

## DISERTASI

# PENGARUH HIDROKSOKOBALAMIN TERHADAP PATOGENESIS DIABETES PADA TIKUS WISTAR MLD-STZ SUATU MODEL DIABETES MELLITUS TIPE I

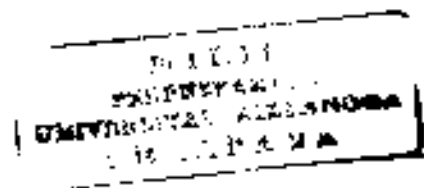
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh

**DOTI WAHYUNINGSIH**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**



**PENGARUH HIDROKSOKOBALAMIN  
TERHADAP PATOGENESIS DIABETES PADA  
TIKUS WISTAR MLD-STZ SUATU MODEL  
DIABETES MELLITUS TIPE I**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
dan dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka**

**Pada Hari : Selasa  
Tanggal : 8 Agustus 2006  
Pukul : 10.00 WIB**

**Oleh :**

**DOTI WAHYUNINGSIH  
NIM. 090013747 D**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL, 26 SEPTEMBER 2006**

Oleh:

Promotor



Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr



Ko-Promotor



Prof. Dr. H. Askandar Lukrowiro, dr., SpPD-KEMD.

**Telah diuji pada ujian tahap I  
Tanggal 2 Juni 2006**

---

**PANITIA PENGUJI DISERTASI :**


**Ketua** : Prof. Dr. Indri Safitri, dr., MS.  
**Anggota** : 1. Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr.  
2. Prof. Dr. H. Askandar Tjokroprawiro, dr., SpPD., KEMD  
3. Prof. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., D.Sc  
4. Prof. Dr. Mulyohadi Aji, dr.  
5. Dr. FM Yudajana, dr., SpPK (K)  
6. Dr. Hari Basuki N., dr., M.Kes  
7. Dr. Fedik A. Rantam, drh  
8. Dr. Agung Pranoto., dr., SpPD., KEMD



**Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomor : 4075/J03/PP/2006  
Tanggal : 12 Juni 2006**

**Dengan Menyebut Asma Allah Yang Maha Pengasih dan  
Maha Penyayang**

**Kupersembahkan Kepada :  
Almamater,  
Ibunda, Suami, Anak-Anakku, Saudaraku  
dan Keponakanku tercinta**

- 
- **Sesungguhnya Bersama Kesukaran Ada Kemudahan**
  - **Maka Apabila Kamu Selesai (Dari Suatu Urusan),  
Maka Bekerja Keraslah (Dalam Urusan Yang lain)**
    - **Hanya Kepada Tuhanmu Berbaraplah Kamu  
(Surat Al Insyirah : 6-8)**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas Rakhmat, Taufik dan Hidayah-Nya sehingga Disertasi ini dapat saya selesaikan.

Dengan selesainya Disertasi ini, saya ucapkan terima kasih sebesar besarnya kepada,

Prof. Pumomo Suryohudoyo, dr, Guru besar dalam Ilmu biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, sebagai Promotor yang saya kagumi keteguhannya dalam prinsip dan kedisiplinan serta kedalaman wawasan. Sebagai narasumber dan pendidik, secara arif telah membimbing dan mengarahkan saya sejak dalam perancangan, pelaksanaan dan penulisan disertasi.

Prof. Dr. H. Askandar Tjokroprawiro, dr., SpPD-KEMD. Ketua Bagian – smf Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Soetomo, selaku ko-promotor, yang memberikan kepada saya tentang pentingnya kedalaman wawasan keilmuan dan kebijakan berpikir serta memberikan bimbingan secara rinci dan efektif.

Ketua Kopertis Wilayah III Prof. Dr. Budi Soesilo Supandji, Ir. dan Syamsu Alam Makka, Drs., selaku Sekretaris pelaksana Kopertis III, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasich, Apt., dan mantan Rektor Prof. Dr.Med. Purnhito, dr.SpBTKV, yang telah memberi izin dan berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Mohammad Amin, dr, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Laba Mahaputeu, drh, M.Sc, selaku Asisten Direktur Bidang Akademik Program Pascasarjana Universitas Airlangga, dan Dr. Sunarjo, dr., MS., MSc, selaku Asisten Direktur Bidang umum Pascasarjana Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengembangkan kemampuan ini.

Prof. Dr. H. Mandojo Rukmo, drg., MSc, Sp.KG selaku Ketua Program studi Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, atas segala kemudahan tanpa mengurangi ketelitian dalam surat menyurat.

Prof. Dr. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., DSc selaku Guru Besar dalam Ilmu Biologi molekuler, yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk melaksanakan penelitian di lingkungan Universitas Brawijaya.

Dr. Aulanni'am, Drh., Des, atas bimbingan, saran-saran, dan penyediaan sarana, pada saat penelitian untuk disertasi ini berlangsung.

Dr. Hari Basuki N., dr., M. Kes. yang telah memberi saran berharga dalam uji bio statistik.

Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD., atas saran saran dan artikel-artikel pada saat Disertasi ini masih dalam bentuk proposal.

Dr. FM Yudajana, dr., SpPK(K), atas tugas-tugas yang intensif, sehingga membantu kelengkapan disertasi ini sejak masih dalam bentuk proposal.

Saya ucapkan terima kasih kepada semua penguji Tahap I, Prof. Dr. Indri Salitri, dr., MS., Prof. Pumomo Suryohudoyo, dr., Prof. Dr. H. Askandar Tjokroprawiro, dr., SpPD., KEMD., Prof. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., D.Sc.,

Prof. Dr. Mulyohadi Ali, dr., Dr. FM Yudajana, dr., SpPK (K), Dr. Hari Basuki N., dr., M.Kes., Dr. Fedik A. Rantam, drh., Dr. Agung Pranoto., dr., SpPD., KEMD.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada teman-teman sejawat: Sdri. Iku dan sdr. Wibisono yang dalam kesibukannya sebagai mahasiswa pascasarjana Universitas Brawijaya, masih berkenan meluangkan waktu untuk membantu berlangsungnya penelitian ini. Pak Heri, yang telah memelihara hewan coba dengan telaten. Ibu Siswatin, di Sekretariat pascasarjana Universitas Airlangga, atas kelancaran surat –menyurat selama studi berlangsung.

Dengan hormat saya menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada Ayahanda almarhum bapak Soediman, yang telah mengukir jiwa raga dan menyirami kalbu saya dengan nilai-nilai rohani yang berharga sebagai bekal hidup. Kepada seorang wanita yang saya kagumi akan kesetiaan dan pengorbanannya, Ibunda Indahing Warminingsih, yang telah mampu mendidik dan membahagiakan saya, dari lubuk hati terdalam saya sampaikan rasa bakti saya.

Secara khusus saya memberikan penghargaan kepada suami tercinta Socnartomo Soepomo yang dengan kesabaran dan pengorbanannya yang tanpa pamrih mampu membangkitkan semangat dan kepercayaan diri sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Kepada anak-anak saya Dito Wahyutomo, Hening Naluria dan Linia Nitrika yang dengan penuh pengertian menunda keinginan untuk bermanja ria..Untuk anakku Dito terima kasih telah mengantar ibu untuk semua urusan mengenai disertasi ini. Untuk anakku Hening terimakasih telah membantu mengetik naskah disertasi. Kepada saudara saya satu-satunya adik Ir. Teguh Indradjano dan keluarga, atas perhatiannya terhadap anak-anak saya.

Untuk semuanya dari lubuk hati yang paling dalam saya ucapkan terima kasih.

Semoga Allah SWT ridlo memberikan pahala yang setimpal atas kebaikan dan amalan dari *panjenengan semua*. Amin ya Robbalalamin.



## RINGKASAN

### PENGARUH HIDROKSOKOBALAMIN TERHADAP PATOGENESIS DIABETES PADA TIKUS WISTAR MLD-STZ SUATU MODEL DIABETES MELLITUS TIPE I

Diabetes Mellitus tipe I (DMT I), merupakan penyakit otoimun. Kejadian DMT I diawali oleh *insulitis* yaitu peradangan pada jaringan pankreas yang didominasi oleh sel mononuklear (limfosit, makrofag, dan monosit). Limfosit pada DMT I adalah dari fenotip T CD4<sup>+</sup> penghasil IFN- $\gamma$  suatu sitokin yang memicu sel  $\beta$  pankreas dan makrofag untuk mengekspresi enzim *iNOS*—enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan radikal NO<sup>•</sup> (Nitrogen Oksida). NO<sup>•</sup> memiliki fungsi fisiologis luas, meskipun demikian dalam jumlah berlebihan berdampak merugikan bagi sel. Para peneliti menyatakan bahwa pada diabetes otoimun (DMT I), NO<sup>•</sup> merupakan radikal yang mempercepat patogenesis DMT I pada manusia maupun pada hewan coba diabetes MLD-STZ (*Multiple Low Dose Streptozocin*) suatu hewan model DMT I.

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh pengikatan NO terhadap patogenesis diabetes pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. Parameter pada penelitian ini adalah; 1) Nitrogen oksida (NO<sup>•</sup>), yang dalam cairan tubuh radikal ini terdapat sebagai senyawa nitrat dan nitrit yang stabil, 2) Jumlah sel pengeksresi enzim *iNOS*, 3) indeks *insulitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas, serta 4) kadar glukosa darah. Metoda penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap serta uji statistik Anova dengan derajat kepercayaan 5%.

Pada penelitian ini digunakan model DMT I dengan menggunakan tikus putih jantan galur Wistar MLD-STZ sebagai model, usia 4 minggu. Pembuatan model DMT I pada hewan coba ini dilaksanakan dengan memaparkan



streptozocin dosis subtoksik sebesar 20 mg/kgBB/hari selama 5 hari secara intraperitoneal pada hewan coba. Hiperglikemia ( $>181$  mg/dl) timbul 4 minggu pasca penyuntikan streptozocin terakhir, disertai timbulnya *insulinitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas. Streptozocin adalah senyawa penghasil radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  dan radikal  $\cdot\text{OH}$  dalam jumlah besar.

Untuk mempelajari peran  $\text{NO}^{\cdot}$  terhadap patogenesis diabetes karena streptozocin dosis subtoksik 20 mg/kgBB/ hari, dipergunakan hidrosokobalamin. Senyawa ini adalah suatu *nucleophile* yang dengan demikian memudahkannya mengikat radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  untuk membentuk senyawa nitrosokobalamin, yang akan dikeluarkan bersama urin. Dalam penelitian ini dosis hidrosokobalamin yang dipergunakan adalah 20 mg/kg BB/hari, diberikan sebanyak 5 kali dalam waktu 4 minggu. Pemberian pertama dilaksanakan pada hari ke 5 pasca pemberian streptozocin terakhir.

Dosis hidrosokobalamin sebesar tersebut berhasil; 1) mencegah peningkatan kadar nitrat dan nitrit serum dan 2) menghambat ekspresi *iNOS*, 3) mencegah peningkatan indeks *insulinitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas serta 4) mencegah peningkatan kadar glukosa darah hewan coba tikus wistar diabetes MLD-STZ— model DMT 1.

Disimpulkan bahwa pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  memperbaiki keadaan hewan coba tikus diabetes MLD-STZ, dengan demikian pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$ , diduga dapat dipergunakan untuk mempengaruhi DMT 1 pada manusia, misalnya pada tahap awal yaitu pada saat telah ditemukan ICA (*islet cells autoantibodies*) sebelum timbulnya hiperglikemia karena  $\text{NO}^{\cdot}$ .

## SUMMARY

### **Hydroxocobalamin Influence on Pathogenesis of Diabetes in MLD-STZ diabetic Wistar Rats — Type 1 Diabetes Mellitus Model.**

Type 1 Diabetes Mellitus is an autoimmune disease. The disease is initiated by insulinitis—a pancreatic inflammation dominated by infiltration of mononuclear cells (macrophage, monocyte, and T lymphocyte). Type 1 Diabetes Mellitus elicits CD4+ T cell phenotype producing IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  stimulate pancreatic  $\beta$  cells and macrophages to express iNOS— an enzyme catalyzing NO<sup>•</sup> formation. NO<sup>•</sup> has a wide physiological function , however in excess, the radical raises negative effects on cells. Studies indicate that NO<sup>•</sup> is a medium in the pathogenesis of type 1 Diabetes Mellitus in both human and type 1 Diabetes Mellitus model of rat.

The objective of this Study was to study the role of NO<sup>•</sup> on pathogenesis of MLD-STZ diabetic Wistar rat—type 1 Diabetes Mellitus model. Parameters measured in this Study were : 1) nitrate and nitrite serum level, NO<sup>•</sup> in biological fluid being oxidized to stable nitrate and nitrite, 2) amount of cells expressing iNOS in pancreatic islet, 3) Insulinitis index, and 4) Blood sugar level. The design used in this Study is The post only control group design, using ANOVA for statistical analysis with 5% level o significance.

Rattus Norvegicus rats, Wistar strain, age 4 week were administered subtoxic streptozocin to create MLD-STZ diabetic Wistar rat—type 1 Diabetes Mellitus model. In a preliminary eksperiment, 3 groups of male Wistar rats were each given one of the 3 variation of subtoxic streptozocin doses intraperitoneally ie: 25 mg/kg/day, 20 mg/kg/day, 15 mg/kg/day. Streptozocin dose of 20

mg/kg/day in 5 consecutive days, intraperitoneally, optimally create MLD-STZ diabetic Wistar rat—Type 1 Diabetes Mellitus model. Within 4 weeks after the last streptozocin administration, hyperglycemia ( $> 181$  mg/dl) and insulinitis (sign of autoimmune process in rats receiving subtoxic doses of streptozocin) were detected. The immune process was on islet  $\beta$  cells since streptozocin was a specific toxin for islet  $\beta$  cells. Streptozocin release  $\text{NO}^{\cdot}$  and  $\text{OH}^{\cdot}$ .

Hydroxocobalamin was used to study the role of  $\text{NO}^{\cdot}$  on pathogenesis of MLD-STZ diabetic Wistar rat—Type 1 Diabetes Mellitus. The vitamin is a nucleophile thus making it easily sequesters  $\text{NO}^{\cdot}$  to form nitrosocobalamin, which will be excreted in urine. Hydroxocobalamin dose of 20 mg/kg/day were administered 5 times within 4 weeks. Initial administration of the vitamin is done 5 days after the last administration of streptozocin. The administered dose of hydroxocobalamin : 1) prevented iNOS expression, 2) lowered insulinitis index in islet, 3) reduced serum nitrate and nitrite, 4) corrected rats blood glucose level.

In conclusion, the sequestration of  $\text{NO}^{\cdot}$  corrected the condition of rats with MLD-STZ Diabetes. The vitamin can thus be used to prevent type 1 Diabetes Mellitus pathogenesis at least in model rats and possibly also in the early stages of type 1 Diabetes Mellitus in humans when islet cells autoantibodies (ICA) were already detected prior to the presence of hyperglycaemia.

## ABSTRACT

### **Hydroxocobalamin influence on MLD-STZ diabetic Wistar rats — Type 1 Diabetes Mellitus Model.**

**DOTI WAHYUNINGSIH**

Nitric oxide has a very wide physiological function, however in excess, the radical causes negative effects on cells. Studies indicate that nitric oxide promotes autoimmune reaction and mediates destruction in islet cells both in human and type 1 Diabetes Mellitus model rat. In this Study hydroxocobalamin was used for studying nitric oxide role on the pathogenesis of MLD-STZ (Multiple low doses streptozocin) diabetic Wistar rat—type 1 Diabetes Mellitus model. The vitamin is a nucleophile that easily reacts with nitric oxide to form nitrosocobalamin which will be then excreted in urine.

*Rattus Norvegicus*, male, Wistar strain, age 4 weeks, were induced by 20 mg/kg/day of Streptozocin, in 5 consecutive days intraperitoneally. The dose of streptozocin evoke MLD-STZ Diabetes Mellitus—Type1 Diabetes Mellitus model, 4 weeks after the last streptozocin administration.

In this Study, Five days after the last intraperitoneally administration of streptozocin dose of 20 mg/kg/day, the rats received hydroxocobalamin 20 mg/kg/day intramuscularly five times during 4 weeks. The administered dose of hydroxocobalamin :1) lowered insulinitis index, 2) reduced expression of iNOS enzyme in islet, 3) reduced nitrate and nitrite serum level , and 4) corrected rats blood glucose level.

The design used in this experiment was the post test only control group design, using Anova for statistical Analysis, and 5% level of significance.

**Key words:** Hydroxocobalamin, Type 1 Diabetes Mellitus, Streptozocine, Nitric Oxide, MLD-STZ diabetic rat.

**DAFTAR ISI**

|  | Halaman |
|--|---------|
| LEMBAR PERSETUJUAN.....  | iii     |
| UCAPAN TERIMA KASIH.....   | vi      |
| RINGKASAN .....  | viii    |
| SUMMARY .....  | x       |
| ABSTRACT .....   | xii     |
| DAFTAR ISI .....   | xiii    |
| DAFTAR TABEL .....   | xv      |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xvii    |
| DAFTAR LAMPIRAN.....   | xx      |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xxi     |
| <br>   |         |
| BAB I PENDAHULUAN .....  | 1       |
| 1.1 Latar Belakang .....   | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....  | 4       |
| 1.3 Tujuan Penelitian.....                                       | 5       |
| 1.4 Manfaat Penelitian.....                                      | 6       |
| <br>   |         |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....                                     | 7       |
| 2.1 Diabetes Mellitus .....                                      | 7       |
| 2.2 Insulin .....  | 15      |
| 2.2.1 Sekresi insulin .....                                      | 17      |
| 2.2.2 Aksi biologis dari insulin .....                           | 20      |
| 2.3 Patogenesis DM1 .....  | 26      |
| 2.4 Limfosit T.....  | 39      |
| 2.5 Nitrogen Oksida.....   | 59      |
| 2.6 Sitokin.....   | 70      |
| 2.7 Diabetes karena Streptozocin.....                            | 75      |
| 2.8 Kelenjar Pankreas.....                                       | 81      |
| 2.9 Pengendalian Sintesis dan Sekresi Insulin Intraseluler ..... | 84      |
| 2.10 Stres Oksidatif .....                                       | 86      |
| 2.11 Kobalamin.....  | 90      |
| <br>   |         |
| BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....                     | 97      |
| 3.1 Kerangka Konseptual.....                                     | 97      |
| 3.2 Hipotesis.....   | 102     |
| <br>   |         |
| BAB 4 METODE PENELITIAN.....                                     | 103     |
| 4.1 Rancangan Penelitian.....                                    | 103     |
| 4.2 Unit Eksperimen dan Utangan.....                             | 105     |
| 4.3 Variabel Penelitian.....                                     | 106     |

|   | Halaman    |
|---|------------|
| 4.4 Definisi Operasional.....   | 106        |
| 4.5 Bahan Penelitian .....  | 108        |
| 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....  | 108        |
| 4.7 Analisis Data .....   | 108        |
| 4.8. Prosedur Penelitian.....   | 109        |
| <b>BAB 5 HASIL PENELITIAN dan ANALISIS HASIL PENELITIAN.....</b>  | <b>111</b> |
| 5.1 Penentuan Dosis Streptozocin untuk Membuat Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....  | 111        |
| 5.2 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Kadar Gula Darah Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....  | 121        |
| 5.3 Pengaruh Pemberian Hidroksokobalamin terhadap Kadar Nitrat dan Nitrit Serum pada Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ ..                       | 123        |
| 5.4 Indeks <i>Insulinitis</i> pada Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....  | 126        |
| 5.5 Ekspresi Enzim <i>iNOS</i> pada Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....   | 128        |
| 5.6 Hubungan antar Variabel Penelitian .....  | 132        |
| <b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>  | <b>134</b> |
| 6.1 Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....   | 135        |
| 6.2 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Kadar Gula Darah Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ .....  | 136        |
| 6.3 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Ekspresi Enzim <i>iNOS</i> Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ.....   | 139        |
| 6.4 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Kejadian <i>Insulinitis</i> dalam Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ..... | 141        |
| 6.5 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Kadar Nitrat dan Nitrit Serum Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ.....  | 142        |
| 6.6 Hubungan antar Variabel Penelitian .....  | 142        |
| <b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>   | <b>144</b> |
| 7.1 Kesimpulan .....  | 144        |
| 7.2 Saran .....   | 144        |
| DAFTAR PUSTAKA.....   | 146        |
| LAMPIRAN.....   | 155        |

## DAFTAR TABEL

|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| Tabel 2.1.1  | Klasifikasi Etiologi dari Diabetes Mellitus (ADA 2005).....                                       | 14  |
| Tabel 2.3.1  | Patogenesis DMT1 .....  | 36  |
| Tabel 2.4.1  | Profil sitokin dari sel limfosit CD4+ T (sel Th).....   | 50  |
| Tabel 2.5.1  | Nitrogen Oksida dalam biologi .....   | 60  |
| Tabel 2.10.1 | Spesies oksigen aktif utama .....   | 88  |
| Tabel 5.1.1  | Kadar Gula Darah Hewan Coba Tikus yang Terpapar<br>Streptozocin.....                              | 112 |
| Tabel 5.1.2  | Indeks <i>Insulitis</i> Pulau Langerhans Jaringan Pankreas<br>Tikus Wistar .....                  | 113 |
| Tabel 5.2.1  | Kadar Glukosa Darah Hewan Coba Tikus Wistar.....  | 121 |
| Tabel 5.2.2  | Hasil Analisis Variansi Kadar Glukosa Darah<br>antar Kelompok Perlakuan .....                     | 122 |
| Tabel 5.2.3  | Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Kadar<br>Glukosa Darah antar Kelompok Perlakuan .....     | 123 |
| Tabel 5.3.1  | Kadar Nitrat dan Nitrit pada Hewan Coba Tikus Wistar.....   | 123 |
| Tabel 5.3.2  | Hasil Analisis Variansi Kadar Nitrit Antar<br>Kelompok Perlakuan .....                            | 124 |
| Tabel 5.3.3  | Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Kadar Nitrat<br>antar Kelompok Perlakuan .....            | 124 |
| Tabel 5.3.4  | Hasil Analisis Variansi Kadar Nitrat antar<br>Kelompok Perlakuan .....                            | 125 |
| Tabel 5.3.5  | Hasil Analisis Perbandingn Ganda (LSD) Kadar Nitrat<br>antar Kelompok Perlakuan .....             | 126 |
| Tabel 5.4.1  | Indeks <i>Insulitis</i> Hewan Coba Tikus Wistar .....   | 127 |
| Tabel 5.4.2  | Hasil Analisis Variansi Indeks <i>Insulitis</i><br>antar Kelompok Perlakuan .....                 | 127 |
| Tabel 5.4.3  | Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD)<br>Indeks <i>Insulitis</i> antar Kelompok Perlakuan ..... | 128 |

|                    |   |            |
|--------------------|---|------------|
| <b>Tabel 5.5.1</b> | <b>Jumlah Sel Penghasil <i>iNOS</i> dalam Pulau Langerhans .....</b>  | <b>129</b> |
| <b>Tabel 5.5.2</b> | <b>Hasil Analisis Variansi Jumlah Sel penghasil Enzim <i>iNOS</i> antar Kelompok perlakuan .....</b>          | <b>129</b> |
| <b>Tabel 5.5.3</b> | <b>Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Jumlah Sel Penghasil <i>iNOS</i> Antar Kelompok Perlakuan.....</b> | <b>130</b> |





## DAFTAR GAMBAR

|  |    |
|--|----|
| Gambar 2.1.1 Gangguan dari glikemia: tipe penyebab dan tingkatannya.....   | 13 |
| Gambar 2.2.1 Struktur dari proinsulin dan insulin manusia .....  | 16 |
| Gambar 2.2.2 Gambaran diagramatik sekresi insulin dari sel $\beta$ pankreas .....  | 17 |
| Gambar 2.2.3 Alur sinyal dalam sel $\beta$ yang teraktivasi oleh pemicu eksternal .....  | 25 |
| Gambar 2.3.1 Proses otoimun diawali oleh ekspresi HLA class II .....   | 28 |
| Gambar 2.3.2 Ilustrasi <i>molecular mimicry</i> pada patogenesis otoimun.....  | 29 |
| Gambar 2.3.3 Kerusakan sel $\beta$ yang diperantari mekanisme imun.....  | 33 |
| Gambar 2.3.4 Morfologi sel pada berbagai tingkatan proses apoptosis.....   | 35 |
| Gambar 2.3.5 Alur yang digunakan proses imun untuk menyerang Sel $\beta$ dapat menimbulkan nekrosis atau apoptosis pada sel tersebut ..... | 37 |
| Gambar 2.3.6 Dua model kejadian otoimun dari DM1I .....  | 38 |
| Gambar 2.4.1 Diagram trisan Timus .....  | 42 |
| Gambar 2.4.2 Timosit <i>double positive</i> CD4+CD8+ menjadi sel T CD4+ dan sel T CD8+ .....   | 43 |
| Gambar 2.4.3 Pengaktifan sel T memerlukan ekspresi antigen dan Molekul <i>costimulatory</i> B7.1 dan B7.2 pada suatu APC .....             | 47 |
| Gambar 2.4.4 Model Instruktif dan Model Stokastik .....  | 49 |
| Gambar 2.4.5 Model Induktif/Selektif .....   | 50 |
| Gambar 2.4.6 Seleksi Positif dan Seleksi Negatif terhadap Timosit di dalam Timus .....   | 51 |
| Gambar 2.4.7 Sitokin menyebabkan polarisasi Th1 atau Th2 .....   | 56 |
| Gambar 2.4.8 Sifat dan fungsi utama dari respon terpolarisasi Th1 atau Th2.....  | 57 |
| Gambar 2.4.9 Faktor polarisasi bagi Th1 dan Th2 .....  | 58 |

|               |  |     |
|---------------|--|-----|
| Gambar 2.5.1  | Reaksi oksidasi NO <sup>•</sup> .....  | 61  |
| Gambar 2.5.2  | Reaksi pemisahan homolitik dan reaksi pemisahan Heterolitik pada S-nitrosotiol .....   | 63  |
| Gambar 2.5.3  | Bentuk Redoks dari senyawa NO (Nitrogen Oksida) .....  | 65  |
| Gambar 2.5.4  | Pembentukan NO <sup>•</sup> yang dikatalisis enzim NO sintase .....  | 65  |
| Gambar 2.5.5  | Senyawa yang dapat dihasilkan, jika radikal NO bereaksi dengan superoksida .....   | 66  |
| Gambar 2.5.6  | Struktur Heme .....  | 69  |
| Gambar 2.6.1  | Bagan Penginduksian dan fungsi sitokin .....   | 71  |
| Gambar 2.6.2  | Aksi <i>pleiotrophy, redundancy, synergism, antagonism</i> , dan induksi berangkai dari sitokin .....                                  | 72  |
| Gambar 2.6.3  | Interaksi antigen makrofag menyebabkan aktivasi sel Th .....   | 74  |
| Gambar 2.7.1  | Reaksi alkilasi ion karbonium dari streptozocin dengan Atom N <sup>7</sup> dari basa guanin .....                                      | 78  |
| Gambar 2.8.1  | Bagan kelenjar pankreas .....  | 81  |
| Gambar 2.8.2  | Sel $\alpha$ dan sel $\beta$ dalam pulau Langerhans .....  | 82  |
| Gambar 2.8.3  | Irisan melalui pulau Langerhans dan sel asini disekitarnya .....   | 82  |
| Gambar 2.9.1  | Gambar skematik dari partisipasi sistim <i>microtubular-Microfilamentous</i> dalam proses sekresi insulin yang diinduksi glukosa ..... | 86  |
| Gambar 2.10.1 | Stres oksidatif .....  | 89  |
| Gambar 2.11.1 | A) Susunan tetrapirrol dari cincin Corrin pada kobalamin<br>B) Susunan tetrapirrol dari porfirin pada hemoglobin .....                 | 92  |
| Gambar 2.11.2 | Struktur formula dari kobalamin .....  | 94  |
| Gambar 2.11.3 | Cincin <i>Corrin</i> dari Kobalamin .....  | 95  |
| Gambar 2.11.4 | Nitrosokobalamin .....   | 96  |
| Gambar 3.1.1  | Bagan Kerangka Konsep .....  | 100 |
| Gambar 4.1.1  | Bagan Rancangan Penelitian Tahap I .....   | 103 |

|              |  |     |
|--------------|--|-----|
| Gambar 4.1.2 | Bagan Rancangan Penelitian Tahap II.....   | 104 |
| Gambar 4.8.1 | Bagan Prosedur Penelitian Tahap I.....   | 109 |
| Gambar 4.8.2 | Bagan Prosedur Penelitian Tahap II.....  | 110 |
| Gambar 5.1.1 | Jaringan pankreas tikus yang diberi streptozocin<br>25 mg/kgBB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari<br>Tampak terjadi nekrosis sel $\beta$ ..... | 114 |
| Gambar 5.1.2 | Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang<br>diinjeksi STZ dosis 20 mg/kg BB .....   | 115 |
| Gambar 5.1.3 | Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang<br>diinjeksi STZ dosis 15 mg/kg BB .....   | 116 |
| Gambar 5.1.4 | Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus<br>yang diinjeksi STZ 25 mg/kg BB .....   | 117 |
| Gambar 5.1.5 | Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus<br>tanpa injeksi STZ.....   | 118 |
| Gambar 5.1.6 | Jaringan pankreas hewan coba yang diberi streptozocin<br>20 mg/kgBB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari<br>Terdapat <i>insulitis</i> .....      | 119 |
| Gambar 5.1.7 | Jaringan pankreas tikus yang diberi 15 mg/kgBB/hari<br>streptozocin, intraperitoneal, selama 5 hari, Tidak terdapat<br><i>insulitis</i> .....  | 120 |
| Gambar 5.5.1 | Imunohistokimia menggunakan anti iNOS dari<br>Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus<br>yang diinjeksi dengan STZ .....        | 131 |
| Gambar 5.5.2 | Imunohistokimia menggunakan anti iNOS dari<br>Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus<br>yang diinjeksi dengan STZ.....         | 132 |
| Gambar 5.6.1 | Diagram jalur pengaruh satu variabel terhadap<br>variabel yang lain .....  | 133 |
| Gambar       | (pada Lampiran 5) Reaksi Griess .....  | 163 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|   |     |
|---|-----|
| Lampiran 1. Hasil Analisis Statistik.....   | 155 |
| Lampiran 2. <i>Text Kit</i> untuk pemeriksaan Glukosuria.....   | 160 |
| Lampiran 3 . Pemeriksaan glukosa.....   | 161 |
| Lampiran 4. Pemeriksaan kadar glukosa darah.....  | 162 |
| Lampiran 5. Pemeriksaan Nitrat dan Nitrit.....  | 163 |
| Lampiran 6. Pemeriksaan <i>insulinitis</i> dan enzim <i>iNOS</i> .....  | 167 |
| Lampiran 7. Diagram alur pemeriksaan nitrat dan nitrit, gula darah, indeks insulinitis, dan enzim <i>iNOS</i> hewan coba tikus yang terpapar streptozocin (STZ), dengan dan tanpa pemberian hidrosokobalamin..... | 170 |
| Lampiran 8 Pembuatan sediaan jaringan pankreas.....   | 171 |
| Lampiran 9 Mempersiapkan serum darah.....   | 172 |
| Lampiran 10 Pembuatan hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ.....   | 173 |
| Lampiran 11 Memhuat Buffer Citrat pH 4.5 10mM .....   | 175 |
| Lampiran 12 Kadar gula darah hewan coba tikus Wistar yang menerima Streptozocin (STZ) dosis subtoksik, secara intraperitoneal, Setiap hari selama 5 hari.....   | 176 |
| Lampiran 13 Jumlah sel penghasil <i>iNOS</i> dalam pulau Langerhans Jaringan pankreas.....  | 177 |
| Lampiran 14 Indeks insulinitis hewan coba tikus.....  | 178 |
| Lampiran 15 Kadar nitrat dan nitrit hewan coba tikus.....   | 179 |
| Lampiran 16 Prosedur Injeksi Intraperitoneal pada hewan coba tikus.....   | 180 |
| Lampiran 17 Analisis Hubungan antar Variabel Penelitian .....   | 181 |

## DAFTAR SINGKATAN

AA-Asam Arakhidonat  
 ADA - *American Diabetes Association*  
 anti GADs – *antiGlutamic Acid Decarboxylate Autoantibodies*  
 ANC – *Adenine Nucleotide Carrier*  
 APC – *Antigen Presenting Cell*  
 AP-1 – *Activator protein-1*  
 BB *Bio Breeding*  
 BBdp – *Bio Breeding diabetic prone*  
 CaM – *Calmodulin*  
 CCK-*Cholecystokinin*  
 CD *Cluster of Differentiation*  
 CMI *Cell Mediated Immunity*  
 cNOS – *Constitutive Nitric Oxide Synthase*  
 DAG- *Diacyl Glycerol*  
 DM1 – *Diabetes Mellitus Tipe 1*  
 DNA – *Deoxyribo Nucleic Acid*  
 E-SOD – *Eritrosit- Superoksida dismutase*  
 GADs *Autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase*  
 GLO 1 *Glioxolase 1*  
 GLP-1- *Glucagon-like peptide-1*  
 GLUT – *Glucose Transporter*  
 GMP<sub>s</sub> – *Guanosin Monofosfat Siklik*  
 GSH – *Gluthation*  
 GSNO – *S- Nitroso Gluthation*  
 GTP-Guanosin Trifosfat  
 HLA – *Human Leucoeyte Antigen*  
 HNF- $\alpha$  – *Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$*   
 Hsp – *heat shock protein*  
 IAAs – *Insulin Associated Autoantibodies*  
 IAPP-*Islet Amyloid Poly Peptide*  
 ICAs *Islet Cell Autoantibodies*  
 IDDM – *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*  
 IFN – *Interferon*  
 IGF-1- *Insulin-Growth Factor-1*  
 IL – *Interleukin*  
 im – *intra muskuler*  
 iNOS – *Inductive Nitric Oxide Synthase*  
 ip – *intra peritoneal*  
 iv – *intra vena*  
 JAK *Janus Kinase*  
 LDL - *Low Density Lipoprotein*  
 L-NMMA *N<sup>G</sup>-nitrometil-L-arginin*  
 L-NIO *N-iminoetil-L-arginin*  
 L-NA – *N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin*  
 L-NAME – *N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-metilester*

L-NAA -  $N^G$ -amino-L-arginin  
LSD - *Least Significant Different*  
LPS - Lipo polisakarida  
MAP kinase - *Mitogen-associated protein kinase*  
MHC - *Major Histocompatibility Complex*  
MLCK- *Myosin Light-Chain Kinase*  
MLD-STZ - *Multiple Low Dose Streptozocin*  
MODY - *Maturity Onset Diabetes of the Young*  
NAD - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*  
NDMT1- *Non Diabetes Mellitus Tipe 1*  
NF- $\kappa$  B - *Nuclear Factor-kappa B*  
NHTI - *Nontypeable Haemophilus Influenzae*  
NIDDM - *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus*  
NK - *Natural Killer*  
NO<sup>•</sup> - Nitrogen Oksida  
NOD - *Non Obese Diabetic*  
OHA - *Oral Hypoglycemic Agent*  
PACAP- *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*  
PARP - *poly (ADP-ribose) polymerase*  
PARS - *poly (ADP-ribose) synthase*  
PDE- *Phosphodiesterase*  
PI-3-K- *phosphoinositide-3-kinase*  
PKA- protein kinase A  
PKB - protein kinase B  
PKC = protein kinase C  
PLA<sub>2</sub> - *Phospholipase A<sub>2</sub>*  
PLC- *Phospholipase-C*  
RAG - *Recombination-Activating Genes*  
RDA - *Recommended Dietary Allowances*  
Sc1 pp- *Sc1 pancreatic polypeptide*  
STAT - *Signal Transducers and activators of transcription*  
STZ - *Streptozocin*  
SUR-1 - *Sulphonylurea Receptor-1*  
TCR - *T Cell Receptor*  
Tc - *T cytotoxic*  
TGF-  $\beta$  - *Transforming Growth Factor-  $\beta$*   
Th - *Helper*  
TNF - *Tumor Necrosis Factor*  
VIP- *Vasoactive Intestinal Polypeptide*

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Diabetes Mellitus tipe 1 (DMT 1) merupakan penyakit otoimun (Notkins, 2002). Kejadian DMT 1 diawali oleh *insulitis* yaitu peradangan pada jaringan pankreas yang didominasi oleh sel mononuklear ( limfosit, makrofag, dan monosit) (Suryohudoyo, 2000). *Insulitis* akan diikuti oleh kematian sel  $\beta$ , salah satu penyebabnya karena proses fagositosis oleh makrofag (Zumsteg, et al, 2000).

Penderita diabetes tipe DMT 2 dalam perjalanan penyakitnya dapat menjadi penderita diabetes tipe DMT 1. Penderita DM yang demikian disebut sebagai DM tipe X. Patogenesis DM tipe X dapat merupakan suatu proses otoimun pada sel  $\beta$  jaringan pankreas (Tjokropawiro, 1991). Penderita DMT 1 mensintesis NO' lebih tinggi dari individu sehat (O'Byrne et al, 2000). NO' bereaksi dengan superoksida ( $O_2^{\cdot -}$ ) atau hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) membentuk peroksinitrit ( $OONO^{\cdot}$ ) (Stamler et al, 1992<sup>b</sup>). Senyawa ini bersifat toksik bagi DNA (Yoshikawa, 2002).

Kekhasan kondisi patofisiologi DMT 1 pada manusia adalah dominasi respon limfosit T CD4+ penghasil IFN- $\gamma$  (Romagnani, 2000). IFN- $\gamma$  mengganggu fungsi sel  $\beta$  melalui mekanisme yang melibatkan radikal NO' yang terbentuk dalam sel  $\beta$  (Suarez-Pinson et al, 1997). NO' berhubungan dengan penghambatan sekresi insulin, karena senyawa target molekul ini adalah enzim yang mengandung besi atau sulfur intraseluler, yang akan menyebabkan gangguan fungsi metabolisme dan sintesis DNA, yang menyebabkan menurunnya konsentrasi ATP (Corbett, 1992). Penurunan konsentrasi ATP berdampak menghambat

sekresi insulin (Langin, 2001) dan penghambatan sekresi insulin meningkatkan kadar gula darah. Senyawa nitrogen reaktif memodulasi ekspresi dan pengeluaran protein sitokin seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, dan *platelet derived growth factor* (Bellocq, 1999).

NO $^{\cdot}$  sebagai salah satu dari senyawa nitrogen reaktif berfungsi sebagai *signal transducer agent* (Bloodworth et al, 2000) dan bagi makrofag senyawa ini merupakan pesan interseluler untuk memulai aktivitasnya sebagai bakterisid maupun tumorisid (Marletta et al, 1988). Sehubungan dengan uraian sebelumnya, sampai saat ini belum banyak dipelajari dampak pengikatan NO $^{\cdot}$  pada patogenesis DMT I.

Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus Wistar MLD-STZ (*multiple low dose streptozocin*)—suatu model DMT I pada hewan coba tikus karena pemberian streptozocin dosis subtoksik secara berulang. Penelitian pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ mengindikasikan bahwa NO $^{\cdot}$  merupakan spesies radikal bebas spesifik yang berperan sebagai molekul efektor primer pada gangguan fungsi sel  $\beta$  yang diperantarai oleh sitokin (Lindsay et al, 1995).

Sitokin proinflamasi yang memperantarai gangguan fungsi sel  $\beta$  adalah IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Lakey et al, 2001). IFN- $\gamma$  memicu makrofag mensekresi sitokin IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . 3 sitokin tersebut menyebabkan transkripsi enzim *iNOS*-enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan NO $^{\cdot}$  (Suarez-Pinson et al, 1997). Selain dihasilkan oleh tubuh sendiri, bermacam radikal bebas juga berasal dari asupan, dan berdampak merugikan apabila jumlahnya cukup untuk merusak sel (Yoshikawa, 2002).



Senyawa N-nitroso adalah salah satu dari sumber  $\text{NO}^{\cdot}$  eksogen dan merupakan polutan yang terdapat di udara dan di makanan (Ladoux et al, 1986). Salah satu dari senyawa yang termasuk dalam golongan N-nitroso adalah streptozocin ( STZ ) (The Merck Index, 1976). STZ dapat melepas  $\text{NO}^{\cdot}$  dan  $\cdot\text{OH}$  (radikal hidroksil) dalam jumlah besar (Orzechowski, 2003). Dosis subtoksik standar adalah 40mg/kg diberikan sekali sehari selama 5 hari untuk menghasilkan hewan coba MLD-STZ- model DMT I(Wang, 1998).

Untuk mempelajari peran  $\text{NO}^{\cdot}$  pada patogenesis Diabetes Mellitus pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, digunakan hidroskobalamin. Pemilihan senyawa ini berdasar pada fakta bahwa hidroskobalamin tersusun dari cincin Corrin yang mengandung ion kobalt. Dalam cincin Corrin ion ini bersifat *nucleophile*, sehingga memudahkannya mengikat radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  untuk membentuk senyawa nitroskobalamin yang akan diekskresi melalui urin (Greenberg et al, 1995).

Radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  dalam cairan tubuh terdapat dalam bentuk nitrit dan nitrat, karenanya pemberian hidroskobalamin diharapkan dapat menurunkan kadar nitrit dan nitrat serum. Pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$ — suatu nitrogen reaktif, diharapkan mengurangi ekspresi dan pengeluaran sitokin IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IL-8 (yaitu sitokin yang memicu ekspresi enzim *iNOS*), karena  $\text{NO}^{\cdot}$  memicu sitokin – sitokin tersebut untuk mengekspresi enzim *iNOS*. Kejadian *insulinitis* diamati melalui indeks *insulinitis* jaringan pankreas (Gerling et al, 1994).

Pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  diharapkan menghambat toksisitas radikal ini terhadap sel  $\beta$ , sehingga tidak terjadi kerusakan sel  $\beta$ —kerusakan yang akan memicu migrasi sel makrofag dan limfosit T menuju jaringan pankreas (Notkins, 2002).

Timbulnya diabetes dipantau dari kejadian hiperglikemia pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, yaitu  $>181$  mg/dl (Elias, 1996). Pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  diharapkan menghambat kejadian *insulinitis*, peningkatan kadar nitrit dan nitrat serum, serta ekspresi enzim *iNOS* dari hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. Perbaikan dari 3 hal tersebut diharapkan dapat mengoreksi kadar glukosa darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.

## 1.2 Rumusan Masalah

Kejadian diabetes pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DMT 1 diawali oleh kejadian *insulinitis*. *Insulinitis* pada hewan coba tersebut melibatkan sel mononuklear (limfosit, makrofag, monosit). Pada DMT 1 limfosit yang berperan adalah fenotip T CD4<sup>+</sup> penghasil  $\text{IFN-}\gamma$ .  $\text{IFN-}\gamma$  adalah sitokin yang memicu sel makrofag untuk menghasilkan  $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , dan  $\text{NO}^{\cdot}$ . Selanjutnya  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IFN-}\alpha$ , dan  $\text{IL-1}\beta$  memicu produksi  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh sel  $\beta$ .  $\text{NO}^{\cdot}$  dapat berasal dari asupan atau diproduksi sendiri oleh tubuh. Makrofag adalah penghasil radikal  $\text{NO}^{\cdot}$ . Peran  $\text{NO}^{\cdot}$  dipelajari dengan memberikan hidroskobalamin pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DMT 1. Hidroskobalamin mengikat  $\text{NO}^{\cdot}$  untuk membentuk senyawa nitroskobalamin yang akan diekskresi melalui urin. Pengikatan tersebut diharapkan mencegah peningkatan jumlah  $\text{NO}^{\cdot}$  pada jaringan pankreas. Berdasarkan uraian di atas susunan rumusan masalah adalah sebagai berikut;

1. Apakah pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan kadar nitrit dan nitrat serum hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. ?

2. Apakah pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan ekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. ?
3. Apakah pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan indeks *insulinitis* dalam pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. ?
4. Apakah pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan kadar gula darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ. ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Maka tujuan penelitian adalah;

#### 1.3.1 Tujuan umum;

Mempelajari pengaruh pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  terhadap patogenesis diabetes pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.

#### 1.3.2 Tujuan khusus;

1. Membuktikan bahwa pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan nitrat dan nitrit dalam serum hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
2. Membuktikan bahwa pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan ekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
3. Membuktikan bahwa pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan indeks *insulinitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.

4. Membuktikan bahwa pengikatan  $\text{NO}^+$  oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan kadar gula darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.

#### 1. 4 Manfaat Penelitian

##### 1. 4. 1 Manfaat akademik:

Memberi sumbangan pemikiran bagi pengetahuan yang mempelajari pencegahan kelainan yang patogenesisnya melibatkan  $\text{NO}^+$ .

##### 1. 4. 2 Manfaat terapan:

1. Dapat dipergunakan sebagai salah satu alternatif pencegahan patogenesis DMT 1 pada manusia yaitu pada tahap awal sebelum ditemukan hiperglikemia tetapi telah ditemukan ICA (*islet cells autoantibodies*).
2. Dapat pula dipertimbangkan kegunaannya sebagai sarana pencegahan berbagai penyakit lain yang patogenesisnya melibatkan  $\text{NO}^+$

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang ditandai oleh kelainan metabolik dan komplikasi menahun pada mata, ginjal, susunan saraf, dan pembuluh darah ( Darmono, 2000). Prevalensi di Indonesia sebesar 1,5%-2,3% pada penduduk berusia di atas 15 tahun (Santoso dkk 2000). *International Diabetes Federation* dalam *Diabetes Atlas 2000* mencantumkan perkiraan penduduk Indonesia yang berusia diatas 20 tahun sebanyak 125 juta jiwa. Berdasarkan pola pertumbuhan penduduk seperti saat ini, diperkirakan pada tahun 2020 akan terdapat 178 juta penduduk berusia diatas 20 tahun. Dengan asumsi prevalensi DM sebesar 4,6 % akan terdapat 8,2 juta penderita DM (Perkeni, 2002).

Perkembangan penyakit diabetes melibatkan beberapa proses patogenik, perkembangan ini dapat terjadi karena kerusakan sel  $\beta$  pankreas oleh proses otoimun dengan akibat terjadi defisiensi sekresi insulin sampai terjadi karena kelainan pada insulin yang menyebabkan timbulnya resistensi insulin (keadaan dimana terjadi gangguan fungsi dari insulin pada jaringan sasaran). Resistensi insulin mendasari kelainan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein pada diabetes mellitus. Kinerja insulin yang tidak sempurna adalah akibat sekresi insulin yang tidak mencukupi dan atau menghilangnya respon jaringan terhadap insulin pada salah satu atau beberapa titik dari alur kinerja hormon ini. Gangguan sekresi insulin dan kelainan pada kinerja insulin sering kali terdapat pada satu penderita (ADA, 2005).

ADA (2005) membagi diabetes menjadi 4 tipe ; 1) DMT 1, 2) DMT2. 3) Tipe spesifik, dan 4) Tipe gestasional. Meskipun demikian sebagian besar kasus diabetes masuk pada 2 golongan besar yaitu DMT 1 dan DMT2.

DMT 1, penyebabnya adalah kerusakan sel  $\beta$  yang menyebabkan defisiensi absolut dari sekresi insulin. Pada DMT 1 kerusakan sel  $\beta$  karena proses otoimun. Individu yang memiliki risiko menderita diabetes tipe ini sering kali dapat dideteksi dengan bukti serologis adanya proses otoimun yang patologis pada pulau Langerhans jaringan pankreas. Pada tipe ini ditemukan petanda imun yang menunjukkan pengrusakan sel  $\beta$  pankreas (Shafir, 2003) . Petanda imun tersebut adalah ICAs, IAAs, dan GAD<sub>65</sub>, dan otoantibodi terhadap tirosin pospatase IA-2 dan 1A-2 $\beta$ . Salah satu atau semua dari petanda imun tersebut terdapat pada 85 – 90% individu penderita penyakit ini saat kadar glukosa puasa diperiksa pertama kali. Kecepatan kerusakan sel  $\beta$  pada DMT 1 sangat bervariasi, dapat berlangsung cepat (utamanya pada bayi dan anak-anak), dapat berlangsung lambat, terutama pada orang dewasa. Pada beberapa penderita utamanya anak-anak dan dewasa manifestasi pertama dari penyakit ini dapat disertai ketoasidosis. Pada tahap akhir, kadar peptida-C sangat berkurang atau tidak ada. Kerusakan sel  $\beta$  karena reaksi otoimun memiliki predisposisi genetik dan faktor lingkungan. Penderita DMT 1 biasanya juga menderita kelainan otoimun lain seperti *Graves' Disease*, tiroiditis hashimoto, *Addison's Disease*, hepatitis otoimun, vitiligo, miastenia gravis, anemia pernisiiosa, *celiac sprue* (ADA, 2005).

Beberapa DMT 1 penyebabnya tidak diketahui dan disebut diabetes idiopatik. Sebagian dari penderitanya mengalami insulinopenia permanen dan

menghadapi risiko ketoasidosis tetapi tanpa bukti adanya proses otoimun (ADA, 2005).

**DMT 2**, pada tipe ini terdapat resistensi insulin dengan defisiensi insulin relatif sampai terdapat gangguan sekresi insulin dengan resistensi insulin. Merupakan diabetes yang paling sering ditemukan, di Indonesia 60% penderitanya gemuk, dan terdapat resistensi insulin (Adam, 2000). Resistensi insulin adalah kelainan dimana pemunculan insulin terhadap transportasi glukosa dalam otot dan jaringan lemak terganggu, dan tidak sempurna dalam menekan produksi glukosa hati. Intoleransi glukosa yang diikuti dengan timbulnya diabetes terjadi manakala kompensasi hipersekreksi insulin oleh sel  $\beta$  menurun (Langin, 2001). Penderita DMT2, mengalami resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Mereka tidak memerlukan pengobatan insulin untuk bisa bertahan hidup. Penyebab dari DMT2 belum jelas (Foster, 1997). Pada tipe ini jarang terjadi ketoasidosis, tetapi jika terjadi, umumnya berhubungan dengan hadirnya penyakit lain semisal infeksi. Kadar insulin pada penderita DMT2 bisa normal, bahkan meningkat. Risiko menderita DMT2 meningkat dengan bertambahnya usia, kegemukan dan kurang aktivitas fisik (ADA, 2005).

