

KK  
FKA  
Teb. 59/11  
Nov  
e

## TESIS

**EFEK TERAPI KOMBINASI METFORMIN – OKSIGEN HIPERBARIK  
PADA PASIEN DIABETES MELLITUS TIPE 2  
SUB JUDUL : PENINGKATAN KADAR ENDOTHELIAL *NITRIC OXIDE*  
*SYNTHASE* (eNOS) DAN PENURUNAN KADAR GLUKOSA DARAH**



Oleh :

**Bernadette Dian Novita Dewi, dr.**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**TUGAS AKHIR  
PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER  
ILMU KEDOKTERAN DASAR  
MINAT STUDI FARMAKOLOGI**

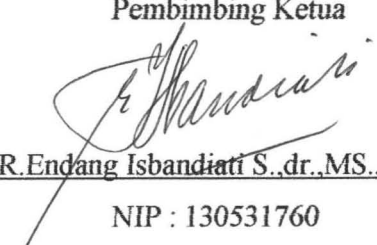
**TAHUN 2009**

**LEMBAR PENGESAHAN**

Tesis ini telah disetujui  
Pada tanggal 15 Desember 2009


Oleh,

Pembimbing Ketua

  
DR. Endang Isbandiati S., dr., MS., Sp.FK

NIP : 130531760

Pembimbing II

  
DR. M. Guritno S., dr. SMHS DEA  
Laksamana Pertama TNI (Purn)

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar



  
Prof. Retno Handajani, dr., MS, Ph.D

NIP. 130 541 984



## PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh Panitia Penguji  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Pada tanggal 15 Desember 2009

### Panitia Penguji :

1. Dr. Endang Isbandiati,dr.,MS.,Sp.FK
2. Dr. M. Guritno S,dr.,SMHS.DEA.
3. Dr. Florentina Sustini,dr.,MS
4. Dr. F.M.Judajana,dr.,Sp.PK(K)
5. Ramadhani,dr.,M.Kes.
6. Sri Purwaningsih,dr.,M.Kes

## UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan Puji Syukur kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan dalam waktu yang sesuai dengan yang telah saya targetkan.

Tesis ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi Para Pembimbing, serta saran dan koreksi Tim Penguji. Dengan segala kerendahan hati, perkenankan saya menghaturkan ucapan terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. DR. Endang Isbandiati, dr., MS., Sp.FK., sebagai pembimbing ketua yang telah memberikan bimbingan yang besar sekali manfaatnya terhadap cara berpikir ilmiah saya, dengan penuh pengertian, kasih sayang dan kesabaran seorang ibu memberikan dukungan mental untuk senantiasa percaya pada asa dan Tuhan, meluangkan waktu untuk berdiskusi menyusun kerangka konsep penelitian sejak awal hingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Ibu, saya mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga
2. DR.M.Guritno S., dr., SMHS.,DEA, Laksamana Pertama TNI (Purn) sebagai pembimbing II yang telah memberikan bimbingan terhadap cara berpikir ilmiah saya, meluangkan waktu untuk berdiskusi, membimbing dan memberikan arahan dalam bidang hiperbarik oksigen memberikan informasi jurnal baru yang berkaitan dengan terapi OHB yang berperan besar dalam penyusunan tesis ini, sejak konsep awal hingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Saya mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga
3. DR. F.Sustini, dr., MS., sebagai ketua Tim Penguji atas saran dan koreksi terutama pada kerangka konsep penelitian dan tata cara penulisan ilmiah. DR. FM. Judajana, dr., Sp.PK(K), Ramadhani,dr.,M.Kes., Sri Purwaningsih, dr., M.Kes sebagai anggota Tim Penguji atas saran dan koreksi terhadap kekurangan yang ada pada tesis ini.

Dengan telah selesainya pendidikan program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Dasar ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

4. Prof. DR. Fasichul Lisan, Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga, serta Prof. DR. M. Amin., dr., Sp.P(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas dalam mengikuti dan menyelesaikan program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga
5. Prof. DR. Hardjanto JM., dr., Sp.AIF., selaku ketua program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, serta Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D., selaku ketua program studi Ilmu Kedokteran Dasar Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, serta seluruh pimpinan dan staf Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan program magister pada program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga

6. Seluruh dosen Program Pascasarjana selama saya mengikuti program magister program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membuka wawasan berpikir ilmiah saya, terutama Prof. Poernomo Suryohudoyo, Sp.BK., Prof.DR. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Prof. Ari Gunawan, dr., MS., Ph.D. DR.A.Basori, drs.,Apt., DR. Sunarko Setyawan, dr., MS., saya mengucapkan terima kasih.
7. Direktur Rumah Sakit Angkatan Laut Dr.Ramelan Surabaya, Direktur Lembaga Kesehatan Kelautan TNI AL Drs.Med.R.Rijadi Satropanoelar Phys., yang telah memberikan izin dan fasilitas untuk penelitian hiperbarik oksigen. Djati,dr.,M.Kes., Titut,dr.,M.Kes. dan seluruh staf Lakesla yang telah membantu dalam pelaksanaan terapi OHB, serta para pasien atas kesediaannya menjadi subyek dalam penelitian yang terkait dalam tesis saya.
8. Teman-teman satu angkatan tahun 2008/2009 di program magister Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga yang telah bekerja sama dengan baik dan saling memberikan motivasi untuk menyelesaikan program magister ini

Dalam kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang kepada :

9. Orang tua saya ayahanda Gandy Sugardo,SH. dan ibunda Imelda S.Islandjari,SH., serta tante saya Anny Ch., SPd., yang telah memberi teladan yang baik, penuh pengertian dan kasih sayang menjaga anak-anak saya saat saya menyelesaikan tesis ini
10. Suami saya, Agus Krisdianto, ST.,MM., dan kedua balita saya Yoshua dan Patricia tercinta yang telah memberikan kesempatan, dorongan, pengertian serta selalu sabar dalam mendampingi saya selama mengikuti dan menyelesaikan pendidikan ini

Saya ucapkan terima kasih dan mohon maaf sebesar-besarnya kepada semua pihak, yang belum saya sebutkan satu per satu, yang telah turut membantu dalam penyelesaian penelitian dan tesis ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

## ABSTRACT

### THE IMPROVEMENT OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (eNOS)'S CONCENTRATION IN PATIENTS WITH TYPE2 DIABETES AFTER COMBINATION TREATMENT OF METFORMIN AND HIPERBARIK OXYGEN

Metformin is the first line drug of type 2 diabetes patients. Its improves Insulin sensitivity as mechanism of action via activation of cyclic-adenomonomosphat dependent protein kinase (AMPK), reduces hepatic glucose product by reducing *gluconeogenesis*, and increases endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). Chronic hyperglycemia induces Nitric Oxide (NO) dysfunction, where as, NO is important vasodilator in human body. Due to of NO dysfunction, cells become hypoxia to ischemic then cell apoptotic, included cells  $\beta$  pancreatic. The aim of this study to find new management in optimalisation of Metformin therapy in patients with type 2 diabetes, especially in the improvement of blood glucose into 'normoglycemia' and eNOS, the important indicator for vascular condition. Hyperbaric oxygen (HBO), 2.4 ATA, which is given 3x30 minutes with 5 minutes intervals for 10 times within 10 days continually, reduces directly blood glucose, improves NO function and inhibits cytokines released. Therefore, HBO therapy is considered as an adjuvant treatment in type 2 DM beside Metformin.

*Methods* : This study was conducted by a clinical pre and post experiment without control. The ten men's correspondents in the study were chosed randomly. Blood glucose and eNOS concentration are used as the parameters in this study. They were examined before, during and after the combination treatment of Metformin and HBO were given. All parameters were statistically analyzed by paired t-test.

*Result* : The concentration of eNOS were increased significantly and also with the blood glucose condition, it reduced significantly after the combination treatment of Metformin and HBO.

*Conclusion* : HBO therapy works synergism with Metformin in diabetes type2 therapy, especially by improving Metformin therapy in reduced blood glucose and raised eNOS. It is a new hope to prevent micro and macro angiopathy's complication in patient with chronic hyperglycemia caused by type 2 diabetes

*Keywords* : *type2 diabetes, Metformin, HBO, eNOS and blood glucose*

## RINGKASAN

Perkembangan terapi Diabetes Mellitus (DM) melaju pesat dalam dekade ini, karena jumlah penderita DM semakin meningkat setiap tahun, Salah satu perkembangan dalam terapi oral anti diabetik (OAD) adalah penggunaan Metformin sebagai terapi DM tipe 2 lini pertama (Perkeni, 2007). Penggunaan Metformin bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas reseptor melalui peningkatan kinerja *Insulin Receptor Substrate* (IRS) via aktivasi *cyclic Adenomonophosphat dependent Protein Kinase* (AMPK), Fungsi AMPK untuk mengaktivasi *Glucose Transporters* (GLUT) 1,2,3,4 sehingga terjadi peningkatan *uptake* glukosa di seluruh tubuh terutama pada sel hepar, muskuloskeletal dan adipose. Alasan Metformin digunakan sebagai OAD lini pertama karena secara alami penderita DM Tipe 2 telah mengalami *decompensated* hiperglikemia kronis, kerusakan sel  $\beta$  pankreas, peningkatan resistensi Insulin sekunder.

Resistensi Insulin dapat terjadi akibat *defect* pada *pre* reseptor, reseptor, dan post reseptor. *Defect pre* reseptor dapat disebabkan oleh gen atau antibodi reseptor. *Defect* reseptor dapat disebabkan oleh jumlah reseptor yang kurang atau kepekaan reseptor yang menurun. *Defect post* reseptor disebabkan oleh gangguan proses fosforilasi dan Insulin *signaling cascade*. Resistensi Insulin menurunkan *uptake* glukosa pada otot skeletal dan *adipocyte* sehingga keadaan hiperglikemia semakin parah. Mekanisme kerja Metformin tidak tergantung pada fungsi sel  $\beta$  pankreas. Hiperglikemia dan hipoksia mempunyai peran penting terhadap patofisiologi komplikasi diabetes, sebagai akibat respons jaringan yang tidak adekuat terhadap kapasitas oksigen. *Hypoxia Inducable Factor* (HIF)-1 $\alpha$  menginduksi beberapa gen di antaranya *endothelial Nitric Oxide* (eNOS) dan beberapa enzim glikolisis (Thornton, 2005). Metformin meningkatkan sensitivitas Insulin melalui pengaktifan AMPK yang banyak berada pada hepar dan saluran cerna, serta di muskuloskeletal dan jaringan adipocyte bila pemberian Metformin tersebut diimbangi dengan olah raga. Selain itu Metformin juga dapat mengaktifkan *endothelium Nitric Oxide Synthase* (eNOS) melalui aktivasi fosforilasi AMPK di pembuluh darah serta peningkatan ATP dan penurunan konsentrasi fosfokreatin di muskuloskeletal (Musi et al, 2002). Harapan dari pemberian Metformin sebagai anti diabetik oral adalah untuk menurunkan keadaan hiperglikemia dan mencegah komplikasi mikrovaskular.

Problem yang muncul pada monoterapi Metformin adalah peningkatan insiden kegagalannya dalam dekade terakhir ini. Di Inggris, insidennya mencapai 21% dari 4360 responden penelitian kohort lima tahun (Kahn et al, 2006). Hal ini terjadi karena kemampuan Metformin untuk memperbaiki sensitivitas reseptor Insulin terbatas hanya pada perbaikan *defect post* reseptor Insulin.

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi bertambah buruknya kondisi penderita DM tipe 2 yang mengalami kegagalan monoterapi Metformin dengan mengkombinasi Metformin dengan oral antidiabetik lainnya seperti Glibenclamide (golongan Sulfonylurea) yang bersifat meningkatkan sekresi

Insulin, selain itu juga diberikan bersama Rosiglitazone (golongan Thiazolidinediones), maupun dengan analog Insulin. Namun hasil dari kombinasi tersebut tidak dapat memperbaiki fungsi sel  $\beta$  dan hormon, sehingga meskipun telah mengkonsumsi anti diabetik secara rutin, progresivitas komplikasi pada DM Tipe 2 sulit dihindari.

Fenomena tersebut membuat peneliti tertarik untuk melakukan penelitian, terutama untuk mencari upaya mengoptimalkan terapi Metformin sebagai monoterapi pada penderita DM Tipe 2 sehingga mampu membuat keadaan 'normoglikemia', mencegah terjadi komplikasi, terutama komplikasi mikrovaskular, dan mencegah atau menghambat progresivitas kerusakan massa sel  $\beta$ . Terapi kombinasi Metformin tersebut sebaiknya mudah dilakukan dan aman dengan efek samping serta efek interaksi obat minimal.

Salah satu terapi kombinasi tersebut adalah terapi oksigen hiperbarik (OHB), yang pada beberapa penelitian terdahulu telah diduga dapat mengurangi faktor – faktor yang dapat memperparah penurunan fungsi sel  $\beta$  pankreas pada penderita dengan DM Tipe 2. Terapi OHB (oxygen hyperbaric therapy, HBOT) adalah terapi oksigen murni 100% dengan tekanan lebih dari 1 atmosfer absolut (ATA). Terapi OHB dapat 1) meningkatkan oksigenasi pada hemoglobin sehingga ATP tingkat sel dapat meningkat, hal ini berguna untuk meningkatkan respons reseptor Insulin, selain itu, pada sel muskuloskeletal dan adipose, peningkatan ATP ini dapat meningkatkan stimulasi pada AMPK yang kemudian mengaktifasi GLUT-4 sehingga glukosa dapat masuk ke dalam sel (Epstein, 1999), 2) berfungsi menghambat interleukotrin  $\beta_2$  (Thorn, 1993), 3) mempunyai efek supresi terhadap mediator inflamasi dan sitokin pro-inflamasi pada DM Tipe 2 seperti IL-6, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  yang bersifat proapoptosis sel  $\beta$  pankreas (Cvetkovic, 2002; Graves, 2003; Dean, 2004), 4). menghambat rilis berlebih stres oksidatif (ROS, peroksid-NO, DAG) yang terjadi akibat hiperglikemia kronis dan mempercepat penyembuhan luka ganggren yang merupakan salah satu komplikasi kronis diabetes mellitus (Brummelkamp, 1961). Tekanan hiperbarik untuk terapi antara 2–2,5 ATA dengan waktu minimum 90 menit setiap kali terapi tidak menunjukkan toksisitas terhadap jaringan (Delaney, 2001; Bakker, 2002). Pemberian terapi OHB dilakukan selama 3x30 menit dengan interval waktu 5 menit menghirup udara lingkungan bertujuan untuk menghindari terjadi toksisitas, selama 10 hari berturut – turut. Frekuensi pemberian terapi OHB 10 hari merupakan pilihan yang menunjukkan efek hiperoksia paling optimal untuk inflamasi kronis / DM Tipe 2 (Bruchman, 2001; Conconi, 2003).

Berdasarkan uraian tersebut di depan, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek kombinasi terapi Metformin dan OHB terhadap kadar eNOS serum sebagai indikator perbaikan mikrovaskular, sehingga di masa yang mendatang terapi OHB dapat digunakan sebagai terapi *adjuvant* pada penderita dengan DM Tipe 2.



## TUJUAN PENELITIAN

**Tujuan Umum :** Menjelaskan peran terapi OHB dalam upaya mengoptimalkan monoterapi Metformin pada penderita DM Tipe 2.

**Tujuan Khusus :**

1. Mengetahui pengaruh kombinasi terapi kombinasi Metformin – OHB terhadap peningkatan kadar eNOS di pembuluh darah tepi penderita DM Tipe 2
2. Mengetahui pengaruh kombinasi terapi kombinasi Metformin – OHB terhadap penurunan kadar glukosa darah penderita DM Tipe 2

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *pre and post test without control*. Subyek dalam penelitian ini adalah 10 orang laki-laki penderita diabetes yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pengamatan terhadap kadar eNOS dan kadar glukosa darah puasa dilakukan tiga kali, yaitu 1) sebelum subyek mendapat terapi OHB 2.4ATA atau saat subyek hanya mendapat terapi Metformin saja, 2) saat subyek mendapat terapi kombinasi Metformin dan OHB hari ke 5 serta 3) setelah subyek mendapat terapi kombinasi Metformin dan OHB hari ke 10. Dari hasil pengamatan tersebut dilakukan uji statistik 1) deskripsi untuk mengetahui rerata, 2) uji distribusi normal menggunakan metode Kolmogorov Smirnov, 3) *paired t-test* untuk membandingkan keadaan sebelum dan sesudah terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA.

Hasil analisis data dan pembahasan dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA : 1) berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah puasa pada pasien gagal monoterapi Metformin, 2) berpengaruh terhadap peningkatan kadar eNOS pada pasien gagal monoterapi Metformin. Hal tersebut sesuai dengan hipotesis penelitian, 3) tidak menyebabkan perubahan pada faal ginjal (BUN dan serum kreatinin) dan faal hepar (SGOT dan SGPT). Hal tersebut sesuai dengan tujuan penelitian, yaitu untuk mengoptimalkan terapi Metformin tanpa menurunkan fungsi ginjal dan hepar. Harapan dari kesimpulan tersebut di atas adalah terapi OHB 2.4 ATA dapat direkomendasikan sebagai terapi kombinasi pasien DM tipe 2 yang mendapat terapi Metformin.

Efek lain terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA adalah memperbaiki kemampuan ereksi. Hal ini terkait dengan peningkatan *release NO* dapat memperbaiki keadaan disfungsi ereksi melalui mekanisme peningkatan eNOS yang terkait Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) yang berada pada vassa cavernosum dan relaksasi otot polos yang dipengaruhi NO (Yang et al, 2000; Rathel et al, 2005).

## SUMMARY

### THE IMPROVEMENT OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (eNOS)'S CONCENTRATION IN PATIENTS WITH TYPE2 DIABETES AFTER COMBINATION TREATMENT OF METFORMIN AND HIPERBARIK OXYGEN

Metformin is the first line drug of type 2 diabetes patients. Its improves Insulin sensitivity as mechanism of action via activation of cyclic-adenomonophosphat dependent protein kinase (AMPK), reduces hepatic glucose product by reducing *gluconeogenesis*, and increases endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). Chronic hyperglycemia induces Nitric Oxide (NO) dysfunction, where as, NO is important vasodilator in human body. Due to of NO dysfunction, cells become hypoxia to ischemic then this condition increases cytokines released, such as  $TNF\alpha$ , IL-6. Mostly those cytokines are pro inflammation – pro cell apoptotic., included cells  $\beta$  pancreatic. However, Metformin is expected to prevent endothelial and vascular function beside its effects on increasing Insulin receptor sensitivity. On the other hand, the evidence of Metformin monotherapy failure is high. Due to that, Hyperbaric oxygen (HBO) therapy is considered as combination of Metformin therapy.

Thus, the aim of this study to find new management in optimisation of Metformin therapy in patients with type 2 diabetes, especially in the improvement of blood glucose into 'normoglycemia' and eNOS, the important indicator for vascular condition. HBO therapy 2.4 ATA, which is given 3x30 minutes with 5 minutes intervals for 10 times within 10 days continually, reduces directly blood glucose, improves NO function, inhibits cytokines released and without makes worse the renal or liver function.

*Methods* : This study was conducted by a clinical pre and post experiment without control. The ten men's correspondents in the study were chosed randomly. Blood glucose and eNOS concentration are used as the parameters in this study. They were examined before, during and after the combination treatment of Metformin and HBO were given. All parameters were statistically analyzed by paired t-test method to compare before and after combination therapy of Metformin and HBO's condition especially in the eNOS concentration and fasting blood glucose.

*Result* : The concentration of eNOS were increased significantly and also with the blood glucose condition, it reduced significantly after the combination treatment of Metformin and HBO. The combination therapy also gave effect on erection function. It is presumable from the bound of NO and Estrogen Receptor (ER) in penis (Yang et al, 2000; Rathel et al, 2005).



*Conclusion* : HBO therapy works synergism with Metformin in diabetes type2 therapy, especially by improving Metformin therapy in reduced blood glucose and raised eNOS. It is a new hope to prevent micro and macro angiopathy's complication in patient with chronic hyperglycemia caused by type2 diabetes. It also a new management to prevent from Metformin monotherapy failure.

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>Judul</b>	i
<b>Lembar Pengesahan</b>	ii
<b>Lembar Penetapan Panitia Penguji</b>	iii
<b>Ucapan Terima Kasih</b>	iv
<b>Abstract</b>	vi
<b>Ringkasan</b>	vii
<b>Summary</b>	x
<b>Daftar Isi</b>	xii
<b>Daftar Gambar</b>	xvi
<b>Daftar Tabel</b>	xvii
<b>Daftar Singkatan</b>	xviii
<b>Bab I : Pendahuluan</b>	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	7
1.3 Tujuan penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat penelitian	8
1.4.1 Teoritis	8
1.4.2 Praktis	8
<b>Bab II : Studi Pustaka</b>	9
2.1 Diabetes Mellitus	9
2.1.1 Batasan Diabetes Mellitus	9
2.1.2 Kerusakan molekuler akibat hiperglikemia	11
2.1.3 Stres Oksidatif pada hiperglikemia	15
2.1.3.1 Reactive Oxygen Species dan Radikal Bebas	15
2.1.3.2 Peningkatan Stres Oksidatif pada hiperglikemia	16

2.2 Patogenesis Diabetes Mellitus Tipe2	17
2.2.1 Insulin, Reseptor Insulin dan GLUT	18
2.3 c-AMP, Protein Kinase	21
2.3.1 Fungsi c-AMP	21
2.3.2 Sintesis dan Dekomposisi c-AMP	22
2.3.3 c-AMP dependent Protein Kinase (AMPK)	23
2.4 NOS	24
2.4.1 Macam NOS	24
2.4.2 Mekanisme reaksi NOS	26
2.4.3 Struktur NOS	27
2.4.4 Nitric Oxide (NO)	28
2.4.5 Peran eNOS pada mikrovaskular pasien diabetes tipe2	29
2.5 Metformin	31
2.5.1 Mekanisme kerja dan Efek Metformin	31
2.5.2 Absorpsi, Metabolisme Ekskresi dan Dosis Metformin	33
2.5.3 Efek Metformin pada eNOS	34
2.6 Terapi oksigen hiperbarik	35
2.6.1 Definisi terapi OHB	35
2.6.2 Sejarah terapi OHB	35
2.6.3 Efek fisiologi dan farmakologi OHB	36
2.6.3.1 Efek fisiologi	37
2.6.3.2 Efek farmakologi	39
2.6.4 Efek OHB terhadap eNOS	43
2.6.5 Indikasi terapi OHB	44
2.6.6 Kontraindikasi terapi OHB	45
2.6.7 Komplikasi terapi OHB	46
2.6.8 Ruang hiperbarik	47

<b>Bab III</b>	<b>: KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b>	48
3.1	Kerangka Konseptual	48
3.2	Penjelasan Teori Konseptual Penelitian	49
3.3	Hipotesis Penelitian	50
<b>Bab IV</b>	<b>: METODE PENELITIAN</b>	51
4.1	Jenis/Rancangan Penelitian	51
4.2	Unit Eksperimen, Jumlah dan Teknik Pengambilan Sampel	51
4.2.1	Unit Eksperimen	51
4.2.2	Besar Sampel	53
4.3.3	Teknik Pengambilan Sampel	54
4.3	Variabel dan Definisi Operasional	54
4.3.1	Variabel Penelitian	54
4.3.2	Definisi Operasional	54
4.4	Bahan Penelitian	55
4.5	Instrumen Penelitian	55
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	55
4.6.1	Lokasi Penelitian	56
4.6.2	Waktu Penelitian	56
4.7	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	57
4.8	Prosedur Pemeriks dan Laboratorium Metode ELISA	57
4.9	Cara Menganalisis Data	57
4.10	Kerangka Operasional	58
<b>Bab V</b>	<b>: HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN</b>	60
5.1	Hasil uji homogenitas HbA1C Sampel	60
5.2	Hasil Pengukuran kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)	61
5.3	Hasil Pengukuran kadar eNOS	63
5.4	Faal Ginjal (BUN dan Serum Kreatinin)	65
5.5	Faal Hepar (SGOT dan SGPT)	67
5.6	Keluhan pasien selama terapi kombinasi Metformin-OHB	70

<b>Bab VI</b>	<b>: PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN</b>	71
6.1	Persiapan subyek penelitian	71
6.2	Efek sinergisme terapi kombinasi Metformin-OHB	72
6.3	Kadar glukosa darah puasa (GDP)	73
6.4	Kadar endothelial nitric oxide synthase (eNOS)	76
6.5	Faal Ginjal (BUN dan Serum Kreatinin)	78
6.6	Faal Hepar (SGOT dan SGPT)	79
6.7	Temuan baru	79
6.8	Luaran ( <i>outcome</i> )	80
6.9	Keterbatasan pada studi ini	80
<b>Bab VII</b>	<b>: KESIMPULAN DAN SARAN</b>	81
7.1	Kesimpulan	81
7.2	Saran	82
<b>Daftar Pustaka</b>		83
<b>Lampiran</b>		
1	<i>Information for consent</i>	92
2	Pernyataan Persetujuan Medis	96
3	Kuisisioner	98
4	Teknik Pemeriksaan ELISA Kadar eNOS	100
5	Hasil Analisis Data (SPSS Versi 14.0)	101
6	Foto kegiatan	105
7	Lain – lain	
	• Surat Keterangan Kelaikan Etik	
	• Surat Keterangan Ijin Survei / Penelitian di Lembaga Kesehatan TNI AL Drs.Med. Sastropanoelar, Phys.Rumah Sakit dr.Ramelan Surabaya	
	• Surat Keterangan Ijin Penelitian Laboratorium Patologi Klinik FK Unair/ RS Dr.Soetomo	

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Hiperglikemia sebabkan Patologis DM	14
Gambar 2.2	Insulin – Reseptor Insulin dan IRS	19
Gambar 2.3	Glukosa Metabolisme pada musculoskeletal	20
Gambar 2.4	Reaksi kimia pembentukan NO	27
Gambar 2.5	Regulasi dan Aktivitas eNOS	30
Gambar 2.6	Efek Metformin pada AMPK di Hepar dan Otot	32
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual	48
Gambar 4.1	Kerangka Operasional Penelitian	58
Gambar 5.1	Grafik Rerata Kadar HbA1C Pasien	61
Gambar 5.2	Grafik Rentang Kumulatif Penurunan Kadar GDP	63
Gambar 5.3	Grafik Rentang Kumulatif Penurunan Kadar eNOS	65
Gambar 5.4	Grafik Hasil Pemeriksaan BUN dan Serum Kreatinin	67
Gambar 5.5	Grafik Hasil Pemeriksaan SGOT dan SGPT	70
Gambar 6.1	Potensial Utilitas Glukosa Saat Olah Raga	75

**DAFTAR TABEL**

	Halaman	
Tabel 2.1	Efek Terapeutik OHB	43
Tabel 2.2	Perbedaan <i>multiplace</i> dan <i>monoplace</i>	47
Tabel 4.1	Jadwal Kegiatan	56
Tabel 5.1	<i>Paired t-test</i> untuk GDP	62
Tabel 5.2	<i>Paired t-test</i> untuk eNOS	65
Tabel 5.3	<i>Paired t-test</i> untuk BUN dan Serum Kreatinin	67
Tabel 5.4	<i>Paired t-test</i> untuk SGOT dan SGPT	69

## DAFTAR SINGKATAN

AGEs	<i>advanced glycolation end products</i>
AMPK	<i>adenosine mono phosphate activated protein kinase</i>
Akt	<i>protein kinase B</i>
ATA	<i>atmosphere absolute</i>
ATP	<i>adenosine tri phosphate</i>
BH4	<i>tetra-hydrobiopterin</i>
eNOS	<i>constitutive nitric oxide synthase</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
FAD	<i>flavin adenosine dinucleotide (oxidized)</i>
FADH	<i>flavin adenosine dinucleotide hydrogenase (reduced)</i>
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GTP	<i>guanosine tri phosphate</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia induced factor-1<math>\alpha</math></i>
IL-6	<i>interleukin-6</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrates</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
NAD	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide hydrogenase</i>
NO	<i>nitrogen oksida</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
nNOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
OHB	<i>oxygen hyperbaric</i>
PDE	<i>phosphodiesterase</i>
PI3-K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKB	<i>protein kinase B/Akt</i>
RAGE	<i>receptor of advanced glycolation endproducts</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RUBT	<i>Ruang Udara Bertekanan Tinggi</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1. LATAR BELAKANG

Perkembangan terapi Diabetes Mellitus (DM) melaju pesat dalam dekade ini, karena jumlah penderita DM semakin meningkat setiap tahun, peningkatan prevalensi penderita DM tersebut diperkirakan banyak terdapat di negara berkembang. Pada tahun 2000 terdapat kurang lebih 175 juta penderita DM, jumlah tersebut diperkirakan pada tahun 2010 menjadi 239,5 juta orang dengan 90% dari jumlah penderita DM tersebut berada di usia produktif (Southerland, 2005). Tahun 2025 diperkirakan terdapat peningkatan sekitar 7,5 juta orang menderita DM di seluruh dunia dengan jumlah kematian akibat komplikasi DM Tipe 2 sekitar 3,5 juta/tahun (ADA, 2006). Di Indonesia diperkirakan pada tahun 2010, sekitar 5 juta orang menderita DM Tipe 2 (Supari, 2005).

