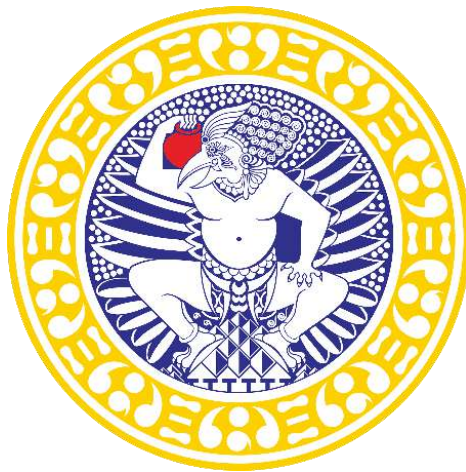


DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP
SINYAL KESETIMBANGAN SINTESA DAN DEGRADASI PROTEIN
MELALUI AKTIVASI JALUR AMPK α PADA MYOBLAST
OTOT SKELETAL DMT2 ABC-TC3957**



JONGKY HENDRO PRAJITNO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

DISERTASI

PENGARUH PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP SINYAL KESETIMBANGAN SINTESA DAN DEGRADASI PROTEIN MELALUI AKTIVASI JALUR AMPK α PADA MYOBLAST OTOT SKELETAL DMT2 ABC-TC3957

JONGKY HENDRO PRAJITNO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**PENGARUH PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP
SINYAL KESETIMBANGAN SINTESA DAN DEGRADASI PROTEIN
MELALUI AKTIVASI JALUR AMPK α PADA MYOBLAST
OTOT SKELETAL DMT2 ABC-TC3957**

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
dan dipertahankan di hadapan Panitia
Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Hari : Senin
Tanggal : 7 Pebruari 2022
Pukul : 10.00 WIB

Oleh :

Jongky Hendro Prajitno
NIM 011417017339

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

PENGARUH PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP SINYAL KESETIMBANGAN SINTESA DAN DEGRADASI PROTEIN MELALUI AKTIVASI JALUR AMPK α PADA MYOBLAST OTOT SKELETAL DMT2 ABC-TC3957

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 12-1-2022

Oleh

Promotor



**Prof. Dr. Agung Pranoto dr., M.Kes, Sp.PD, K-EMD, FINASIM
NIP. 195601041983121001**

Ko Promotor



**Dr. Soebagijo Adi Soelistijono, Sp.PD, K-EMD, FINASIM
NIP. 195804011984031011**

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai oleh
panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)
pada Tanggal 18 Januari 2022**

Panitia Penguji:

Ketua :

Prof. Dr. Usman Hadi, dr., Ph.D., Sp.PD K-PTI, FINASIM

Anggota :

1. Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., Sp.PD., K-EMD., FINASIM
2. Dr. Soebagijo Adi S, dr. Sp.PD, K-EMD, FINASIM
3. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si
4. Prof. Dr. Dharma Lindarto, dr.,Sp.PD, K-EMD, FINASIM
5. Dr. Bambang Purwanto, dr., M.Kes
6. Dr. Maftuchah Rochmanti, dr., M.Kes
7. Dr. Sulistyowati, dr., Mkes
8. Prof. Dr. Achmad Rudijanto, dr.,Sp.PD,K-EMD, FINASIM

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 09/ UN3.1.1/HK.04/2021
Tanggal : 18 Januari 2022

SURAT PERNYATAAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jongky Hendro Prajitno
NIM : 011417017339
NIM : 011417017339
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Alamat / No. Telp : /081553994030

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli, benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas-namakan saya, serta bukan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiatism*) hasil karya orang lain. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, Mei 2022
Yang membuat pernyataan



Jongky Hendro Prajitno
NIM. 011417017339

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Robbil ‘Aalamiin, segala puja dan puji syukur kami panjatkan kepada Allah Yang Maha Pengasih dan Penyayang, atas segala karunia dan nikmat yang dilimpahkan sehingga penyusun dapat menyelesaikan disertasi dengan judul “Pengaruh Pemberian Metformin Terhadap Sinyal Keseimbangan Sintesa Dan Degradasi Protein Melalui Aktivasi Jalur Ampkα Pada Myoblast Otot Skeletal Dmt2 *Abc-Tc3957*.”

Disertasi ini dapat selesai juga karena dorongan, bimbingan, saran dan perbaikan dari Promotor, kedua Ko-Promotor dan Tim Penguji. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankanlah saya menghaturkan ucapan terimakasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes, SpPD., K-EMD, FINASIM sebagai promotor yang penuh pengertian, perhatian dan kesabaran banyak memberikan dukungan mental, semangat, motivasi, memberikan banyak bantuan dan berbagai kemudahan, meluangkan waktu untuk konsultasi, memberikan arahan dan masukan sejak awal menempuh Pendidikan jenjang doktor ini sampai disertasi ini terselesaikan dengan baik. Perkenankanlah saya menghaturkan ucapan terimakasih setinggi-tingginya.

Dr. Soebagijo Adi Soelistijo, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM sebagai ko-promotor yang sangat memahami saya, memahami semua kekurangan saya, dan selalu berusaha untuk mencari solusi akan masalah-masalah dalam disertasi ini, memberikan bimbingan, semangat, arahan dan bantuan dalam melakukan penelitian dan penyusunan disertasi ini. Perkenankanlah saya menghaturkan ucapan terimakasih yang tidak terhingga.

