutnya diberi suspensi vanadil sulfat dalam CMC Na 0,6 % secara oral sekali sehari selama 7 hari berturut-turut (hari ke-21 hingga ke-27). Terdapat tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok mencit yang menerima vanadil sulfat dengan dosis 5, 30 dan 100 mg/kg BB. Sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok positif pada hari ke-21 hingga ke-27 diberi larutan CMC Na 0,6 %. Perubahan kadar GDA diamati pada hari ke-28. Hasil pengukuran kadar GDA tampak pada Tabel 4.5 dan Gambar 4.10.

Tabel 4.5 Kadar GDA Mencit setelah Mendapatkan Perlakuan selama 7 Hari dengan Vanadil Sulfat pada Berbagai Dosis

| Kelompok | Kadar GDA (mg/dL \pm SE) Hari Ke- | | |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------|
| | 0 | 21 | 28 |
| Kontrol (dapar sitrat) | 126.75 \pm 9.18 | 124.25 \pm 18.92 | 109.75 \pm 10.14 |
| Diabetes (STZ) | 101.00 \pm 10.27 | 155.60 \pm 21.06 | 255.40 \pm 31.17 |
| Vanadil Sulfat 5 mg/kg | 114.80 \pm 10.03 | 281.80 \pm 35.45 | 95.60 \pm 20.43 # |
| Vanadil Sulfat 30 mg/kg | 116.25 \pm 8.20 | 232.25 \pm 21.09 | 110.25 \pm 22.14 # |
| Vanadil Sulfat 100 mg/kg | 122.00 \pm 8.60 | 242.67 \pm 30.07 | 62.67 \pm 21.61 # |

$p < 0.001$ vs diabetes



$F_{(4,20)} = 13.716$, * $p < 0.001$ vs kontrol negatif, # $p < 0.001$ vs kontrol positif
 Gambar 4.10 Penurunan Kadar GDA Mencit setelah *Treatment* Vanadil Sulfat Sekali Sehari Selama 7 Hari dengan Vanadil Sulfat pada Berbagai Dosis

Tabel 4.6 Signifikansi Penurunan Kadar GDA Kelompok *Treatment* Vanadil Sulfat Berbagai Dosis selama 7 Hari Dibandingkan dengan Kelompok Diabetes

| Perbandingan | P | Keterangan |
|--|---------|------------|
| Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 5 mg/kg | < 0,001 | Bermakna |
| Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 30 mg/kg | < 0,001 | Bermakna |
| Diabetes CMC Na – Vanadil Sulfat 100 mg/kg | < 0,001 | Bermakna |

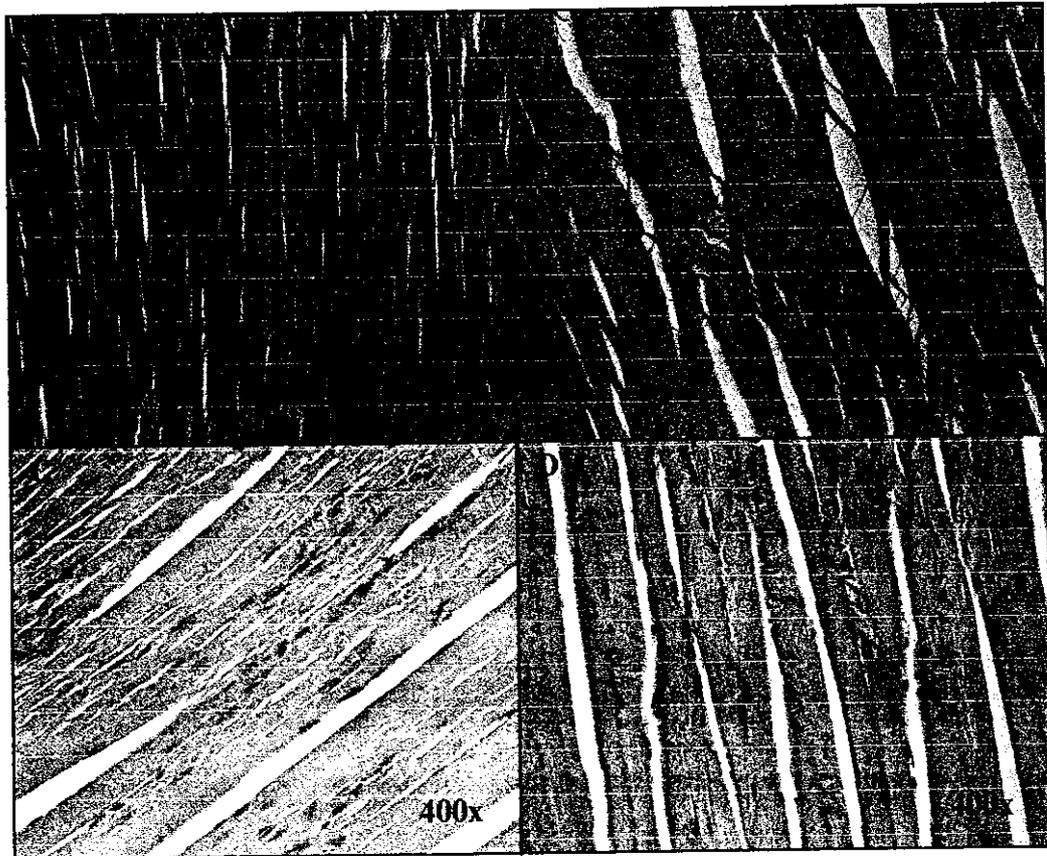
Vanadil sulfat terbukti efektif menurunkan kadar GDA mencit dengan kondisi *diabetes mellitus*. Pengukuran kadar GDA pada hari ke-28 kelompok mencit yang mengalami *diabetes mellitus* dan mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat berbagai dosis menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok diabetes yang hanya mendapatkan larutan CMC-Na secara oral ($F_{(4,20)} = 13.716$, $p < 0.001$).

4.5 Hasil Pengamatan Jaringan Otot, Hepar dan Pankreas pada Kelompok Diabetes yang Mendapat VS

4.5.1 Pengamatan Histokimia

Perubahan histopatologi jaringan otot dan hepar hewan coba setelah pemberian *treatment* dengan vanadil sulfat pada dosis 5, 30, dan 100 mg/kg BB

melalui rute per oral dapat dilihat diketahui dengan melakukan pembedahan pada hari ke-28 dan preparasi secara histokimia jaringan otot dan hepar mencit. Pewarnaan yang digunakan adalah *hematoxylin-eosin*. Hasil pengamatan histopatologi jaringan otot terlihat pada gambar 4.11.



Gambar 4.11 Irisan Penampang Melintang Otot Tungkai Belakang Mencit Kelompok Diabetes (A); Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 mg/kg BB Menggunakan Pewarnaan *hematoxylin-eosin* dengan Perbesaran 400x

Pada gambar 4.11 tampak perubahan jaringan otot pada kondisi *diabetes mellitus* setelah mendapat *treatment* vanadil sulfat selama 7 hari. Jaringan otot mencit mengalami perbaikan atropi sel otot dimana pada jaringan tersebut terjadi penambahan volume sel otot, tampak dari makin besarnya diameter sel otot dibandingkan kelompok diabetes (gambar 4.11 B, C, D). Penambahan volume serat otot semakin meningkat dari dosis vanadil sulfat 5 mg/kg BB hingga 100 mg/kg BB. Pada dosis tertinggi (gambar 4.11.D) massa serat otot lebih padat dan bentuknya mendekati kondisi normal. Inti sel mulai terlihat tajam dan jelas serta

tidak ada tanda-tanda nekrosis sel otot. Pada perbesaran 400x antar berkas otot tidak ditemukan lagi jaringan fibroblas seperti yang terlihat pada kelompok diabetes (gambar 4.11.D).

Hasil pengamatan morfologi jaringan otot mencit secara semikuantitatif dengan mengukur diameter serat otot mencit yang mendapatkan *treatment* ketiga dosis pada perbesaran 400x, ditunjukkan dalam tabel 4.7 dimana diameter serat otot semakin meningkat seiring dengan besarnya dosis vanadil sulfat.