Salah satu perkembangan dalam terapi oral anti diabetik (OAD) adalah penggunaan Metformin sebagai terapi DM tipe 2 lini pertama (Perkeni, 2007). Penggunaan Metformin bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas reseptor melalui peningkatan kinerja *Insulin Receptor Substrate* (IRS) via aktivasi *cyclic Adenomonophosphat dependent Protein Kinase* (AMPK), Fungsi AMPK untuk mengaktivasi *Glucose Transporters* (GLUT) 1,2,3,4 sehingga terjadi peningkatan *uptake* glukosa di seluruh tubuh terutama pada sel hepar, muskuloskeletal dan adipose.

Pada keadaan normal atau terkompensasi, hiperglikemia dapat menstimulasi rilis spontan Insulin oleh sel  $\beta$  pankreas, yang kemudian berikatan dengan reseptor Insulin. Ikatan IRS menstimulasi Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) sehingga terjadi aktivasi Protein Kinase B (Akt). Pada muskuloskeletal, adipocyte dan pembuluh darah proses aktivasi Akt menstimulasi 2 jalur, yaitu : 1) translokasi GLUT-4 melalui perubahan rasio ATP/AMP dan penurunan *phosphocreatine*, mengaktivasi AMPK. Peran GLUT 4 adalah membawa glukosa masuk dalam sel, sehingga terjadi proses metabolisme glukosa. 2) menstimulasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sehingga kadar *Nitric Oxide* (NO) dalam darah meningkat dan terjadi vasodilatasi. Hasil akhir dari 2 jalur yang distimulasi Akt adalah pendistribusian glukosa ke seluruh tubuh sehingga dapat digunakan oleh seluruh sel. Melalui mekanisme yang berbeda, hiperglikemia mengakibatkan terbentuk senyawa *Advanced Glycation End Products* (AGEs) yang merupakan reaksi nonenzimatik antara karbohidrat dengan lemak dan protein yang teroksidasi (Alikhani, 2005) atau glikosilasi non enzimatis protein melalui reseptor spesifik AGE-reseptor (RAGE), Interaksi AGEs-*Receptor for AGEs/RAGE* mengaktifkan adenilat siklase dan fosforilasi Akt. Fungsi Akt untuk mempengaruhi *cyclic-AMP respons element binding*/CREB. Aktivitas CREB dapat mempengaruhi faktor transkripsi lain seperti NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  yang mengubah fenotipe gen eNOS yang bersifat sitoprotektif. (Mealey, 2006; Smith, 2004). Hiperglikemia meningkatkan rasio ATP/AMP dan menurunkan *phosphocreatine* sehingga terjadi aktivasi AMPK yang mengaktifkan GLUT 1,2,3,4. Aktivasi GLUT menyebabkan glukosa dapat masuk ke dalam sel (Musi et al, 2002). Hiperglikemia kronis, atau keadaan

dekompensasi, dapat menyebabkan tubuh tidak mampu lagi melakukan homeostasis, sehingga interaksi AGEs/RAGE justru menyebabkan inaktivasi AMPK dan GLUT. Selain itu hiperglikemia kronis dapat menyebabkan rilis *reactive oxygen species* (ROS), yang bersifat meningkatkan oksidatif stres, produksi *Nitric Oxide Synthase* (NOS), sebagai mekanisme homeostasis tubuh terhadap stres oksidatif menurun. (Du, 2000; Evans, 2003; Monnier, 2002). Kondisi tersebut di atas dapat meningkatkan mediator proapoptosis terhadap sel  $\beta$  pankreas dan meningkatkan resistensi Insulin secara langsung. Penurunan fungsi sel  $\beta$  pankreas tersebut dapat menyebabkan kemampuan tubuh, untuk melakukan kompensasi terhadap resistensi Insulin menurun. Dari ungkapan di depan diketahui bahwa sangat penting menjaga fungsi sel  $\beta$  untuk mencegah pengurangan jumlah massa sel  $\beta$  di Pankreas pada DM Tipe 2.

Hiperglikemia dan hipoksia mempunyai peran penting terhadap patofisiologi komplikasi diabetes, sebagai akibat respons jaringan yang tidak adekuat terhadap kapasitas oksigen. *Hypoxia Inducable Factor* (HIF)- $1\alpha$  menginduksi beberapa gen di antaranya *endothelial Nitric Oxide* (eNOS) dan beberapa enzim glikolisis (Thornton, 2005).

Alasan Metformin digunakan sebagai OAD lini pertama karena secara alami penderita DM Tipe 2 telah mengalami *decompensated* hiperglikemia kronis, kerusakan sel  $\beta$  pankreas, peningkatan resistensi Insulin sekunder.

Resistensi Insulin dapat terjadi akibat *defect* pada *pre* reseptor, reseptor, dan post reseptor. *Defect pre* reseptor dapat disebabkan oleh gen atau antibodi reseptor. *Defect* reseptor dapat disebabkan oleh jumlah reseptor yang kurang atau

kepekaan reseptor yang menurun. *Defect post reseptor* disebabkan oleh gangguan proses fosforilasi dan Insulin *signaling cascade*. Resistensi Insulin menurunkan *uptake* glukosa pada otot skeletal dan *adipocyte* sehingga keadaan hiperglikemia semakin parah. Mekanisme kerja Metformin tidak tergantung pada fungsi sel  $\beta$  pankreas. Metformin meningkatkan sensitivitas Insulin melalui pengaktifan AMPK yang banyak berada pada hepar dan saluran cerna, serta di muskuloskeletal dan jaringan *adipocyte* bila pemberian Metformin tersebut diimbangi dengan olah raga. Selain itu Metformin juga dapat mengaktifkan *endothelium Nitric Oxide Synthase* (eNOS) melalui aktivasi fosforilasi AMPK di pembuluh darah serta peningkatan ATP dan penurunan konsentrasi fosfokreatin di muskuloskeletal (Musi et al, 2002). Harapan dari pemberian Metformin sebagai anti diabetik oral adalah untuk menurunkan keadaan hiperglikemia dan mencegah komplikasi mikrovaskular.

Problem yang muncul pada monoterapi Metformin adalah peningkatan insiden kegagalannya dalam dekade terakhir ini. Di Inggris, insidennya mencapai 21% dari 4360 responden penelitian kohort lima tahun (Kahn et al, 2006). Hal ini terjadi karena kemampuan Metformin untuk memperbaiki sensitivitas reseptor Insulin terbatas hanya pada perbaikan *defect post reseptor* Insulin.

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi bertambah buruknya kondisi penderita DM tipe 2 yang mengalami kegagalan monoterapi Metformin dengan mengkombinasi Metformin dengan oral antidiabetik lainnya seperti Glibenclamide (golongan Sulfonylurea) yang bersifat meningkatkan sekresi Insulin, selain itu juga diberikan bersama Rosiglitazone (golongan

Thiazolidinediones), maupun dengan analog Insulin. Namun hasil dari kombinasi tersebut tidak dapat memperbaiki fungsi sel  $\beta$  dan hormon, sehingga meskipun telah mengkonsumsi anti diabetik secara rutin, progresivitas komplikasi pada DM Tipe 2 sulit dihindari.

Fenomena tersebut membuat peneliti tertarik untuk melakukan penelitian, terutama untuk mencari upaya mengoptimalkan terapi Metformin sebagai monoterapi pada penderita DM Tipe 2 sehingga mampu membuat keadaan 'normoglikemia', mencegah terjadi komplikasi, terutama komplikasi mikrovaskular, dan mencegah atau menghambat progresivitas kerusakan massa sel  $\beta$ . Terapi kombinasi Metformin tersebut sebaiknya mudah dilakukan dan aman dengan efek samping serta efek interaksi obat minimal.

Salah satu terapi kombinasi tersebut adalah terapi oksigen hiperbarik (OHB), yang pada beberapa penelitian terdahulu telah diduga dapat mengurangi faktor – faktor yang dapat memperparah penurunan fungsi sel  $\beta$  pankreas pada penderita dengan DM Tipe 2. Terapi OHB (oxygen hyperbaric therapy, HBOT) adalah terapi oksigen murni 100% dengan tekanan lebih dari 1 atmosfer absolut (ATA). Terapi OHB dapat 1) meningkatkan oksigenasi pada hemoglobin sehingga ATP tingkat sel dapat meningkat, hal ini berguna untuk meningkatkan respons reseptor Insulin, selain itu, pada sel muskuloskeletal dan adipose, peningkatan ATP ini dapat meningkatkan stimulasi pada AMPK yang kemudian mengaktivasi GLUT-4 sehingga glukosa dapat masuk ke dalam sel (Epstein, 1999), 2) berfungsi menghambat interleukotrin  $\beta_2$  (Thorn, 1993), 3) mempunyai efek supresi terhadap mediator inflamasi dan sitokin pro-inflamasi pada DM Tipe

2 seperti IL-6, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  yang bersifat proapoptosis sel  $\beta$  pankreas (Cvetkovic, 2002; Graves, 2003; Dean, 2004), 4). menghambat rilis berlebih stres oksidatif (ROS, peroksid-NO, DAG) yang terjadi akibat hiperglikemia kronis dan mempercepat penyembuhan luka gangren yang merupakan salah satu komplikasi kronis diabetes mellitus (Brummelkamp, 1961).

Tekanan hiperbarik untuk terapi antara 2–2,5 ATA dengan waktu minimum 90 menit setiap kali terapi tidak menunjukkan toksisitas terhadap jaringan (Delaney, 2001; Bakker, 2002). Pemberian terapi OHB dilakukan selama 3x30 menit dengan interval waktu 5 menit menghirup udara lingkungan bertujuan untuk menghindari terjadi toksisitas, selama 10 hari berturut – turut. Frekuensi pemberian terapi OHB 10 hari merupakan pilihan yang menunjukkan efek hiperoksia paling optimal untuk inflamasi kronis / DM Tipe 2 (Bruchman, 2001; Conconi, 2003).

Berdasarkan uraian tersebut di depan, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek kombinasi terapi Metformin dan OHB terhadap kadar eNOS serum sebagai indikator perbaikan mikrovaskular, sehingga di masa yang mendatang terapi OHB dapat digunakan sebagai terapi *adjuvant* pada penderita dengan DM Tipe 2.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

- 1 “Bagaimana pengaruh terapi kombinasi Metformin–Oksigen Hiperbarik (OHB) terhadap peningkatan kadar eNOS di pembuluh darah perifer penderita DM Tipe 2?”
- 2 “Bagaimana pengaruh terapi kombinasi Metformin – Oksigen Hiperbarik (OHB) terhadap penurunan kadar glukosa darah penderita DM Tipe 2?”

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

### 1.3.1 Tujuan Umum :

Menjelaskan peran terapi OHB dalam upaya mengoptimalkan monoterapi Metformin pada penderita DM Tipe 2.

### 1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Mengetahui pengaruh kombinasi terapi kombinasi Metformin – OHB terhadap peningkatan kadar eNOS di pembuluh darah tepi penderita DM Tipe2
2. Mengetahui pengaruh terapi kombinasi Metformin – OHB terhadap penurunan kadar glukosa darah penderita DM Tipe2

## 1.4 MANFAAT PENELITIAN

### 1.4.1 Teoritis :

1. Mendukung teori yang sudah ada tentang peran terapi OHB sebagai terapi *adjuvant* penderita DM tipe 2
2. Memberikan informasi ilmiah tentang peran terapi OHB dalam upaya mengoptimalkan efek monoterapi Metformin penderita DM Tipe 2
3. Memberikan informasi mengenai perkembangan mekanisme molekuler proses perbaikan fungsi endotel pada penderita DM Tipe 2

### 1.4.2 Praktis :

1. Kontribusi dasar ilmiah dalam pengembangan penatalaksanaan dan pengobatan DM Tipe 2
2. Menjelaskan peran terapi OHB 2.4 ATA sebagai terapi *adjuvant* untuk mengoptimalkan terapi Metformin
3. Mengetahui salah satu upaya untuk mencegah serta menurunkan morbiditas akibat komplikasi mikroangiopati



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Mellitus

##### 2.1.1 Batasan Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) merupakan kelainan di bidang endokrin, yaitu kelainan metabolisme karbohidrat, yang mengakibatkan tubuh tidak mampu secara otomatis mengendalikan kadar glukosa darah. Hal tersebut disebabkan tubuh tidak mampu memproduksi Insulin dalam jumlah yang cukup atau Insulin yang diproduksi tubuh tidak dikenali oleh reseptor Insulin (resistensi Insulin). Tanda DM adalah hiperglikemia kronis dan glukosuria (Golan, 2008).

Kadar glukosa normal dapat bervariasi, berbeda antara sebelum dan sesudah makan pada berbagai waktu. Definisi glukosa darah puasa normal berkisar antara 80 sampai 120 mg/dl, sedangkan untuk glukosa darah acak/ 2 jam post prandial adalah kurang dari 200 mg/dl. Manusia dengan kadar glukosa darah  $\geq 126$  mg/dl pada umumnya dinyatakan hiperglikemia, sedangkan  $< 70$  mg/dl disebut hipoglikemia (Powers, 2001; Monnier, 2006). Kondisi hiperglikemia kronis dapat diukur dengan HbA1C (Brandner, 2008). Hiperglikemia pada penderita DM berarti peningkatan kadar glukosa dalam darah yang berlangsung kronis. Keadaan Hiperglikemia kronis mengakibatkan berbagai komplikasi (Pais, 2007).

Gejala hiperglikemia ditandai dengan poliphagia, polidipsia, poliuria, penglihatan kabur, penurunan berat badan, mulut kering, kulit kering, impotensi

(pada laki-laki), infeksi yang berulang seperti kandidiasis vagina, infeksi telinga, infeksi organ lain, stupor dan koma. Terapi hiperglikemia membutuhkan eliminasi faktor penyebab, apabila penyebabnya adalah DM maka terapi DM untuk mengatasi hiperglikemia (Nishikawa, 2007).

Klasifikasi DM sesuai *American Diabetes Association* (ADA) 1997 dan Perhimpunan Endokrinologi Indonesia (PERKENI) 1999.

1. Diabetes Mellitus tipe 1 (autoimun dan idiopati)
2. Diabetes Mellitus tipe 2
3. Diabetes Mellitus tipe lain :
  - A. Defek genetik fungsi sel beta
    - a. *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY)
    - b. DNA mitokondria
  - B. Defek genetik kerja Insulin
  - C. Penyakit eksokrin pankreas
    - a. pankreatitis
    - b. tumor/pankreatektomi
    - c. pankreatopati fibrokalkulus
  - D. Endokrinopati
    - a. Akromegali
    - b. Sindroma Cushing
    - c. Feokromositoma
    - d. Hipertiroidisme

#### E. Obat dan zat kimia

- a. Asam nikotinat
- b. Glukokortikoid
- c. Tiazid
- d. Dilantin
- e. Hormon tiroid
- f. Interferon Alfa

#### 2.1.2 Kerusakan molekuler akibat hiperglikemia pada pasien DM

Hiperglikemia menyebabkan beberapa perubahan dan kerusakan molekuler pada sel endotel, perubahan metabolisme yang reversibel dan irreversibel dan peningkatan stres oksidatif (Jacus V, 200; Evans, 2003). Fungsi sel endotel di antaranya mengatur migrasi larutan, makromolekul dan sel-sel darah mengikuti alur dinding pembuluh darah. Fungsi sebagai transduktor pada permukaan sel dan sebagai barier antara darah dan intersisial sangat bergantung pada integritas struktur lapisan endotel yang mampu beradaptasi terhadap kondisi hemodinamik dan paparan oksidan. Endotel mampu merespons jejas dengan suatu mekanisme penyembuhan yang spesifik termasuk angiogenesis dan reendotelialisasi (Foncea, 2002).

Ketidakseimbangan regulasi fungsi vaskular menimbulkan terjadi gangguan atau disfungsi endotel (Lum, 2001; Gyurko, 2006). Paparan secara terus menerus seperti gangguan aliran darah, tekanan darah dan distensi pembuluh

darah menyebabkan endotel menerima berbagai sinyal kimia dari darah dan jaringan sehingga dapat terjadi angiopati (Foncea R, 2002).

Efek hiperglikemia terhadap metabolisme dapat bersifat reversibel. Metabolisme glukosa di dalam sel terdapat berbagai jalur, pada jalur glukogenesis terjadi pembentukan glikogen dari glikosa melalui glukosa-1-fosfat. Oleh  $O_2$ , maka Glukosa dan glikogen dapat dioksidasi menjadi  $H_2O$  dan  $CO_2$ . Glukosa dibentuk menjadi glukosa-6-fosfat dengan bantuan 1 molekul ATP yang kemudian masuk ke jalur glikolisis di sitoplasma, kemudian diubah menjadi fruktosa-1,6-bifosfat yang terjadi secara anaerob, Glukosa diubah menjadi piruvat yang menghasilkan 4 ATP dan kehilangan 2 molekul ATP. Oksidasi yang sempurna secara aerob yang terjadi melalui jalur siklus krebs di mitokondria menghasilkan 36 molekul ATP (Murray, 2006). Metabolisme Glukosa dapat menimbulkan pengaruh langsung pada berbagai jalur sinyal, seperti perubahan pada metabolisme sorbitol intraseluler, peningkatan sintesis *de-novo* diacylglycerol (DAG), DAG mendapat rangsangan yang kemudian meningkatkan sintesis dan aktivasi protein kinase C (PKC), penurunan kadar  $Na^+ K^+$  ATP ase (Foncea, 2002; Monnier et al, 2006).

Peningkatan kadar glukosa di dalam sel dapat menyebabkan akumulasi glukosa di dalam jaringan. Hal ini dapat menimbulkan aktivitas jalur glikolisis meningkat berlebihan, sehingga jaringan mengaktifkan jalur sorbitol. Glukosa di dalam sel diubah menjadi sorbitol oleh enzim aldose reduktase. Aktivasi jalur sorbitol menimbulkan akumulasi sorbitol di dalam sel sehingga dapat menimbulkan kerusakan endotel, sebab terjadi perubahan tekanan osmotik akibat



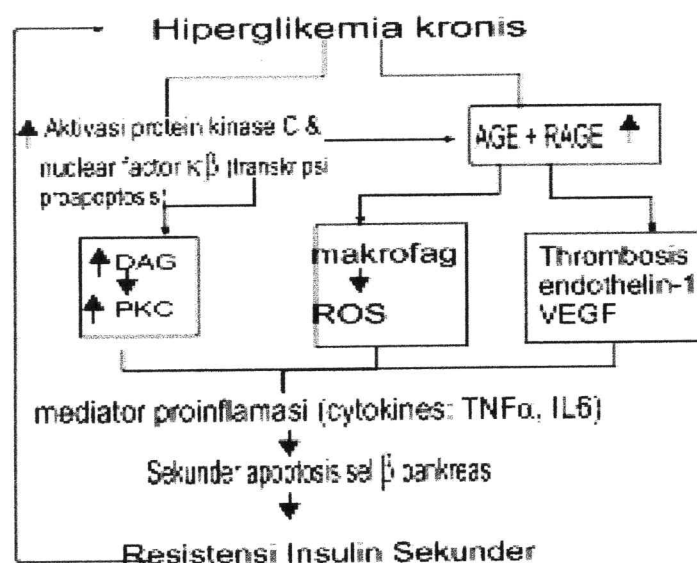
sorbitol sukar berdifusi ke luar sel sehingga terjadi pembengkakan dan kerusakan endotel (Steven et al, 2000).

Hiperglikemia mengaktifkan sebagian besar jalur biokimia yang berperan penting terhadap terjadi komplikasi DM di antaranya (1). Memicu aktivitas jalur poliol, menyebabkan akumulasi sorbitol dan fruktosa; (2). Meningkatkan pembentukan AGEs yaitu glikosilasi non enzimatis protein melalui reseptor spesifik AGE-reseptor (RAGE); (3). Aktivasi protein kinase C dan *nuclear factor*  $\kappa\beta$ ; (4). Meningkatkan jalur hexosamine (Du, 2000; Evans, 2003; Monnier, 2006).

Hiperglikemia menyebabkan lemak dan protein dapat mengalami glikosilasi secara nonenzimatis membentuk basa Schiff, kemudian membentuk *Amadori products*. Degradasi *Amadori products* menghasilkan senyawa karbonil yang reaktif. Senyawa ini bereaksi dengan gugus asam amino bebas sehingga membentuk AGEs yang bersifat permanen. AGEs berikatan dengan RAGE yang dapat membentuk senyawa radikal bebas yang reaktif (Lalla, 2000; Wautier, 2004).

Hasil riset terdahulu menyatakan bahwa pada keadaan hiperglikemia kronis dapat menyebabkan aktivasi jalur sinyal seperti *transcription factor*  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) dan *NH2-terminal Jun Kinases* (JNK/SAPK) yang berperan penting pada sebagian besar etiologi DMT1 dan DMT2 (Evans, 2002).

Sebagian besar penelitian yang dilakukan pada jalur intraseluler pada hiperglikemia, ROS dan stres oksidatif adalah faktor transkripsi NF- $\kappa$ B (Benson et al, 2003; Evans et al, 2003). NF- $\kappa$ B berperan penting pada respons imun, inflamasi dan apoptosis. NF- $\kappa$ B mengatur ekspresi sejumlah besar gen termasuk beberapa yang berkaitan dengan komplikasi DM seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), RAGE dan gen yang diregulasi oleh NF- $\kappa$ B yang sebagian besar mengaktifkan NF- $\kappa$ B kembali. Regulasi yang menyimpang dari NF- $\kappa$ B dikaitkan dengan penyakit kronis termasuk diabetes dan aterosklerosis. Aktivasi NF- $\kappa$ B melibatkan induksi fosforilasi, degradasi sub unit inhibitori melalui proteosome, inhibitory protein  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). I $\kappa$ B difosforilasi oleh serin kinase, I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (I $\kappa$ B  $\beta$ ) diaktifkan oleh serin kinase (Lee, 2005).



**Gambar 2.1 : Hiperglikemia dapat menyebabkan patofisiologis DM melalui jalur ROS dan pengaktifan berbagai jalur oksidatif**

Sumber : Lee, 2005

Gambar 2.1 menunjukkan bahwa NF-  $\kappa$ B berperan penting pada respons imun, inflamasi dan apoptosis. Hiperglikemia mengakibatkan peningkatan stres oksidatif melalui aktivasi NF-  $\kappa$ B dan PKC-*activated*.

### **2.1.3 Stres oksidatif akibat hiperglikemia pada pasien DM**

#### **2.1.3.1 *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan Radikal Bebas**

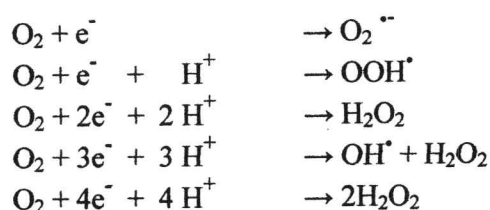
Pembentuk ROS dapat terjadi baik pada kondisi fisiologis maupun kondisi patologis. Bentuk ROS patologis adalah radikal hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ), alkosil ( $\text{RO}^\cdot$ ), radikal peroksil ( $\text{ROO}^\cdot$ ), ion superoksida ( $\text{O}_2^\cdot$ ) dan yang terbentuk non radikal yaitu singlet oksigen, hidroksi peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan ion hipoklorit ( $\text{HOCl}$ ).

Pada kondisi fisiologik, ROS dihasilkan secara terus menerus dan dapat dieliminir oleh antioksidan intra dan ekstrasel (Jakus, 2000). ROS dapat juga berfungsi sebagai molekul sinyal yang menstimulasi berbagai aktivitas seluler seperti sekresi sitokin dan proliferasi sel. Produksi ROS yang berlebihan menimbulkan kerusakan makromolekul seluler seperti DNA, protein dan lipid serta molekul kecil antioksidan, sedangkan ROS yang bersifat radikal lebih berbahaya, hal ini disebabkan sifat radikal bebas yang mempunyai reaktivitas yang tinggi dan mempunyai kecenderungan membentuk radikal bebas baru (Nindl, 2004).

Sekitar 90% oksigen yang diperoleh dari pernafasan oleh mamalia di dalam mitokondria digunakan untuk pembentukan ATP. Produksi ATP merupakan hasil

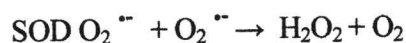
oksidasi dari bahan makanan dan melepaskan elektron yang diterima oleh *carrier* elektron seperti  $\text{NAD}^+$ , FMN, FAD yang kemudian mengalami reduksi menjadi  $\text{NADH}$ ,  $\text{FMNH}_2$ ,  $\text{FADH}_2$ .

Di dalam mitokondria, bentuk reduksi NAD dan flavin direoksidasi lagi oleh oksigen sehingga membentuk sejumlah besar ATP. Molekul oksigen direduksi menjadi  $\text{H}_2\text{O}$ , proses reduksi tersebut memerlukan pengalihan 4 elektron yang terjadi dalam 4 tahap. Setiap tahap hanya menerima satu elektron. Pembentukannya sebagai berikut (Halliwell and Gutteridge, 1999; Droge, 2002; Nindl, 2004) :



Bila pengalihan elektron tersebut tidak terjadi secara sempurna, maka dapat terbentuk senyawa oksigen reaktif, yaitu ion superoksida, radikal peroksil, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Halliwell and Gutteridge, 1999; Droge, 2002; Nindl, 2004).

Ion superoksida sebagian besar didapatkan dari reaksi reduksi oksidasi atau peristiwa perpindahan elektron di mitokondria dan hidroksilasi di endoplasmik retikulum dan reaksi yang dikatalisis enzim xantin oksidase (Droge, 2002). Ion superoksida merupakan radikal bebas yang dapat mengalami otooksidasi dengan katalisis enzim superoksida dismutase, menghasilkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan  $\text{O}_2$ .





$H_2O_2$  merupakan ROS yang relatif stabil dengan difusi biologis yang sama seperti  $H_2O$ . Selain dibentuk dari superoksid,  $H_2O_2$  dapat secara langsung dibentuk dari reduksi dua elektron  $O_2$  oleh enzim oksidase.

Dalam kondisi normal dampak negatif ROS dapat diredam oleh senyawa antioksidan seperti glutathion peroksidase, superoksid dismutase, katalase, vitamin C dan vitamin E. Senyawa antioksidan mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif dan memutuskan reaksi berantai terhadap pembentukan radikal hidroksil yang merupakan senyawa yang paling berbahaya (Hallwell and Gutteridge, 1999; Droge, 2002).

Apabila terjadi ketidakseimbangan antara senyawa ROS dan senyawa antioksidan maka timbul stres oksidatif yang dapat mengakibatkan terjadi kerusakan dinding sel, DNA dan protein. Stres oksidatif yang timbul akibat hiperglikemia kronis menimbulkan patogenesis DM sendiri. Akumulasi glukosa meningkatkan potensial transmembran mitokondria yang dapat menghasilkan peningkatan sintesis superoksid (Gyurko, 2006). Hiperglikemia juga meningkatkan stres oksidatif melalui aktivasi *PKC-dependent* / PKC dengan NAD(P)H oksidase.

## 2.2 Patogenesis Diabetes Mellitus Tipe 2 (DM Tipe2)

DM tipe 2 merupakan kelainan metabolik akibat kelainan sekresi Insulin oleh sel  $\beta$  pankreas dan atau resistensi Insulin. Resistensi Insulin berarti ketidakmampuan Insulin memberi efek biologis yang normal pada kadar glukosa

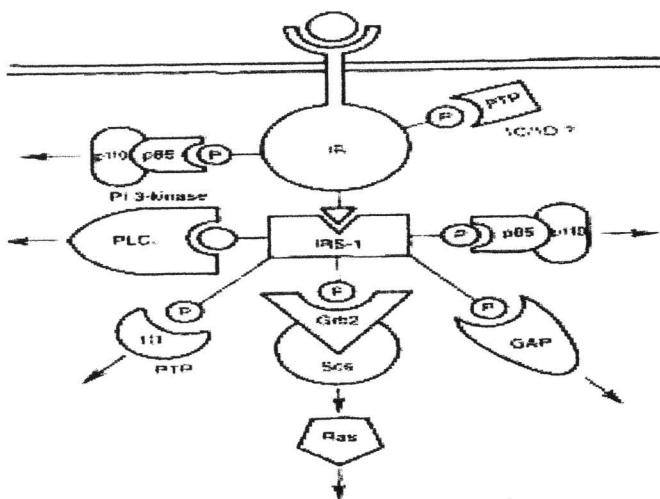
darah tertentu, sehingga dibutuhkan kadar Insulin yang lebih banyak agar tubuh mampu melakukan homeostasis agar glukosa darah menjadi normal.