Prof. Dr. Moh. Nasih, SE., MT., Ak. sebagai Rektor Universitas Airlangga dan Prof. Fasichul Lisan, Apt. sebagai mantan Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan

fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Budi Santoso, dr., SpOG(K) sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soetojo, dr., SpU(K) dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes, SpPD., K-EMD, FINASIM sebagai mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, beserta jajaran dekanat atas kesempatan yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan ini.

Dr. Joni Wahyuadi, dr., SpBS(K) sebagai Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Harsono, dr. dan Dodo Anondo, dr., MPH sebagai mantan Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya beserta jajaran direksi yang telah memberikan dukungan dan fasilitas selama mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD.,K-PTI, FINASIM selaku Direktur RS Universitas Airlangga beserta jajaran direksi dan staf yang memberikan dukungan dan fasilitas selama mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG(K) sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor dan Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., MSc., SpPD.,K-R, FINASIM serta Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., SpA(K) selaku mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan asuhan akademik dan bimbingan selama masa studi.

Prof. Dr. Usman Hadi, dr., Ph.D., Sp.PD K-PTI, FINASIM; Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes, SpPD., K-EMD, FINASIM; Dr. Soebagijo Adi S, dr. Sp.PD, K-EMD, FINASIM; Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si; Prof. Dr. Dharma Lindarto, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM; Prof. Dr. Achmad Rudijanto, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM; Dr. Bambang Purwanto, dr., M.Kes; Dr. Maftuchah Rochmanti, dr., M.Kes; Dr. Sulistyowati, dr., Mkes, selaku para penguji yang memberikan arahan, saran dan perbaikan untuk disertasi saya ini.

Kepada seluruh staf pengajar pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga: Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D, Prof. Dr. Harjanto JM, dr., AIFM (Alm), Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D, Prof. Dr. Indri Safitri, dr., MS, Prof. Dr. Suhartati, dr., MS, Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH, Prof. Purnomo Suryohudoyo ,dr., Sp.BK, Prof. Dr. H. Muhammad Zainudin, Apt, Prof. Dr. I Ketut Sudiana,drs. Msi, Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS, Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., Sp.Par(K), Dr. Susilowati Andajani, dr., MS, Siti Pariani, dr, MS, Ph.D, yang banyak memberikan ilmu dan wawasan dalam Pendidikan Doktor yang saya tempuh.

Prof. Dr. Ugroseno Yudho Bintoro, dr., Sp.PD, K-HOM, FINASIM sebagai Ketua Departemen Ilmu Penyakit Dalam, serta seluruh staf pengajar Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes, Sp.PD, K-EMD, FINASIM selaku Ketua Divisi Endokrin Metabolik Diabetes Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga serta seluruh Staf Divisi Endokrin Metabolik Diabetes Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yaitu Prof. Dr. Ari Sutjahjo, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM, Dr. Soebagijo Adi Soelistijo, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM, Dr. Sony Wibisono, dr., SpPD.,

K-EMD, FINASIM, Dr. Hermina Novida, dr. SpPD-KEMD, FINASIM, Hermawan Susanto, dr., Sp.PD, FINASIM, Deasy Ardiani, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM, Rio Wironegoro, dr., Sp.PD, FINASIM, saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas bantuan, dorongan, pengertian dan kerjasamanya selama saya menempuh Pendidikan Doktor ini.

Penghargaan yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Prof. Dr. Askandar Tjokroprawiro, dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM dan Sri Murtiwi, dr, Sp.PD, K-EMD, FINASIM selaku Ketua dan Bendahara Pusat Diabetes dan Nutrisi Surabaya Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang banyak memberikan dukungan, bantuan, bimbingan dan arahan sehingga saya bisa menyelesaikan Pendidikan Doktor ini.

Kepada seluruh guru dan dosen yang telah membimbing saya semenjak di Taman Kanak-Kanak sampai Pendidikan dokter spesialis dan konsultan yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, saya ucapkan penghargaan setinggi-tingginya atas semua ilmu dan wawasan pengetahuan yang telah diberikan selama ini kepada saya.

Kepada seluruh rekan teman seperjuangan, senasib dan sepenanggungan peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Angkatan 2014 yang saling menemani, memotivasi, bekerja sama, bekerjasama, saling mendorong, mendukung dan mengingatkan dan memberi masukan. Terimakasih atas kerjasama, keakraban dan kekompakan yang terjalin selama ini.

Kepada Dr. Agung Dwi Wahyu, dr. SpMK, dr. Afifah Zahra Dzakiya, dr Robert Dwitama, SpPD, dr. Willa, dr. Priangga Adi, SpPA, dr. Cupuwati, SpPD, Dr. Reny I'tishom, S.Pi, M.Si yang banyak memberikan support, motivasi dan membantu saya selama proses Pendidikan Doktor ini.

Kepada seluruh staf pendidikan di Departemen Penyakit Dalam yang sudah banyak membantu saya Mbak Arinil, Mbak Rossy, Mbak Restu, Mbak Indah, Mbak Siti, Mbak Lily, Mbak Ulil, Mbak Lis, Mbak Jum, Pak Japar dan Pak Sulaiman, serta staf administrasi Pusat Diabetes dan Nutrisi Surabaya Mbak Esti, Mas Tri Rahmansyah, ST, Mbak Aprilia, dan Pak Ahmad kami ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas bantuan yang diberikan kepada saya.