Tabel 4.7 Pengukuran Diameter Serat Jaringan Otot Tungkai Belakang Mencit pada Irisan Melintang setelah Mendapatkan *Treatment* Vanadil Sulfat

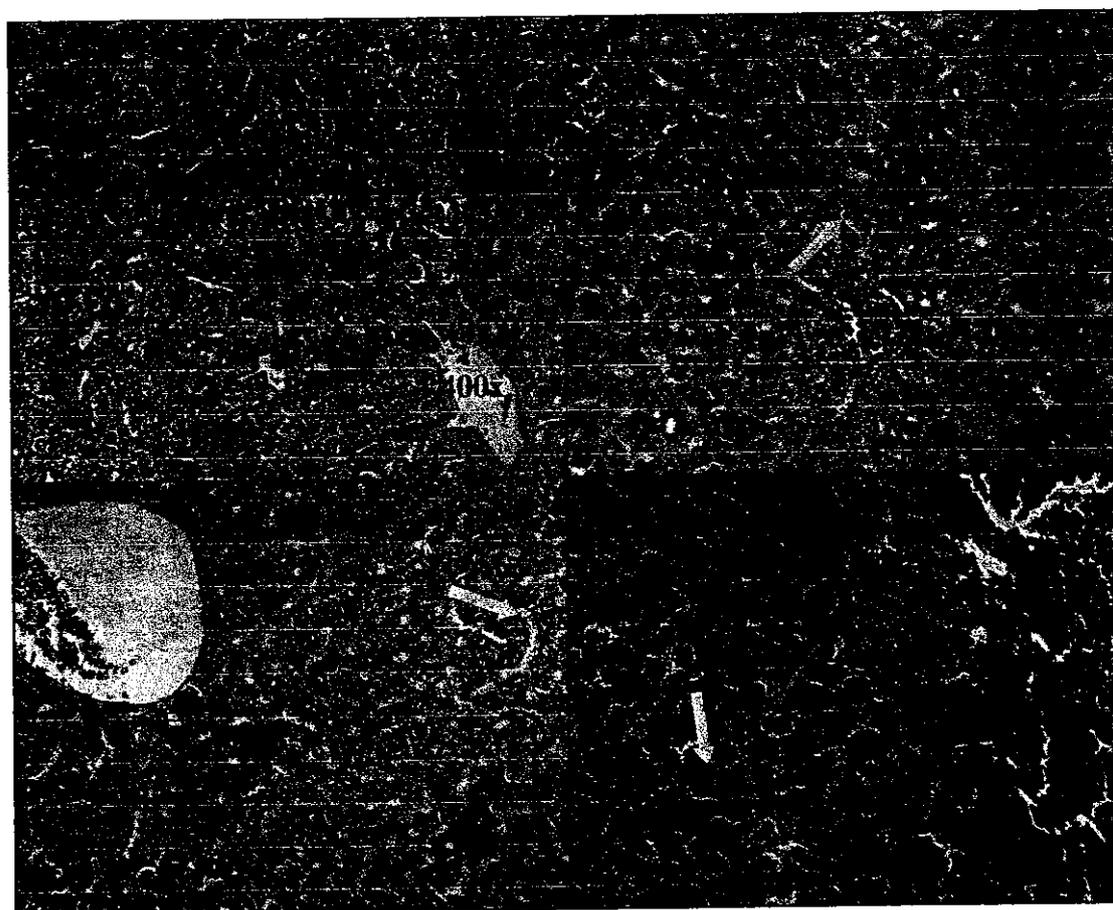
| Sampel serat otot ke- | diameter serat otot (μm) kelompok | | |
|-----------------------|--|-------------------|-------------------|
| | STZ + VS 5 mg | STZ + VS 30mg | STZ + VS 100mg |
| 1 | 120 | 180 | 200 |
| 2 | 110 | 200 | 220 |
| 3 | 150 | 190 | 260 |
| 4 | 120 | 180 | 150 |
| 5 | 140 | 170 | 160 |
| 6 | 110 | 140 | 210 |
| 7 | 130 | 150 | 150 |
| 8 | 140 | 190 | 190 |
| 9 | 150 | 140 | 240 |
| 10 | 140 | 150 | 240 |
| 11 | 130 | 150 | 180 |
| 12 | 160 | 180 | 180 |
| Rata-rata \pm SE | 133,33 \pm 1,21 | 168,33 \pm 1,39 | 198,33 \pm 1,83 |

Tabel 4.7 menunjukkan data diameter serat otot rata-rata mencit dengan berbagai perlakuan. Dari tabel tersebut diketahui bahwa pada kelompok kontrol negatif (dapar sitrat) mempunyai rata-rata diameter serat otot $209,17 \pm 1,51 \mu\text{m}$ sedangkan pada kelompok kontrol positif (*streptozotocin*) mengalami penurunan menjadi $91,25 \pm 1,40 \mu\text{m}$. Pemberian vanadil sulfat dengan dosis 5 mg/kg BB menghasilkan perubahan rata-rata diameter serat otot menjadi $133,33 \pm 1,21 \mu\text{m}$. Sedangkan pemberian terapi vanadil sulfat dengan dosis 30 mg/kg BB dan dosis 100 mg/kg BB memberikan peningkatan rata-rata diameter serat otot menjadi $168,33 \pm 1,39 \mu\text{m}$ dan $198,33 \pm 1,83 \mu\text{m}$. Dari hasil analisis tersebut dapat diketahui bahwa pemberian vanadil sulfat dosis 100 mg/kg BB memberikan peningkatan diameter serat otot mencit secara efektif yang ditunjukkan dengan

ukuran diameter serat otot yang mendekati ukuran normal apabila dibandingkan dengan kontrol negatif (dapar sitrat).

Tabel 4.8 Diameter Serat Otot Rata-Rata Mencit dengan Berbagai Perlakuan pada Pewarnaan *haematoxylin-eosin* (HE)

| Kelompok | Diameter serat otot rata-rata \pm SE (μm) |
|--------------------------------|--|
| Kontrol negatif (dapar sitrat) | 209,17 \pm 1,51 |
| Kontrol positif (STZ) | 91,25 \pm 1,40 |
| Perlakuan dosis 5 mg/kg BB | 133,33 \pm 1,21 |
| Perlakuan dosis 30 mg/kg BB | 168,33 \pm 1,39 |
| Perlakuan dosis 100 mg/kg BB | 198,33 \pm 1,83 |



Gambar 4.12 Irisan Penampang Melintang Jaringan Hepar Mencit Kelompok Diabetes (A); Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 mg/kg BB Menggunakan Pewarnaan *hematoxylin-eosin* dengan Perbesaran 400x

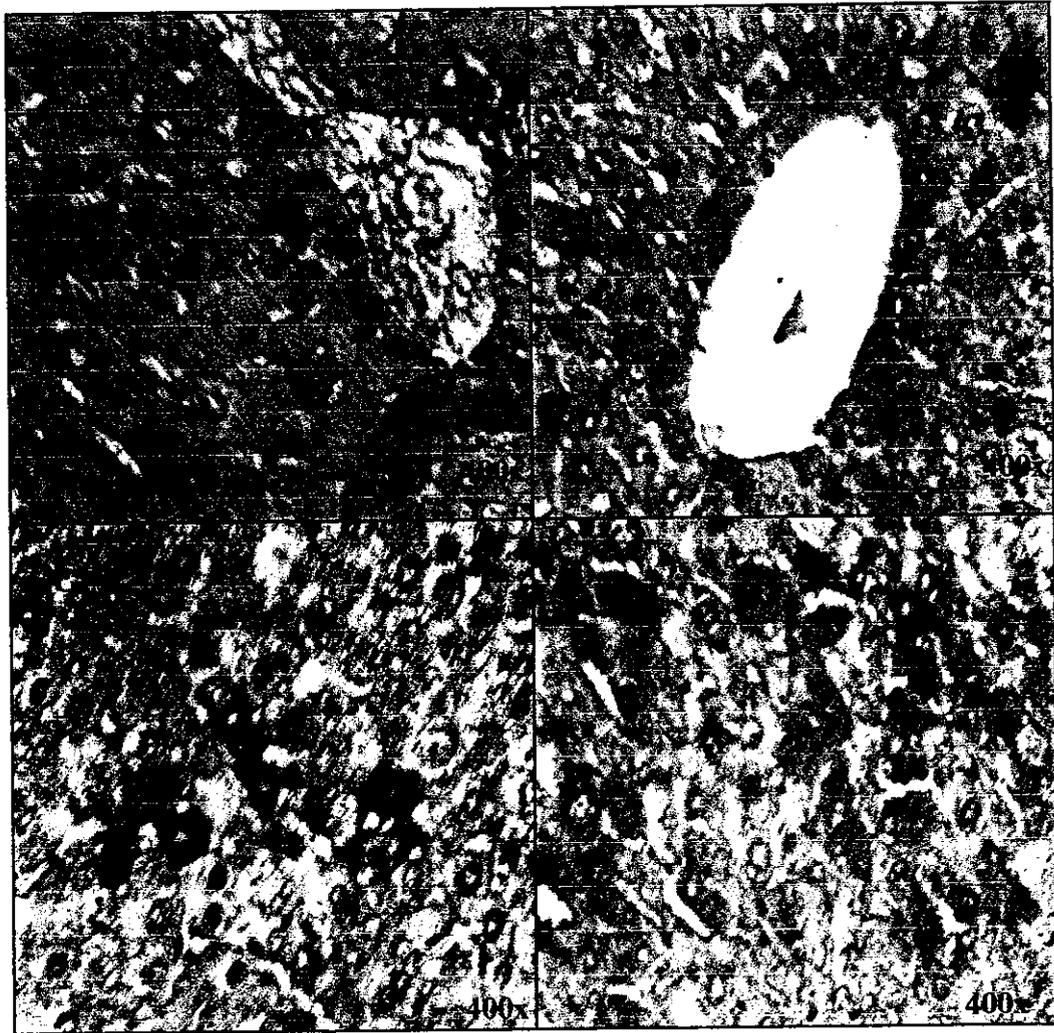
- Tanda \blacktriangleright : menunjukkan reparatif inti sel hepatosit
 Tanda \blacktriangleright : vena sentral yang berwarna merah
 Tanda \blacktriangleright : sinusoid-sinusoid
 Tanda \blacktriangleright : sel parenkim hepar