**DM tipe spesifik**, Diabetes tipe ini disebabkan beberapa hal diantaranya adalah;

*1. Kelainan genetik dari sel  $\beta$* . Bentuk diabetes ini seringkali ditandai oleh timbulnya hiperglikemia pada usia muda (umumnya sebelum 25 tahun), sering disebut sebagai MODY. Diabetes tipe ini ditandai oleh gangguan sekresi insulin dengan disertai atau tidak disertai oleh kelainan kinerja insulin. Kelainan ini diturunkan dalam pola otosomal dominan. Bentuk yang paling umum

berhubungan dengan mutasi pada kromosom 12 dalam (HNF)-1 $\alpha$ .(suatu *hepatic transcription factor*). Bentuk lainnya berhubungan dengan mutasi dalam gen glukokinase (pada kromosom 7p). Mutasi ini menyebabkan kelainan pada molekul glukokinase. Glukokinase mengubah glukosa menjadi glukosa 6 pospat yang akan memicu sekresi insulin oleh sel  $\beta$ . Karena glukokinase tidak sempurna maka diperlukan lebih banyak glukosa untuk diubah menjadi glukosa 6 pospat, sehingga jumlahnya memadai untuk memicu sekresi insulin oleh sel  $\beta$ . Mutasi pada DNA mitokondria terbukti berhubungan dengan kejadian diabetes mellitus disertai keadaan tuli. Kelainan genetik ada yang menyebabkan ketidak mampuan individu untuk mengubah proinsulin menjadi insulin (ADA, 2005).

2. *Kelainan genetik pada kinerja insulin*. Gangguan kinerja insulin yang berhubungan dengan mutasi pada reseptor insulin, yang menyebabkan hiperinsulinemia dan hiperglikemia ringan sampai terjadinya diabetes parah. Contoh penyakit yang berhubungan dengan mutasi reseptor insulin adalah; 1) sindroma resistensi insulin tipe A (hiperglikemia, *acanthosis nigricans*, pembesaran dan kiste ovarium), 2) sindroma *Leprechaunisme* dan sindroma Rabson-Mendehall, adalah sindroma karena terjadi mutasi reseptor insulin pada masa anak-anak yang menyebabkan perubahan fungsi reseptor insulin dan terjadi resistensi insulin yang ekstrem (ADA, 2005).

3. *Penyakit pada kelenjar eksokrin pankreas*. Semua proses yang merusak pankreas secara menyeluruh menyebabkan diabetes. Proses tersebut meliputi pankreatitis, trauma, infeksi, keganasan pada pankreas, dan pankreatektomi. Kecuali pada proses keganasan, kerusakan pada pankreas harus ekstensif agar dapat menimbulkan diabetes. *Adrenocarcinoma* yang hanya mengenai sebagian



kecil kelenjar pankreas, ternyata dapat menimbulkan diabetes. Hal ini menunjukkan terdapat mekanisme lain selain dari pengurangan jumlah sel  $\beta$  dalam menimbulkan diabetes. Penyakit *cystic fibrosis* dan *haemochromatosis* jika ekstensif dapat merusak sel  $\beta$  dan mengganggu sekresi insulin (ADA, 2005).

4. *Kelainan endokrin*. Beberapa hormon seperti; *Growth hormon*, kortisol, glukagon, epineprin, merupakan antagonis kinerja insulin. Jumlah yang berlebihan dari hormon-hormon ini (misalnya pada kasus akromegali, sindroma Cushing, glukagonoma, peokromositoma) dapat menyebabkan diabetes. Diabetes pada penderita ini timbul karena pada awalnya sudah terdapat gangguan pada sekresi insulin. Manakala kelebihan hormon teratasi maka hiperglikemia juga terkoreksi. Tumor stomatostatinoma dan aldosteronoma yang menginduksi hipokalemia, dapat menyebabkan diabetes, melalui mekanisme penghambatan sekresi insulin. Hiperglikemia dapat dikoreksi setelah pengambilan tumor (ADA, 2005).

5. *Obat-obatan dan bahan kimia yang menginduksi diabetes*. Obat-obatan dapat mengganggu sekresi insulin. Meskipun obat-obatan ini tidak secara langsung menyebabkan diabetes, tetapi dapat memperparah keadaan dari resistensi insulin. Vacor (suatu racun tikus) dan pentamidin dapat secara permanen merusak sel  $\beta$ . Terdapat banyak Obat-obatan lain dan hormon yang juga mengganggu kinerja insulin. Contohnya adalah asam nikotinat, glukokortikoid.

6. *Infeksi*. Beberapa virus dihubungkan dengan kerusakan sel  $\beta$ . Penderita rubela kongenital akan mengalami diabetes jika terinfeksi virus, perlu menjadi perhatian sebagian besar penderita ini memiliki HLA dan petanda imun yang khas bagi DMT 1. Virus lain seperti *coxsackie virus B*, *Cytomegalo virus*, *adenovirus*, dan

virus *Mumps* sering digunakan pada penelitian dengan hewan coba untuk menginduksi diabetes (ADA, 2005).

7. *Bentuk lain dari diabetes karena proses imun.* Disini terdapat 2 kondisi yang telah diketahui, yaitu sindroma *Stiff-man* dan terdapatnya antibodi anti-reseptor insulin. Sindroma *stiff-man* adalah kelainan karena proses otoimun pada susunan saraf pusat dengan gejala khas kekakuan pada otot aksial dan rasa nyeri pada otot tersebut. Pada umumnya penderita memiliki titer otoantibodi GAD yang tinggi, sepertiga dari penderita *Stiff-man* akan juga menderita diabetes melitus. Antibodi anti-reseptor insulin dapat menyebabkan diabetes dengan mengikat insulin reseptor, sehingga menghambat insulin untuk mengikat reseptornya pada jaringan target.

Sindroma genetik lain yang berhubungan dengan diabetes misalnya sindroma Down, sindroma Klinefelter, dan sindroma Turner. Sindroma-sindroma genetik tersebut seringkali disertai kejadian diabetes mellitus. Sindroma dari Wolfram merupakan kelainan otosomal resesif, dengan kelainan khas diabetes (karena defisiensi insulin dan tidak adanya sel  $\beta$ ), diabetes insipidus, hipogonadisme, atrofi optik, dan tuli saraf.(ADA, 2005).

**Diabetes mellitus Gestasional.** Semua tingkatan intoleransi glukosa selama kehamilan atau pertama kali terdeteksi pada saat kehamilan disebut sebagai diabetes mellitus gestasional. Definisi ini tentu saja tidak mengesampingkan kemungkinan bahwa intoleransi glukosa sudah ada sebelum kehamilan atau mulai bersama kehamilan. Diabetes mellitus gestasional terjadi pada hampir 90% dari semua kehamilan dengan komplikasi diabetes (ADA, 2005). Pada beberapa kasus ditemukan kejadian diabetes berat progresif dari

jenis DMT I yang berhubungan dengan kehamilan penderita. Meskipun DMT I tidak jarang timbul pada saat ada kehamilan, tetapi dalam bentuknya yang parah jarang ditemukan (Inagaki *et al.* 2002).

Saat ini di Indonesia telah dilakukan upaya deteksi dini terhadap diabetes yang didasarkan pada 4 buah parameter yaitu; 1) AIC (*Autoantibody to islet cell*), 2) *Blood glucose*, 3) *Blood pressure*, 4) *Albuminuria* ( disingkat ABBA) (Bidi, 2002). AIC dapat dideteksi bertahun-tahun sebelum terjadinya hiperglikemia. AIC dihubungkan dengan angka kejadian DMT I, karena semakin muda usia pada saat AIC pertamakali terdeteksi dan semakin tinggi titer AIC, maka semakin besar risiko untuk menderita DMT I (Atkinson, 1994). Otoantibodi lain yang berhubungan dengan DMT I adalah IAAs dan anti GADs (Donosepoetro, 1998).

| Tingkatan               | Normoglikemia<br>Regulasi glukosa<br>normal | Gangguan toleransi<br>glukosa<br>atau<br>Gangguan glukosa puasa<br>(pre diabetes) | Hiperglikemia<br>Diabetes mellitus   |
|-------------------------|---|---|--|
| Tipe                    |   |   | Tidak perlu Insulin    perlu insulin untuk mengendalikan kadar gula    perlu insulin agar bertahan hidup |
| Tipe 1*                 | ←-----→                                     |   |  |
| Tipe 2                  | ←-----→                                     |   |  |
| Tipe spesifik **        | ←-----→                                     |   |  |
| Diabetes gestasional ** | ←-----→                                     |   |  |

**Gambar 2.1.1 Gangguan dari glikemia: Tipe penyebab dan tingkatannya (ADA, 2005)**

\* Setelah terjadi ketoasidosis, penderita diabetes tipe ini segera dapat kembali ke keadaan normoglikemia, tanpa memerlukan terapi lanjutan; \*\* meskipun jarang penderita pada kategori ini (misal, karena keracunan, penderita DM tipe I pada saat hamil) memerlukan insulin untuk bertahan hidup.

Tabel 2.1.1  
Klasifikasi Etiologi dari Diabetes Mellitus (ADA, 2005)

- 
- I. DMT I (Kerusakan sel  $\beta$ , umumnya menyebabkan defisiensi insulin absolut)
- A. Karena proses imun
  - B. Idiopatik
- II. DMT2 (berkisar dari predominan resistensi insulin dengan defisiensi insulin relatif sampai predominan gangguan sekresi insulin dengan resistensi insulin)
- III. Tipe spesifik lain
- A. Kelainan genetik fungsi sel  $\beta$ 
    1. Kromosom 12, HNF-1a (MODY 3)
    2. Kromosom 7, glukokinase (MODY 2)
    3. Kromosom 20, HNF-4a (MODY 1)
    4. Kromosom 13, *insulin promoter factor-1* (IPF-1; MODY 4)
    5. Kromosom 17, HNF-1 $\beta$  (MODY 5)
    6. Kromosom 2, *NeuroD1* (MODY 6)
    7. DNA Mitokondria
    8. Lain-lain
  - B. Kelainan genetik dari kinerja insulin
    1. Resistensi insulin tipe A
    2. *Leprechaunism*
    3. Sindroma Rabson-Mendenhall
    4. Diabetes Lipotropik
    5. Lain-lain
  - C. Penyakit kelenjar eksokrin pankreas
    1. Pankreatitis
    2. Trauma/pankreatektomi
    3. Neoplasia
    4. Fibrosis sistik
    5. Hemokromatosis
    6. Pankreatopati fibrokalkulus
  - D. Kelainan endokrin
    1. Akromegali
    2. Sindroma Cushing
    3. Glukagonoma
    4. Peokromositoma
    5. Iipertinoid
    6. Somatostatlinoma
    7. Aldosteronoma
    8. Lain-lain
  - E. Karena induksi obat atau bahan kimia
    1. Vacor
    2. Pentamidin
    3. Asam Nikotinat
    4. Glukokortikoid
    5. Hormon Tiroid
    6. Diazoxida
    7. Agonis adrenergik  $\beta$
    8. Tiazida
    9. Dilantin
    10. Interferon- $\alpha$
    11. Lain-lain
  - F. Infeksi
    1. Rubella konginital
    2. Virus Cytomegalo
    3. Lain-lain
  - G. Bentuk lain dari diabetes yang dimediasi proses imun
    1. Sindroma *Stiff-man*
    2. Anti-antibodi reseptor insulin
    3. Lain-lain
  - H. Sindroma genetik yang kadang berhubungan dengan diabetes
    1. Sindroma Down
    2. Sindroma Klinefelter
    3. Sindroma Turner
    4. Sindroma Wolfram
    5. Ataksia Friedreich
    6. Korea Huntington
    7. Sindroma Laurence-Moon-Biedl
    8. Distrofi miotunik
    9. Porfiria
    10. Sindroma Prader-Willi
    11. Lain-lain
- IV. Diabetes Gestasional
-

Sebagian penderita diabetes mellitus yang pada awalnya adalah DMT 2, tetapi pada perkembangannya terbukti menjadi DMT 1. Penderita DMT 2 tersebut masuk ke dalam keadaan defisiensi insulin absolut dalam beberapa tahun, keadaan ini disebut sebagai diabetes tipe 1½ atau DMT 1 laten. Pada sebagian kasus penderita yang demikian ini, patogenesis penyakitnya bisa sama dengan patogenesis DMT 1 yaitu reaksi otoimun (Tuomi *et al*, 1993).

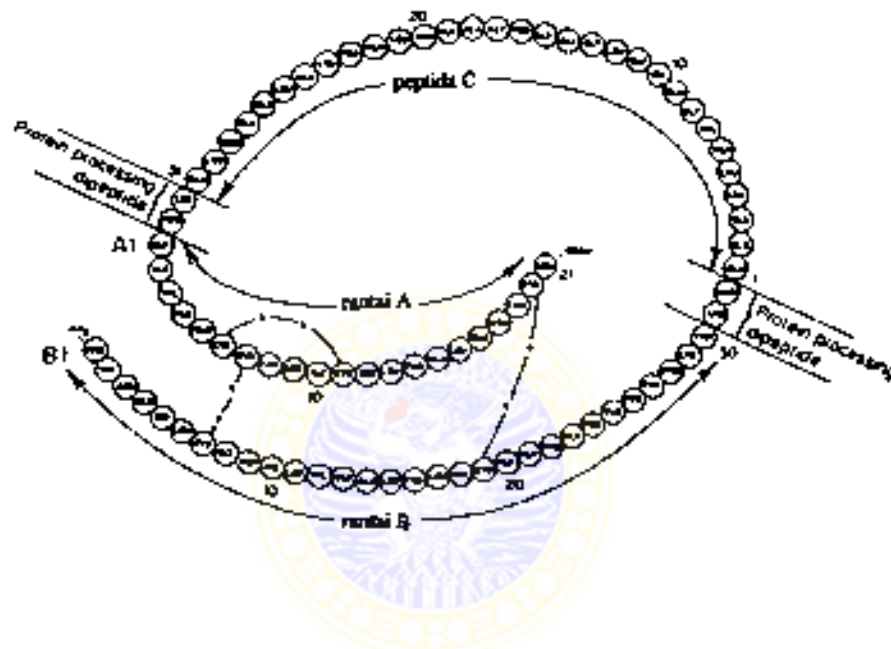
Tjokroprawiro (1991) menyatakan bahwa DMT 2 yang berkembang menjadi diabetes mellitus yang bergantung pada insulin maupun obat hipoglikemik oral disebut sebagai DM tipe X. Penderita DMT 2 dalam perjalanan penyakitnya dapat digolongkan pada DM tipe X, manakala terdapat hal-hal berikut ini; 1) penderita memerlukan terapi dengan OHA dan insulin untuk mengontrol kadar gula darah, 2) secara intensif menggunakan *Dietetic regiment*, 3) Melaksanakan olah raga secara optimal, 4) Bebas dari faktor-faktor yang mempengaruhi kadar glukosa darah, 5) non ketotik meskipun tanpa terapi insulin. Selanjutnya DM tipe X dibagi menjadi : 1) DM tipe X<sub>1</sub>, merupakan DM tipe X yang memiliki kadar peptida-C saat puasa normal yaitu 0,8 – 4 ng/ml, tetapi toleransi glukosa terganggu. 2) DM tipe X<sub>2</sub>, memiliki kadar peptida – C puasa sub normal 0,6 – 0,8 ng/ml. 3) DM tipe X<sub>3</sub>, kadar peptida – C puasa sangat rendah < 0,6 ng/ml, tipe yang terakhir ini mutlak bergantung pada pemberian insulin (Tjokroprawiro, 1991).

## 2.2 Insulin

Insulin berasal dari proinsulin. Insulin terdiri dari dua rangkaian rantai peptida. Rantai A (terdiri dari 21 asam amino) dan rantai B (terdiri dari 30 asam amino). Rantai A dan rantai B dihubungkan melalui dua buah ikatan disulfida.

Ikatan disulfida juga terdapat pada rantai A dari insulin, yang menghubungkan asam amino Cys-Cys dari rantai A.

Pro insulin merupakan rangkaian asam amino yang membentuk peptida C dan insulin. Pemutusan dipeptida Arg-Arg dan Lys-Arg akan memisahkan insulin dari peptida C.



**Gambar 2.2.1 Struktur dari Proinsulin dan Insulin Manusia (Bhagavan, 2001)**

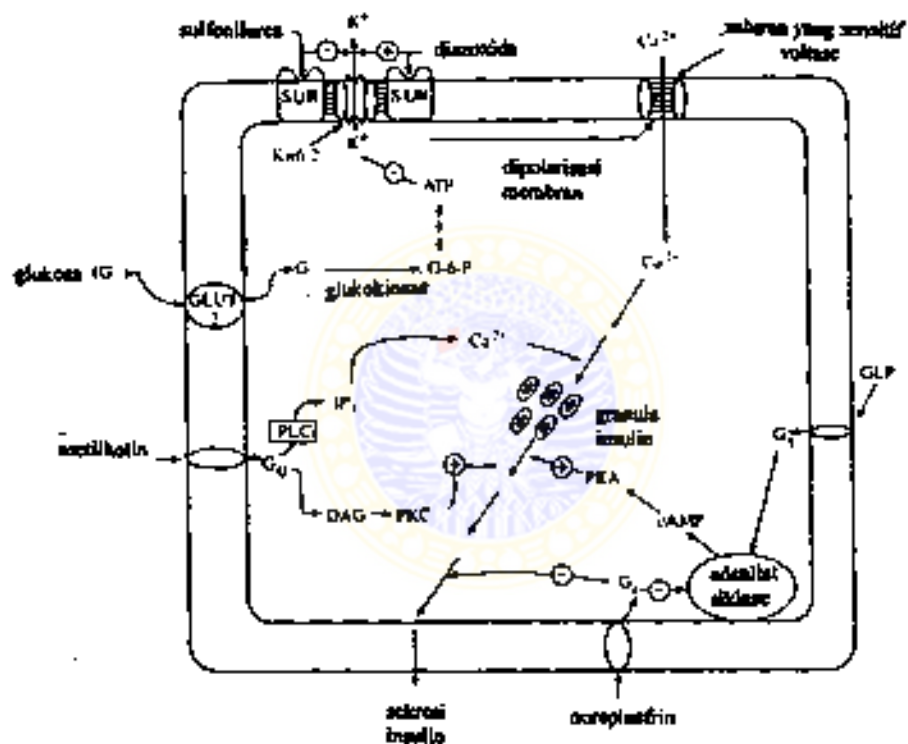
Insulin berasal dari proinsulin dengan memutus ikatan dipeptida Arg-Arg dan Lys-Arg. Pemutusan ikatan dipeptida tersebut akan menghasilkan rantai A dan rantai B. Rantai A dan Rantai B saling berhubungan melalui ikatan disulfida. Pada insulin babi asam amino no. 30 pada rantai B, dan pada sapi asam amino no. 8 pada rantai A adalah alanin, asam amino no. 10 pada rantai A adalah valin, dan asam amino no. 30 pada rantai B adalah alanin. Insulin sapi dan babi digunakan secara luas pada praktek klinik.

Perubahan proinsulin menjadi insulin terjadi di granula sekretori sel  $\beta$  pankreas. Perubahan ini tidak lengkap karena proinsulin terdeteksi saat terjadi sekresi insulin. Proinsulin mempunyai aktifitas biologis 5% dibanding aktivitas

biologis insulin. Peptida C tidak memiliki fungsi fisiologis, senyawa ini dipergunakan untuk membedakan insulin endogen dengan insulin eksogen.

### 2.2.1 Sekresi insulin

Glukosa, asam amino, glukagon, asetilkolin, dan senyawa  $\beta$ -adrenergik memicu sekresi insulin, sedangkan somatostatin dan  $\alpha$ -adrenergik menghambat sekresi insulin. Yang terbaik dalam memicu sekresi insulin adalah glukosa.



**Gambar 2.2.2** Gambar diagramatik dari sekresi insulin dari sel  $\beta$  pankreas (Bhagavan, 2001)

Urutan proses sekresi insulin yang menyertai masuknya glukosa ke dalam sel  $\beta$  terdiri dari : aksi dari glukokinase, produksi ATP, penghambatan saluran  $K^+$  yang sensitif terhadap ATP, depolarisasi membran, masuknya ion  $Ca^{2+}$  ke dalam sel  $\beta$ , dan pelepasan insulin. Asetilkolin dan norepinefrin memicu dan menghambat sekresi insulin melalui protein G trimerit  $G_q$  dan  $G_i$ .  $GLP$  (*Glucagon Like Peptide*) memicu pelepasan insulin melalui protein  $G_s$ . Sulfonamida dan Diazoksida mempunyai pengaruh langsung pada SUR.

Gambar 2.2.2 menunjukkan urutan kejadian yang menyebabkan sekresi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas manakala kadar gula darah meningkat. Gula darah masuk ke dalam sel  $\beta$  dengan bantuan GLUT 2 (*glucose transporter 2*). Setelah glukosa memasuki sel  $\beta$ , glukosa oleh glukokinase akan diubah menjadi glukosa-6-fosfat. Oksidasi glukosa-6-fosfat melalui glikolisis, siklus TCA, dan sistim transport elektron menyebabkan fosforilasi oksidatif yang memicu peningkatan ATP atau peningkatan ratio ATP/ADP dalam sel  $\beta$ . Peningkatan ATP menyebabkan penutupan saluran  $K^+$  yang sensitif terhadap ATP, penutupan ini menyebabkan penghambatan keluarnya ion  $K^+$  dan menyebabkan dipolarisasi dari potensial membran sel  $\beta$ . Saluran  $K^+$  yang sensitif terhadap ATP terdiri dari 2 sub unit protein yaitu : SUR (*Sulphonylurea Receptor*) dan saluran  $K^+$  (*Kir6.2*). SUR merupakan sub unit pengatur. Diduga saluran  $K^+$  merupakan kompleks oktamer yang terdiri dari sub unit SUR dan Kir6.2 dalam jumlah yang sama.

Depolarisasi dari membran sel  $\beta$  yang terjadi manakala saluran  $K^+$  yang sensitif terhadap ATP menutup, mengaktifkan saluran  $Ca^{2+}$  yang sensitif terhadap perubahan voltage membran sel, menyebabkan ion  $Ca^{2+}$  masuk ke dalam sel  $\beta$ , dan ini secara bersamaan menyebabkan keluarnya insulin dari granula insulin. Eksositosis dari insulin melibatkan fosforilasi dan ATPase. Bersama dengan insulin dan peptida C, juga disekresi amylin, suatu peptida yang terdiri dari 37 asam amino. Fungsi dari amilin belum diketahui.

Perubahan kadar ion  $Ca^{2+}$  dalam sitosol sel  $\beta$ , ternyata mempengaruhi sekresi insulin. Somatostatin menghambat masuknya  $Ca^{2+}$  ke dalam sel  $\beta$ , keadaan ini menyebabkan gangguan sekresi insulin. Asetilkolin menyebabkan



peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam sitosol yang diikuti dengan sekresi insulin yang disebabkan oleh aktivasi protein Gq, aktivasi fosfolipase C-inositol trifosfat- $\text{Ca}^{2+}$ , dan aktivasi protein kinase C.

Norepinefrin dan epinefrin menekan sekresi insulin dengan cara mengadakan ikatan pada situs reseptor  $\alpha$ -adrenergik dan menghambat adenilat siklase. Hambatan pada adenilat siklase dimediasi oleh aktivasi dari protein Gi (*protein G inhibitory*). Hal ini menyebabkan penghambatan produksi siklik AMP, yang akan menyebabkan penurunan aktivitas protein kinase A. Penurunan protein kinase A menentukan proses eksositosis yang berhubungan dengan fosforilasi yang diperlukan bagi sekresi insulin.

Penurunan sekresi insulin selama olah raga juga berhubungan dengan sekresi epinefrin, hormon GLP-1 (suatu hormon gastrointestinal), meningkatkan sekresi insulin melalui aktivasi protein G dari sistem protein kinase A siklik AMP adenilat siklase.

Hormon glukagon, memicu sekresi insulin sedangkan somatostatin menekan sekresi insulin. Koordinasi aktifitas hormon pankreas (glukagon, insulin, dan somatostatin) penting bagi homeostasis energi. Kerja insulin dihambat oleh glukagon, epinefrin, kortisol dan *growth hormon*. Ketiga hormon tersebut memperbaiki keadaan hipoglikemia dengan mempertahankan kadar glukosa yang mencukupi (misalnya pada jaringan otak, yang sangat bergantung pada glukosa sebagai energi).

Beberapa asam amino juga berfungsi sebagai pemicu sekresi insulin. Asam amino leusin memicu sekresi insulin melalui aktivasi glutamatdehidrogenase. Glutamatdehidrogenase adalah enzim mitokondria yang

mengubah glutamat menjadi  $\alpha$ -ketoglutarat melalui reaksi deaminasi oksidatif. Glutamatdehidrogenase dimodulasi positif oleh ADP dan dimodulasi negatif oleh GTP.  $\alpha$ -ketoglutarat kemudian dioksidasi menjadi ATP, selanjutnya ATP akan menutup saluran  $K^+$  yang sensitif terhadap ATP, hal ini menyebabkan pelepasan insulin.

### 2.2.2 Aksi biologi dari insulin

Insulin mempengaruhi semua jaringan. Hormon ini merupakan sinyal anabolik dan memicu penyimpanan energi dalam bentuk glikogen dan triasil gliserol. Sementara itu menghambat penguraian 2 jenis energi tersebut. Insulin juga memicu sintesis protein dan menghambat penguraiannya. Pengaturan ekspresi dari beberapa gen, dipengaruhi oleh insulin. Gen yang terlibat dalam ekspresi enzim yang berpartisipasi dalam penyimpanan energi (misalnya glukokinase hepar) ekspresinya dipicu, sedangkan gen yang mengkode enzim katabolik (misalnya fosfoenolpiruvat karboksikinase) ekspresinya dihambat. Pengaruh utama insulin terhadap glukosa darah adalah penyerapan glukosa menuju otot dan jaringan lemak. Mekanisme aksi insulin kompleks dan dapat dibagi menjadi 3 bagian yaitu : 1) pengikatan insulin pada reseptor insulin yang terdapat pada membran sel, 2) beberapa kejadian setelah terjadi ikatan antara insulin dengan reseptor insulin, 3) respon biologis (Bhagavan, 2001).

Faktor lain yang juga berperan pada sekresi insulin oleh sel  $\beta$  adalah sistem *second messenger*. Sistem ini berperan pada pengendalian langkah-langkah sekresi dan mengatur kepekaan tempat pelepasan insulin terhadap kadar ion  $Ca^{2+}$  yang ada.

### a. Sistem *Calcium Messenger*.

Peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  sitoplasma meningkatkan eksositosis melalui aktivasi serin/treonin kinase. Perantara dari aktivasi ini adalah golongan protein yang disebut Calmodulin (CaM), misalnya Protein kinase II bergantung pada  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (CaMK II). Penghambatan pada CaMK II mengganggu sekresi insulin yang diinduksi oleh nutrisi. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  juga mengaktifkan MLCK (*myosin light-chain kinase*) dan penghambatan terhadap MLCK mengganggu sekresi insulin yang dipicu glukosa (Ahren, Taborsky, 2003).

### b. Sistem *Phosphoinositide Messenger*.

Glukose meningkatkan produksi DAG dan IP<sub>3</sub>, diduga dengan cara memberi tambahan substrat pospolipid atau dengan cara mengaktifkan pospolipase membran. DAG dan IP<sub>3</sub> juga dibentuk melalui proses hidrolisis PIP<sub>2</sub> (pospatidil inositol-bispospat) melalui kerja pospolipase-C (LPC). LPC sangat penting untuk mengawali pelepasan insulin setelah aktivasi oleh reseptor muskarinik atau cholecystokinine (CCK). Isoenzim LPC yang terdapat pada sel  $\beta$  adalah PLC- $\beta$ 1, PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$ , PLC- $\delta$ . Aktivasi PLC dipicu oleh guanosin tripospat yang terikat protein. DAG terikat pada membran sel dan mengaktifkan protein kinase-C. Enzim golongan ini berperan sebagai serin/treonin kinase untuk memfosforilasi berbagai protein sel  $\beta$ . Sel  $\beta$  mengandung bermacam isoenzim PKC yang berbeda, termasuk bentuk konvensional seperti PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta$ , dan PKC- $\gamma$  (yang responsif terhadap  $\text{Ca}^{2+}$ ), serta PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\eta$ , dan PKC- $\theta$  ( yang tidak responsif terhadap  $\text{Ca}^{2+}$ , dan bergantung pada DAG), sedangkan PKC- $\xi$ , PKC- $\mu$ , dan PKC- $\lambda$ , tidak bergantung pada DAG maupun ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Manakala isoenzim PKC diaktifkan, akan dikirim ke membran plasma dan

disini akan memfosforilase protein-protein sel  $\beta$ , protein-protein ini pada gilirannya memodulasi saluran ion dan meningkatkan metabolisme sel, yang akan mempengaruhi sekresi insulin. DAG juga berinteraksi dengan membran retikulum endoplasmik untuk melepas kalsium yang tersimpan dalam organel ini. Aktivasi PKC juga menyebabkan terbentuknya IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> larut dalam sitoplasma dan berperan utama dalam pengaktifan PLC melalui asetilkolin atau CCK. Keadaan ini akan meningkatkan sekresi insulin yang diinduksi glukosa, tetapi jika tanpa glukosa aktivasi tidak akan terjadi. Masuknya ion Na<sup>+</sup> ke dalam sel juga menjelaskan terjadinya depolarisasi pada membran sel  $\beta$ . GLP-1 dan PACAP tampaknya meningkatkan masukan Na<sup>+</sup> ke dalam sel  $\beta$ . Kadar Na<sup>+</sup> yang tinggi dalam sel akan meningkatkan masukan Ca<sup>2+</sup>, sehingga meninggikan kadar Ca<sup>2+</sup> sitosol sel  $\beta$ .

### c. Sistem *Cyclic AMP Messenger*

Pengaktifan adenilat siklase oleh pemicu peptidergik (glukagon, GLP-1, PACAP, VIP) dan pemicu adrenergik- $\beta$  akan mengubah ATP menjadi AMPsiklik. Setiap pemicu tersebut memiliki sebuah reseptor yang terikat pada adenilat siklase melalui perantara protein G (*Guanine-binding protein*). AMPsiklik mengikat subunit regulatori dari PKA, mengaktifkan subunit katalitiknya (yang akan memfosforilasi protein). Terdapat 2 bentuk PKA. Salah satunya mempunyai subunit regulatori yang berada dalam sitosol, sedangkan bentuk yang lain berinteraksi dengan protein dalam membran plasma dan dalam granula sekretori. PKA memfosforilasi GLUT-2, saluran K<sub>ATP</sub>, dan saluran Ca<sup>2+</sup> tipe L. (ketiganya terlibat dalam sekresi insulin). Meskipun demikian aktivasi PKA tidak cukup untuk dapat menyebabkan sekresi insulin setelah pemuncuan dengan glukosa, tetapi

nampaknya hanya meningkatkan efek dari alur-alur penyebab sekresi insulin yang lain. AMPsiklik dapat mengaktifkan secara langsung proses eksositosis sebab senyawa ini meningkatkan sekresi insulin meskipun tidak terjadi peningkatan  $Ca^{2+}$  sitoplasma. AMPsiklik intraseluler diatur oleh PDE (phosphodiesterase), PDE akan mendegradasi nukleotida siklik dari AMPsiklik. Terdapat 3 isoform PDE, yaitu PDE1, PDE2, PDE3 semuanya terdapat dalam pulau Langerhans. PDE3 merupakan isoform terpenting. Isoform ini terdapat dalam 2 subtype; PDE3A dan PDE3B. PDE3 diaktifkan oleh PKB (protein kinase B), sedangkan PKB sendiri diaktifkan oleh fosfoinositide-3-kinase (PI-3-K). 2 jenis enzim ini diekspresi oleh sel  $\beta$ . Aksi penghambatan [IGF-I] terhadap sekresi insulin diperantarai oleh aktivasi PDE melalui PI-3-K, PKB, dan pengurangan AMPsiklik intraseluler (Ahren, Taborsky, 2003).

#### d. Sistem Arachidonic Acid Messenger

Glukosa, pengaktifan muskarinik, dan CCK mengaktifkan fosfolipase $A_2$  (PLA $_2$ ). Pengaktifan PLA $_2$  ini menyebabkan hidrolisa fosfolipid membran plasma, yang pada gilirannya menyebabkan pembentukan asam arakhidonat (AA). Terdapat 2 bentuk isozim PLA $_2$  yang diekspresi sel  $\beta$ , bentuk yang bergantung pada  $Ca^{2+}$  dan bentuk yang tidak bergantung pada  $Ca^{2+}$ . Bentuk-bentuk tersebut diperlukan untuk sekresi insulin pada kondisi yang berbeda. Aktivasi oleh agonis muskarinik memicu PLA $_2$  yang bergantung pada  $Ca^{2+}$ , sedangkan aktivasi oleh CCK memicu baik PLA $_2$  yang bergantung pada  $Ca^{2+}$  maupun PLA $_2$  yang tidak bergantung  $Ca^{2+}$ . Terbentuknya AA (asam arakhidonat) langsung meningkatkan kalsium sitoplasma dan menyebabkan

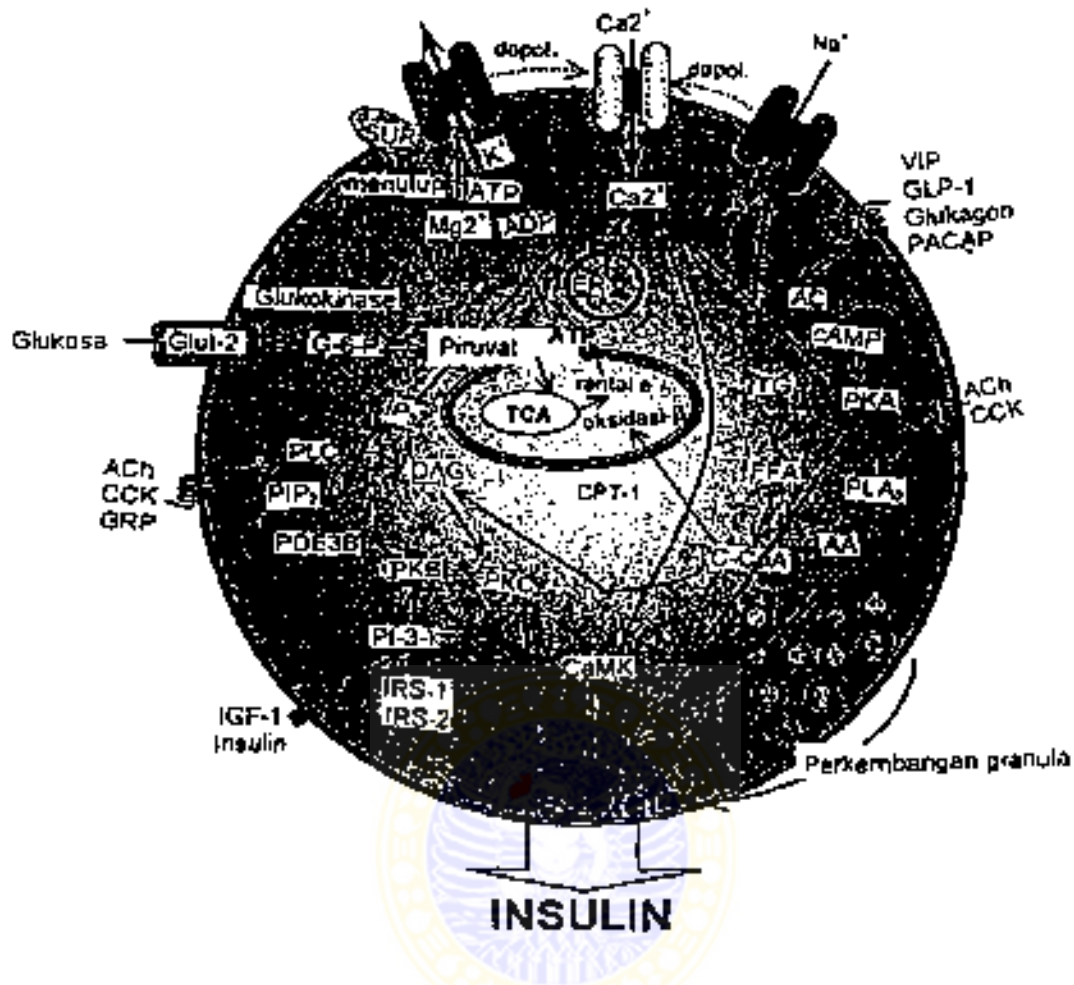
pembentukan prostaglandin dan eikosanoid, dua senyawa ini mempengaruhi sekresi insulin (Ahren, Taborsky, 2003).

#### e. Sistem *Lipid Messenger*.

Sinyal yang berasal dari lipid juga penting bagi sekresi insulin. Sinyal-sinyal ini merupakan *long-chain acyl CoA* (LC-CoA) yang berasal dari trigliserida yang disimpan dalam sel  $\beta$ . Senyawa ini meningkatkan fusi granula sekretori dengan membran sel selama proses eksositosis melalui aktivasi PKC. Senyawa neurohormonal mengatur eksositosis insulin melalui penghambatan atau pengaktifan pembentukan LC-CoA. Target dari senyawa - senyawa neurohormonal adalah *hormone sensitive lipase* (HSL), yaitu lipase yang diekspresi dalam sel  $\beta$ . HSL diaktifkan oleh PKA, oleh karenanya senyawa-senyawa yang meningkatkan AMPsiklik dapat meningkatkan sekresi insulin melalui pembentukan LC-CoA yang diperantarai HSL. Senyawa ini contohnya adalah GLP-1 (Ahren, Taborsky, 2003).

#### f. Sistem *Insulin Messenger*.

Sel  $\beta$  juga mengekspresi reseptor untuk insulin. Sel  $\beta$  diduga menunjukkan kemampuan penghambatan otokrin, karena insulin eksogen dapat menghambat sekresi insulin dari sel ini. Sementara itu mencit yang telah dihilangkan reseptor insulin spesifiknya memperlihatkan penurunan kemampuan insulin dalam merespon glukosa dan memperlihatkan adanya gangguan terhadap toleransi glukosa. Penelitian ini mengindikasikan bahwa aksi insulin pada reseptornya yang terdapat pada sel  $\beta$ , berguna untuk mempertahankan fungsi normal dari sel  $\beta$  (Ahren, Taborsky, 2003).



**Gambar 2.2.3** Atur sinyal dalam sel  $\beta$  yang teraktivasi oleh pemicu eksternal (Abreu, Taborsky, 2003).

AA = asam arakhidonat, AC = adenylat cyclase, ACh = acetylcholine, ADP = adenosin diposfat, ATP = adenosin triposfat, CaMK = calmodulin kinase, cAMP = cyclic adenosin monophosphate, CCK = cholecystokinin, CPT-1 = carnitin palmitoil transferase-1, DAG = diacyl glycerol, ER = endoplasmic reticulum, FFA = free fatty acid, G-6P = glukose-6-posfat, GLP = Glucagon-like peptide-1, GLUT-2 = Glucosa Transporter 2, GRP = gastrin-releasing polypeptide, IGF-1 = insulin-growth factor-1, IP<sub>3</sub> = inositol-1,4,5-triposfat, IRS-1 = insulin receptor substrat-1, IRS-2 = insulin receptor substrat-2, LC-CoA = long chain-coenzymeA, PACAP = pituitary adedilate cyclase-activating polypeptide, PDE3B = phosphodiesterase 3B, PI-3-K = phosphatidylinositol-3-kinase, PIP<sub>2</sub> = phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate, PKA = protein kinase A, PKB = protein kinase B, PKC = protein kinase C, PLA<sub>2</sub> = phospholipase A<sub>2</sub>, PLC = phospholipase C, SUR = sulfonilurea receptor, TCA = tricarboxylic acid cycle, TG = triglyceride pool, VIP = vasoactive intestinal polypeptide.

### 2.3 Patogenesis DMT 1

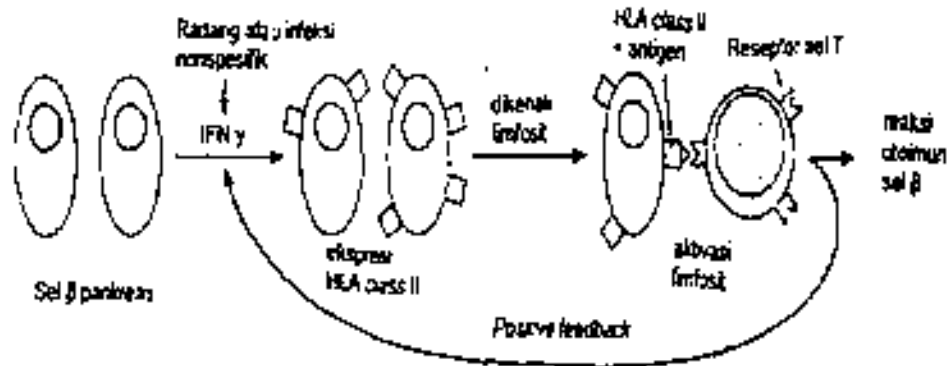
Di dalam kondisi fisiologi normal, masuknya glukosa ke dalam sel  $\beta$  memicu sekresi insulin. Bersama darah insulin akan menuju jaringan perifer dan berikatan dengan reseptornya. Reseptor untuk insulin adalah golongan tirosin kinase. Ikatan tersebut mengawali serangkaian kejadian pada *transmembrane* yang menyebabkan pengambilan glukosa darah, yang kemudian dilanjutkan dengan proses metabolisme glukosa tersebut menjadi energi, atau disimpan sebagai glikogen (Notkins, 2002).

Kelainan yang terdapat disepanjang alur jaringan perifer dapat menyebabkan hiperglikemia. DMT 1 disebabkan karena defisiensi absolut dari produksi insulin karena kerusakan sel  $\beta$ . Banyak bukti memperlihatkan bahwa kerusakan sel  $\beta$  tersebut karena proses otoimun (Notkins, 2002). Pulau Langerhans diinfiltrasi oleh sel imun (makrofag dan limfosit), dan sel imun tersebut merusak sel  $\beta$  melalui berbagai mekanisme. Sebagai contoh, radikal bebas oksigen dan nitrogen oksida yang diproduksi oleh makrofag (yang diaktifasi oleh sitokin), begitu juga yang diproduksi oleh sel  $\beta$  (karena terpapar sitokin proinflamasi) merupakan salah satu penyebab kerusakan sel  $\beta$  pada diabetes otoimun (DMT 1). Radikal bebas superoksida ( $O_2^{\cdot -}$ ) dan nitrogen oksida (NO) membentuk peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot -}$ ), merupakan senyawa oksidan yang lebih kuat dari senyawa asalnya (Lacey *et al*, 2001). Sementara itu menurut Foster, (1997) patogenesis DMT 1 didasari oleh faktor genetika. Gen yang berhubungan dengan DMT 1 adalah MHC, yang pada manusia disebut sebagai HLA (HLA-DQA<sub>1</sub> dan DQB<sub>1</sub>) (Todd, 1990). HLA mengandung 200 gen, terdapat pada kromosom 6, dan menyandi molekul HLA *Class I* dan HLA *Class II* (Notkins, 2002). Gen HLA



*class I* menyandi produk-produk gen dari HLA A, B, dan C; gen HLA *Class II* menyandi produk-produk gen HLA DP, DQ dan DR; sedangkan gen *Class III* menyandi gen komplemen. Hampir semua penyakit otoimun berhubungan dengan gen HLA *Class II* (Faustman, 1992). Penderita DMT 1 berkulit putih 95% mengekspresi HLA-DR3 atau HLA-DR4, atau konfigurasi heterozigot HLA-DR 3/4 (Foster, 1997). Untuk populasi di Indonesia faktor genetik bagi DMT 1 di bawa oleh HLA-DR3 dan HLA-DR9 (Yudajana, 1993).

Meskipun kejadian DMT 1 memerlukan predisposisi genetik, tetapi agar timbul gejala penyakit diperlukan faktor pemicu (Elias *et al*, 1994). Dipikirkan bahwa faktor lingkungan, genetika, dan imunologi berperan sebagai faktor pemicu (Notkins, 2002). Penelitian epidemiologi mengindikasikan bahwa faktor lingkungan (misalnya mikroorganisme dan kemotoksin) berpengaruh pada kejadian DMT 1 pada manusia (Wang *et al*, 1993). Faktor tersebut akan membangkitkan reaksi radang pada kelenjar pankreas yang disebut sebagai *insulinitis*. Tahapan berikutnya terjadi perubahan pada sel  $\beta$  pankreas, sehingga yang tadinya dikenali sebagai *self* menjadi dikenali sebagai *non self*, akibatnya terjadi respon imun terhadap sel  $\beta$  tersebut (Foster, 1997).

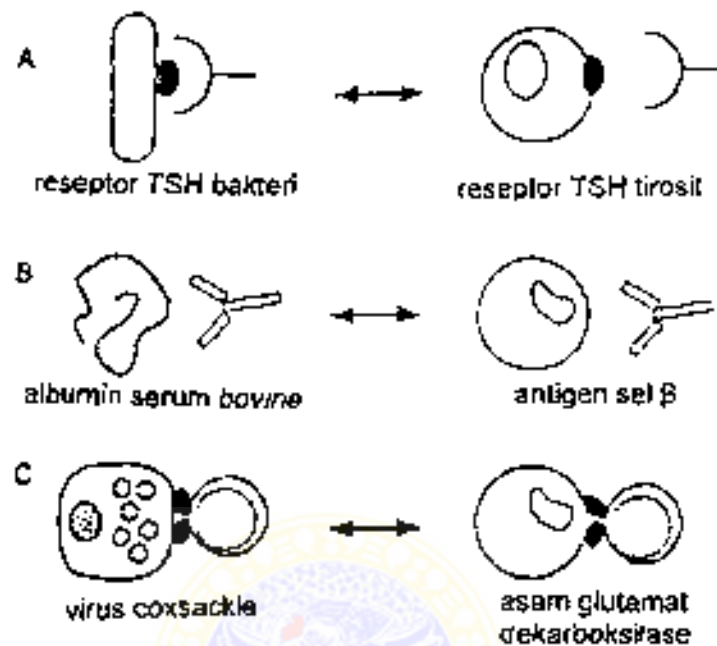


**Gambar 2.3.1** Proses otoimun diawali oleh ekspresi HLA *class II* (Modifikasi dari Baker, 1997)

Ekspresi HLA class II menyebabkan aktivasi limfosit, yang menyebabkan peningkatan produksi limfokin. Keadaan ini menyebabkan pemicuan kembali dari ekspresi HLA class II dari sel  $\beta$  yang lain.

Proses ini utamanya terjadi pada individu yang mengekspresi salah satu dari HLA-DR3, HLA-DR4, atau HLA-DR3/4. Pada individu ini, infeksi atau pengaruh eksternal lain memicu terjadinya *molecular mimicry*—suatu keadaan dimana terjadi gangguan pada *self tolerance*. Pada *molecular mimicry*, antigen yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang menginfeksi sel mempunyai susunan asam amino mirip dengan susunan asam amino dari HLA-DR yang diekspresi individu yang rentan terhadap kelainan diabetes otoimun. Antigen tersebut dapat menyebabkan aktivasi limfosit Th0 untuk berdeferensiasi menjadi fenotip Th1 (Romagnani, 2000). Fenotip Th1 nantinya akan mengaktifkan APC dari jenis MHC II (misalnya makrofag). Fenotip Th1 juga menyebabkan aktivasi limfosit B (yang akan menghasilkan antibodi) bagi antigen tersebut. Makrofag yang aktif dan antibodi yang terbentuk tidak hanya menyerang sel-sel yang terinfeksi tetapi juga sel-sel tubuh sendiri yang mengekspresi HLA-DR (dalam hal ini sel  $\beta$  pankreas).

yang susunan asam aminonya menyerupai susunan asam amino antigen (Behar, 1995).



**Gambar 2.3.2** Ilustrasi *molecular mimicry* pada patogenesis penyakit otoimun (Baker, 1997)

A : Kereaktifan silang antibodi dengan reseptor *thyroid-stimulating hormon (TSH)* dari bakteri dan reseptor *TSH* sel tiroid (tirosit) pada penyakit Graves'. B : Kereaktifan silang antibodi terhadap albumin serum *bovine* dan antigen pulau Langerhans pada DM1. C : Kereaktifan silang antara peptida virus coxsackie dan asam glutamat dekarboksilase.

Dalam keadaan normal limfosit T toleran terhadap *self antigen*. Seleksi dan pendidikan bagi limfosit T terjadi di Timus. Limfosit T yang tidak menerima isyarat dari kompleks HLA-otoantigen akan dimatikan, limfosit T yang menerima isyarat dari kompleks HLA-otoantigen dengan cara terlalu kuat juga akan dimatikan melalui mekanisme apoptosis, sedangkan limfosit T yang menerima isyarat dari kompleks HLA-otoantigen dengan cara lemah akan tetap hidup.