Kepada Dr. Ni Wayan Tirthaningsih, dr., MS., Dr. Reny I'tishom, S.Pi., M.Si., tim sekretariat S3 yaitu Mbak Adhdriyani, A.Md, Mbak Pramita Kurniasari, A.Md., Mbak Fitriyah Diah Isnaini, A.Md, dan Mas Shobkhi Mafakir atas segala bantuan yang diberikan sejak awal masuk sampai menyelesaikan Pendidikan Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga ini.

Akhirnya pada kesempatan ini, saya sampaikan rasa hormat, kasih sayang dan terimakasih sedalam-dalamnya untuk:

Yang tercinta, almarhum ayahanda dr. Soeharjono Soedjono, Sp PD-KEMD, yang selalu memberi motivasi kepada saya untuk bisa selalu menjadi kebanggaan beliau, meski beliau telah tiada, dan ibunda tercinta Prof. Hj. Lestari Basoeki, dr., Sp KJ(K) dengan segenap cinta dan kasihnya telah melahirkan, mengasihi, mendidik, menafkahi dan memberikan teladan yang baik, serta selalu mendoakan kebaikan pada saya, menemani disaat suka dan duka semoga Allah senantiasa melindungi ibu. I love u mom...

Juga ayah mertua Bapak H Soemadji Darmo Soewito (alm) beserta ibu yang selalu mendidik dan mengayomi saya, senantiasa mendoakan kebaikan di segala situasi dan kondisi.

Terimakasih yang tulus juga untuk istri saya tercinta drg. Retno wulandari, Sp Perio atas segala dorongan dan dukungan baik moral maupun material, menemani dan mengatasi

semua kesulitan bersama-sama, juga waktu dan motivasi yang diberikan sehingga saya bisa menempuh Pendidikan Doktor ini. Kepada anak saya tercinta Akilla Nathania Melati yang selalu menginspirasi, memotivasi, membanggakan dan mendukung saya. Semoga ini dapat menjadi panutan buatmu kelak.

Kepada kakak kandung saya almarhum Ir. Sonny Soeharsoo dan adik saya Benny Trihardoyo Wicakcono, SE, MM, beserta istri Mira Savira, S Kom. Juga untuk kakak ipar saya Kolonel Laut(K). Dr. Eko Riyanto, Sp KK, Lenta Andika, SE, Soeryono SH, Sri Handayani, SE, dan Dwi Hari Prasetyo, serta keponakan-keponakan saya Satria Sabri Wicaksono dan Rania, Ilham Putra Alam, Wahyu Safira Prasetyani, Aisha Sunya Manha, Terimakasih atas segala dukungan dan semangat yang diberikan.

Kepada semua pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan yang diberikan sehingga disertasi ini bisa selesai. Mohon maaf kepada semua pihak jika ada kesalahan yang pernah saya lakukan baik sengaja maupun tidak disengaja.

Semoga penelitian ini membawa manfaat bagi umat manusia dan pada kemajuan ilmu kedokteran khususnya dibidang Diabetes Melitus. Semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmat, taufik dan hidayahNya untuk semua pihak yang sudah berjasa besar membantu penyelesaian disertasi ini.

Januari 2022

Penulis

RINGKASAN

**PENGARUH PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP SINYAL
KESETIMBANGAN SINTESA DAN DEGRADASI PROTEIN MELALUI
AKTIFASI JALUR AMPK α PADA MYOBLAST OTOT SKELETAL DMT2 ABC-
TC3957**

Diabetes Mellitus tipe 2 (DMT2) merupakan masalah kesehatan di seluruh penjuru dunia. Dibutuhkan strategi terapi yang agresif dalam penatalaksanaan DMT2 untuk menurunkan risiko hiperglikemik. Salah satu pengobatan yang menjadi pilihan sampai saat ini adalah Metformin. Metformin terutama bekerja pada organ hati dengan mengurangi pengeluaran glukosa, di jaringan perifer metformin meningkatkan penyerapan glukosa, terutama pada jaringan otot. Ini membuat otot mempunyai peranan yang sangat penting terkait penatalaksanaan kendali gula darah pada pasien DMT2. Karena otot berperan penting sebagai jaringan utama untuk pengambilan glukosa dari darah, maka pengurangan masa otot akan berdampak pada perburukan resistensi insulin pada pasien DMT2. Metformin merupakan salah satu obat andalan yang banyak dipakai dan dicantumkan pada semua *guideline* di seluruh dunia. Metformin bekerja pada organ hati dengan mengurangi pengeluaran glukosa, di jaringan perifer metformin meningkatkan penyerapan glukosa, terutama pada jaringan otot. Mekanisme kerjanya menghambat glukoneogenesis melalui aktivasi AMPK. Selanjutnya AMPK α akan mengaktivasi jalur katabolisme dan menghambat jalur anabolisme

Sampai saat ini efek pemberian metformin pada sel otot manusia masih belum banyak diteliti, khususnya pada sel otot DMT2 yang belum pernah mendapatkan terapi metformin sebelumnya. Data penelitian yang ada banyak dikemukakan pada sel otot tikus dan sel otot non DMT2. Hasil yang didapat juga masih kontroversi. Terutama pada terjadinya atrofi dan penambahan massa otot melalui jalur aktivasi dari AMPK α . Massa otot sangat terkait dengan kestimbangan aktifitas sintesis dan degradasi protein otot, yang juga akan dipengaruhi oleh aktifitas dari AMPK α . Namun di sisi lain, sel mempunyai aktifitas Autofagi yang memiliki peran dalam homeostasis sintesis dan degradasi protein-protein di otot.