Gambar 4.12 menunjukkan perbandingan antara morfologi hepar mencit yang mengalami diabetes dengan perubahan morfologi jaringan hepar yang telah mendapatkan *treatment* dengan vanadil sulfat pada dosis 5, 30, dan 100 mg/kg BB. Pada perbesaran 400x tampak bahwa aliran sinusoid gambar 4.12 B, C, dan D mulai terbuka dan terlihat jelas. Gambar D menunjukkan hasil *treatment* dosis 100 mg/kg BB dimana aliran sinusoid tampak semakin jelas dan berwarna merah. Bentuk hepatosit pada morfologi *treatment* ketiga dosis menunjukkan perbaikan mendekati kondisi normal. Hepatosit terlihat lebih banyak, tampak jelas serta adanya dua hepatosit yang saling berdekatan menunjukkan proses reparatif sel hepatosit. Proses proliferasi sel hepar ditunjukkan oleh adanya 2 inti sel dalam satu sitoplasma hepatosit yang kromatinnya tampak tajam.

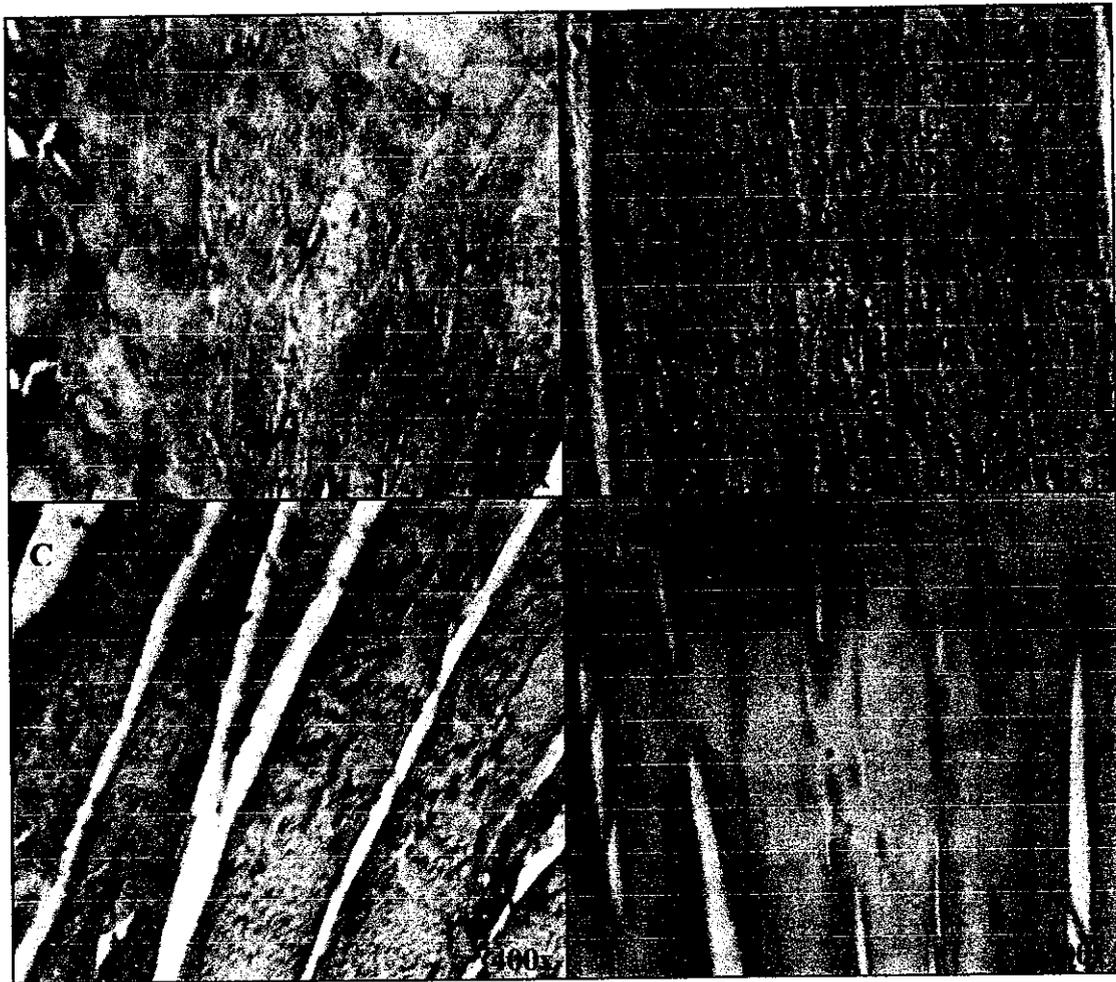
5.5.2 Hasil Analisis Imunohistokimia

Perubahan aktivitas reseptor insulin jaringan otot dan hepar hewan coba setelah pemberian *treatment* dengan vanadil sulfat pada dosis 5, 30, dan 100 mg/kg BB melalui rute per oral dapat dilihat diketahui dengan pewarnaan imunohistokimia jaringan otot dan hepar mencit dengan menggunakan insulin reseptor sebagai antibodi. Hasil pengamatan intensitas warna yang dihasilkan pada jaringan hepar terlihat pada gambar 4.13.

Pada gambar 4.10 terlihat bahwa lokasi reseptor insulin ditunjukkan oleh bagian yang berwarna coklat. Pada keempat gambar tersebut terlihat bahwa ada beberapa bagian sel yang memberikan intensitas warna coklat yang lebih tinggi pada bagian sitoplasma sel. Namun, pada hasil pemberian *treatment* vanadil sulfat dosis 5, 30, 100 mg/kg BB menunjukkan lokasi reseptor insulin yang lebih banyak pada bagian tepi sel membran dengan intensitas warna tepi membran yang lebih coklat bila dibandingkan dengan kelompok diabetes. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas reseptor insulin pada bagian tepi membran sel pada kelompok perlakuan ketiga dosis *treatment* vanadil sulfat.



Gambar 4.13 Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Hepar Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Diabetes (A) dan Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 (D) mg/kg BB dengan Perbesaran 400x