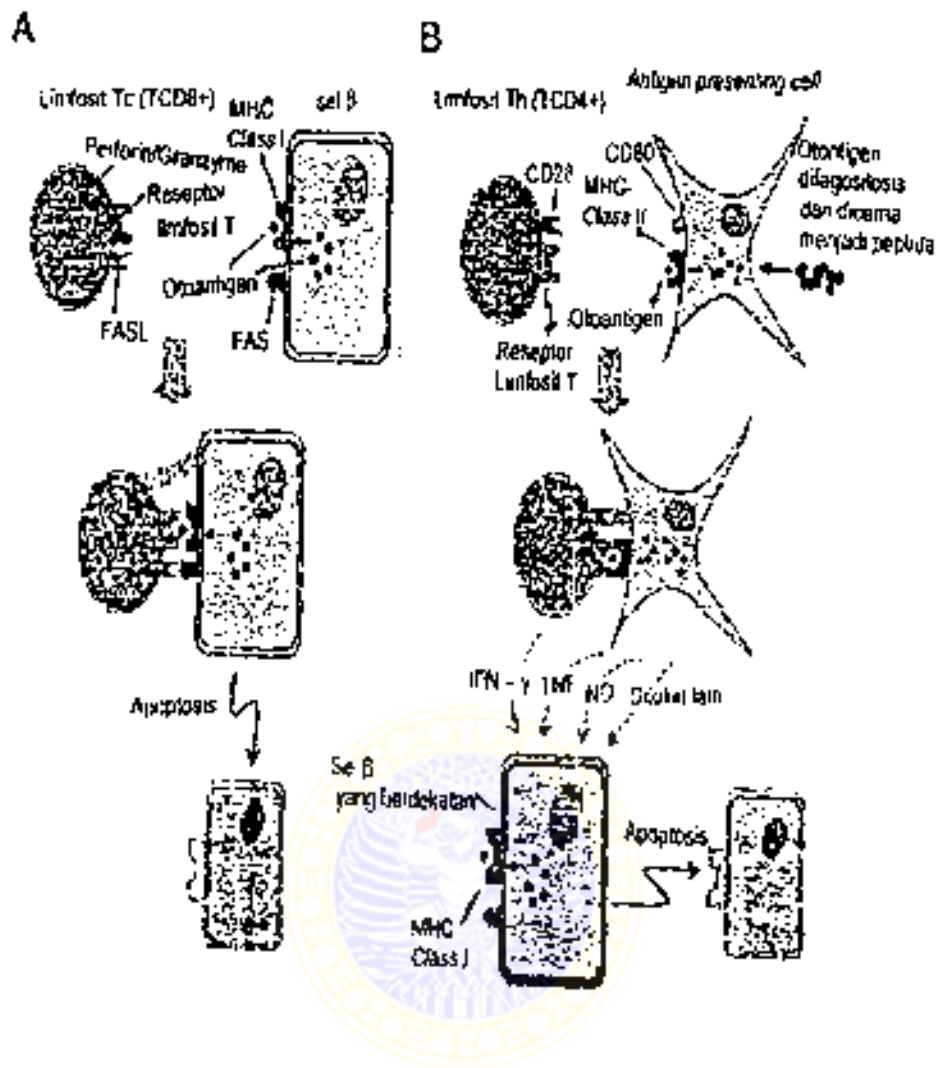
Limfosit T yang bertahan hidup jumlahnya tidak banyak dan dapat bermigrasi ke organ perifer diantaranya ke kelenjar pankreas. Di dalam organ perifer tersebut limfosit T dalam keadaan *dormant* dan dalam kondisi terkontrol secara ketat oleh sistem imun (Notkins, 2002). Di dalam timus sel T akan dikenalkan pada semua *self*, jika ada sel T yang *self reactive* maka sel T tersebut akan dimatikan melalui proses delesi klonal. Berhubung karena posisinya maka tidak semua *self* dapat kontak dengan timus atau sistem limforetikuler untuk diperkenalkan pada sel T. *Self* yang tidak pernah dikenali sel T saat sel ini masih berada di timus, sering disebut sebagai *sequestered antigen* (antigen terkurung). Pada diabetes otoimun sel  $\beta$  pankreas merupakan antigen terkurung (Suryohudoyo, 2000). Keadaan terkurung yang dialami suatu *self* misalnya karena: 1) *Self* berada pada lokasi yang tidak dijangkau pembuluh darah (kornea mata), 2) terdapatnya barier anatomi (kapsul Bowman pada ginjal) (Behar, 1995). Jika antigen terkurung atau komponennya karena suatu hal terbebas, akan dikenali sel T sebagai *non self* (Roitt, 2000). Respon radang karena infeksi patogen dapat membebaskan antigen terkurung atau membebaskan antigen yang terlindungi barier anatomi jaringan (Janeway, Wong, 2003).

Terdapat beberapa mekanisme yang mendasari proses patologi yang menyebabkan gangguan fungsi dan kematian sel  $\beta$  pankreas pada DMT 1. Mekanisme tersebut meliputi: 1) interaksi sel  $\beta$  pankreas dengan limfosit Tc (*cytotoxic*) melalui molekul MHC I, 2) induksi ekspresi enzim *iNOS* yang mengkatalisis reaksi pembentukan  $\text{NO}^*$ , 3) produksi radikal bebas oksigen, dan 4) aktivasi program *apoptosis* untuk sel  $\beta$ . Semua mekanisme tersebut memerlukan peran sitokin, seperti  $\text{IL-1}\beta$  dan  $\text{IFN-}\gamma$ . Dua sitokin ini diproduksi oleh sel

imunosit yang menginfiltrasi pulau Langerhans pada keadaan *insulitis* (Pavlovic *et al.*, 1999).

Notkins (2002), menyatakan kerusakan sel  $\beta$  pankreas pada DM1 juga melibatkan aktifitas sel Tc (Gambar 2.2.3). Antigen dipresentasikan pada sel Tc melalui APC yang mengekspresi MHC I (Clancy, 1998). Penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa kejadian DM1 diawali oleh *insulitis*—infiltrasi sel mononuklear ke dalam jaringan pankreas. Sel mononuklear tersebut didominasi oleh limfosit, monosit, dan makrofag (Suryohudoyo, 2000). *Insulitis* pada hewan coba tikus BBdp umumnya terjadi 2 – 3 minggu sebelum terjadi diabetes (Wu, 1995). Shafrir (2003) menyatakan pada tikus BB, diabetes terjadi beberapa hari setelah timbulnya *insulitis*. Setelah sel  $\beta$  rusak dan menghilang *insulitis* juga menghilang, pulau Langerhans mengecil dan hanya ditempati sel  $\alpha$ , sel  $\delta$ , dan sel pp. Makrofag merupakan sel yang pertama kali mengadakan migrasi dan merupakan sel yang dapat memproduksi NO<sup>•</sup> dalam jumlah besar (Lau, 1998). Juga terdapat pembentukan peroksinitrit dalam jaringan pankreas. Senyawa oksidan ini ditemukan dalam sel  $\beta$  pankreas dan makrofag (yang migrasi ke dalam jaringan pankreas). Peroksinitrit adalah senyawa hasil reaksi antara radikal oksigen dan radikal nitrogen oksida. Dua radikal tersebut pembentukannya melibatkan IL - 1 $\beta$ , IFN -  $\gamma$ , dan TNF- $\alpha$  (suarez-Pinzon *et al.*, 1997). IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$  menginduksi ekspresi enzim *iNOS* dalam makrofag dan sel  $\beta$  pankreas, *iNOS* adalah enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan NO dari asam amino arginin (Corbett, 1992). O'Byrne *et al* (2000) membuktikan bahwa penderita DM1 mensintesis NO<sup>•</sup> lebih tinggi dari individu sehat. Reaksi imun pada DM1 dimediasi oleh sel Th1 yang memproduksi IFN- $\gamma$  (Romagnani,

2000). Penelitian pada mencit model DMT 1 (yang diinduksi dengan streptozocin), menunjukkan bahwa pemberian senyawa IFN- $\gamma$  meningkatkan reaksi otoimun dan memperparah kerusakan sel  $\beta$  pankreas (Campbell *et al.*, 1988). Senyawa oksigen reaktif yang terlibat dalam proses patologis sebagian besar berasal dari proses-proses biologis alami. Senyawa oksigen reaktif tersebut antara lain:  $O_2^{\cdot-}$  (superoksida),  $H_2O_2$  (hidrogen peroksida),  $\cdot OOH$  (radikal peroksil),  $\cdot OH$  (radikal hidroksil). Senyawa-senyawa ini berbahaya karena merusak asam lemak, DNA, dan protein (Suryohudoyo, 2000). Reaksi antara  $NO^{\cdot}$  dan superoksida menghasilkan peroksinitrit (Racie *et al.*, 1993). Senyawa ini lebih reaktif dari senyawa-senyawa pembentuknya (Gambar 2. 4. 3). Reaksi peroksinitrit dengan protein menyebabkan oksidasi pada residu asam amino triptofan dan sistein. Juga terjadi reaksi nitrasi pada asam amino tirosin yang menghasilkan senyawa nitrotirosin, ditirosin, dan 2,4-dinitrofenilhidrazin. Reaksi tersebut menyebabkan rusaknya protein (Xu, 2000).



**Gambar 2.3.3 Kerusakan sel  $\beta$  yang diperantarai mekanisme imun (Notkins, 2002)**

**A.** Mematikan sel  $\beta$  secara langsung. *Otoantigen* yang telah diproses dan dipresentasikan sebagai peptida oleh MHC *class I*, pada permukaan sel  $\beta$ , akan dikenali oleh limfosit Tc (limfosit T CD8+). Hal ini menimbulkan pengaktifan sejumlah molekul *co-stimulatory* (misalnya FAS/FASL). Serangkaian isyarat transduksi yang timbul menyebabkan kematian sel  $\beta$  karena proses apoptosis melalui beberapa alur (misalnya FAS/FASL, perforin/granzyme).

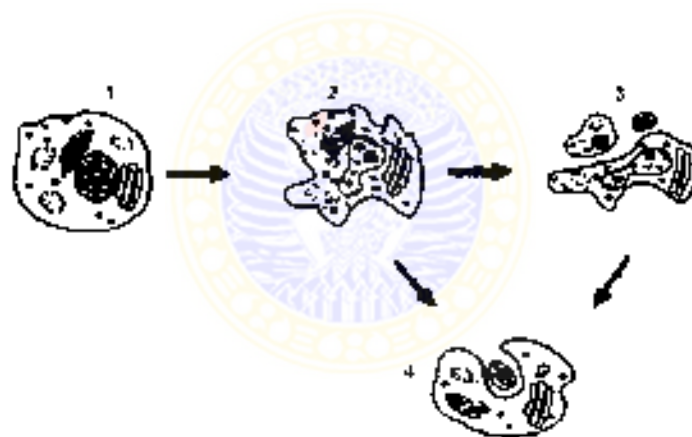
**B.** Mematikan sel  $\beta$  secara tidak langsung. *Otoantigen* yang telah difagositosis, selanjutnya diproses, kemudian dipresentasikan sebagai peptida oleh molekul MHC II pada permukaan APC (misalnya makrofag atau sel dendritik). Peptida ini akan dikenali oleh limfosit Th (T CD4+). Keadaan tersebut mengaktifkan molekul *co-stimulatory* (misalnya CD28/CD80) dan memicu pelepasan berbagai jenis sitokin (misalnya IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) dan radikal NO' dari limfosit T CD4+ dan APC, keadaan ini menyebabkan apoptosis dari sel  $\beta$  disekitarnya.

Penelitian pada mencit NOD dan tikus BB menunjukkan adanya gelombang apoptosis sel  $\beta$  yang timbul pada usia hewan coba antara 5 – 25 hari. Gelombang apoptosis tersebut diyakini memicu kejadian DMT 1 pada hewan coba tersebut. Sel yang mengalami apoptosis disingkirkan melalui proses fagositosis yang melibatkan sel fagosit. Gangguan fungsi pada sel fagosit menyebabkan sel ini tidak dapat menyingkirkan sel yang mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis yang tidak segera disingkirkan memicu reaksi imunitas. Sel yang mengalami apoptosis dapat: 1) Membentuk antigen otoreaktif pada permukaannya, 2) mengaktifkan sel dendritik yang dapat mengaktifkan limfosit sitotoksik (Tc) spesifik bagi jaringan pankreas, 3) menginduksi pembentukan otoantibodi (Trudeau *et al*, 2000). Pada penderita DMT 1 ditemukan 3 otoantigen utama yaitu: 1) GAD65 (suatu isoform dari *glutamic acid decarboxylase*), 2) IA-2 (disebut juga sebagai ICA512), 3) insulin. Pada penderita DMT 1 ditemukan otoantibodi bagi otoantigen tersebut beberapa bulan atau beberapa tahun sebelum timbulnya gejala klinis. Meskipun otoantibodi (ICA, IAAs dan anti GADs), ditemukan bahkan jauh sebelum timbulnya gejala diabetes, tetapi para peneliti masih meragukan bahwa antibodi tersebut merupakan penyebab awal timbulnya penyakit ini (Notkins, 2002). Kerusakan pada sel  $\beta$  dimediasi oleh sel T dan bukan dimediasi oleh antibodi (Diaz *et al*, 1992).

Sitokin memicu proses apoptosis melalui jalur Fas dan seramida. IL-1 $\beta$  merupakan satu-satunya sitokin yang dapat menginduksi ekspresi protein Fas pada sel  $\beta$ . IL-1 $\beta$  menginduksi peningkatan produksi seramida, suatu senyawa yang memiliki peran pada proses apoptosis. Sel T yang menginfiltrasi pulau Langerhans juga dapat menginduksi Fas pada sel  $\beta$  (Gambar 2. 2. 5) (Mauricio



dan Mandrup Poulsen, 1998). Penelitian lain membuktikan bahwa apoptosis melalui jalur Fas/FasL mempunyai peran penting bagi patogenesis DMT 1. (Su, 2000). NO<sup>•</sup> merupakan sinyal penting bagi terjadinya apoptosis pada sel  $\beta$  (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998). Beberapa peneliti meyakini bahwa efek proapoptotik dari radikal NO<sup>•</sup> adalah karena kemampuannya dalam; 1) membentuk peroksinitrit (dengan senyawa lain), 2) mengadakan fragmentasi DNA, dan 3) menginduksi ekspresi p53 (Kim *et al.* 1999). Baik NO<sup>•</sup> endogen (yang terbentuk karena induksi oleh  $\text{I}_2$ - $\text{I}_\beta$ ) maupun NO<sup>•</sup> eksogen (misalnya dari streptozocin) dapat menginduksi ekspresi p53—suatu protein yang dapat memicu proses apoptosis (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998).

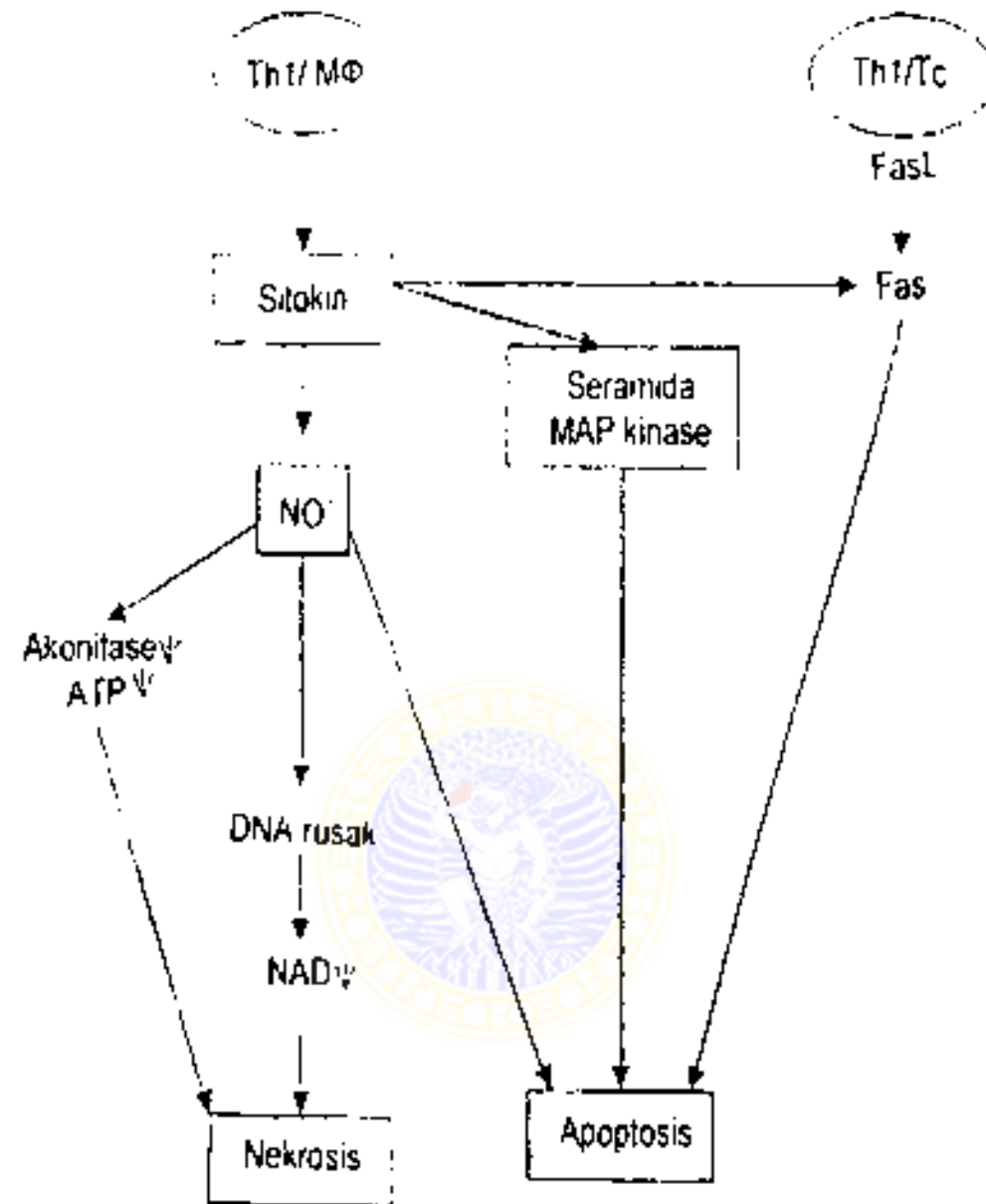


**Gambar 2.3.4** Morfologi sel pada berbagai tingkatan proses apoptosis (Trudeau *et al.*, 2000)

1) Morfologi sel normal. 2) Tingkat awal apoptosis (plasma membran menggebung, kondensasi kromatin, fragmentasi DNA). 3) Fragmentasi sel menjadi bagian-bagian kecil (*apoptotic bodies*) dan pepadatan kromatin. 4) Serpihan-serpihan sel ditelan oleh sel fagosit dan mengalami degradasi.

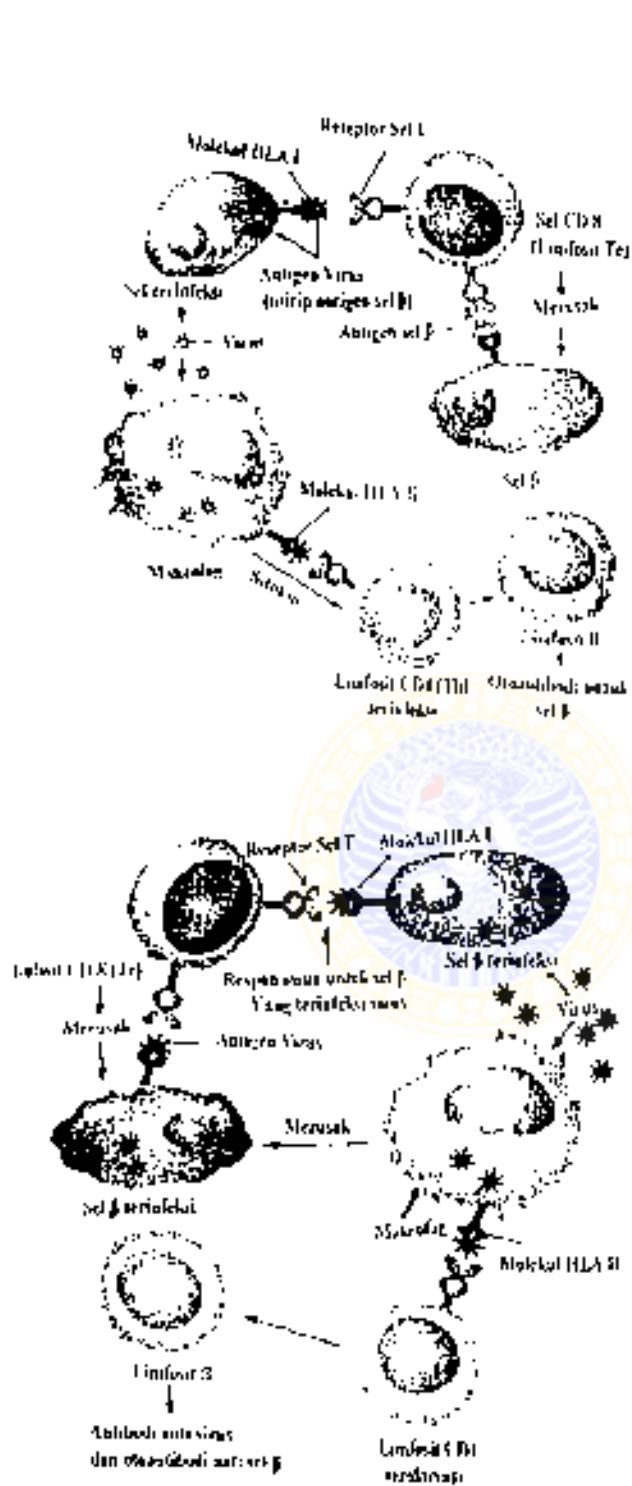
**Tabel 2.3.1**  
**Patogenesis DMT 1 (Foster, 1997)**

| Urutan | Kejadian                                    | Pemicu atau Respon   |
|--------|---|--|
| 1      | Kerentanan genetik<br>↓                     | gen HLA-D<br>reseptor sel T?<br>↓                              |
| 2      | Kondisi lingkungan<br>↓                     | virus? Makanan?<br>↓   |
| 3      | <i>Insulinitis</i><br>↓                     | infiltrasi limfosit T<br>aktif<br>↓                            |
| 4      | Aktivasi respon imun<br>↓                   | transisi <i>self</i> → <i>nonself</i><br>↓                     |
| 5      | Gangguan respon imun<br>terhadap sel-β<br>↓ | antibodi terhadap sel-β,<br><i>cell-mediated immunity</i><br>↓ |
| 6      | Diabetes melitus                            | >90% sel β rusak kecu-<br>ali sel α                            |



**Gambar 2.3.5** Alur yang digunakan proses imun untuk menyerang sel  $\beta$  dapat menimbulkan nekrosis atau apoptosis pada sel tersebut (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998)

M $\phi$  (makrofag), NAD (nikotinamid adenin dinukleotida), MAP kinase (*mitogen-associated protein kinase*), NO<sup>+</sup> (nitrogen oksida).



A. Model A (*molecular mimicry*) proses otoimun dimulai dari respon imun terhadap sel (bukan sel  $\beta$ ) yang terinfeksi oleh virus (yang memiliki protein dengan urutan asam amino mirip dengan urutan asam amino dari sel  $\beta$ ). Sel yang terinfeksi akan menyajikan protein antigen (virus) untuk limfosit CD8 melalui molekul MHC I. Makrofag yang terinfeksi atau telah memfagositosis virus akan menyajikan peptida virus untuk limfosit CD8 melalui molekul MHC I. Limfosit CD4 membantu limfosit CD8 menjadi sel efektor sitotoksik, sehingga dapat memusnahkan sel  $\beta$  yang mengekspresi peptida mirip peptida virus

B. Model B. Infeksi virus memicu produksi sitokin (misalnya IFN $\gamma$ ) dan perlekatan leukosit pada jaringan pankreas. Sel  $\beta$  yang terinfeksi rentan terhadap serangan limfosit CD8. Makrofag yang teraktivasi dalam jaringan pankreas menghasilkan sitokin dan radikal bebas. Dua senyawa ini memperbesar respon sitotoksik terhadap sel  $\beta$ . Sitokin juga menarik limfosit CD4+ menuju tempat yang terinfeksi. Makrofag akan menyajikan antigen virus untuk limfosit CD4+, selanjutnya limfosit CD4+ akan mengaktifkan sel B untuk memproduksi antibodi bagi virus. Pada dua model ini makrofag menyajikan otoantigen yang berasal dari sel  $\beta$  yang rusak karena virus, sehingga memicu pengaktifan limfosit B dan pembentukan otoantibodi yang dapat bereaksi dengan protein sel  $\beta$ .

Gambar 2.3.6 Dua Model kejadian otoimun dari DMT I (Atkinson, 1994)

## 2.4 Limfosit T

Limfosit berjumlah sekitar 20%-40% dari seluruh sel darah putih tubuh, dan di dalam pembuluh limfe limfosit berjumlah 99% dari seluruh sel yang terdapat dalam pembuluh ini. Limfosit beredar didalam pembuluh darah dan pembuluh limfe, dapat masuk ke dalam jaringan dan dapat bergerak menuju organ limfoid untuk menciptakan sistim imun yang terintegrasi. Berdasarkan komponen membran dan fungsi sel, terdapat tiga populasi limfosit, yaitu ; limfosit B, limfosit T, sel NK. Permukaan limfosit T mengandung reseptor yang khas untuk antigen tertentu, dan berfungsi untuk mengenali senyawa asing. Umumnya limfosit T mengenali antigen hanya jika antigen tersebut terikat pada molekul yang pembentukannya disandi oleh gen dalam MHC. Oleh karenanya berbeda dengan limfosit B, limfosit T tidak dapat mengenali antigen bebas (Goldsby *et al.* 2000<sup>A</sup>). Limfosit T berasal dari sel *stem* sumsum tulang belakang, tetapi tidak berdeferensiasi di dalam sumsum tulang belakang. Progenitor sel ini akan migrasi menuju organ timus untuk mengalami maturasi, berdasar hal tersebut sel ini diberi nama sebagai sel T (Timus). Progenitor sel T dalam timus disebut sebagai timosit (Janeway *et al.* 1999).

Timus terletak diatas jantung. Organ ini berbentuk pipih, terdiri dari dua lobus, setiap lobus dibungkus kapsul, dan masing-masing lobus terbagi menjadi lobulus-lobulus oleh jaringan ikat (*trabekulae*). Setiap lobulus memiliki bagian yang disebut kortek dan medula. Kortek menempati bagian luar lobulus, bagian ini padat dengan timosit. Medula menempati bagian dalam lobulus, disini timosit tidak sepadat di kortek. Timus berperan penting pada proses maturasi timosit, meskipun mekanismenya masih belum jelas. Kortek dan medula dipenuhi oleh

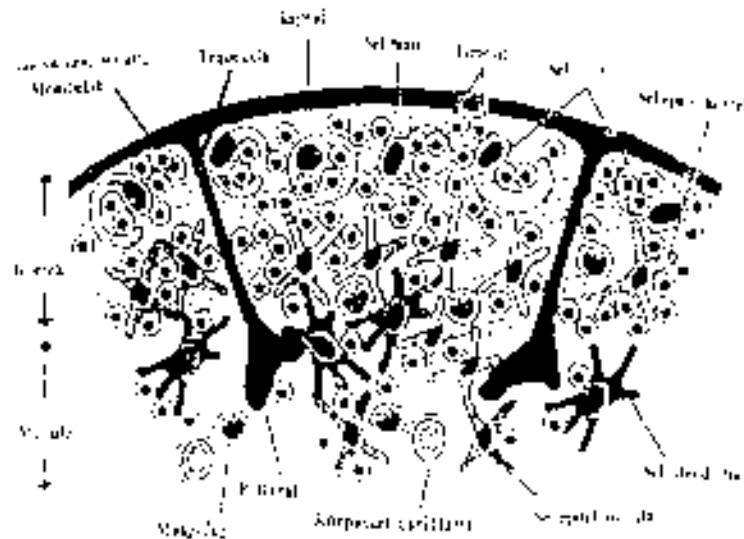
apa yang disebut sebagai stroma timus—suatu jaringan sel yang terdiri dari sel epitel, sel dendritik, dan makrofag (Goldsby *et al.*, 2000<sup>4</sup>). Stroma timus merupakan lingkungan mikro dimana progenitor sel T (timosit) akan mengalami maturasi (Janeway *et al.*, 1999).

Progenitor sel T bermigrasi dari sumsum tulang belakang menuju organ timus pada kehamilan  $\pm$  9 minggu (pada manusia). Pada saat mencapai timus, progenitor sel T (setelah berada dalam timus disebut timosit) berinteraksi fisik dengan sel-sel stroma timus. Keadaan ini memicu timosit mengekspresi molekul CD1 pada permukaan membran sel. Pada saat ini timosit belum mengekspresi molekul (yang menjadi ciri khasnya) yaitu molekul CD4, CD8, dan CD3 pada permukaan membran sel. Timosit juga belum mengatur gen TCR, karenanya juga belum mengekspresi protein RAG-1 dan RAG-2, adalah gen yang menyandi segmen gen imunoglobulin bagi pembentukan gen imunoglobulin fungsional. Timosit muda (juga disebut sebagai prekursor sel T) yang belum mengekspresi CD4 atau CD8 umumnya disebut sebagai timosit *double negative* (timosit CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Timosit *double negative* juga belum mengekspresi CD3, sehingga kadang-kadang disebut sebagai timosit *triple negative* (timosit CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Pada awal interaksi fisik dengan sel stroma ternyata terdapat banyak timosit muda yang sudah mengekspresi molekul CD4 dalam jumlah sangat sedikit, oleh karenanya sebagian besar timosit muda di dalam timus adalah timosit CD3<sup>-</sup>CD4<sup>Lo</sup>CD8<sup>-</sup>. Timosit CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> dan timosit CD3<sup>-</sup>CD4<sup>Lo</sup>CD8<sup>-</sup> banyak ditemukan di konek subkapsularis, di daerah ini timosit-timosit muda tersebut berproliferasi. Tahap berikutnya timosit-timosit muda mengalami maturasi, yang ditandai dengan pengekspresian CD4 dan CD8 pada permukaan membran sel

(timosit *double positive*—CD4+CD8<sup>+</sup>). Timosit *double positive* mulai mengekspresi molekul CD3 dan TCR. Timosit ini merupakan populasi terbanyak dan menempati korteks timus. Berbeda dengan timosit *double negative*, timosit *double positive* tidak berproliferasi dan tidak aktif. Tahap berikutnya timosit *double positive* akan hanya mengekspresi CD4 atau CD8 saja, dan selanjutnya sel-sel tersebut menjadi timosit-timosit dewasa (sel T) yang hanya mengekspresi CD4 atau CD8 (sel T CD4+ — sel Th dan sel T CD8+ — sel Tc). Jadi timosit-timosit muda (prekursor sel T), pada saat melintasi timus, mengawalinya dari korteks supkapsularis bergerak menuju korteks dilanjutkan ke perbatasan antara korteks-medula dilanjutkan ke bagian medula. Dalam perjalanan melintasi timus sel timosit berinteraksi dengan sel stroma timus, interaksi tersebut memicu perkembangan dan maturasi sel timosit (Clancy, 1998).

Setelah menjadi dewasa timosit memulai mengekspresi reseptor untuk antigen. Pada saat tersebut timosit dihadapkan pada proses seleksi untuk memilih timosit-timosit yang akan diloloskan ke pembuluh darah maupun pembuluh limfe perifer. Sel stromal timus memegang peran penting pada proses seleksi ini. Sel stromal mengekspresi molekul MHC I dan MHC II. Selanjutnya setiap timosit dewasa yang tidak sanggup mengenali molekul MHC dari *self*, atau yang berhasil mengenalinya tetapi berafinitas berlebihan terhadap antigen *self* dan molekul MHCnya, atau yang mengenali dan berafinitas berlebihan dengan molekul MHCnya saja, akan mengalami proses apoptosis. Dengan demikian hanya timosit yang memiliki reseptor yang dapat mengenali molekul MHC *self* dan antigen *foreign* yang lolos seleksi. Diperkirakan 95% - 99% timosit gagal melewati seleksi ini dan mengalami proses apoptosis (Goldsby *et al*, 2000<sup>B</sup>). Rangkaian proses yang

dialami timosit di dalam kelenjar timus ini ada yang menyebutnya sebagai *Schooling process* (proses pembelajaran) (Roitt, 2000).



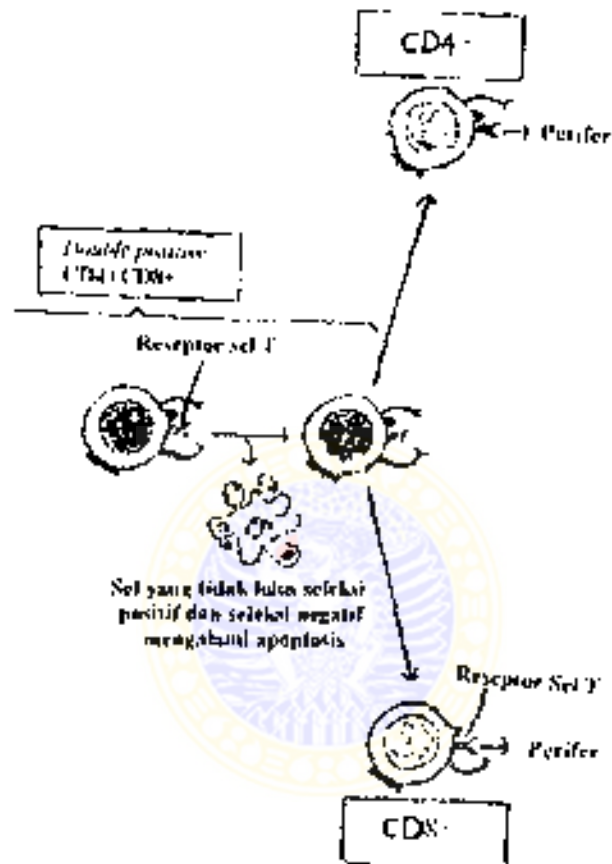
**Gambar 2.4.1** Diagram irisan timus (Goldsby *et al*, 2000<sup>3</sup>)

Disini diperlihatkan beberapa labalus yang dipisahkan oleh trabekulae. Di bagian kortek terdapat banyak timosit muda yang akan berproliferasi dengan cepat, tetapi juga banyak yang mati. Di kortek juga dijumpai sel *nurse* (sel epitel yang mempunyai membran panjang, membran ini akan melingkupi ~ 50 buah timosit. Medula diterpati sedikit timosit, dan diduga timosit di daerah ini lebih dewasa dari yang berada di kortek. Selama berada di timus timosit berinteraksi dengan bermacam sel stromal yang meliputi: sel epitel kortek, sel epitel medula, sel dendritik, dan makrofag. Sel stromal memproduksi hormon dan molekul MHC I dan MHC II. Di bagian medula ditemukan korpuskel dari Hassal—terdiri dari sel-sel epitel yang mengalami degenerasi, yang menyusun diri dalam lapisan-lapisan konsentrik.

Di dalam timus, timosit mengalami dua macam seleksi; seleksi *positif* dan seleksi *negatif*. Seleksi positif terjadi di kortek timus, melibatkan interaksi timosit muda dengan sel epitel kortek. Reseptor yang sudah terbentuk pada timosit (kelak disebut *T cell receptor* (TCR) — reseptor sel T), mengikat molekul epitel kortek pada lokasi kontak. Diduga interaksi antara timosit CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dengan reseptor sel epitel timus, dimediasi oleh molekul MHC spesifik untuk reseptor pada timosit. Keadaan ini menyebabkan sel timosit menerima sinyal yang



mencegahnya dari kematian. Sel timosit yang memiliki reseptor yang tidak spesifik bagi molekul MHC tertentu (dalam hal ini molekul MHC epitel timus), tidak mampu mengikat sel epitel tersebut, sehingga tidak akan menerima sinyal yang dapat melindunginya dari kematian karena apoptosis.



**Gambar 2.4.2** Timosit *double positive* CD4+CD8+ menjadi sel T CD4+ dan sel T CD8+ (Goldsby *et al.*, 2000<sup>8</sup>)  
Selanjutnya dua macam sel ini akan menuju pembuluh darah dan pembuluh limfe perifer.

Timosit yang lolos seleksi positif terdiri dari; 1) timosit yang memiliki reseptor berafinitas rendah terhadap antigen yang dipresentasikan oleh molekul

MHC *self*, dan 2) timosit dengan reseptor berafinitas kuat terhadap antigen yang dipresentasikan oleh molekul MHC *self*. Selanjutnya timosit-timosit ini akan mengalami seleksi negatif dengan cara mengadakan interaksi dengan APC yang berasal dari sumsum tulang belakang (sel dendritik, dan makrofag). Selama seleksi negatif, sel dendritik dan makrofag yang mengekspresi molekul MHC I dan MHC II berinteraksi dengan timosit yang memiliki reseptor berafinitas tinggi terhadap antigen *self*, molekul MHC spesifiknya, dan terhadap molekul MHC sendiri. Timosit yang terlalu kuat bereaksi dengan MHC I dan MHC II tidak akan lolos seleksi. Mekanisme yang terjadi pada seleksi negatif belum jelas (Gambar 2. 3. 5) (Goldsby *et al*, 2000<sup>6</sup>).

Terdapat dua model bagi penjelasan mengenai bagaimana timosit *double positive* CD4+CD8+ menjadi *single positive* CD4+ atau CD8+ yaitu; 1) model instruksi, dan 2) model stokastik. *Model instruksi* menyatakan bahwa interaksi berulang antara reseptor sel T, ko reseptor CD4+ atau CD8+ dengan molekul MHC I atau MHC II dari sel stromal memberi perintah kepada sel timosit untuk berdeferensiasi menjadi salah satu dari sel timosit *single positive* CD4+ atau sel timosit *single positive* CD8+ secara berurutan. Dengan menggunakan model ini dapat diperkirakan bahwa reseptor sel T spesifik bagi molekul MHC I bersama dengan ko reseptor CD8 akan menghasilkan sinyal yang berbeda dari sinyal yang dihasilkan oleh reseptor sel T spesifik bagi molekul MHC II bersama dengan ko reseptor CD4. *Model stokastik* menyatakan ekspresi CD4+ atau CD8+ akan dihentikan secara acak tanpa ada hubungannya dengan spesifisitas dari reseptor sel T terhadap molekul MHC sel stromal. Hanya timosit yang memiliki reseptor sel T dan ko reseptor yang kebetulan ekspresinya tidak dihentikan (yang dapat

mengenali molekul MHC yang sesuai dari sel stromal), yang nantinya akan berhasil berkembang menjadi timosit dewasa (Goldsby *et al.*, 2000<sup>b</sup>).

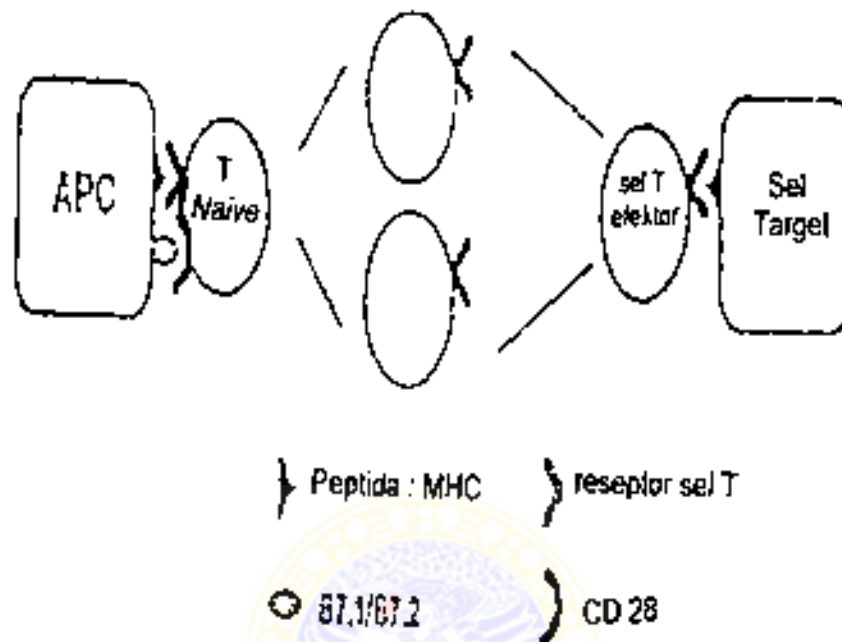
Selain dua model tersebut terdapat model ke tiga disebut sebagai *model induktifselektif*. Menurut model ini diferensiasi timosit *double positive* CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> menjadi timosit *single positive* CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup> tidak langsung bergantung pada sifat alami ko reseptor, tetapi lebih bergantung pada pengaruh-pengaruh lain seperti: 1) karakteristik fisikokimia sinyal reseptor sel T—MHC (intensitas, parameter kinetik, aviditas, atau pengaruh lingkungan mikro seperti daya hidup dan gen), 2) Kecenderungan timosit CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> untuk berdiferensiasi menjadi salah satu *single positive* CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup>, 3) hanya sel yang dapat mempertahankan ekspresi ko reseptor (CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup>) yang sesuai dengan molekul MHC tertentu dari sel stroma, yang dapat mengalami pendewasaan (Benoist, 1999).

Timosit CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> dewasa selanjutnya akan meninggalkan timus menuju sirkulasi darah dan sirkulasi limfe sebagai sel T *naive* (sel T yang belum pernah berinteraksi dengan antigen). Sel T CD4<sup>+</sup> juga disebut sebagai sel Th (sel *Helper*), sedangkan sel T CD8<sup>+</sup> disebut sel Tc (sel *Cytotoxic*). Sel Th *naive* sering disebut sebagai sel Th0. (Goldsby *et al.*, 2000<sup>b</sup>).

Seperti telah diketahui salah satu dari atur sinyal apoptosis dalam sistim imun adalah sistim Fas. Di dalam sistim imun, Fas dan FasL (Fas ligan) terlibat dalam penghambatan reaksi imun dan toksisitasnya, yang dimediasi oleh sel T. FasL diekspresi oleh sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>. Fenotip T CD4<sup>+</sup> (Th1 dan Th2) semuanya dapat mengekspresi FasL, tetapi fenotip Th1 lebih mampu dan lebih siap untuk mengadakan proses pengrusakan sel target melalui mekanisme yang

dimediasi oleh Fas. Oleh karenanya sel T dewasa di perifer dapat mengalami proses seleksi lanjutan yang dikenal dengan sebutan Delesi klonal perifer. Di dalam proses Delesi klonal perifer sel T yang dapat berinteraksi dengan antigen *self* di perifer akan dimatikan (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998). Sebelum sel T turut berperan pada satu proses imun, sel T harus terlebih dahulu mengenali antigen dan menggandakan diri dalam jumlah banyak, ini dimaksudkan untuk memperbanyak jumlah sel T yang memiliki kekhususan tertentu yang diperlukan bagi proses imun tersebut. Selanjutnya sel-sel tersebut harus berdeferensiasi menjadi sel yang mampu memediasi fungsi-fungsi efektor. Keadaan ini timbul pada 4-5 hari setelah paparan dengan antigen, dan menyebabkan peningkatan jumlah sel T spesifik sebanyak seribu kali dari jumlah semula, disertai deferensiasi dari sel T yang tidak aktif menjadi efektor aktif (Janeway, Wong, 2003). APC adalah sel yang memicu proliferasi dan deferensiasi sel T. Sel mampu menjadi suatu APC jika 1) membentuk dan selanjutnya menyajikan suatu kompleks peptida-MHC pada permukaan selnya, 2) dapat menyampaikan pesan (*Costimulatory Signal*) menuju sel T. *Costimulatory Signal* umumnya melalui molekul yang disebut sebagai B7.1 dan B7.2. *Costimulatory Signal* akan diterima oleh molekul CD 28 yang terdapat pada sel T. Selanjutnya *signal* tersebut akan memicu proses proliferasi dan deferensiasi sel T (Janeway, Wong, 2003). Hanya sel yang mampu mengekspresi molekul *Costimulatory* mampu mengaktifkan sel T *naive*. Sel yang memiliki kapasitas seperti yang telah dijelaskan berkumpul di organ limfoid dimana sel T *naive* akan mengadakan kontak dan teraktivasi oleh antigen. Manakala saat itu suatu sel T *naive* mengenali kompleks peptida-MHC, maka sel T tersebut cenderung diinaktifkan oleh kontak tersebut. Ini adalah hal

penting sebab tidak semua antigen jaringan diekspresi pada tempat dimana limfosit berkembang (umumnya di timus).

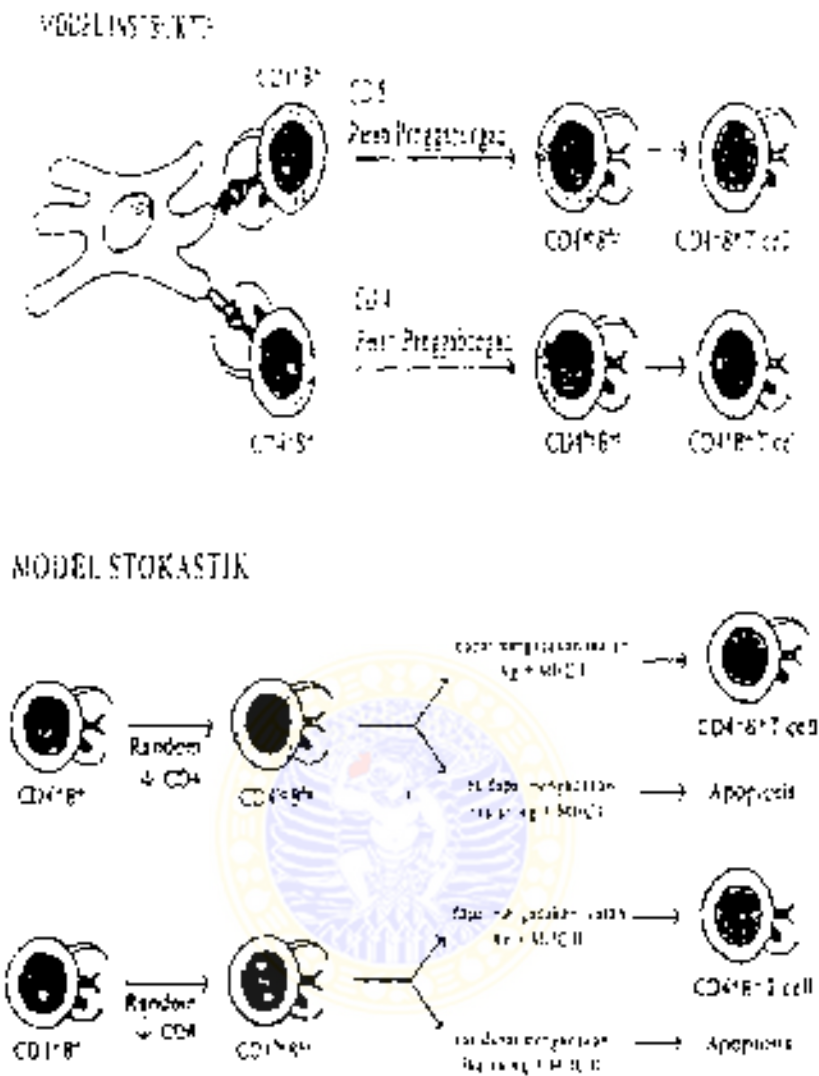


**Gambar 2.4.3** Pengaktifan sel T memerlukan ekspresi antigen dan molekul *Costimulatory* B7.1 dan B7.2 pada suatu APC (*Antigen Presenting Cell*) (Janeway, Wong, 2003) Sinyal simultan dari kompleks peptida-MHC kepada reseptor sel T, dan dari molekul B7.1 atau B7.2 menuju CD28 menginduksi ekspresi klonal sel T dan diferensiasinya menjadi sel T efektor.

Sel T yang spesifik bagi antigen *self* perifer tidak dieliminasi, tetapi juga tidak mengalami aktivasi ketika sel-sel ini berpapar dengan antigen spesifiknya pada sel jaringan, keadaan ini penting untuk mencegah terjadinya induksi proses otoimunitas. Pencegahan dilaksanakan melalui proses delesi sel T di dalam timus atau dengan cara proses inaktivasi melalui pemaparan dengan spesifik otoantigen di jaringan perifer (Janeway, Wong, 2003). Virus dalam sel akan berreplikasi

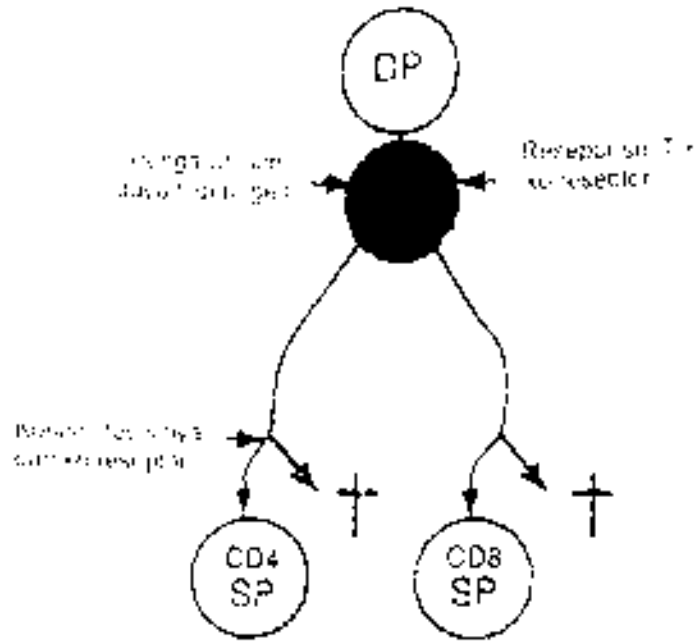
dalam sitosol sel dan peptida dari virus tersebut akan dipresentasi oleh MHC I untuk sel T CD8<sup>+</sup>, dan selanjutnya sel ini akan mematikan sel-sel yang terinfeksi. Selama proses ini sel T CD8<sup>+</sup> memproduksi IFN- $\gamma$  yang dapat menghambat replikasi virus. Dengan dua cara tersebut sel T CD8<sup>+</sup> menghambat penyebaran virus. Sebaliknya spesialisasi sel T CD4<sup>+</sup> adalah mengaktifkan sel yang mengekspresi kompleks peptida-MHC II. Molekul MHC II diekspresi terutama oleh sel efektor sistem imun seperti sel makrofag yang terinfeksi atau telah memfagositosis bakteri, dan limfosit B yang mengikat antigen dan karenanya teraktivasi guna memproduksi antibodi. Sel T CD4<sup>+</sup> yang mengaktifkan makrofag menghasilkan protein sitokin tertentu yang memediasi fungsi efektor sel ini, dan protein sitokin jenis lain yang dapat mengaktifkan sel B.





**Gambar 2.4.4 Model instruktif dan model stokastik (Goldsby *et al.*, 2000<sup>B</sup>)**

Menurut model instruktif interaksi antara salah satu ko reseptor dengan molekul MHC pada sel stromal menyebabkan penghambatan pada ko reseptor yang lain. Menurut model stokastik penghambatan terhadap ko reseptor CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup> bersifat acak.