Penelitian ini mencoba untuk menjawab pertanyaan, Apakah terapi Metformin memberikan efek terhadap aktifitas jalur sintesis protein yang diwakili oleh ekspresi mTOR, dan aktifitas degradasi protein otot melalui ekspresi FoxO3, ULK-1, LC3, dan MuRF1 pada otot skeletal pasien DM tipe 2 melalui aktivasi jalur AMPK α dan peningkatan aktifitas autofagi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan rancangan post test kontrol group desain laboratorik in vitro. Pemilihan metode ini bertujuan untuk menyamakan kondisi antara kelompok kontrol dan perlakuan sehingga lebih dapat terkendali, lebih dapat terukur dan mendapatkan gambaran dampak perlakuan hingga tingkat seluler. Sampel yang dipakai pada penelitian ini diperoleh dari kultur sel otot rangka (*skeletal muscle sel culture* = SkMC) dari *Cell line Human Skeletal Muscle Myoblasts (HSMM) ABC-TC3957* DMT2 yang berasal dari donor yang menderita DMT2 dan sama sekali belum pernah mendapatkan pengobatan DMT2.

Kultur sel otot rangka dibagi menjadi 4 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari sekitar 6 sampel, kelompok kontrol (K) tanpa perlakuan hanya diberikan medium saja. Kemudian 3 kelompok sisanya dibagi menjadi kelompok dengan perlakuan pemberian metformin dosis 1mM, 2 mM dan 3 mM. Semua kelompok diamati pada jam ke 0, 24, 48 dan 72. Pada tiap-tiap jam pengamatan diukur ekspresi untuk tiap-tiap protein dengan menggunakan *immunofluoresensi*.

Dari hasil percobaan didapatkan ekspresi sinyal-sinyal degradasi protein yang meningkat pasca pemberian metformin pada pengamatan 24, 48 dan 72 jam. Marker sinyal degradasi meningkat seiring dengan meningkatnya ekspresi dari AMPK α . Marke sinyal degradasi protein yang diperankan oleh MURF1, dan LC3 meningkat pada awal perlakuan, untuk kemudian melandai atau tetap. Gambaran ini justru berkebalikan dengan apa yang ditunjukkan oleh ekspresi mTOR sebagai penanda sinyal sintesis protein yang justru terlihat menurun pada awal perlakuan untuk kemudian meningkat pada fase pengamatan berikutnya. Bila dilakukan nalisis jalur sinyal sintesis protein dari AMPK α ke mTOR didapatkan hambatan yang semakin besar pada awal pengamatan, namun hambatan ini berangsur mengecil dan berbalik menjadi positif pada pengamatan berikutnya. Demikian juga untuk jalur sinyal sintesis protein yang diperankan oleh MURF-mTOR, pola nya juga menunjukkan pola yang sama, dengan menunjukkan hambatan pada awal perlakuan, untuk kemudian berangsur mengecil dan berubah menjadi positif di akhir periode pengamatan.

Sedangkan sinyal degradasi protein yang diperankan oleh AMPK ke MURF1 tampak lebih datar, namun tetap konstan dalam menunjukkan sinyal aktifitas degradasinya. Hal berbeda ditunjukkan oleh jalur sinyal degradasi yang diperankan oleh aktifitas autofagimelalu ULK 1 ke LC3, pada jalur ini tampak semakin besar setelah perlakuan awal, namun kemudian menurun dan berubah menjadi negatif pada akhir pengamatan.

Temuan baru pada penelitian ini menunjukkan bahwa sinyal kesetimbangan sintesis dan degradasi protein otot pada pemberian protein berada dalam homeostasis dimana awalnya sinyal degradasi protein otot dominan pada awal perlakuan seiring dengan hambatan sinyal sintesis otot yang ditekan, namun berubah berkebalikan dengan ditunjukkannya gambaran sinyal sintesis protein yang menguat dan sinyal degradasi yang semakin mengecil yang patut diduga aktifitas autofagi turut berperan dalam menciptakan kondisi homeostasis ini dengan menyediakan kebutuhan sel akan energi untuk melakukan aktifitas sintesa protein di dalam sel.