Resistensi Insulin terjadi melalui tiga mekanisme *defect*, yaitu : 1) *Defect pre* reseptor dapat disebabkan oleh gen atau antibodi reseptor, 2) *Defect* reseptor dapat disebabkan oleh jumlah reseptor yang kurang atau kepekaan reseptor yang menurun. Penurunan jumlah reseptor Insulin, yang berkaitan dengan mutasi gen *HNF 1 $\alpha$* , gen *HNF 4 $\alpha$* , dan gen *HNF 1 $\beta$* , serta 3) *defect post* reseptor disebabkan oleh gangguan proses fosforilasi, perubahan faktor transkripsi seperti NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  (Mealey, 2006; Smith, 2004). NF- $\kappa$ B mengatur ekspresi sejumlah besar gen termasuk beberapa yang berkaitan dengan komplikasi diabetes seperti aktivasi Protein Kinase C (PKC) yang menyebabkan resistensi Insulin dan inaktivasi GLUT 4 di muskuloskeletal dan *adipocytes*, melalui mekanisme yang belum diketahui (Evans, 2002). Hasil akhir dari mekanisme *defect* tersebut adalah keadaan *glucotoxicity* yang disebabkan oleh hiperglikemia kronis yang meningkatkan proses glikogenolisis dan glukoneogenesis di hepar.

### **2.2.1 Insulin, Reseptor Insulin dan *Glucose Transporter***

Insulin merupakan 51 – asam amino, yang diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas akibat dari rangsangan metabolisme glukosa yang dapat meningkatkan ratio ATP/AMP. Glukosa darah dapat masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas melalui membran transporter. Target organ Insulin adalah jaringan yang terdapat reseptor Insulin.

Reseptor Insulin merupakan glikoprotein yang mempunyai 4 sisi yang terdiri dari 2 subunit  $\alpha$  dan 2 subunit  $\beta$  ekstrasel. Ikatan Insulin dan reseptor Insulin dapat mengaktifkan intrasel tirosin kinase yang dapat menjadi IRS.



**Gambar 2.2 : Insulin – Reseptor Insulin dan IRS**

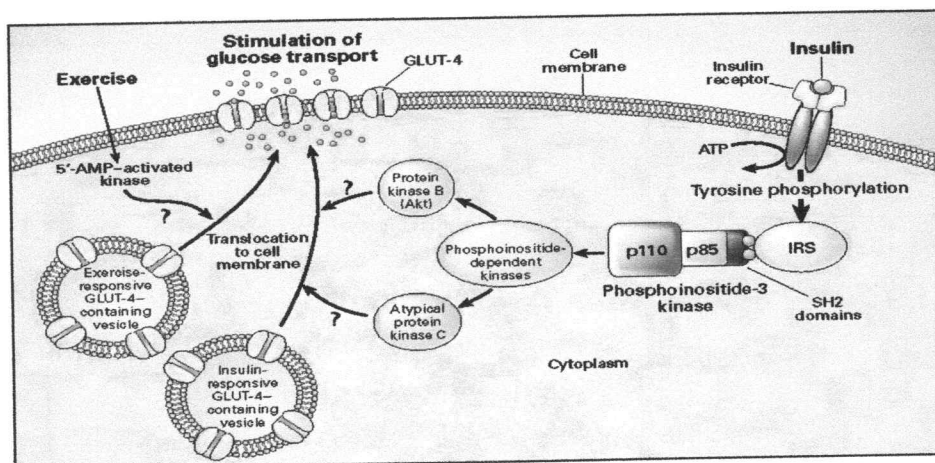
Sumber : Epstein, 1999

Pada keadaan normal, Insulin dihasilkan oleh sel  $\beta$  pankreas secara spontan saat glukosa darah meningkat. Prosesnya sebagai berikut : fase 1 (*early phase*) terjadi sekresi Insulin dalam 3 – 30 menit pertama setelah makan. Insulin yang disekresi pada fase ini merupakan Insulin yang disimpan dalam sel  $\beta$  pankreas (siap pakai), fase 1 bertujuan untuk mencegah peningkatan kadar glukosa darah berlebih. Fase 2 (*late phase*) sekresi Insulin terjadi 20 menit setelah stimulasi glukosa, fase 2 bertujuan untuk meningkatkan produksi Insulin (adaptasi). Namun kemampuan adaptasi ini hanya terbatas pada kadar glukosa darah dalam batas normal.

Pada keadaan hiperglikemia kronis akibat DM tipe 2, sekresi Insulin di fase 1 tidak dapat menurunkan kadar glukosa darah karena terjadi gangguan pada *post* reseptor sehingga merangsang fase 2 untuk menghasilkan Insulin lebih banyak, namun peningkatan Insulin tidak mampu mengatasi keadaan hiperglikemia yang terjadi.

Pada muskuloskeletal dan adipose, IRS (terutama IRS-1) menstimulasi translokasi GLUT melalui perubahan rasio ATP/AMP dan penurunan *phosphocreatine*, mengaktifasi AMPK. Ikatan ini dapat mengaktifkan tirosin kinase fosforilase termasuk pengaktifan phosphoinositide-3 (PI3) kinase. Interaksi dan modulasi IRS dengan signal molekul lain menyebabkan *up-regulation* sensitivitas Insulin.

Peran GLUT 1,2,3,4,5 adalah sebagai enzim penting pada metabolisme karbohidrat, terutama GLUT-4 yang bertugas membawa karbohidrat masuk ke dalam sel otot skeletal dan *adipocyte*.



**Gambar 2.3 : Glukosa Metabolisme pada muskuloskeletal dan *Adipocyte***  
Sumber : Epstein, 1999

### 2.3 *Cyclic-Adenosin Monophosphate (c-AMP), Protein Kinase, Phospho Inositol-3 (PI3) kinase/Akt Pathways*

Fungsi faktor transkripsi dapat dimodulasi oleh jalur sinyal transduksi spesifik yang diaktifkan oleh berbagai macam sinyal pada permukaan membran sel. Terdapat dua sistem sinyal transduksi utama yaitu c-AMP dan DAG sebagai *second messenger*. Kedua jalur tersebut mempunyai karakter khusus yaitu protein kinase spesifik (protein kinase A dan protein kinase C) yang merupakan target *DNA control element, c-AMP respons element (CRE)*. c-AMP atau 3'-5'-*cyclic adenosine monophosphate* merupakan molekul yang berperan penting pada berbagai proses biologi, merupakan derivat ATP (Chong, 2005).

PI3 kinase memegang peran penting pada kemampuan metabolik dan mitogenik Insulin. Aktivasi Akt menyebabkan fosforilasi dan regulasi GLUT4 dan Protein Kinase. PI3 kinase *blocker* menghambat translokasi GLUT4 di permukaan sel dan menghambat *uptake* glukosa ke dalam sel (Zhang, 2008).

#### 2.3.1 Fungsi c-AMP

c-AMP berpengaruh terhadap kontraksi otot polos, c-AMP juga berperan sebagai *second messenger* yang digunakan dalam sinyal transduksi intraselular pada saraf, kelenjar, kardiovaskuler, dan sistem imun. AMP dan ATP berperan pada efek biologi terhadap fungsi seluler yang dihubungkan dengan proses fisiologi dan patologi termasuk apoptosis, iskemia, hipoksia dan penyembuhan luka (Hashikawa, 2003).

### 2.3.2 Sintesis dan Dekomposisi c-AMP

c-AMP intraseluler disintesis dari ATP oleh enzim adenilat siklase yang terdapat di membran sel. Enzim adenilat siklase dimodulasi oleh berbagai macam stimuli melalui reseptor spesifik dan interaksinya dengan protein G. Pengikatan ligand spesifik pada reseptor menghasilkan aktivasi atau inhibisi jalur *c-AMP activated* yang mempengaruhi regulasi transkripsi berbagai gen melalui respons tempat promoter tertentu (Baenerle, 1999). Aktivasi cAMP oleh hormon glukagon, adrenalin, dan protein-G. Dekomposisi c-AMP oleh enzim phosphodiesterase.

Sejumlah hormon diketahui mengaktifkan c-AMP melalui aktivasi enzim adenilat siklase yang mengubah ATP menjadi AMP. Rasio AMP:ATP menginduksi aktivasi AMPK yang kemudian menyebabkan *cascade* protein kinase yang menghasilkan suatu sistem yang sensitif. Peran AMPK diatur oleh stres seluler, seperti *hypoxia*, *glucose deprivation*, *ischemia*, yang dikaitkan dengan produksi ATP. Aktivasi ini juga dilakukan oleh *Gq-coupled receptors*, *Leptin* dan *Adenopectin*, melalui mekanisme yang masih belum jelas. Sekali diaktivasi, sistem akan diubah pada jalur katabolisme yang menghasilkan ATP, sedangkan apabila terjadi perubahan proses ATP dan jumlah ATP tidak mencukupi maka dapat mengganggu kehidupan sel seperti sintesis lipid, karbohidrat, dan protein (Hardie, 2003; Hashikawa, 2003).

### 2.3.3 Adeno Monophosphat Activated Protein Kinase (AMPK)

AMPK merupakan enzim *heterotrimeric* yang mengkomposisi satu subunit *catalytic* ( $\alpha$ ) dan dua subunit *regulatory* ( $\beta$  dan  $\gamma$ ). Subunit AMPK $\alpha$  terdiri dari dua isoform, yaitu  $\alpha 1$  yang tersebar di seluruh tubuh dan  $\alpha 2$ , terutama tereksresi pada muskuloskeletal, jantung dan hepar. Pengaktifan AMPK terjadi saat 1) Ikatan Insulin dan Insulin Reseptor (IRS), 2) penurunan rasio ATP/AMP dan *Phosphocreatine* (PCr). Hasil akhir dari peningkatan aktivitas AMPK adalah terutama peningkatan *uptake* glukosa di musculoskeletal dan sensitivitas Insulin, selain itu juga meningkatkan oksidasi asam lemak di otot dan lemak, menghambat produksi *hepatic glucose*, sintesis Kolesterol dan Trigliserida serta lipogenesis (Musi et al, 2002).

Metformin meningkatkan aktivitas AMPK. Efek aktivasi AMPK oleh Metformin di hepar menurunkan *hepatic glucose production*, sedangkan di muskuloskeletal dan *adipocyte* meningkatkan translokasi GLUT4. Di sisi lain, AMPK mengaktifkan aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) dan *Insulin-responsive tissues* (Zhang, 2008). Efek metabolik AMPK optimal setelah sekitar 10 minggu terapi Metformin. Pada keadaan hiperglikemia kronis dan resistensi Insulin, akibat *defect* dari Insulin *signaling cascade* atau DM Tipe 2, AMPK gagal teraktivasi. Hal ini merupakan salah satu penyebab kegagalan monoterapi Metformin sebagai terapi DMT2.

## 2.4 Nitric oxide synthase (NOS)

*Nitric Oxide Synthase (NOS)* adalah enzim di dalam tubuh yang berperan pada proses transmisi saraf, sistem imun dan vasodilatasi. NOS mengkatalisis asam amino L-arginin dengan NADPH dan O<sub>2</sub> menghasilkan *Nitric Oxide (NO)* dan *L-citrulline*. NO merupakan molekul *messenger* yang dapat berperan dalam fungsi fisiologis maupun patologis di dalam tubuh (Kendall, 2000). Sebagai enzim, NOS berikatan dengan *flavin adenine dinucleotide (FAD)*, *flavin mononucleotide (FMN)*, heme, *tetrahydrobiopterin (BH4)* dan Kalmodulin (Alderton, 2001; Pacher, 2007).

NO dan *reactive oxygen species (ROS)* menunjukkan efek modulasi yang multiple terhadap inflamasi, berperan penting pada regulasi sistem imun, mempengaruhi setiap tahap perkembangan inflamasi. Pada kadar yang rendah NO dihasilkan secara kondusif dan NOS menghambat ekspresi molekul adesi, sitokin, sintesis kimokin, adesi leukosit dan transmigrasi leukosit. Pada kadar yang tinggi, NO yang dihasilkan dapat bersifat toksik dan proinflamatori. Aktivitas NO tidak saja dipengaruhi oleh enzim namun juga kadar NO di dalam sel (Guzik, 2003).

Diabetes dan keadaan hiperglikemia kronis yang disebabkan diabetes meningkatkan stres oksidatif dan nitrosatif, hal tersebut terkait erat pada komplikasi kardiovaskular melalui mekanisme disfungsi eNOS (Pacher, 2007).

### 2.4.1 Macam NOS

*Neural NOS (nNOS)* menghasilkan NO yang diekspresikan pada jaringan saraf, baik pada sistem saraf pusat dan perifer, tetapi juga terdapat di sel lain



seperti pada muskuloskeletal (Lahti, 2004), nNOS juga berperan pada komunikasi sel dan dihubungkan dengan membran plasma.

*Endothelial NOS (eNOS)*, dikenal juga sebagai *nitric oxide synthase 3 (NOS3) constitutive NOS (cNOS)*, menghasilkan NO di pembuluh darah dan terlibat dalam regulasi fungsi pembuluh darah, merupakan *constitutive Ca<sup>2+</sup> dependent NOS*.

*Inducible NOS (iNOS)* dapat ditemukan pada berbagai kondisi akibat induksi atau jejas seperti pada peradangan, dapat sebagai stres oksidatif NO (radikal bebas) yang digunakan oleh makrofag dalam sistem imun untuk melawan patogen (Thorm, 2002 ; Lappin, 2003). iNOS selalu terikat pada Kalmodulin. Transkripsi gen iNOS diatur oleh : (1). Inducer positif (IFN), TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, antigen (dari gram negatif dan positif). (2). Sitokin inhibitor termasuk TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, dan *macrophage deactivating factor (MDF)* (Billack, 2006).

Mitokondria NOS (mNOS), merupakan enzim iNOS yang terletak di dalam mitokondria. Enzim ini tergantung kalsium dan berkaitan dengan bioenergetika di dalam mitokondria. Stimulasi mNOS di mitokondria yang berkaitan dengan ion kalsium, menyebabkan mitokondria bersifat asam dan mengakibatkan penurunan membran potensial (Hanssen KF, 2000)

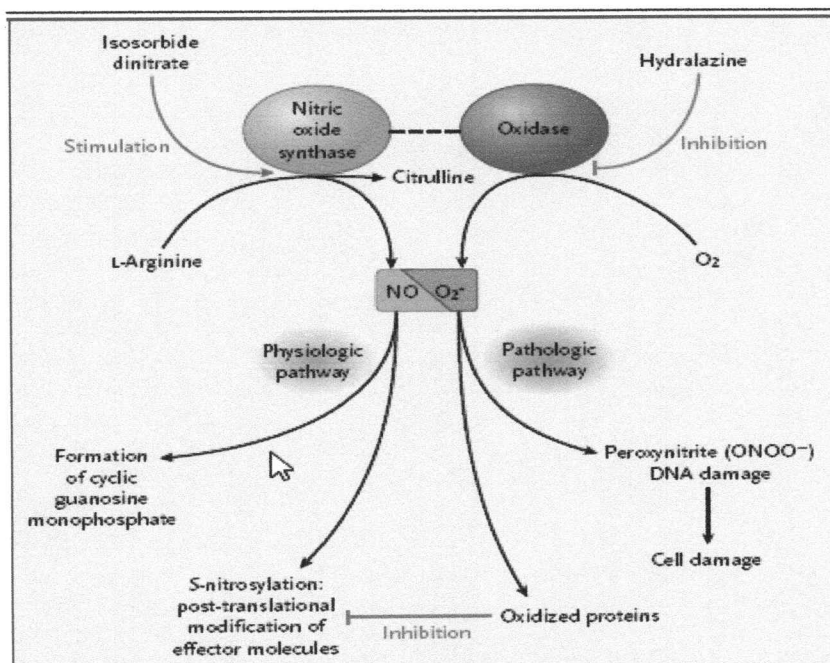
Peran NO di dalam mitokondria adalah NO menghambat sitokrom C oksidase dengan mengikat gugus heme dan mengakibatkan peningkatan superoksida di rantai respirasi mitokondria. Superoksid dapat bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrat, ikatan ini dapat menghambat rantai respirasi pada kompleks I, III, dan IV, dan aktivitasnya pada *iron sulfur centers*. Hambatan cis-

aconitase menghambat metabolisme asetil-KoA menjadi CO<sub>2</sub>, yang merupakan langkah penting untuk menghasilkan *nicotinamide-adenine dinucleotide* (NADH) yang diperlukan untuk reaksi fosforilasi oksidatif. Hal tersebut dapat merusak kemampuan sel untuk dapat mempertahankan simpanan ATP (Hermans, 2007).

#### 2.4.2 Mekanisme sintesis eNOS

eNOS disintesis dari L-arginine oleh NO *synthase* yang diprogram oleh gen eNOS yang terdapat pada kromosom 7q36. Setelah *release*, NO yang dihasilkan eNOS berdifusi secara cepat dalam membran sel dan menyebabkan relaksasi otot polos vaskular melalui pengaruh terhadap produksi *cyclic guanine 3'5'-monophosphate* (cGMP). cGMP mengaktifkan protein kinase G family, memicu respons *cascade* transkripsi and translasi mRNA. Peningkatan cGMP memperbaiki regulasi beberapa fungsi fisiologi tubuh, termasuk relaksasi otot polos. Hambatan produksi NO menyebabkan disfungsi endothelial, yang dapat berkontribusi pada kejadian resistensi Insulin pasien DM Tipe 2, gagal ginjal kronis dan komplikasi kardiovaskular seperti hipertensi (Thameem et al, 2008). Saat ini, sangat diperlukan terapi untuk memperbaiki aktivitas eNOS, salah satunya dengan menggunakan terapi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu terapi kombinasi Metformin dan OHB.

eNOS mensintesis NO dengan cara mengoksidasi L-Arginine menjadi L-sitrulin melalui reaksi monooksigenasi, reaksi ini memformasikan *cyclic guanosine monophosphate*. NADPH digunakan untuk pembentukan satu molekul NO.



**Gambar 2.4 : Reaksi kimia pembentukan NO**

Sumber : Thum et al, 2007

### 2.4.3 Struktur NOS

Semua bentuk isoform NOS mempunyai domain *carboxyl-terminal reductase* yang homolog pada sitokrom P450 reduktase, terdiri dari domain *amino-terminal oxygenase* yang mengandung gugus prostetik heme yang terikat di bagian tengah pada *calmodulin-binding domain*. Pengikatan Kalmodulin bekerja sebagai "*molecular switch*" yang mampu mengalirkan elektron dari gugus prostetik flavin pada domain reduktase terhadap heme. Fasilitas ini menyebabkan perubahan O<sub>2</sub> dan L-arginin menjadi NO dan L-citrulline.

Semula diketahui neuron NOS (NOS<sub>1</sub> atau nNOS) dan endothelial NOS (eNOS) diekspresikan secara konstitutif "*constitutively expressed*" dan Ca<sup>2+</sup> *sensitive*". Sekarang diketahui terdapat pada berbagai tipe sel dan ekspresinya

diatur oleh kondisi fisiologis yang spesifik. Sebaliknya, Kalmmodulin tetap terikat pada bentuk inducibel dan  $\text{Ca}^{2+}$  insensitive (iNOS) pada aktivitas pada kadar  $\text{Ca}^{2+}$  yang rendah (Lahti, 2003; Billack, 2006).

#### 2.4.4 Nitric Oxide (NO)

Nitric oxide (NO) mempunyai peran penting pada regulasi fungsi endotelial dan aliran darah pada banyak organ termasuk ginjal. NO memiliki berbagai peran fisiologis, antara lain menghambat agregasi platelet, *leukocyte adhesion* pada endotel pembuluh darah dan oksidasi *low-density lipoprotein (LDL)*, sebagai mediator inflamasi dan berperan penting pada regulasi sistem imun. Efek NO tergantung dosis, pada kadar yang rendah, NO bekerja pada transmisi saraf dalam regulasi pergerakan sistem pencernaan, aliran darah regional, fungsi neuro-endokrin. Pada kadar tinggi NO berperan sebagai regulator serta berfungsi sebagai efektor selama terdapat inflamasi dan infeksi.

NO sebagai mediator untuk perbaikan jaringan dapat memicu berbagai proses penyembuhan, di antaranya meningkatkan deposisi kolagen luka, migrasi seluler, vasodilatasi, memodulasi proliferasi endotel, mencegah apoptosis dan memicu imunomodulasi (Billack, 2006).

NO yang berada di pembuluh darah disintesis dari L-arginine oleh *endothelial NO synthase* (eNOS atau NOS3). NO yang diproduksi berdifusi melalui membrane sel dan merelaksasi otot polos pembuluh darah melalui produksi cyclic guanine 3'5'-monophosphate (cGMP). Disfungsi endothelial memicu senyawa *vasoconstrictors*, seperti endothelin-1 dan angiotensin II.

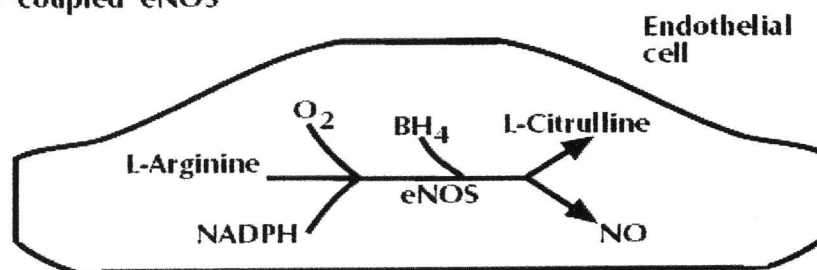
Pada DM tipe 2 terjadi resistensi Insulin, hal ini dapat menyebabkan hambatan produksi NO, sehingga terjadi disfungsi endotel, meningkatkan kekakuan arterial yang dapat menimbulkan komplikasi seperti gagal ginjal kronis, hipertensi, gagal jantung kongestif. eNOS merupakan gambaran umum NO yang mampu meregulasi fungsi endotels, sehingga sangat diperlukan terapi yang dapat memperbaiki regulasi dan aktivitas eNOS.

#### **2.4.5 Peran endotelial NOS pada mikrovaskular pasien DM Tipe2**

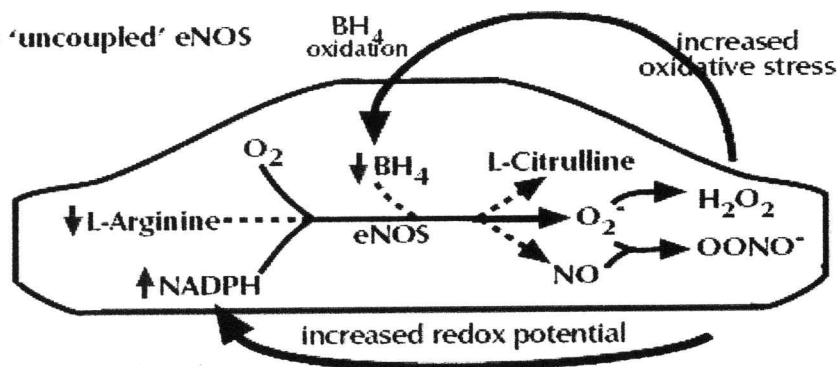
Fungsi endotel sangat penting pada pembuluh darah. Sel endotel mengeluarkan vasoaktif yang berfungsi menghambat agregasi platelet dan meningkatkan fibrinolisis sehingga mencegah terjadi mikrotrombus, mempertahankan aliran darah ke seluruh tubuh normal, mengatur migrasi larutan, makromolekul dan sel-sel darah melintasi dinding pembuluh darah. Sel endotel juga berfungsi sebagai transduktor pada permukaan sel dan sebagai barier antara darah dan intersisial, mempertahankan integritas struktur lapisan endotel agar mampu beradaptasi terhadap kondisi hemodinamik dan paparan oksidan, mampu merespons jejas melalui suatu mekanisme penyembuhan yang spesifik termasuk angiogenesis dan reendotelialisasi.

NO merupakan vasodilator kuat yang diproduksi tubuh melalui aktivasi ikatan eNOS dan L-arginine dengan peningkatan kadar  $Ca^{2+}$ , cAMP dan protein kinase A (PKA) yang sangat berperan pada regulasi eNOS.

a: 'coupled' eNOS



b: 'uncoupled' eNOS



Adapted from Katusic ZS.<sup>168</sup>

**Gambar 2.5 : a. Regulasi dan Aktivitas eNOS, b. Diabetes meningkatkan Redox Imbalance dan Disfungsi NO**

Sumber : Hamilton et al,2007

Disfungsi endotel, pada gambar 2.5, mencerminkan gangguan keseimbangan antara faktor – faktor yang berperan pada pengaturan vasodilatasi dan vasokonstriksi endotel. Penurunan bioavailabilitas NO, dapat disebabkan oleh penurunan sintesis NO dan inaktivasi NO akibat peningkatan *release* ROS. Oksidatif stress dapat menyebabkan timbul *uncoupling* eNOS dan penurunan produksi NO. Peningkatan *asymmetric dimethylarginine* (ADMA), yang merupakan inhibitor eNOS dapat menurunkan produksi NO, menurunkan molekul oksigen akibat pembentukan ROS dan peningkatan stress oksidatif.

Pada keadaan hiperglikemi, terjadi peningkatan pelepasan ROS dan stress oksidatif lain seperti IL-6, VCAM-1, serta peningkatan asam lemak bebas dari pengaktifan jalur Heksosamin. Akibat paparan yang berkepanjangan terjadi disfungsi endotel dan kerusakan NO. Hal tersebut memicu terjadi komplikasi mikroangiopati pada pasien DM Tipe2, yang terekspresi pada kerusakan organ seperti diabetik nefropati, diabetik retinopati, diabetik foot. Pada keadaan disfungsi yang terjadi menahun maka timbul makroangiopati, seperti kardiomiopati (Hamilton, 2007).

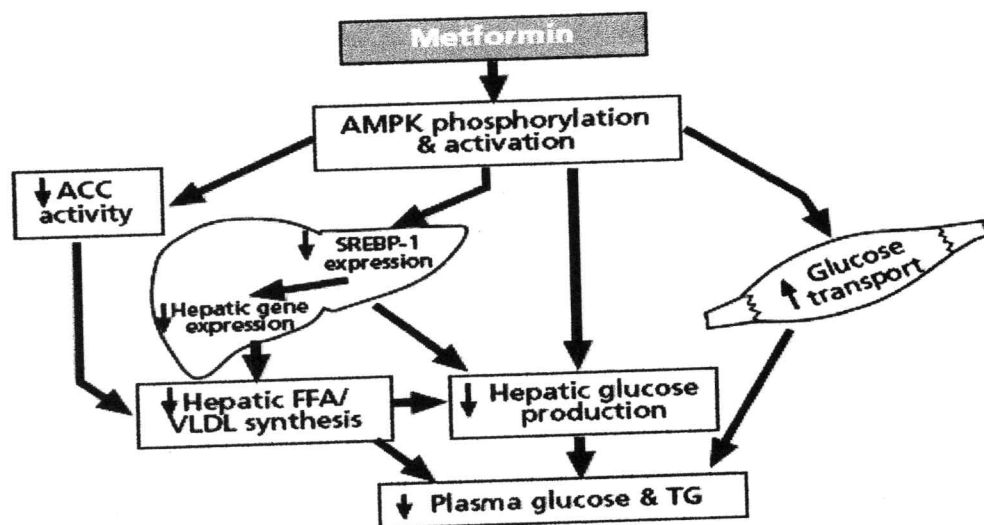
Disfungsi eNOS mengganggu fungsi NO terhadap regulasi sistem imun. Pada keadaan normal, NO berperan sebagai imunomodulator melalui penghambatan ekspresi gen yang terlibat pada proses apoptosis. NO juga mengatur fungsi sel mast yang memiliki peran penting terhadap respon inflamasi awal. NO menghambat ekspresi sejumlah sitokin di limfosit, eosinofil, monosit dan sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Efek ini juga ditunjukkan oleh S-nitrosilasi berbagai faktor transkripsi, termasuk NF-kb, I $\kappa$ B, MAPK yang merupakan sinyal transduksi penting pada respons sitokin dan kimokin. (Guritno,2005, Thumb, 2007).