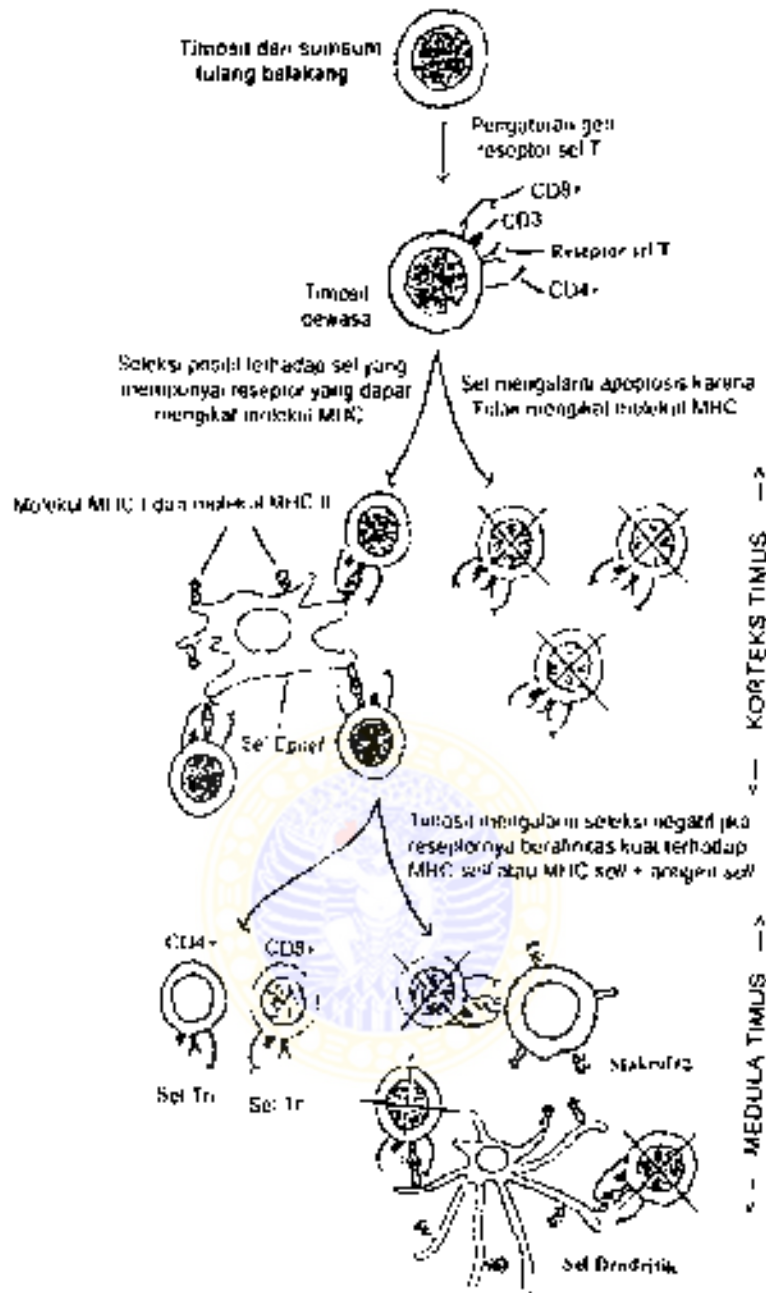
Gambar 2.4.5 Model induktif / selektif (Benoist, 1999)

Menurut model ini diferensiasi timosit *double positive* CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> menjadi timosit *single positive* CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup> ditentukan oleh 1) pengaruh lain seperti daya hidup dan gen, 2) intensitas ekspresi ko reseptor CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup> dan reseptor sel T, 3) kontinuitas sinyal dari ko reseptor CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup>. DP(*double positif*); SP(*single positive*); + (timosit mati).

Tabel 2.4.1  
Profil sitokin dari sel limfosit CD4<sup>+</sup> (sel Th) (Clancy, 1998)

|       | Th 0 | Th 1 | Th 2 |
|-------|------|------|------|
| IL-2  | +    | +    | -    |
| INF-γ | +    | →    | -    |
| INF-β | +    | →    | -    |
| IL-4  | +    | -    | ++   |
| IL-5  | +    | -    | ++   |
| IL-10 | +    | -    | →    |
| IL-13 | +    | -    | +    |





**Gambar 2.4.6 Seleksi positif dan seleksi negatif terhadap timosit di dalam timus (Goldsby *et al*, 2000<sup>B</sup>)**

Proses seleksi di dalam timus, yang melibatkan sel stromal (sel epitel, sel dendritik, dan makrofag) menghasilkan limfosit T yang bersifat hanya berafinitas terhadap molekul MHC tertentu+antigen yang dipresentasi-kannya, dan bersifat toleran terhadap *self*.

Di perifer sel Th0 akan berdeferensiasi menjadi fenotip-fenotipnya. Terdapat dua faktor yang mempengaruhi sel Th0 deferensiasi menjadi fenotip Th1 atau fenotip Th2 yaitu : faktor ekstrinsik dan faktor intrinsik. Faktor intrinsik (misalnya; genetika, hormon) belum terungkap, sedangkan faktor ekstrinsik meliputi: tempat dimana antigen masuk, bentuk fisik imunogen, jenis *adjuvant* dan dosis antigen (Romagnani, 2000).

Imunisasi pada mencit dengan vaksin NHTI bersama toksin kolera melalui intraperitoneal lebih menghasilkan respon imun dari fenotip Th2, yang ditandai dengan terdapatnya IL-4. Sedangkan vaksinasi melalui mukosa nasal dan intra trakheal dapat menghasilkan respon imun dari fenotip Th1 yang ditandai dengan meningkatnya IFN- $\gamma$  (Kurono *et al*, 1999).

Antigen yang berasal dari parasit seperti *Leishmania* dan *Schistosoma* akan memicu respon imun dari fenotip Th2. Sedangkan antigen inert seperti *microsphere* sintetik tidak sanggup memicu deferensiasi dari sel Th (Sedlik *et al*, 1996). Produk organisme mikro seperti; *Mycobacterium*, *Listeria*, dan Protozoa (*Toxoplasma*) menginduksi respon Th1 karena senyawa-senyawa tersebut memicu terbentuknya IL-12 (sitokin yang memicu Th0 berdeferensiasi menjadi fenotip Th1)(Gallin, 1999). Jumlah antigen yang masuk dalam tubuh sangat berpengaruh terhadap deferensiasi sel Th. Dosis tinggi antigen peptida akan memicu deferensiasi Th0 ke arah Th1, sedangkan dosis rendah akan menuju ke respon imun Th2 (Paul, 1999). Sebagai contoh dosis tinggi antigen produk mikroorganisme seperti; *Mycobacterium*, *Listeria*, dan Protozoa (*Toxoplasma*) menginduksi respon Th1 karena senyawa-senyawa tersebut memicu terbentuknya IL-12 (Gallin, 1999).

*Adjuvant* adalah senyawa atau formulasi yang mempunyai kemampuan meningkatkan respon imun terhadap suatu antigen (Paul, 1999). Mencit galur Balb/cJ dan mencit galur A/J tidak rentan terhadap toksin streptozocin dosis rendah (40mg/kg), tetapi jika pada toksin dengan dosis sebesar tersebut ditambahkan senyawa IL-1 maka akan terjadi *insulitis* dan *hiperglikemia* (Zunino *et al*, 1994). Suatu antigen protein mumi jika diberi organisme *Bordetella Pertusis* sebagai *adjuvant*, akan menimbulkan respon imun dari fenotip Th2 (Paul, 1999).

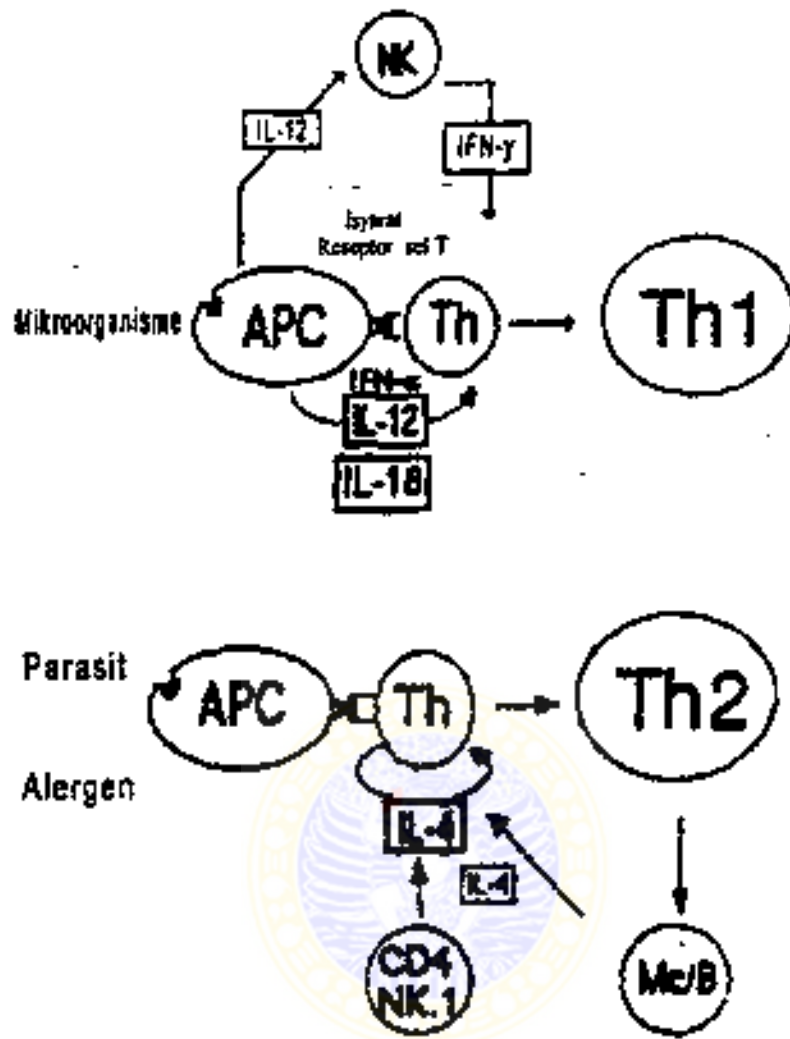
Faktor ekstrinsik dan faktor intrinsik mempengaruhi diferensiasi sel Th menjadi sel Th1 atau sel Th2 utamanya dengan menentukan jenis sitokin yang akan mendominasi lingkungan mikro dimana limfosit Th0 (*naïve*) berada (Romagnani, 2000). Sitokin yang mempengaruhi lingkungan mikro yang menyebabkan diferensiasi Th0 menjadi fenotipnya adalah IL-4 dan IL-12 (Goldshy *et al*, 1999<sup>4</sup>). Kehadiran senyawa IL-4 pada masa awal terjadinya aktivasi Th0 merupakan pemicu kuat terjadinya diferensiasi menuju fenotip Th2, sedangkan IL-12 dan IFN- $\gamma$  berpengaruh pada perkembangan fenotip Th1 (Gallin, 1999). Fenotip Th2 diperlukan untuk respon imun humoral sedangkan fenotip Th1 berperan penting dalam terjadinya otoimun dan radang (Chaturvedi *et al*, 2000). IL-4 sendiri dapat dihasilkan oleh Th0 (pada saat awal aktivasi) dan jumlahnya akan terus meningkat seiring dengan meningkatnya aktivasi sel Th0. Jika jumlah IL-4 mencapai batas tertentu maka terjadi diferensiasi Th0 menjadi Th2 (Romagnani, 2000). Sumber: IL-4 yang lain adalah sel CD4<sup>+</sup> NK1, sel mast, sel basofil, eosinofil. Produksi IL-4 oleh sel-sel ini memperkuat sinyal untuk terjadinya diferensiasi menuju fenotip Th2. IL-4 dalam jumlah kecil, yang

terdapat pada awal terjadinya respon imun diduga sudah dapat mengarahkan diferensiasi menuju fenotip Th2 (Gallin, 1999).

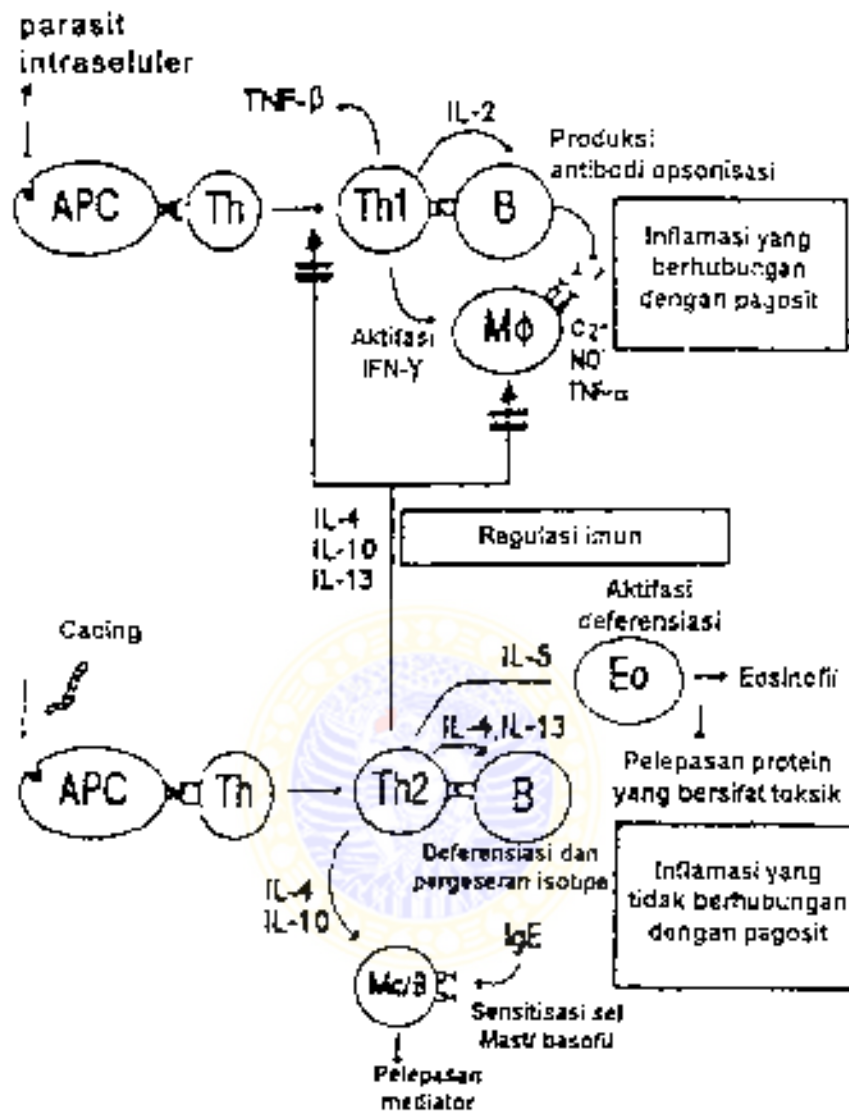
IL-12-senyawa yang dapat memicu diferensiasi Th0 menuju fenotip Th1, diproduksi pada saat terjadi infeksi bakteri dan parasit (Gallin, 1999). Sitokin ini bersifat *proinflammatory*, mengaktifasi sel NK dan sel Th1 yang terbentuk untuk memproduksi IFN- $\gamma$  (Oswald *et al*, 1994), meningkatkan aktifitas fagositosis dan bakterisid dari sel fagositik, serta meningkatkan kemampuan sel ini untuk memproduksi sitokin *proinflammatory* termasuk IL-12 (Gallin, 1999). Senyawa ini juga menghambat diferensiasi sel Th0 ke arah fenotip Th2 (Oswald *et al*, 1994).

Pengikatan sitokin pada reseptornya memicu isyarat intraseluler. Isyarat yang dilakukan oleh sitokin menyebabkan aktivasi transkripsi dari gen yang menjadi target, yang berlangsung cepat dan tidak memerlukan sintesis protein baru. Transduksi isyarat yang berlangsung cepat tersebut melibatkan transduser isyarat JAK (*Janus kinase*) dan aktivasi alur isyarat dari STAT. Faktor STAT mengalami reaksi tirosin fosforilasi pada saat terjadi pemecuan oleh sitokin. Selanjutnya STAT akan mengalami dimerisasi dan bergerak menuju inti sel, disini senyawa ini akan mengaktifasi transkripsi. Terdapat 6 famili dari STAT (STAT 1 sampai dengan STAT 6). IL-12 mengaktifkan STAT 1 sampai dengan STAT 4. STAT 4 tampaknya secara selektif diaktifkan IL-12. Sinyal yang dilaksanakan IL-4 terjadi melalui aktivasi STAT-6 (Gambar 2. 3. 9) (Gallin, 1999). Limfosit Th1 dan Th2 memperantai respon imun yang dipicu oleh infeksi bakteri, virus dan parasit (Romagnani, 2000).

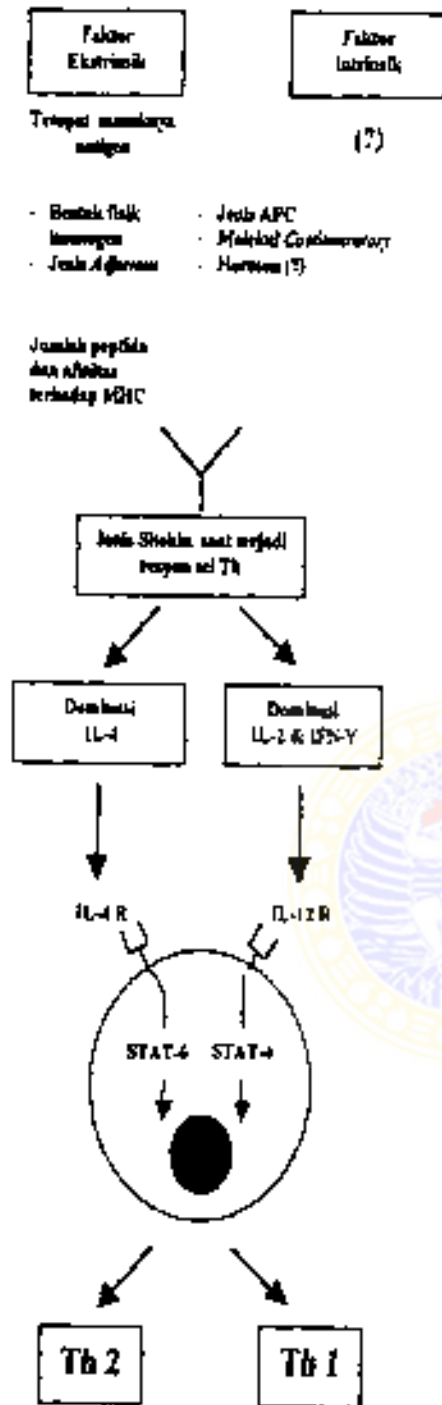
Limfosit Th1 menghasilkan sitokin IFN- $\gamma$ , IL-2 dan TNF- $\beta$ . Sitokin ini, mengaktifkan makrofag, mempengaruhi sitotoksitas sel dan menginduksi terjadinya CMI, serta mempengaruhi produksi antibodi yang dipergunakan pada proses opsonisasi dan pengikatan komplemen. Respon imun yang didominasi oleh limfosit Th1 utamanya menyebabkan proses radang yang tergantung pada sel fagosit (Clancy, 1998). Limfosit Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13. Sitokin yang diproduksi sel ini, membangkitkan respon antibodi ( Ig E ), menyebabkan diferensiasi dan aktivasi eosinofil, menghambat beberapa fungsi sel-sel fagosit. Limfosit Th2 memperantarai terjadinya proses radang yang tidak tergantung pada sel fagosit. Menurut tabel 2. 3. 1, limfosit Th1 dan Th2 bukanlah satu-satunya yang memproduksi sitokin, sebab limfosit Th0 juga mengekspresikan protein sitokin yang diproduksi baik oleh sel Th1 maupun Th2. Sedangkan sel limfosit Th yang memproduksi senyawa TGF- $\beta$  disebut sebagai Th 3 (gambar 2. 6. 3)(Romagnani, 2000).



Gambar 2.4.7 Sitokin menyebabkan polarisasi menjadi sel Th 1 atau sel Th 2 (Romagnani, 2000)



Gambar 2.4.8 Sifat dan fungsi utama dari respon terpolarisasi Th1 atau Th2 (Romagnani, 2000)  
 APC (*antigen presenting cells*); Th (sel *Helper*); Th1 (Th tipe 1); B (limfosit B); MΦ (makrofag); Eo (eosinofil); Th2 (sel Th tipe 2); Mc/B (sel mast/basofil); TNF (*tumor necrosis factor*); IL (interleukin).



Faktor intrinsik dan ekstrinsik mempengaruhi pembentukan sel Th menjadi efektor Th 1 dan Th 2 dengan mempengaruhi sitokin mana yang mendominasi (IL-4 atau IL-12 dan IFN-γ). Jika IL-4 menonjol, akan mempengaruhi alur isyarat intraseluler STAT-6 dalam sel Th, yang kemudian menyebabkan produksi IL-4 dan terjadi polarisasi Th 2 ; jika IL-12 dan IFN-γ yang menonjol, alur STAT 4 yang teraktivasi, yang memicu polarisasi ke arah Th 1. Meskipun faktor ekstrinsik sudah banyak diungkap, tetapi faktor intrinsik masih belum jelas

Gambar 2.4.9 Faktor polarisasi bagi Th 1 dan Th 2 (Gallin, 1999)



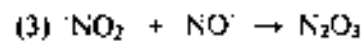
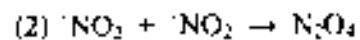
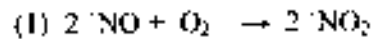
## 2.5 Nitrogen Oksida

Nitrogen oksida adalah senyawa radikal bebas, berbentuk gas yang dihasilkan melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim *NOS (NO synthase)* (Sea, 1999). Senyawa ini memiliki waktu paruh 3 – 5 detik di dalam larutan yang mengandung oksigen (Griscavage *et al.*, 1993). Radikal nitrogen oksida tidak bermuatan, molekulnya berukuran kecil (Stamler *et al.*, 1992<sup>B</sup>), dan bersifat lipofilik sehingga mudah menerobos plasma membran dan lipoprotein dari sel penghasil radikal ini untuk kemudian menuju sel sasaran (Bloodsworth *et al.*, 2000), tanpa harus menggunakan reseptor (Stamler *et al.*, 1992<sup>B</sup>). Radikal ini dengan menggunakan alur yang berbeda-beda bereaksi dengan sel sasaran untuk menghasilkan pengaruh biologi yang bergantung pada lingkungan kimiawi setempat. Enzim *NOS* diekspresi oleh bermacam-macam sel, diantaranya adalah: sel endotel pembuluh darah, sel otot polos, trombosit, sel saraf, makrofag, dan neutrofil (Bloodsworth *et al.*, 2000).  $\text{NO}^{\cdot}$  memiliki fungsi fisiologi yang luas yaitu: 1) sebagai *signal molecule* pada sistem saraf, 2) mediator radang, 3) mengatur tekanan darah, 4) berperan pada kontraksi saluran pencernaan (Sea, 1999), 5) sebagai pelonggar saluran nafas (Barnes, 1993). Selain berfungsi untuk mempertahankan fungsi faal tubuh normal, senyawa ini juga diproduksi jika terjadi radang dan infeksi (Mitsumoto *et al.*, 2000). Dalam jumlah besar  $\text{NO}^{\cdot}$  selain berfungsi sebagai regulator juga berfungsi sebagai efektor selama ada infeksi dan radang. Salah satu fungsi efektor senyawa ini yaitu toksisitasnya terhadap sel tumor, mikroorganisme dan sel tubuh (Kim *et al.*, 1999). Toksisitas  $\text{NO}^{\cdot}$  tampak pada patogenesis kerusakan jaringan akibat radang, yang ditandai dengan meningkatnya sintesis  $\text{NO}^{\cdot}$  pada daerah tersebut (Sea, 1999).

Hasil akhir metabolisme  $\text{NO}^\bullet$  sebagian besar adalah nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Dua ion ini akan diekskresi melalui air seni. Selama metabolisme menjadi nitrit dan nitrat, radikal  $\text{NO}^\bullet$  mengalami serangkaian reaksi yang akan menghasilkan spesies nitrogen reaktif yang memiliki bilangan oksidasi beragam (Tabel 2. 4. 1). Dalam suasana aerob  $\text{NO}^\bullet$  bereaksi dengan oksigen membentuk  $\text{NO}_2$  (nitrogen dioksida) (persamaan 1 Gambar 2. 4. 1). Reaksi ini jika berlangsung di dalam lingkungan yang hidrofobi (misalnya membran atau inti) berlipat-lipat kali lebih cepat dibandingkan jika berlangsung di lingkungan hidrofilik.  $\text{NO}_2$  jika bereaksi dengan sesamanya akan menghasilkan  $\text{N}_2\text{O}_4$  (dinitrogen tetraoksida), dan jika bereaksi dengan  $\text{NO}^\bullet$  akan menghasilkan  $\text{N}_2\text{O}_3$  (dinitrogen trioksida) (Bloodsworth *et al.*, 2000).

Tabel 2.5.1  
Nitrogen oksida dalam biologi (Bloodsworth *et al.*, 2000)

| Simbol                 | Bilangan oksidasi | Nama   | Aksi   |
|------------------------|-------------------|--|--|
| $\text{NO}^-$          | +1                | anion nitroksil                                  | relaksasi otot polos                                   |
| $\text{N}_2\text{O}$   | +1                | nitrous oksida                                   | anestesia  |
| $\text{NO}$            | +2                | nitrik oksida<br>(nitrogen monoksida)            | vasodilator<br>antagonis trombosit<br>neurotransmitter |
| $\text{NO}^+$          | +3                | kation nitrosil<br>(nitrosonium)                 | spesies penitrosasi<br>mutagen                         |
| $\text{NO}_2^-$        | +3                | nitrit   | oksidan  |
| $\text{N}_2\text{O}_3$ | +3                | dinitrogen trioksida<br>(asam nitrous anhidrida) | oksidan<br>spesies penitrosasi                         |
| $\text{NO}_2$          | +4                | nitrogen dioksida                                | oksidan  |
| $\text{N}_2\text{O}_4$ | +4                | dinitrogen tetraoksida                           | spesies penitrosasi                                    |
| $\text{ONOO}^-$        | +5                | Peroksinitrit<br>(Oksiperoxonitrat)              | oksidan<br>spesies penitrat<br>antimikroba             |
| $\text{NO}_2^+$        | +5                | kation nitrit<br>(nitronium)                     | oksidan<br>spesies penitrat                            |
| $\text{NO}_3^-$        | +5                | nitrat   | oksidasi produk akhir                                  |



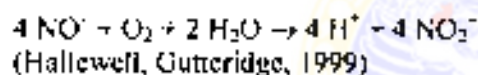
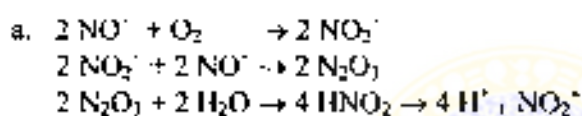
**Gambar 2.5.1** Reaksi oksidasi  $\text{NO}^\cdot$  (Bloodsworth *et al.*, 2000).

Reaksi pembentukan  $\text{NO}^\cdot$  terjadi di dalam sel yang dapat mengekspresi enzim *NOS*. Enzim ini akan mengubah asam amino L-arginin menjadi L-sitruilin dan  $\text{NO}^\cdot$ . Reaksi pembentukan  $\text{NO}^\cdot$  dari substrat L-arginin yang dikatalisis oleh enzim *NOS* adalah stereospesifik, karena jika substratnya D-arginin maka reaksi tersebut tidak akan berlangsung (Barnes, 1993). Terdapat dua jenis enzim *NOS* yaitu *eNOS* (*constitutive NOS*) dan *iNOS* (*inductive NOS*). *eNOS* menghasilkan  $\text{NO}^\cdot$  yang diperlukan bagi fungsi faal tubuh normal, sedang *iNOS* menghasilkan  $\text{NO}^\cdot$  jika ada pemicunya (Bloodsworth *et al.*, 2000). Ekspresi *iNOS* antara lain dipicu oleh sitokin dan lipopolisakarida. Sitokin terbentuk pada infeksi virus dan respon imun, sedangkan lipopolisakarida terdapat pada infeksi bakteri. Sebagai radikal bebas,  $\text{NO}^\cdot$  mudah bereaksi dengan radikal lain seperti superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), membentuk senyawa peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Suarez-Pinson *et al.*, 1997). Peroksinitrit mempunyai waktu paruh 1,9 detik pada pH 7,4 dan terdapat dalam keseimbangan dengan asam peroksinitrous ( $\text{ONOOH}$ ). Reaktivitas peroksinitrit bermula dari dua senyawa antara ketika asam peroksinitrous berdegradasi menjadi nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Senyawa antara tersebut adalah radikal nitrit dioksida dan radikal hidroksil (Gambar 2. 4. 3) (McCafferty, 2000). Superoksida adalah salah satu oksigen reaktif yang dihasilkan sel sebagai hasil samping metabolisme normal (Suryoludoyo, 2000). Peroksinitrit terlibat dalam patofisiologi beberapa penyakit

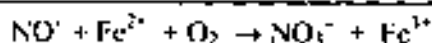
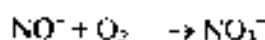
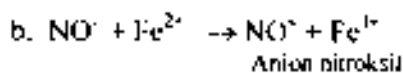
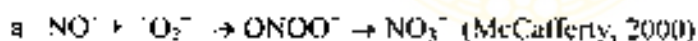
seperti fibrosis paru (Bellocq *et al.*, 1999), DMT 1 (Suarez-Pinson *et al.*, 1997), dan meningitis pneumokokus pada hewan coba (Kastenbauer *et al.*, 1999).

Di dalam plasma NO<sup>•</sup> terdapat dalam bentuk S-nitrosoalbumin, senyawa ini terbentuk melalui ikatan S-nitrosotiol (RS-NO) antara albumin plasma dengan NO<sup>•</sup>. S-nitrosoalbumin diduga bekerja sebagai penyangga kadar NO<sup>•</sup> plasma dan merupakan sarana untuk menyimpan NO<sup>•</sup> (Stamler *et al.*, 1992<sup>A</sup>). Jika tidak terikat pada albumin atau senyawa lain, di dalam plasma NO<sup>•</sup> akan teroksidasi dengan cepat membentuk ion nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), dan di dalam plasma ion-ion tersebut stabil (Gastun, 1994).

Oksidasi NO<sup>•</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



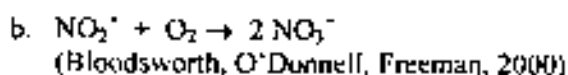
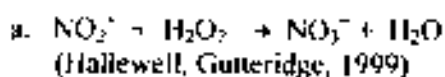
Oksidasi NO<sup>•</sup> → NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



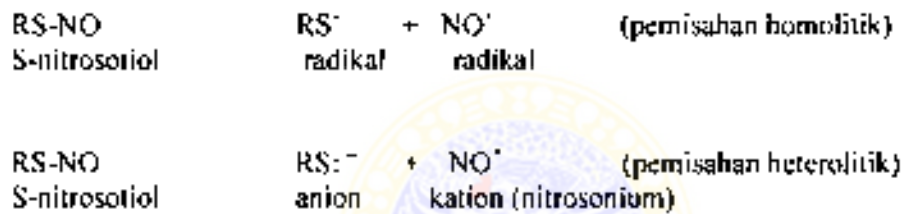
Sumber Fe : sitokrom C

(Hallewell, Gutteridge, 1999)

Oksidasi NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



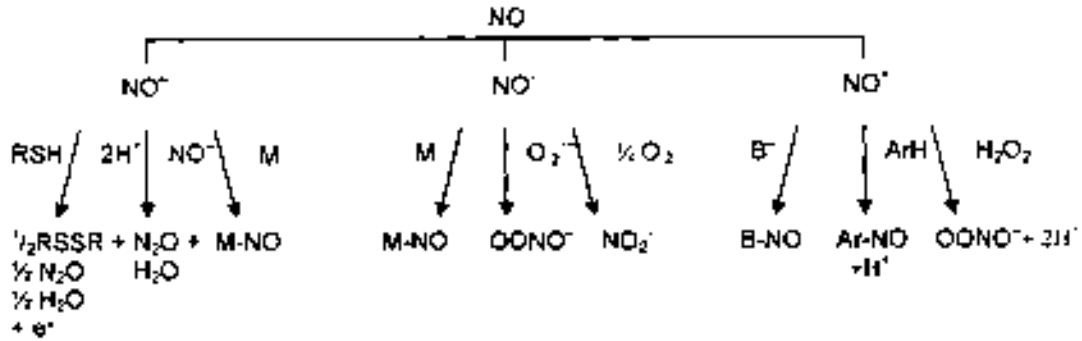
Ikatan S-nitrosotiol ( $RS\text{-NO}$ ) dapat terurai secara homolitik menghasilkan radikal  $NO^{\cdot}$  dan radikal  $RS^{\cdot}$ , serta terpisah secara heterolitik menghasilkan kation  $NO^+$  (nitrosonium) dan anion  $RS:^-$  (Stamler *et al.*, 1992<sup>A</sup>). Nitrosonium bereaksi dengan  $Fe^{3+}$ -porfirin pada hemoglobin,  $H_2O_2$ , senyawa aromatik, gugus tiolat ( $RS^{\cdot}$ ), gugus alkoksi ( $RO^{\cdot}$ ), amina ( $RR'NH$ ), dan peroksida ( $ROO^{\cdot}$ ). Reaksi nitrogen oksida dengan senyawa-senyawa tersebut merupakan mekanisme tubuh untuk melindungi diri dari ketoksikan  $NO^{\cdot}$  (Racic, 1993).  $NO^{\cdot}$  mudah bereaksi dengan radikal-radikal yang dihasilkan oleh sel radang pada keadaan patologis seperti  $H_2O_2$  (hidrogen peroksida) dan  $O_2^{\cdot-}$  (superoksida).



**Gambar 2.5.2** Reaksi pemisahan homolitik dan heterolitik pada S-nitrosotiol (Stamler *et al.*, 1992<sup>B</sup>)

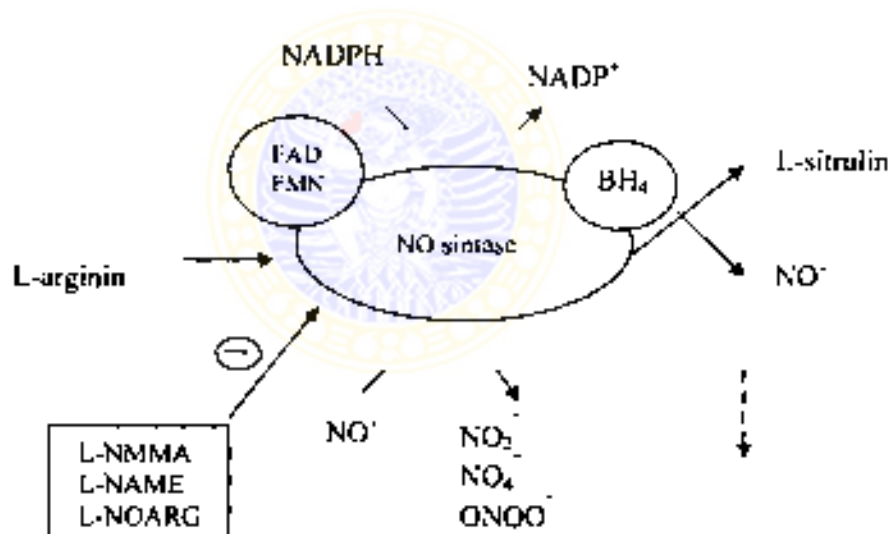
Sifat toksik  $NO^{\cdot}$  terhadap sel penjelasannya adalah, radikal ini mengikat gugus Fe-S dari enzim-enzim dalam sel untuk membentuk kompleks Fe-nitrosil. Komplek Fe-nitrosil yang terbentuk dapat melepas nitrosonium ( $NO^+$ ) dan nitroksil ( $NO^{\cdot}$ ). Ion-ion tersebut selanjutnya akan dapat bereaksi dengan logam dalam berbagai jenis metaloprotein, bermacam asam lemak, dan gugus tiol dalam protein (Stamler *et al.*, 1992<sup>D</sup>).  $NO^{\cdot}$  juga mudah bereaksi dengan DNA dan karenanya membuat kerusakan pada molekul tersebut (Suryohudoyo, 2000). Kerusakan DNA memicu produksi enzim PARS— poli (ADP-ribosa)sintetase, yaitu enzim yang diperlukan untuk memperbaiki kerusakan pada DNA. Enzim ini

memerlukan NAD sebagai substratnya, sehingga kandungan NAD dalam sel menurun (Yamada *et al.* 1982). Radikal NO menghambat aktivitas enzim akonitase siklus Krebs melalui reaksi nitrosilasi gugus Fe-S enzim tersebut. Keadaan ini mencegah reaksi oksidasi glukosa dan pembentukan ATP (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998). Penurunan ATP akan mengganggu pembentukan NAD – senyawa yang diperlukan bagi perbaikan DNA (Wilson *et al.* 1988) (Gambar 2. 2, 1). Metabolisme molekul oksigen *in vivo* akan menghasilkan metabolit reaktif oksigen seperti superoksida ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $HO^{\cdot}$ ), dan oksigen singlet ( $^1O_2$ ) (Yoshikawa, 2002). Reaksi radikal NO dengan superoksida dan hidrogenperoksida menghasilkan senyawa peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) yang sangat reaktif (Racie *et al.* 1993). Peroksinitrit merusak DNA dan karenanya menyebabkan 1) pengaktifkan enzim PARS, 2) penggunaan NAD dalam jumlah besar dan 3) gangguan pembentukan ATP. Sehubungan dengan senyawa peroksinitrit, Suarez-Pinson *et al.* (1997) membuktikan bahwa timbulnya diabetes otoimun pada mencit NOD ada hubungannya dengan terbentuknya senyawa peroksinitrit di dalam sel  $\beta$  pankreas mencit tersebut. Sedangkan Lakey *et al.* (2001) membuktikan bahwa senyawa peroksinitrit merupakan mediator dari kerusakan sel  $\beta$  pankreas manusia yang diinduksi oleh sitokin.



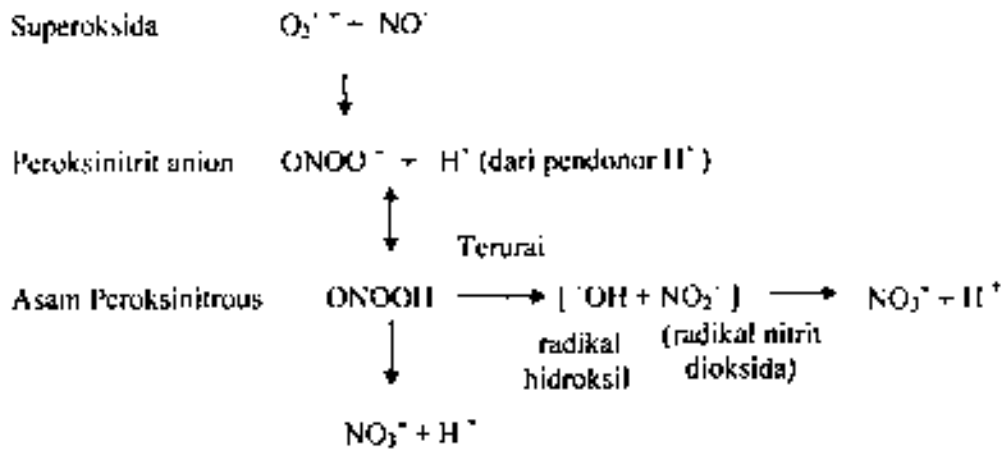
**Gambar 2.5.3 Bentuk redoks dari senyawa NO• (nitrogen oksida)** (Stamler *et al*, 1992<sup>6</sup>)

RSH: Tiol, M: Logam, RSSR: Disulfida, ONOO<sup>-</sup> : Ion peroksinitrit, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> : Radikal nitrogen dioksida, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Superoksida, B<sup>-</sup> : Basa, RS<sup>-</sup> : Tiolat, RR'NH: Amina, RO<sup>•</sup>: Alkoksi, ROO<sup>•</sup> : Peroksida, ArH: Senyawa aromatik.



**Gambar 2.5.4 Pembentukan NO• yang dikatalisis oleh enzim NO sintase, melibatkan reaksi perubahan L-arginin menjadi L-sitrulin** (Barnes, 1993)

Aktivitas NO sintase memerlukan ko faktor antara lain; flavon (FAD, FMN) dan tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>). NO sintase mengalami penghambatan kompetitif oleh derivat arginin; N<sup>G</sup>-mono-metil-L-arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitroarginin metil ester (L-NAME), dan N<sup>G</sup>-nitroarginin (L-NOARG). NO• dapat dioksidasi menjadi ion nitrit (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), dan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>).



**Gambar 2.5.5** Senyawa yang dapat dihasilkan, jika radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  bereaksi dengan superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) (McCafferty, 2000)

Ikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  dengan logam besi (Fe) yang terdapat dalam enzim dari sel tertentu pengaruhnya tidak selalu merugikan. Ikatan radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  dengan logam besi pada gugus heme enzim guanilil siklase, justru mengaktifkan enzim ini. Ikatan ini akan menyebabkan perubahan bentuk 3 dimensi dari gugus heme tersebut, dan keadaan ini menyebabkan enzim tadi menjadi aktif sehingga dapat mengubah GTP (guanosin trifosfat) menjadi GMPs (guanosin monofosfat siklik). Tergantung dari jenis sel, GMPs akan memicu fungsi fisiologi tertentu dari sel tersebut. Pada sel otot polos pembuluh darah, GMPs menyebabkan relaksasi otot polos sehingga terjadi pelebaran pembuluh darah tersebut (Snyder, 1992). Sedangkan ikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  dengan logam Fe pada inti heme dari hemoglobin diyakini merupakan salah satu mekanisme tubuh untuk mengurung  $\text{NO}^{\cdot}$  (Jenkinson *et al.*, 1994). Ikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  dengan logam besi dalam heme dari oksihemoglobin akan segera diikuti dengan reaksi oksidasi yang menghasilkan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dan methemoglobin (Bloodsworth *et al.*, 2000). Pada bentuknya sebagai



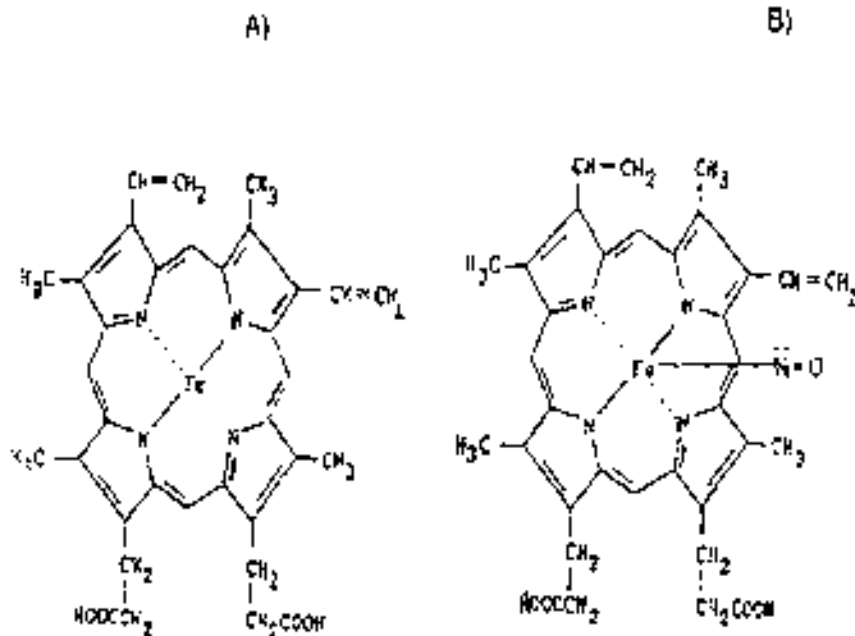
methemoglobin. hemoglobin tidak dapat melaksanakan fungsinya sebagai pengangkut oksigen (Li, 1993). Bentuk feri ( $Fe^{3+}$ ) maupun  $Fe^{2+}$  dari protein heme dapat bereaksi dengan  $NO^{\cdot}$ . Reaksi ini menghindarkan kemungkinan pembentukan metabolit-metabolit oksidan dari radikal  $NO^{\cdot}$ , dan mengurangi status redoks dari logam besi dari heme. Sebagai contoh spesies oksoferit dari hemoglobin atau mioglobin dapat direduksi menjadi bentuk feri (met) jika bereaksi dengan  $NO^{\cdot}$ , hal ini akan melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Methemoglobin masih dapat mengikat  $NO^{\cdot}$  membentuk nitrosil-hemoglobin ( $NO^{\cdot}$ -Hb). Reaksi ini akan mengurangi kemampuan  $NO^{\cdot}$  untuk mengoksidasi asam linoleat dalam sel. Secara umum dapat dikatakan jika  $NO^{\cdot}$  bereaksi dengan metaloprotein, maka lemak tubuh akan terhindar dari oksidasi oleh metal dan metabolit-metabolit  $NO^{\cdot}$ . Metal dalam tubuh (seperti besi dalam hemoglobin) memiliki kemampuan untuk mengawali reaksi oksidasi bagi molekul lemak (Bloodsworth *et al*, 2000).

Spesies nitrogen reaktif, misalnya  $NO^{\cdot}$  dalam penelitian *in vitro* mengendalikan sintesis sitokin, growth factor, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, dan TGF- $\beta$  (Bellogg *et al*, 1999). Enzim NOSi (yang mengkatalisis reaksi pembentukan  $NO^{\cdot}$ ) menginduksi regulasi proliferasi dan diferensiasi sel T (Kubes, 2000). Penelitian *in vivo* pada mencit NOD membuktikan TNF menghambat kejadian diabetes. Efek anti diabetogenik dari TNF diduga karena sitokin ini menginduksi pembentukan  $NO^{\cdot}$  oleh makrofag. Penghambatan ini menyebabkan hambatan pada proliferasi sel T (Corbett, 1992).

Glutation (GSH) bereaksi dengan  $NO^{\cdot}$  membentuk S-nitrosoglutation (GSNO). Glutation merupakan antioksidan yang memegang peran utama dalam

melindungi sel dari kerusakan oksidatif karena NO. Senyawa GSNO dapat memindahkan gugus NO<sup>•</sup> yang dimiliki kepada senyawa tiol lain melalui reaksi transnitrosasi untuk menghasilkan senyawa S-nitrosatiol yang tidak stabil. Enzim Glo I (Glyoxalase I) adalah enzim yang diyakini dapat menerima transfer NO<sup>•</sup> dari GSNO. Molekul Glyoxalase I mengandung empat buah residu sistein. Gugus sulfhidril dari residu tersebut menerima NO<sup>•</sup> dari GSNO melalui reaksi transnitrosasi. Reaksi ini akan membebaskan glutathion dari NO<sup>•</sup> (Mitsumoto *et al.*, 2000).

Pengurangan produksi NO<sup>•</sup> dapat dilaksanakan dengan memberikan senyawa penghambat enzim NOS seperti : L-NMMA (N<sup>G</sup>-monometil-L-arginin), L-NIO (N-iminoetil-L-arginin), L-NA (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin), L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-metilester), L-NAA (N<sup>G</sup>-amino-L-arginin) (Moncada *et al.*, 1991). Jika senyawa L-NMMA sebesar 5 mg/kg BB diberikan setiap hari secara subkutaneus selama 80 hari, dapat menghambat kejadian diabetes pada tikus BB (*biobreeding*). Penghambatan kejadian diabetes tersebut karena penghambatan pembentukan senyawa NO<sup>•</sup> (Wu, 1995). L-NMMA ternyata menghambat baik enzim iNOS maupun enzim eNOS, enzim eNOS diperlukan bagi sintesis NO untuk kepentingan fungsi fisiologi normal dari tubuh (Hotchkiss *et al.*, 1992).



**Gambar 2.5.6 A) Struktur heme (Jenkinson *et al.*, 1995)**

Tersusun dari porphyrin dengan logam besi di tengahnya. Di dalam jaringan senyawa ini merupakan gugus prostetik dari hemoglobin, mioglobin, katalase, beberapa peroksidase, dan sitokrom b (The Merck Index, 1976). **B) Ikatan NO<sup>•</sup> dengan heme.** Ikatan ini diyakini merupakan salah satu cara untuk mengurung NO<sup>•</sup>.

Sel yang mati karena nekrosis akan memicu migrasi dan aktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan mengsekresi sitokin IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , dan TNF $\alpha$ . Tiga sitokin ini akan ditangkap oleh sel  $\beta$  pankreas yang akan memicu ekspresi enzim *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*) yang selanjutnya akan meningkatkan kadar NO dalam sitosol sel  $\beta$  (Hallewell *et al.*, 1999).