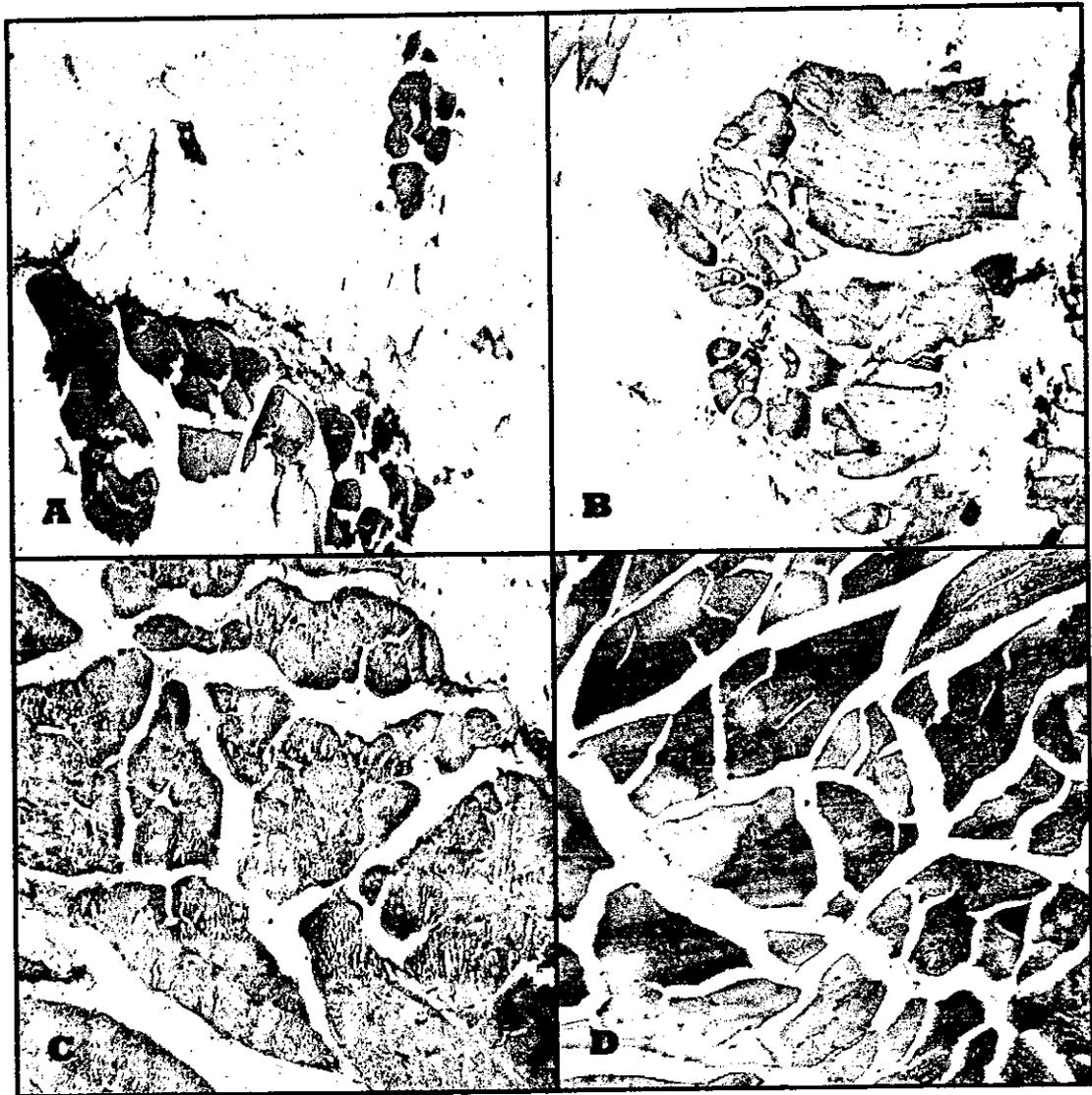
Gambar 4.14 Hasil Pewarnaan Imunohistokimia pada Jaringan Hepar Mencit yang Menunjukkan Adanya Insulin Reseptor pada Kelompok Diabetes (A) dan Kelompok Perlakuan Dosis 5 mg/kg BB (B); 30 mg/kg BB (C); dan 100 (D) mg/kg BB dengan Perbesaran 400x

Gambar 4.14 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan intensitas warna coklat pada tepi membran sel otot antara kelompok diabetes dengan kelompok perlakuan *treatment* vanadil sulfat dengan dosis 5, 30, 100 mg/kg BB. Pada kelompok *treatment*, terlihat bahwa lokasi reseptor insulin yang lebih banyak pada tepi membran sel hingga memperlihatkan batas yang jelas antar tiap sel. Reseptor insulin yang terletak pada membran ekstraselular merupakan bagian sub unit α yang berfungsi untuk mengikat insulin pada jaringan target insulin yaitu otot dan hepar, lalu akan terjadi autofosforilasi reseptor insulin sub unit β yang terletak di dalam membran sel dan mengaktifkan protein kinase sehingga akan terjadi

fosforilasi protein intramolekuler yang akan melanjutkan proses *signaling* pemasukan glukosa ke dalam sel.

Gambar 4.15 menunjukkan perbandingan penampang melintang otot tungkai belakang mencit kelompok perlakuan dengan dosis vanadil sulfat masing-masing 5 mg/kg BB, 30 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB yang dipreparasi imunohistokimia dengan menggunakan antibodi GLUT4. Jaringan otot yang memperoleh vanadil sulfat 5 mg/kg menampilkan jumlah GLUT4 teraktivasi yang paling sedikit apabila dibandingkan dengan ketiga dosis lainnya. Hal tersebut tampak dari intensitas warna yang ditunjukkan oleh jaringan lebih mengarah ke warna abu-abu keperakan atau pucat, yang berarti belum terdapat cukup banyak GLUT4 teraktivasi yang dapat membentuk ikatan dengan antibodi GLUT4. Kondisi jaringan otot yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan kondisi jaringan pada kelompok diabetes.

Pada jaringan otot kelompok mencit yang diberi vanadil dosis 30 mg/kg BB, sudah mulai tampak warna kecoklatan, yang berarti jumlah GLUT4 teraktivasi yang berikatan dengan antibodi sudah mulai banyak. Hal ini menunjukkan mulai adanya perbaikan kondisi jaringan otot setelah diberikan *treatment* vanadil sulfat dengan dosis yang lebih tinggi. Kondisi jaringan otot yang paling mendekati normal ialah pada kelompok perlakuan dengan vanadil sulfat dosis 100 mg/kg BB, dimana pada preparat tampak jaringan otot memberikan warna coklat secara merata, dengan intensitas yang lebih pekat pada beberapa bagian tertentu. Hal tersebut menandakan bahwa jumlah GLUT4 teraktivasi yang dapat terdeteksi oleh antibodi telah mengalami perbaikan sedemikian rupa sehingga sudah tampak seperti kondisi normal.

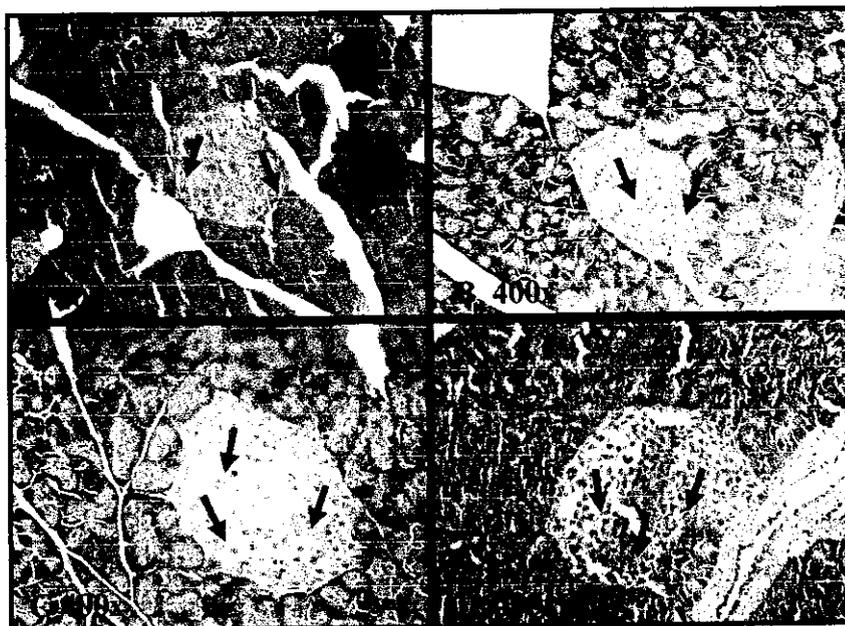


Gambar 4.15 Irisan penampang melintang GLUT4 teraktivasi pada jaringan otot tungkai mencit menggunakan analisis imunohistokimia kelompok kontrol diabetes (A), kelompok perlakuan STZ + VS 5 mg/kg BB (B), STZ + VS 30 mg/kg BB (C), dan STZ + VS 100 mg/kg BB (D) dengan perbesaran 200x

4.5 Hasil Analisis Histopatologi dan Imunohistokimia Preparat Jaringan Pankreas setelah 7 Hari *Treatment* Vanadil Sulfat

Untuk melihat perubahan histopatologi setelah *treatment* vanadil sulfat dengan 3 dosis yang berbeda, maka pada hari ke-28 dilakukan pembedahan dan preparasi jaringan pankreas mencit untuk diamati dengan pewarnaan *aldehyde fuchsin*. Hasil irisan melintang jaringan pankreas mencit dengan pewarnaan *aldehyde fuchsin* diamati perubahan morfologi pada islet Langerhansnya dengan bantuan mikroskop cahaya seperti terlihat pada Gambar 4.16.