## **2.5 Metformin**

### **2.5.1 Mekanisme Kerja dan Efek Metformin**

Biguanides (Metformin) merupakan anti diabetik oral yang bekerja meningkatkan sensitivitas Insulin melalui peningkatan kinerja IRS. Target molekul Metformin adalah AMPK. Pengaktifan AMPK dapat menghambat

pemecahan asam lemak dan menghambat *hepatic* glukoneogenesis dan glikogenolisis. Penghambatan terhadap proses glukoneogenesis dan glikogenolisis dapat meningkatkan *uptake* glukosa di hepar namun juga meningkatkan produksi asam laktat, terutama bila terjadi proses metabolisme glukosa anaerob. Selain itu, Metformin dapat meningkatkan aktivitas Insulin pada muskuloskeletal dan liver dengan berolahraga atau melakukan aktivitas fisik sehingga meningkatkan kebutuhan energi dan respons metabolisme di seluruh tubuh. Karena Metformin menghambat proses glukoneogenesis, maka dapat menurunkan *flux metabolic acids* sehingga dapat terjadi penumpukan asam laktat yang dapat menyebabkan asidosis laktat. Peningkatan asam laktat yang disebabkan Metformin, diharapkan dapat dicegah dengan pemberian terapi OHB. Pemberian terapi OHB dapat meningkatkan proses metabolisme glukosa aerob sehingga dapat menurunkan produksi asam laktat.



Adapted from the results of Zhou G et al. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74

**Gambar 2.6 : Efek Metformin pada sistem Adenosin monophosphat (AMP) Kinase di Hepar dan Otot**  
Sumber : Zhou et al, 2001



Metformin tidak mempunyai efek yang signifikan terhadap sekresi glukagon, kortisol, *growth hormone* dan somatostatin. Metformin tidak mempengaruhi Insulin secara langsung sehingga kondisi hipoglikemi jarang terjadi. Selain itu Metformin sering digunakan untuk menurunkan kadar lemak dalam serum serta menurunkan berat badan, melalui penurunan hormon adenopectin dan Leptin (Davis, 2006). Indikasi pemberian Metformin pada pasien DM Tipe 2 bila kadar HbA1C 7–8 (Darmansyah I, 2009). Meski golongan Thiazolidinediones (TZD) seperti Rosiglitazone memberikan efek peningkatan sensitivitas Insulin melalui aktivasi Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) dan dapat diberikan pada kadar HbA1C >8% (Goodman and Gillman's, 2006; Katzung, 2008). Namun dalam penelitian ini digunakan Metformin sebab Metformin adalah OAD lini pertama yang disarankan oleh Perkeni, serta TZD merupakan OAD yang dimetabolisme di sitokrom hepar (CYP) dan ikatan protein plasma tinggi, sehingga penggunaan TZD membutuhkan observasi yang lebih ketat.

### **2.5.2 Absorpsi, Metabolisme, Ekskresi, dan Dosis Metformin**

Metformin diabsorpsi pada usus halus, merupakan obat yang stabil, tidak berikatan dengan protein plasma dan diekskresi dalam bentuk *unchanged* dalam urin. Waktu Paruh Metformin sekitar 2 jam. Dosis harian maksimum yang disarankan di Amerika Serikat adalah 2.5 gram terbagi dalam 3-4 kali pemberian bersama dengan makanan atau *durantee coenam* (Goodman and Gilman, 2006).

Efek samping Metformin akut yang sering terjadi adalah gangguan ringan saluran cerna yang dapat dicegah dengan titrasi perlahan pada dosis dan pemberian bersamaan dengan makanan. Absorpsi vitamin B<sub>12</sub> dan folat sering terganggu pada terapi Metformin jangka waktu lama, namun dapat diatasi dengan penambahan suplement kalsium.

Kontraindikasi terhadap pasien dengan asidosis metabolik, gangguan fungsi hati, gangguan fungsi ginjal, gagal jantung, penyakit respirasi, hipoksia dan infeksi berat.

Pertimbangan untuk menghentikan terapi Metformin bila terjadi peningkatan Laktat plasma lebih dari 3 mM atau terjadi penurunan pada fungsi faal hati dan ginjal, pasien dengan asupan diet sangat rendah kalori. Pada infark miokardial atau sepsis, Metformin harus segera dihentikan.

### 2.5.3 Efek Metformin terhadap eNOS

Metformin meningkatkan aktivasi eNOS melalui aktivasi *c-AMP dependent Protein Kinase* (AMPK), baik AMPK yang berada di muskuloskeletal maupun jaringan adipocyte (Musi, 2002). Stimulasi AMPK tersebut dipengaruhi oleh olah raga dan hormon (adenopectin dan Leptin).

Pada hewan, pemberian Metformin secara intra-aorta dengan dosis yang lebih kecil dari dosis optimal yang digunakan sebagai OAD, dapat mencegah perluasan dari infark akut, dengan onset kurang dari dua jam, melalui aktivasi eNOS. Pencegahan tersebut tidak diikuti dengan penurunan kadar glukosa darah yang optimal. Metformin saat ini digunakan sebagai kardioprotektor baik pada

pasien Diabetes maupun pada pasien yang mempunyai risiko terkena gangguan kardiovaskular (Calvert, 2008).

## **2.6 Terapi Oksigen Hiperbarik (OHB)**

### **2.6.1 Definisi Terapi OHB**

Terapi OHB atau *Hyperbaric Oxygen Therapy* merupakan salah satu cara pengobatan dalam kedokteran yang menggunakan oksigen konsentrasi tinggi. Pasien menghirup oksigen murni 100% pada tekanan lebih dari 1 atmosfer absolut (ATA) di dalam ruang udara bertekanan tinggi atau *hyperbaric vessels* (Elayan, 2000; Prince, 2004).

### **2.6.2 Sejarah Terapi OHB**

Konsep pengobatan dengan menggunakan udara bertekanan di dalam ruang bertekanan tinggi "Domicillium" telah diawali oleh Henshaw sejak tahun 1662. Penelitian gas oksigen oleh Priestley tahun 1775 mendorong Haldane menggunakan oksigen sebagai gas untuk pengobatan. Penelitian tentang toksisitas oksigen pertama kali dilakukan pada tahun 1878 oleh Paul Bert. Pada tahun 1879, Fontaine, seorang ahli bedah Perancis membangun sebuah kendaraan yang dilengkapi dengan ruang udara bertekanan tinggi (RUBT). Lebih dari 20 pembedahan dilakukan di dalam mobil tersebut dengan menggunakan *nitrous oxide* sebagai gas anestesi. Pengobatan menggunakan OHB pertama kali dilakukan pada tahun 1917 untuk menanggulangi kongesti paru akibat keracunan gas (Ziykovic, 2005). Behnke dan Shaw pada tahun 1937 menggunakan OHB

sebagai pengobatan kasus kecelakaan akibat kerja penyelaman atau dekompresi (Dean, 2003). Churchill tahun 1950, melakukan penelitian pengaruh OHB terhadap penyakit kanker (Smith, 2005). Tahun 1956, dengan hewan coba seekor anak babi, Dr. Boerema berhasil membuktikan bahwa O<sub>2</sub> yang terlarut dalam plasma pada pemberian OHB dapat mempertahankan kehidupan walaupun tanpa hemoglobin (*life without blood* (Hart, 2005; Neumeister M, 2005)). Pada tahun yang sama Dr. Boerema juga melaporkan penggunaan OHB sebagai terapi *adjuvant* pada pembedahan jantung kongenital tetralogi Fallot (Neumeister M, 2005). Tahun 1962, Smith dan Sharp membuktikan tentang efek penggunaan terapi OHB pada keracunan gas karbon monoksida (Neumeister M, 2005). Tahun 1967, *Undersea Medical Society* yang telah membuat pedoman penggunaan OHB. Tahun 1996, OHB mulai digunakan sebagai terapi *adjuvant* pada beberapa penyakit : gas ganggren, keracunan karbon monoksida, penyembuhan luka diabetikum, *decompression sickness*, kasus gigi dan mulut dan tindakan bedah rahang dan radionekrosis pasca terapi radiasi (Bakker, 2002; Smith, 2005).

### **2.6.3 Efek Fisiologi dan Farmakologi OHB**

Efek terapeutik oksigenasi hiperbarik terhadap tubuh tergantung pada dua modalitas, yaitu : (1). Faktor fisik yang dikaitkan dengan perubahan lingkungan dari lingkungan normal/normobarik (1ATA) ke lingkungan hiperbarik (lebih dari 1 ATA) merupakan modalitas efek mekanik; (2). Faktor peningkatan tekanan

parsial oksigenasi di dalam darah atau jaringan yang banyak memberikan efek terapeutik dari OHB (Neumeister, 2005; Mathieu, 2006; Bitterman, 2007).

### 2.6.3.1 Efek Fisiologi

Banyak perubahan fisiologis yang terjadi pada tubuh selama pemberian OHB, antara lain : a). penurunan ventilasi paru/hipoventilasi, b). *bradycardia* dan penurunan *cardiac output*, c). Perubahan transportasi oksigen selama terapi OHB.

Transportasi oksigen dari organ paru ke jaringan melalui dua cara, yaitu 1).melalui keterikatan dengan hemoglobin, 2). terlarut di dalam plasma (Bakker DJ, 2002; Wright, 2003; Mathieu, 2006). Oksigen yang terikat dengan hemoglobin merupakan transportasi oksigen yang utama oleh sel darah merah dalam bentuk *oxyhaemoglobin* ( $\text{HbO}_2$ ). Pada kadar hemoglobin normal, 1 gram hemoglobin dapat berikatan dengan 1,36 ml oksigen. Bila saturasi jenuh ( $\text{SaO}_2=100$ ), 1 dl darah keseluruhan akan mentransport 20,4 ml  $\text{O}_2$ . Pada keadaan normal, tekanan parsial oksigen alveolar sekitar 100 mmHg, maka saturasi hemoglobin terhadap oksigen sekitar 97% saturasi ( $\text{SaO}_2=97$ ) dan mengandung 19,8 ml osigen per dl darah. Pada tekanan parsial alveolar mencapai 200mmHg, maka hemoglobin tersaturasi maksimal dan tidak mampu lagi membawa oksigen dari plasma masuk ke dalam jaringan, sehingga penambahan oksigen akan terlarut di plasma. Transport oksigen dalam plasma merupakan kunci dari efek terapeutik OHB pada jaringan, walaupun perfusi darah di jaringan tersebut kurang baik. Kurva saturasi hemoglobin berbentuk S, jumlah oksigen terlarut meningkat linier sebanding dengan peningkatan tekanan parsial oksigen  $\text{PO}_2$ .

Peningkatan tekanan parsial inspirasi, dapat meningkatkan jumlah oksigen yang terlarut dalam plasma. Peningkatan kadar oksigen di plasma sebanding dengan peningkatan tekanan oksigen inhalasi. Saat tekanan udara dalam RUBT meningkat maka tekanan parsial oksigen di dalam alveolar meningkat, proporsional dengan besar peningkatan tekanan di dalam RUBT. Peningkatan tekanan oksigen di dalam alveolar dapat meningkatkan pada tekanan parsial oksigen terlarut di plasma. Hal tersebut merupakan dasar dari pengobatan OHB (Burras, 2000).

Hukum fisika yang digunakan dalam OHB adalah hukum Boyle, Dalton, Henry, dan Charles. Hukum Boyle menyatakan bahwa bila suhu konstan, tekanan gas berbanding terbalik dengan volume gas. Peningkatan tekanan gas menyebabkan penurunan volume gas. Hukum Dalton menyatakan bahwa tekanan parsial suatu gas tergantung tekanan absolut dan fraksi gas tersebut. Tekanan total campuran gas adalah penjumlahan tekanan parsial gas-gas yang menyusun campuran gas tersebut. Hukum Henry menyatakan bahwa pada suhu konstan jumlah gas yang terlarut dalam cairan sebanding proporsional dengan tekanan parsial gas pada cairan tersebut. Hukum Henry juga menyebutkan ada pengaruh waktu (time-dependent), bahwa diperlukan waktu bagi difusi gas atau pembentukan gelembung. Hukum Charles menyatakan bahwa bila tekanan konstan, volume gas sebanding proporsional dengan suhu absolut (Mathieu,2006).

Hemoglobin (Hb) memiliki keterbatasan dalam mengikat  $O_2$ . Paparan OHB meningkatkan kadar  $O_2$  terlarut plasma karena Hb telah mengalami saturasi maksimal.  $O_2$  terlarut plasma adalah bentuk  $O_2$  bebas yang dapat segera

digunakan sel.  $O_2$  terikat Hb memerlukan proses pelepasan  $O_2$  dari Hb. Oksigenasi jaringan bergantung pada  $pO_2$  arterial, sedangkan  $pO_2$  arterial bergantung pada  $pO_2$  inspirasi. *Arterial  $pO_2$  content* adalah jumlah total  $O_2$  yang tersedia, yang bergantung pada  $pO_2$  inspirasi dan kadar Hb darah (Jain, 1990). Kadar  $O_2$  plasma pada tekanan di atas permukaan laut (1 atm) adalah 0,32 vol %. Jaringan dalam kondisi istirahat membutuhkan sekitar 6 vol % (asumsi : perfusi normal) untuk mempertahankan metabolisme seluler normal. Tekanan 3 atm menghasilkan  $O_2$  terlarut plasma 6 vol %, yang dapat mencukupi kebutuhan  $O_2$  total jaringan istirahat, sehingga tidak membutuhkan  $O_2$  yang terikat Hb. OHB bermanfaat untuk kondisi ketika terdapat keterbatasan Hb yaitu dalam hal kemampuannya untuk afinitas  $O_2$  atau jumlahnya. Keterbatasan Hb terjadi pada kasus intoksikasi CO atau anemia sebab kesulitan *crossmatching* atau kepercayaan agama yang melarang tranfusi. Intoksikasi CO mengakibatkan Hb terikat CO, karena afinitas Hb-CO 250 kali lebih kuat daripada Hb- $O_2$ , sehingga Hb tidak mampu mengikat  $O_2$ . Hb berkurang pada anemia, sehingga  $O_2$  yang dapat diangkut Hb juga berkurang (Niinikoshi J, 2006).

#### **2.6.3.2 Efek Farmakologis Terapi OHB**

Secara farmakologis, terapi OHB dinyatakan efektif apabila terjadi perbaikan pada kondisi patologis dan status klinis penderita. Terapi OHB sangat dipengaruhi kadar inspirasi oksigen ( $F_i O_2$ ) pada tekanan terapi 2-2,5 ATA (Wright, 2001; Prince, 2004; Smith, 2005; Marthieu, 2006). Pada terapi OHB di klinik, tekanan OHB yang digunakan adalah 2-3 ATA, karena pemberian 3 ATA

merupakan dosis yang efektif dan mempunyai efek toksisitas yang minimal (Wright, 2001; Gill and Bell, 2004; Hink et al, 2006).

Fungsi terapi OHB dapat meningkatkan konsentrasi oksigen di dalam darah, diperlukan untuk berbagai reaksi enzimatik biokimiawi, fungsi respirasi sel dan jaringan yang normal (Neumeister, 2005). Enzim monooksigenase, intraoksigenase dan interdioksigenase adalah enzim spesifik yang membutuhkan oksigen sebagai kofaktor untuk proses biologi. Untuk meningkatkan kadar oksigen dalam jaringan dilakukan secara inhalasi melalui respirasi karena absorpsi kulit tidak mencukupi. OHB meningkatkan kadar oksigen di plasma sebanding dengan tekanan inspirasi oksigen. Terapi OHB yang banyak digunakan di klinik adalah 2-3 ATA (Sheffield, 2002), karena dilaporkan pemberian OHB lebih 3 ATA banyak menimbulkan gejala neurologi (Ostrowski RP, 2005).

Efek terapeutik OHB dihubungkan dengan kemampuan oksigen dalam kondisi hiperbarik. *Reserve hypoxia (acute hypoxia)*, mempengaruhi efek iskemia, mempengaruhi reaktivitas pembuluh darah, mengurangi edema, memodulasi produksi NO, memodifikasi faktor pertumbuhan dan efek sitokin melalui regulasi kadar atau reseptornya, merangsang perubahan protein membran yang berpengaruh pada pertukaran ion, meningkatkan proliferasi sel, mempercepat deposisi kolagen, menstimulasi *capillary budding* dan *arborization*, mempercepat efek anti mikroba secara oksidatif, meningkatkan transport antibiotik tertentu melewati membran, terlibat dalam propagasi penyakit bakterial melalui denaturasi toksin, memodulasi respons sistem imun, memperkuat *oxygen radical scavengers* dengan menurunkan *ischemia perfussion injury* (Prince M, 2004; Mathieu, 2006).



Pengaruh terapi OHB pada vaskularisasi otak terutama pada aliran darah, iskemia dan edema (Calvert JW, 2003). Autoregulasi dipengaruhi oleh konsentrasi oksigen maupun konsentrasi karbon dioksida pada arteria serebral. Karbon dioksida meningkatkan produksi NO, dan oksigen menurunkan produksi NO oleh sel endotel. Peningkatan NO menyebabkan vasodilatasi, sedangkan penurunan NO menyebabkan vasokonstriksi (Niinikoshi J, 2006).

Terapi OHB mempengaruhi vasoreaktivitas otak dengan memodulasi produksi NO. Penurunan produksi NO yang berarti, terjadi vasokonstriksi dan pengurangan aliran darah otak sekitar 25%. OHB pada tekanan 2.0 ATA selama kurang dari dua jam telah dibuktikan dapat mengurangi aliran darah otak dan meningkatkan sepuluh kali isi oksigen otak, sehingga meski aliran darah otak berkurang namun jumlah oksigen yang masuk ke dalam jaringan otak meningkat (Mathieu, 2006).

Respons terhadap hiperoksia yang lama dan/atau kadar tekanan yang tinggi, pada terapi OHB menyebabkan vasodilatasi sebral dan menunjukkan peningkatan pada aliran darah otak. Pada hewan coba, peningkatan aliran darah otak dimediasi oleh NOS, *N-nitro-L-arginine*, suatu NOS inhibitor, berkompetisi dengan prekursor *L-arginine* alami untuk mengikat NOS. Penelitian menggunakan *N-nitro-L-arginine* mendukung korelasi antara OHB menginduksi aliran darah otak dan produksi NO konsisten dengan aktivasi NO (Elayan, 2000; Dean, 2003).

Peningkatan enzim neuroprotektif dan protein seperti superoksida dismutase (Mn-SOD) dan HSP-27 juga berlangsung pada area iskemia serebral. Superoksida dismutase meredam radikal bebas sehingga mempunyai efek neuroprotektif.

Kadar neuroprotektif tergantung dari profil terapi. Terapi *single dose* tidak menghasilkan neuroprotektif. Pra-terapi dengan OHB diutamakan pada ligasi vaskuler bedah dan atau terapi berulang disertai neuroprotektif. Terapi OHB pada 3.0 ATA selama 60 menit yang diberikan secepatnya setelah sumbatan arteri serebri media dapat menurunkan volume infark, hanya pada infark yang terjadi kurang dari 2 jam.

Hasil riset pada penderita ulkus diabetik menunjukkan hubungan langsung antara peningkatan akumulasi sel epitel pada luka dari metabolit NO, yaitu 3-NI (3-nitrotyrosine) dan peningkatan jaringan granulasi pada luka. Akumulasi epithelial 3-NT yang progresif pada penyembuhan luka meningkat secara signifikan sesudah 2 minggu pertama terapi OHB dibandingkan dengan kadar 3-NT dengan proses penyembuhan yang minim. Hal ini diduga beberapa sebab: (1).produksi NO di jaringan luka meningkat pada awal proses penyembuhan; (2).terapi OHB yang efektif dikaitkan dengan peningkatan produksi NO pada luka, dan (3).peningkatan produksi NO melalui OHB menyebabkan vasodilasi, menurunkan lekosit, adesi platelet dan proteksi mikrosirkulasi perkutaneus. Pada luka diabetik, aktivitas NOS kurang berperan dalam mempertahankan kondisi fisiologis, *vascular rythms*, adesi sel dan ketersediaan oksigen. Pada ulkus diabetik kronis, OHB meningkatkan NO sehingga menyebabkan penyembuhan mikrovaskular dan repair pada luka (Joseph, 2000).

#### 2.6.4 Efek OHB terhadap eNOS

Terapi OHB, pada awal terapi, meningkatkan stres oksidatif melalui produksi ROS. Terapi OHB dengan tekanan 2-3 ATA dalam jangka waktu lama dan diberikan berulang dapat menurunkan stres oksidatif, sehingga terjadi keseimbangan antara oksidatif dan antioksidan (Alleva, 2005). Terapi OHB dapat meningkatkan eNOS melalui keseimbangan tersebut juga antara produksi ROS dan NOS. Terapi OHB juga meningkatkan HSP-70 yang bersifat sitoprotektor terhadap stres oksidatif (Shyu, 2004).

Terapi OHB 2.4 ATA, *in vitro*, terhadap apoptosis sel hematopoietik memberikan hasil terapi OHB menurunkan sel apoptosis melalui akumulasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intraselular (Gill and Bell, 2004). Terapi OHB dapat memicu penyembuhan luka dengan memodulasi signal dan menurunkan ekspresi HIF-1 $\alpha$  (Zhang, 2008).

**Tabel 2.1 : Efek Terapeutik OHB**

1. Mengurangi hipoksia faktor dan iskemia
2. Mempengaruhi reaktivitas vaskuler
3. Mengurangi edema
4. Meningkatkan *nitric oxide*
5. Modulasi faktor pertumbuhan dan sitokin dengan mempengaruhi kadar dan atau reseptornya
6. Menginduksi perubahan membran sel dengan mempengaruhi pertukaran ion dan kanal membran sel
7. Merangsang proliferasi sel
8. Meningkatkan deposit kolagen
9. Meningkatkan fagositosis
10. Meningkatkan efektivitas antibiotika
11. Modulasi respons imun

Sumber : Bakker, 2002

### 2.6.5 Indikasi Terapi OHB

Indikasi OHB berbeda-beda di tiap negara. Indikasi OHB dibedakan menjadi indikasi absolut dan relatif (*adjuvant*) berdasarkan Undersea and Hyperbaric Medical Society (Gill AL and Bell CNA, 2004; Niinikoshi J, 2006).

Indikasi absolut :

- Penyakit dekompresi
- Emboli udara
- Intoksikasi : CO, sianida, hidrogen sulfida, karbon tetraklorida

Indikasi relatif :

- Infeksi : *gas gangren, acute necrotizing fasciitis, refractory mycoses, leprosy, osteomyelitis*
- Operasi bedah plastik dan rekonstruksi : untuk luka sulit sembuh, ajuvan flap kulit dengan sirkulasi marginal, ajuvan operasi reimplantasi, ajuvan terapi luka bakar
- Traumatologi : *crush injuries, compartement syndrome*, jejas olahraga jaringan lunak
- Ortopedi : patah tulang non-union, graf tulang, osteoradionecrosis
- Penyakit vaskuler : syok, iskemia miokard, ajuvan operasi jantung, gangren iskemik, nyeri tungkai iskemik
- Penyakit saraf : stroke, sklerosis multipel, migrain, edema serebral, demensia multiinfark, jejas medulla spinalis, penyakit vaskuler medulla spinalis, abses otak, neuropati perifer, myelitis radiasi, koma vegetatif

- Penyakit darah : *anemia sickle cells*, anemia kehilangan darah parah
- Penyakit mata : oklusi arteri sentral retina
- Penyakit gastrointestinal : ulkus lambung, *necrotizing enterocolitis*, ileus paralitik, *pneumotoides cystoides intestinalis*, hepatitis
- Penyakit telinga, hidung, dan tenggorok : tuli mendadak, trauma akustik akut, labirintitis, penyakit Meniere, otitis eksterna maligna (infeksi kronis)
- Penyakit paru : abses paru, emboli paru (ajuvan untuk operasi)
- Diabetes Mellitus
- Penyakit kebidanan dan kandungan : kehamilan berkomplikasi (diabetes mellitus, eclampsia, penyakit jantung, hipoksia plasenta, hipoksia fetus), penyakit jantung kongenital neonatus
- *Adjuvan* rehabilitasi : hemiplegia spastik akibat stroke, paraplegia, insufisiensi miokard kronis, penyakit vaskuler perifer
- *Adjuvan* radioterapi dan kemoterapi : meningkatkan sensitivitas radioterapi dan kemoterapi terhadap kanker, mengurangi efek samping toksisitas radioterapi dan kemoterapi

Indikasi lain pemberian terapi OHB :

- Lepromatous leprosy
- Trauma kepala dan trauma spinal
- Meningitis
- Abses intra abdominal
- Keracunan hidrogen sulfat and karbon tetrachloride
- *Ischemia reperfusion injury*

### 2.6.6 Kontraindikasi Terapi OHB

Kontraindikasi OHB dibedakan menjadi absolut dan relatif. Kontraindikasi absolut satu-satunya yaitu pneumotoraks tanpa terapi. Pneumotoraks yang telah diterapi sebelum OHB menjadi kontraindikasi relatif (Jain, 1990).

Kontraindikasi relatif :

- Infeksi / peradangan saluran napas atas
- Kejang
- Paru : emfisema dengan retensi CO<sub>2</sub>, lesi asimtomatis pada foto *thorax*
- Riwayat operasi jantung atau telinga
- Demam tinggi yang tak terkendali
- Kanker
- Kehamilan
- Neuritis optik
- *Tension pneumothorax*
- Gangguan psikis : *claustrophobia*

### 2.6.7 Komplikasi Terapi OHB

OHB dapat mengakibatkan bahaya/efek samping/komplikasi. Secara umum, OHB dalam batas aman bila tekanan < 3 ATA dan durasi < 120 menit.

Komplikasi akibat OHB yaitu (Jain, 1990) :

- Barotrauma telinga, sinus dan paru
- Miopia dan katarak

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

- Penyakit dekompresi
- Klaustrofobia
- Toksisitas O<sub>2</sub> : kejang

Gangguan akibat OHB pada sistem saraf pusat terjadi 1-2% dari keseluruhan kasus terapi OHB, barotrauma reversibel simptomatik 15-20%, gangguan paru 15-20%, dan gangguan optik reversibel 20%. Miopia akibat toksisitas O<sub>2</sub> bersifat reversibel dapat kembali normal dalam beberapa minggu atau bulan. Katarak mungkin terjadi pada paparan jangka panjang. Kejang sangat jarang terjadi. Efek karsinogenik OHB belum dapat ditunjukkan dari studi yang ada meskipun OHB dapat meningkatkan radikal bebas (Mathieu, 2006).

### 2.6.8 Ruang Hiperbarik

Ruang hiperbarik adalah ruang yang dapat diisi gas dengan tekanan tinggi (> 1 atm). Ruang hiperbarik (gambar dapat dilihat pada lampiran halaman 103) dapat digunakan untuk manusia (klinis) dan hewan. Ruang hiperbarik klinis digolongkan menjadi 2 berdasarkan National Fire Protection Association (NFPA) dari Amerika Serikat, yaitu *multiplace* (class A-multiple patient occupancy), dan *monoplace* (class B-single patient occupancy).