SUMMARY

THE EFFECT OF METFORMIN ON EQUILIBRIUM OF PROTEIN SYNTHESIS AND DEGRADATION SIGNALING THROUGH AMPK α PATHWAY ACTIVATION IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS MYOBLASTS SKELETAL MUSCLE CELL *ABC-TC3957*

Jongky Hendro Prajitno

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a health problem throughout the world. An aggressive therapeutic strategy is needed in the management of T2DM to reduce the risk of hyperglycemia. One of the treatment options is metformin. Metformin mainly acts on the liver by reducing glucose expenditure, in peripheral tissues it increases glucose absorption, especially in muscle tissue. This makes the muscles have a very important role related to the management of blood sugar control in patients with T2DM. Since the muscle plays an important role as the main tissue for glucose uptake from the blood, the reduction in muscle mass will have an impact on worsening insulin resistance in T2DM patients. Metformin is one of the first line treatment that is widely used and is included in all Diabetic management guidelines around the world. Metformin acts on the liver by reducing glucose expenditure, in peripheral tissues metformin increases glucose absorption, especially in muscle tissue. Its mechanism of action is to inhibit gluconeogenesis through AMPK activation. Furthermore, AMPK α will activate the catabolic pathway and inhibit the anabolic pathway

Until now, the effect of giving metformin on human muscle cells has not been widely studied, especially in DMT2 muscle cells that have never received metformin therapy before. There are many research data presented on mice muscle cells and non-T2DM muscle cells. The results obtained are also still controversial. Especially in the occurrence of atrophy and increase in muscle mass through the activation pathway of AMPK α . Muscle mass is closely related to the balance of muscle protein synthesis and degradation activities, which will also be influenced by the activity of AMPK α . But on the other hand, cells have autophagy activity that has a role in the homeostasis of the synthesis and degradation of muscle proteins. This study attempts to answer the question whether

Metformin therapy has an effect on the activity of the signaling protein synthesis pathway represented by the expression of mTOR, and the activity of signaling muscle protein degradation through the expression of FoxO3, ULK-1, LC3, and MuRF1 in the skeletal muscle of T2DM patients through activation AMPK α activity and increased autophagy activity. This research is an experimental study, with a post test control group design in vitro laboratory design. The selection of this method aims to equalize the conditions between the control and treatment groups so that they are more controllable, more measurable and get an overview of the impact of treatment at the cellular level. The sample used in this study was obtained from skeletal muscle cell culture (SkMC) from the Human Skeletal Muscle Myoblasts (HSMM) cell line ABC-TC3957 DMT2, which came from a donor who had DMT2 and had never received DMT2 treatment.

This study attempts to answer the question whether Metformin therapy has an effect on the activity of the protein synthesis pathway represented by the expression of mTOR, and the activity of muscle protein degradation through the expression of FoxO3, ULK-1, LC3, and MuRF1 in the skeletal muscle of type 2 DM patients through activation of the pathway. AMPK α and increased autophagy activity. This research is an experimental study, with a post test control group design in vitro laboratory design. The selection of this method aims to equalize the conditions between the control and treatment groups so that they are more controllable, more measurable and get an overview of the impact of treatment at the cellular level. The sample used in this study was obtained from skeletal muscle cell culture (SkMC) from the Human Skeletal Muscle Myoblasts (HSMM) cell line ABC-TC3957 DMT2, which came from a donor who had DMT2 and had never received DMT2 treatment.

Skeletal muscle cell cultures were divided into 4 groups. Each group consisted of about 6 samples, the control group (K) without treatment was only given medium. Then the remaining 3 groups were divided into groups with metformin treatment with doses of 1 mM, 2 mM and 3 mM. All groups were observed at 0, 24, 48 and 72 hours. At each observation hour the expression for each protein was measured using immunofluorescence.

The results of the study was found that the expression of protein degradation signals increased after the administration of metformin at 24, 48 and 72 hours of observation. Marker degradation signal increased with increasing expression of AMPK α .

The protein degradation signaling markers played by MURF1, and LC3 increased at the beginning of the treatment, to then slope or remain. This picture is in contrast to what was shown by the expression of mTOR as a signal marker of protein synthesis which actually seemed to decrease at the beginning of the treatment and then increase in the next observation phase. When analyzing the protein synthesis signaling pathway from AMPK α to mTOR, we found that the inhibition was getting bigger at the beginning of the observation, but this inhibition gradually decreased and turned positive in the next observation. Likewise for the protein synthesis signaling pathway played by MURF-mTOR, the pattern also shows the same pattern, by showing inhibition at the beginning of the treatment, then gradually decreases and turns positive at the end of the observation period. Meanwhile, the signal for protein degradation played by AMPK to MURF1 appeared flatter, but remained constant in showing the signal for its degradation activity. Different things were shown by the degradation signal pathway played by autophagy activity through ULK 1 to LC3, in this pathway it seemed to be getting bigger after the initial treatment, but then decreased and turned negative at the end of the observation.

The new findings in this study indicate that the equilibrium signal of muscle protein synthesis and degradation upon protein administration is in homeostasis where initially the muscle protein degradation signal is dominant at the beginning of treatment along with suppressed muscle protein synthesis signal inhibition, but changes in the opposite direction with the appearance of an amplified protein synthesis signal. and the decreasing signal of degradation which should be suspected that autophagy activity plays a role in creating this homeostatic condition by providing the cell's need for energy to carry out protein synthesis activities in the cell.

ABSTRACT

**THE EFFECT OF METFORMIN ON EQUILIBRIUM SIGNALING OF PROTEIN
SYNTHESIS AND DEGRADATION THROUGH AMPK α PATHWAY
ACTIVATION IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS MYOBLASTS SKELETAL
MUSCLE CELL *ABC-TC3957***

Jongky Hendro Prajitno

Objective :

To Determine the effect of metformin on AMPK pathway and autophagy activation to skeletal muscle signaling protein synthesis and degradation on T2DM skeletal muscle

Material and Method :

The skeletal muscle cell line *abc-tc3957* culture randomly divided into four groups, control group, and treatment group with metformin on 1mM, 2mM, and 3mM doses, respectively. The control group without metformin treatment. The expression of AMPK α , ULK-1, LC3, FoxO3, MuRF1, and mTOR measured by immunofluorescence microscope using specific antibody. Each group was observed in four times, at 0, 24, 48, and 72 hours. The result was obtain and analyzed in comparative test and pathway analysis.