Gambar 4.16 (B), (C), (D) memperlihatkan perubahan morfologi islet Langerhans pankreas mencit diabetes yang menerima vanadil sulfat pada tiga dosis yang berbeda dibandingkan dengan morfologi islet Langerhans pankreas mencit diabetes seperti terlihat pada Gambar 4.16 (A). Pada perlakuan dengan dosis vanadil sulfat 5 mg/kgBB sudah terlihat perbaikan pada islet Langerhans seperti terlihat pada Gambar 4.16 (B). Sel-sel β pankreas masih kabur dan batas antar sel masih tampak kurang jelas. Pada dosis vanadil sulfat yang lebih tinggi, yakni 30 mg/kg BB terdapat peningkatan jumlah dan ukuran islet Langerhans. Seperti terlihat pada Gambar 4.16 (C), terdapat peningkatan jumlah sel β , dan batas antar sel lebih tampak jelas. Pada dosis yang lebih tinggi lagi, yaitu 100 mg/kg BB terlihat morfologi islet Langerhans yang mengalami perbaikan hampir menyerupai kelompok kontrol positif. Terlihat adanya peningkatan jumlah serta diameter islet Langerhans yang lebih besar. Pada Gambar 4.16 (D) terlihat adanya peningkatan jumlah sel β dengan batas antar sel yang semakin jelas.



Tanda \blackrightarrow : Sel β pankreas

Gambar 4.16 Irisan Melintang Pankreas Mencit dengan Pewarnaan *Aldehyde Fuchsin* dan Perbesaran 400x, Mencit Mendapatkan : STZ (A); STZ dan Vanadil Sulfat 5 mg/kg BB (B); STZ dan Vanadil Sulfat 30 mg/kg BB (C); STZ dan Vanadil Sulfat 100 mg/kg BB (D)

Pada irisan jaringan pankreas dengan pewarnaan *aldehyde fuchsin* diambil beberapa lapang pandang secara random untuk diamati diameternya dan jumlah sel β pada tiap islet Langerhans. Data hasil pengukuran diameter islet Langerhans dan perhitungan jumlah sel β tiap islet Langerhans kemudian dianalisis secara statistika dengan ANOVA satu arah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna pada diameter islet Langerhans dan jumlah sel β tiap islet Langerhans menciit dari kelompok kontrol negatif (dapar sitrat), kelompok kontrol positif (STZ), dan kelompok perlakuan dengan vanadil sulfat dengan 3 dosis yang berbeda yaitu 5 mg/kg BB, 30 mg/kg BB, 100 mg/kg BB.

Tabel 4.9 Diameter Rata-Rata Islet Langerhans dan Jumlah Rata-Rata Sel β Pankreas Menciit dengan Pewarnaan *Aldehyde Fuchsin* pada Berbagai Kelompok Perlakuan

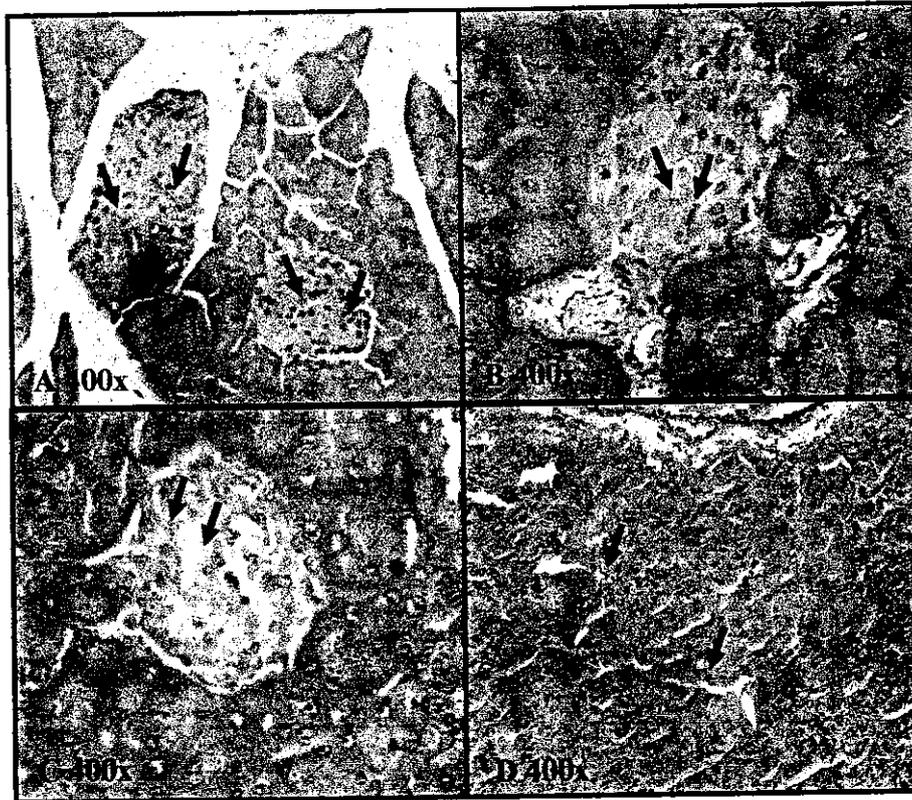
| Kelompok | Jumlah rata-rata sel β tiap islet Langerhans \pm SE | Diameter rata-rata islet Langerhans \pm SE (μm) |
|--------------------------|---|--|
| Kontrol positif | 41.60 \pm 2.20 | 93.33 \pm 9.68 |
| Vanadil sulfat 5 mg/kg | 49.80 \pm 11.01 | 106.25 \pm 8.07 |
| Vanadil sulfat 30 mg/kg | 94.80 \pm 13.54 | 207.50 \pm 15.49 |
| Vanadil sulfat 100 mg/kg | 132.80 \pm 12.48 | 216.25 \pm 23.38 |
| Kontrol negative | 134.40 \pm 11.18 | 194.44 \pm 16.31 |

Pada pemberian vanadil sulfat dengan dosis 5 mg/kg BB diperoleh diameter islet Langerhans 106.25 \pm 8.07 μm , apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif tidak menunjukkan adanya perbedaan diameter islet Langerhans yang bermakna, dengan harga $p = 0.529$. Sedangkan pemberian vanadil sulfat dengan dosis 30 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB memberikan peningkatan diameter islet Langerhans yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yaitu diameternya masing-masing menjadi 207.50 \pm 15.49 μm ($p < 0.001$) dan 216.25 \pm 23.38 μm ($p < 0.001$). Kelompok perlakuan dengan vanadil sulfat dosis 30 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tidak memberikan perbedaan diameter islet Langerhans yang bermakna, dengan harga p secara berurutan $p=0.525$ dan $p=0.290$.

Pemberian vanadil sulfat dengan dosis 5 mg/kg BB tidak memberikan perbedaan jumlah sel β pankreas tiap islet Langerhans yang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, diperoleh jumlah sel β tiap islet Langerhans meningkat menjadi 49.80 ± 11.01 namun memiliki harga $p = 0.881$. Sedangkan pemberian vanadil sulfat dengan dosis 30 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB memberikan peningkatan jumlah sel β yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yaitu jumlahnya masing-masing menjadi 94.80 ± 13.54 ($p=0.004$) dan 132.80 ± 12.48 ($p<0.001$). Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan dengan vanadil sulfat dosis 100 mg/kg BB ($p=0.913$) memberikan perbedaan jumlah sel yang tidak bermakna sedangkan dengan kelompok perlakuan vanadil sulfat dosis 30 mg/kg BB masih memberikan perbedaan yang bermakna ($p=0.013$).

Selain perubahan morfologi pada jaringan pankreas, lebih lanjut dilakukan analisis imunohistokimia menggunakan pewarnaan BrdU dengan metode TUNEL. Sel β yang mengalami apoptosis terdeteksi oleh pewarnaan BrdU dengan metode TUNEL sebagai sel yang berwarna coklat tua kontras terhadap *background* yang merupakan hasil pewarnaan dari *methyl green*. Gambar 4.17 (B), (C), (D) memperlihatkan perubahan apoptosis sel β pankreas pankreas mencit diabetes yang menerima vanadil sulfat pada tiga dosis yang berbeda dibandingkan dengan mencit diabetes seperti terlihat pada Gambar 4.17 (A).

Pada perlakuan dengan dosis vanadil sulfat 5 mg/kgBB sudah terlihat penurunan apoptosis pada sel β bila dibandingkan dengan kelompok diabetes seperti terlihat pada Gambar 4.7 (B). Dijumpai diameter islet Langerhans yang masih kecil dengan sel yang tercat coklat tua dalam jumlah yang lebih sedikit daripada pada kelompok diabetes. Pada dosis vanadil sulfat yang lebih tinggi, yakni 30 mg/kg BB terdapat peningkatan diameter islet Langerhans. Seperti terlihat pada Gambar 4.7 (C), terdapat penurunan jumlah sel yang tercat coklat tua pada bagian tengah sel. Pada dosis yang lebih tinggi lagi, yaitu 100 mg/kg BB seperti terlihat pada Gambar 4.7 terjadi peningkatan diameter islet Langerhans dengan hampir tidak ditemukannya sel berwarna coklat tua pada bagian tengah hingga tepi sel.