**Tabel 2.2 : Perbedaan *multiplace* dan *monoplace***

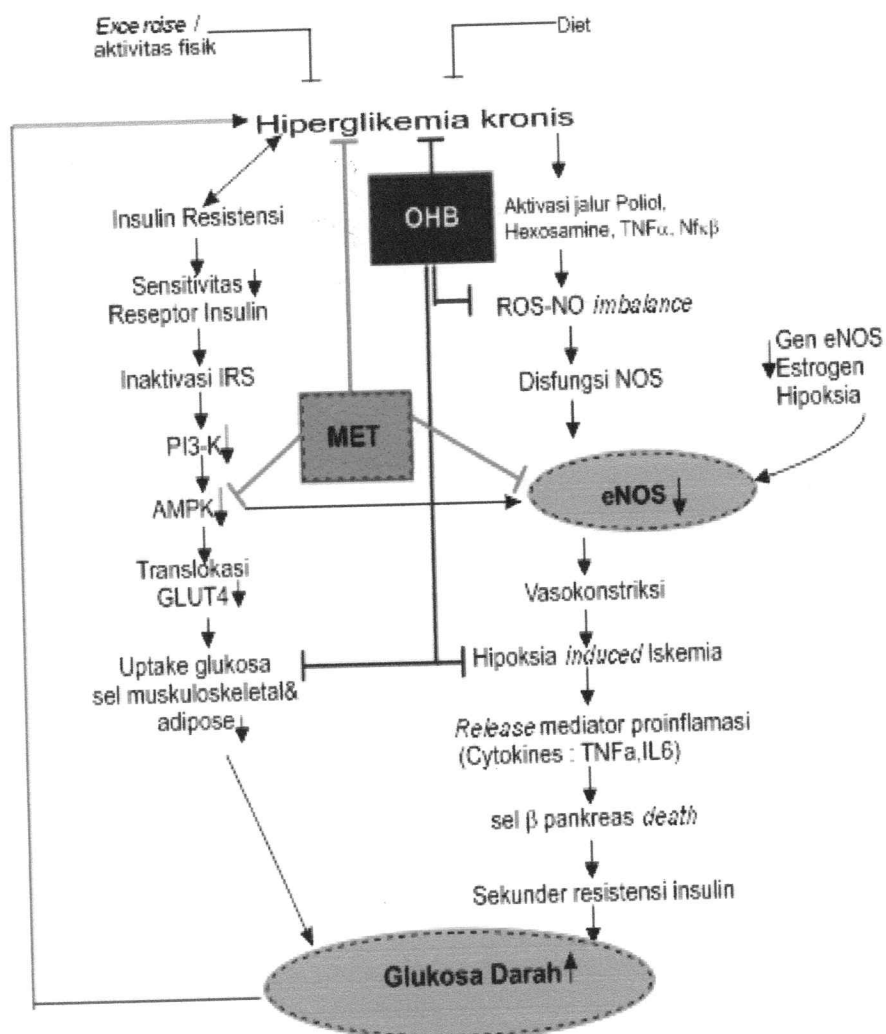
<i>Multiplace hyperbaric chamber</i>	<i>Monoplace hyperbaric chamber</i>
Menampung 2-20 orang Tekanan maksimum 6 ATA Memakai masker napas Dapat dilakukan tindakan intervensi, dan dipakai sebagai ruang operasi Perlu petugas di dalam ruangan	Menampung 1 orang Tekanan 3 ATA Tidak memakai masker napas

Sumber : Bakker, 2002

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL dan HIPOTESIS**

**3.1 KERANGKA KONSEPTUAL**



**Gambar 3.1 : Kerangka Konseptual**

Keterangan :  $\rightarrow$  = aktivasi  
 $\perp$  = inhibisi  
 = variabel tergantung (kadar eNOS dan Glukosa Darah)

variabel bebas : MET = Metformin  
 OHB = Terapi OHB



### 3.2 Penjelasan Teori Konseptual Penelitian

Keadaan hiperglikemia, yang dihambat oleh aktifitas fisik dan Diet, timbul akibat resistensi Insulin, sebaliknya resistensi insulin dapat memperberat hiperglikemia. Resistensi insulin sebagai akibat dari penurunan sensitivitas reseptor insulin berakibat insulin tidak dapat berikatan dengan reseptor Insulin, sehingga IRS inaktif. Inaktivasi IRS menyebabkan penurunan PI3-K dan AMPK. Penurunan AMPK menyebabkan translokasi GLUT4 pada sel muskuloskeletal dan adipose menurun sehingga kemampuan *uptake* glukosa pada sel tersebut menurun. Penurunan *uptake* glukosa tersebut menyebabkan kadar glukosa darah meningkat, selanjutnya hiperglikemia dapat meningkatkan penurunan aktivasi reseptor insulin atau resistensi insulin.

Selain itu, hiperglikemia menyebabkan aktivasi jalur Poliol, Hexosamine, TNF $\alpha$  dan NF $\kappa$  $\beta$  sehingga menyebabkan gangguan keseimbangan ROS-NO yang berakibat disfungsi NOS dan penurunan kadar eNOS. Di pihak lain, kadar eNOS juga dipengaruhi oleh transkripsi gen eNOS, kadar Estrogen dan keadaan hipoksia. Penurunan kadar eNOS menyebabkan produksi NO endotel menurun yang berakibat terjadinya vasokonstriksi sehingga aliran oksigen ke jaringan berkurang, dan memicu hipoksia-iskemia. Kondisi iskemia yang timbul dapat menyebabkan meningkatnya produksi mediator inflamasi atau *cytokines* seperti TNF $\alpha$ , IL-6 dan peningkatan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan *defect* pada post reseptor Insulin *Signaling Cascade* sehingga terjadi resistensi Insulin sekunder. Hal ini menyebabkan proses kembali berulang dengan keadaan dekompensasi hiperglikemia yang lebih parah.

Pada terapi DM Tipe 2, Metformin mempunyai tiga jalur mekanisme, melalui : 1) penurunan keadaan hiperglikemia dengan cara menurunkan proses glikogenolisis dan glukoneogenesis hepar, 2) memperbaiki sensitivitas reseptor Insulin melalui peningkatan AMPK, 3) menstimulasi eNOS sehingga mengurangi hipoksia jaringan.

Pada pembahasan di bab 1, telah dikemukakan bahwa monoterapi Metformin sering mengalami kegagalan, maka pada studi ini diberikan terapi *adjuvant* yaitu terapi OHB 2,4 ATA. Pemberian terapi OHB 2,4 ATA mengakibatkan 1) menurunkan glukosa darah secara langsung dengan meningkatkan produksi ATP; 2) memperbaiki disfungsi eNOS melalui penurunan pembentukan ROS, 3) menghambat hipoksia *induced* iskemia melalui perbaikan oksigenasi jaringan dan menghambat aktivasi HIF-1 $\alpha$  yang dapat meningkatkan *relesase* mediator proinflamasi. Diharapkan terapi OHB mampu mengoptimalkan terapi Metformin sebagai terapi lini pertama pada DM Tipe 2.

### 3.3 HIPOTESIS PENELITIAN

Hipotesis penelitian ini adalah :

- I. Terjadi peningkatan kadar eNOS setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB
- II. Terjadi penurunan kadar glukosa darah setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis / Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah " *the one group pre – post without control design*" yang harus melalui uji *ethical clearance* (Campbell et al, 1967). Rancangan penelitian ini menggunakan metode analitik berpasangan yang sampelnya diambil secara acak komplit (*completely random design*).



Keterangan :

R = Pemilihan sampel secara random

O<sub>1</sub> = *Pretest* kelompok sampel terpilih

X = Perlakuan

O<sub>2</sub> = *Posttest* kelompok sampel terpilih

Pada penelitian ini tidak menggunakan kelompok kontrol, yaitu kelompok pasien dengan DM Tipe 2 yang mengalami kegagalan monoterapi Metformin tanpa mendapat terapi *adjuvant* lain untuk mengatasi hiperglikemia. Alasan tidak menggunakan kelompok kontrol terkait dengan etika kedokteran, bahwa keselamatan pasien adalah yang utama.

#### 4.2 Unit Eksperimen, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

##### 4.2.1 Unit Eksperimen

Unit eksperimen dalam penelitian ini adalah manusia yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

**Kriteria Inklusi :**

- Penderita DM Tipe 2
- laki – laki
- usia 50 – 65 tahun
- tanpa gangguan metabolik / penyakit penyerta lain (hipo/ hipertiroidisme, cushing sindrom, penyakit jantung koroner, stroke, *cludicatio intermittent*, penyakit paru obstruktif menahun, BPH, anoreksia bulimia)
- faal hati dan faal ginjal dalam batas normal
- melalui survey pra penelitian : telah mengalami kegagalan monoterapi Metformin (masih hiperglikemia, dari indikator GDA>200mg/dl dan Hb A1c>7,5 setelah 3 bulan monoterapi Metformin secara rutin setiap hari)
- mengikuti program diet DM
- tidak mendapat terapi Insulin
- bersedia ikut serta dalam penelitian, yang dibuktikan dengan tanda tangan pada *inform consent*.

**Kriteria Eksklusi :**

- kontraindikasi untuk terapi OHB, antara lain : gagal jantung kongestif, gangguan membrana timpani
- kontraindikasi terapi Metformin
- tekanan darah tinggi, sistolik >160mmHg, atau diastolik >100 mmHg
- merokok
- ada gejala dan tanda makroangiopati berupa stroke, penyakit jantung

koroner, claudicatio intermittens, gangren atau ulkus diabetik

- gangguan psikis : *claustrophobia, panic disorder*
- kondisi apapun yang berdasarkan pendapat peneliti bisa membahayakan subyek
- tidak mengonsumsi anti oksidan : vitamin E, vitamin C, suplemen Kalsium dan suplemen lain dalam 6 bulan terakhir

**Kriteria Drop Out :**

- Mengalami gejala barotrauma dan toksisitas O<sub>2</sub>
- Tidak menjalankan terapi sesuai dengan prosedur di atas
- Meninggal dunia karena sebab apa pun selama terapi berlangsung

**4.2.2 Besar Sampel**

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini, dihitung berdasarkan rumus penentuan besar sampel (Steel and Torrie, 1991)

$$n = [(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot \alpha^2] / \delta^2$$

Keterangan : n = besar sampel ;  $\delta$  = standar deviasi

$\alpha$  = standar normal,  $\alpha = 5\%$ ; sehingga  $Z_{\alpha/2} = 1,96$

$1-\beta = \text{power of the test} = 0,80$ ; sehingga  $Z_{\beta} = 0,85$

Pada penelitian eksperimental :  $\alpha^2 / \delta^2 = 1$

Sehingga :  $n = (1,96+0,85)^2 = 7,9$

faktor koreksi =  $1/(1-f)$ ;  $f = 10\%$

$r \geq 1/(1-0,1) \times n \text{ min} = 1/0,90 \times 7,9 = 8,8$ , jadi  $r \geq 9$

besar sampel pada studi ini adalah 10.

### 4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel Random

Pada penelitian ini, sampel berasal dari poli diabet Rumah Sakit dr. Ramelan Surabaya yang telah memenuhi kriteria Inklusi dan Eksklusi. Sampel dipilih secara *simple random*.

### 4.3 Variabel dan Definisi Operasional Variabel

#### 4.3.1 Variabel Penelitian :

**Variabel Bebas :** Pemberian terapi Metformin 4x500 mg per oral yang diberikan *durantee coenam* dan terapi OHB sebesar 2,4 ATA selama 3x30 menit dengan interval 5 menit selama 10 kali dan dilakukan selama 10 hari berturut – turut di dalam RUBT khusus manusia

**Variabel Tergantung :** peningkatan kadar eNOS dan penurunan kadar glukosa darah

#### 4.3.2 Definisi Operasional :

1. Terapi Metformin, merupakan terapi *oral* anti diabetik golongan Biguanides yang bekerja meningkatkan sensitivitas Insulin. Dosis terapi yang diberikan adalah 4x500 mg saat makan dalam sehari. Skala data : interval
2. Terapi Oksigen hiperbarik (OHB), merupakan terapi 2,4 ATA menghirup udara biasa tanpa menggunakan oksigen selama 10 menit, kemudian bernafas dengan O<sub>2</sub> 100% selama 3x30 menit dengan diselingi 5 menit bernafas menggunakan udara biasa. Setelah 30 menit terakhir, tekanan dikurangi secara bertahap selama 10 menit sampai kembali ke tekanan normal, selama proses tersebut pernafasan yang dilakukan menggunakan udara biasa. Terapi OHB ini

dilakukan selama 10 kali dalam 10 hari berturut – turut menggunakan RUBT khusus manusia. Skala data : interval

3. *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) adalah peningkatan kadar eNOS di serum yang diukur dengan metode ELISA. Skala data : Interval
4. Kadar glukosa darah parameter pengukuran yang digunakan adalah penurunan kadar glukosa darah acak. Skala data : Interval

#### **4.4 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Heparin, eNOS *conjugate* (antibodi eNOS), eNOS *standard*, *asacy diluent* RD 1W, *calibrator diluent* RD 5K, *cell lysis buffer*, *color reagent* A dan B.

#### **4.5 Instrumen Penelitian**

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah form isian identitas dan kuisisioner, 1 unit Ruang Udara Bertekanan Tinggi (RUBT) khusus manusia di Lembaga Kesehatan Angkatan Laut Rumah Sakit dr.Ramelan Surabaya, tabung reaksi, tabung tabung sentrifuse, *Elisa reader*, eNOS *microplate*, sentrifuse, inkubator, homogenizer, freezer -20<sup>0</sup>C, *Plate covers*, alat pengukur glukosa darah (*Fortex Mixer*).

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **4.6.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian ini dilakukan 1) di Lembaga Kesehatan TNI AL Drs.Med. Sastropanoelar, Phys.Rumah Sakit dr.Ramelan Surabaya untuk terapi OHB dan

pemeriksaan penunjang (Foto *Thorax* dan EKG), 2) di Laboratorium Patologi Klinik FK Unair/ RS Dr.Soetomo untuk pemeriksaan laboratorium (GDA, HbA1c, faal hati dan ginjal, ELISA kadar eNOS). Alasan pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FK Unair/ RS Dr.Soetomo adalah tersedia alat dan tenaga ahli untuk pemeriksaan ELISA.

#### 4.6.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan bulan Agustus 2009. sampai November 2009

Jadwal penelitian dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 4.1 : Jadwal Penelitian**

Kegiatan	Bulan ke –			
	1 Agust	2 Sept	3 Okt	4 Nov
Penelusuran Pustaka	X	X	X	X
Penyusunan Proposal	X			
Pengadaan Bahan Penelitian	X	X		
Perlakuan			X	X
Pengumpulan Data			X	X
Analisis Data			X	X
Penyusunan Laporan				X

#### 4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Sebanyak 10 orang pasien DM Tipe2 yang telah memenuhi kriteria – kriteria tersebut di atas, pasien mendapat terapi kombinasi Metformin dan OHB. Pada penelitian ini, observasi dilakukan sebelum, saat dan setelah terapi untuk membandingkan kondisi sebelum, saat dan setelah terapi kombinasi tersebut di atas. Poin yang diobservasi adalah pemeriksaan fisik, serta pemeriksaan penunjang dan laboratorium, sesuai yang tersebut di bawah.



#### 4.8 Prosedur Pemeriksaan Laboratorium Metode ELISA

Prinsip ELISA : Agar terjadi suatu reaksi warna pada ELISA, maka dibutuhkan suatu antibodi yang dilabel enzim, dan substrat yang diberi indikator warna yang dikenal dengan kromogen.

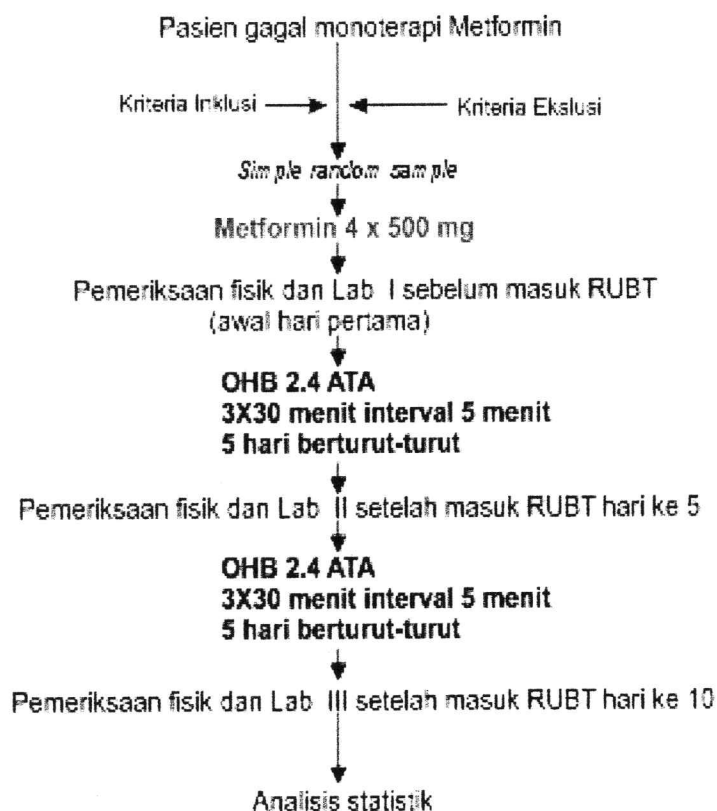
Enzim yang digunakan untuk melabel antibodi adalah *Horseradish peroksidase*. Pada ELISA bahan yang dideteksi sebelumnya harus ditempelkan pada fase padat (pada *microtiter well*). Bahan (Ag/Ab) dapat menempel pada *microtiter well* ini telah dilapisi dengan *polysterine / polyvinylchloride* (Aulanni'am, 2004). Prinsip dasar ELISA terdiri dari a) Fase *coating*, b) Fase reaksi Ag – Ab, c) Fase reaksi kimiawi.

#### 4.9 Cara Analisis Data

Analisis data dilakukan terhadap kadar eNOS dan kadar glukosa darah pre (kondisi saat subyek belum mendapat terapi OHB) dan post (kondisi saat subyek sudah selesai mendapat terapi OHB) pada kelompok subyek terpilih. Selanjutnya dilakukan uji normalitas pada kedua kelompok dengan menggunakan uji Kolmogorof Smirnov. Bila hasil data tersebut berdistribusi normal maka dilakukan uji *pre and post test control design* atau *paired t-test*, dengan tingkat kesalahan 5% dan *power of the test* 80% (Steel and Torrie, 1991). Namun bila data tidak berdistribusi normal, maka data akan diuji menggunakan uji Brown Forsythe dilanjutkan Kruskal-Wallis.

#### 4.10 Kerangka Operasional Penelitian

Skema rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut .:



**Gambar 4.1 : Kerangka Operasional Penelitian**

Keterangan :

- Subyek pada studi ini setelah memenuhi kriteria inklusi dan tidak termasuk kriteria eksklusi akan dipilih secara acak untuk diberikan terapi. Pemeriksaan fisik meliputi tanda vital, yaitu : tekanan darah, nadi, frekuensi pernafasan dan suhu tubuh
- Pemeriksaan I (Pre Test): Pemeriksaan fisik dan laboratorium (GDA, Hb A1c, faal hati, faal ginjal, kadar eNOS) sampel sebelum dilakukan terapi OHB

- Pemeriksaan II : Pemeriksaan fisik dan laboratorium (GDA, faal hati, faal ginjal, kadar eNOS) sampel saat dilakukan terapi OHB
- Pemeriksaan III (Post Test): Pemeriksaan fisik dan laboratorium (GDA, faal hati, faal ginjal, kadar eNOS) sampel sesudah dilakukan terapi OHB  
Pemeriksaan fisik meliputi : pemeriksaan *vital sign* (tekanan darah, nadi, suhu tubuh, *respiratory rate*)
- Terapi : kombinasi terapi Metformin 4x500mg – OHB 2.4 ATA (selama 10 hari berturut-turut 3x 30 menit dengan interval 5 menit)

## BAB V

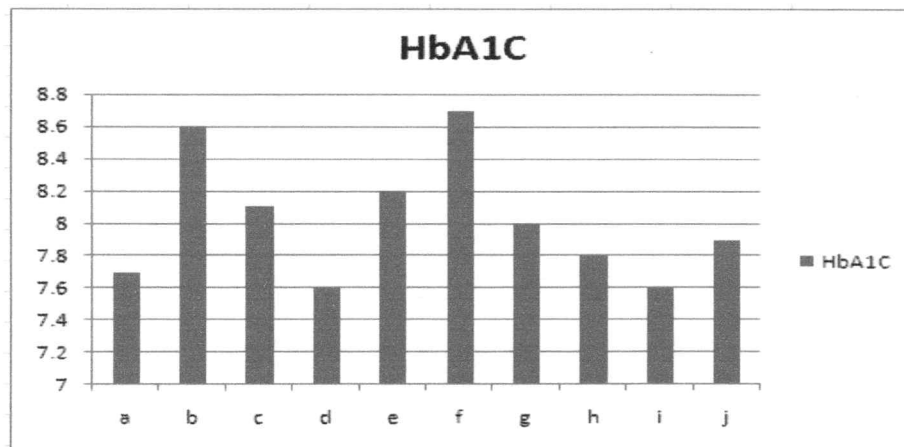
### HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Pada bagian ini memuat hasil penelitian dan analisis hasil penelitian yang berkaitan dengan tujuan dan hipotesis penelitian.

Subyek penelitian terdiri dari 10 orang laki – laki penderita DM tipe 2 dengan rentang usia 55 – 65 tahun dan telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi seperti yang telah dituliskan pada bab IV. Pemilihan subyek penelitian ini melalui proses wawancara dan pengisian kuisisioner serta pemeriksaan fisik dan laboratorium. Sebelum menyatakan persetujuan, subyek diberi informasi mengenai tujuan dan pelaksanaan studi ini (*form information for consent* terlampir).

#### 5.1 Hasil uji homogenitas HbA1C Sampel

Pemeriksaan HbA1C dilakukan pada pemeriksaan I untuk memastikan keadaan hiperglikemia yang dialami oleh subyek dalam studi ini adalah keadaan hiperglikemia kronis. Rerata HbA1C adalah 8,02% dengan standar deviasi 0,388.



**Gambar 5.1 : Grafik rerata kadar HbA1C pasien**

Data HbA1C berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p=0,990$ ), dengan sebaran data HbA1C berada dalam rentang 7-8,5% (gambar 5.1), rerata 8.2% dan standar deviasi 0.388 (hasil terlampir). Hal tersebut sesuai dengan syarat pemberian terapi Metformin, HbA1C kurang dari 8% (Darmansyah I, 2009). Bila lebih dari 9% maka pemberian Metformin harus dikombinasi dengan terapi lain seperti Insulin atau kombinasi dengan golongan Sulfonylurea.

## **5.2 Hasil Pengukuran kadar Glukosa Darah Puasa (GDP) sebelum, saat dan setelah terapi kombinasi Metformin dan Oksigen Hiperbarik**

Pemeriksaan GDP I dilakukan saat subyek penelitian hanya mendapatkan terapi Metformin 4x500mg tanpa HBO. Pemeriksaan GDP II dilakukan saat subyek penelitian telah mendapatkan terapi kombinasi Metformin dan HBO hari ke 5. Pemeriksaan GDP III dilakukan saat subyek penelitian telah mendapat terapi kombinasi Metformin dan HBO hari ke 10.

Rerata hasil pemeriksaan GDP I adalah 188,1 mg/dl dengan standar deviasi 51,64. Rerata hasil pemeriksaan GDP II adalah 133,3 mg/dl dengan standar deviasi 34,93. Rerata hasil pemeriksaan GDP III adalah 106,6 mg/dl dengan standar deviasi 14,74. Rerata penurunan GDP setelah terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 kali adalah 82mg/dl.

Untuk melihat homogenitas maka dilakukan uji distribusi normal menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, diperoleh hasil : data GDP I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,911$ ), demikian juga dengan data GDP II dan GDP III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  GDP II = 0,980,  $p$  GDP III = 0,718).

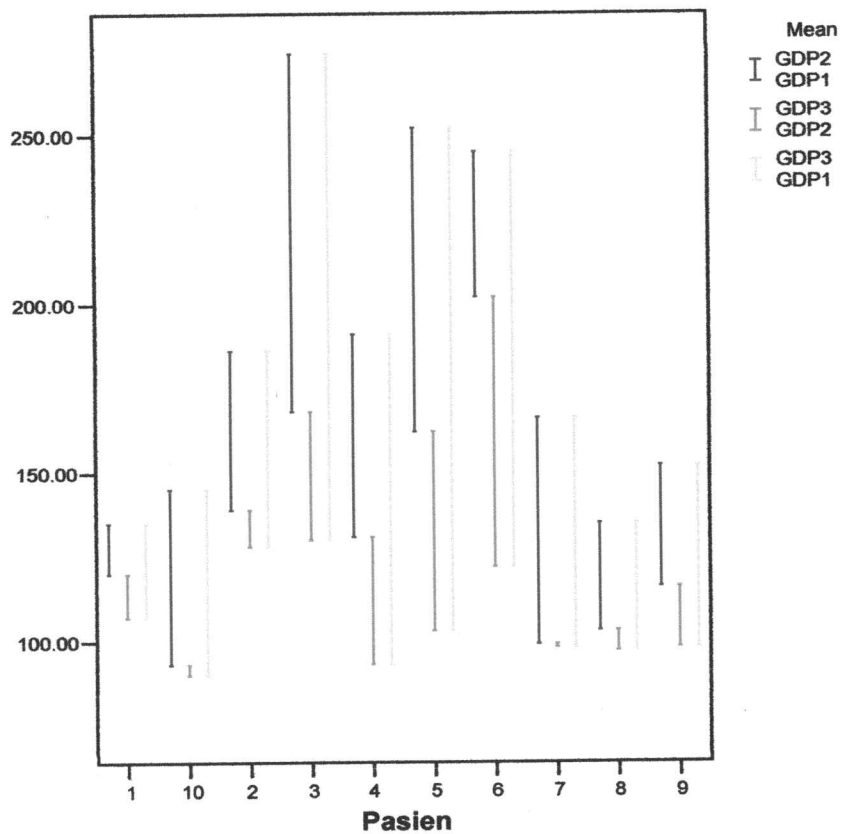
Untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB, dilakukan perbandingan kadar GDP pada subyek. Terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,011$ ) antara GDP I dengan GDP III. Perubahan yang signifikan ( $p=0,00$ ) juga didapat pada perbandingan GDP II dengan GDP III (Tabel 5.1). berikut data perbandingan GDP I – GDP II, GDP II – GDP III dan GDP I – GDP III seperti ditampilkan dalam tabel di bawah ini.

**Tabel 5.1 : Paired t-Test untuk GDP**

Paired t-Test		Sig.	Mean
Pair 1	GDP_I - GDP_II (pre – durantee HBO)	.000	55.2
Pair 2	GDP_II - GDP_III (durantee – post HBO)	.011	26.7
Pair 3	GDP_I - GDP_III (pre – post HBO)	.000	81.5

Sig. = signifikan < 0,05 ; Sumber : SPSS versi 14.0

Hasil analisis membuktikan pemberian kombinasi Metformin dan OHB dapat menyebabkan keadaan ‘normoglikemia’ pada subyek penelitian antara sebelum dan sesudah terapi kombinasi Metformin (gambar 5.2), dengan rerata penurunan GDP 81,5 mg/dl.



**Gambar 5.2 : Grafik rentang kumulatif rerata penurunan kadar GDP**  
 ◆ Perbandingan GDP1 dan 2; ◆ Perbandingan GDP 2 dan 3;  
 ◆ Perbandingan GDP 1 dan 3

### 5.3 Hasil Pengukuran kadar *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sebelum, saat dan setelah terapi kombinasi Metformin dan Oksigen Hiperbarik

Pemeriksaan kadar eNOS menggunakan sampel sel (eritrosit) dan metode ELISA dengan kit yang diproduksi oleh R&D systems Inc. Minneapolis USA, yang terdiri dari reagen eNOS *conjugate* (antibodi eNOS), eNOS *standard*, *assay diluent* RD 1W, *calibrator diluent* RD 5K, *cell lysis buffer*, *color reagent* A dan B (prosedur pelaksanaan lampiran).

Rerata hasil pemeriksaan eNOS I adalah 36,83  $\mu$ L dengan standar deviasi 45,41. Rerata hasil pemeriksaan eNOS II adalah 88,79  $\mu$ L dengan standar deviasi 104,68. Rerata hasil pemeriksaan eNOS III adalah 578,49  $\mu$ L dengan standar deviasi 580,77.

Untuk melihat homogenitas maka dilakukan uji distribusi normal menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, diperoleh hasil : data eNOS I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,930$ ), demikian juga dengan data eNOS II dan eNOS III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  eNOS II = 0,925,  $p$  eNOS III = 0,911).

Untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi kombinasi Metformin dan O<sub>2</sub>, dilakukan perbandingan kadar eNOS pada subyek. Terdapat perbedaan yang bermakna ( $p = 0,017$ ) antara eNOS I dengan eNOS III. Perubahan yang signifikan ( $p=0,031$ ) juga didapat pada perbandingan eNOS II dengan eNOS III



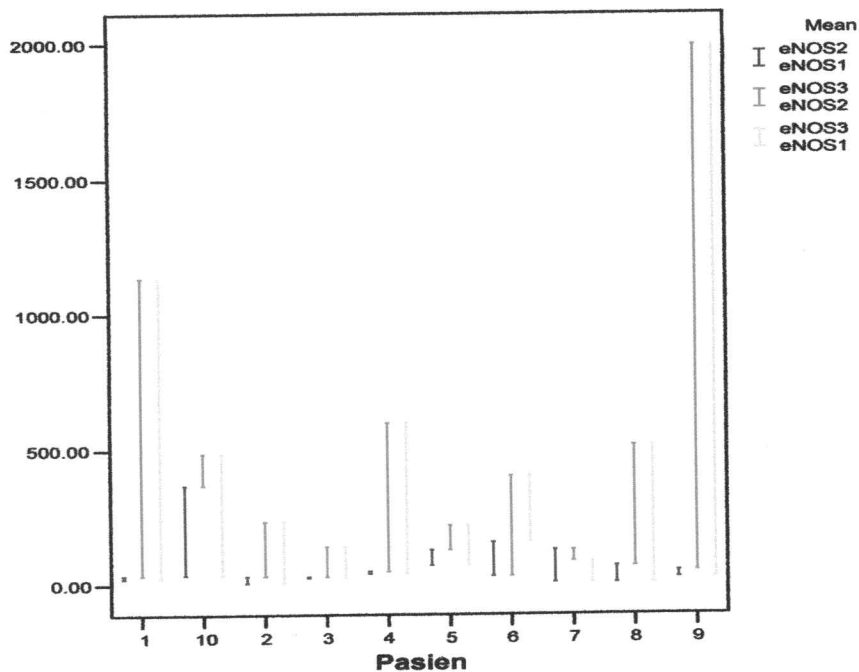
(Tabel 5.2). berikut data perbandingan eNOS I – eNOS II, eNOS II – eNOS III dan eNOS I– eNOS III seperti ditampilkan dalam tabel 5.2.

**Tabel 5.2 : Paired t-Test untuk eNOS**

Paired t-Test		Sig.	Mean
Pair 1	eNOS_I = eNOS_II (pre = durantee HBO)	.193	51.94
Pair 2	eNOS_II – eNOS_III (durantee – post HBO)	.031	489.70
Pair 3	eNOS_I – eNOS_III (pre – post HBO)	.017	541.67

Sig. = signifikan < 0,05 ; Sumber : SPSS versi 14.0

Hasil analisis membuktikan pemberian kombinasi Metformin dan OHB dapat menyebabkan peningkatan kadar eNOS pada subyek penelitian antara sebelum dan sesudah terapi kombinasi Metformin dan OHB (gambar 5.3) dengan rerata peningkatan kadar eNOS 541,67  $\mu$ L.



**Gambar 5.3 : Grafik kadar eNOS**

- ◆ Perbandingan eNOS 1 dan 2;
- ◆ Perbandingan eNOS 2 dan 3;
- ◆ Perbandingan eNOS 1 dan 3

#### 5.4 Faal Ginjal (BUN dan Serum Kreatinin)

Rerata hasil pemeriksaan BUN I adalah 14,71 mg/dl dengan standar deviasi 3,01. Rerata hasil pemeriksaan BUN II adalah 14,49 mg/dl dengan standar deviasi 3,07. Rerata hasil pemeriksaan BUN III adalah 0,92 mg/dl dengan standar deviasi 2,46. Rerata hasil pemeriksaan serum kreatinin I adalah 0,92 mg/dl dengan standar deviasi 0,18. Rerata hasil pemeriksaan serum kreatinin II adalah 0,92 mg/dl dengan standar deviasi 0,13. Rerata hasil pemeriksaan serum kreatinin III adalah 0,92 mg/dl dengan standar deviasi 0,15.

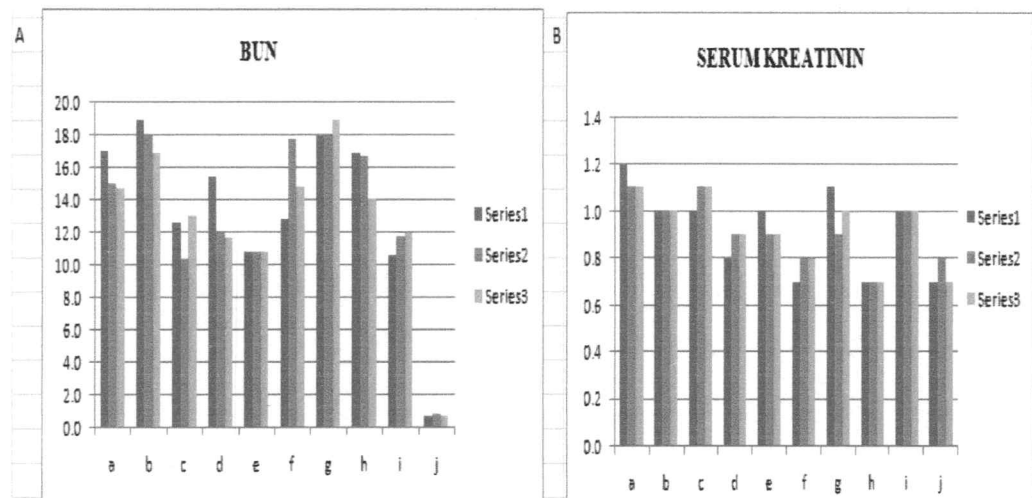
Untuk melihat homogenitas maka dilakukan uji distribusi normal menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, diperoleh hasil : data BUN I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,527$ ), demikian juga dengan data BUN II dan BUN III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  BUN II = 0,606,  $p$  BUN III = 0,599). Data serum kreatinin I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,855$ ), demikian juga dengan data serum kreatinin II dan III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  pemeriksaan II = 0,507,  $p$  pemeriksaan III = 0,652).

**Tabel 5.3 : Paired t-Test untuk BUN dan Serum Kreatinin (SK)**

Paired t-Test		Sig.	Mean
Pair 1	BUN_I = BUN_II (pre = durantee HBO)	.771	.22
Pair 2	BUN_II – BUN_III (durantee – post HBO)	.479	.38
Pair 3	BUN_I – BUN_III (pre – post HBO)	.364	.60
Pair 4	SK_I – SK_II (pre – durantee HBO)	1.00	.00
Pair 5	SK_II – SK_III (durantee – post HBO)	1.00	.00
Pair 6	SK_I – SK_III (pre – post HBO)	1.00	.00

Sig. = signifikan < 0,05 ; Sumber : SPSS versi 14.0

Tidak ada perubahan yang signifikan pada faal ginjal (BUN dan Serum Kreatinin) baik pada perbandingan pemeriksaan I dan II, pemeriksaan II dan III, serta pemeriksaan I dan III (tabel 5.3). Dapat disimpulkan tidak ada penurunan fungsi ginjal setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB, sebab pemberian Metformin dibutuhkan fungsi ginjal yang baik. Metformin diekskresi dalam bentuk yang utuh di ginjal. (gambar 5.4 a dan b).



**Gambar 5.4 : Grafik (A) hasil pemeriksaan BUN; (B) hasil pemeriksaan serum kreatinin (SK). series 1 = pemeriksaan faal ginjal (BUN dan SK) 1, series 2 = pemeriksaan faal ginjal (BUN dan SK) 2, series 3 = pemeriksaan faal ginjal (BUN dan SK) 3**

### 5.5 Faal Hepar (SGOT dan SGPT)

Rerata hasil pemeriksaan SGOT I adalah 18,5 U/l dengan standar deviasi 4,55. Rerata hasil pemeriksaan SGOT II adalah 17,1 U/l dengan standar deviasi 3,78. Rerata hasil pemeriksaan SGOT III adalah 18,6 U/l dengan standar deviasi 4,40. Rerata hasil pemeriksaan SGPT I adalah 18,1 U/l dengan standar deviasi 4,82. Rerata hasil pemeriksaan SGPT II adalah 17,8 U/l dengan standar deviasi 4,42. Rerata hasil pemeriksaan SGPT III adalah 17,5 U/l dengan standar deviasi 3,66.

Untuk melihat homogenitas maka dilakukan uji distribusi normal menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, diperoleh hasil : data SGOT pada pemeriksaan I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,566$ ), demikian juga dengan data SGOT pada pemeriksaan II dan III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  pemeriksaan II =  $0,678$ ,  $p$  pemeriksaan III =  $0,611$ ). Data SGPT pada pemeriksaan I berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,780$ ), demikian juga dengan data SGPT pada pemeriksaan II dan III masing-masing berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p$  pemeriksaan II =  $0,662$ ,  $p$  pemeriksaan III =  $0,762$ ).

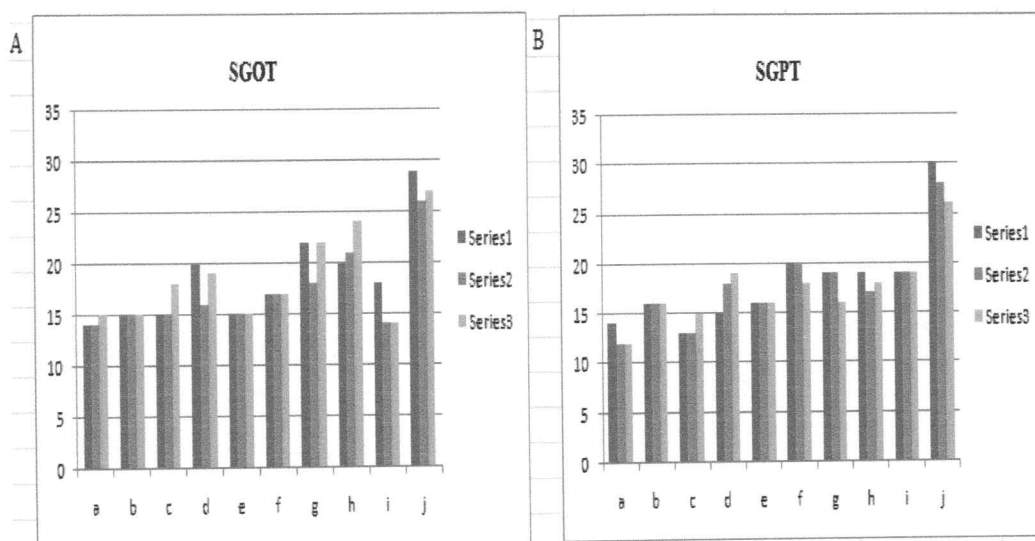
**Tabel 5.4 : Paired t-Test untuk SGOT dan SGPT**

Paired t-Test		Sig.	Mean
Pair 1	SGOT_I – SGOT_II (pre – durantee HBO)	.061	1.40
Pair 2	SGOT_II – SGOT_III (durantee – post HBO)	.015	1.20
Pair 3	SGOT_I – SGOT_III (pre – post HBO)	.893	.10
Pair 4	SGPT_I – SGPT_II (pre – durantee HBO)	.541	.30
Pair 5	SGPT_II – SGPT_III (durantee – post HBO)	.560	.30
Pair 6	SGPT_I – SGPT_III (pre – post HBO)	.443	.60

Sig. = signifikan < 0,05 ; Sumber : SPSS versi 14.0

Ada perubahan SGOT yang signifikan pada perbandingan pemeriksaan II dan III, namun tidak ada perubahan yang signifikan pada perbandingan pemeriksaan I dan II serta pemeriksaan I dan III (table 5.4). Diduga perubahan pada pemeriksaan SGOT II dan III merupakan mekanisme homeostasis perbaikan fungsi hepan dalam melakukan metabolisme glukosa sehingga terjadi penurunan glukoneogenesis dan glikogenolisis.

Tidak ada perubahan yang signifikan pada SGPT baik pada perbandingan pemeriksaan I dan II, pemeriksaan II dan III, serta pemeriksaan I dan III (tabel 5.4). Dapat disimpulkan tidak ada penurunan fungsi hati setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB, sebab pemberian Metformin dibutuhkan fungsi hati yang baik. Seperti yang telah diketahui kerja Metformin yang terutama adalah di hepar dengan menurunkan glukoneogenesis dan glikogenolisis (gambar 5.5).



**Gambar 5.5 : Grafik (A) hasil pemeriksaan SGOT; (B) hasil pemeriksaan SGPT. series 1 = pemeriksaan faal hati (SGOT dan SGPT) 1, series 2 = pemeriksaan faal hati (SGOT dan SGPT) 2, series 3 = pemeriksaan faal hati (SGOT dan SGPT) 3**

### 5.6 Keluhan Subyek selama terapi kombinasi Metformin dan OHB

Subyek dalam penelitian ini adalah pasien DM tipe 2 yang telah mendapatkan monoterapi Metformin 4 x 500mg, namun masih mengalami keadaan hiperglikemia. Selama terapi kombinasi Metformin 4 x 500mg dan OHB 2.4 ATA 10 hari berturut-turut, ada 1 pasien yang mengeluh gangguan pencernaan ringan (sebah, mual), namun keluhan tersebut berkurang setelah disarankan untuk mengkonsumsi Metformin saat makan. Tidak didapatkan keluhan atau tanda barotrauma, seperti tinitus, spontan epistaksis, maupun tanda intoksikasi oksigen, seperti *seizure*.

## BAB VI

### PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN

#### 6.1 Persiapan Subyek Penelitian

Penelitian ini telah dinyatakan lulus uji kelayakan etik di Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga tanggal 21 Oktober 2009 dengan Keterangan Kelaikan Etik No.20/EC/KEPK/FKUA/2009. Pada awal penelitian, dilakukan pemilahan data pasien Diabetes Tipe 2 yang mengalami kegagalan monoterapi Metformin di Poli Diabetes Rumah Sakit Angkatan Laut dr.Ramelan Surabaya (data tersebut digunakan sebagai data sekunder yang sesuai dengan kriteria Inklusi dan Eksklusi yang ada), memilih data pasien yang mempunyai data EKG dan Foto thoraks 1 bulan terakhir.

Pasien yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dipilih secara acak, dilakukan *home visite*, diberikan informasi mengenai tujuan dan pelaksanaan studi ini (*form information for consent* terlampir), wawancara dan pengisian data diri dan kuisisioner, pemeriksaan fisik dan pendataan hasil laboratorium yang dimiliki oleh pasien tersebut. Saat menyatakan kesediaan sebagai subyek dalam penelitian ini maka subyek harus menandatangani *inform consent* (terlampir). Subyek dalam studi ini berjumlah 10 orang laki – laki dengan rentang usia 55 – 65 tahun.

Konfirmasi atas keadaan hiperglikemia kronis yang dialami oleh subyek penelitian dengan melakukan pemeriksaan HbA1C. Hasil pemeriksaan HbA1C berdistribusi normal (uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $p = 0,990$ ). Sebaran

dilakukan terapi Metformin 4x 500mg. Sebab bila HbA1C  $\geq$  9%, maka pasien tersebut tidak boleh hanya mendapat monoterapi Metformin saja, harus dikombinasi dengan terapi lain seperti Insulin atau kombinasi dengan golongan Sulfonylurea (Darmansyah I, 2009).

## 6.2 Efek sinergisme terapi kombinasi Metformin dan Oksigen Hiperbarik

Pemberian monoterapi Metformin setelah 10 minggu mampu menurunkan level HbA1C 1,5% - 2%, kadar GDP 60 – 80 mg/dl (Kahn et al, 2005; Dipiro et al, 2009). Pada hewan coba, terapi OHB tanpa anti diabetik oral dapat menurunkan kadar glukosa darah acak sebesar 73 mg/dl (Wijayatno,2000). Terapi OHB diduga dapat menurunkan kadar glukosa darah melalui proses difusi, sehingga terjadi peningkatan kadar oksigen di dalam darah. Oksigen dibutuhkan untuk memenuhi respons yang adekuat terhadap metabolisme energi (Gilmore, 2006), namun belum ada data mengenai angka penurunan kadar GDP. Pada penelitian ini, terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA selama 10 hari dapat menurunkan kadar GDP  $\pm$  81.5 mg/dl.

Metformin menurunkan risiko *cardiovascular events*, yang dapat menyebabkan kecacatan dan kematian pada pasien DM Tipe 2, melalui peningkatan stimulasi AMPK yang kemudian dapat menstimulasi eNOS. Terapi OHB memperbaiki fungsi organ, melalui efek hiperoksigenasi dan peningkatan perfusi ke jaringan akibat peningkatan produksi NO. Terapi kombinasi Metformin dan OHB, diduga dapat menurunkan *cardiovascular events* (CVE), namun mekanisme yang pasti belum diketahui. Hal tersebut perlu dibandingkan pada



kondisi *cardiovascular* pasien DM tipe setelah terapi kombinasi Metformin dengan OAD lain, contoh : Metformin – Sulfonylurea (Glibenclamide). Sebab pemberian sulfonylurea jangka panjang perlu dipertimbangkan karena efek samping pada *cardiovascular* yang dapat menyebabkan kematian (Burke, 2004; Johnson et al, 2002), demikian juga dengan pemberian terapi Rosiglitazone dapat menyebabkan gangguan *cardiovascular* yang fatal (Selvin et al, 2008).

Efek samping Metformin adalah *lactic acidosis*. Setiap tahun  $\pm$  3 kasus dari 100.000 pasien mengalami risiko fatal akibat *lactic acidosis* dan *impaired* fungsi renal (Kahn et al, 2006). Pemberian Metformin harus hati – hati pada pasien dengan risiko peningkatan asam laktat atau keadaan *tissue hypoperfusion*, seperti gagal jantung kongestif, status hipoksia, syok, sepsis, penyakit hepar kronis *severe*, dan *alcoholism*. Terapi OHB 2.4 ATA menurunkan produksi asam laktat melalui peningkatan utilitas glukosa pada proses respirasi aerobik *respiration*. namun efek terapi OHB terhadap produksi asam laktat oleh metformin masih belum diketahui.

### 6.3 Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)

Penurunan kadar GDP yang mendekati keadaan ‘normoglikemia’ pada subyek penelitian setelah mendapatkan terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 kali dibandingkan keadaan sebelum terapi kombinasi, disebabkan efek sinergisme terapi OHB dalam mengefektifkan terapi Metformin pada pasien DM tipe 2 gagal monoterapi Metformin. Rerata penurunan kadar GDP pada pasien gagal monoterapi

Metformin setelah mendapatkan terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 kali adalah 81,5 mg/dl.

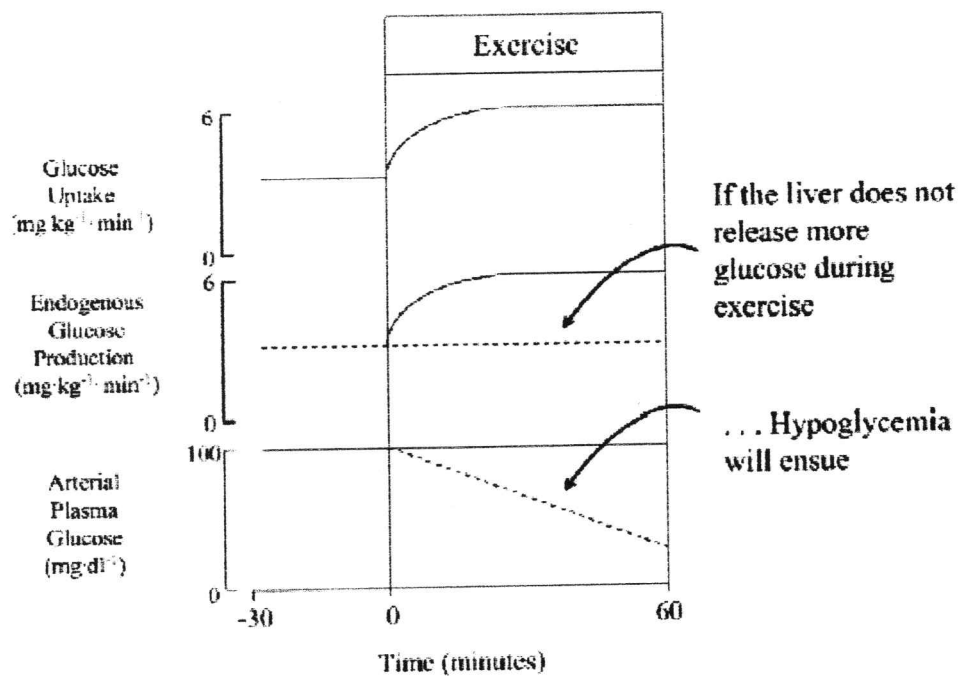
Diduga, pemberian terapi OHB 2.4 ATA melalui proses difusi, terjadi peningkatan kadar oksigen di dalam darah. Oksigen dibutuhkan untuk memenuhi respons yang adekuat terhadap metabolisme energi (Gilmore, 2006). Bila di dalam sel tersuplai cukup oksigen maka glukosa yang ada di dalam darah dapat digunakan sebagai sumber energi yang adekuat untuk mencukupi kebutuhan energi tubuh. Hal tersebut dapat menurunkan proses glikogenolisis dan glukoneogenesis, yang merupakan mekanisme tubuh dalam menghasilkan energi saat glukosa tidak dapat dimanfaatkan tubuh akibat resistensi Insulin. Terapi OHB 2.4 ATA mampu mengoptimalkan terapi Metformin karena mekanisme kerja Metformin adalah glukoneogenesis dan glikogenolisis melalui aktivasi *adeno mono phosphate dependent protein kinase* (AMPK) terutama di sel hepar, sel muskuloskeletal dan *adipocyte* (Goodman and Gilman's, 2006).

Pengendalian kadar glukosa darah sehingga mendekati normoglikemia setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB dapat menurunkan sintesis AGEs yang merupakan sumber radikal bebas. AGEs dapat mempengaruhi reseptor makrofag untuk melepaskan mediator proinflamasi dan sitokin (Hanssen, 2000). Selain itu, kombinasi terapi Metformin dan OHB mampu memperbaiki sintesis vasodilator yaitu NO, sehingga aliran darah, terutama ke mikrovaskular tetap lancar.

Sebagai perbandingan dengan terapi OHB, aktivitas fisik dan olah raga menyebabkan otot berkontraksi, mengoptimalkan *uptake* oksigen dan glukosa.

Olah raga dapat mengaktifkan signal transduksi yaitu AMPK yang kemudian mengaktivasi translokasi GLUT4 (Epstein,1999). Olah raga mengaktifkan NO dan MAPK sehingga terjadi vasodilatasi (American College of Sports Medicine, 2000; Adlam et al, 2007). Hal tersebut menyebabkan distribusi glukosa ke seluruh tubuh sehingga *uptake* glukosa ke dalam sel menjadi efektif

Pada gambar 6.1 diketahui olah raga sekitar 60 menit dapat meningkatkan *uptake* glukosa dan produksi glukosa endogen  $\pm 360$  mg/kg (Sigal et al, 2004). Efek olah raga terhadap metabolisme glukosa efektif tergantung pada waktu, yaitu kekerapan dan lama olah raga tersebut dilakukan. Olah raga disarankan dilakukan 15 menit setelah makan selama 30 – 60 menit minimal 3 hari dalam seminggu, kemudian dapat ditingkatkan menjadi 5-7 hari dalam seminggu.



**Gambar 6.1 : Potensial utilitas glukosa saat olah raga**  
Sumber : Sigal et al, 2004

Data mengenai kombinasi Metformin dan olah raga belum didapatkan, sehingga salah satu saran untuk penelitian lanjut adalah membandingkan efektivitas dan efisiensi terapi kombinasi Metformin dan OHB serta Metformin dan olah raga.

#### 6.4 Kadar *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS)

Terdapat peningkatan kadar eNOS yang bermakna pada subyek penelitian setelah mendapatkan terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 kali dibandingkan keadaan sebelum terapi kombinasi, disebabkan efek sinergisme terapi OHB dalam mengefektifkan terapi Metformin pada pasien DM tipe 2 gagal monoterapi Metformin. eNOS, yang merupakan *constitutive Ca<sup>2+</sup> dependent* NOS, regulasi dan aktivasi transkripsi gen eNOS dipengaruhi banyak hal, antara lain kadar estrogen dan suplai oksigen jaringan. Melalui peningkatan kadar eNOS diharapkan terjadi peningkatan produksi NO. NO merupakan molekul *messenger* yang dapat berperan dalam fungsi fisiologis maupun patologis di dalam tubuh (Kendall, 2000). NO mempunyai berperan penting pada fungsi endotel dan regulasi vaskular organ dalam tubuh termasuk ginjal, menghambat agregrasi platelet, adesi leukosit pada endotel vaskular dan oksidasi LDL (Thameem, 2008).

Penggunaan Metformin, pada studi menggunakan hewan coba, dapat meningkatkan aktivitas eNOS sekitar 100  $\mu$ L (Davis et al, 2006) melalui AMPK yang terstimulasi oleh IP-3K dan perubahan rasio ATP/AMP. Bila AMPK

teraktivasi maka terjadi peningkatan transkripsi gen eNOS, kemudian terjadi peningkatan kadar eNOS, aktivitas eNOS menghasilkan NO yang bersifat vasodilator, sehingga terdapat kecukupan suplai oksigen dalam sel yang menyebabkan peningkatan produksi ATP melalui peningkatan metabolisme *aerob* glukosa. Kecukupan ATP yang dibutuhkan oleh sel sebagai sumber energi dapat menghambat pemecahan asam lemak dan menghambat *hepatic gluconeogenesis* dan *glycogenolisis*. Agar penggunaan Metformin efektif maka harus diimbangi dengan olah raga/*exercise*, untuk dapat meningkatkan aktivasi AMPK.

Terapi OHB 2.4 ATA memiliki efek seperti olah raga / *exercise*, yang memberikan efek pada peningkatan aktivasi AMPK yang menstimulasi transkripsi gen eNOS, selain itu kecukupan suplai oksigen dalam sel juga mampu menstimulasi transkripsi gen eNOS. Terapi OHB juga menstimulasi produksi eNOS melalui penurunan ekspresi *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Buras et al, 2000). Rerata peningkatan kadar eNOS pada pasien gagal monoterapi Metformin setelah mendapatkan terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 kali adalah 541,67  $\mu$ L. Hal tersebut merupakan efek sinergisme pemberian terapi OHB 2.4 ATA dalam mengoptimalkan terapi Metformin pada pasien DM Tipe 2.

Terapi OHB (Hink et al, 2006), pada awal paparan dapat menyebabkan vasokonstriksi akibat 1) penurunan *release* asetilkolin (ACh) dan peningkatan *release* Norepinephrine (NE) sehingga terjadi vasokonstriksi, 2) penurunan *superoxide dysmutase* (SOD)-*polyethylene glycol* (PEG), serta 3) katalisis PEG. Pada paparan terapi OHB yang berkelanjutan, terjadi peningkatan *endothelium-*

*derived* NO (eNOS), hal tersebut merupakan proses adaptasi/tingkat inisiasi tubuh terhadap kecukupan suplai oksigen jaringan.

Terapi kombinasi Metformin dan OHB pada penelitian ini diharapkan meningkatkan produksi NO yang berperan sebagai imunomodulator, meningkatkan HSP-70 yang berperan sebagai sitoprotektor terhadap stress oksidatif yang terjadi akibat hiperglikemia kronis pada pasien DM tipe 2, serta memicu penyembuhan luka dengan memodulasi signal dan menurunkan ekspresi HIF-1 $\alpha$ . Sebab hal tersebut merupakan efek pemberian terapi OHB (Shyu, 2004; Zhang, 2008).

Meski tidak dilakukan penelitian terhadap kemampuan ereksi, beberapa pasien menyatakan bahwa kemampuan ereksi membaik. Hal ini terkait dengan peningkatan *release* NO dapat memperbaiki keadaan disfungsi ereksi melalui mekanisme peningkatan eNOS yang terkait Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) yang berada pada vassa cavernosum dan relaksasi otot polos yang dipengaruhi NO (Yang et al, 2000; Rathel et al, 2005).

#### **6.5 Faal Ginjal (BUN dan Serum Kreatinin)**

Tidak ada perubahan atau penurunan yang signifikan fungsi ginjal setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA. Hal tersebut sesuai dengan tujuan penelitian, yaitu untuk mengoptimalkan terapi Metformin tanpa menurunkan fungsi ginjal. Metformin tidak dimetabolisme tubuh dan tidak terikat protein plasma, sehingga eliminasi Metformin melalui sekresi tubulus renalis dan filtrasi glomerulus.

## 6.6 Faal Hepar (SGOT dan SGPT)

Tidak ada perubahan atau penurunan fungsi hati setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan OHB, sebab pemberian Metformin dibutuhkan fungsi hati yang baik. Seperti yang telah diketahui kerja Metformin yang terutama adalah di hepar dengan menurunkan glukoneogenesis dan glikogenolisis.