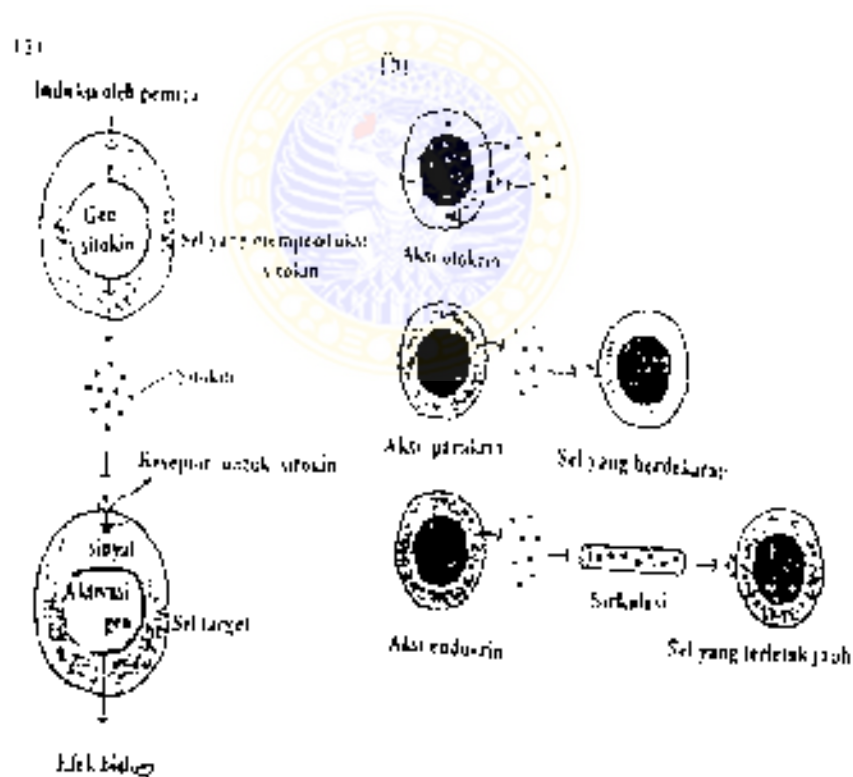
## 2.6. Sitokin

Sitokin adalah non spesifik glikoprotein (10 – 30 kDa) yang disekresi oleh bermacam sel sebagai respon dari berbagai pemicu (Corbett, 1992). Nama sitokin berasal dari kata *cyto* (sel), nama ini diambil karena sesuai dengan keadaan sitokin, yaitu senyawa yang dihasilkan oleh berbagai macam sel dan berpengaruh pada berbagai macam sel target (Humbin, 1993). Sitokin mempengaruhi sel target atau sel yang memproduksinya melalui interaksinya dengan reseptor spesifik yang terdapat pada permukaan sel dan melalui timbulnya transduksi sinyal. Berbeda dengan hormon, sitokin pada umumnya berpengaruh lokal, karena di dalam sirkulasi waktu paruhnya pendek. Sebaliknya hormon akan tersebar dalam sirkulasi darah untuk mencapai organ-organ sasaran yang jauh (Goldsby *et al.*, 2000<sup>6</sup>).

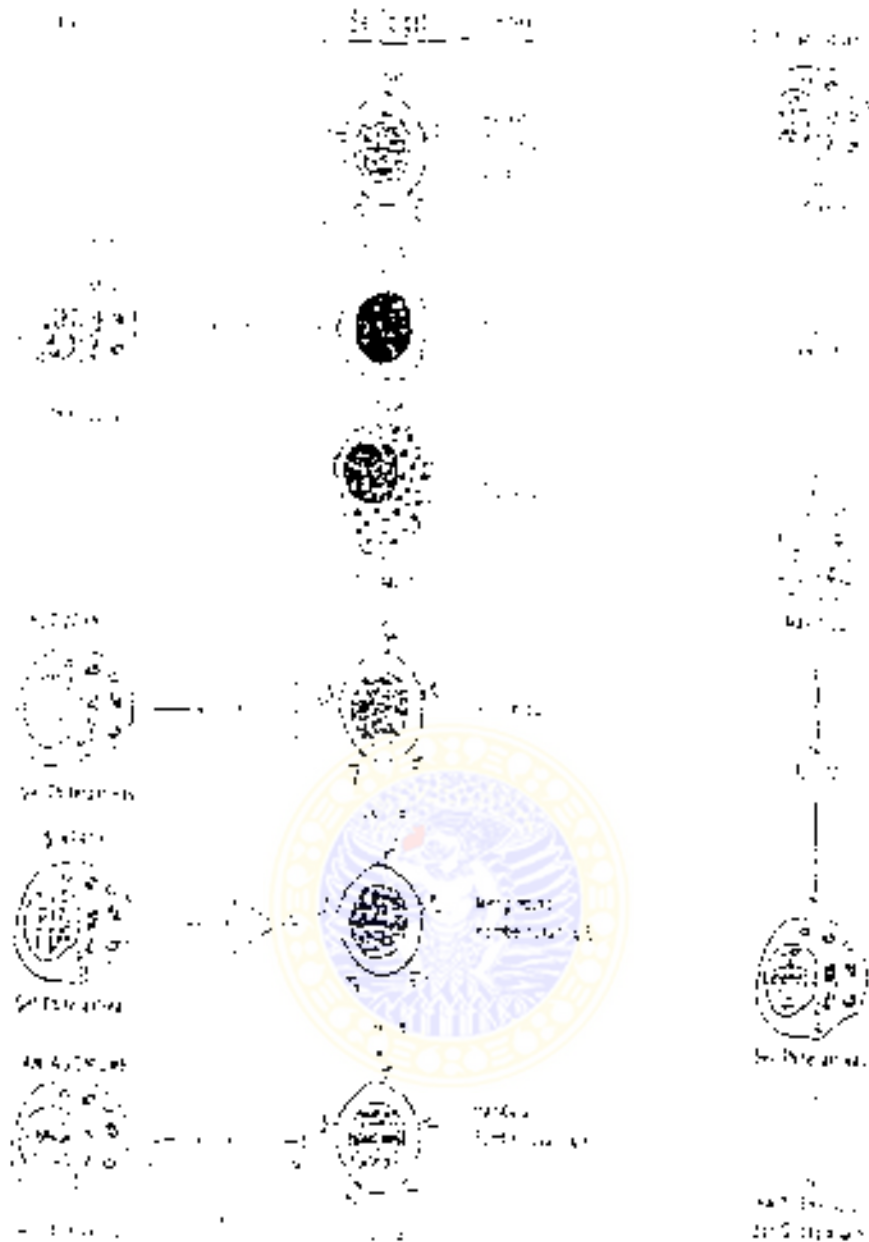
Karakter biologi sitokin antara lain: 1) *pleiotrophy*, 2) *redundancy*, 3) *synergism*, 4) *antagonism*, dan 5) induksi *cascade*. Semua karakter biologi tersebut diperlukan untuk mengatur aktivitas seluler yang terkoordinasi dan interaktif. Aksi *pleiotrophy* adalah bahwa suatu sitokin tertentu mempunyai pengaruh biologis yang berbeda terhadap sel target yang berbeda. Aksi *redundancy* adalah jika beberapa sitokin memiliki pengaruh yang serupa terhadap sel target. *Synergism* terjadi manakala pengaruh beberapa jenis sitokin bersamaan terhadap sel target lebih besar daripada penjumlahan dari pengaruh masing-masing sitokin tersebut. *Antagonism* terjadi jika pengaruh satu sitokin menghambat pengaruh sitokin yang lain. Induksi *cascade* terjadi manakala pengaruh satu sitokin terhadap sel target menyebabkan sel target tersebut memproduksi sitokin lain, kemudian sitokin yang baru terbentuk tersebut akan

menginduksi sel yang menjadi targetnya untuk memproduksi sitokinya sendiri, demikian seterusnya. (Goldsby *et al*, 2000<sup>5</sup>).

Sitokin pada umumnya berfungsi sebagai molekul pembawa pesan antar sel. Sebagai pembawa pesan, sitokin dapat membangkitkan aktivitas biologi tertentu dari suatu sel target setelah sitokin tersebut mengikat reseptor pada sel target tersebut. Di dalam pembuluh darah sitokin mempunyai waktu paruh pendek, sehingga setelah terbentuk sitokin hanya sempat berpengaruh pada area yang sangat sempit. Sitokin umumnya diproduksi lebih karena suatu penginduksian daripada diproduksi secara konstitutif. Keberadaannya di dalam jaringan merupakan indikasi adanya aktivitas imunologi (Goldsby *et al*, 2000<sup>1</sup>).



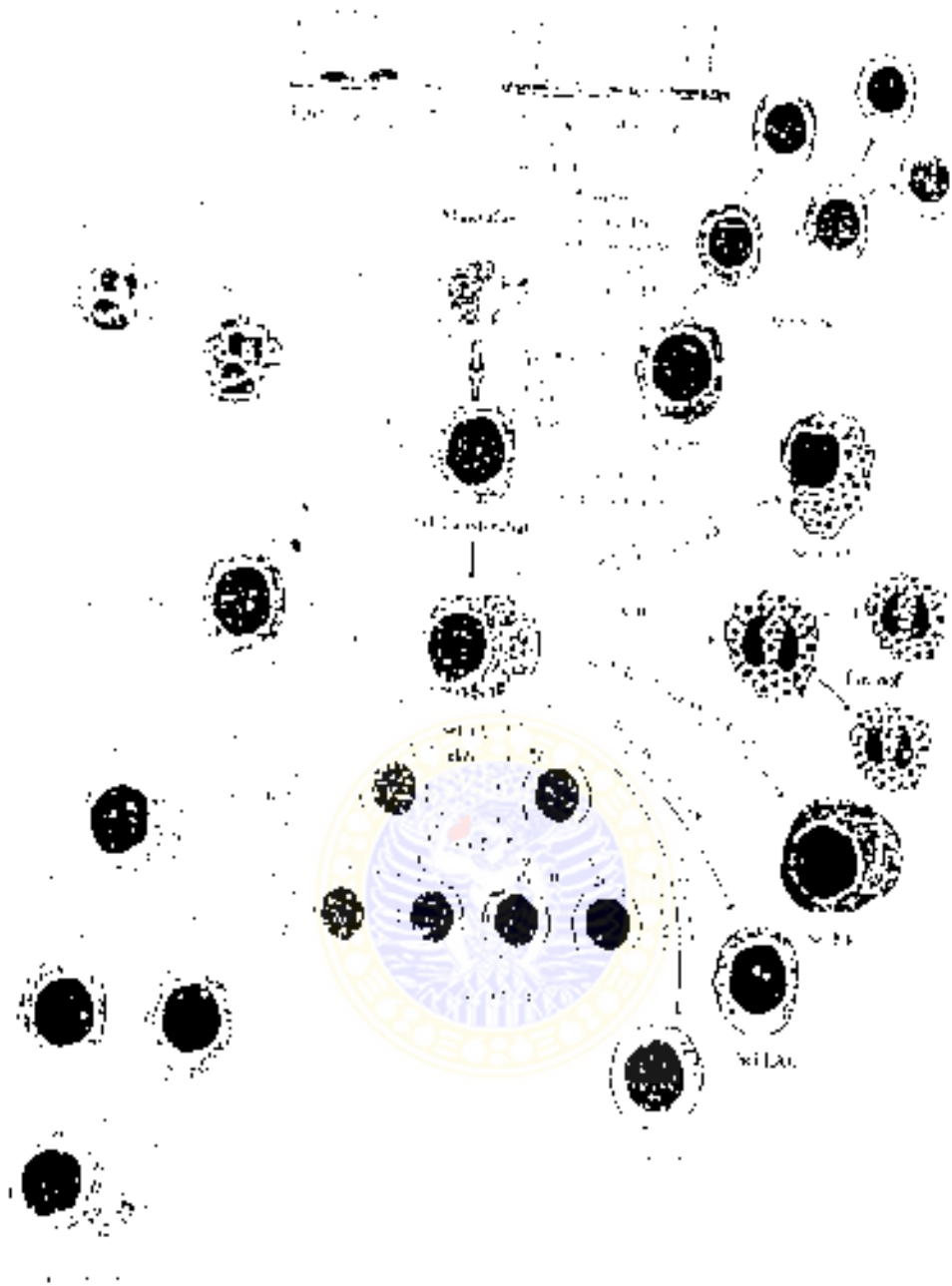
**Gambar 2.6.1** Bagian penginduksian dan fungsi sitokin (Goldsby *et al*, 2000<sup>5</sup>)  
Sebagian besar sitokin melaksanakan fungsi otokrin dan parakrin, hanya sebagian kecil saja yang berfungsi endokrin.



Gambar 2.6.2 Aksi *pleiotrophy*, *redundancy*, *synergism*, *antagonism*, dan induksi berangka dari sitokin (Goldshy *et al*, 2000<sup>4</sup>)

Ekspresi sitokin dan reseptornya, dan pelepasan reseptor sitokin dalam sirkulasi dilaporkan tidak normal pada keadaan patologi. Trio inflamasi (IL-1,

TNF, IL-6) jumlahnya meningkat pada radang menahun. Pengaruh buruk sitokin juga ditemukan pada penderita kanker dan penyakit infeksi, berupa turunnya berat badan secara berlebihan. TNF (cachectin) berperan pada kelainan tersebut. TNF menekan produksi enzim lipoprotein lipase, sehingga menghambat penyerapan trigliserida dengan demikian menghambat proses hidrolisisnya menjadi asam lemak dan gliserol. Gejala panas, menggigit, dan rasa lemah pada infeksi akut virus dihubungkan dengan peningkatan kadar IFN dalam sirkulasi darah. Pada penyakit malaria, IFN bertanggung jawab pada gejala neurologis dan akibat yang mematikan lainnya. Gangguan keseimbangan pada proporsi dan aktivitas dari sel Th1 dan sel Th 2 diduga memicu timbulnya keadaan patologi. Pada infeksi oleh parasit tampak pola peningkatan sitokin ( yang dihasilkan oleh sel Th 1 atau sel Th 2) yang berbeda, bergantung pada jenis parasitnya. Sitokin juga dihubungkan dengan timbulnya otoimunias. Otoantigen timbul jika sel yang seharusnya tidak mengekspresi produk-produk MHC II, terinduksi untuk memproduksinya. Sel tirosit pada penderita penyakit kelenjar tiroid dan sel  $\beta$  pada penderita DM tipe 1 mengekspresi produk-produk MHC II, sedangkan sel dua organ tersebut pada individu yang tidak terkena penyakit-penyakit tersebut tidak mengekspresinya (Goldsby *et al.* 2000<sup>1</sup>).



**Gambar 2.6.3** Interaksi antara antigen dengan makrofag menyebabkan aktivasi sel Th, dan sel ini akan melepas sitokin (Goldshy *et al*, 2000<sup>6</sup>)  
Selanjutnya timbul serangkaian interaksi antar sel yang kompleks di dalam suatu respon imun.



## 2.7 Diabetes karena Streptozocin

Streptozocin adalah senyawa analog glukosa yang terdiri dari D-glukospiranosa dan gugus metilnitrososurea (Wang, 1998). Senyawa ini dihasilkan oleh jamur streptomyces serta berkhasiat sebagai antibiotik dan anti tumor (Schmedl *et al.*, 1994). Streptozocin sejak lama digunakan sebagai sarana untuk merekayasa diabetes eksperimental pada hewan coba karena bersifat sitotoksik spesifik bagi sel  $\beta$  pankreas (Schmedl *et al.*, 1994). Hewan coba yang dipergunakan sebagai model diabetes dengan menggunakan streptozocin umumnya adalah: mencit *MDD*, mencit atau tikus yang rentan terhadap streptozocin, dan mencit atau tikus *BB*. Sebutan *Bio Breeding (BB)* diberikan pada semua hewan coba dan keturunannya yang mengalami diabetes secara spontan (Nakhooda *et al.*, 1978). Terdapat bukti bahwa DM1 pada manusia maupun hewan model berhubungan dengan imunitas seluler dan humoral. Pada tikus *BB* (model DM1), secara umum terdapat hal-hal sebagai berikut; 1) keterlibatan monutas seluler, 2) pembentukan otoantibodi terhadap sel  $\beta$ , 3) otoantibodi terhadap antigen pada permukaan sel  $\beta$ , 4) otoantihodi terhadap insulin, 5) otoantihodi terhadap antigen 6-1K dari sel  $\beta$  (Diaz *et al.*, 1992).

Streptozocin merusak sebagian besar sel  $\beta$  hewan coba tikus, anjing, mencit, monyet, babi, dan kelinci setelah pemberian dosis tunggal yang berkisar antara 25 - 200 mg/kg. Terdapatnya variasi suseptibilitas terhadap streptozocin tampaknya lebih berhubungan dengan farmakokinetik senyawa ini dari pada pengaruh langsungnya terhadap sel  $\beta$ . Streptozocin tidak stabil dalam larutan bahkan dalam larutan asam, oleh karenanya setelah dilarutkan dalam bufer sitrat (pH 5.0) harus segera diinjeksikan. Waktu paruhnya *in vivo* kurang dari 15 menit.

Senyawa ini menyebabkan proses degranulasi sel  $\beta$  tetapi tidak sampai menyebabkan nekrosis (Shafir, 2003).

Pengangkutan streptozocin dalam jaringan memerlukan protein GLUT 2. Protein ini diekspresi oleh beberapa jaringan diantaranya adalah jaringan pankreas (terutama sel  $\beta$ ), jaringan ginjal dan jaringan hati. Pada manusia dan beberapa jenis hewan, pemberian streptozocin menyebabkan gangguan pada ginjal dan hati, karena dua organ ini mengekspresi protein GLUT 2 untuk pengangkutan glukosa dan analognya (misalnya streptozocin) menuju selnya (Schredl *et al.*, 1994). GLUT2 memfasilitasi pengangkutan streptozocin melalui bagian glukopiranosida dari senyawa ini (Wang, 1998). Senyawa lain yang juga dapat menginduksi diabetes pada hewan coba adalah Alloxan (Rossini *et al.*, 1977) dan Siklofosfamid (Suenaga, 1988).

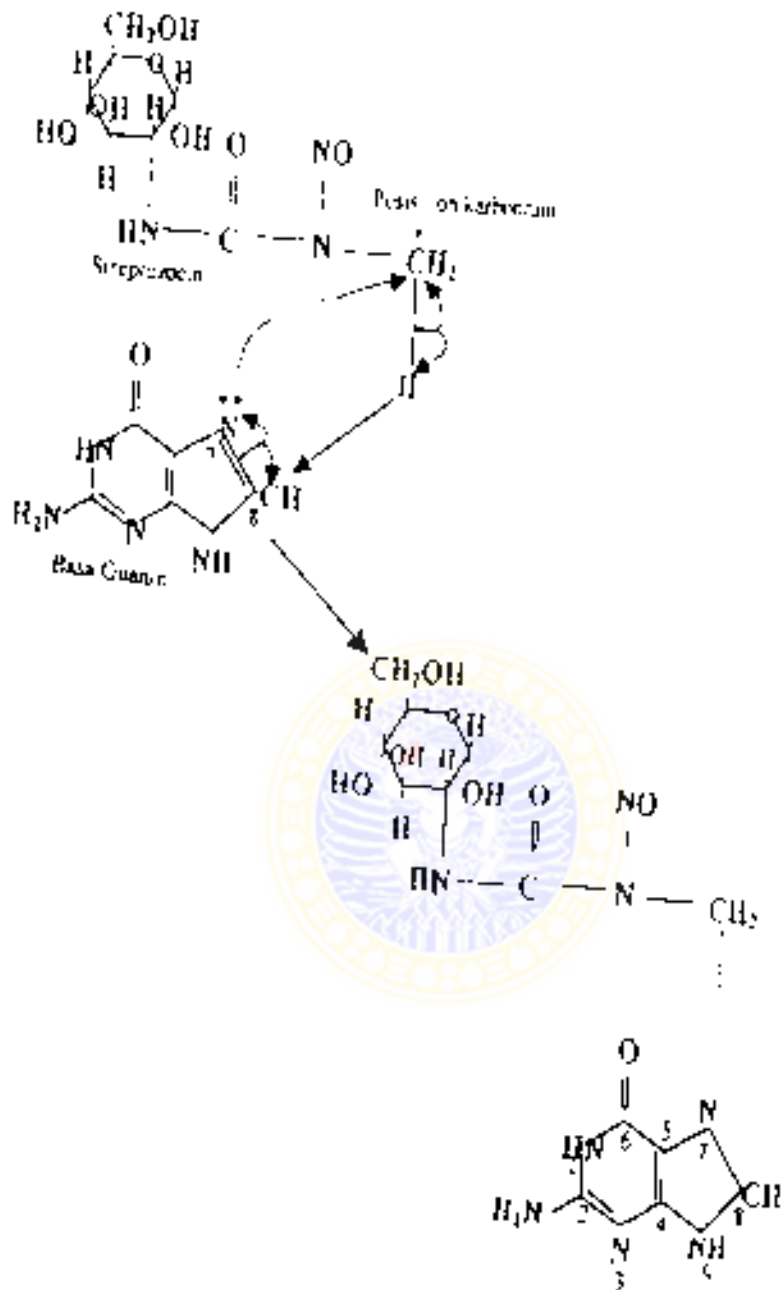
Terdapat dua macam dosis STZ untuk menghasilkan Diabetes Mellitus yaitu; dosis tinggi tunggal > 40 mg/kg BB menyebabkan kerusakan sel  $\beta$  pankreas dan sebagai konsekuensinya menimbulkan hiperglikemia. Dosis sebesar 65 mg/kg jika diberikan pada tikus jantan galur Wistar secara intraperitoneal, akan menimbulkan diabetes sehari setelah penyuntikan (Youn *et al.*, 1994). Malabu *et al.* (1994) berhasil merekayasa terjadinya diabetes dengan memberikan streptozocin 55 mg/kg melalui pembuluh vena ekor pada tikus jantan Wistar.

Streptozocin merupakan sumber radikal NO dalam jumlah besar (Orzechowski, 2003). Reaksi NO dengan superoksida ( $O_2^-$ ) menghasilkan senyawa peroksinitrit yang bersifat toksik bagi sel  $\beta$  (Racie *et al.*, 1993), karena senyawa ini menyebabkan kerusakan pada DNA sel (Suarez Pinzon *et al.*, 1997). Superoksida merupakan hasil metabolisme efektif oksigen *in vivo* (Yoshikawa,

2002). Kerusakan sel  $\beta$  karena streptozocin dosis tinggi tunggal tersebut juga terjadi karena peristiwa berikut:

1. Ion peroksinitrit dapat menghasilkan radikal hidroksil (OH) (McCafferty, 2000).
2. STZ dapat menimbulkan fragmentasi DNA melalui aktivasi OH atau melalui alkilasi DNA (Wang *et al.*, 1993).
3. Fragmentasi DNA akan menginduksi aktivitas enzim poli (ADP-ribosa) polymerase (PARP). Aktivasi PARP yang berlebihan akan memicu nekrosis sel  $\beta$  melalui penurunan NAD<sup>+</sup> dan penurunan sintesa ATP (Mauricio dan Mandrup-Poulsen, 1998).
4. Nekrosis sel  $\beta$  dapat juga disebabkan oleh radikal hidroksil (OH). Kadar OH yang tinggi dapat merusak sistem transport elektron mitokondria yang selanjutnya menyebabkan penurunan sintesis ATP (Green dan Reed, 1998).

Alkilasi DNA terjadi karena STZ mudah terurai menjadi ion karbonium yang sangat reaktif. Ion ini akan mengalkilasi basa nitrogen nukleotida DNA (Gerling *et al.*, 1994). Alkilasi terjadi misalnya pada posisi N<sup>7</sup> basa guanin (Wilson *et al.*, 1988) (gambar 2.7.1). Fragmentasi DNA terjadi ketika sel  $\beta$  mengaktifasi enzim perbaikan DNA (*DNA repair enzymes*).



Gambar 2.7.1 Reaksi alkilasi ion karbonium dari streptozocin dengan atom N<sup>7</sup> dari basa guanine (Wilson *et al.*, 1988)  
Reaksi ini diyakini dapat merusak DNA.

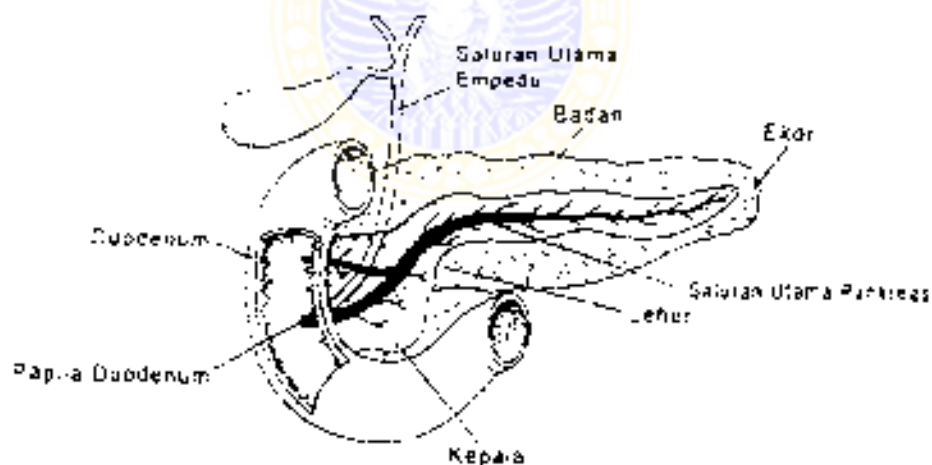
Cara ke dua adalah dengan pemberian STZ dosis rendah  $\leq 40$  mg/kg BB, diberikan 5 hari berturut-turut. Cara ini disebut *multiple low dose STZ* (MLD-STZ) kepada hewan coba yang rentan (Elias *et al.* 1994).

MLD-STZ menimbulkan perubahan dan/atau kerusakan pada struktur sel  $\beta$ . Bagian-bagian sel yang rusak tersebut (autoantigen) akan dipresentasikan oleh sel  $\beta$  melalui molekul MHC II pada permukaan sel. Selanjutnya otoantigen tersebut akan dikenali oleh limfosit T, maka terjadi infiltrasi sel mononuklear ke dalam jaringan pankreas (Klinkhammer, 1988). MLD-STZ selain menimbulkan pengaruh toksik langsung juga menyebabkan reaksi imun bergantung pada sel T pada hewan coba yang rentan pada dosis ini (Wang *et al.* 1993). Pemberian streptozocin dosis rendah secara berulang, akan menimbulkan sindroma yang terdiri dari *myelitis* dan kerusakan sel  $\beta$  pankreas yang menyerupai dengan yang terjadi pada DM1 (Shenedl *et al.* 1994), yang diikuti dengan hiperglikemia, dan ketosidosis (Jackson *et al.* 1981). Dosis rendah standar 40 mg/kg yang diberikan lima hari berturut-turut mempengaruhi sel  $\beta$  pankreas dan menimbulkan reaksi imun yang bergantung pada limfosit T (Wang, 1998). Dosis 40 mg/kg yang diberikan secara intraperitoneal selama lima hari berturut-turut pada mencit gafir (57-ke) umumnya menimbulkan gejala diabetes dalam waktu 3 minggu, sedangkan dosis 30 mg/kg yang diberikan dengan *rate*, rentang waktu, dan pada hewan coba yang sama akan menimbulkan gejala klinis diabetes setelah 3 bulan. Dosis sebesar 30 mg/kg tersebut menyebabkan proses otoimun yang sama dengan proses terjadinya diabetes otoimun yang timbul secara spontan pada mencit NOD (Elias, 1996).

Secara histologi kelainan yang terdapat pada jaringan pankreas dari penderita DM1, miceit NOD, dan miceit atau tikus diabetes akibat streptozocin dosis subtoksik (rendah) secara berulang adalah sama (Yamada *et al.*, 1982). DM1 pada hewan coba tersebut ditandai oleh; 1) diawali oleh kejadian *insulitis*, yang sudah dapat timbul sehari setelah suntikan berulang streptozocin dosis rendah terakhir (Herold *et al.*, 1995). Pada miceit *NOD* kejadian *insulitis* mulai meningkat pada usia antara 9-13 minggu. Pada usia 5 minggu (*insulitis* minimal), usia 11 minggu (*insulitis* sedang), dan pada usia 13-16 minggu (*insulitis* luas) (Rabinovitch *et al.*, 1995); 2) *Insulitis* didominasi oleh sel T dan makrofag (Corbett, 1992). *Peri insulitis* lebih sering ditemukan dihanding infiltrasi masif sel mononuklear ke dalam pulau Langerhans (Gerling *et al.*, 1994); 3) melalui pengecatan hematoksilin dan eosin dibawah mikroskop sinar tampak adanya kerusakan selektif sel  $\beta$  yang ditandai dengan berkurangnya jumlah sel  $\beta$  yang terletak dibagian sentral pulau Langerhans. Sel yang tersisa adalah sel  $\alpha$ —penghasil glukagon yang terletak di bagian tepi dalam pulau Langerhans (Lindsay *et al.*, 1995). Kerentanan hewan coba terhadap streptozocin dosis rendah yang diberikan berulang tergantung pada disposisi gen dan gender (Elias *et al.*, 1994). Tikus galur Wistar ( tikus *Bio Breeding*) adalah salah satu hewan coba model DM1. Sekitar 50% dari keturunan tikus ini akan menderita hiperglikemia spontan pada umur antara 60 sampai 120 hari, karena *insulitis*, yang diikuti dengan kerusakan sel  $\beta$ , insulinopeni, hiperglikemia, dan ketoasidosis (Jackson *et al.*, 1981).

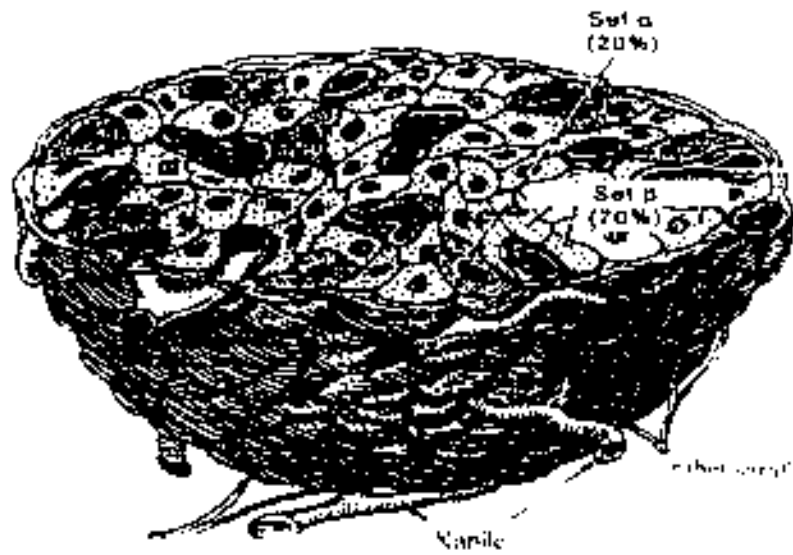
### 2.8 Kelenjar Pankreas

Kelenjar pankreas terletak di belakang lambung, dengan letak melintang ke arah limpa menuju duodenum. Menurut bentuknya kelenjar ini dibagi menjadi 4 bagian yaitu: kepala, leher, badan, ekor. Pankreas merupakan kelenjar eksokrin dan endokrin (Felford, 1995). Kelenjar eksokrin dipisahkan dari kelenjar endokrin oleh lapisan jaringan ikat. Bagian endokrin dari kelenjar ini merupakan sel-sel asinar yang tersebar diantara pulau-pulau Langerhans (Ahren, Laborsky, 2003). Sel-sel asinar mensekresi sekitar 1, 200 ml cairan pankreas setiap 24 jam dengan pH 8, 2. Cairan tersebut mengandung ion bikarbonat dan beberapa enzim seperti tripsinogen (enzimproteolitik), kimotripsinogen, dan prokarboksi-polipeptidase (keduanya menghidrolisa protein). Cairan pankreas akan disalurkan ke duodenum melalui saluran-saluran pankreas kecil yang bermuara pada saluran pankreas utama yang terletak sepanjang ekor sampai dengan kepala pankreas (Snell, 1984).

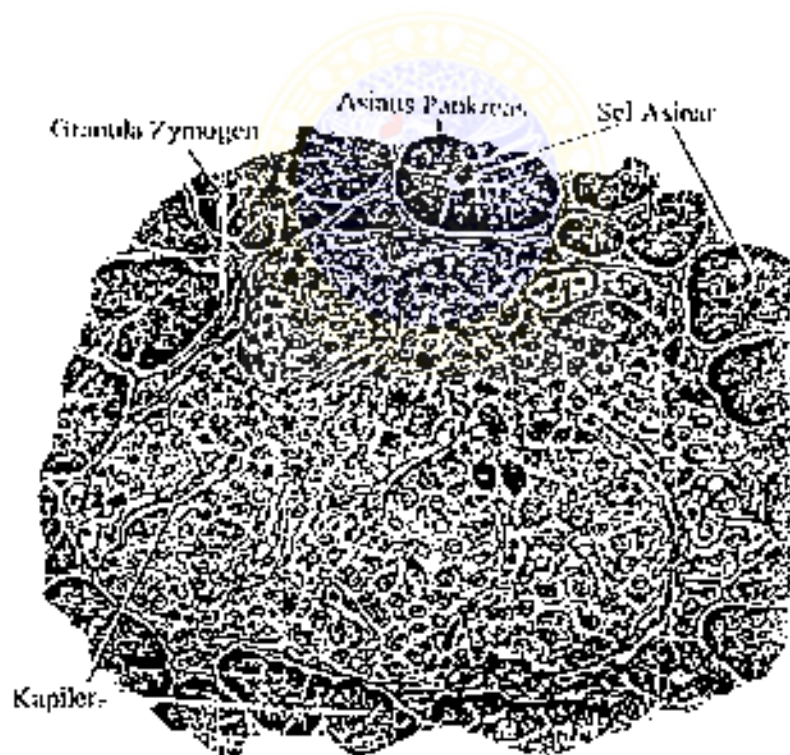


**Gambar 2.8.1** Bagian kelenjar pankreas dan hubungan organ ini dengan duodenum dan saluran utama empedu (Snell, 1984)

Sebagian pankreas disisihkan untuk memperlihatkan saluran utama pankreas.



**Gambar 2.8.2**  
**Sel  $\alpha$  dan sel  $\beta$  dalam pulau Langerhans (Telford *et al*, 1995)**



**Gambar 2.8.3** Irisan melalui pulau Langerhans dan sel-sel asini disekitarnya  
 (Copenhaver *et al*, 1978)  
 Diambil dari pankreas manusia.



Bagian endokrin dari kelenjar pankreas dikenal dengan nama pulau Langerhans. Pulau Langerhans kira-kira 1-2% dari isi pankreas (Telford *et al.*, 1995). Pulau Langerhans tersebar di seluruh kelenjar pankreas, tetapi terbanyak berkumpul di bagian ekor kelenjar ini (Ahren,Taborsky, 2003). Pulau Langerhans tidak mempunyai saluran, sel-sel yang terdapat di dalam pulau tersebut mensekresi produknya langsung ke aliran darah melalui anastomose antara kapiler dan sel-sel tersebut. Pulau Langerhans adalah kumpulan sel  $\beta$  (70%) bersama sel-sel lain (Snell, 1984). Pulau Langerhans utamanya terdiri dari 4 jenis sel yaitu; sel  $\beta$ , sel  $\alpha$ , sel  $\delta$ , dan sel pp (*pancreatic polypeptide*) (Snell, 1984). Sel  $\beta$  merupakan mayoritas (70%), sel  $\alpha$  (20%), sisanya adalah sel  $\delta$  dan sel pp (Telford *et al.*, 1995). Sel pp juga disebut sebagai sel F (Ahren,Taborsky, 2003). Sel  $\beta$  yang terletak di bagian tengah dari pulau Langerhans menghasilkan hormon insulin—hormon yang menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan transfer glukosa melalui membran plasma utamanya ke dalam sel otot, sel hati, dan sel lemak. Sel  $\alpha$  bersama dengan sel  $\delta$  dan sel pp yang terletak di bagian tepi pulau Langerhans. Sel  $\alpha$  mensekresi glukagon. Hormon ini meningkatkan kadar glukosa darah dengan menginduksi glukogenesis dan aktifitas glikolitik dalam sel hati. Sel  $\delta$  mensekresi hormon somatostatin yang berfungsi menghambat pelepasan insulin dan glukagon. Sel pp selain berada di dalam pulau Langerhans juga terdapat diantara sel asinar. Sel ini mensekresi polipeptida (Snell, 1984).

Sel-sel di dalam pulau Langerhans tersusun secara berdekatan, setiap sel dengan sel yang lain hanya dipisahkan oleh ruang ekstraseluler yang sempit. Ke dalam ruang ekstraseluler tersebut masing-masing sel mensekresi hormon yang diproduksi. Dengan cara demikian hormon tersebut dapat langsung berdifusi

pada sel yang berdekatan dan mempengaruhinya (parakrin). Komunikasi antar sel yang lain di dalam pulau Langerhans dilaksanakan melalui *Cell-cell Gap Junctions* (dapat mengirim sinyal bioelektrik dan molekul kecil) (Ahren, Laborsky, 2003).

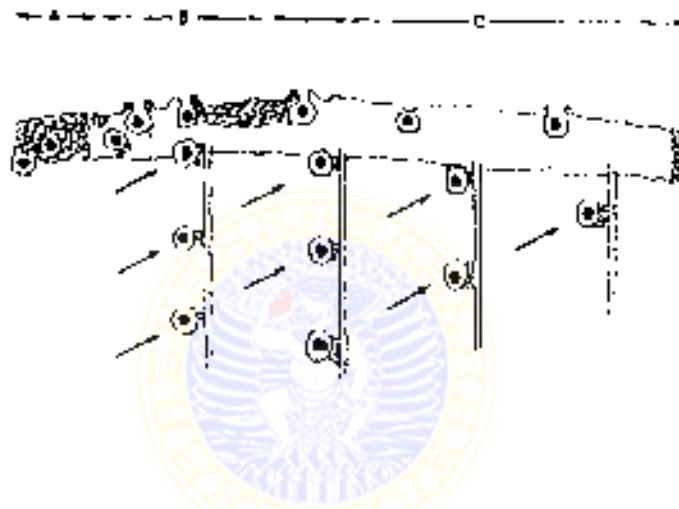
## 2.9 Pengendalian Sintesis dan Sekresi Insulin Intraseluler.

Pada manusia dan hewan pangerat glukosa memicu transkripsi gen insulin yang membentuk mRNA di dalam inti sel. Selanjutnya di dalam ribosom dari RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) mRNA ditranslasi menjadi peptida besar preproinsulin. Proses translasi dipicu oleh glukosa melalui reaksi fosforilasi dari 2 faktor translasi (eIF-2B dan PHAS-1/eIF-4E-BP). Setelah molekul preproinsulin terbentuk, molekul ini akan lepas dari ribosom menjadi proinsulin dan diangkut oleh vesikel menuju aparatus golgi dan disimpan di sini. Di dalam aparatus golgi molekul proinsulin dikemas dalam granula sekretori. Di sini molekul proinsulin akan dipisah menjadi insulin dan peptida-C. Granula sekretori yang telah matang berisi insulin dan peptida-C dalam jumlah sama serta sejumlah kecil proinsulin dan senyawa intermediet dari proinsulin. Granula sekretori mengandung banyak ion Zn, yang berfungsi penting bagi kristalisasi insulin. Ion ini juga mengandung proton yang dapat mengendalikan aktivitas enzim tersebut. Granula sekretori memiliki protein membran yang spesifik (digunakan untuk mengikatkan diri pada membran plasma). Selain itu juga mengandung kalsium, monoamin, dopamin serotonin dan IAPP (*Islet Amyloid Poly Peptide*). Sekali terbentuk, granula sekretori memasuki tempat penampungan di sitoplasma. Penampungan ini yang memungkinkan pelepasan granula sekretori (insulin) dengan cepat, segera setelah terjadi pemecahan terhadap sel. Meskipun demikian hanya 1% saja dari seluruh

tempat penampungan yang dapat segera melepas insulin ke peredaran darah, yaitu yang posisinya berdekatan dengan membran sel. Setelah terjadi pelepasan granula sekretori, tempat penampungan yang berlokasi dekat membran sel tersebut akan diisi ulang dengan granula sekretori dari tempat penampungan lain disekitarnya. Granula sekretori dipindahkan dari tempat penampungan satu ke tempat penampungan lain oleh *microtubule* dan *microfilament* (Ahren,Taborsky, 2003). Sekresi insulin memicu pemindahan (pergerakan) granula sekretori menuju bagian tepi sel (Alberti *et al.*, 1992).

Pelepasan insulin oleh sel  $\beta$  melalui proses eksositosis suatu proses dimana granula sekretori yang berdekatan dengan membrane sel mengadakan fusi dengan membran sel tersebut. Pada saat terjadi fusi membran sel akan rusak pada posisi terjadinya fusi, kristal insulin akan keluar menuju ekstraseluler. Protein granula sekretori yang tertinggal akan menutup kerusakan pada membran sel. Kecepatan proses eksositosis mempengaruhi kecepatan sekresi insulin (Ahren,Taborsky, 2003). Proses ini menjelaskan respon pendahuluan, berupa peningkatan awal dari keluarnya insulin. Kejadian ini dikendalikan oleh sistem *microtubular-microfilamentous*. *Microtubule* yang dibentuk dari polimerasi tubulin akan bertindak sebagai *cytoskeleton* yang mengarahkan perpindahan granula sekretori. Granula tersebut akan bergerak sepanjang alur *microtubular* menuju dan sepanjang membran sel. Suatu jaring *microfilament* yang berada dibawah membran sel bertindak sebagai *sphincter* dan mengendalikan masuknya granula sekretori menuju posisi eksositosis. Senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan konsentrasi  $Ca^{2+}$ , akan memicu aktivitas kontraksi dari jaring *microfilament* (Alberti *et al.*, 1992).

Fusi antara granula sekretori dengan membran sel memerlukan ATP, dan kejadiannya dipicu oleh ion  $Ca^{2+}$ . Dalam hal sel  $\beta$  pankreas, *synaptobrevin* (protein membran dari granula sekretori), *syntaxin* dan *N-ethyl maleide-SNAP 25* (protein membran plasma) berperan penting pada fusi granula sekretori dengan membran sel  $\beta$ . Proses eksositosis pada sel  $\beta$  sensitif terhadap ion  $Ca^{2+}$  dan dipengaruhi oleh *Synaptotagmin* (suatu granula protein). Granula sekretori yang tidak pernah di sekresi akan mengalami degradasi dalam lisosom (Ahren, Tahursky, 2003).



**Gambar 2.9.1** Gambar skematik dari partisipasi sistim *microtubular-microfilamentous* dalam proses sekresi insulin yang diinduksi glukosa (Alberti *et al*, 1992)

Pada sel  $\beta$  yang tidak mengalami pemicuan, granula sekretori dipertahankan berada jauh dari membran plasma oleh jaring sel (A). Selama fase pertama dari respon sekresi (B), sekresi insulin berhubungan dengan keluarnya granula sekretori yang memang telah berada dekat dengan kompleks membran plasma. Selama fase terakhir (C), Pelepasan insulin sangat bergantung pada persediaan granula sekretori yang dikirim menuju jaring sel sepanjang alur *microtubular*.

## 2.10 Stres Oksidatif

Stres oksidatif terdefinisi sebagai kelainan yang disebabkan oleh serangan radikal bebas oksigen terhadap molekul biologi seperti lemak, protein, dan DNA.

Walaupun demikian stres oksidatif juga memiliki peran berguna dalam adaptasi fisiologi dan pengaturan transduksi sinyal intraseluler. Karena hal tersebut stres oksidatif juga didefinisikan sebagai suatu keadaan dimana kekuatan oksidatif melebihi sistem anti oksidan, sehingga mengganggu keseimbangan antara 2 hal tersebut. Petanda adanya stres oksidatif *in vivo* dipergunakan untuk mengetahui menilai tingkat stres oksidatif dan keberhasilan suatu pengobatan. Petanda stres oksidatif antara lain adalah: lipid hidroperoksida, 4-hidroksinonenal, isoprostan, 8-hidroksi guanin, dan ubiquinol-10 (Yoshikawa, 2002).

Khan *et al* (2004), menggunakan 3 petanda stres oksidatif yaitu: 1) E-SOD, 2) *Lag time* dari LDL, dan 3) isoprostan untuk mempelajari dampak obat golongan ACE inhibitor terhadap stres oksidatif akibat hiperglikemia. E-SOD (Eritrosit-Superoksida dismutase)-adalah enzim yang mengkatalisis reaksi anion superoksida ( $O_2^{\cdot -}$ ) menjadi  $H_2O_2$  (hidrogen peroksida). *Lag time* adalah waktu yang diperlukan oleh LDL untuk mengalami oksidasi. *Lag time* merupakan ukuran tidak langsung dari stres oksidatif.

Umumnya atom tersusun dari inti atom dengan beberapa pasang elektron yang mengorbit mengelilingi inti tersebut. Meskipun demikian beberapa atom atau molekul memiliki elektron yang tidak berpasangan, atom atau molekul dalam keadaan demikian disebut sebagai radikal bebas. Radikal bebas umumnya tidak stabil dan sangat reaktif, karena elektron yang tidak memiliki pasangan cenderung untuk membentuk pasangan dengan elektron lain. Spesies oksigen aktif dalam arti luas terdapat pada Tabel 2. 9. 1, hanya spesies oksigen aktif yang memiliki elektron tidak berpasangan (diberi tanda titik di atas sebelah kanan rumus kimia) yang merupakan radikal bebas (Yoshikawa, 2002).

**Tabel 2.10.1**  
**Spesies oksigen aktif utama (Yoshikawa, 2002)**

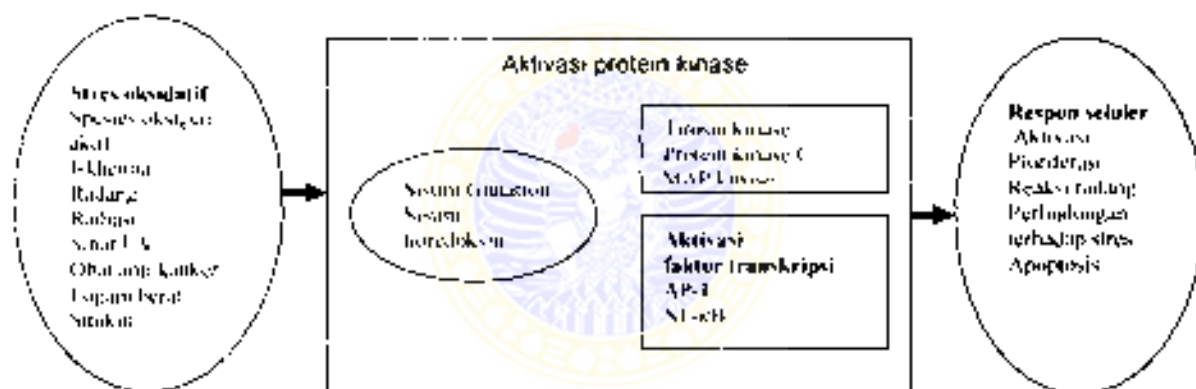
|                 |                       |
|-----------------|-----------------------|
| $O_2^{\cdot -}$ | radikal Superoksida   |
| $H_2O_2$        | Hidrogen peroksida    |
| $HO^{\cdot}$    | radikal Hidroksil     |
| $^1O_2$         | Oksigen singlet       |
| $HOO^{\cdot}$   | radikal Hidroperoksil |
| $LOOH$          | Alkildidroperoksida   |
| $LOO^{\cdot}$   | radikal Alkilperoksil |
| $LO$            | radikal Alkoksil      |
| $ClO^{\cdot}$   | ion Hipoklorit        |
| $Fe^{4+}O$      | ion Feril             |
| $Fe^{5+}O$      | ion Periferil         |
| $NO^{\cdot}$    | Nitrogen Oksida       |

Bagi organisme aerobik, mekanisme untuk menghilangkan spesies oksigen aktif yang sangat reaktif ini merupakan hal yang esensi untuk mempertahankan kehidupan. Untuk hal inilah berbagai mekanisme pertahanan antioksidan dikembangkan selama proses evolusi. Berbagai spesies oksigen aktif dihasilkan oleh tubuh selama proses penggunaan oksigen. Tubuh dilengkapi dengan sarana mekanisme untuk menghilangkan spesies oksigen aktif dan radikal bebas, oleh karenanya hasil samping metabolisme oksigen tersebut tidak sampai merugikan. Namun jika spesies oksigen aktif dan radikal bebas terbentuk berlebihan maka keseimbangan antara pembentukannya dan pemusnahannya terganggu, keadaan ini menimbulkan stres oksidatif. Sebagai konsekuensi, spesies oksigen aktif dan radikal bebas tersebut dapat menyerang membran biologi untuk menimbulkan berbagai penyakit.

Dalam beberapa hal stres oksidatif berguna, misalnya:1) stres oksidatif menginduksi apoptosis untuk mempersiapkan jalan lahir bagi proses kelahiran,

2) mekanisme pertahanan biologi diperkuat oleh stres oksidatif selama iskemia dan latihan fisik yang sesuai (Yoshikawa, 2002).

Kerusakan jaringan tubuh karena terpapar radikal bebas menghasilkan produk-produk oksidatif yang dapat dipergunakan sebagai petanda adanya stres oksidatif. Senyawa lipid peroksida, malonildialdehid, dan 4-hidroksinonenal digunakan sebagai petanda adanya kerusakan oksidatif pada jaringan lemak. Senyawa isoprostan (produk oksidasi radikal bebas terhadap asam arakhidonat), 8-hidroksi-quinon, dan timinglikel adalah petanda bagi kerusakan oksidatif pada DNA, protein, asam amino, protein karbonil, hidroleusin, hidrovalin, dan nitro-tirosin.



**Gambar 2.10.1 Stres oksidatif dan respon seluler (Yoshikawa, 2002)**

Stres oksidatif tidak hanya memiliki dampak sitotoksik, tetapi juga memiliki peran penting pada modulasi pengaturan fungsi penting membran sel yang memiliki peran vital untuk mempertahankan hidup. Stres oksidatif berdampak pada status redoks intraseluler—yang menyebabkan aktivasi protein kinase (diantaranya protein kinase C, tirosin kinase, dan MAP kinase). Stres

oksidatif dapat mempengaruhi bermacam proses biologi seperti diantaranya apoptosis dan reaksi radang. Stres oksidatif juga mengaktifkan faktor transkripsi gen seperti NF- $\kappa$ B dan AP-1. Dua gen ini berperan sebagai sensor stres melalui siklus oksidasi dan reduksi dari 2 senyawa ini sendiri (Yoshikawa, 2002).

Streptozocin adalah senyawa penghasil HO<sup>•</sup> dan NO<sup>•</sup> dalam jumlah besar (Orzechowski, 2003). HO<sup>•</sup> maupun NO<sup>•</sup> merupakan spesies oksigen aktif sekaligus radikal bebas (Yoshikawa, 2002). Dalam jumlah berlebihan spesies oksigen aktif menyebabkan keadaan stres oksidatif. Salah satu respon jaringan terhadap stres oksidatif adalah reaksi radang (Yoshikawa, 2002). Pada hewan coba tikus Wistar diabetes karena streptozocin, reaksi radang tersebut terjadi dalam pulau Langerhans jaringan pankreas yang dikenal sebagai *insulinitis*. Respon terhadap stres oksidatif akibat terpapar streptozocin terjadi pada pulau Langerhans jaringan pankreas, karena streptozocin adalah toksin spesifik bagi sel  $\beta$  (Schnedl *et al.* 1994).