Tanda **→** : Sel β pankreas yang mengalami apoptosis

Gambar 4.17 Pewarnaan Imunohistokimia Menggunakan BrdU dengan Metode TUNEL pada Irisan Melintang Pankreas, Perbesaran 400x : Mencit Diabetes (STZ) (A); Mencit Perlakuan 1 (STZ+Vanadil Sulfat 5 mg/kgBB) (B); Mencit Perlakuan 2 (STZ+Vanadil Sulfat 30 mg/kgBB) (C); Mencit Perlakuan 3 (STZ+Vanadil Sulfat 100 mg/kg BB) (D)

BAB 5 PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian vanadil sulfat terhadap aktivitas kerja *glucose transporter 4* (GLUT4) pada mencit dengan kondisi *diabetes mellitus* melalui pemeriksaan imunohistokimia. Dari penelitian-penelitian sebelumnya, vanadil sulfat telah terbukti dapat memperbaiki kondisi gula darah mencit yang menderita *diabetes mellitus*. Oleh karena itu, diperkirakan akan terjadi perubahan aktivitas GLUT4 pada mencit yang menderita *diabetes mellitus* yang memperoleh *treatment* vanadil sulfat selama satu minggu. Sebelum dilakukan pemeriksaan secara imunohistokimia, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan histokimia melalui pewarnaan *haematoxyllin-eosin* untuk memastikan jaringan yang akan dianalisis telah sesuai dengan yang diharapkan.

Mencit model *diabetes mellitus* diperoleh melalui induksi intraperitoneal *streptozotocin* (STZ). Induksi pertama dilakukan pada hari ke-1 dengan dosis 100 mg/kg BB dan induksi selanjutnya diberikan pada hari ke-14 dengan dosis 50 mg/kg BB. Adapun pengaturan dosis untuk mendapatkan mencit dengan kondisi *diabetes mellitus* yang paling optimal telah disesuaikan dengan hasil penelitian sebelumnya (Arijanto, 2006; Rakhman, 2008). STZ diinduksikan di dalam pelarut dapar sitrat dengan pH yang sesuai dengan stabilitas optimal STZ, yaitu pH 4,8. Untuk mengetahui apakah telah diperoleh kondisi *diabetes mellitus* pada hewan coba, maka dilakukan pengukuran gula darah dengan menggunakan glukometer *On Call Plus® Blood Glucose*. Adapun prinsip kerja alat tersebut ialah zat kimia yang berada pada *test spot* dari *glucose test spot* akan bereaksi dengan glukosa dalam darah membentuk warna tertentu. Intensitas warna tersebut sebanding dengan konsentrasi glukosa dalam darah. Glukometer akan mengukur intensitas warna pada *test spot* kemudian menghitung konsentrasi glukosanya.

STZ digunakan untuk menginduksi *diabetes mellitus* baik tipe 1 maupun tipe 2, dimana pemberian dengan dosis di bawah 40 mg/kg BB tidak efektif untuk menginduksi terjadinya diabetes (Szkudelski, 2001). Bahkan setelah induksi yang ke-2 pun masih ada beberapa mencit yang belum terkondisikan diabetes, oleh karena itu diberikan induksi STZ dosis 50 mg/kg BB sekali lagi. Hal tersebut dapat disebabkan oleh adanya perbedaan kondisi mencit pada pustaka dengan

mencit yang digunakan pada penelitian ini, baik perbedaan secara genetika maupun perbedaan kondisi laboratorium. Kelompok mencit yang mendapatkan *streptozotocin* (kelompok diabetes) mengalami peningkatan kadar glukosa darah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang hanya memperoleh dapar sitrat [$F_{(1,19)} = 8,042$; $p = 0,011$], dimana rata-rata kadar glukosa darah pada mencit yang mengalami *diabetes mellitus* ialah sebesar $(226,12 \pm 17,25)$ mg/dL

Untuk mengetahui pertumbuhan normal pada hewan coba akibat pemberian *streptozotocin* dilakukan pengamatan terhadap selisih berat badan mencit selama perkembangan *diabetes mellitus*, dimana berat badan mencit tiap harinya dikurangi dengan berat badan mencit pada hari ke-0 (sebagai *baseline*) seperti yang terlihat pada Tabel 5.2, dimana pada kondisi *diabetes mellitus* sempat terlihat adanya penurunan berat badan mencit mulai hari pertama hingga hari kelima, dimana hal ini menunjukkan adanya gejala diabetes. Namun pada hari ketujuh dan seterusnya terjadi kembali terjadi peningkatan berat badan. Kemungkinan hal ini disebabkan karena adanya perbaikan oleh sel β -pankreas terhadap kerusakan sel. Karena saat awal terjadi diabetes dengan kerusakan sel β -pankreas yang tidak parah, tubuh melakukan mekanisme kompensasi lewat peningkatan fungsi dan perbaikan sel β yang juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga produksi insulin tetap normal, dengan demikian transpor glukosa dari darah ke jaringan dan penggunaan energi melalui metabolisme karbohidrat dapat tetap terjadi (Lavin, 1999). Namun dari uji analisis Anova satu arah, diketahui bahwa tidak ada perbedaan berat badan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok diabetes [$F_{(1,19)} = 0,337$; $p = 0,568$], yang berarti bahwa pemberian STZ tidak memberikan pengaruh terhadap berat badan hewan coba atau mencit yang digunakan dalam penelitian ini mengalami pertumbuhan yang normal.

Pada hari ke-28 dilakukan pembedahan serta preparasi secara histokimia jaringan otot rangka dan adiposa menggunakan pewarnaan *haematoxyllin-eosin* (HE). Pewarnaan HE merupakan pewarnaan rutin preparat histologi yang memulas struktur inti menjadi ungu tua dan hampir semua struktur sitoplasma dan substansi intraselular menjadi merah muda.

Pada *diabetes mellitus* tipe 2 terjadi resistensi insulin akibat kegagalan jaringan target insulin, yaitu jaringan otot, hepar, dan adiposa, dalam merespon stimulus hormon insulin. Akibatnya, terjadi gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein pada jaringan target tersebut (Peavy, 2006). Pada serat-serat otot dengan kondisi diabetes tampak ditemukan adanya daerah inflamasi dan nekrosis. Selain itu, juga terjadi penurunan rata-rata diameter otot, baik pada *extensor digitorum longus* maupun pada *rectus femoris*. Rendahnya serum insulin di *motor end plate* dan di proses sintesis protein kontraktile secara langsung akan menyebabkan atrofi otot rangka pada kondisi diabetes jangka panjang. Berdasarkan studi morfometrik terbaru, diketahui bahwa perubahan serabut-serabut otot lebih banyak terjadi pada anggota gerak bagian balakang (Aughsteen *et al*, 2006).

Resistensi insulin juga akan meningkatkan lipolisis jaringan adiposa perifer yang mengakibatkan peningkatan influks lemak ke dalam hepar dalam bentuk asam-asam lemak bebas. Lebih jauh, resistensi insulin dapat meningkatkan sintesis trigliserida (TG) lewat jalur *de novo* pada hepar dan menghambat oksidasi asam lemak, sehingga menyebabkan akumulasi TG. Pada *diabetes mellitus* tipe 2 sering terjadi dislipidemia yang ditandai dengan peningkatan jumlah TG dalam plasma, penurunan jumlah HDL, serta peningkatan jumlah VLDL (Cassader *et al*, 2001).

Hasil pengamatan perubahan jaringan otot mencit kelompok diabetes dapat dilihat pada Gambar 5.3, dimana pada kelompok diabetes terjadi atrofi serabut otot mencit, sehingga diperoleh hasil pengukuran diameter serabut otot yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok normal. Inti serat otot pun tampak lebih kecil, lebih pipih, dan lebih pucat dibandingkan inti serat otot normal. Selain itu, tampak adanya sel-sel radang serta perdarahan pada otot yang mengindikasikan terjadinya nekrosis sel-sel otot. Sementara itu perubahan jaringan adiposa yang terjadi pada mencit kelompok diabetes dapat dilihat pada Gambar 5.4, dimana pada kelompok diabetes tampak susunan sel-sel lemak berdiameter lebih kecil saling berdesakan, dengan batas antar sel yang tidak jelas dan warna inti sel yang lebih pucat bila dibandingkan dengan sel-sel lemak normal.

Setelah mencit mengalami *diabetes mellitus* akibat induksi STZ, pada hari ke-21 mencit pada kelompok perlakuan diberi suspensi vanadil sulfat dalam pelarut CMC Na 0,6% secara oral masing-masing dengan dosis 5 mg/kg BB, 30 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB selama 7 hari. Sementara itu, untuk kelompok kontrol hanya diberikan larutan CMC Na 0,6% secara oral saja. Dari hasil pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-28, diperoleh adanya perbedaan yang bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol diabetes. Adapun hasil pengukuran kadar glukosa darah dapat dilihat pada Tabel 5.7 dan Gambar 5.9.