Result :

Metformin affect the expression of AMPK α , ULK-1, LC3, FoxO3, MuRF1, and mTOR ($p < 0,05$). In control group, protein synthesis signaling through mTOR activation was significantly higher than protein degradation signal through MuRF1 and autophagy signaling . In 24 hours, protein synthesis signaling start to decrease ($p < 0,05$) and protein degradation was increased ($p < 0,05$) through both MuRF1 and LC3 signaling, respectively. In this group, both synthesis and degradation signaling was approaching and reach equilibrium. In 48 hours, degradation signaling through LC3 getting weaker than synthesis signaling through mTOR ($p < 0,05$). The equilibrium between synthesis and degradation reached after 72 hours of observation, marked by increase of mTOR expression and decrease of LC3 as autophagy marker

Conclusion :

Short-term metformin suppress protein synthesis signaling and induce its degradation signaling and autophagy. In longer period of treatment, equilibrium was reached by balancing of protein synthesis and degradation, include autophagy.

Keywords : autophagy, metformin, AMPK α , mTOR, MuRF1, LC3, T2DM

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul depan	i
Sampul dalam.....	ii
Halaman Persetujuan.....	iii
Halaman Pengesahan.....	iv
Panitia Penguji.....	v
Orisinalitas Penelitian	vi
Ucapan Terimakasih.....	vii
Ringkasan.....	.xiii
<i>Summary</i>	.xv
<i>Abstract</i>	xviii
DAFTAR ISI	xx
DAFTAR GAMBAR	.xxii
DAFTAR TABEL.....	.xxv
DAFTAR SINGKATAN.....	.xxvi
DAFTAR LAMPIRAN	.xxviii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.5. Manfaat Praktis	6

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Melitus	7
2.1.1 Definisi.....	7
2.1.2 Patogenesis DMT2	8
2.1.3 Patofisiologi DMT2	.10
2.1.4 Komplikasi DMT2	.12
2.1.5 Terapi DMT2	.18
2.2. Otot Rangka.....	.22
2.2.1. Fisiologi otot rangka	.25
2.2.2. Regulasi massa otot rangka	.27
2.2.3. <i>Myoblast Cell-Line</i>	.32
2.2.4. Otot rangka pada diabetes melitus	.32
2.2.5. Atrofi otot rangka pada DMT2	.33
2.3. Jalur AMPK pada Pertumbuhan Sel Otot.....	.37
2.3.1. Peran AMPK pada sintesa protein	.39
2.3.2. Peran AMPK pada degradasi protein	.40

2.4.	Autofagi pada Sel Otot	41
2.4.1.	Peran autofagi pada sel otot	41
2.4.2.	<i>Signaling</i> autofagi pada sel otot	42
2.4.3.	Regulasi autofagi pada sel otot rangka.....	45
2.5.	<i>Mammalian target of Rapamycin</i> (mTOR).....	46
2.6.	<i>Muscle Ring Finger1</i> (MuRF1).....	50
2.7.	<i>Forkheadbox class O</i> (FoxO).....	51
2.8.	Efek Metformin terhadap Massa Sel Otot Rangka.....	54

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1.	Kerangka Konseptual	57
3.2.	Hipotesa Penelitian	59

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	60
4.2.	Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel	61
4.2.1.	Sampel.....	61
4.2.2.	Besar sampel	61
4.2.3.	Teknik pengambilan sampel	64
4.3.	Variabel Penelitian	64
4.3.1.	Variabel bebas	64
4.3.2.	Variabel tergantung.....	64
4.3.3.	Variabel kendali	64
4.4.	Bahan Penelitian	67
4.5.	Instrumen Penelitian	67
4.6.	Lokasi dan Waktu Penelitian	68
4.7.	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.....	68
4.8.	Bagan Kerangka Operasional	69
4.9.	Analisis Data.....	70

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1.	Hasil Pemeriksaan Ekspresi AMPK α , ULK-1, LC3, FoxO3, mTOR, dan MuRF1 pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957.....	71
5.2.	Hubungan Kausalistik Antarvariabel yang Diteliti pada Kultur Cell Line ABC-TC3957.....	100
5.3.	Temuan Baru Pengaruh Pemberian Metformin pada Keseimbangan Sintesa dan Degradasi Protein pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	118
5.3.1.	Perubahan keseimbangan sintesa dan degradasi protein berdasarkan lamanya paparan metformin	118
5.3.2.	Perubahan keseimbangan sintesa dan degradasi protein berdasarkan dosis metformin	120

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1.	Ekspresi MuRF1 pada Cell Line ABC-TC3957	123
6.2.	Ekspresi ULK-1 pada Cell Line ABC-TC3957	125
6.3.	Ekspresi mTOR pada Cell Line ABC-TC3957	127
6.4.	Ekspresi FoxO3 pada Cell Line ABC-TC3957	130