## 2.11 Kobalamin

Kobalamin atau vitamin B<sub>12</sub> termasuk golongan vitamin yang larut dalam air, dan merupakan senyawa organometalik yang mengandung logam Co (kobalt) (Loudon, 1984). Kobalt menyebabkan warna kemerahan bagi kobalamin (Beutler *et al.* 1995). Kobalamin dihasilkan oleh organisme seperti: jamur aktinomisetes—mikroorganisme penghasil utama kobalamin bagi alam (Linder, 1991), dan streptomises merupakan mikroorganisme penghasil kobalamin untuk sediaan (Hovding, 1968). Vitamin ini rentan terhadap sinar matahari, larutan asam dan alkali, dan semua senyawa pereduksi (Mahan, 1992). Sumber: makanan hewani kaya kandungan kobalamin (Beutler *et al.* 1995), sumber makanan nabati

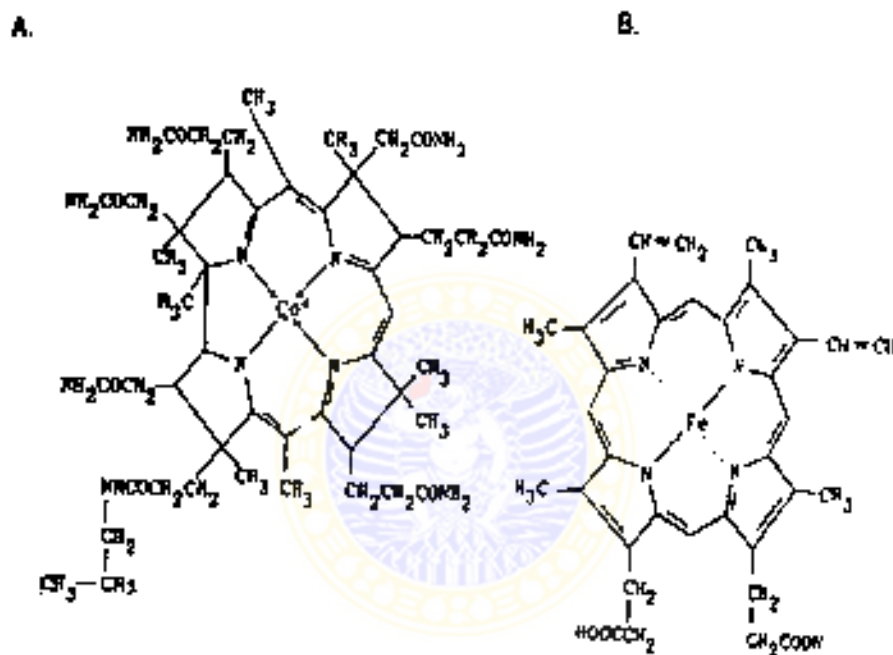


tertentu seperti tumbuhan laut, mengandung kobalamin setara sumber makanan hewani (Mahan, 1992). Tempe mengandung 2 - 7  $\mu\text{g}$  kobalamin untuk setiap 100 g berat kering. Menurut FAO kebutuhan terhadap kobalamin adalah 0,1  $\mu\text{g}$  sehari (Linder, 1991). Kobalamin tidak beracun (Mahan, 1992), jika tubuh mengandung jumlah kobalamin berlebih, vitamin ini akan dikeluarkan melalui air seni (Linder, 1991).

Molekul kobalamin mengandung cincin *corrin* yang berstruktur planar, cincin ini tersusun dari empat cincin pirol (cincin tetra pirol) yang tereduksi. Pada cincin *corrin* terikat molekul ribonukleotida yang terhadap cincin tersebut posisinya hampir tegak lurus. Susunan tetra pirol pada cincin *Corrin* berbeda dengan susunan tetra pirol pada porfirin dari hemoglobin dan klorofil. Pada cincin tetra pirol dari hemoglobin dan klorofil hanya terdapat tiga jembatan metena yang menghubungkan tiga pirol. Pirol pertama dan ke empat di dalam cincin *corrin* berhubungan tanpa jembatan metena, untuk membentuk struktur tetra pirol yang tertutup (gambar 2.8.1) (Classen, 1993). Di bagian tengah cincin *corrin* terikat logam Co (kobalt) (Beutler *et al.*, 1995). Logam kobalt pada cincin *corrin* diasumsikan bermuatan  $1+$ ,  $2+$ , atau  $3+$  tergantung pada lingkungan dimana cincin *corrin* berada atau bergantung pada fungsi biokimia yang akan diperannya (Classen, 1993).

Pada molekul kobalamin, ikatan koordinasi terbentuk antara atom kobalt dengan atom nitrogen dari keempat pirol dari cincin *corrin*, dan juga dengan 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB) dari ribonukleotida. Ikatan koordinasi lainnya terjadi antara kobalamin (melalui atom kobalt) dengan bermacam gugus seperti : i) gugus CN (sianida) membentuk sianokobalamin, ii) gugus -OH, maka akan terbentuk

hidroksokobalamin. iii)  $-\text{NO}_2$  akan terbentuk nitrokobalamin, dan kalau dengan iii) gugus  $-\text{HSO}_3$  terbentuk senyawa sulfitokobalamin. Pengikatan kobalamin dengan amonia menghasilkan senyawa *ammonia cobalichrome*, sedangkan ikatan dengan asam amino histidin menghasilkan *histidin cobalichrome*. Senyawa koenzim  $\text{B}_{12}$  terbentuk karena gugus  $-\text{CN}$  digantikan oleh gugus besar 5'-deoksiadenosin (Classen, 1993).

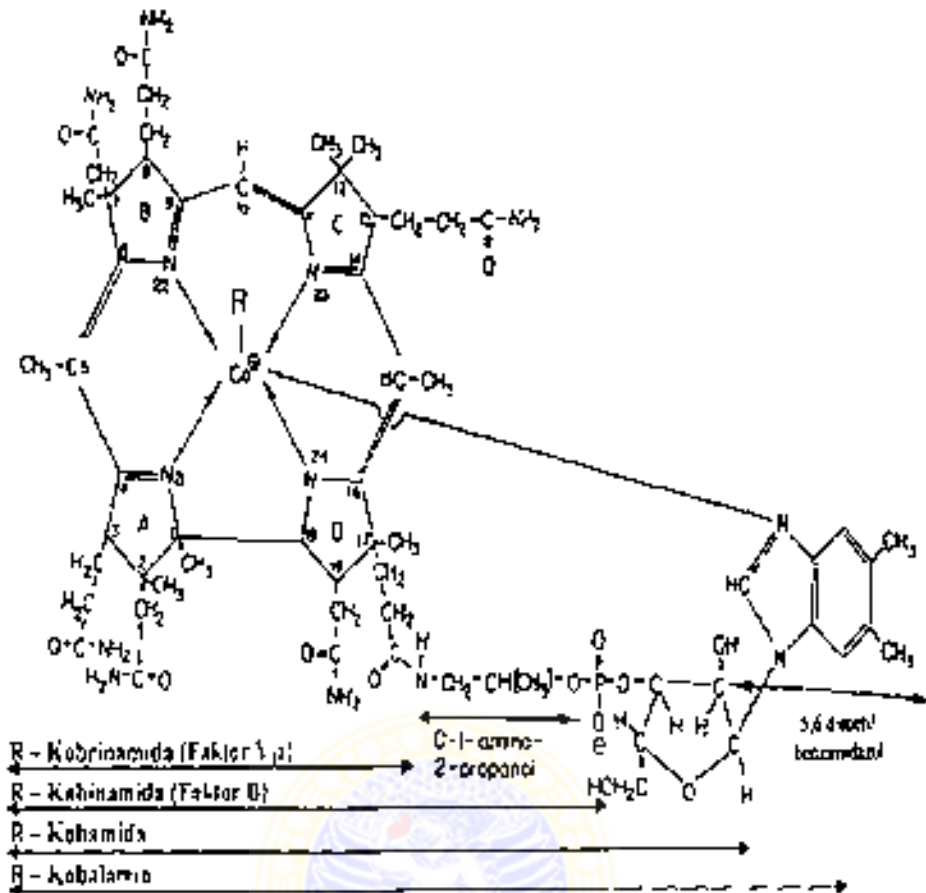


Gambar 2.11.1 A) susunan tetra pirol dari cincin *corrin* pada kobalamin. B) susunan tetra pirol dari *porfirin* pada hemoglobin (The Merck Index, 1976)

Variasi struktur yang telah disebutkan digolongkan sebagai senyawa *corrinoid* (senyawa yang mengandung inti *corrin*) (Classen, 1993). Terdapat enam macam kobalamin yaitu: 1) sianokobalamin (vitamin  $\text{B}_{12}$ ), 2) hidroksokobalamin (vitamin  $\text{B}_{12a}$ ), 3) akuokobalamin (vitamin  $\text{B}_{12b}$ ), 4) nitritokobalamin (vitamin  $\text{B}_{12c}$ ), 5) 5'-deoksiadenosilkobalamin (koenzim  $\text{B}_{12}$ ), 6)

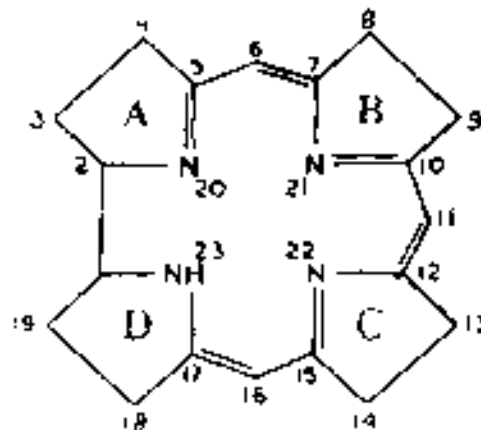
metilkobalamin (metil B<sub>12</sub>), 5'-deoksiadenosilkobalamin dan metilkobalamin adalah koenzim yang berperan dalam metabolisme asam nukleat (Hebert, 1987). Hanya terdapat dua enzim yang bergantung pada dua koenzim tersebut yaitu : metilmalonil KoA mutase dan metiltetrahidrofolat homosistein metil transferase (Heutler *et al*, 1995).

Jenis kobalamin yang paling banyak dikenal adalah sianokobalamin. Vitamin ini digunakan secara luas sebagai suplemen pada makanan dan untuk terapi anemia pernisiosa. Nama-nama lain untuk vitamin ini antara lain: *Lactobacillus lactis Dornier factor (LLD factor)*, *Extrinsic factor*, dan *anti-pernicious anemia factor* (Classen, 1993). Di dalam plasma kobalamin utamanya terdapat dalam bentuk metilkobalamin. Sirkulasi enterohepatik, akan menyerap kembali kelebihan vitamin yang diekskresi ke dalam empedu dan usus halus. Hal ini yang menjelaskan mengapa kobalamin memiliki waktu paruh dalam plasma yang panjang (Heutler *et al*, 1995). Oleh karenanya suplai kobalamin berasal dari dua hal yaitu sebagian dari makanan, dan sebagian lagi dari penyerapan kembali kobalamin yang telah diekskresi setiap hari ke dalam empedu. Penyerapan kembali kobalamin oleh sirkulasi enterohepatik ini sedemikian efektifnya sehingga menguntungkan pada *vegetarian*—mereka yang tidak mengkonsumsi protein hewani (sumber utama kobalamin). Diperlukan waktu sekitar 20 sampai 30 tahun sampai mereka mengalami defisiensi vitamin B<sub>12</sub>. Sumber lain dari vitamin B<sub>12</sub> adalah bakteri yang berada dalam usus halus manusia (Hebert, 1987).



**Gambar 2.11.2 Struktur formula dari Kobalamin (Herbert, 1987)**

Tampak logam Co ditengahnya. — R dapat merupakan : — CN (pada sianokobalamin—vitamin B<sub>12</sub>), —OH (pada hidroskobalamin—vitamin B<sub>12</sub>), —H<sub>2</sub>O (akuokobalamin—vitamin B<sub>12b</sub>), —NO<sub>2</sub> (nitritokobalamin—vitamin B<sub>12c</sub>), —5'-deoksi adenosil (5'-deoksi adenosil kobalamin—koenzim B<sub>12</sub>), —CH<sub>3</sub> (metilkobalamin—metil B<sub>12</sub>).

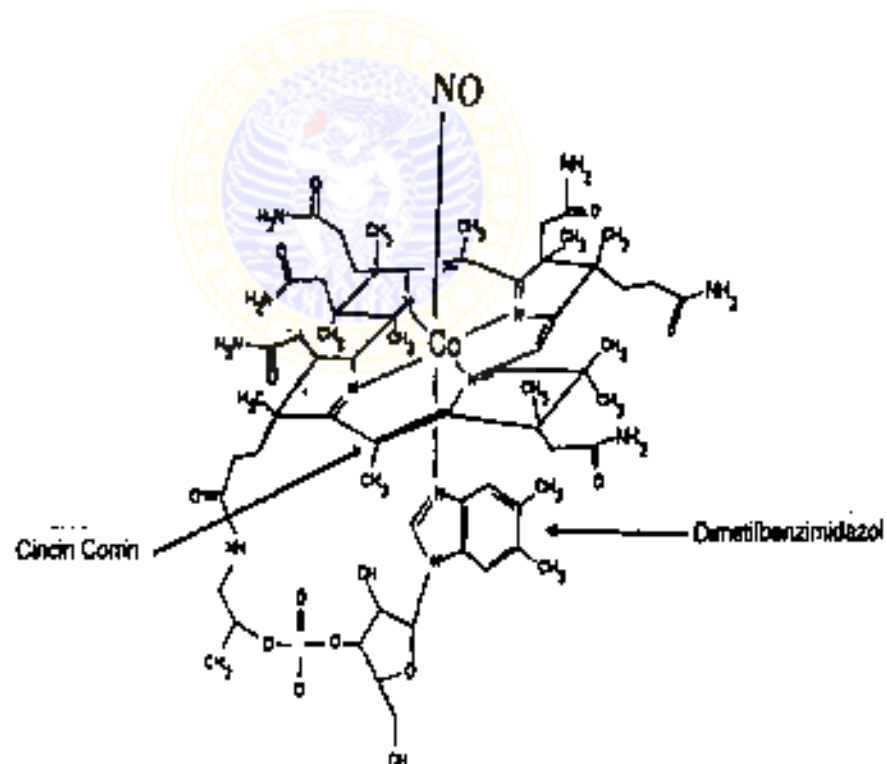


**Gambar 2.11.3 Cincin Corrin dari kobalamin (Beutler *et al.*, 1995)**  
 Disini diperlihatkan penomoran standar dari atom-atomnya.

Radikal NO bereaksi dengan logam yang terdapat di dalam suatu metaloprotein (Bloodsworth *et al.*, 2000) dan dengan Co yang terdapat di dalam vitamin B<sub>12a</sub> (hidroksokobalamin) (Greenberg *et al.*, 1995). Reaksi antara NO<sup>•</sup> dengan hidroksokobalamin menghasilkan senyawa nitrosokobalamin yang stabil (Jenkinson *et al.*, 1994), dan larut dalam air (Greenberg *et al.*, 1995). Dibandingkan dengan besi dari cincin *corrin* heme, kobalt dalam cincin *corrin* kobalamin lebih efektif dalam mengikat NO<sup>•</sup> (Li, 1993).

Bersama dengan kobalt edetat, hidroksokobalamin digunakan sebagai *antidote* pada keracunan sianida. Meskipun kobalt edetat (dosis 10,5 mg/kg BB) memperlihatkan kemampuan sebagai *antidote* keracunan sianida lebih baik dari hidroksokobalamin (dosis 70 mg/kg BB) pada hewan coba anjing, tetapi senyawa ini mempunyai efek samping serius seperti: muntah, syok, dan hipotensi. Sedangkan hidroksokobalamin efektif mengikat sianida untuk membentuk sianokobalamin. Hidroksokobalamin mengikat sianida dengan ratio molar 1 (satu

atom kobalt untuk satu satu molekul sianida), sedangkan kobalt edetat mengikat sianida dengan ratio molar 2 (2 atom kobalt untuk satu molekul sianida) (Riou *et al.*, 1993). Pada penelitian mengenai keracunan sianida akibat terapi dengan nitroprusida, Zerbe (1993) menggunakan 4 g hidroskobalamin untuk menyisihkan 80 mg sianida dari peredaran darah. jadi berarti 2,4 g hidroskobalamin diperlukan untuk menetralkan sianida yang dilepaskan oleh 100 g nitroprusida. Hidroskobalamin tidak stabil, harus disimpan dalam bentuk kering (Zerbe, 1993). Pemberian senyawa hidroskobalamin sebesar 20 mg/kg iv, 30 menit sebelum atau 15 menit sesudah pemberian LPS (0,8 mg/kg iv) menghindarkan hewan coba tikus dari mengalami hipotensi ( Greenberg *et al.* 1995).



Gambar 2.11.4 Nitrosokobalamin (Greenberg *et al.*, 1995)

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Streptozocin (STZ), menembus membran sel memasuki sel  $\beta$  pankreas melalui molekul pangangkut glukosa, *glucose transporter-2* (GLUT-2) (Wang dan Gleichmann, 1998).

Di dalam sitosol sel  $\beta$  pankreas, STZ akan melepaskan nitrogen oksida ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) yang berasal dari gugus nitroso STZ (Lindsay et al, 1995).

$\text{NO}^{\cdot}$  Kemudian akan berikatan dengan super oksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), suatu senyawa yang dihasilkan dalam proses fosforilasi oksidatif sebagai hasil sampingan, membentuk ion peroksinitrit ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) (Suarez-Pinzon et al, 1997)

Senyawa ion peroksinitrit setelah mengikat  $\text{H}^+$  akan membentuk asam peroksinitrit ( $\text{ONOOH}$ ) (Bloodsworth et al, 2000). Asam peroksinitrit selanjutnya akan terurai menjadi radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) dan radikal nitrogen dioksida ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ) (McCafferty, 2000).

Dua molekul  $\text{NO}_2^{\cdot}$  akan menghasilkan dinitrogen tetraoksida  $\text{N}_2\text{O}_4$ :  $\text{NO}_2^{\cdot} + \text{NO}_2^{\cdot} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4$  (Bloodsworth et al, 2000).

Radikal  $\cdot\text{OH}$  adalah suatu senyawa oksigen reaktif (SOR) yang sangat reaktif dan dapat menimbulkan keadaan stres oksidatif. Radikal hidroksil akan menyebabkan fragmentasi DNA dalam inti sel, atau merusak membran sel mitokondria dan menimbulkan kerusakan pada sistem transport elektron (STE). Oksidasi protein sitosol oleh  $\cdot\text{OH}$ , akan mengubah struktur protein, yang akan menghasilkan suatu neoantigen. Protein yang telah berubah tersebut kemudian dipotong menghasilkan neopeptida yang dipresentasikan oleh molekul MHC-I

(*major histocompatibility complex-1*). Gabungan MHC-I dan neuropeptida akan dikenali oleh sel Tsitotoksik.

Fragmentasi DNA menyebabkan aktivasi gen PARP dan menyebabkan ekspresi PARP meningkat serta menyebabkan produksi NAD turun, keadaan ini mengakibatkan produksi ATP menurun maka sel akan mengalami nekrosis (Maurício dan Mandrup Poulsen, 1998).

Kerusakan membran mitokondria dan kerusakan sistem transport elektron akan menyebabkan ATP menurun dan nekrosis sel (Green dan Reed, 1998).

Tc yang mengenali gabungan MHC-I dan neopeptida akan menghasilkan perforin, granzim dan Fas L. Perforin dan Granzim akan menimbulkan kematian sel melalui nekrosis atau lewat apoptosis bila sel sasaran memaparkan Fas melalui pengikatan Fas-Fas L (Zumsteg et al, 2000).

Sel yang mati karena nekrosis akan memicu migrasi dan aktivasi makrofag yang akan menimbulkan insulinitis. Makrofag yang teraktivasi akan mengsekresi sitokin  $IL-1\beta$ ,  $IL-Ny$ , dan  $TNF\alpha$ . Tiga sitokin ini akan ditangkap oleh sel  $\beta$  pankreas yang akan memicu ekspresi enzim *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*) yang selanjutnya akan meningkatkan kadar  $NO^{\cdot}$  dalam sitosol sel  $\beta$  (Zumsteg et al, 2000).

Dampak lain dari makrofag yang teraktivasi oleh tiga sitokin tersebut adalah ekspresi molekul Fas di permukaan sel  $\beta$  pankreas. Produksi  $NO^{\cdot}$  oleh *iNOS* akan menggandakan dampak  $NO^{\cdot}$  dalam memicu nekrosis sel  $\beta$  dan meningkatkan ion nitrit ( $NO_2^-$ ) dan nitrat ( $NO_3^-$ ) yang merupakan hasil oksidasi  $NO^{\cdot}$  (Halliwell dan Guttridge, 1999).

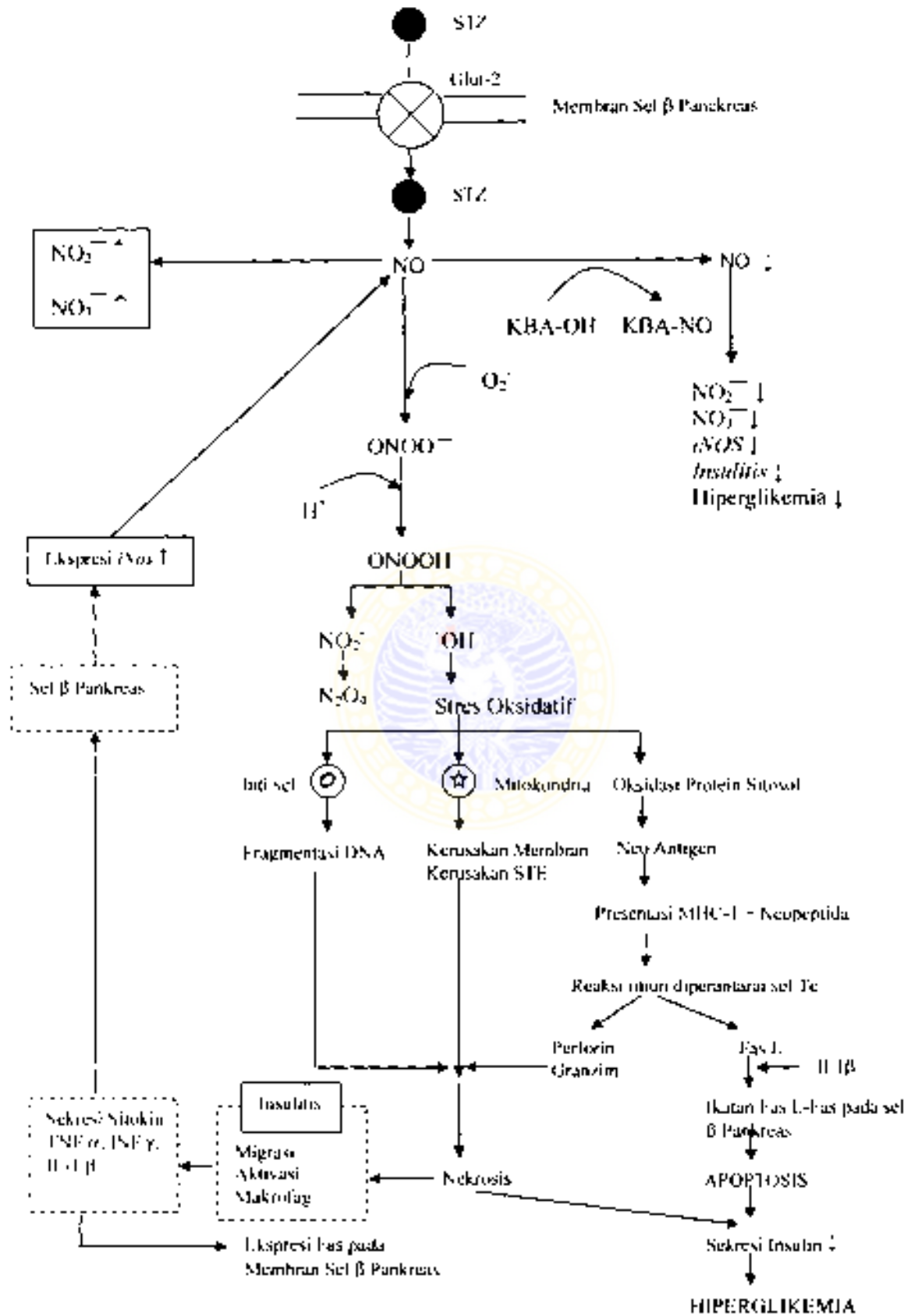


Kematian sel  $\beta$ , baik melalui nekrosis maupun apoptosis mengakibatkan sekresi insulin turun dan terjadi hiperglikemia. Pada tahap awal NO secara langsung dapat mempengaruhi sekresi insulin. Diketahui NO dapat menurunkan produksi ATP melalui nitrosilasi dan inaktivasi enzim yang mengandung gugus Fe-S seperti enzim akunitase (siklus Krebs) dan protein Fe-S yang berperan dalam sistem transport elektron mitokondria (Mauricio dan Mandrup Poulsen, 1998).

NO adalah senyawa yang reaktif sehingga tidak stabil dengan waktu paruh pendek. NO akan teroksidasi menjadi nitrat dan nitrit. Kenaikan kadar NO akan ditandai dengan kenaikan kadar ion nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) dalam plasma.

Hidroksokobalamin (KBA-OH) akan bereaksi dengan NO menghasilkan nitrosokobalamin (KBA-NO), hal ini menyebabkan penurunan kadar NO dalam sitosol. Penurunan NO selanjutnya akan menyebabkan penurunan ekspresi enzim iNOS, penurunan nitrat dan nitrit plasma, dan penurunan insulin, konsekuensinya terjadi perbaikan kadar glukosa darah. Nitrosokobalamin akan di keluarkan melalui urine.

**TIKUS WISTAR MLD-STZ**



**Gambar 3.1.1 Kerangka Konseptual**

**Keterangan Gambar 3.1.1 :**

|        |                                |
|--------|--------------------------------|
| STE    | : Sistem Transport Elektron    |
| STZ    | : Streptozocin                 |
| Glut-2 | : <i>Glucose Transporter-2</i> |
| KBA-OH | : Hidroksokobalamin            |
| KBA-NO | : Nitrosokobalamin             |

Rancangan penelitian ini menggunakan 3 kelompok hewan coba tikus Wistar yaitu:

1) kelompok hewan coba tikus Wistar sehat, 2) kelompok hewan coba tikus Wistar terpapar streptozocin dosis subtoksik, 3) kelompok hewan coba tikus Wistar terpapar streptozocin dosis subtoksik dan menerima hidroksokobalamin.

Kelompok hewan coba yang terpapar streptozocin mengalami stres oksidatif karena streptozocin adalah senyawa penghasil  $\text{NO}^{\cdot}$  dan  $\text{OH}^{\cdot}$  dalam jumlah besar. Stres oksidatif memicu kerusakan sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas diantaranya sel  $\beta$ . Kerusakan sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas akan memicu migrasi makrofag dan limfosit T (utamanya T  $\text{CD4}^{+}$ ) untuk proses fagositosis. Makrofag dalam proses tersebut akan menghasilkan IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ , sitokin-sitokin tersebut memicu ekspresi enzim iNOS—enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan  $\text{NO}$ , sehingga meningkatkan produksi  $\text{NO}$  endogen, yang pada gilirannya memperbanyak jumlah  $\text{NO}$ . Keadaan tersebut menyebabkan stres oksidatif semakin berat sehingga semakin banyak jumlah sel dalam jaringan pulau Langerhans yang rusak. Peningkatan kerusakan sel  $\beta$  dan tingginya jumlah  $\text{NO}^{\cdot}$  memicu gangguan sekresi insulin, sehingga timbul hiperglikemia.

Pada hewan coba tikus Wistar yang terpapar streptozocin dan menerima hidroksokobalamin. Pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroksokobalamin akan menghasilkan nitrosokobalamin yang akan diekskresi melalui urin. Pengikatan  $\text{NO}^{\cdot}$  mengurangi

stres oksidatif pada hewan coba yang terpapar streptozocin, ekspresi *iNOS* berkurang, sehingga produksi NO endogen menurun. Selanjutnya kerusakan sel  $\beta$  berkurang, konsekuensinya tidak terjadi gangguan sekresi insulin, dan tidak timbul hiperglikemia.

### 3.2 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

1. Pengikatan NO oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan pembentukan nitrat dan nitrit pada serum hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
2. Pengikatan NO<sup>•</sup> oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan i ekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus wistar MLD-STZ.
3. Pengikatan NO<sup>•</sup> oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan indeks *isletitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
4. Pengikatan NO<sup>•</sup> oleh hidroskobalamin mencegah peningkatan glukosa darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.

## BAB 4

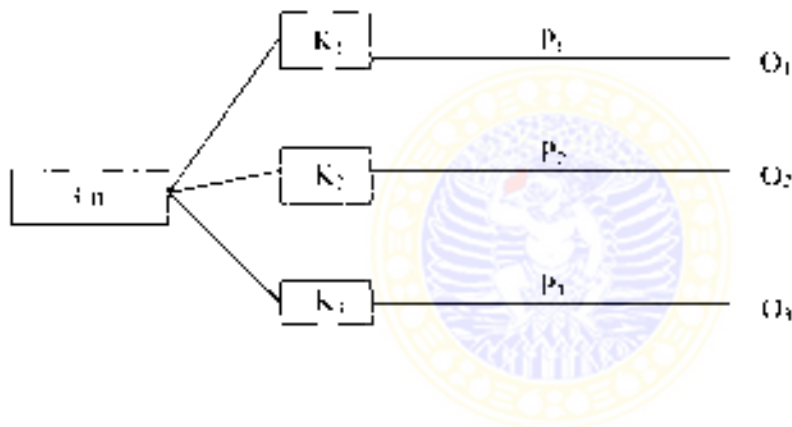
### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode eksperimental laboratorium melalui 2 tahap dengan rancangan acak lengkap.

##### Tahap I

mempelajari dosis streptozocin yang optimal menyebabkan Diabetes MLD-STZ pada hewan coba *Rattus Norvegicus* galur Wistar

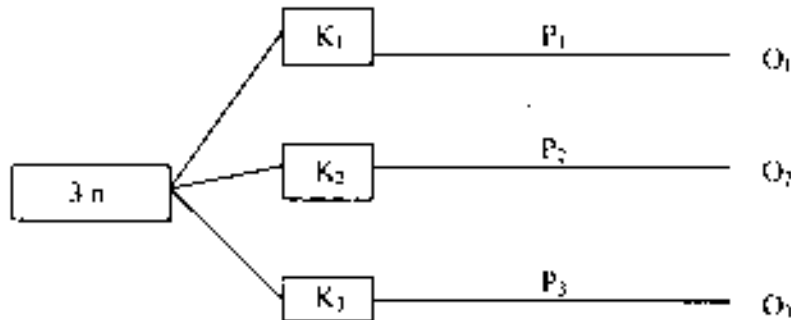


**Gambar 4.1.1 Bagan Rancangan Penelitian tahap I**

- |            |   |
|------------|---|
| K1, K2, K3 | - Kelompok <i>Rattus Norvegicus</i> galur Wistar jantan umur 4 minggu   |
| P1         | - Pemberian streptozocin 15 mg/kg BB/hari selama lima hari secara intraperitoneal.                            |
| P2         | - Pemberian streptozocin 20 mg/kg BB/hari selama lima hari secara intraperitoneal.                            |
| P3         | - Pemberian streptozocin 25 mg/kg BB/hari selama lima hari secara intraperitoneal.                            |
| O1, O2, O3 | - Pemeriksaan glukosuria, glukosa darah dan pemeriksaan indeks insulinitis pada jaringan pankreas hewan coba. |

**Tahap II**

Mempelajari pengaruh hidroskobalamin pada tikus Wistar MLD-STZ.



**Gambar 4.1.2** Bagan rancangan penelitian tahap II

- K 1                   Kelompok tikus kontrol  
 K 2 , K 3       = Kelompok tikus terpapar MLD-STZ (20 mg/kg BB)  
 P1               - Pemberian larutan bufer fosfat .  
 P2               - Pemberian larutan bufer fosfat.  
 P3               - Pemberian hidroskobalamin (20 mg/kg BB).  
 O1, O2, O3   = Pemeriksaan glukosa darah, pemeriksaan kadar nitrit dan nitrat serum, pengamatan indeks *insulinitis* dan enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas.

## 4.2 Unit Eksperimen dan Ulangan

### 4.2.1 Unit eksperimen

Pada penelitian ini sebagai unit eksperimen adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan usia 4 minggu.

### 4.2.2 Ulangan

Banyaknya ulangan ditentukan dengan rumus

$$r \geq \frac{2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 Se^2}{(X_c - X_t)^2}$$

$$\alpha = 5\% \rightarrow Z_{1-\alpha/2} = 1,96$$

$$\beta = 10\% \rightarrow Z_{1-\beta} = 1,28$$

$X_c$  = nilai rata kelompok kontrol

$X_t$  = nilai rata kelompok perlakuan

$Se$  = simpangan baku kelompok kontrol

Menurut penelitian terdahulu (Gerling et al, 1944) mengenai pemeriksaan gula darah tikus Wistar BB, diperoleh data sebagai berikut:

$$X_c = 8,44 \text{ mg/dl}$$

$$X_t = 9,44 \text{ mg/dl}$$

$$Se = 0,56 \text{ mg/dl}$$

Data tersebut dimasukkan dalam rumus maka akan diperoleh harga r.

$$r = \frac{2(1,96 + 1,28)^2 (0,56)^2}{(8,44 - 9,44)^2}$$

$$r \geq 6,5841$$

Dari pembulatan ke atas hasil penghitungan ini diperoleh harga  $r$  sebesar 7. Pada penelitian ini baik tahap I dan tahap II menggunakan besar ulangan 9.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian hidroskobalamin dan streptozocin.

#### 4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah: nitrat dan nitrit serum, indeks *insulitis* dan jumlah sel yang mengekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas, serta kadar glukosa darah.

### 4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah;

1. *insulitis* adalah infiltrasi sel mononuklear (limfosit, monosit, dan makrofag) ke dalam pulau Langerhans dari jaringan pankreas diperiksa secara histologis dengan pewarnaan Hematoxylen-Eosin (HE) (lihat lampiran 6)
2. Derajat *insulitis* adalah tingkat infiltrasi sel mononuklear ke dalam pulau Langerhans dari jaringan pankreas. Skor derajat *insulitis* 0-4. Skor 0, tidak diketemukan lesi; skor 1, terdapat *perinsulitis* tanpa penetrasi pulau Langerhans; skor 2, kurang dari 25% pulau Langerhans diinfiltrasi; skor 3, lebih dari 25%-75% pulau Langerhans diinfiltrasi; skor 4, > 75% atau terjadi degenerasi. Derajat *insulitis* untuk setiap tikus dihitung dengan menjumlahkan semua skor yang diperoleh dari setiap



pulau Langerhans yang diperiksa dibagi dengan jumlah pulau Langerhans yang diperiksa (Rabinovitch et al. 1995).

3. Indeks *insulinitis* adalah nilai yang diperoleh dari membagi derajat *insulinitis* dengan angka 4. Indeks *insulinitis* 0 (nilai terendah) menyatakan tidak terdapat *insulinitis* pada seluruh jaringan pankreas mencit tersebut, sedangkan indeks *insulinitis* 4 (nilai terbesar) menyatakan *insulinitis* atau degenerasi menyeluruh pada pulau - pulau Langerhans pankreas (Gierling et al. 1994).
4. Glukosuria adalah kandungan glukosa dalam urina diukur dengan *test-kit* urisan (lihat lampiran 2).
5. Hiperglikemia adalah kadar gula darah  $> 181$  mmol/l. (Elias. 1996).
6. Kadar glukosa darah adalah kadar glukosa dalam darah yang diukur dengan glukometer digital (*One Touch Lifescan*). (lihat lampiran 4).
7. Ekspresi enzim iNOS jaringan pankreas adalah jumlah sel penghasil iNOS dalam pulau Langerhans yang diukur dengan metode imunohistokimia (lihat lampiran 6)
8. Kadar Ion Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dan Ion Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) adalah kadar ion nitrat dan nitrit diukur menurut metode Griess (lihat lampiran 5).
9. Tikus MLD-STZ adalah hewan coba tikus (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar jantan usia 4 minggu yang diberi dosis subtoksik STZ 20mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut.
10. Injeksi Intraperitoneal adalah metode injeksi jika harus memberikan material injeksi dalam jumlah banyak (lihat lampiran 16).

#### 4.5 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan adalah jaringan pankreas dan serum dari hewan coba tikus, *Rattus Norvegicus* galur Wistar jantan usia 4 minggu yang sehat, dan dari hewan coba tikus Wistar M.D-STZ.

##### 4.5.1 Jaringan pankreas

Bahan penelitian ini dipergunakan untuk mengukur indeks *insulitis* dan ekspresi enzim *INOS*.

##### 4.5.2 Serum darah

Serum darah dipergunakan untuk mengukur kadar nitrit dan nitrat serta kadar gula darah hewan coba.

##### 4.5.3. Urin

Bahan penelitian ini dipergunakan untuk memeriksa adanya glukosuria pada hewan coba.

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian menggunakan sarana yang terdapat di Laboratorium Biomolekuler Universitas Brawijaya Malang. Penelitian berlangsung dari Oktober 2003 sampai Mei 2005.

#### 4.7 Analisis Data

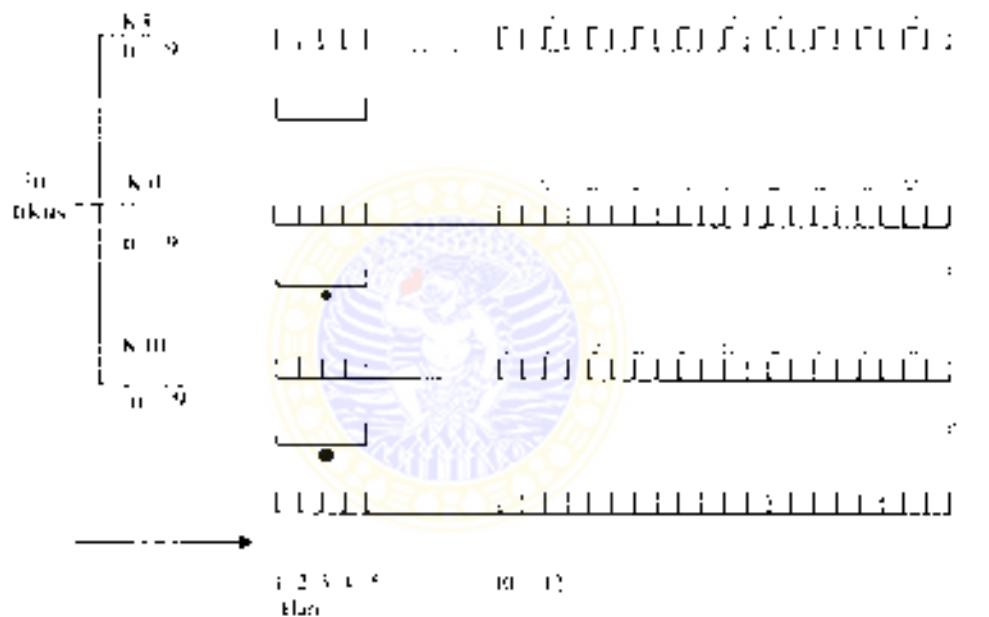
Data yang diperoleh setelah diolah dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada derajat kemaknaan 5%, dilanjutkan dengan *Least significance difference* (LSD) dan *path analysis* (analisis jalur)

### 4.3 Prosedur Penelitian

#### Tahap I

Terdapat 3 dosis subtoksik dari streptozocin yang akan dipelajari kemampuannya dalam menimbulkan diabetes MLD-STZ, yaitu 15mg/kg BB/hari, 20 mg/kg BB hari, dan 25 mg/kg BB/ hari.

Disediakan tiga kelompok tikus galur Wistar jantan usia 4 minggu. Kelompok K1 menerima streptozocin 15 mg/kgBB/hari, Kelompok K2 menerima 20mg/kg BB hari, dan kelompok K3 menerima 25 mg/kgBB/hari.

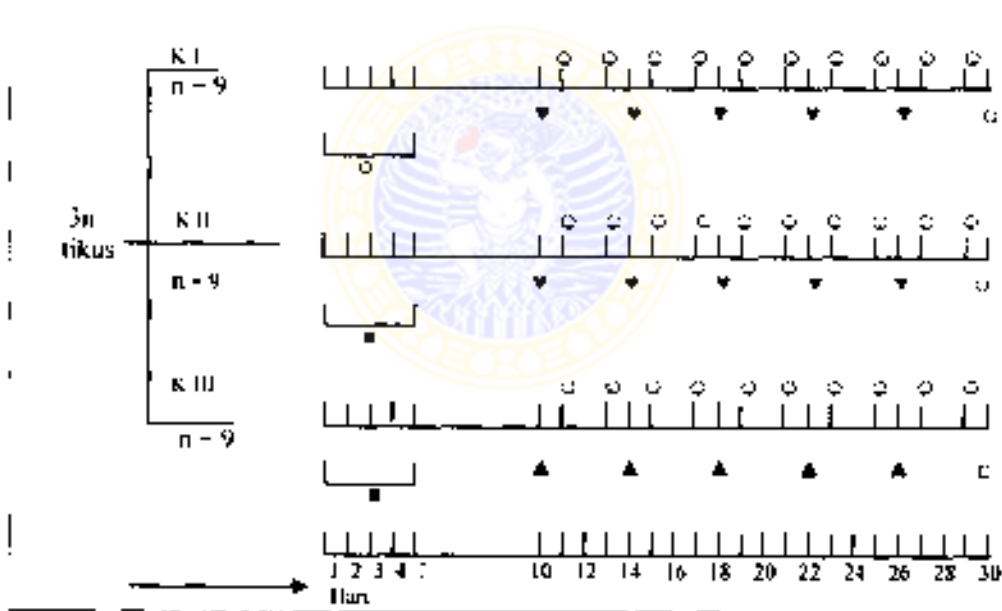


Gambar 4.8.1 Bagan Prosedur Penelitian Tahap I

- Keterangan :**
- Penyuntikan streptozocin intraperitoneal 15 mg/kgBB/hari
  - Penyuntikan streptozocin intraperitoneal 20 mg/kg BB/hari
  - Penyuntikan streptozocin intraperitoneal 25 mg/kgBB/hari
  - | Pemeriksaan glukosuria setiap 2 hari sekali
  - |· Pemeriksaan gula darah, pengambilan jaringan pankreas untuk pemeriksaan indeks insulinitis

### Tabap II

Sampel dibagi 3 kelompok yaitu; KI, KII, dan KIII. KI adalah kelompok tikus sehat, KII adalah kelompok tikus terpapar streptozocin dosis subtoksik tidak menerima hidroskobalamin. KIII adalah kelompok tikus terpapar streptozocin dosis subtoksik yang menerima hidroskobalamin. Selama perlakuan hewan coba mendapat makan minum *ad libitum*. Streptozocin 20 mg/kg BB/hari diberikan setiap hari selama 5 hari secara intraperitoneal pada kelompok KII dan KIII. Selanjutnya KIII menerima hidroskobalamin 20 mg/kg/hr, intramuskuler, yang dimulai pada hari ke 5 pasca penyuntikan STZ terakhir (diberikan sebanyak 5 kali dalam waktu 2 minggu). Untuk KII pada hari ke 5 pasca penyuntikan streptozocin (STZ) terakhir, mulai dilakukan penyuntikan bufer fosfat secara intramuskuler (diberikan sebanyak 5 kali dalam waktu 2 minggu).



Gambar 4. 8.2 Bagan prosedur penelitian tabap II

#### Keterangan :

- Penyuntikan bufer fosfat pro injeksi intra peritoneal.
- Penyuntikan streptozocin intra peritoneal.
- ▼ Penyuntikan bufer fosfat pro injeksi intramuskuler.
- ▲ Penyuntikan hidroskobalamin intramuskuler.
- Pemeriksaan timbulnya glukosuria.
- Sehari setelah timbul glukosuria, dilakukan pengambilan kelenjar pankreas dan darah.

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Bagian ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang berhubungan dengan tujuan dan hipotesis. Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, Grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari dua tahap penelitian, yaitu :

1. Mempelajari dosis streptozocin yang optimal menyebabkan Diabetes MLD-STZ pada hewan coba *Rattus Norvegicus* galur Wistar, yaitu: pembuatan hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, melalui paparan streptozotocin 20 mg/kgBB/hari pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.
2. Mempelajari pengaruh hidroksokobalamin pada tikus Wistar MLD-STZ, yaitu:
  - a. Pengaruh pemberian hidroksokobalamin terhadap kadar gula darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
  - b. Pengaruh pemberian hidroksokobalamin terhadap kadar nitrat dan nitrit serum hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
  - c. Pengaruh pemberian hidroksokobalamin terhadap indeks *insulitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ.
  - d. Pengaruh pemberian hidroksokobalamin terhadap ekspresi enzim *iNOS* oleh sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas

#### 5.1 Penentuan Dosis Streptozocin untuk Membuat Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ

Dalam penelitian ini terdapat 3 macam dosis subtoksik streptozocin yaitu 25 mg/kg BB/hr, 20 mg/kg BB/hr, dan 15 mg/kg BB/hr untuk dipelajari mana dari ketiga dosis tersebut yang paling optimum dalam menghasilkan

diabetes MLD-STZ pada tikus putih galur Wistar jantan. Hewan coba tikus dinyatakan menderita diabetes MLD-STZ (*Multiple Low Dose Streptozocin*)—model DMT 1, jika gula darah > 181 mg/dl (Elias, 1996), dan terdapat *insulinitis* pada jaringan pankreas (Wu, 1995).

Tabel 5.1.1 Kadar Gula Darah Hewan Coba Tikus yang Terpapar Streptozocin

| Dosis          | BB (g) | Pemeriksaan gula darah Mg/dl |
|----------------|--------|------------------------------|
| 25 mg/kg BB/hr | 130    | 425                          |
|                | 130    | 445                          |
|                | 131    | 421                          |
|                | 138    | 475                          |
|                | 136    | 509                          |
|                | 116    | 460                          |
|                | 117    | 500                          |
|                | 139    | 425                          |
|                | 138    | 500                          |
| 20 mg/kg BB/hr | 151    | 405                          |
|                | 156    | 434                          |
|                | 154    | 411                          |
|                | 155    | 451                          |
|                | 155    | 408                          |
|                | 152    | 436                          |
|                | 154    | 440                          |
|                | 151    | 405                          |
|                | 152    | 443                          |
| 15 mg/kg BB/hr | 180    | 160                          |
|                | 180    | 175                          |
|                | 180    | 150                          |
|                | 196    | 170                          |
|                | 170    | 165                          |
|                | 181    | 177                          |
|                | 176    | 134                          |
|                | 190    | 151                          |
|                | 176    | 174                          |

Tabel 5.1.1 menunjukkan kadar gula darah hewan coba tikus yang terpapar streptozocin dosis 25 mg/kg BB, 20 mg/kg BB/hr, atau 15 mg/kg BB secara intraperitoneal, selama lima hari dan terlihat bahwa dosis 25 mg/kg BB/hr dan 20mg/kgBB/hr streptozocin yang diberikan secara intraperitoneal setiap hari

selama 5 hari menimbulkan diabetes pada hewan coba tikus 4 minggu pasca penyuntikan streptozocin terakhir.

Hewan coba yang mendapat dosis 15 mg/kg BB/hr, secara intraperitoneal setiap hari selama 5 hari, sampai dengan 4 minggu pasca penyuntikan streptozocin terakhir belum menunjukkan gejala hiperglikemia.

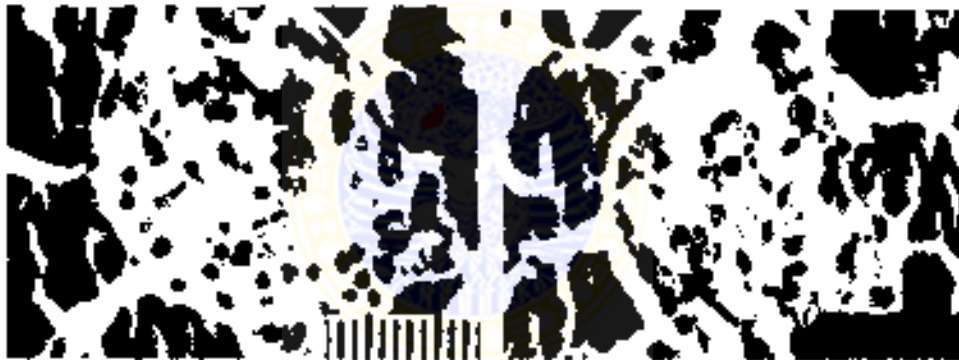
Data dari Tabel 5.1.1 ini ditunjang oleh data dari Tabel 5.1.2 (merupakan hasil pemeriksaan histologi jaringan pankreas) dari hewan coba tersebut.

Tabel 5.1.2 Indeks *Insulinitis* Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Wistar

| Dosis          | Indeks <i>insulinitis</i> |                         |
|----------------|---------------------------|-------------------------|
| 25 mg/kg BB/hr | Nekrosis                  | n=9                     |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
|                | Nekrosis                  |                         |
| 20 mg/kg BB/hr | 0,80                      | n=9<br>$\bar{X} = 0,63$ |
|                | 0,70                      |                         |
|                | 0,65                      |                         |
|                | 0,60                      |                         |
|                | 0,85                      |                         |
|                | 0,72                      |                         |
|                | 0,45                      |                         |
|                | 0,65                      |                         |
|                | 0,55                      |                         |
| 15 mg/kg BB/hr | Negatif                   | n=9                     |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |
|                | Negatif                   |                         |

Tabel 5.1.2 menunjukkan indeks *insulinitis* pulau Langerhans jaringan pankreas tikus yang terpapar streptozocin 25 mg/kg BB/hr, 20 mg/kg BB/hr, atau 15 mg/kg BB/hr secara intraperitoneal selama 5 hari.