## 6.7 Temuan Baru :

1. menemukan efek sinergisme terapi kombinasi Metformin dan OHB dalam mengatasi keadaan hiperglikemia pasien DM tipe 2 yang mengalami gagal monoterapi Metformin
2. menemukan efek sinergisme terapi kombinasi Metformin dan OHB terhadap peningkatan eNOS yang memproduksi NO, dalam upaya mencegah komplikasi kardiovaskular
3. pengaruh terapi kombinasi tersebut melalui jalur aktivasi AMPK (asumsi/hipotesis)

## 6.8 Luaran (*outcome*) :

1. mekanisme molekuler proses peningkatan produksi NO melalui AMPK yang mengaktivasi NOS pada pasien DM Tipe 2 setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan HBO
2. sebagai dasar pengembangan penatalaksanaan DM Tipe 2 untuk mencapai kondisi 'normoglikemia' dan mencegah komplikasi mikroangiopati

### **6.9 Keterbatasan pada studi ini :**

1. tidak ada kontrol penelitian, yaitu pasien DM tipe2 gagal monoterapi Metformin yang tidak mendapat terapi OHB. Terkait dengan etik kedokteran bahwa kesehatan pasien adalah yang utama, sehingga tidak dapat membiarkan pasien DM tipe 2 gagal monoterapi Metformin tetap mengalami hiperglikemia dan tidak diberi terapi kombinasi lain



## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Terapi yang dilakukan pada studi ini adalah terapi kombinasi Metformin 4x500mg dan OHB 2.4 ATA yang dilakukan 10 kali, dengan kegiatan pada setiap kali terapi OHB meliputi : 1) 10 menit adaptasi terhadap perubahan tekanan udara hingga mencapai tekanan udara 2.4 ATA, 2) menghirup oksigen 100% selama 3x30 menit dengan interval waktu 5 menit menghirup udara lingkungan, dan 3) 10 menit adaptasi untuk kembali pada tekanan udara normal.

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA :

1. Berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah puasa pada pasien gagal monoterapi Metformin. Hal tersebut sesuai dengan hipotesis penelitian
2. Berpengaruh terhadap peningkatan kadar eNOS pada pasien gagal monoterapi Metformin. Hal tersebut sesuai dengan hipotesis penelitian.
3. Tidak menyebabkan perubahan pada faal ginjal (BUN dan serum kreatinin) dan faal hepar (SGOT dan SGPT). Hal tersebut sesuai dengan tujuan penelitian, yaitu untuk mengoptimalkan terapi Metformin tanpa menurunkan fungsi ginjal dan hepar

Harapan dari kesimpulan tersebut di atas adalah terapi OHB 2.4 ATA dapat direkomendasikan sebagai terapi kombinasi pasien DM tipe 2 yang mendapat terapi Metformin.

## 7.2 Saran

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan yaitu tidak ada kontrol penelitian atau pasien DM tipe 2 gagal monoterapi Metformin yang tidak mendapat terapi OHB, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan *in vitro* mengenai perbandingan efek terapi antara hewan coba, yang telah dibuat diabetes, yang mendapat terapi Metformin saja dengan hewan coba yang mendapat kombinasi Metformin dan OHB terutama pada perbaikan produksi NO.

Berdasarkan pembahasan pada penelitian yang telah dilakukan ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai : 1) Efek kombinasi Metformin dan olah raga, 2) membandingkan efektivitas dan efisiensi terapi kombinasi Metformin dan OHB, Metformin dan olah raga, serta Metformin dan anti diabetik oral lain, 3) lama pengaruh terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA terhadap perbaikan produksi NO, 4) serta efek terapi kombinasi Metformin dan OHB 2.4 ATA terhadap:

- a. Aktivasi AMPK
- b. Penghambatan komplikasi pada makroangiopati akibat DM tipe 2
- c. Penyakit lain yang juga terjadi resistensi insulin, seperti Polycystic Ovary Syndroms (PCOS)

**DAFTAR PUSTAKA**

- Acker H, 2005, The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species, *Biol.Sci.Dec* 29<sup>th</sup>;360-370
- Adlam J, Bendall JK, De Bono JP, Alp J, Khoo J, Nicoli N, 2007, Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase1 double transgenic mice, *Exp Physiol* 92.1 pp 119-126
- Ahima RS, Flier JS, 2000, Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metabolism*;11:327-32.
- Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman Pc and Graves DT, 2005, Advanced Glycation End Products Enhance Expression of Pro-Apoptotic Genes and Stimulate Fibroblast Apoptosis through Cytoplasmic and Mitochondrial Pathways, *J.Bio.Chem.Vol.280*: 12087-12095
- Ahn KS, Aggarwal BB, 2005, Transcription Factor NF- $\kappa$ B : A Sensor for Smoking Stress Signals, *Ann NY Acad Sci*, Nov.57;1056:218-33
- Alderton WK, Copper CE and Knowles RG, 2001, Nitric Oxide Synthase : Structure, Function and Inhibition, *Biochem J* 367:593-615
- Alleva R, Nasole E, Di Danato F, Borghi B, Neuzil J, Tamozetti M, 2005,  $\alpha$ -Lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy, *Biochem Biophys Res Commun*; 333(2):404-10
- Al-Wailli NS, Butler GJ, 2006, Effect of hyperbaric oxygen on inflammatory response in wound and trauma; possible mechanisms of action, *Scientific World J* : 425-41
- American Diabetic Association, 2008, Diabetes statistics from the American Diabetes Association, The International Diabetes Federation, Nutrition and Metabolism Society, *Am.J.Diabetes*; 87:290-325
- American College of Sports Medicine, 2000, Guidelines for exercise testing and prescription 6<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Ammon HPT, Haring HU, Kellerer M, Laube H, Mosthaf H, 1998, Anti Diabetic Agents – Recent Advance Their Molecular and Clinical Pharmacology, Academic Press : Harcourt Brace and co, San Diego CA 92101

- Aulanni'am, 2004, Prinsip dan Teknik Analisis Bio molekuler, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, FPUB Press, Malang
- AVMA Group Health and Life Insurance Trust, 2007, Prevalence of diabetes continues to grow, AVMA journals November 15<sup>th</sup>; 201-207
- Bailey C, 2007, Treating insulin resistance: future prospects, Diab Vasc Dis Res 2007; 4-20
- Banerjee RR, Lazar RA, 2001, Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. J Biol Chem 2001;276:25970-3
- Benson RM, Minter LM, Osborne RA, Granowitz EV, 2003, Hyperbaric Oxygen inhibits-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood derived monocytes-macrophage, Clin Exp Immunol, Oct:134(1): 57-62
- Bouche C, Sherdy S, Khan CR, Goldfine AB, 2004, The cellular fate glucose and its relevance in type2 diabetes, Endocrine Review; 25(5):807-830
- Brandner, Johanna M, Zacheja S, Houdek P, Moll I, 2008, Expression of Matrix Metalloproteinases, Cytokines and Connexins in Diabetic and Nondiabetic Human Keratinocytes Before and After Transplantation into an ex Vivo wound healing model, Diabetes Care 31:114-120
- Brown J, Nichols G, Perry A, 2004, The Burden of Treatment Failure in Type 2 Diabetes, Diabetes Care Vol.27, No.7, July:190-96
- Bruchman AL, Fife C, Torres C, Smith L, Aristizabal J, 2001, Hyperbaric oxygen therapy for severe ulcerative colitis, J Clin Gastroenterol; 33(4):337-339
- Brummelkamp et al, 1961, Treatment of anaerobic infections (Clostridial myositis) by drenching tissue with oxygen under high atmospheric pressure
- Buras JA, Stahl GL, Kathy KH, Svoboda KH, Wender R, 2000, Hyperbaric Oxygen Downregulates ICAM-1 Expression induced by hypoxia and hypoglycaemia. The Role of NOS, Am J Physiol Cell 278(2):292-302
- Burke F, 2004, Review: Combination treatment with insulin and oral agents in type 2 diabetes mellitus, *British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2004; 4; 71-82
- Butler AE, Ritzler R, Risa RA, 2003,  $\beta$ -Cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, Diabetes 52:102-110

- Calvert JW, et al, 2008, Acute Metformin Therapy Confers Cardioprotection Against Myocardial Infarction Via AMPK-eNOS-Mediated Signaling, *Diabetes* Vol.58, March;204-209
- Campbell DT, Stanley J, 1967, *Experimental and Quasi – Experimental Designs for Research*, Rand McNally College Publishing Co.,Chicago; 7-12
- Chen ZP, McConnell GK, Mitchell BJ, 2000, AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl – CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: 1202–1206
- Coleman JW, 2001, Nitric oxide in immunity and inflammation, *Int.Immunopharmacol* 1 :1397-1406
- Conconi MT, et al, 2003, Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation, *J investing Med.* Jul;51(4):227-32
- Connely L, Callender MP, Amexia C, Moncanda S, Hobbs AJ, 2001, Biphasic Regulation of NF $\kappa$ B activity underlies in Pro- and Anti- Inflammatory Actions Of Nitric Oxide, *The J of Immunology.* 166:3873-3881
- Dahlan MS, 2008, *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Salemba Medika, Jakarta
- Darmansyah I, 2009, Metformin for Type 2 Diabetes, Annual Meeting of Pharmacology, FK UI July 17-18<sup>th</sup>
- David MB, 2003, Reducing Medication Errors and Increasing Patient Safety: Case Studies in Clinical Pharmacology, *J. Clin. Pharmacol.* 2003; 43; 768
- Davis J, et al, 2006, Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase, *Diabetes* Vol.55, February: 496-505
- Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA, Potter SJ and Putnam RW, 2004, Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neuron, Oxygen sensing in Health and Disease, *J of Applied Physiology* 96: 784-791
- Dipiro JT., Talbert RL., Yee GC., Matzke GR, Wells BG., Posey LM., 2009, *Pharmacotherapy : A Pathophysiologic Approach* 7<sup>th</sup> Ed., Mc. Graw Hill Companies, Inc. NY, 1223-1224

- Defronzo RA, 2003, Impaired glucose tolerance: do pharmacological therapies correct the underlying metabolic disturbance?, *British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2003; 3; S24
- Du XL, Edelstein D, Rosetti L, Pantus IG, Goldberg H, Ziyadeh P, Wu J, 2000, Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-I expression by increasing SpI glycosylation, *Proc.Na.Acad sci USA*.97:12222-12226
- Epstein FH, 1999, Glucose Transportation and Insulin Action, *British Journal of Pharmacology*; 115, 1182-1187
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM, 2003, Are Oxidative stress – activated signaling pathways mediators of Insulin resistance and  $\beta$  – cell dysfunction?, *Endocrine Reviews* 28(2):187–218
- Fisher Y, Thomas J, Rosen P, Kammermeier H, 1998, Action of Metformin on Glucose Transport and Glucose Transporter GLUT4 in Heart Muscle Cells for Healthy and Diabetic Rats, *Endocrine Society*; July;67; 476-497
- Galea E, Bhat NR, Feinstein DL, 2000, Transcriptional Regulation of the Inflammatory Nitric Oxide Synthase Gene : Convergence of Cytosolic and Nuclear Signals. 6:123-145
- Garber A, et al, 2003, Efficacy of Glyburide/Metformin Tablets Compared with Initial Monotherapy in Type 2 Diabetes, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(8):3598–3604
- Gehrig and Daniels PPAD, 2002, *Diabetes Mellitus and Oral Disease*, 16 (1): 84-87
- Gill AL and Bell CAN, 2004, Hyperbaric Oxygen : its uses, mechanism of action and outcomes, *Review, QJ Med.* 97:385-395
- Goodman Gilman A, 2006. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11<sup>th</sup> ed, The Mc Graw-Hill Companies, Inc., NY, USA; Ch.60; 1289-95
- Golan DE, Tashijan AH, Armstrong EJ, Armstrong AW, 2008, *Principles of Pharmacology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; SectionIV(29):529-548
- Graves DT, et al, 2006, Diabetes – enhanced Inflammation and Apoptosis Impact on Vascular Pathology, *Diabetes Vol.45*: 127-135

- Greenbaum C, Harrison LC, 2008, Diabetes : translating research into practice, Informa Healthcare USA, Inc.Illinois.; 23-60
- Green K., Brand M.D., Murphy M.P., 2004, Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes, Diabetes Vol.. 53, Supplement 1
- Guritno, 2005, Hyperbaric Oxygen Therapy in Treatment on Diabetic, Seminar Nasional PSMKGI, FKG Hang Tuah Surabaya, July 25<sup>th</sup>
- Hanssen KF, 2000, Making sense of advanced glycation endproducts (AGEs), Dept.of Endocrinology, Diabetes Research Center, Oslo, Norway: 167-182
- Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF, 2007, Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus, Diab Vasc Dis Res 2007; 4; 89-93
- Hardie DG, 2003, Minireview : The AMP-activated Protein Kinase Cascade : The Key Sensor of Cellular Energy Status, Endocrinology Vol.144 (12-18)
- Harris et al, 2000, Early detection of undiagnosed diabetes mellitus, a US perspective. Diabetes Metab Res Rev;16:230-6
- Hashikawa T, Terakura M, Saho T, 2003, Involvement of CD73 (ecto-59-nucleotidase) in Adenosine Generation by Human Fibroblast, J Phy 82(11):888-92
- Hermans MP, 2007, Diabetic macro- and microvascular disease in type 2 diabetes, Diab Vasc Dis Res 2007; 4; 57-63
- Hink J, Thorn ST, Simonsen U, Rubin I, Jansen E, 2006, Vascular reactivity and endothelial NOS activity in rat thoracic aorta during and after hyperbaric oxygen exposure, Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:1988-1998
- Isley WI and Oki J, 2005, Diabetes Mellitus Type 2 : Diabetes, Metabolism, and Nutrition, Mayo Clinic of Rochester, July : 14:39-47
- Kahn SE, Haffner, S, Heise M, Herman W, Holman R, Jones NP., Kravitz BG.,Lachin JM, O'Neil C, Zimman B, Viberti G, 2006, Glycemic durability of Rosiglitazon, Metformin, or Glyburide Monotherapy, N Engl J Med;355:2427-43
- Katzung B.G, 2008, Basic & Clinical Pharmacology, 10<sup>th</sup> ed, University of California, San Fransisco; Ch.41;987-1034
- Kendall H., Haase H, Li Y, Xiao and Bartold, 2000, Nitric Oxide Synthase type II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblast, J.Periodonta; Res.35:194-200



- Kiem Y, et al, 2008, Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP, *Diabetes* Vol.57, February 2008
- Knighton DR, Silver JA, Hunt TK, 1984, Oxygen as an antibiotic the effect of inspired oxygen on infection, *Arch Surg*199: 199-204
- Lee JIL, Yu BP, Chung HY, 2005, Activation mechanism of endothelial NF- $\kappa$ B, IKK, and MAP Kinase by tert-butyl hydroperoxidase, *Free Radical Research*, 39(4):399-409
- Mathieu D, 2006, *Handbook Hyperbaric Medicine*, Springer, The Netherland, Amsterdam:25-30
- Mc Neill, 2000, *Experimental Models in Diabetes*, CRC Press, 1999, ISBN 0-8493-1667
- Mealy BI, Rethman MP, 2006, Periodontal Disease and Diabetes Mellitus, *Dent.Today*, Apr:22(4): 107-13(A)
- Monnier L, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C, Yoshie H, 2002, Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor Alpha and Beta are Released from Human Cultured Gingival Sheets, *Jul*;73(7):748-53
- Morrow V, 2003, Direct Activation of AMP-activated Protein Kinase Stimulates Nitric-oxide Synthesis in Human Aortic Endothelial Cells, *J Bio Chem*, Vol.278, No.34
- Musi N. et al, 2002, Metformin Increased AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects with Type2 Diabetes, *Diabetes*, Vol.51; 2074-82
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, 2006, *Harper's illustrated Biochemistry* 27<sup>th</sup> ed. The Mc Graw Co. Lange Medical Publication
- Nicolaidis E, Jones C, 2002, Review: Type 2 diabetes \_ implications for macrovascular mechanics and disease, *British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2002; 2; 9
- Niinikoshi J, 2006, Physiologic effects of hyperbaric oxygen on wound healing process. In Mathieu D,2006,*Handbook Hyperbaric Medicine*,Springer, The Netherland : 135-145
- Oktarina, 2006, *SPSS 13.0 untuk orang awam*, Maxikom,Palembang; 23-39



- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L, 2007, Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, *Physiol Rev.* January; 87(1): 315-424
- Pais I, Hallschmid M, Jauch-Chara K, 2007, mood and cognitive functions during acute euglycaemia and mild hyperglycaemia in type 2 diabetic patients, *Exp.Clin.Endocrinology Diabetes* 115 (1):42-6
- Prince M, 2004, *Hyperbaric Oxygen, Medicine*, Available from <http://www.emedicine.com/ent/topic733.htm>. access on July 10<sup>th</sup> 2009
- PERKENI (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia), *Petunjuk Praktis Terapi Insulin pada Pasien Diabetes Mellitus*, 2007, Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 4-29
- Rathel TR, Leikert JF, Volimar AM, Dirsch VM, 2005, The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro, *Br.J.Pharmacol*;144;394-399
- Richard MD.,Neubauer and Walker M, 2004, *Hyperbaric Oxygen Therapy Research. The Role of G-Proteins in the Pathophysiology of the Cardiovascular Diseases*, *Arq.Bras.Cardiol.vol.72:2*
- Saeedi R et al, 2008, Metabolic action in the heart can occur by AMPK-independent mechanism, *Am J Physiol Heart Circ* March 28 : 134-6
- Sandau KB, Brune B, 2001, Accumulation of HIF-1 $\alpha$  under the Influence of Nitric Oxide, *Immunobiology. Blood*, February 15<sup>th</sup>, Vol.97, Number 4 : 1009-15
- Salvemini D, Ischiropoulos H, Cuzzocrea S, 2003, Roles of Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation, *Methods Mol.Bio.*; 225; 291-303
- Sastroasmoro S, Ismael S, 2002, *Dasar-dasar Metodologi Klinis Edisi ke-2, CV SAGUNG SETO*; 44-51
- Scarpello JH, Howlett HC, 2008, Metformin therapy and clinical uses, *Diab Vasc Dis Res* 2008; 5; 157
- Selvin E, Bolen S, Yeh HC, Willey C, Wilson L, Marinopoulos, Feldman L, Vassy J, Wilson R, Bass EB, Brancati F, 2008, Cardiovascular Outcomes in Trials of Oral Diabetes Medications, *Arch Intern Med.* 2008;168(19):2070-2080
- Shyu WC, Lin SZ, Saeki K, 2004, Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cel line. *Cell Mol.Neurobiol.* 24(2): 257-68

- Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Sceppa CC, 2004, Physical Activity/Exercise and type 2 Diabetes, *Diabetes Care*, Vol. 27(10) : 2517-2538
- Smith APS, 2004, The role of MMPs in Chronic Wound Edema, *Pediatry today*, Vol.16 Issue 8:22-26
- Southerland JH, Taylor GW, Offenbacher S, 2005, Diabetes and Periodontal Infection : making connection, *Clinical Diabetes* 23: 171-178s
- Storey AM, Perry CJ, Petrie JR, 2001, Review : Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes, *British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2001;1;22
- Sugiyono, 2008, *Statistik untuk Penelitian*, CV Alfa Beta, Bandung
- Supari SF, 2005, Pembukaan Dialog Interaktif bertajuk : "Diabetes? Jangan Takut", 8 Juni, [www.depkes.go.id](http://www.depkes.go.id) access on July 7<sup>th</sup> 2009
- Thameem F, et al, 2008, Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 Diabetes, *Diab Vasc Dis Res*; Vol. 5; 109-120
- Tibbles P, Eldesberg JS, 1996, Hyperbaric oxygen therapy, *N Eng J Med*: 334: 1642-8
- Thum T, et al, 2007, Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Function in Diabetes, *Diabetes* Vol.56, March : 143
- Walchenberg, 2006,  $\beta$  cell failure in Diabetes and Prevention by Clinical Treatment, *Endocrine Reviews* 28(2):187-218
- Wang YF et al, 2000, *Antioxidant and Redox Regulation of Genes*, Academic Press, San Diego, CA, USA
- Wiernsperger NF, 2008, Review: 50 years later: is Metformin a vascular drug with antidiabetic properties?, *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*; 7; 204-216
- Wijayatno, 2000, Pengaruh Terapi Oksigen Hiperbarik terhadap penurunan kadar glukosa darah, Tugas Akhir Pascasarjana Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga, Surabaya
- Wright J, 2003, Hyperbaric oxygen therapy for wound healing, *Am J Diabetes*. Mar 74(3):296-306

- Yamagata et al, 1996, Mutation in the hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  gene in maturity – onset diabetes of the young, *Nature*; 338: 455-460
- Yamane T, 1973, *Statistic an Introductory Analysis 3<sup>rd</sup> Ed.*, Aoyama Gakuin University; 12-18
- Yamashita M, 2000, Hyperbaric Oxygen treatment attenuates cytokine introduction after massive hemorrhage, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* May;278(5):E811-6tey endothelium, *J Cardiovasc Pharmacol*; 36:242-247
- Yang S, Bae L, Zhang L, 2000, Estrogen increases eNOS dan NOx release in human coronary artery, *Circ Res.*;82:10-12
- Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, 2008, hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol.* March; 13; 298-309
- Zhou G, et al, 2001, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74

## LAMPIRAN 1

### INFORMATION FOR CONSENT

Informasi mengenai keuntungan dan risiko mendapatkan terapi kombinasi Metformin dan Oksigen Hiperbarik untuk pasien diabetes perlu disampaikan kepada pasien sebelum menyatakan persetujuan medis sebagai subyek dalam studi ini, sebab mendapat informasi yang sebenarnya adalah hak pasien.

Bapak merupakan salah satu pasien yang terpilih sebagai subyek dalam studi yang bertujuan untuk mencari alternatif untuk mengoptimalkan terapi Metformin yang sebelumnya telah bapak konsumsi, yaitu dengan memberikan terapi tambahan oksigen hiperbarik (OHB) yang dilakukan di Lakesla Rumah Sakit Angkatan Laut dr. Ramelan, Surabaya. Manfaat dari kombinasi terapi Metformin dan OHB adalah untuk mengoptimalkan penurunan kadar glukosa darah sehingga mendekati normal dan memperbaiki fungsi pembuluh darah sehingga komplikasi Diabetes dapat dicegah lebih dini.

Informasi yang perlu bapak ketahui tersebut meliputi :

1. Proses pemilihan pasien sebagai subyek dalam studi ini. Subyek terpilih dalam studi ini adalah pasien yang telah memenuhi kriteria seperti berikut :
  - Penderita DM Tipe 2, laki – laki dengan usia 50 – 65 tahun
  - tanpa gangguan metabolik/penyakit penyerta lainnya (hipo/hipertiroideme, cushing sindrom, penyakit jantung koroner, stroke, *cludicatio intermittent*, penyakit paru obstruktif menahun, BPH, anoreksia bulimia)
  - faal hati dan faal ginjal dalam batas normal
  - melalui survey pra penelitian : telah mengalami kegagalan monoterapi Metformin (masih hiperglikemia, dari indikator Gula Darah Acak (GDA) >200mg/dl, Gula Darah Puasa (GDP) > 126 mg/dl dan atau Hb A1c>7% setelah 3 bulan monoterapi Metformin 4 x 500 mg secara rutin setiap hari)
  - mengikuti program diet DM
  - tidak mendapat terapi Insulin
  - bersedia ikut serta dalam penelitian, yang dibuktikan dengan tanda tangan pada *inform consent*

Meski telah memenuhi kriteria tersebut di atas, pasien tidak diperkenankan menjadi subyek penelitian, bila:

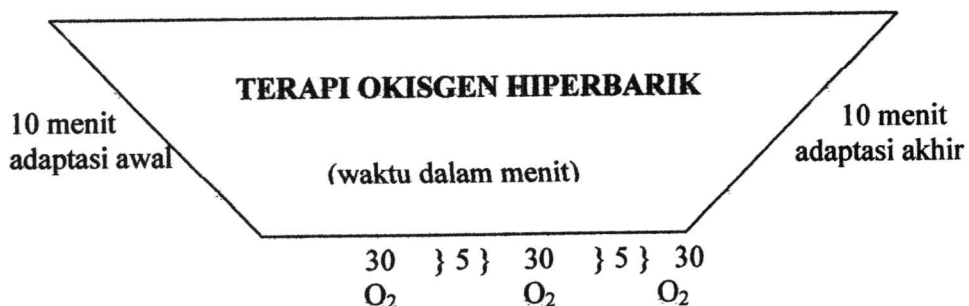
- kontraindikasi untuk terapi OHB, antara lain : gagal jantung kongestif, gangguan membrana timpani
- kontraindikasi terapi Metformin, antara lain infeksi kronis, mempunyai riwayat penyakit paru obstruksi menahun seperti asma dan pneumonia
- tekanan darah tinggi, sistolik >160mmHg, atau diastolik >100 mmHg
- merokok

- o ada gejala dan tanda makroangiopati berupa stroke, penyakit jantung koroner, claudicatio intermittens, gangren atau ulkus diabetik
- o gangguan psikis : *claustrophobia, panic disorder*
- o kondisi apapun yang berdasarkan pendapat peneliti bisa membahayakan subyek
- o tidak mengkonsumsi anti oksidan : supplement, kapsul  $\text{Ca}^{2+}$ , Vitamin E dan lainnya dalam 6 bulan terakhir

Bapak dinyatakan gagal dalam terapi pada penelitian ini (kriteria kegagalan ditentukan oleh pihak ketiga, yaitu salah satu dari ahli oksigen hiperbarik, ahli penyakit dalam, ahli penyakit jantung, ahli penyakit THT, ahli penyakit mata dan ahli penyakit saraf), bila bapak mengalami, antara lain :

- o Mengalami gejala barotrauma dan toksisitas Oksigen
  - o Tidak menjalankan terapi sesuai dengan prosedur di atas
  - o Meninggal dunia karena sebab apa pun selama terapi berlangsung. Penyebab meninggal dunia diselidiki dengan baik
2. Terapi yang diperoleh paka yaitu : Metformin 4 x 500mg, Oksigen Hiperbarik (OHB) 2.4 ATA selama 10 hari atau sesi, diberikan secara gratis
  3. Dalam 1 sesi terapi OHB, pasien berada dalam ruang khusus yaitu Ruang Udara Bertekanan Tinggi (RUBT) selama 2 jam. Aktivitas yang dilakukan dalam RUBT meliputi : (1). adaptasi terhadap peningkatan tekanan selama 10 menit awal, pada proses ini tekanan udara dalam RUBT dinaikkan perlahan sehingga mencapai 2.4 ATA dan pasien menghirup udara biasa atau udara dalam RUBT, bila pasien mengalami nyeri di telinga akibat perbedaan tekanan maka harus melakukan valsava, (2). Pasien menghirup Oksigen 100% selama 3x30 menit dalam tekanan 2,4 ATA dengan 5 menit menghirup udara biasa, kemudian (3). adaptasi terhadap penurunan tekanan selama 10 menit untuk kembali pada tekanan normal secara perlahan dan pasien menghirup udara biasa

Seperti orang menyelam (berada di bawah air yang bertekanan atmosfer 2.4 ATA



4. Bapak mendapat istirahat bebas terapi OHB 2 hari (2x24 jam) setelah 5 sesi pertama
5. Keuntungan terapi Metformin pada pasien Diabetes:
  - a. Penurunan kadar glukosa darah secara bertahap sesuai dengan peningkatan sensitivitas reseptor Insulin
  - b. Penurunan kadar lemak darah terutama Trigliserida
  - c. Penurunan berat badan
  - d. Perbaikan terhadap fungsi pembuluh darah
  - e. Menjaga fungsi jantung tetap baik (*cardioprotective*)
6. Efek samping terapi Metformin yang dapat dialami :
  - a. Gangguan pencernaan seperti kembung, mual namundapat diatasi dengan peningkatan dosis terapi Metformin secara bertahap dan pemberian Metformin saat atau bersama dengan makanan
  - b. Gangguan absorpsi vitamin B12 dan asam folat
  - c. Gangguan fungsi ginjal dan hati, bila asupan kalori rendah
7. Keuntungan terapi OHB :
  - a. Mengurangi hipoksia faktor dan iskemia
  - b. Mempengaruhi reaktivitas pembuluh darah dan mengurangi edema/bengkak
  - c. Meningkatkan *nitric oxide* sehingga terjadi pelebaran pembuluh darah (vasodilatasi)
  - d. Merangsang proliferasi sel dan meningkatkan deposit kolagen sehingga mempercepat proses penyembuhan luka
  - e. Meningkatkan efektivitas antibiotika
  - f. Modulasi respons imun
8. Efek samping terapi OHB yang dapat dialami :
  - a. Barotrauma seperti : gendhang telinga pecah (rupture membrane tymphani), mimisan (epistaxis), spontan bleeding, pneumothorax
  - b. Intoksikasi Oksigen : kejang
  - c. Claustrophobia (ketakutan pada ruang tertutup)
9. Hak bapak sebagai subyek dalam studi ini :
  - o Mendapatkan penanganan medis bila selama studi klinis ini berlangsung terjadi efek samping/bahaya dari terapi oksigen hiperbarik dan oral anti diabetes sesuai protokol. Adapun penanganan medis menjadi tanggung jawab pimpinan proyek, sedangkan dampak/bahaya yang terjadi akibat perjalanan/komplikasi penyakit bapak bukan menjadi tanggung jawab pimpinan proyek. Penentuan diagnosis dampak/bahaya yang terjadi pada saya ditentukan oleh tim ahli sebagai pihak ketiga, yang terdiri dari ahli oksigen hiperbarik

- Tidak ada beban materi berupa uang/barang yang dibebankan kepada saya, sehingga terapi Metformin dan OHB yang diberikan selama masa studi ini berlangsung adalah gratis atau tanpa biaya
- Kewajiban bapak sebagai subyek dalam studi ini :
  - Patuh terhadap prosedur studi sesuai dengan ketentuan tersebut di atas

## LAMPIRAN 2

## PERNYATAAN PERSETUJUAN MEDIS

**Nama** : .....

**Tanggal lahir** : .....

**Umur** : .....

**Alamat** : .....

**Telepon** : .....

**Pekerjaan** : .....

1. Saya yang bertanda tangan di bawah ini secara sadar dan sukarela, dengan ini menyatakan bersedia :
  - a. mengikuti studi klinis sesuai dengan prosedur yang telah direncanakan. Mengikuti terapi oksigen hiperbarik di Lakesla RSAL Dr. Ramelan Surabaya, pada hari kerja (Senin-Jumat), total selama 10 sesi, 1 sesi / hari, 2 jam 5 menit yang terdiri dari 10 menit awal tekanan dinaikkan perlahan dan menghirup udara biasa, 3x30 menit menghirup Oksigen 100% dalam tekanan 2,4 ATA dengan 5 menit menghirup udara biasa, kemudian 10 menit untuk kembali pada tekanan normal secara perlahan / sesi, istirahat terapi 2 hari setelah 5 sesi pertama.
  - b. mematuhi semua prosedur yang akan dilaksanakan selama studi klinis ini berlangsung, berupa wawancara, pemeriksaan fisik setiap memulai terapi oksigen hiperbarik, pemeriksaan laboratorium sebanyak 2 kali yaitu pada awal dan akhir terapi oksigen hiperbarik, program diet Diabetes Mellitus yang telah ditentukan, oral antidiabetes yang telah ditentukan, petunjuk dari petugas oksigen hiperbarik ketika berada di dalam ruang hiperbarik.
  - c. Memberikan informasi yang sebenarnya selama mengikuti studi klinis demi kepentingan studi klinis ini, baik saat wawancara, saat akan dilakukan pemeriksaan fisik, saat akan dilakukan pemeriksaan laboratorium, dan segala hal yang berkaitan dengan studi klinis ini.
2. Saya mengerti dan memahami bahwa prosedur yang digunakan telah mendapat pengesahan dari Departemen Kesehatan Republik Indonesia tentang keamanan prosedur tersebut. Saya telah mengerti bahwa indikasi terapi oksigen hiperbarik untuk studi klinis ini telah sesuai dengan ilmu kedokteran sebagaimana yang telah dijelaskan pimpinan proyek. Saya telah mengerti bahwa ada kontraindikasi dan risiko/bahaya/efek samping dari terapi oksigen hiperbarik ini dan saya telah mendapat penjelasan dari pimpinan proyek.
3. Saya telah mempelajari protokol studi melalui diskusi dan wawancara dengan pimpinan proyek studi, dan saya telah memahami dengan jelas tujuan dan metode yang digunakan.