6.5. Ekspresi LC3 pada Cell Line ABC-TC3957	133
6.6. Ekspresi AMPK α pada Cell Line ABC-TC3957	135
6.7. Keseimbangan Degradasi dan Sintesa Protein.....	137
6.8. Temuan Baru.....	138
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan	140
7.2. Kelemahan Penelitian	141
7.3. Saran	142
 DAFTAR PUSTAKA	143
 DAFTAR LAMPIRAN.....	171

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Faktor risiko terjadinya disfungsi sel β	10
Gambar 2.2 Algoritma Terapi Kombinasi Pada DMT2.....	24
Gambar 2.3 Kondisi sarkomer saat relaksasi	26
Gambar 2.4 Kondisi sarkomer saat kontaksi	26
Gambar 2.5 Jalur <i>Signaling</i> Regulasi Massa Otot Rangka	28
Gambar 2.6 Mekanisme Atrofi Otot pada DMT2	35
Gambar 2.7 Aktivitas AMPK pada regulasi sintesis dan degradasi protein	38
Gambar 2.8 Peranan AMPK dalam regulasi ukuran otot.....	41
Gambar 2.9 Tiga Bentuk Autofagi pada Sel Otot Rangka.....	43
Gambar 2.10 Aktivasi mTORC1 oleh factor pertumbuhan	48
Gambar 2.11 Jalur sintesis protein oleh mTORC1	49
Gambar 2.12 Proses intraseluler yang melibatkan mTORC2	50
Gambar 2.13 Peran FoxO dalam homeostasis sel otot.....	53
Gambar 2.14 Efek Pemberian Metformin pada Regulasi Massa Otot Rangka.....	55
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	60
Gambar 5.1 Kultur Sel Myoblast DMT2 Hari Ke-1. Direkam dengan inverted microscope perbesaran 800X	71
Gambar 5.2 Sel Myoblast pada confluent dan monolayer. Direkam dengan inverted contrast microscope perbesaran 400X	72
Gambar 5.3 Perubahan Ekspresi AMPK α pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	73
Gambar 5.4 Diagram Perbedaan ekspresi AMPKα antar kelompok perlakuan pada <i>cell line ABC-TC3957</i>	76
Gambar 5.5 Perubahan Ekspresi ULK-1 pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	78
Gambar 5.6 Perubahan Ekspresi LC3 pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	82
Gambar 5.7 Diagram Perbedaan ekspresi LC3 antar kelompok perlakuan pada <i>cell line ABC-TC3957</i>	85
Gambar 5.8 Perubahan Ekspresi FoxO3 pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	87
Gambar 5.9 Perubahan Ekspresi MuRF1 pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	91
Gambar 5.10 Diagram Perbedaan ekspresi MURF1 antar kelompok perlakuan pada <i>cell line ABC-TC3957</i>	94
Gambar 5.11 Perubahan Ekspresi mTOR pada Setiap Periode Pengamatan Masing-Masing Kelompok	96
Gambar 5.12 Diagram Perbedaan ekspresi mTOR antar kelompok perlakuan pada <i>cell line ABC-TC3957</i>	99
Gambar 5.13 skema analisis jalur sinyal sintesis dan degradasi protein pada cell line abc-tc3957 dengan pemberian metformin dalam berbagai periode pengamatan	116

Gambar 5.14 skema analisis jalur sinyal sintesis dan degradasi protein pada cell line abc-tc3957 dengan pemberian metformin pada berbagai dosis perlakuan	117
---	-----

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Ekspresi AMPK α pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957.....	72
Tabel 5.2 Perbedaan ekspresi AMPK α antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	74
Tabel 5.3 Ekspresi ULK-1 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957.....	77
Tabel 5.4 Perbedaan ekspresi ULK-1 antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	79
Tabel 5.5 Ekspresi LC3 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957	81
Tabel 5.6 Perbedaan ekspresi LC3 antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	83
Tabel 5.7 Ekspresi FoxO3 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957	86
Tabel 5.8 Perbedaan ekspresi FoxO3 antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	88
Tabel 5.9 Ekspresi MuRF1 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957.....	90
Tabel 5.10 Perbedaan ekspresi MuRF1 antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	92
Tabel 5.11 Ekspresi mTOR pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957	95
Tabel 5.12 Perbedaan ekspresi mTOR antarkelompok perlakuan pada <i>cell line</i> ABC-TC3957	97
Tabel 5.13 Hubungan Pemberian Dosis Metformin Terhadap Ekspresi Protein AMPK α , ULK-1, LC3, FOXO3, mTOR, dan MuRF1 pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957.....	101
Tabel 5.14 Hubungan Waktu Pengamatan Terhadap Ekspresi Protein AMPK α , ULK-1, LC-3, FOXO3, mTOR, dan MuRF1 pada kultur <i>cell line</i> ABC-TC3957	103
Tabel 5.15 Data hubungan antarvariabel terhadap durasi pemberian metformin pada <i>cell line</i> ABC-TC3957 dengan hasil tidak signifikan.....	105
Tabel 5.16 Data hubungan antarvariabel terhadap durasi paparan metformin pada <i>cell line</i> ABC-TC3957 dengan hasil signifikan.....	108
Tabel 5.17 Data hubungan antarvariabel terhadap dosis terapi metformin pada <i>cell line</i> ABC-TC3957 dengan hasil tidak signifikan	110
Tabel 5.18 Data hubungan antarvariabel terhadap dosis terapi metformin pada <i>cell line</i> ABC-TC3957 dengan hasil signifikan	113