Semakin besar dosis vanadil sulfat yang diberikan, maka semakin besar pula efek toksisitas yang ditimbulkannya. Hal ini terbukti dengan paling banyaknya jumlah mencit yang mati pada kelompok perlakuan dosis 100 mg/kg BB. Mencit-mencit tersebut mati dehidrasi akibat diare, dapat diamati melalui konsistensi sisa feses di sekitar anus mencit yang kurang solid. Vanadil sulfat mengandung logam Vanadium yang dapat memberikan efek osmotik dan menarik air ke dalam saluran cerna. Kondisi tersebut menyebabkan volume feses meningkat sehingga terjadi diare yang mengakibatkan dehidrasi dan berujung pada kematian (Neal, 1997). Hal ini dapat diatasi dengan mengganti senyawa vanadil dengan senyawa-senyawa organo-vanadium (Srivastava, 2004). Namun, secara keseluruhan, vanadil sulfat terbukti efektif dalam menurunkan glukosa darah mencit dalam kondisi *diabetes mellitus*.

Perbandingan perubahan morfologi yang terjadi pada jaringan otot mencit setelah diberi *treatment* vanadil sulfat selama 7 hari dengan dosis yang berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 5.5. Tampak pada gambar tersebut bahwa pemberian dosis vanadil sulfat berbanding secara proporsional dengan lebar diameter serabut otot yang dihasilkan, yaitu semakin besar dosis vanadil sulfat yang diberikan, maka semakin besar pula perbaikan diameter serabut otot yang dihasilkan. Selain itu, inti-inti sel otot mulai terlihat lebih tajam dan eksentris. Pada Gambar 5.5 (A) dan (B), dimana masing-masing merupakan penampang melintang otot rangka mencit dalam kondisi diabetes tanpa *treatment* dan kondisi diabetes dengan *treatment* dosis paling rendah, masih dapat diamati adanya sel-sel radang yang mengindikasikan terjadinya nekrosis sel otot. Demikian pula halnya

dengan penampang melintang jaringan adiposa pada Gambar 5.6, dimana pemberian vanadil sulfat dengan dosis 100 mg/kg BB memberikan penampakan diameter sel adiposa yang paling lebar dibandingkan dengan kedua dosis lainnya.

Imunohistokimia merupakan proses lokalisasi antigen pada jaringan dengan menggunakan antibodi berlabel sebagai reagen spesifik melalui interaksi antigen-antibodi yang divisualisasikan oleh suatu *marker* atau penanda seperti pewarna *fluorescent*, enzim, elemen radioaktif, ataupun emas koloid (IHCWORLD, 2009). Pada penelitian ini, dilakukan pemeriksaan imunohistokimia yang menggunakan *glucose transporter 4* (GLUT4) sebagai antibodi. Kendala yang umum terdapat dalam proses preparasi imunohistokimia ini ialah pewarnaan *background* yang tidak spesifik, dimana penyebab utamanya ialah ikatan non imunologi antara sera imun spesifik dengan tekanan-tekanan hidrofobik dan elektrostatik pada daerah-daerah tertentu di jaringan. Namun kendala tersebut dapat diminimalisasi dengan memblok daerah tadi dengan serum normal. Aktivitas peroksidase endogen banyak ditemukan pada jaringan dan dapat dideteksi dengan mereaksikan jaringan terfiksasi dengan substrat DAB. Solusi untuk menghilangkan aktivitas tersebut ialah dengan melakukan *pre-treatment* jaringan dengan hidrogen peroksida sebelum dilakukan inkubasi di dalam antibodi primer (IHCWORLD, 2009).

GLUT4 merupakan *transporter* glukosa yang diatur oleh insulin, yang ditemukan pada jaringan otot lurik (rangka dan jantung) serta jaringan adiposa. GLUT4 yang belum aktif berada di dalam vesikel *lipid bilayers* pada sitoplasma. Insulin akan merangsang translokasi GLUT4 dari tempat penyimpanan intraselular menuju ke membran plasma (Imamura, 2003). GLUT4 yang telah teraktivasi inilah yang dapat berikatan dengan antibodi GLUT4 yang digunakan pada pemeriksaan imunohistokimia. Fokus pemeriksaan pada penelitian ini ialah jaringan otot, karena berdasarkan pustaka diperoleh keterangan bahwa paparan senyawa-senyawa Vanadium telah terbukti dapat memperbaiki ekspresi atau translokasi protein sensitif insulin, GLUT4, pada otot lurik, yaitu otot rangka dan jantung. Vanadium diyakini dapat meningkatkan aktivitas intrinsik ataupun kemampuan *targeting* GLUT4 mencapai permukaan membran plasma yang berdampak pada peningkatan ambilan glukosa (Srivastava, 2004). Di samping itu, jaringan adiposa yang diperoleh kurang begitu baik, sehingga dikhawatirkan tidak

dapat memberikan hasil imunohistokimia seperti yang diharapkan, sementara antibodi yang tersedia juga tidak cukup banyak. Adapun pengamatan intensitas warna GLUT4 yang teraktivasi pada jaringan otot dalam penelitian ini merupakan pemeriksaan secara kualitatif, karena hanya digunakan 1 sampel jaringan untuk masing-masing kelompok, sehingga kurang dapat mewakili keseluruhan kelompok penelitian. Untuk memperoleh hasil secara signifikan statistik, perlu dilakukan pemeriksaan jaringan otot seluruh mencit pada tiap-tiap kelompok.

Perbandingan luas serta intensitas daerah yang berwarna kecoklatan antar tiap kelompok menunjukkan adanya perbedaan jumlah GLUT4 pada masing-masing kelompok tersebut. Pada kelompok normal penampang melintang jaringan otot tampak berwarna coklat pekat. Hal tersebut mengindikasikan pada kondisi normal, masih banyak terdapat GLUT4 teraktivasi yang berada pada permukaan membran sel-sel otot, sehingga dapat berikatan dengan antibodi GLUT4 yang diberikan. Sementara pada kelompok diabetes, lebih banyak diperoleh penampakan bercak yang berwarna abu-abu keperakan dibandingkan dengan yang berwarna coklat pekat. Hal ini disebabkan karena pada kondisi *diabetes mellitus*, terjadi resistensi insulin, sehingga penghantaran sinyal PI-3-kinase terganggu dan berakibat pada berkurangnya translokasi GLUT4 menuju ke membran plasma (Powers, 2005). Sementara itu, intensitas warna serta luas daerah yang berwarna coklat akibat ikatan antara GLUT4 teraktivasi dengan antibodi GLUT4 pada jaringan otot mencit kelompok perlakuan menunjukkan mulai adanya perbaikan kondisi, dimana jumlah GLUT4 teraktivasi (yang terdapat pada permukaan membran sel) terbanyak ditunjukkan oleh kelompok perlakuan dosis 30 mg/kg BB. Pada dosis 100 mg/kg BB warna coklat lebih banyak terlihat di tengah-tengah sel, sehingga tidak menunjukkan adanya aktivasi pada GLUT4. Semakin banyak GLUT4 yang teraktivasi pada permukaan membran sel, pemasukkan glukosa ke dalam sel akan semakin meningkat, yang dapat berakibat pada menurunnya kadar glukosa bebas dalam darah. Adapun irisan yang digunakan pada pengamatan ini merupakan irisan melintang dengan pertimbangan pada irisan melintang sitoplasma sel otot dapat diamati dengan lebih jelas daripada irisan membujur.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

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

1. Vanadil sulfat efektif menurunkan kadar glukosa darah pada kondisi *diabetes mellitus*.
2. Vanadil sulfat dapat meningkatkan aktivitas reseptor insulin dan *glucose transporter 4* (GLUT4) dalam proses *insulin signaling* pada jaringan otot rangka dan hepar.
3. Vanadil sulfat dapat memberikan efek perbaikan pada kondisi atrofi dan nekrosis jaringan otot rangka dan hepar akibat *diabetes mellitus*.
4. Vanadil sulfat dapat menghentikan proses lipolisis pada jaringan adiposa dalam kondisi *diabetes mellitus* dan meningkatkan regenerasi sel-sel lemak pada jaringan adiposa.
5. Vanadil sulfat dapat memperbaiki sel beta pankreas yang mengalami kerusakan akibat *diabetes mellitus*.

7.2 Saran

Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh vanadil sulfat terhadap aktivitas proliferasi sel beta pankreas, perlu dilakukan analisis secara kuantitatif terhadap intensitas warna imunohistokimia yang ditimbulkan oleh aktivitas insulin reseptor dan GLUT4 pada jaringan target insulin (baik pada adiposa, hepar, maupun otot).