4. Saya mengerti bahwa studi ini sering dilakukan dan terbukti tidak mengancam jiwa partisipan.
5. Saya mengerti bahwa saya dapat mengundurkan diri dari studi tersebut setiap saat dan membatalkan pernyataan ini.
6. Saya berhak mendapatkan penanganan medis bila selama studi klinis ini berlangsung terjadi efek samping/bahaya dari terapi oksigen hiperbarik dan oral anti diabetes sesuai protokol. Adapun penanganan medis menjadi tanggung jawab pimpinan proyek, sedangkan dampak/bahaya yang terjadi akibat perjalanan/komplikasi penyakit saya menjadi tanggung jawab saya sendiri. Penentuan diagnosis dampak/bahaya yang terjadi pada saya ditentukan oleh tim ahli sebagai pihak ketiga, yang terdiri dari ahli oksigen hiperbarik dan ahli penyakit dalam.
7. Saya mengerti bahwa selama mengikuti studi klinis ini tidak ada beban materi berupa uang/barang yang dibebankan kepada saya.
8. Saya bersedia menerima semua hasil terapi yang terjadi pada diri saya dalam studi klinis ini.
9. Saya bersedia mengikuti keputusan pimpinan proyek bila dalam studi klinis ini saya tidak diijinkan lagi mengikuti studi klinis ini karena studi klinis telah selesai atau sebab lain.
10. Saya telah membaca, mempelajari, dan dengan sadar menyetujui pernyataan ini.

Surabaya,

.....

Saksi

.....

( saudara/pihak ketiga )

.....

( partisipan )

Saksi

.....

**LAMPIRAN 3****KUISIONER**

Nama : .....

Tanggal Lahir : .....

Umur : .....

Alamat : .....

Telp : .....

Pekerjaan : .....

NO.	PERTANYAAN	YA	TIDAK
1	Apakah anda menderita penyakit diabetes mellitus (kencing manis) ?		
2	Apakah anda menderita diabetes mellitus sudah > 5 tahun ?		
3	Apakah anda dinyatakan menderita diabetes pada umur > 40 tahun ?		
4	Apakah anda mengalami gangguan penglihatan ?		
5	Apakah anda pernah menjalani operasi mata ?		
6	Apakah anda mengalami gangguan sensasi rasa tebal di jari-jari tangan/kaki atau bagian tubuh yang lain ?		
7	Apakah anda mengalami rasa kesemutan ?		
8	Apakah anda mendapat obat minum antidiabetes Metformin saat ini ?		
9	Apakah anda mendapat obat suntik insulin saat ini ?		
10	Apakah anda pernah putus berobat (drop out) ?		
11	Apakah anda masih merokok sampai saat ini ?		
12	Apakah anda pernah menjalani cuci darah (hemodialisis) ?		
13	Apakah sampai saat ini anda masih menjalani cuci darah ?		
14	Apakah sampai saat ini anda mengalami perdarahan dubur akibat wasir atau penyakit dubur lainnya ?		
15	Apakah sampai saat ini anda mengalami perdarahan hidung/mimisan ?		
16	Apakah sampai saat ini anda mengalami perdarahan gusi ?		
17	Apakah sampai saat ini anda mengalami batuk darah ?		
18	Apakah sampai saat ini anda mengalami muntah darah ?		
19	Apakah anda pernah mengalami kelemahan/kelumpuhan setengah badan ?		
20	Apakah anda pernah mengalami bicara pelo ?		
21	Apakah anda pernah mengalami sesak napas ?		

22	Apakah anda pernah mengalami nyeri dada ?		
23	Apakah anda pernah/sedang mengalami luka yang lama mengering ?		
24	Apakah anda juga menderita penyakit kelenjar gondok ?		
25	Apakah anda juga menderita penyakit dengan wajah bengkak dan banyak tumbuh rambut ?		
26	Apakah anda juga menderita penyakit tumor/kanker ?		
27	Apakah anda juga menderita penyakit dengan nyeri sendi/linu (reumatik) ?		
28	Apakah anda juga mengalami gangguan selalu ingin menghindari / memuntahkan makanan ?		
29	Apakah anda juga mengalami batuk lama ?		
30	Apakah anda juga mengalami penyakit infeksi ?		
31	Apakah anda juga mengalami penyakit lambung/usus ?		
32	Apakah anda juga mengalami sakit kuning (hepatitis) ?		
33	Apakah anda juga mengalami gangguan kencing, berupa sulit kencing, kencing terputus-putus, tidak bisa menahan kencing, atau rasa sisa setelah kencing ?		
34	Apakah anda juga mengalami penyakit darah selain anemia ?		
35	Apakah anda mempunyai alergi obat ?		
36	Apakah anda mempunyai alergi Metformin ?		
37	Apakah anda mengalami gangguan pendengaran saat ini?		
38	Apakah anda mengalami gangguan keseimbangan saat ini?		
39	Apakah anda pernah menjalani operasi telinga ?		
40	Apakah anda mengalami sinusitis ?		
41	Apakah anda pernah menjalani operasi sinus ?		
42	Apakah anda mengalami pilek ?		
43	Apakah anda mendapat obat untuk pilek/sinusistis ?		

Surabaya, .....

Pewawancara,

.....

## LAMPIRAN 4

### Teknik Pemeriksaan ELISA Kadar eNOS

#### Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel untuk pemeriksaan ELISA eNOS adalah eritrosit yang diambil dari darah. Darah disimpan dalam *vacuntainer* EDTA 3ml. Dilakukan sel lisis dengan cara: 1) pemutaran (*centrifuge*) selama 5 menit dengan kecepatan 300xg, 2) cuci sel dengan salin, kemudian dilakukan *centrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 300xg, proses kedua ini dilakukan dua kali, 3) hitung eritrosit menggunakan pewarnaan hayem, encerkan hingga jumlah eritrosit 1000/ml 4) pisahkan dan buang *supernatant* kemudian setelah proses lisis menggunakan *cell lysis buffer* pada suhu 2-8<sup>0</sup>C (1 mL bufer per 1 x 10<sup>6</sup> sel), 5) *centrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 300xg, 6) pindahkan *supernatant* untuk segera dilakukan *assay* atau disimpan dalam suhu ≤ -20<sup>0</sup> C.

#### Pemeriksaan ELISA

Melakukan *coating* sampel dan standard pada *microplate* ELISA dengan *buffer coating* selama 2 jam pada *horizontal orbital microplate shaker* (0.12" orbit) set dengan kecepatan 500 ± 50 rpm.. Dilakukan pencucian dengan *washing buffer* selama 3 kali masing – masing dalam waktu 5 menit. Inkubasi dengan antibodi primer (reagen A) 100 uL, *human anti eNOS* selama 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. *Washing* dengan *washing buffer* selama 3 kali masing – masing dalam waktu 5 menit. Inkubasi dengan antibodi sekunder (reagen B) 100 uL selama 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. *Washing* dengan *washing buffer* selama 3 kali masing – masing dalam waktu 5 menit. Inkubasi dengan *substrate solution* 90 uL selama 30 menit dan proteksi dari cahaya. Setelah 30 menit tambahkan *stop solution* 50 uL dan baca setelah 15 menit dengan ELISA reader pada panjang gelombang 540-570 nm. Hasil absorbansi dikonversi ke dalam konsentrasi dengan pengeplotan pada kurva standar eNOS

## LAMPIRAN 5

## Hasil Analisis Data (SPSS Versi 14.0)

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
eNOS1	10	36.8270	45.41032	2.71	153.20
eNOS2	10	88.7960	104.68208	26.75	367.00
eNOS3	10	578.4950	580.77116	83.60	1990.00
GDP1	10	188.1000	51.64075	135.00	274.00
GDP2	10	133.3000	34.92866	93.00	202.00
GDP3	10	106.6000	14.74374	90.00	130.00
HbA1C	10	8.0200	.38816	7.60	8.70
BUN1	10	14.7100	3.00867	10.60	19.00
BUN2	10	14.4900	3.06719	10.40	18.00
BUN3	10	14.1100	2.45784	10.80	18.90
SK1	10	.9200	.18135	.70	1.20
SK2	10	.9200	.13166	.70	1.10
SK3	10	.9200	.14757	.70	1.10
SGOT1	10	18.5000	4.55217	14.00	29.00
SGOT2	10	17.1000	3.78447	14.00	26.00
SGOT3	10	18.6000	4.40202	14.00	27.00
SGPT1	10	18.1000	4.81779	13.00	30.00
SGPT2	10	17.8000	4.41714	12.00	28.00
SGPT3	10	17.5000	3.65908	12.00	26.00

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eNOS1	eNOS2	eNOS3	GDP1	GDP2	GDP3	HbA1C
N		10	10	10	10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	36.82	88.79	578.49	188.10	133.30	106.60	8.02
	Std. Deviation	45.41	104.68	580.77	51.64	34.93	14.74	.39
Most Extreme Differences	Absolute	.29	.29	.28	.17	.15	.22	.14
	Positive	.29	.29	.28	.17	.15	.22	.12
	Negative	-.22	-.27	-.19	-.16	-.12	-.15	-.14
Kolmogorov-Smirnov Z		.93	.92	.91	.56	.47	.69	.44
Asymp. Sig. (2-tailed)		.35	.35	.37	.91	.98	.71	.99

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		BUN1	BUN2	BUN3	SK1	SK2	SK3
N		10	10	10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	14.71	14.49	14.11	.92	.92	.92
	Std. Deviation	3.09	3.07	2.46	.18	.13	.15
Most Extreme Differences	Absolute	.17	.19	.19	.27	.16	.21
	Positive	.14	.19	.19	.19	.16	.13
	Negative	-.17	-.16	-.09	-.27	-.14	-.21
Kolmogorov-Smirnov Z		.52	.60	.59	.85	.51	.65
Asymp. Sig. (2-tailed)		.94	.85	.87	.45	.96	.79

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		SGOT1	SGOT2	SGOT3	SGPT1	SGPT2	SGPT3
N		10	10	10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	18.50	17.10	14.11	18.10	17.80	17.50
	Std. Deviation	4.55	3.78	2.46	4.82	4.42	3.66
Most Extreme Differences	Absolute	.18	.21	.19	.25	.21	.24
	Positive	.18	.21	.19	.25	.21	.24
	Negative	-.16	-.21	-.15	-.14	-.14	-.15
Kolmogorov-Smirnov Z		.57	.68	.61	.78	.66	.76
Asymp. Sig. (2-tailed)		.91	.75	.85	.58	.78	.61

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

## Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	eNOS1	36.8270	10	45.41032	14.36000
	eNOS2	88.7960	10	104.68208	33.10338
Pair 2	eNOS2	88.7960	10	104.68208	33.10338
	eNOS3	578.4950	10	580.77116	183.65597
Pair 3	eNOS1	36.8270	10	45.41032	14.36000
	eNOS3	578.4950	10	580.77116	183.65597
Pair 4	GDP1	188.1000	10	51.64075	16.33024
	GDP2	133.3000	10	34.92866	11.04541
Pair 5	GDP2	133.3000	10	34.92866	11.04541
	GDP3	106.6000	10	14.74374	4.66238
Pair 6	GDP1	188.1000	10	51.64075	16.33024
	GDP3	106.6000	10	14.74374	4.66238
Pair 7	BUN1	14.7100	10	3.00867	.95143
	BUN2	14.4900	10	3.06719	.96993
Pair 8	BUN2	14.4900	10	3.06719	.96993
	BUN3	14.1100	10	2.45784	.77724
Pair 9	BUN1	14.7100	10	3.00867	.95143
	BUN3	14.1100	10	2.45784	.77724
Pair 10	SK1	.9200	10	.18135	.05735
	SK2	.9200	10	.13166	.04163
Pair 11	SK2	.9200	10	.13166	.04163
	SK3	.9200	10	.14757	.04667
Pair 12	SK1	.9200	10	.18135	.05735
	SK3	.9200	10	.14757	.04667
Pair 13	SGOT1	18.5000	10	4.55217	1.43952
	SGOT2	17.1000	10	3.78447	1.19675
Pair 14	SGOT2	17.1000	10	3.78447	1.19675
	SGOT3	18.6000	10	4.40202	1.39204
Pair 15	SGOT1	18.5000	10	4.55217	1.43952
	SGOT3	18.6000	10	4.40202	1.39204
Pair 16	SGPT1	18.1000	10	4.81779	1.52352
	SGPT2	17.8000	10	4.41714	1.39682
Pair 17	SGPT2	17.8000	10	4.41714	1.39682
	SGPT3	17.5000	10	3.65908	1.15710
Pair 18	SGPT1	18.1000	10	4.81779	1.52352
	SGPT3	17.5000	10	3.65908	1.15710

## Paired Samples Correlations

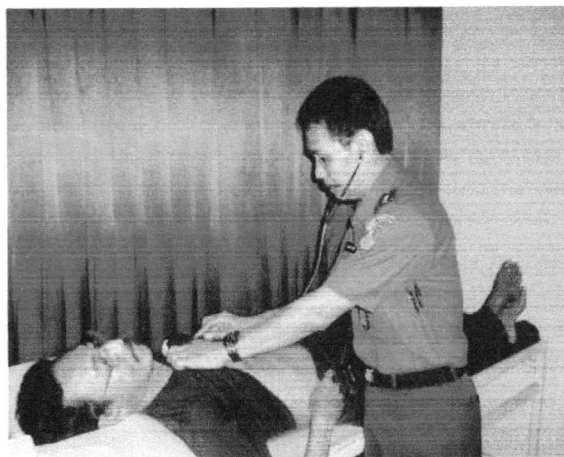
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	eNOS1 & eNOS2	10	-.064	.860
Pair 2	eNOS2 & eNOS3	10	-.159	.661
Pair 3	eNOS1 & eNOS3	10	-.107	.769
Pair 4	GDP1 & GDP2	10	.871	.001
Pair 5	GDP2 & GDP3	10	.716	.020
Pair 6	GDP1 & GDP3	10	.624	.054
Pair 7	BUN1 & BUN2	10	.709	.022
Pair 8	BUN2 & BUN3	10	.849	.002
Pair 9	BUN1 & BUN3	10	.754	.012
Pair 10	SK1 & SK2	10	.819	.004
Pair 11	SK2 & SK3	10	.949	.000
Pair 12	SK1 & SK3	10	.897	.000
Pair 13	SGOT1 & SGOT2	10	.893	.000
Pair 14	SGOT2 & SGOT3	10	.936	.000
Pair 15	SGOT1 & SGOT3	10	.871	.001
Pair 16	SGPT1 & SGPT2	10	.951	.000
Pair 17	SGPT2 & SGPT3	10	.942	.000
Pair 18	SGPT1 & SGPT3	10	.879	.001

## Paired Samples Test

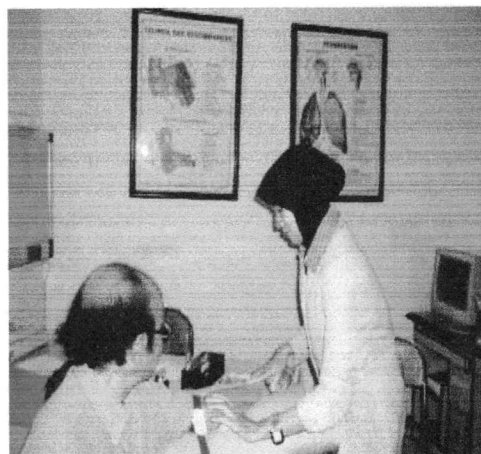
		Paired Differences				t	df	Sig.	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	eNOS1 - eNOS2	-51.97	116.76	36.92	-135.49	31.55	-1.408	9	.193
Pair 2	eNOS2 - eNOS3	-489.69	606.26	191.72	-923.39	-56.01	-2.554	9	.031
Pair 3	eNOS1 - eNOS3	-541.67	587.36	185.74	-961.84	-121.49	-2.916	9	.017
Pair 4	GDP1 - GDP2	54.80	27.29	8.63	35.28	74.32	6.351	9	.000
Pair 5	GDP2 - GDP3	26.70	26.46	8.37	7.77	45.63	3.191	9	.011
Pair 6	GDP1 - GDP3	81.50	43.98	13.91	50.04	112.96	5.861	9	.000
Pair 7	BUN1 - BUN2	.22	2.32	.73	-1.44	1.88	.300	9	.771
Pair 8	BUN2 - BUN3	.38	1.63	.51	-.78	1.54	.739	9	.479
Pair 9	BUN1 - BUN3	.60	1.99	.63	-.82	2.02	.955	9	.364
Pair 10	SK1 - SK2	.00	.11	.03	-.08	.08	.000	9	1.000
Pair 11	SK2 - SK3	.00	.05	.015	-.03	.03	.000	9	1.000
Pair 12	SK1 - SK3	.00	.08	.03	-.06	.06	.000	9	1.000
Pair 13	SGOT1 - SGOT2	1.40	2.07	.65	-.08	2.87	2.143	9	.061
Pair 14	SGOT2 - SGOT3	-1.50	1.58	.50	-2.6	-.37	-3.000	9	.015
Pair 15	SGOT1 - SGOT3	-.10	2.28	.72	-1.73	1.53	-.139	9	.893
Pair 16	SGPT1 - SGPT2	.30	1.49	.47	-.77	1.37	.635	9	.541
Pair 17	SGPT2 - SGPT3	.30	1.57	.49	-.82	1.42	.605	9	.560
Pair 18	SGPT1 - SGPT3	.60	2.37	.75	-1.09	2.29	.802	9	.443



FOTO KEGIATAN



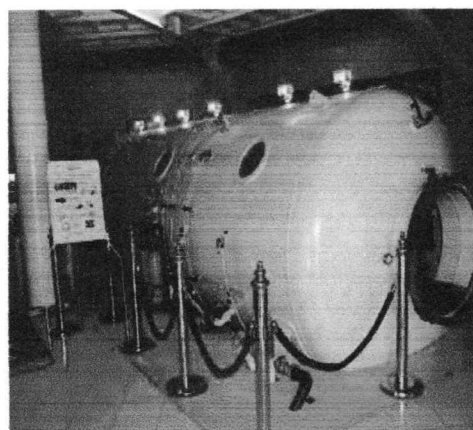
Pemeriksaan Fisik oleh dokter Lakesla



Pengambilan sampel



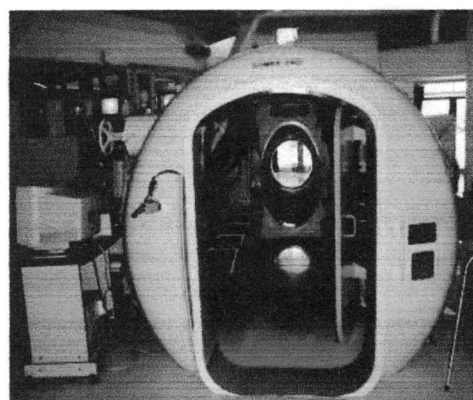
Meja Panel



RUBT (tampak samping )



Tempat Pelaksanaan Kegiatan



RUBT ( tampak depan )



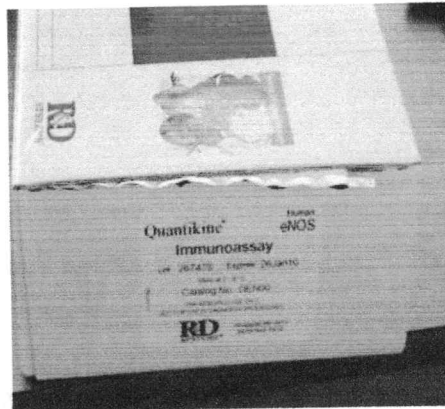
RUBT ( tampak dalam )



Petugas RUBT



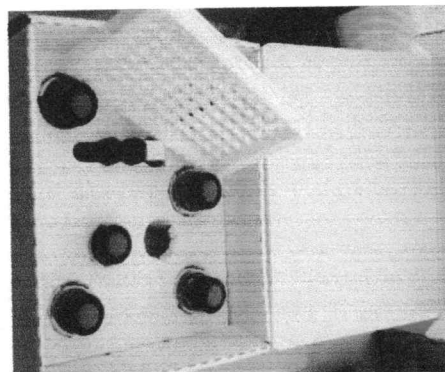
ELISA Kit eNOS



ELISA Kit eNOS (tampak samping)

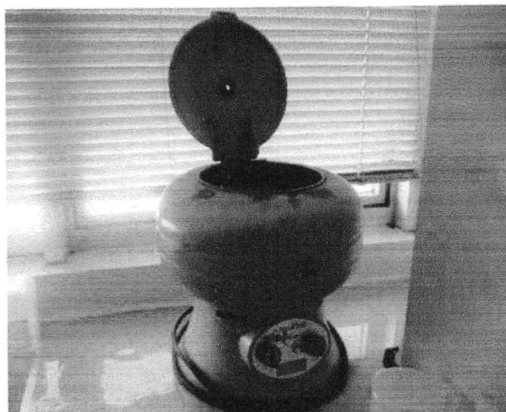


Freezer tempat penyimpanan



Kit Reagen ELISA Kit eNOS

FOTO KEGIATAN



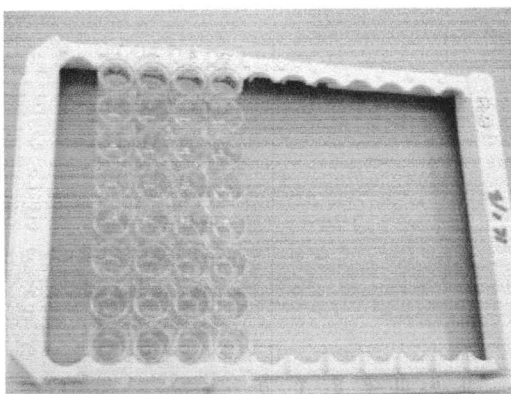
Centrifuge



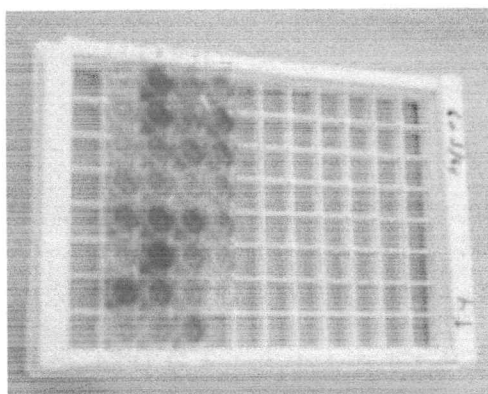
Vortex Mixer



Oven Binder



ELISA Reader  
Microplate ELISA Ag- eNOS



Microplate telah diisi serum



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

**No. 20/EC/KEPK/FKUA/2009**

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Peningkatan Kadar Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Pasien Diabetes Tipe 2  
Setelah Pemberian Kombinasi Terapi Metformin dan Oksigen Hiperbarik**

PENELITI UTAMA :

**Bernadette Dian Novita Dewi, dr**


UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Lembaga Kesehatan TNI AL Drs. Med. Sastropanoelar, Phys. dan  
Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Surabaya, 21 Oktober 2009



  
Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS

**DINAS KESEHATAN ANGKATAN LAUT  
LAKESLA Drs. Med. R. RIJADI S., Phys**

Surabaya, 27 Juli 2009

Nomor : B /200 / VII /2009  
Klasifikasi : Biasa  
Lampiran : -  
Perihal : Jawaban permohonan  
Ijin survei

Kepada  
Yth. Ketua Lembaga Penelitian dan  
Pengabdian Kepada  
Masyarakat Unair ✓  
di  
Surabaya


1. Berdasarkan Surat Ketua Lembaga Penelitian Pengabdian Kepada Masyarakat Unair Surabaya Nomor : 662/H 3.13/PP d/2009 tanggal 15 Juli 2009 perihal Permohonan Ijin survei atas nama :

- a. Dr. Endang Isbandiati, dr., MS., Sp.FK.
- b. Bernadette Dian Novita Dewi, dr
- c. Handy Suyono, dr

2. Sehubungan dengan hal tersebut, pada prinsipnya Lakesla Drs. Med. R. Rijadi S., Phys menyetujui.

3. Demikian terima kasih atas perhatian.

Kepala Lakesla Drs. Med. R. Rijadi S., Phys



Dr. Rahardjo Ariyo Mataram  
Kolonel Laut (K) NRP. 9103/P



**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**DEPARTEMEN PATOLOGI KLINIK**

Nomor : 65/H3.1.1/PK/2009  
Lamp. : -  
Prihal : Ijin untuk fasilitas penggunaan alat.

Surabaya, 20 Oktober 2009

Kepada  
Yth. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana  
Universitas Airlangga  
Surabaya

Dengan ini diberitahukan bahwa kami memberikan ijin penggunaan alat untuk pemeriksaan ELISA di Litbang Departemen/SMF Patologi Klinik F.K. Unair/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, kepada mahasiswa S2 Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, minat Studi: Farmakologi atas nama:

Nama : Bernadette Dian Novita Dewi, dr.  
NIM : 090810623M  
Judul : Peningkatan kadar *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) pada pasien Diabetes Mellitus tipe 2 setelah pemberian terapi kombinasi Metformin dan Oksigen Hiperbarik

Pembimbing Ketua : Dr. Endang Isbandiati, dr, MS, SpFK

Demikian atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.



Ketua Departemen Patologi Klinik

Peny. T. Soedewo, dr, MS, Sp.PK(K)

NIP. 190610746