Pemeriksaan histologi jaringan pankreas memperlihatkan: 1) dosis streptozocin 25 mg/kgBB/hr menimbulkan nekrosis sel  $\beta$  pada pulau Langerhans jaringan pankreas (Gambar 5. 1. 1), 2) dosis streptozocin 20 mg/kgBB/hr menimbulkan *insulinitis* dalam pulau Langerhans (Gambar 5. 1. 2), sedangkan 3) dosis 15 mg/kgBB/hr sampai dengan minggu ke 4 tidak/belum menyebabkan perubahan pada pulau Langerhans jaringan pankreas (Gambar 5.1.3 ).



**Gambar 5.1.1** Jaringan pankreas tikus yang diberi streptozocin 25 mg/kgBB/hari. Secara intra peritoneal, selama 5 hari. Tampak terjadi nekrosis sel  $\beta$  pulau Langerhans

Keterangan :

Panah Biru (sel  $\beta$  nekrosis), terjadi kondensasi inti dan disagregasi sitoplasma

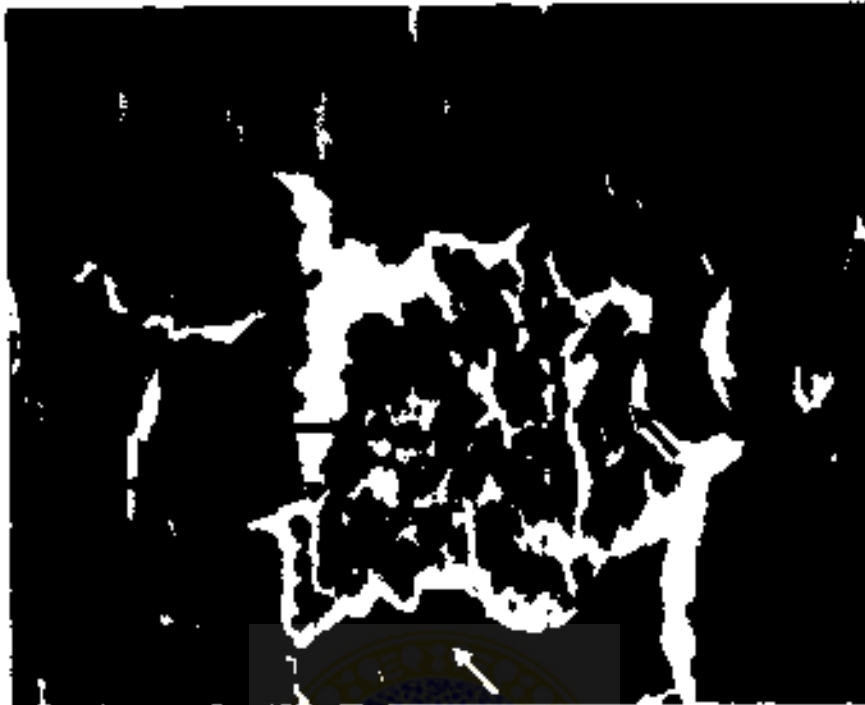
Panah Kuning (Ruang sel yang terjadi akibat terjadi pengurangan masa sel  $\beta$ )

Ruang antar sel lebih luas dibanding ruang antar sel jaringan pankreas dari hewan coba yang menerima dosis 20 mg/kg BB/hr

Pembesaran 200x, 1 bar = 0,01 $\mu$ m

Pewarnaan menggunakan hematoxylen-eosin





**Gambar 5.1.2** Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang diinjeksi STZ dosis 20 mg/kg BB

**Keterangan:**

Menggunakan pewarnaan hematoxylin-eosin

Panah Hijau : Sel beta pankreas, Panah Kuning : Sel acinus pankreas, Panah Biru :

Makrofag yang bermigrasi dalam pulau langerhans (indikasi adanya insulitis),

Panah Merah : Sel nekrosis (Mengalami swelling, dengan inti piknosis)

Perbesaran 200X. 1 bar = 0,01  $\mu$ m

Data yang diperoleh, menunjukkan bahwa dosis optimum streptozocin untuk menghasilkan tikus Wistar MLD-STZ adalah 20 mg/kgBB/hr.



**Gambar 5.1.3** Histologi Pulau Langerhans dan sel beta pancreas tikus yang diinjeksi STZ dosis 15 mg/kg BB

**Keterangan:**

Menggunakan pewarnaan hematoxylen-cosin

Panah hijau: Sel beta pancreas, Panah Kuning; Sel acinus Pancreas, Tidak ditemukan infiltrasi makrofag ( Tidak mengindikasikan adanya insulitis)

Perbesaran 200X. 1 bar = 0.01  $\mu$ m



**Gambar 3.14** Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang diinjeksi STZ 25 mg/kg BB

**Keterangan:**

Menggunakan pewarnaan hematoxylen-eosin

Panah Hijau: Sel beta pankreas, Panah Kuning: Sel acinus pankreas, Panah Biru: Makrofag yang bermigrasi dalam pulau langerhans (indikasi adanya insulinitis dengan kerusakan yang lebih parah dari histology pankreas tikus yang diinjeksi STZ 20 mg/kg BB), Panah Merah: Sel nekrosis (Mengalami swelling, dengan inti piknosis), Panah Hitam: Ruang dalam pulau langerhans yang terbentuk akibat hilangnya massa sel beta pankreas karena nekrosis.

Perbesaran : 200X. 1 bar = 0.01  $\mu$ m



**Gambar 5. 1. 5** Histologi Pulau Langerhans dan sel beta pankreas tikus tanpa injeksi Streptozotocin.

**Keterangan:**

**Panah Hijau:** Sel beta pankreas, **Panah Hitam:** Sel acinus pankreas

**Perbesaran 200X. 1 bar = 0.01 $\mu$ m**

**Menggunakan pewarnaan hematoxylin-eosin**

\*

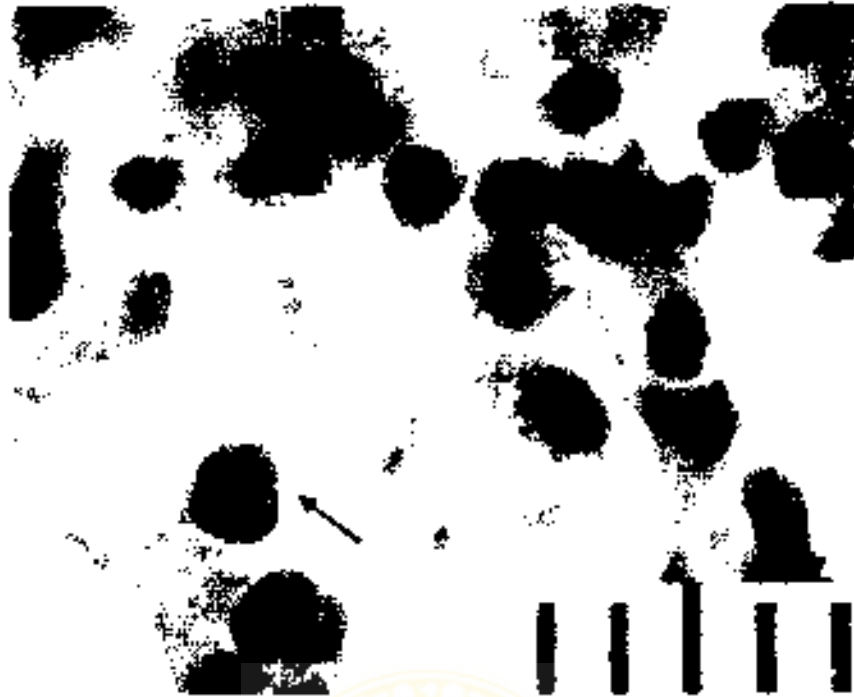


**Gambar 5.1.6** Histologi sel beta pankreas tikus yang diinjeksi Streptozotocin 20 mg/kg BB.

**Keterangan:**

Panah Hijau: Sel beta pankreas, Panah Biru : Makrofag (ukuran inti dan sel lebih besar daripada sel beta pankreas). Infiltrasi makrofag mengindikasikan adanya insulitis

Perbesaran 400X. 1 bar = 0.01µm



**Gambar 5.1.7** Histologi sel beta pancreas hewan coba tikus yang diinjeksi Streptozotocin 15 mg/kg BB.

Keterangan:

Panah Hijau: Sel beta pancreas. Tidak ditemukan adanya makrofag (Tidak terjadi insulitis)

Perbesaran 400X. 1 bar = 0,01 mm

## 5.2 Pengaruh Hidroksokobalamin pada Kadar Glukosa Darah Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ

Setelah tikus menerima streptozocin secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kg BB/hr setiap hari selama 5 hari, hewan coba tersebut akan menderita diabetes dalam waktu 4 minggu setelah pemberian streptozocin yang terakhir. Data dari Tabel 5.2.1 memperlihatkan bahwa pemberian hidroksokobalamin 20 mg/kgBB/hr sebanyak 5 kali (pemberian pertama dilaksanakan 5 hari pasca penyuntikan streptozocin terakhir) yang diberikan dalam waktu 4 minggu, menyebabkan kadar glukosa darah hewan coba tikus Wistar yang menerima streptozocin dosis subtoksik menjadi lebih rendah dibandingkan dengan kadar gula darah hewan coba yang sama tetapi tidak menerima hidroksokobalamin.

Tabel 5.2.1 Kadar Glukosa Darah Hewan Coba Tikus Wistar

| Tikus No | Kadar glukosa darah mg/dl |                    |  |
|----------|---------------------------|--------------------|--|
|          | Kontrol                   | STZ 20 mg/kg BB/hr | STZ 20 mg/kg BB/hr dilanjutkan hidroksokobalamin |
| 1        | 107                       | 410                | 115  |
| 2        | 93                        | 430                | 120  |
| 3        | 131                       | 425                | 108  |
| 4        | 112                       | 475                | 123  |
| 5        | 130                       | 450                | 127  |
| 6        | 116                       | 430                | 130  |
| 7        | 96                        | 470                | 115  |
| 8        | 100                       | 405                | 110  |
| 9        | 107                       | 455                | 120  |
|          | $\bar{X} = 110,22$        | $\bar{X} = 438,89$ | $\bar{X} = 118,67$                               |

Tabel 5.2.1 menunjukkan kadar glukosa darah hewan coba tikus wistar yaitu : 1) yang mendapat streptozocin 20 mg/kgBB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari. 2) kelompok kontrol, 3) yang mendapat streptozocin 20 mg/kgBB/hr

intrapitoneal selama 5 hari, diteruskan dengan pemberian hidrosokobalamin 20 mg/kgBB/hr, dimulai pada hari ke 5 pasca pemberian streptozocin terakhir

Tabel 5.2.2 Hasil Analisis Variansi Kadar Glukosa Darah antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan   | Mean   | SD    | Min | Maks | Anova                     |
|----------------------|--------|-------|-----|------|---------------------------|
| Kontrol              | 110,22 | 13,62 | 93  | 131  | F = 1097,624<br>p = 0,000 |
| STZ 20 mg/kg BB/hr   | 438,89 | 24,97 | 405 | 475  |                           |
| STZ-Hidrosokobalamin | 118,67 | 7,38  | 108 | 130  |                           |

Selanjutnya hasil analisis variansi pada Tabel 5.2.2 menunjukkan nilai  $F = 1097.624$  dengan  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ). Artinya paling tidak terdapat sepasang kelompok perlakuan yang memiliki kadar glukosa darah yang berbeda.

Untuk mengetahui pasangan kelompok yang memiliki perbedaan kadar glukosa darah, dilakukan analisis perbandingan ganda (LSD). Dari hasil analisis tersebut ditemukan terdapatnya perbedaan kadar glukosa darah; 1) antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dengan kelompok hewan coba kontrol ( $d = 328.67$ ,  $p = 0,000$ ), 2) antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidrosokobalamin dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin saja ( $d = 320.22$  dan  $p = 0,000$ ). Sementara itu tidak ada perbedaan kadar glukosa darah antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidrosokobalamin dengan kelompok hewan coba kontrol ( $d = 8,44$  dan  $p = 0,3021$ ).



Tabel 5.2.3 Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Kadar Glukosa Darah antar Kelompok Kelakuan

| Kelompok perlakuan      | Kelompok Perlakuan      |                          |                         |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                         | Kontrol                 | STZ 20 mg/kg BB/hr       | STZ + Hidroksokobalamin |
| Kontrol                 | -                       | d = -328,67<br>p = 0,000 | d = -8,44<br>p = 0,302  |
| STZ 20 mg/kg BB/hr      | d = 328,67<br>p = 0,000 | -                        | d = 320,22<br>p = 0,000 |
| STZ + Hidroksokobalamin | d = 8,44<br>p = 0,302   | d = -320,22<br>p = 0,000 | -                       |

### 5.3 Pengaruh Pemberian Hidroksokobalamin Terhadap Kadar Nitrat dan Nitrit Serum dari Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ

Radikal NO<sup>•</sup> pada penelitian ini dipantau melalui kadar nitrat dan nitrit serum hewan coba. Pemberian hidroksokobalamin menghasilkan penurunan kadar nitrat dan nitrit serum hewan coba tikus (data dari Tabel 5.3.1).

Tabel 5.3.1 Kadar Nitrat dan Nitrit pada Hewan Coba Tikus Wistar

| Tikus No | Menerima streptozocin    |                        |                         |                        | Kontrol                |                        |
|----------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|          | Diberi Hidroksokobalamin |                        | Tanpa Hidroksokobalamin |                        | Nitrit $\mu\text{m/L}$ | Nitrat $\mu\text{m/L}$ |
|          | Nitrit $\mu\text{m/L}$   | Nitrat $\mu\text{m/L}$ | Nitrit $\mu\text{m/L}$  | Nitrat $\mu\text{m/L}$ |                        |                        |
| 1        | 15,954                   | 13,535                 | 92,762                  | 44,162                 | 5,940                  | 8,036                  |
| 2        | 6,969                    | 3,679                  | 76,338                  | 43,887                 | 14,860                 | 14,084                 |
| 3        | 4,800                    | 8,944                  | 78,931                  | 52,324                 | 15,840                 | 15,096                 |
| 4        | 6,644                    | 14,324                 | 77,429                  | 47,005                 | 9,900                  | 11,060                 |
| 5        | 10,571                   | 10,155                 | 92,659                  | 48,809                 | 10,880                 | 13,072                 |
| 6        | 10,562                   | 5,708                  | 79,089                  | 44,559                 | 12,860                 | 13,084                 |
| 7        | 5,747                    | 11,303                 | 84,430                  | 50,667                 | 7,920                  | 8,048                  |
| 8        | 12,314                   | 8,644                  | 80,924                  | 43,915                 | 12,880                 | 12,072                 |
| 9        | 9,664                    | 10,148                 | 81,555                  | 45,791                 | 13,860                 | 12,084                 |
|          | $\bar{x} = 9,2472$       | $\bar{x} = 9,604$      | $\bar{x} = 82,679$      | $\bar{x} = 46,792$     | $\bar{x} = 11,66$      | $\bar{x} = 11,848$     |

Tabel 5.3.1 menunjukkan kadar nitrat dan nitrit pada hewan coba tikus wistar yaitu : 1) kelompok kontrol, 2) kelompok hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20mg/kgBB/hr, secara intraperitoneal, selama 5 hari, 3) kelompok hewan coba tikus yang menerima streptozocin, secara intraperitoneal, selama 5 hari, diteruskan dengan pemberian hidrosokobalamin pada hari ke 5 pasca pemberian streptozocin terakhir, sebanyak 5 kali pemberian secara intramuskuler, dalam waktu 4 minggu

Tabel 5.3.2 Hasil Analisis Variansi Kadar Nitrit antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan   | Mean  | SD   | Min   | Maks  | Anova                  |
|----------------------|-------|------|-------|-------|------------------------|
| Kontrol              | 11,66 | 3,28 | 5,94  | 15,84 | F= 765,113<br>p= 0,000 |
| STZ 20 mg/kg BB/hr   | 82,86 | 6,16 | 76,34 | 92,76 |                        |
| STZ-Hidrosokobalamin | 9,25  | 3,57 | 4,80  | 15,95 |                        |

Hasil analisis variansi terhadap kadar nitrit antar kelompok perlakuan (Tabel 5.3.2) diperoleh nilai  $F = 765.113$  dengan  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), sehingga disimpulkan paling tidak terdapat sepasang kelompok perlakuan yang memiliki kadar nitrit serum yang berbeda.

Tabel 5.3.3 Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Kadar Nitrit antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok Perlakuan     | Kelompok Perlakuan     |                         |                        |
|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
|                        | Kontrol                | STZ 20 mg/kg BB-hr      | STZ + Hidrosokobalamin |
| Kontrol                | -                      | d = -71,02<br>p = 0,000 | d = 2,41<br>p = 0,269  |
| STZ 20 mg/kg BB-hr     | d = 71,02<br>p = 0,000 | -                       | d = 73,43<br>p = 0,000 |
| STZ + Hidrosokobalamin | d = -2,41<br>p = 0,269 | d = -73,43<br>p = 0,000 | -                      |

Selanjutnya hasil analisis perbandingan ganda antar kelompok perlakuan (tabel 5.3.3) memperlihatkan adanya perbedaan kadar nitrit serum hewan coba.

yaitu; 1) antara kelompok hewan coba kontrol dengan kelompok hewan coba yang terpapar streptozocin 20mg/kgBB/hari ( $d = 71,02$  dengan  $p = 0,000$ ). 2) antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin dosis yang sama tetapi menerima hidroskobalamin ( $d = 73,43$  dengan  $p = 0,000$ ). Sedangkan kadar nitrit serum antara kelompok hewan coba kontrol dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dan menerima hidroskobalamin tidak berbeda ( $d = 2,41$  dengan  $p = 0,269$ ).

Tabel 5.3.4 Hasil Analisis Variansi Kadar Nitrat antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan  | Mean  | SD   | Min   | Maks  | Anova                    |
|---------------------|-------|------|-------|-------|--------------------------|
| Kontrol             | 11,85 | 2,46 | 8,04  | 15,10 | F = 425,963<br>p = 0,000 |
| STZ 20 mg/kg BB/hr  | 46,79 | 3,15 | 43,89 | 52,32 |                          |
| STZ+Hidroskobalamin | 9,60  | 3,41 | 3,68  | 14,32 |                          |

Hasil analisis variansi kadar nitrat serum antar kelompok perlakuan (Tabel 5.3.4) memperlihatkan paling tidak terdapat sepasang kelompok perlakuan yang memiliki kadar nitrat serum yang berbeda ( $F = 425,963$ ,  $p = 0,000$ ).

Selanjutnya hasil analisis perbandingan ganda kadar nitrat serum antar kelompok perlakuan (Tabel 5.3.5), memperlihatkan tidak terdapat perbedaan kadar nitrat serum antara kelompok hewan coba kontrol dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dan menerima hidroskobalamin ( $d = 2,24$  dengan  $p = 0,129$ ).

Tabel 5.3.5 Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Kadar Nitrat antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan        | Kelompok Perlakuan     |                         |                           |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                           | Kontrol                | STZ 20 mg/kg BB/hr      | STZ+<br>Hidroksokobalamin |
| Kontrol                   |                        | d = -34,94<br>p = 0,000 | d = 2,24<br>p = 0,129     |
| STZ 20 mg/kg<br>BB/hr     | d = 34,94<br>p = 0,000 |                         | d = 37,19<br>p = 0,000    |
| STZ+<br>Hidroksokobalamin | d = -2,24<br>p = 0,129 | d = -37,19<br>p = 0,000 |                           |

Tabel 5.3.5 tersebut terlihat adanya perbedaan kadar nitrat serum: 1) antara kelompok hewan coba kontrol dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr (d = 34,94 dengan p = 0,000). 2) antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hr dan menerima hidroksokobalamin (d = 37,19 dengan p = 0,000).

#### 5.4 Indeks *insulinitis* pada Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ

Indeks *insulinitis* berkisar antara 0 (nilai terendah) sampai dengan 1 (nilai terbesar) (Gerling et al. 1994). Nilai 0 menyatakan bahwa pada seluruh jaringan pankreas tidak terdapat *insulinitis*. Tabel 5.4.1 memperlihatkan bahwa hidroksokobalamin menurunkan nilai indeks *insulinitis* ( yang berarti menghambat timbulnya *insulinitis* ) pada hewan coba tikus wistar jantan yang menerima streptozocin dosis subtoksik (20 mg/kg BB/hr setiap hari selama 5 hari, secara intraperitoneal).

Tabel 5.4.1 Indeks *Insulinitis* Hewan Coba Tikus Wistar

| Tikus No | Indeks <i>insulinitis</i> |                   |   |
|----------|---------------------------|-------------------|---|
|          | Kontrol                   | streptozocin      | streptozocin diteruskan hidroskobalamin |
| 1        | 0                         | 0,80              | 0,50                                    |
| 2        | 0                         | 0,70              | 0,40                                    |
| 3        | 0                         | 0,65              | 0,45                                    |
| 4        | 0                         | 0,70              | 0,35                                    |
| 5        | 0                         | 0,85              | 0,60                                    |
| 6        | 0                         | 0,75              | 0,35                                    |
| 7        | 0                         | 0,75              | 0,45                                    |
| 8        | 0                         | 0,65              | 0,45                                    |
| 9        | 0                         | 0,80              | 0,50                                    |
|          |                           | $\bar{x} = 0,738$ | $\bar{x} = 0,45$                        |

Tabel 5.4.1 menunjukkan indeks *insulinitis* hewan coba tikus yang: 1) menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari; 2) hewan coba tikus kontrol; 3) hewan coba tikus menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, intraperitoneal, dalam 5 hari, diteruskan dengan pemberian hidroskobalamin 20 mg/kg BB/hr 5 hari pasca penyuntikan streptozocin terakhir, dilaksanakan secara intramuskuler, sebanyak 5 kali pemberian dalam 4 minggu

Hasil analisis variansi antar kelompok perlakuan ( kelompok kontrol, kelompok terpapar streptozocin, dan kelompok terpapar streptozocin dan menerima hidroskobalamin) (Tabel 5.4.2), memperlihatkan paling tidak terdapat sepasang perlakuan yang memiliki perbedaan dalam nilai indeks *insulinitis* ( $F = 336,925$  dengan  $p = 0,000$  ).

Tabel 5.4.2 Hasil Analisis Variansi Indeks *Insulinitis* antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan  | Mean  | SD    | Min  | Maks | Anova                    |
|---------------------|-------|-------|------|------|--------------------------|
| Kontrol             | 0     | 0     | 0    | 0    | F = 336,925<br>p = 0,000 |
| STZ 20 mg/kg BB/hr  | 0,739 | 0,070 | 0,65 | 0,85 |                          |
| STZ+Hidroskobalamin | 0,45  | 0,079 | 0,35 | 0,60 |                          |

Selanjutnya hasil analisis perbandingan ganda antar kelompok-kelompok tersebut (Tabel 5.4.3) memperlihatkan hal sebagai berikut; 1) terdapat perbedaan indeks *insulitis* antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dengan hewan coba kelompok kontrol ( $d = 0,739$  dengan  $p = 0,000$ ). 2) perbedaan indeks *insulitis* tersebut juga terdapat antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidraksokobalamin ( $d = 0,289$  dengan  $p = 0,000$ ). 3) terdapat perbedaan indeks *insulitis* antara hewan coba kelompok kontrol dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidraksokobalamin ( $d = 0,45$  dengan  $p = 0,000$ ).

Tabel 5.4.3 Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Indeks *Insulitis* antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok Perlakuan        | Kelompok Perlakuan |                     |                           |
|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
|                           | Kontrol            | STZ 20 mg/kg BB/hr  | STZ+<br>Hidraksokobalamin |
| Kontrol                   | -                  | -0,739<br>p = 0,000 | -0,45<br>p = 0,000        |
| STZ 20 mg/kg BB/hr        | 0,739<br>p = 0,000 | -                   | 0,289<br>p = 0,000        |
| STZ+<br>Hidraksokobalamin | 0,45<br>p = 0,000  | 0,289<br>p = 0,000  | -                         |

### 5.5 Ekspresi Enzim *iNOS* pada Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ

Ekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas, oleh sel yang dapat mengekspresi enzim ini, salah satunya dipicu oleh reaksi imunologi. Tabel 5.5.1 memperlihatkan bahwa ekspresi enzim tersebut dihambat oleh hidraksokobalamin, yang ditunjukkan dengan berkurangnya jumlah sel yang mengekspresi enzim ini dalam pulau Langerhans jaringan pankreas.

Tabel 5.5.1 Jumlah Sel Penghasil *iNOS* dalam Pulau Langerhans Jaringan Pankreas

| Tikus No | Jumlah sel penghasil <i>iNOS</i> |                       |   |
|----------|----------------------------------|-----------------------|---|
|          | Kontrol                          | Menerima streptozocin | Menerima streptozocin diteruskan dengan hidroskobalamin |
| 1        | 3                                | 25                    | 8   |
| 2        | 7                                | 26                    | 14  |
| 3        | 8                                | 25                    | 7   |
| 4        | 5                                | 23                    | 9   |
| 5        | 6                                | 28                    | 8   |
| 6        | 7                                | 25                    | 10  |
| 7        | 4                                | 24                    | 8   |
| 8        | 6                                | 26                    | 8   |
| 9        | 7                                | 27                    | 13  |
|          | $\bar{x} = 5,89$                 | $\bar{x} = 25,44$     | $\bar{x} = 9,44$  |

Tabel 5.5.1 menunjukkan jumlah sel penghasil *iNOS* : 1) hewan coba tikus kelompok kontrol; 2) hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari; 3) hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, intraperitoneal, selama 5 hari diteruskan dengan pemberian hidroskobalamin 20mg/kgBB/hr pada hari ke 5 pasca pemberian streptozocin terakhir. Hidroskobalamin diberikan secara intramuskuler, sebanyak lima kali dalam 4 minggu

Tabel 5.5.2 Hasil Analisis Variansi Jumlah Sel Penghasil Enzim *iNOS* antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan  | Mean  | SD   | Min | Maks | Anova                    |
|---------------------|-------|------|-----|------|--------------------------|
| Kontrol             | 5,89  | 1,62 | 3   | 8    | F = 268,377<br>p = 0,000 |
| STZ 20 mg/kg BB/hr  | 25,44 | 1,51 | 23  | 28   |                          |
| STZ+Hidroskobalamin | 9,44  | 2,46 | 7   | 14   |                          |

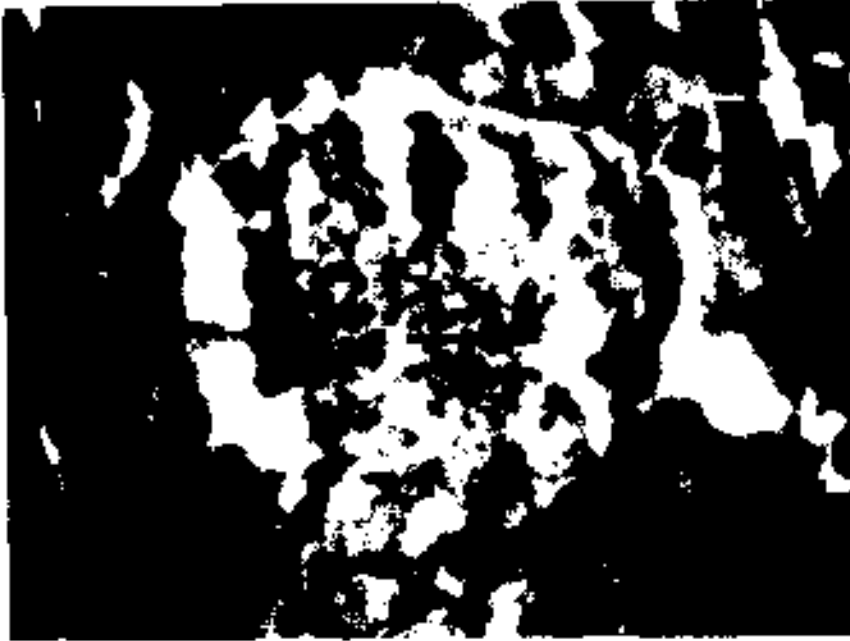
Analisis variansi jumlah sel penghasil *iNOS* antar kelompok perlakuan (tabel 5.5.2), memperhatikan paling sedikit terdapat sepasang kelompok perlakuan yang mempunyai perbedaan pada jumlah sel penghasil enzim *iNOS* ( $F = 268,377$  dengan  $p = 0,000$ ).

Analisis perbandingan ganda terhadap jumlah sel penghasil *iNOS* antar kelompok perlakuan (Tabel 5.5.3), diperoleh hasil sebagai berikut: 1) terdapat perbedaan jumlah sel penghasil *iNOS* antara kelompok hewan coba kontrol dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin 20 mg/kgBB/hari ( $d = 19,56$  dengan  $p = 0,000$ ). 2) terdapat perbedaan jumlah sel penghasil *iNOS* antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dengan kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidroskobalamin ( $d = 16,00$  dengan  $p = 0,000$ ). Sementara itu ada perbedaan jumlah sel penghasil *iNOS* antara kelompok hewan coba terpapar streptozocin dan menerima hidroskobalamin dengan kelompok hewan coba kontrol ( $d = 3,56$  dengan  $p = 0,001$ ).

Tabel 5.5.3 Hasil Analisis Perbandingan Ganda (LSD) Jumlah Sel Penghasil *iNOS* antar Kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan    | Kelompok Perlakuan   |                       |                       |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                       | Kontrol              | STZ 20 mg/kg BB/hr    | STZ - Hidroskobalamin |
| Kontrol               | -                    | -19,56<br>$p = 0,000$ | -3,56<br>$p = 0,001$  |
| STZ 20 mg/kg BB/hr    | 19,56<br>$p = 0,000$ | -                     | 16,00<br>$p = 0,000$  |
| STZ - Hidroskobalamin | 3,56<br>$p = 0,001$  | -16,00<br>$p = 0,000$ | -                     |

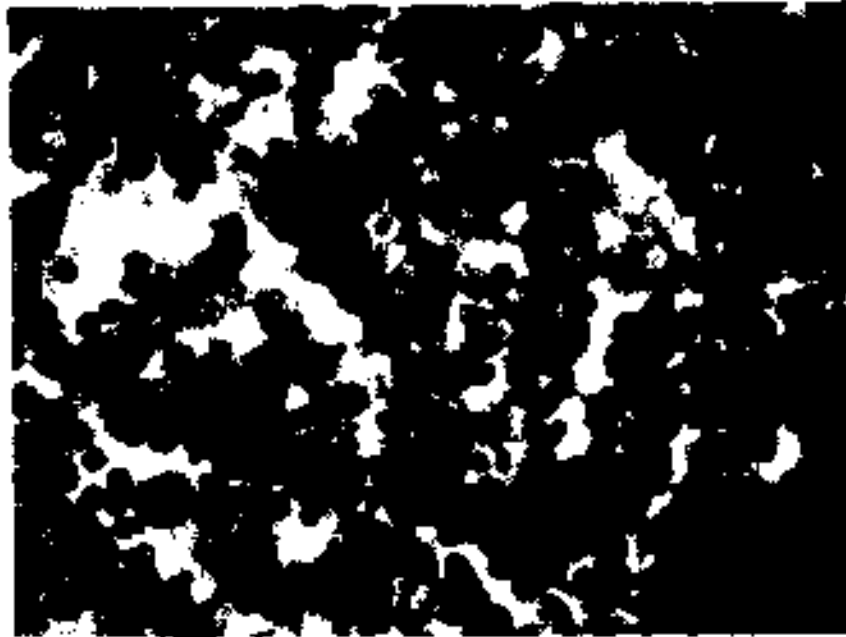




**Gambar 5.5.1** Immunohistokimia menggunakan anti iNOS dari Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang diinjeksi dengan MLD-STZ

**Keterangan:**

**Panah Hijau :** Sel beta pankreas yang mengekspresikan iNOS (tampak warna coklat pada sitoplasma sel), **Panah Kuning :** Sel acinus pankreas yang mengekspresikan iNOS, **Panah Biru :** Makrofag yang mengekspresikan iNOS. Perbesaran 200X. 1 bar =0.01 $\mu$ m.



**Gambar 5.5.2** Imunohistokimia menggunakan anti iNOS dari Histologi pulau langerhans dan sel beta pankreas tikus yang diinjeksi dengan MLD-STZ

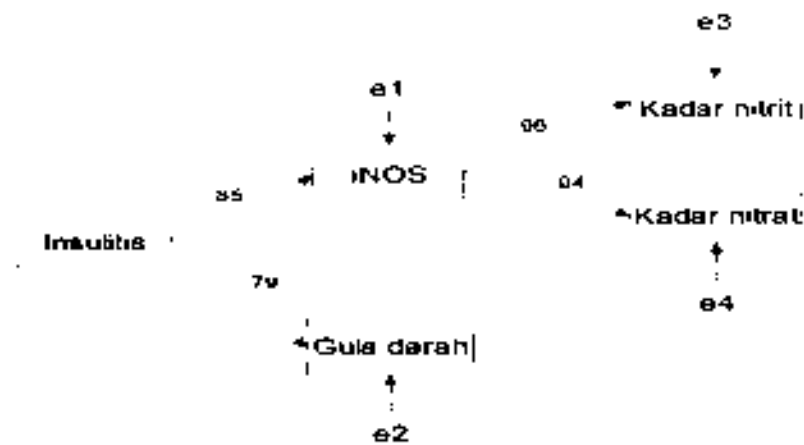
Keterangan:

Panah Hijau: Sel beta pankreas, Panah Biru: Makrofag yang mengekspresikan iNOS (terwarnai coklat), Panah Merah: Sel beta pankreas dan sekitarnya yang mengekspresikan iNOS.

Perbesaran:200X. 1 bar = 0.01  $\mu$ m

#### **5.6 Hubungan antar Variabel Penelitian**

Sesuai dengan kerangka konsep maka dilakukan analisis jalur terhadap variabel yang di gambarkan sebagai berikut :



Gambar 5.6.1 Diagram jalur pengaruh satu variabel terhadap variabel yang lain

Dari hasil diagram jalur tersebut  $p = 0.000 < \alpha = 0.05$ , maka :

1. Ada pengaruh antara indeks insulinitis terhadap produksi iNOS, dengan pengaruh sebesar 85%
2. Ada pengaruh antara indeks insulinitis terhadap kadar gula darah, dengan pengaruh sebesar 79%
3. Ada pengaruh antara produksi iNOS terhadap kadar nitrit, dengan pengaruh sebesar 96%
4. Ada pengaruh antara produksi iNOS terhadap kadar nitrat, dengan pengaruh sebesar 94%

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian yang hasil dan analisisnya disampaikan pada Bab 5. Pada bab pembahasan ini dibahas secara berurutan berdasarkan tahapan hasil penelitian. Diawali dari pembuatan hewan coba tikus MLD-STZ—model DMF 1, melalui paparan streptozocin dosis subtoksik pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Selanjutnya pembahasan mengenai pengaruh hidroksokobalamin terhadap kadar gula darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, diteruskan dengan pembahasan mengenai pengaruh pemberian hidroksokobalamin terhadap kadar nitrit dan nitrat serum dari hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, kemudian dilanjutkan dengan pembahasan mengenai pengaruh pemberian hidroksokobalamin pada ekspresi enzim *iNOS* oleh sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ, dan akhirnya pembahasan mengenai indeks *insulinitis* pada hewan coba tersebut.

Streptozocin adalah toksin spesifik bagi sel  $\beta$  pankreas, dan merupakan senyawa N-Nitroso karenanya adalah sumber radikal NO dan OH dalam jumlah besar. NO dan OH merupakan spesies oksigen aktif sekaligus radikal bebas, yang dalam jumlah berlebihan dua jenis radikal ini menimbulkan stres oksidatif pada hewan coba. NO yang berlebihan akan bereaksi dengan superoksida ( $O_2^-$ ) membentuk senyawa asam peroksinitrit (HONOO) yang sangat toksik bagi sel (Gambar 2.4.3 ). Stres oksidatif karena pemberian streptozocin menyebabkan kerusakan sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba. Kerusakan tersebut mengaktifasi sel-sel mononuklear (makrofag, limfosit dan monosit) untuk bermigrasi menuju pulau Langerhans

guna proses fagositosis sel yang rusak. Proses fagositosis memicu makrofag untuk menghasilkan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dan IL-1, sitokin-sitokin proinflamasi yang memicu ekspresi enzim *iNOS* oleh sel dalam jaringan pulau Langerhans, diantaranya sel  $\beta$ . Terdapatnya sel mononuklear dalam pulau Langerhans jaringan pankreas disebut sebagai *insulitis*.

Sejumlah strategi telah dilakukan untuk mencegah kerusakan sel  $\beta$ , misalnya dengan penggunaan obat – obatan golongan imunosupresif, namun demikian manfaat obat – obat tersebut berlangsung sebentar, penggunaan dalam jangka lama bersifat toksik. Diyakini bahwa pengaruh senyawa imunosupresif adalah menekan proliferasi dan migrasi limfosit menuju jaringan sasaran.

Sangatlah menarik untuk berusaha mencegah patogenesis penyakit ini, yaitu sebelum terjadi kerusakan signifikan yang dapat menimbulkan penyakit.

#### **6.1 Hewan Coba Tikus Wistar MLD-STZ (*Multiple Low Doses Streptozocin*)**

Pemberian streptozocin dosis subtoksik 20 mg/kgBB/hari, selama 5 hari secara intraperitoneal menyebabkan kerusakan sel dari pulau Langerhans jaringan pankreas, di antaranya sel  $\beta$ . Kerusakan sel tersebut menyebabkan migrasi sel mononuklear (makrofag, limfosit, dan monosit) ke dalam pulau Langerhans untuk proses fagositosis sel yang rusak tersebut. Dalam proses ini makrofag akan mengeluarkan NO<sup>-</sup> dan sitokin proinflamasi ( IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1). Sitokin tersebut memicu ekspresi enzim *iNOS* yang mengkatalisis reaksi pembuatan NO<sup>-</sup> oleh sel dalam pulau Langerhans diantaranya oleh sel  $\beta$ . Keadaan tersebut menyebabkan jumlah NO<sup>-</sup> semakin meningkat, karenanya jumlah sel  $\beta$  yang rusak juga meningkat.

Kejadian DM1 pada manusia memerlukan predisposisi genetik, dan agar timbul gejala penyakit diperlukan faktor pemicu. Faktor pemicu tersebut antara lain lingkungan, misalnya mikroorganisme dan kemotoksin. Faktor genetik untuk DM1 pada populasi di Indonesia dibawa oleh HLA-DR3 dan HLA-DR9 (Yudajana, 1993). Faktor-faktor tersebut akan membangkitkan reaksi radang pada kelenjar pankreas (*insulinitis*). Tahapan berikutnya terjadi perubahan pada sel  $\beta$  jaringan pankreas, sehingga yang tadinya dikenali sebagai *self* akan dikenali sebagai *non self*, akibatnya terjadi respon imun terhadap sel  $\beta$ . Proses ini terjadi pada individu yang mengekspresi salah satu dari HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR3/4, dan HLA-DR9. Pada individu ini, infeksi atau pengaruh eksternal lain memicu terjadinya *molecular mimicry*—suatu keadaan dimana terjadi gangguan pada *self tolerance*. Disimpulkan beberapa mekanisme yang mendasari proses patologi yang menyebabkan gangguan fungsi dan kematian sel  $\beta$  pada DM1 adalah: 1) interaksi sel  $\beta$  dengan limfosit T<sub>c</sub> (*cytotoxic*) melalui molekul MHC I, 2) induksi ekspresi enzim iNOS—enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan NO, 3) aktivasi program apoptosis untuk sel  $\beta$ , dan 4) produksi radikal bebas oksigen. Semua hal tersebut memerlukan peran sitokin IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ . Trio sitokin tersebut diproduksi oleh sel imunosit yang menginfiltirasi pulau Langerhans pada keadaan *insulinitis*.

## 6.2 Pengaruh hidroskobalamin pada kadar gula darah hewan coba tikus Wistar MLD-STZ

Tabel 5.2.1 memperlihatkan bahwa hidroskobalamin mencegah peningkatan gula darah hewan coba tikus yang terpapar streptozocin. Rerata kadar gula darah hewan coba penerima streptozocin dan hidroskobalamin adalah

118,666 mg/dl. Hewan coba kelompok penerima streptozocin tanpa hidrosokobalamin memiliki rerata kadar gula darah 438, 89 mg/dl. Pencegahan peningkatan kadar gula darah hewan coba tikus terpapar streptozocin yang menerima hidrosokobalamin, merupakan konsekuensi dari perbaikan keadaan dari jaringan pankreas utamanya sel  $\beta$ . Perbaikan keadaan tersebut tampak pada parameter lain dari penelitian ini yaitu : 1) penurunan ekspresi enzim *iNOS* (Tabel 5.5.1), 2) penurunan indeks *insulinitis* (Tabel 5.4.1), dan 3) penurunan kadar nitrit dan nitrat serum hewan coba (Tabel 5.3.2 dan Tabel 5.3.4).

Terdapat 4 macam kobalamin yang berperan penting pada metabolisme sel. Dua yang pertama adalah sianokobalamin (vitamin B12) dan hidrosokobalamin (vitamin B12a). Dua yang lain merupakan derivat alkyl dari hidrosokobalamin yaitu; adenosilkobalamin dan metilkobalamin. Hidrosokobalamin dan sianokobalamin adalah jenis kobalamin yang sering digunakan sebagai suplemen dan tersedia dalam kemasan. Hidrosokobalamin tidak stabil, harus disimpan dalam keadaan kering (dalam bentuk kristal) dan terlindung dari cahaya. Sebaliknya sianokobalamin stabil dan banyak tersedia dalam bentuk parenteral. Namun demikian pemilihan sianokobalamin untuk pengikatan radikal  $\text{NO}^\cdot$  perlu pertimbangan, oleh karena pengikatan satu radikal  $\text{NO}^\cdot$  akan membebaskan satu ion sianida ( $-\text{CN}^-$ ), seperti diketahui sianida bersifat racun bagi sel. Hidrosokobalamin adalah vitamin yang banyak terdapat pada sumber nutrisi hewani. Sampai saat ini belum ada laporan yang jelas mengenai keracunan akibat penggunaan senyawa ini dengan dosis besar sampai 100  $\mu\text{g}$ . Dosis sebesar 5 g hidrosokobalamin pernah diberikan pada kasus keracunan sianida dan kasus keracunan karena terapi dengan nitroprusida. Vitamin ini relatif

aman, timbulnya keadaan kelebihan vitamin berlangsung lambat, dan kelebihan tersebut segera diekskresi melalui ginjal bersama urin.

Pada usia 55-60 tahun (saat atrofi gastritis sering terjadi), tampaknya anjuran untuk melaksanakan *screening* secara berkala guna menemukan kejadian defisiensi kobalamin bisa diterima. RDA merekomendasi 3,0 µg/hari kobalamin untuk mereka pada usia tersebut. Jika ditemukan atrofi gastritis maka dianjurkan untuk memberikan kobalamin secara intramuskuler. Pemberian dosis sebesar 1 mg/bulan secara intramuskuler yang dilaksanakan rutin, atau pemberian suplemen kobalamin dengan dosis 500 - 1000 µg/hari dianjurkan bagi mereka yang menderita atrofi gastritis. Asupan kobalamin sebesar 1 µg/hari diperkirakan mempertahankan kesehatan. Meskipun demikian karena absorpsi di usus pada setiap individu berbeda, dan juga guna mempertahankan konsentrasi normal vitamin ini dalam serum, serta untuk mempertahankan cadangan vitamin ini dalam tubuh, maka bagi orang dewasa dianjurkan 2,0 µg (1,5 nmol) untuk asupan sehari-hari. Tidak ada efek samping dari vitamin ini, meskipun demikian ada laporan terjadinya syok anafilaktik, meskipun jarang, setelah pemberian 1 mg hidroskobalamin.

Dalam perjalanan penyakitnya penderita diabetes tipe DM2 dapat berkembang menjadi penderita diabetes tipe DM1 (Tjokroprawiro, 1991). Patogenesis berkembangnya tipe DM2 menjadi tipe DM1 bisa sama dengan patogenesis DM1 yaitu reaksi otoimun pada sel β (Tuomi et al. 1993). Pada penelitian ini terbukti pengurangan radikal NO<sup>•</sup> pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DM1 memperbaiki kadar glukosa darah hewan coba tersebut. NO<sup>•</sup> adalah perantara bagi kerusakan sel β. Sitokin IL-1 dan IFN-γ



bersama-sama memicu ekspresi enzim *iNOS* (enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan radikal  $\text{NO}^\cdot$ ). Oleh karena itu pemberian hidroskobalamin pada penderita diabetes type DMT 2 diperhitungkan dapat mencegah perkembangannya menjadi type DMT 1.

### **6.3 Pengaruh hidroskobalamin pada ekspresi enzim *iNOS* hewan coba tikus Wistar MLD-STZ**

Pada penelitian ini terdapat ekspresi enzim *iNOS* pada hewan coba tikus Wistar ♂ yang menerima dosis streptozocin subtoksik 20 mg/kgBB/hr, secara intraperitoneal, selama 5 hari. Streptozocin dengan dosis besar tersebut menyebabkan kerusakan sel dalam Pulau Langerhans jaringan pankreas. Kerusakan sel tersebut menyebabkan migrasi sel mononuklear (makrofag monosit limfosit). Sel limfosit yang bermigrasi ke dalam jaringan pankreas didominasi oleh sel  $\text{TCR4}^+$  penghasil  $\text{IFN-}\gamma$ .  $\text{IFN-}\gamma$  memicu makrofag, sel  $\beta$  dan sel lain yang dapat mengekspresi *iNOS* (enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan  $\text{NO}^\cdot$ ). Pemberian hidroskobalamin pada hewan coba galur yang sama, yang memperoleh dosis streptozocin subtoksik yang sama, menyebabkan ekspresi enzim *iNOS* berkurang.

Streptozocin adalah senyawa penghasil radikal  $\text{NO}^\cdot$  dan  $\text{HO}^\cdot$  dalam jumlah besar. Radikal-radikal tersebut dapat merusak sel  $\beta$ . Hidroskobalamin mengikat radikal  $\text{NO}^\cdot$  untuk membentuk senyawa nitroskobalamin yang akan diekskresi melalui urin. Pengikatan  $\text{NO}^\cdot$  tersebut menyebabkan kemungkinan kerusakan sel  $\beta$  berkurang, sehingga kemungkinan infiltrasi sel mononuklear (makrofag, limfosit, dan monosit) ke dalam jaringan pulau Langerhans untuk proses fagositosis sel  $\beta$  yang rusak juga berkurang. Keadaan tersebut

menyebabkan pemicu ekspresi enzim *iNOS*, yaitu trio sitokin IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$  yang diproduksi makrofag dalam jaringan pulau Langerhans berkurang, karenanya ekspresi enzim *iNOS* dalam jaringan ersehut menurun.

Meskipun demikian pada Tabel 3.5.1 terlihat bahwa ekspresi enzim *iNOS* pada penelitian ini tidaklah benar-benar berhenti. Keadaan ini diyakini karena streptozocin *in vivo* berperan sebagai hapten. Menurut Klinkhammer (1988) terdapat kemungkinan reaksi imun spesifik terhadap streptozocin ikut berperan memicu ekspresi *iNOS* pada sel  $\beta$  pankreas hewan coba yang menerima senyawa streptozocin dosis subtoksik.

Untuk mengurangi produksi  $\text{NO}^*$  yang reaksi pembentukannya dikatalisis oleh enzim *iNOS*, ada yang menggunakan senyawa penghambat enzim *iNOS* seperti L-NMMA. L-NMMA menghambat 2 jenis isoform dari enzim *iNOS* (*eNOS* dan *iNOS*), *eNOS* (*constitutive Nitric oxide synthase*) adalah isoform *iNOS* yang mengkatalisis sintesis  $\text{NO}^*$  yang diperlukan bagi fungsi fisiologi normal dari tubuh. Penghambatan terhadap enzim *iNOS* yang tidak selektif akan berdampak negatif, karena dapat mengganggu fungsi faal tubuh normal, seperti terjadi efek samping yang tidak terkendali pada tekanan darah dan neurotransmisi. Sebaliknya hidroskobalamin mengikat  $\text{NO}^*$  bebas yang berlebihan dalam serum, tetapi tidak mengikat  $\text{NO}^*$  yang dihasilkan oleh enzim *eNOS*, sebab  $\text{NO}^*$  yang dihasilkan enzim *eNOS* dalam sirkulasi darah terdapat dalam bentuk ikatan dengan protein serum (S-nitroso albumin).

#### 6.4 Pengaruh hidroskobalamin pada kejadian *insulinitis* dalam pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar MLD-STZ

Infiltrasi pulau Langerhans jaringan pankreas oleh sel-sel mononuklear (*insulinitis*) merupakan kelainan karakteristik dari DMT 1 pada manusia maupun hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DMT 1 (Yamada, 1982). Pada penelitian ini pemberian hidroskobalamin menyebabkan penghambatan kejadian *insulinitis* pada hewan coba tikus Wistar penerima streptozocin dosis subtoksik (Model DMT 1). Kejadian *insulinitis* dipantau melalui indeks *insulinitis* yang diberi nilai mulai 0 (paling kecil) sampai 1 (paling besar). Pengikatan radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  oleh hidroskobalamin mengurangi kerusakan sel  $\beta$  oleh radikal ini. Dengan demikian resiko terjadinya reaksi radang berkurang. Keadaan ini menyebabkan aktivasi sel-sel efektor imun seperti makrofag, limfosit, dan monosit (sel-sel yang mendominasi *insulinitis*) terhambat, dan konsekuensinya migrasi sel-sel tersebut menuju jaringan pankreas berkurang. Seperti diketahui  $\text{NO}^{\cdot}$  merupakan *signal molecule* bagi makrofag untuk memulai fungsinya. Selain itu makrofag merupakan sel efektor imun yang pertama kali bermigrasi ke dalam jaringan pankreas. Menurunnya kadar  $\text{NO}^{\cdot}$  mengurangi faktor pemicu aktivitas makrofag, oleh karena itu resiko sel  $\beta$  mengalami fagositosis oleh sel makrofag berkurang.