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam, 2010. *Glucose Transporter GLUT4 Antibody [EP930(2)AY] (ab 62375)*.
<http://www.abcam.com/Glucose-Transporter-GLUT4-antibody-EP930-2-AY-ab62375.html>. 13 Januari 2010.
- Adams, L. A., Angulo, P., 2006. Review: Treatment of Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Postgrad. Med. J.*, p. 315-322.
- Anonim, 1999. *Vanadium*. http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/can_0258.shtml. 1 Desember 2009.
- Arulmozhi, D. K., Veeran, J. A., Bodhankar, S. L., 2004. Neonatal Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J. Pharmacol*, Vol. 36, pp. 217-221.
- 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. 663-670.
- 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.
- Aughsteeen, A., Khair, A. B., Suleiman, Ahmad, A., 2006. Quantitative Morphometric Study of the Skeletal Muscle of Normal and Streptozotocin-Diabetic Rats. *J. Panc.*, Vol. 7(4), pp. 382-389.
- Belfiore, F., Iannello, S., 2000. Etiological Classification Pathophysiology and Diagnosis; Insulin Secretion and Its Pharmacological Stimulation; Insulin Resistance and Its Relevance to Treatment. In: F. Belfiore, C. E. Mongensen (Eds.). *New Concept in Diabetes and Its Treatment*, Basel: Karger.
- Bevan, P., 2001. Insulin Signaling. *J. Cell Sci.*, Vol. 114, pp. 1429-1430.
- Boden, G., 1997. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes*, Vol. 36, p. 3-10.
- Bowen, R., 2004. *Insulin Mechanism of Action*. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin.html>. 30 Oktober 2009.

- Cadene, A., Grigorescu, F. Serrano, J., Cros, G., 1996. Characterization of Vanadyl Sulfate Effect on Vascular Contraction: Roles of Calcium and Tyrosine Phosphorylation. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, Vol. 281, No. 1, pp. 491-498.
- Cassader, M., Gambino, R., Musso, G., Depetris, N., Mecca, F., Cavallo-Perin, P., 2001. Postprandial Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism and Insulin Sensitivity in Non Alcoholic Steatohepatitis Patients. *Lipids*, Vol. 36, pp. 1117-1124.
- Davis, S. N., Granner, D. K., 2001. Insulin, Oral Hypoglycemic Agents and the Pharmacology of the Endocrine Pancreas. In: J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. Goodman Gilman (Eds.). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed.*, USA: McGraw-Hill Co., p. 1685-1686.
- Elmendorf, J. S., 2002. Signals that Regulate GLUT4 Translocation. *J. Membr. Biol.*, 190(3), p. 167-174.
- Eroschenko, V. P., 2005. *Difiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, 10th Ed.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Faculty of Medicine, PU Olomouc, CZ, 2009. *Histology Practical No. 5.* <http://ultrastruktura.upol.cz/v%C3%BDuka/en/5ConnTissuePractical.pdf>. 13 Januari 2010.
- Fawcett, D. H., 2002. *Buku Ajar Histologi, Ed. 12.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 233-74, 583-603.
- Funk, J. L., 2006. Disorder of the Endocrine Pancreas. In: *Pathophysiology of Disease, an Introduction to Clinical Medicine, 5th Ed.* USA: McGraw-Hill Co., p. 1333-1357.
- Ganong, William F., 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Ed. 20,* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 320-326.
- 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, 2nd Ed.*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 206-207.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Ed. 9,* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 1221-1231.

- Hasiannami, D., 2007. *Pengaruh Penggunaan Vanadil Sulfat pada Hepar Mencit (Mus musculus) dengan Diabetes Mellitus*. Surabaya: Bagian Ilmu Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Hoogwerf, B. J., 2006. Exenatide and Pramlintide: New Glucose-Lowering Agents for Treating Diabetes Mellitus. *Clev. Clin. J. Med.*, Vol. 73, pp. 477-484.
- IHCWORLD, 2009. *Introduction to Immunohistochemistry*. <http://www.ihcworld.com/intro/antigen-retrieval.htm>. 16 Januari 2010.
- Imamura, T., Huang, J., Usui, I., Satoh, H., Bever, J., Olefsky, J. M., 2003. Insulin-Induced GLUT4 Translocation Involves Protein Kinase C- λ -Mediated Functional Coupling between Rab4 and the Motor Protein Kinesin. *Mol Cell Biol.*, Vol. 23, No. 14, p. 4892-4900.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., 1998. *Histologi Dasar, Edisi ke-8*, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, pp. 121-126, 187-207, 317-326.
- 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*. <http://www.library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MANUALS.html>. 3 Desember 2009.
- Lang, F., 2000. Causes of Diabetes Mellitus; Acute Effects of Insulin Deficiency. In: S. Silbernagl, F. Lang (Eds.). *Color Atlas of Patophysiology*, New York: Thieme.
- Leeson, Thomas S., Leeson, C. Roland, 1970. *Histology*, USA: W. B. Saunders Company.
- Leiter, Edward H., 1982. Multiple Low-Dose Streptozotocin-Induced Hyperglycemia and Insulinitis in C57BL Mice: Influence of Inbred Background, Sex, and Thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 79, pp. 630-634.

- Lenzen, S. 2008. *The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin- Induced Diabetes*. <http://www.springerlink.com/content/e2450r1101642j8w/fulltext.pdf>. 1 Desember 2009.
- Lizcano, J. M., Alessi, D. R., 2002. The Insulin Signaling Pathway. *Curr. Viol., Vol. 12*, pp. 236-238.
- Lüllmann, H., Ziegler, A., Mohr, K., Bieger, D., 2000. *Color Atlas of Pharmacology, 2nd Ed.*, New York: Thieme, p. 263.
- McEvoy, G. K. (Ed.), 2002. *AHFS Drug Information*, USA: American Society of Health System.
- Nolte, M. S., Karam, J. H., 2007. Pancreatic Hormones & Antidiabetic Drugs. In: B. G. Katzung (Eds.). *Basic and Clinical Pharmacology, 10th Ed.*, Singapore: McGraw-Hill Companies, p. 683-687.
- Ogawa, A., Kurita, K., Ikezawa, Y., Igarashi, M., Kuzumaki, T., Daimon, M., Kato, T., Yamatani, K., Sasaki, H., 1996. Functional Localization of Glucose Transporter 2 in Rat Liver. *The J. Histochem. and Cytochem., Vol. 44, No. 11*, pp. 1231-1236.
- Peavy, D. E., 2006. The Endocrine Pancreas. In: *Medical Physiology*, p. 625.
- Powers, A. C., 2005. Diabetes Mellitus. In: Dennis L. K., Anthony S. F., Dan L. L., Eugen B., Stephen L. H., J. Larry Jameson (Eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicines, Vol. 2*, USA: McGraw-Hill.
- Rakhman, A., 2008. *Efek Vanadil Sulfat Terhadap Kerusakan Jaringan Otot, Adiposa, dan Hepar Mencit (Mus musculus) yang Menderita Diabetes Mellitus oleh Induksi Streptozotocin*. Surabaya: Bagian Ilmu Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Schwinghammer, T. L. (Ed.), 2006. Diabetes Mellitus. In: B. G. Wells, J. T. Dipiro, T. L. Schwinghammer, C. W. Hamilton (Eds.). *Pharmacotherapy Handbook, 6th Ed.*, USA: Appleton and Lange, p. 181-195.
- 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.

- Srivastava, A. K., Mehdi, M. Z., 2004. Insulino-mimetic and Anti-diabetic Effects of Vanadium Compounds. *Diab. Med.* **22**, pp. 2-13.
- Syahriel, G., 2007. *Pengaruh Vanadil Sulfat Terhadap Jaringan Otot dan Adiposa Mencit (Mus musculus) dengan Diabetes Mellitus*. Surabaya: Bagian Ilmu Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Szkudelski, T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in 5B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.*, **Vol. 50**, pp. 536-546.
- Triplitt, C. L., Reasner, C. A., Isley, W. L., 2005. 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, 6th Ed.*, USA: McGraw-Hill Co., p. 1333-1357.
- Verma, S., Cam, M. C., McNeill, J. H., 1998. Nutritional Factors that Can Favorably Influence the Glucose/ Insulin System: Vanadium. *J. Am. College Nutr.*, **Vol. 17, No. 1**, pp. 11-18.
- World Health Organization, 2007. Diabetes Fact Sheet No. 312. <http://www.who.com>. 8 Oktober 2009.
- Zhang, Shu-Xin, 1999. *An Atlas of Histology*. New York: Springer-Verlag New York, Inc., p. 32-65, 238-247.

| |
|--|
| |
| |
| |
| |