DAFTAR SINGKATAN

ACC-1	: asetil-KoA karboksilase 1
ADP	: <i>adenosine diphosphate</i>
AGE	: <i>advance glycation end</i>
AICAR	: <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside</i>
AMP	: <i>Adenosine monophosphate</i>
AMPK	: <i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
Ang-II	: Angiotensin II
ATP	: <i>adenosine triphosphate</i>
BDNF	: <i>brin-derived neurotrophic factor</i>
BNIP3	: <i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein</i>
CAPN	: <i>calpain</i>
CaMKK2	: <i>calcium-/calmodulin-dependent kinase kinase 2</i>
cIAP-1	: <i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CMA	: <i>chaperone-mediated autophagy</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
Csp3	: Caspase-3
DMD	: <i>Duchenne muscular dystrophy</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMT1	: Diabetes Melitus Tipe 1
DMT2	: Diabetes Melitus Tipe 2
DPP-4	: <i>dipeptidyl peptidase-4</i>
DRAM	: <i>damage regulated autophagy modulator</i>
eIF2B	: <i>eukaryotic subunit factor 2B</i>
eIF3f	: <i>eukaryotic initiation factor 3 subunit f</i>
eIF4E	: <i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FoxO	: <i>forkhead box class O proteins</i>
FTEB	: faktor transkripsi EB
GIP	: <i>gastric inhibitory polypeptide</i>
GLP-1	: <i>gluagon-like peptide-1</i>
GLUT-4	: <i>Glucose transporter</i>
HHS	: <i>hyperglycemic hyperosmolar state</i>
IAPP	: <i>amyloid polypeptide</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1	: <i>insulin-like growth factor-1</i>
IGF-1R	: <i>Insulin-like Growth Factor-1 Receptor</i>
IKK	: <i>IκB Kinase β</i>
IL 1 β	: <i>interleukin 1β</i>
IL6	: <i>interleukin 6</i>
IMA	: infark miokard akut
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KAD	: Ketoasidosis Diabetikum
LC3	: <i>light chain 3 protein</i>

LDL-oks	: <i>low density lipoprotein-oxidant</i>
LFG	: <i>laju filtrasi glomerulus</i>
LKB1	: <i>liver kinase B1</i>
MAFbx	: <i>muscle atrophy F-box</i>
MAPK	: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	: <i>mitogen activated protein kinase</i>
MMP	: <i>matrix metalloproteinase</i>
mTOR	: <i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	: <i>mTOR complex-1</i>
mTORC2	: <i>mTOR complex-2</i>
MuRF-1	: <i>Muscle Ring Finger Protein-1</i>
NAD ⁺	: <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	: <i>nicotinamide adenine diphosphate hydrogen</i>
NFκB	: <i>nuclear factor κB</i>
NMJ	: <i>neuromuscular junction</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
NOD	: <i>Neuropati Diabetikum</i>
OHO	: <i>obat antihiperglikemi oral</i>
PBS	: <i>phosphate buffer saline</i>
PDK 4	: <i>piruvat dehydrogenase kinase 4</i>
PGC-1 α	: <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α</i>
PI3K	: <i>phosphatidil inositol 3 kinase</i>
PKC- α	: <i>protein kinase C-α</i>
PKR	: <i>dsRNA-activated protein kinase</i>
PKV	: <i>Penyakit Kardio Vaskular</i>
PRT	: <i>progressive resistance exercise training</i>
PSA	: <i>Penicillin/streptomisin-Amphotericin B</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
RS	: <i>retikulum sarkoplasma</i>
S6K1	: <i>S6 kinase 1</i>
SGK 1	: <i>serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1</i>
SGLT	: <i>Sodium dependent glucose transporter-2</i>
SIRT-1	: <i>sirtuin 1 deasetilase</i>
SNARE	: <i>soluble NSF attachment protein receptors</i>
SREBP 1/2	: <i>sterol regulatory element binding protein 1/2</i>
TGF β	: <i>transforming growth factor β</i>
TNF-α	: <i>Tumour Necrosis Factor-α</i>
TSC2	: <i>tuberous sclerosis complex 2</i>
ULK1	: <i>UNC51-like Ser/Thr kinases</i>
Vps34	: <i>vascular protein sorting 34</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Gambaran Deskriptif Ekspresi AMPK α , ULK-1, LC3, FoxO3, MuRF1, dan mTOR pada setiap kelompok dalam berbagai periode pengamatan.....	171
Lampiran 2. Hasil Analisa Komparatif Data Menggunakan SPSS.....	174
Lampiran 3. Komparasi antar kelompok	182
Lampiran 4. Regresi Pengaruh waktu pengamatan terhadap variabel	226
Lampiran 5. Regresi Pengaruh Perlakuan dosis Metformin Terhadap Variabel.....	238
Lampiran 6. Skema Uji Analisa Jalur Berdasarkan Waktu Pengamatan	250
Lampiran 7. Skema Uji Analisa Jalur Berdasarkan dosis Metformin	253
Lampiran 8. Gambaran immunofluorecence masing-masing ekspresi protein	255
Lampiran 9. Artikel Jurnal	256
Lampiran 10. Sertifikat laik etik	278
Lampiran 11. Brosur produk antibody protein.....	311