Sementara itu pemberian hidroskobalamin juga mempengaruhi sel imun yang lain yaitu limfosit T. Fenotip limfosit T yang berperan pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DMT 1 adalah limfosit T  $\text{CD4}^+$ . Enzim *iNOS* mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi limfosit T (Kubes, 2000). Pada penelitian ini pemberian hidroskobalamin menghambat ekspresi enzim *iNOS* (Tabel 5.5.1). Diduga penghambatan ekspresi enzim *iNOS* merupakan salah satu

faktor yang menyebabkan limfosit T berkurang keaktifannya dalam bermigrasi ke dalam jaringan pankreas.

#### **6.5 Pengaruh hidroskobalamin pada kadar nitrit dan nitrat serum hewan coba tikus Wistar MLD-STZ**

Radikal NO<sup>•</sup> dalam cairan tubuh segera berubah menjadi ion nitrit dan ion nitrat yang stabil, maka penurunan kadar dua ion ini dalam cairan tubuh menunjukkan kadar NO<sup>•</sup> dalam cairan tubuh berkurang. NO<sup>•</sup> bebas dalam cairan tubuh akan diikat oleh hidroskobalamin untuk kemudian membentuk nitroskobalamin yang tidak memiliki pengaruh apapun pada sel tubuh dan akan diekskresi melalui urin. Tubuh sebenarnya memiliki beberapa senyawa yang dipergunakan sebagai pelindung terhadap toksisitas NO<sup>•</sup> yang jumlahnya berlebihan. Senyawa tersebut antara lain hemoglobin, ion besi pada hemoglobin dapat mengikat NO<sup>•</sup> untuk membentuk methemoglobin. Pelindung lain adalah Glutathion, yang akan bereaksi dengan NO<sup>•</sup> membentuk S-nitrosoglutathion (GSNO). Dalam keadaan tertentu jumlah NO<sup>•</sup> dalam cairan tubuh meningkat sedemikian pesat baik karena diproduksi maupun karena asupan yang meningkat. Pada kondisi demikian tidak dapat diimbangi oleh sistem anti oksidan tubuh semisal hemoglobin maupun Glutathion. Pada penelitian ini pemberian hidroskobalamin pada hewan coba tikus Wistar MLD-STZ—model DMT 1 menyebabkan menurunnya kadar nitrit dan nitrat serum hewan coba tersebut.

#### **6.6 Hubungan antar Variabel Penelitian**

Kerangka konseptual pada penelitian ini terbukti, kalau variabel insulitis diatasi maka variabel yang lain akan menjadi normal. Hal ini dibuktikan dengan :

- 1) Adanya pengaruh positif antara indeks insulitis terhadap produksi iNOS yang

artinya makin tinggi indeks insulinitis maka makin tinggi produksi iNOS. Indeks insulinitis merupakan banyaknya sel mononuklear yang menginfiltrasi pulau Langerhans jaringan pankreas. Semakin tinggi indeks insulinitis (nilai antara 0-1), sebanyak sel mononuklear yang menginfiltrasi jaringan pankreas. Sel mononuklear (makrofag) menghasilkan IFN  $\gamma$  (suatu sitokin yang memicu sel dalam pulau Langerhans untuk mengekspresi iNOS). (2) Adanya pengaruh positif antara indeks insulinitis terhadap kadar gula darah yang artinya makin tinggi indeks insulinitis maka makin tinggi kadar gula darah. iNOS adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan NO, NO adalah senyawa yang terbukti menyebabkan sel dalam pulau Langerhans jaringan pankreas (diantaranya sel  $\beta$ ). (3) Adanya pengaruh positif antara produksi iNOS terhadap kadar nitrit yang artinya makin tinggi produksi iNOS maka makin tinggi kadar nitrit. (4) Adanya pengaruh positif antara produksi iNOS terhadap kadar nitrat yang artinya makin tinggi produksi iNOS maka makin tinggi kadar nitrat. NO dalam plasma akan dioksidasi menjadi  $\text{NO}_3^-$  (Nitrat) dan  $\text{NO}_2^-$  (Nitrit). Semakin tinggi kadar NO semakin tinggi kadar nitrat dan nitrit.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pengikatan nitrogen oksida ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) oleh hidroskobalamin dapat:

1. Mencegah peningkatan kadar nitrit dan nitrat serum hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ— model DMT 1.
2. Mencegah peningkatan ekspresi enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ— model DMT 1.
3. Mencegah peningkatan indeks *insulinitis* pada pulau Langerhans jaringan pankreas dari hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ—model DMT 1.
4. Mencegah peningkatan kadar gula darah hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ— model DMT 1.

#### 7.2 Saran

Karena telah terbukti bahwa  $\text{NO}^{\cdot}$  juga berperan pada patogenesis DMT 1 manusia maka dapat dipertimbangkan penggunaan hidroskobalamin pada :

1. Penderita DMT 1 tahap awal yaitu saat telah ditemukan ICA (*islet cells autoantibodies*) tetapi belum ditemukan hiperglikemia.
2. Penderita DMT 2. sebagai penghambat perjalanan DMT 2 menuju DMT 1.

Radikal  $\text{NO}^{\cdot}$  berfungsi luas dalam mempertahankan faal tubuh normal. Radikal ini berbahaya jika terdapat dalam jumlah berlebihan, karena sifat toksiknya terhadap sel.

Senyawa hidroskobalamin ini selain diproduksi tubuh juga berasal dari asupan.

Penelitian pada tikus wistar STZ membuktikan bahwa pengikatan NO oleh hidroskobalamin dapat mencegah timbulnya hiperglikemia.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adam JMF. 2000. Klasifikasi dan Kriteria Diagnosis Diabetes Mellitus yang baru. *Cermin Dunia Kedokteran* 127: 37-40
- ADA. 2005. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* 28: 537- 542
- Ahren B, Taborsky G J. 2003. *Beta-Cell Function and Insulin Secretion*. Elenberg & Rifkin's *Diabetes Mellitus*, 6<sup>th</sup> Ed., USA: McGraw- Hill Companies. pp 43-59
- Alberti K.G.M.M., DeFronzo R.A., Keen H., Zimmet P., 1992. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. England: John Wiley & Sons Ltd, pp 261-265
- Atkinson MA, McLaren N, 1994. The Pathogenesis of Insulin dependent Diabetes Mellitus. *The New Engl J of Med* 24: 1428-1436
- Baker JR., Jr., MD, 1997. Endocrine Diseases. In (Daniel PS, Abba H, Fristam GP, eds). *Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> Ed. Connecticut : Appleton & Lange, pp 480-491
- Barnes PJ, Belvisi MG. 1993. Nitric Oxide and Lung Disease. *Thorax* 48: 1034-1043
- Behar SM, Porcelli SA, 1995. Mechanism of Autoimmune Disease Induction. The Role of the Immune Response to Microbial Pathogen. *Arthritis and Rheumatism* 38 : 458-478
- Belloeg A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Fouquaray B, Philippe C, Cadranet J, Baud E., 1999. Reactive oxygen and Nitrogen Intermediates Increase Transforming Growth Factor 1 $\beta$  Release From Human Epithelial Alveolar Cells trough 2 different Mechanism. *Am J Res Cell. Mol. Bio* 121: 128 - 136
- Benoist C, Mathis D. 1999. T-Lymphocyte Differentiation and Biology. In *Fundamental Immunology*, 4th Ed, Philadelphia New York.: Lippincott-Raven Publishers, pp 367- 409
- Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ. 1995. Cobalamin Chemistry in *Williams Hematology*, 5<sup>th</sup> Ed, USA: McGraw-Hill Inc, pp 385-390
- Bhagavan NV., 2001. Metabolic Homeostasis. *Medical Biochemistry*, 4<sup>th</sup> Ed, Harcourt Academic Press, Tokyo, pp 490-495
- Bidi. 2002. ABBA, Program Deteksi Dini DM; Tahun XXIII/ 25 Desember, 24, 2



- Bloodsworth A., O'Donnell VB., Freeman BA, 2000. Nitric Oxide Regulation of Free Radical-and Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein Oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1707-1715
- Campbell IL, Oxbrow L, Koulmanda M, Harrison LC, 1988. IFN- $\gamma$  Induces Islet Cell MHC Antigens and Enhances Autoimmune, Streptozocin-Induced Diabetes in The Mouse *J Immunol* 140: 1111-1116
- Chaturvedi P, Heneveld R, Zechel MA, Lee-Chan E, Singh B, 2000. The functional role of class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in its ability to variability modulate immune response. *International Immunology* 12 : 757-765
- Clancy J, 1998. The Thymus and T Cell Development. *Basic Concepts in Immunology*. 1<sup>st</sup> Ed, USA: Mc Graw-Hill Companies, pp 39-50
- Classen V, 1993. *Trends in Drug Research*. Vol 20, Netherlands: Elsevier Science Publisher B. V, pp 159 -165
- Cockfield SM., Ramassar V, Urmsen J, Halloran PF, 1989. Multiple Low Dose Streptozocin Induces Systemic MHC Expression In Mice By Triggering T Cells to Release IFN- $\gamma$ . *The J Immunol* 142:1120-1128
- Copenhaver WM, Kelly DE, Wood RL. 1978. *Bailey's Textbook of Histology*. 17<sup>th</sup> Ed, Tokyo: Igaku Shoin Ltd, pp 521-527
- Corbett JA, McDaniel ML, 1992. Perspective in Diabetes. Does Nitric Oxide Mediate Autoimmune Destruction of  $\beta$  cells? Possible Therapeutic Interventions in IDDM. *Diabetes* 41: 897-903
- Darmono, 2000. *Patofisiologi Komplikasi Vaskuler Diabetes Melitus*. *M Med Indonesiana* 35 : 53-56
- Diaz JL, Ways J, Hammond P, 1992. T-Lymphocyte Lines Specific for Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) the 64K  $\beta$ -Cell Antigen of IDDM. *Diabetes* 41:118-121
- Donosepoetro M, 1998. *Basic Principles of Immunology Related to Diabetes Mellitus*. Surabaya *Diabetes Up Date-IV*: 1-8
- Delaney BA, Tyrberg B, Bouwens L, Vaghef H, Hellman B, Eizirik D, 1996. Sensitivity of human pancreatic islet to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death. *FEBS letters* 394: 300-306
- Elias D, Cohen IR, 1996. The hsp 60 Peptide p 277 Arrests the autoimmune Diabetes Induced by the Toxin Streptomycin. *Diabetes* 45: 1168-1172
- Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapoport M, Lohse WA, Cohen IR, 1994. Autoimmun Diabetes induced by the  $\beta$  cell Toxin STZ. Immunity to the 60-kDa Heat shock Protein and to insulin. *Diabetes* 48: 992-998
- Faustman D, 1993. Mechanism of Autoimmunity in Type 1 Diabetes. *J Clin Immunol* 13 : 1-7

- Flodström M, Tyberg B, Elizirik DL, Sandler S, 1999. Reduced sensitivity of Inducible Nitric oxide synthase-deficient Mice to Multiple Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes* 48:706-713
- Foster DW. *Diabetes Mellitus*, 1997, Harrison's Internal Principles, 13<sup>th</sup> Ed. USA: MC Graw Hill Company, pp 1979-1999
- Gallin JI and Snyderman R, 1999. *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*, 3<sup>rd</sup> Ed, USA: Lippincott Williams and Wilkins, pp 883-892
- Gaston B, Drazen JM, Lescalzo J, 1994. The Biology of Nitrogen Oxide in The Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 538-551
- Gerling IC, Friedman H, Greiner DL, Shultz LD, Leiter EH, 1994. Multiple Low Dose Streptozotocin-Induced Diabetes in NOD-Scid/Scid Mice in the Absence of Functional Lymphocytes. *Diabetes* 43 : 433-440
- Goldsbey RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000<sup>5</sup>. *Cells and Organs Of The Immune System*, Kuby Immunology, 4th Ed. New York:: W.H. Freeman and Company, pp 27-61
- Goldsbey RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000<sup>11</sup>. *T-Cell Maturation, Activation, and Differentiation*. Kuby Immunology, 4<sup>th</sup> Ed, New York:: W. H. Freeman and Company, pp 239-267
- Goldsbey RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000<sup>6</sup>. *Cytokines*. Kuby Immunology, 4<sup>th</sup> Ed. New York:: W. H. Freeman and Company , pp 303- 327
- Green DR, Reed JC, 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Greenberg SS, Xie J, Zatarain JM, Kapusta DR, Miller MJS, 1995. Hydroxocobalamin (Vitamin B12a) Prevents and Resolves Endotoxin Induced Hypotension and Mortality in Rodents. Role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 257-265
- Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ, 1993. Inducible Nitric Oxide Synthase from a Rat Alveolar Macrophage Cell Line Is Inhibited by Nitric Oxide. *Journal of Immunology* 151: 6329-6337
- Hallewell B, Gutteridge JMC, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> Ed, Oxford University Press Inc. New York.
- Hamblin AS, 1993. *Cytokines and Cytokine Receptor*, 1<sup>st</sup> Ed, New York:: Oxford University Press Inc , pp 3-5
- Herbert V, 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B-12 in Humans. *Am J Clin Nutr* 45 :671-678
- Herold KC, Bloch TN, Vezys V, Sun Q, 1995. Diabetes induced with Low Doses of Streptozotocin Is Mediated by Vβ8.2<sup>+</sup> T-Cells. *Diabetes* 44: 354-359
- Higgins JE, 1985. *Design methodology for Randomized Clinical Trial*. USA: Family Health International, 30-31

- Hatchkiss RS, Karl IE, Parker JL. 1992. Inhibition of NO synthesis in septic shock. *Lancet* 339: 434-435
- Hovding G. 1968. Anaphylactic Reaction after Injection of Vitamin B12. *Brit Med J* 3: 102
- Inagaki T, Nishii Y, Suzuki N, Suzuki S, Koizumi Y, Aizawa T, Hashizume K. 2002. Fulminant Diabetes Mellitus Associated with Pregnancy: Cases Reports and Literature Review. *Endocrine Journal* 49 : 319-322
- Jackson R, Rossi N, Crump T, Haynes B, Eisenbarth GS, 1981. The BB Diabetic Rat. Profound T-Cell Lymphocytopenia. *Diabetes* 30: 887-889
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. 1999. The Thymus and the Development of T Lymphocyte. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 4<sup>th</sup> Ed, Current Biology Publication, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, pp 6:1-6:32
- Janeway CA, Wong SF, 2003. Immunology Relevant to Diabetes. *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus*. 6<sup>th</sup> Ed, New York: P McGraw-Hill Companies, pp 219-228
- Jenkinson KM, Reid JJ, Rang MJ, 1995. Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in the rat gastric fundus. *European Journal Pharmacol* 275: 145-152
- Klinkhammer C, Popowa P, Gleichmann H. 1988. Specific Immunity to Streptozocin Cellular Requirements for Induction of Lymphoproliferation. *Diabetes* 37 : 74-80
- Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW, 1999. Role of Peroxynitrite as a Mediator of Pathophysiological Alterations in Experimental Pneumococcal Meningitis. *The Journal of Infectious Disease* 180:1164 -1170
- Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, 2004. Quinapril, an ACE Inhibitor, Reduces Markers of Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 27 : 1712-1715
- Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. 1999. Nitric Oxide as a Bidirectional Regulator of Apoptosis. *Circ Res* 84 : 253-256
- Kubes P, 2000. Inducible nitric oxide Synthase : a little bit of good in all of us. *Gut* 47 : 6-9.
- Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, Kodama S, Suzuki M, Mogi G, McGhee, Kiyono H, 1999. Nasal Immunization Induces Haemophilus influenzae-specific Th1 and Th2 Responses with Mucosal Ig A and Systemic IgG Antibodies for Protective Immunity. *J Infectious Disease* 180: 122-132
- Lakey JRT, Surez-Pinzon WL, Strynadka K, Korbutt GS, Rajotte RV, Mahley JG, Szabó C, Rabinovitch A. 2001. Peroxynitrite as a Mediator of Cytokine-Induced Destruction of Human Pancreatic Islet  $\beta$  Cells. *Laboratory Investigation* 81: 1683-1692

- Lungin D,D.V.M., Ph. D, 2001. Diabetes, Insulin Secretion, And The Pancreatic Beta-Cell Mitochondrion. *N Engl J Med* 345: 1772-1774
- Lau A, Ramanathan S, Poussier P. 1998. Excessive Production of Nitric Oxide by Macrophages From DP-BB Rats [S Secondary to the T-Lymphopenic State of these Animals. *Diabetes* 47: 197-205
- Ledoux SP., Woodley SE., Patton NY., Wilson GI., 1986. Mechanism of Nitrosourea-Induced  $\beta$ -Cell Damage. Alterations in DNA. *Diabetes* 36: 866-872
- Li CG, Rand MJ, 1993. Effects of Hydroxocobalamin and Haemoglobin on NO-Mediated Relaxations in The Rat Aorticocoegeus Muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 20: 633-640
- Like AA, Rossini AA, Gubershi DL, Apple MC, Williams RM, 1979. Spontaneous Diabetes Mellitus: Reversal and Prevention in the BB/W Rat with Antiserum to Rat Lymphocytes. *Science* 206:1421 - 1423.
- Linder MC, 1991. *Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Application*. 2<sup>nd</sup> Ed, Connecticut : Appleton and Lounge Norwalk, pp137-143
- Lindsay RM., Smith W., Rositter SP., McIntyre MA., Williams BC, 1995. N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Reduces the Incidence of IDDM in BB/E Rats. *Diabetes* 44: 365-368
- Loudon GM., 1984. *Organic Chemistry*. 1<sup>st</sup> Ed, California: Addison Wesley Publishing Company Inc. pp 351-352
- Madsbad S, Hartling SG, Faber OK, 1992. C-Peptide and Proinsulin. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Singapore : John Willey & Sons Chichester, pp 303 - 332
- Mahan LK, Arlin MT, 1992. *Krause 's Food Nutrition & Diet Therapy*. 8<sup>th</sup> Ed, USA: W.B. Saunders Company, pp 212-223
- Malabu UH, Dryden S, McCarthy HD, Kilpatrik A, Williams G, 1994. Effect of Chronic Vanadate Administration in the STZ-Induced Diabetes Rat. The Antihyperglycemic Action of Vanadate Is Attributable Entirely to its Suppression of Feeding. *Diabetes* 43 : 9-15
- Marietta MA., Yoon PS., Iyengar R., Leaf CD., Wishnok JS, 1988. Macrophage Oxidation of L-arginin to Nitrit and Nitrat. *American Chemical Society* 27: 8706-8711
- Mauricio D, Mandrup Poulsen T. 1998. *Perspective in Diabetes*. Apoptosis and Pathogenesis of IDDM. A Question of life and Death. *Diabetes* 47:1537-1543
- McCaiferty DM, 2000. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut* 46: 436-439

- Mencacci A, Romani L, Mosci P, Cenci E, Tonnetti L, Vecchiarelli A, Bistoni F. 1993. Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice. *Cellular Immunol* 150: 36-44
- Mitsumoto A, Kwi-Ryeon Kim, Oshima G, Kunimoto M, Okawa K, Iwamatsu A, Nakagawa Y, 2000. Nitric Oxide Inactivates Glyoxalase I in Cooperation With Glutathione. *J Biochem* 128: 647-654
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA, 1991. Nitric Oxide : Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43 : 109-142
- Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Wei CN, Marliss EB, 1978. The Spontaneously Diabetic Wistar Rat (the "BB" Rat). Studies prior to and during Development of the Overt Syndrome. *Diabetologia* 14: 199-207
- Notkins AL. 2002. Immunologic and Genetic Factor in type Diabetes. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 43545-43548
- Nurdiana N, Permatasari, Setyawati, M. Ali, 1998. Efek Streptozocin sebagai bahan diabetogenik pada tikus Wistar dengan cara intraperitoneal dan intravena. *Majalah kedokteran UNIBRAW XIV*: 66-77
- O'Byrne S, Pablo Forte L, Roberts II J, Morrow JD, Jonston A, Ånggård E, Leslie RDG, Benjamin N, 2000. Nitric Oxide Synthesis and Isoprostane Production in Subject With Type 1 Diabetes and Normal Urinary Albumin Excretion. *Diabetes* 49: 857-862
- Orzechowski A, 2003. Justification for antioxidant preconditioning (or how to protect insulin- mediated action under oxidative stress). *J Biosci* 28: 39-49
- Oswald JP, Caspar P, Jankovic D, Wynn TA, Pearce EJ, Sher A. 1994. IL-12 Inhibits Th2 Cytokine Responses Induced by Eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Immunology* 153: 1707
- Paul WE, 1999. *Fundamental Immunology*. 4<sup>th</sup> Ed, Philadelphia USA: Lippincott-Raven Publisher, pp 800-803
- Pavlovic D, Meng CC, Gysemans CA, Mathieu C, Eizirik DL, 1999. The role of interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced mRNA expression and cell death in murine pancreatic  $\beta$ -cells. *European Cytokine Network* 10: 403-412
- Perkeni, 2002. *Konsensus Pengelolaan Diabetes Mellitus tipe 2 Di Indonesia*, hlm 7
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WI, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF, 1995. IFN- $\gamma$  Gene Expression in Pancreatic Islet-infiltrating Mononuclear Cells Correlates with Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* 154: 4874-4882
- Racie MS, Stadler J, Evans CH, 1993. Nitric Oxide and Arthritis. *Arthritis and Rheum* 36: 1036-1044

- Riou B, Berdeaux A, Pussard E, Giudicelli J-F, 1993. Comparison of the hemodynamic effects of hydroxocobalamin and cobalt edetate at equipotent cyanide antidotal doses in conscious dogs. *Intensive Care Med* 19: 26-32
- Roche. 1999. *Collagenase P, Version 3*
- Roitt IM, 2000. *Autoimmune Diseases- Scope and Etiology in Autoimmunity in Essential Immunology*. 10<sup>th</sup> Ed. Oxford : Blackwell Scientific Publications, pp 161-168
- Romagnani S. 2000. T-Cell Subsets (Th1 Versus Th2). *Ann. Alergi Asthma Immunol* 85: 9-21
- Rossini AA., Apple MC, Williams MR, Like MD, 1977. Genetic Influence of the Streptozocin-induced Insulinitis and Hyperglycemia. *Diabetes* 26: 916-920
- Santoso SS, Waluyo I, Kasnodiharjo, 1999/2000. Profil Penderita Diabetes Melitus yang berobat ke Pengobat Tradisional di DKI Jakarta, di Yogyakarta, dan Surabaya. *Bul Penelit Keschat* 27: 333-345
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB, 1994. STZ Stransport and Cytotoxicity: Spesific Enhancement in GLUT2 Expressing Cells. *Diabetes*: 1326-1333
- Seu-Yuong Jeon, 1999. The Role of Nitric Oxide in the Nasal Mucosa and Rhinitis. *J Rhinol* 6: 87-90
- Sedlik C, Deraud E, Leclere C, 1996. Lack of Th1 or Th2 polarization of CD4<sup>+</sup> T cell response induced by particulate antigen targeted to phagocytic cell. *International Immunology*: 91-103
- Shafiq E. 2003. *Diabetes in Animal: Contribution to The Understanding of Diabetes by Study of Its Etiopathology in Animal Models*. Ellenberg & Rifkin's *Diabetes Mellitus*, 6<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill Companies: pp 232-238
- Shellito JE , Tate C., Rwan S., Kolls L, 2000. Murine CD4<sup>+</sup> Tlymphocyte Subsets. *The journal of infectious Disease* 181: 2011-2017
- Snell RS, 1984. *Clinical and Functional Histology For Medical Student*. 1<sup>st</sup> Ed. USA: Brown and Company (Inc) USA, pp 490-502
- Snyder SH, Bredt D, 1992. Biological Roles of Nitric Oxide. *Scientific Am* May: 68-77
- Stamler JS, Jazaki O, Osborne J, 1992<sup>A</sup>. Nitric Oxide Circulation in Mammalian Plasma Primarily as an S-nitroso Adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7674-7677
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J, 1992<sup>B</sup>. Biochemistry of nitric oxide and Its Redox-Activated Forms. *Science* 258: 1898-1902

- Stassi G, Maria R, Trucco G, Rudert W, Festi R, Gallozzo A, Giordano C, Trucco M. 1997. Nitric Oxide Primes Pancreatic  $\beta$  Cells for Fas-mediated Destruction in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Exp Med* 186: 1193-1200
- Su X. 2000. Significant Role for Fas in the Pathogenesis of Autoimmun Diabetes. *J Immunol* 164: 2523 - 2532
- Suarez-Pinzon WL, Shabo C, Rabinovitch A. 1997. Development of Autoimmune Diabetes in NOD Mice Is Associated with the Formation of Peroxynitrite in Pancreatic Islet  $\beta$  Cells. *Diabetes* 46: 907-911
- Suenaga K, Ji WY. 1988. Association of  $\beta$ -Cell-Specific Expression of Endogenous Retrovirus With Development of Insulinitis and Diabetes in NOD Mouse. *Diabetes* 37:1722-1726
- Sung WL, Yun SH, Chung MC, Jun DM, Su JK, In CJ, Young HY, Be AL, Sung WM, Sung HC, Choi KM. 2002. Anti-inflammatory Effect of IL-4 and IL-10 on Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J Korean Med Sci* :7-14
- Suryohudoyo P. 2000. Oksidan, Anti-oksidan dan Radikal, dalam Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler, Jakarta: CV Intomedika, hlm 31-57
- Telford IR, PhD, Bridgman CE, PhD, 1995. Instruction To Functional Histology. 2<sup>nd</sup> Ed. Harper Collins College Publisher, pp 333-338
- The Merck Index, 1976. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, 9<sup>th</sup> Ed, Rahway N.J. USA: Merck & CO, INC, pp 940
- Tjokroprawiro A, David HM, Hadi S, Abimanyu, Subagyo A, Agung P, Hans T, Ari S, Hendromartono, 1991<sup>A</sup>. Diabetes Mellitus Type- X<sub>1</sub> : Insulin-Dependent DM Type 2 (Clinical experience in Surabaya). 15th Congress of International DIABETES Federation (IDF) Kobe, Japan, November 6-11, 1994
- Tjokroprawiro A, Widodo JP, Suhartono TP, 1997<sup>B</sup>. Pedoman Penelitian Kedokteran. Ed 1, Surabaya: University Press, hlm 89-92
- Todd JA. 1990. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunol today* 11:122-128
- Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WJ, Finegood DC, 2001. Perspective in Diabetes Neonatal  $\beta$ -Cell Apoptosis A Trigger for Autoimmune Diabetes. *Diabetes* 49:1-7
- Tuomi T, Group LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles, Mackay IR, 1993. Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase Reveal Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults With a Non — Insulin-Dependent Onset of Disease. *Diabetes* 42: 359-362
- Vallera DA, Carrol SF, Brief S, Bazar BR. 1992. Anti-CD3 Immunotoxin Prevents Low-Dose STZ/Interferon-Induced Autoimmune Diabetes in Mouse. *Diabetes* 41: 457-464

- Wang Z and Gleichmann H, 1998. GLUT2 in Pancreatic Islets. Crucial Target Molecule in Diabetes Induced with Multiple Low doses of Streptozocin in Mice. *Diabetes* 47: 50-56
- Wang Z, Dohle C, Friemann J, Green BS, Gleichmann H. 1993. Prevention of High-and Low-Dose STZ-Induced Diabetes With D-Glucose and 5-Thio- $\beta$ -D-Glucose. *Diabetes* 42: 420-428
- Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, Ledoux SP, 1988. Mechanism of nitrosourea-Induced  $\beta$ -cell Damage. Activation of Poly (ADP-ribose)synthetase and Cellular Distribution. *Diabetes* 37: 213-216
- Wu, 1995. Nitric Oxide Synthesis and the Effect of Aminoguanidine and N<sup>G</sup>-monomethyl-L-Arginine on the Onset of Diabetes in the Spontaneously Diabetic BB Rat. *Diabetes* 44: 360-364
- Xu J, Luming He, 2000. Oxygen – Glucose Deprivation Induces Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosin Expression in Cerebral Endothelial Cells. *Stroke* 31: 1744-1751
- Yamada K, Nonaka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S. 1982. Preventive and Therapeutic Effects of Large-Dose Nicotinamide Injections on diabetes Associated with Insulinitis. An Observation in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *Diabetes* 31: 749-753
- Yoshikawa T, Naito Y, 2002. What is Oxidative Stress? *JMAJ* 45 : 271-176
- Youn JH, Kim JK, Buchanan TA, 1994. Time Courses of Change in Hepatic and Skeletal Muscle Insulin Action and GLUT2 Protein in Skeletal Muscle After STZ Injection. *Diabetes* 43: 564-571
- Yudajana FM, 1993. Pola Sistem HLA Penderita DM – Indonesia. Suatu Pendekatan Immunogenik pada Populasi di Jawa Timur. Disertasi, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga
- Zerbe NF, Wagner BKJ, 1993. Use of vitamin B<sub>12</sub> in the treatment and prevention of nitroprusside-induced cyanide toxicity. *Crit Care Med* 21: 465-467
- Zumsteg M, Frigerid S, Hollander GA, 2000. Nitric Oxide Production and Fas Surface Expression Mediated Two Independent Pathways of Cytokine-Induced Murine  $\beta$ -Cell Damage. *Diabetes* 49: 39-47
- Zunino SJ, Simons LF, Sambrook JF, Geting MJH. 1994. Interleukin-1 promotes Hyperglycemia and Insulinitis in Mice Normally Resistant to Streptozocin-Induced Diabetes. *Am J Pathol* : 145: 661-670



## Lampiran 1. Hasil Analisis Statistik

### Oneway

#### Descriptives

kadar gula darah (mg/dl)

|                            | N  | Mean   | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|----------------------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                            |    |        |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| kontrol                    | 9  | 110,22 | 13,818         | 4,538      | 98,75                            | 120,69      | 93      | 131     |
| sz 20mg/kgBB/hr            | 9  | 438,89 | 24,972         | 8,324      | 419,69                           | 458,08      | 405     | 475     |
| sz 20mg/kgBB/hr + hidroksu | 9  | 118,67 | 7,382          | 2,461      | 112,99                           | 124,34      | 108     | 130     |
| Total                      | 27 | 222,59 | 156,748        | 30,156     | 160,59                           | 284,50      | 93      | 475     |

#### ANOVA

kadar gula darah (mg/dl)

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 631906,1       | 2  | 315953,037  | 1097,624 | ,000 |
| Within Groups  | 6908444        | 24 | 287852      |          |      |
| Total          | 638814,5       | 26 |             |          |      |

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar gula darah (mg/dl)

LSD

| (I) kelompok perlakuan     | (J) kelompok perlakuan     | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                            |                            |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol                    | sz 20mg/kgBB/hr            | 328,67 <sup>*</sup>   | 7,998      | ,000 | -345,17                 | -312,16     |
|                            | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksu | -8,44                 | 7,998      | ,302 | -24,95                  | 8,06        |
| sz 20mg/kgBB/hr            | kontrol                    | 328,67 <sup>*</sup>   | 7,998      | ,000 | 312,16                  | 345,17      |
|                            | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksu | 320,22 <sup>*</sup>   | 7,998      | ,000 | 303,72                  | 336,73      |
| sz 20mg/kgBB/hr + hidroksu | kontrol                    | 8,44                  | 7,998      | ,302 | 8,06                    | 24,95       |
|                            | sz 20mg/kgBB/hr            | -320,22 <sup>*</sup>  | 7,998      | ,000 | -336,73                 | -303,72     |

<sup>\*</sup> The mean difference is significant at the .05 level.

## Oneway

### Descriptives

indeks insulin

|                           | N  | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|---------------------------|----|------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                           |    |      |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Kontrol                   | 9  | 3390 | 66030          | 66000      | 6600                             | 6600        | 60      | 60      |
| sz 20mg/kgBB/hr           | 9  | 7380 | 66372          | 67124      | 6852                             | 7925        | 65      | 65      |
| sz 20mg/kgBB/hr + hidroks | 9  | 4500 | 67806          | 68655      | 3892                             | 5108        | 35      | 60      |
| Total                     | 27 | 3963 | 31529          | 66066      | 2716                             | 5210        | 60      | 65      |

### ANOVA

indeks insulin

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 2.495          | 2  | 1.248       | 336.925 | .000 |
| Within Groups  | .089           | 24 | .004        |         |      |
| Total          | 2.585          | 26 |             |         |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: indeks insulin

LSD

| (I) kelompok perlakuan    | (J) kelompok perlakuan    | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                           |                           |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol                   | sz 20mg/kgBB/hr           | -7380*                | 67869      | .000 | -7981                   | -6797       |
|                           | sz 20mg/kgBB/hr + hidroks | -4500*                | 68659      | .000 | -5092                   | -3908       |
| sz 20mg/kgBB/hr           | kontrol                   | 7380*                 | 67869      | .000 | 6797                    | 7981        |
|                           | sz 20mg/kgBB/hr + hidroks | -2880*                | 67869      | .000 | -2297                   | -3461       |
| sz 20mg/kgBB/hr + hidroks | kontrol                   | 4500*                 | 67869      | .000 | -3908                   | -5092       |
|                           | sz 20mg/kgBB/hr           | 2880*                 | 67869      | .000 | -3461                   | -2297       |

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

## Oneway

### Descriptives

jumlah sel penghasil NOSi

|                              | N  | Mean  | Std. Deviation | Sig. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|------------------------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                              |    |       |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Kontrol                      | 9  | 5.85  | 1.616          | .939       | 4.85                             | 7.13        | 3       | 8       |
| stz 20mg/kgBB/hr             | 9  | 25.44 | 1.505          | .903       | 24.28                            | 26.60       | 23      | 28      |
| stz 20mg/kgBB/hr + hidroksis | 9  | 8.44  | 2.455          | .818       | 7.56                             | 11.33       | 7       | 14      |
| Total                        | 27 | 13.59 | 8.859          | 1.705      | 10.09                            | 17.10       | 3       | 28      |

### ANOVA

jumlah sel penghasil NOSi

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 1953.185       | 2  | 976.593     | 268.377 | .000 |
| Within Groups  | 87.333         | 24 | 3.639       |         |      |
| Total          | 2040.519       | 26 |             |         |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah sel penghasil NOSi

LSD

| (i) kelompok perlakuan       | (j) kelompok perlakuan       | Mean Difference [i-j] | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                              |                              |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol                      | stz 20mg/kgBB/hr             | -19.58 <sup>*</sup>   | .899       | .000 | -21.41                  | -17.70      |
|                              | stz 20mg/kgBB/hr + hidroksis | -3.58 <sup>*</sup>    | .899       | .001 | -5.41                   | -1.70       |
| stz 20mg/kgBB/hr             | kontrol                      | 18.56 <sup>*</sup>    | .899       | .000 | 17.70                   | 21.41       |
|                              | stz 20mg/kgBB/hr + hidroksis | 16.00 <sup>*</sup>    | .899       | .000 | 14.14                   | 17.86       |
| stz 20mg/kgBB/hr + hidroksis | kontrol                      | 3.58 <sup>*</sup>     | .899       | .001 | 1.70                    | 5.41        |
|                              | stz 20mg/kgBB/hr             | -16.00 <sup>*</sup>   | .899       | .000 | -17.86                  | -14.14      |

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

## Oneway

## Descriptives

|                    | N                           | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum   | Maximum |         |
|--------------------|-----------------------------|------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|-----------|---------|---------|
|                    |                             |      |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |           |         |         |
| kadar nitrit       | Kontrol                     | 9    | 11,96000       | 3,276675   | 1,092225                         | 9,14132     | 14,17868  | 3,940   | 15,840  |
|                    | 100 mg/kg BB/hr             | 9    | 82,67967       | 6,158136   | 2,052719                         | 77,94609    | 87,41324  | 78,538  | 82,782  |
|                    | 200 mg/kg BB/hr + hidrokals | 9    | 9,24722        | 3,571364   | 1,190450                         | 6,50209     | 11,99242  | 4,800   | 15,904  |
|                    | Total                       | 27   | 34,52896       | 34,961934  | 6,732278                         | 20,89057    | 48,36736  | 4,800   | 82,782  |
| kadar nitrat       | Kontrol                     | 9    | 11,84344       | 2,456451   | 818817                           | 9,98025     | 13,73664  | 8,030   | 15,040  |
|                    | 100 mg/kg BB/hr             | 9    | 46,79100       | 3,149477   | 1,049826                         | 44,37010    | 49,21190  | 40,867  | 52,324  |
|                    | 200 mg/kg BB/hr + hidrokals | 9    | 9,80444        | 3,406659   | 1,135653                         | 8,48562     | 12,27326  | 3,879   | 14,324  |
|                    | Total                       | 27   | 27,74766       | 17,592678  | 3,385712                         | 15,78853    | 29,70739  | 3,679   | 52,324  |
| kadar nitrit total | Kontrol                     | 9    | 23,50844       | 5,624485   | 1,874828                         | 19,18508    | 27,83181  | 13,976  | 30,936  |
|                    | 100 mg/kg BB/hr             | 9    | 829,47067      | 7,115546   | 2,371849                         | 124,00117   | 134,84016 | 120,225 | 141,468 |
|                    | 200 mg/kg BB/hr + hidrokals | 9    | 18,88167       | 5,369758   | 1,786536                         | 14,75191    | 22,97143  | 10,848  | 29,488  |
|                    | Total                       | 27   | 51,77690       | 52,384178  | 10,081380                        | 38,55444    | 77,99942  | 10,648  | 141,468 |

## ANOVA

|                    |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|--------------------|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| kadar nitrit       | Between Groups | 1325,815       | 2  | 15882,908   | 785,113 | ,000 |
|                    | Within Groups  | 491,313        | 24 | 20,471      |         |      |
|                    | Total          | 1817,128       | 26 |             |         |      |
| kadar nitrat       | Between Groups | 7826,573       | 2  | 3913,286    | 425,963 | ,000 |
|                    | Within Groups  | 220,486        | 24 | 9,187       |         |      |
|                    | Total          | 8047,059       | 26 |             |         |      |
| kadar nitrit total | Between Groups | 1458,724       | 2  | 35229,362   | 852,220 | ,000 |
|                    | Within Groups  | 887,930        | 24 | 36,997      |         |      |
|                    | Total          | 1346,654       | 26 |             |         |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

LSD

| Dependent Variable (I): kelompok perilaku |                              | J: kelompok perilaku         |  | Mean Difference (I-J)  | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|---|------------------------------|------------------------------|--|------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|   |                              |                              |  |                        |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| kepatuhan minum                           | kontrol                      | sz 20mg/kgBB/hr              |  | -74.01967 <sup>*</sup> | 2.132884   | .000 | -75.42172               | -68.61781   |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 2.41270                | 2.132884   | .268 | -1.94028                | 6.81483     |
|   | sz 20mg/kgBB/hr              | kontrol                      |  | 71.01967 <sup>*</sup>  | 2.132884   | .000 | 66.84761                | 75.42172    |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 73.43244 <sup>*</sup>  | 2.132884   | .000 | 69.03039                | 77.83450    |
|   | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido | kontrol                      |  | -2.41270               | 2.132884   | .269 | -8.81483                | 1.98928     |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr              |  | 73.43244 <sup>*</sup>  | 2.132884   | .000 | 77.83450                | 69.03039    |
| kepatuhan minum                           | kontrol                      | sz 20mg/kgBB/hr              |  | -34.84258 <sup>*</sup> | 1.428823   | .000 | -37.89159               | -31.79351   |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 2.24400                | 1.428823   | .129 | -.70495                 | 5.19295     |
|   | sz 20mg/kgBB/hr              | kontrol                      |  | 34.84258 <sup>*</sup>  | 1.428823   | .000 | 31.99361                | 37.89159    |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 37.18656 <sup>*</sup>  | 1.428823   | .000 | 34.23781                | 40.13550    |
|   | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido | kontrol                      |  | -2.24400               | 1.428823   | .129 | -5.19295                | 7.04900     |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr              |  | 37.18656 <sup>*</sup>  | 1.428823   | .000 | 40.13550                | 34.23781    |
| kepatuhan minum total                     | kontrol                      | sz 20mg/kgBB/hr              |  | 105.96222 <sup>*</sup> | 2.867328   | .000 | 101.84435               | 110.08435   |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 4.65678                | 2.867328   | .117 | -1.26110                | 10.57465    |
|   | sz 20mg/kgBB/hr              | kontrol                      |  | 105.96222 <sup>*</sup> | 2.867328   | .000 | 100.04435               | 111.88030   |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido |  | 110.61900 <sup>*</sup> | 2.867328   | .000 | 104.70112               | 116.53688   |
|   | sz 20mg/kgBB/hr + hidroksido | kontrol                      |  | -4.65678               | 2.867328   | .117 | -10.57465               | 1.26110     |
|   |                              | sz 20mg/kgBB/hr              |  | 110.61900 <sup>*</sup> | 2.867328   | .000 | 116.53688               | 104.70112   |

<sup>\*</sup> The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 2. Test Kit untuk pemeriksaan glukosuria



### Lampiran 3

#### Pemeriksaan glukosuria

##### Prinsip:

Pemeriksaan berdasarkan pada 2 reaksi enzimatis secara berurutan. Enzim pertama glukosa oksidase, mengkatalisis reaksi oksidasi glukosa untuk membentuk asam glukonat dan hidrogen peroksida. Enzim ke 2 adalah peroksidase, mengkatalisis reaksi hidrogen peroksida dengan kromogen (kalium yodidat) yang akan mengoksidasi kromogen tersebut menjadi warna-warna dari biru — hijau — selanjutnya coklat.

##### Cara kerja:

1. Hewan coba tikus dipegang dengan mantap (hewan coba tenang tidak bergerak-gerak).
2. Lambung ditekan dengan ringan.
3. Urin yang keluar ditampung pada wadah yang bersih dan kering.
4. *Test strip* (unisean, Chungdo pharm.Co.Ltd.Seoul) dimasukkan ke dalam urin tidak lebih dari satu detik.
5. Kelebihan urin pada *test strip*, dibersihkan dengan meletakkannya diatas kertas saring
6. Satu menit kemudian, hasil dibaca (menggunakan penerangan yang baik) dengan cara mencocokkan warna yang timbul dengan tabel warna yang tercetak pada botol kemasan.
7. Glukosuria dinyatakan positif jika *test strip* menunjukkan warna hijau

## Lampiran 4

### Pemeriksaan kadar glukosa darah

Untuk mengetahui timbulnya hiperglikemia dipantau melalui urin (terdapatnya glukosuria) pada hewan coba. Sehari setelah timbul glukosuria, dilakukan pemeriksaan kadar gula darah melalui pembuluh vena lateral ekor, menggunakan Glukometer digital (*One Touch Ultra Life Scan Inc Inverness Medical Ltd*). Sebelumnya tikus dianestesia ringan dengan eter (Yamada et al, 1982). Gula darah diukur pagi hari (tikus dalam keadaan tidak puasa) (Elias et al, 1994).

### Prinsip :

Gula darah diperiksa berdasarkan teknik glukosa oksidase. Enzim glukosa oksidase akan mengkatalisis reaksi oksidasi glukosa menjadi hidrogen peroksida dan asam glukonat.

### Cara kerja:

1. Hewan coba tikus dianestesi ringan dengan eter.
2. Dilakukan pemotongan kecil pada ujung ekor, sehingga darah dari vena lateralis ekor merembes.
3. *Test paper strip* dimasukkan pada alat pengukur, kemudian tempelkan pada rembesan darah dari vena lateralis ekor.
4. Kadar glukosa darah tertera pada monitor alat pengukur.
5. Hewan coba dinyatakan hiperglikemia jika gula darah  $> 181$  mg/dl (Elias, 1994).

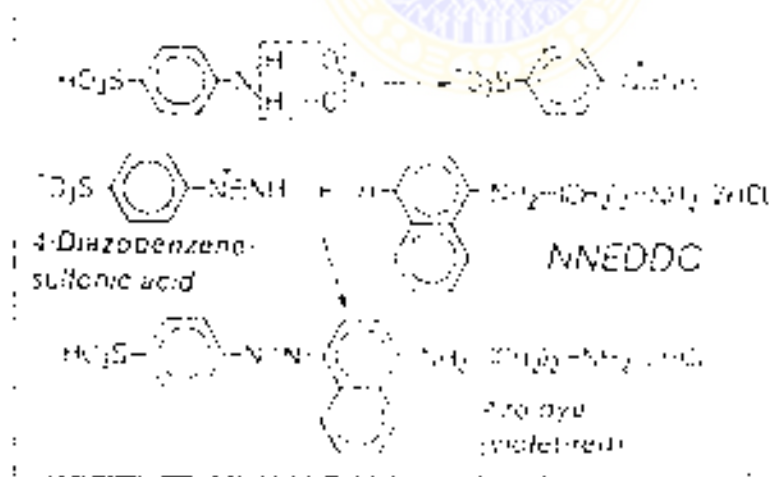


## Lampiran 5

### Pemeriksaan nitrat dan nitrit

#### Prinsip:

Dalam cairan tubuh NO terdapat dalam bentuk nitrat dan nitrit yang stabil. Pemeriksaan nitrit berdasar pada reaksi Griess. Yaitu reaksi antara nitrit dan asam sulfanilat yang akan menghasilkan asam 4-diazobenzenesulfonat. Selanjutnya asam 4-diazobenzenesulfonat jika direaksikan dengan senyawa 1-naftilamin akan berkondensasi membentuk pewarna azo yang berwarna ungu kemerahan. Intensitas warna ungu kemerahan ini sebanding dengan banyaknya nitrit. Selanjutnya dengan alat spektrofotometer diamati serapannya pada panjang gelombang terpilih. Senyawa 1-naftilamin dapat diganti dengan senyawa N-(1-naftil) etilendiamonumdiklorat (NEDDC). Kelebihan senyawa ini dari 1-naftilamin adalah tidak berbau.

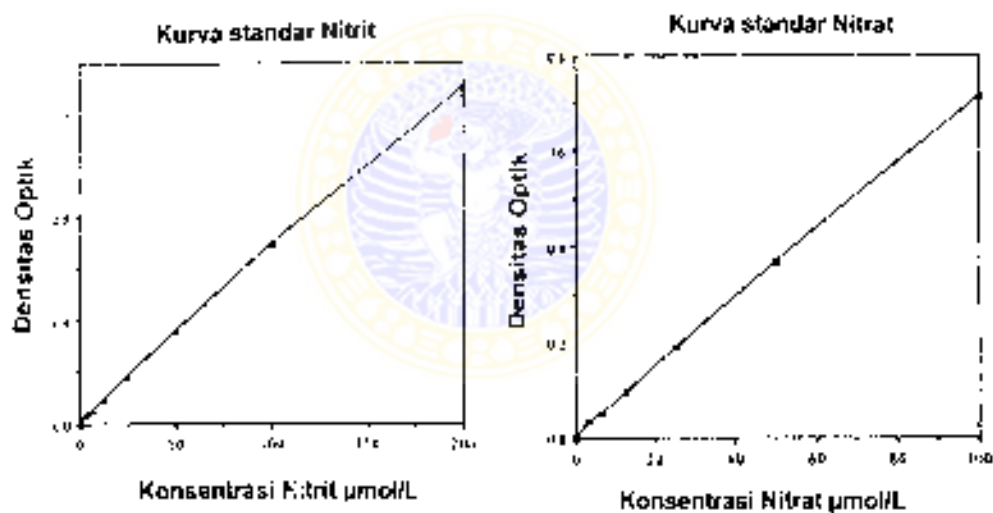


Reaksi Griess (Sumber Merck)

Pemeriksaan nitrat. Dilaksanakan dengan terlebih dahulu mengubah nitrat menjadi nitrit dengan cara memberikan enzim nitrat reduktase. Selanjutnya nitrat yang terjadi diperiksa berdasarkan reaksi Griess.

### Cara kerja

1. Mempersiapkan larutan standar nitrit dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125  $\mu\text{mol/L}$  dan larutan standar nitrat dengan konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125  $\mu\text{mol/L}$ . Larutan standar selain untuk pemeriksaan nitrit dan nitrat juga dipergunakan untuk membuat kurva standar.



**Gambar Lampiran 5.** Contoh kurva standar nitrit dan kurva standar nitrat

### II. Pemeriksaan nitrit

1. Semua larutan standar dan sampel diperiksa secara duplikasi.
2. Memipet 200  $\mu\text{L}$  larutan bufer tempatkan pada wadah secara duplikasi..
3. Memipet 50  $\mu\text{L}$  masing-masing dari larutan nitrit standar secara duplikasi, pada tempat yang tersedia.

4. Memipet 50  $\mu\text{L}$  larutan bufer (secara duplikasi). Larutan bufer dipergunakan sebagai standar zero.
5. Memipet masing-masing 50  $\mu\text{L}$  dari larutan sampel secara duplikasi. Kemudian masing-masing tempatkan pada wadah.
6. Menambahkan masing-masing 50  $\mu\text{L}$  larutan bufer pada larutan standar, larutan sampel, dan larutan standar zero (larutan bufer).
7. Menambahkan reagen Griess pada setiap wadah tersebut.
8. Dikocok dengan seksama, dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit.
9. Densitas optik dari masing-masing wadah dibaca pada  $540 \pm 20 \text{ nm}$ .

### III. Pemeriksaan nitrat

1. Semua larutan standar dan sampel diperiksa secara duplikasi.
2. Memipet 200  $\mu\text{L}$  larutan bufer (sebagai larutan blanko) secara duplikasi. Kemudian tempatkan pada wadah.
3. Memipet masing-masing 50  $\mu\text{L}$  dari larutan nitrat standar, secara duplikasi. Tempatkan pada wadah.
4. Memipet 50  $\mu\text{L}$  larutan bufer secara duplikasi, tempatkan pada wadah. Larutan ini sebagai standar zero.
5. Memipet 50  $\mu\text{L}$  dari setiap sampel secara duplikasi, tempatkan pada wadah.
6. Memipet 25  $\mu\text{L}$  NADH lalu tempatkan pada semua wadah larutan standar dan sampel.
7. Memipet 25  $\mu\text{L}$  enzim nitrat reduktase, tempatkan pada semua wadah larutan standar dan sampel.
8. Diaduk secara seksama, diinkubasi pada  $37^\circ \text{C}$  selama 30 menit.
9. Memipet 50  $\mu\text{L}$  reagen Griess tempatkan pada semua larutan standar dan larutan sampel, kecuali wadah larutan blanko.
10. Dikocok dengan seksama, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit.
11. Dilakukan pembacaan densitas optikal untuk setiap wadah pada  $540 \pm 20 \text{ nm}$ .

- IV. Penghitungan kadar nitrit dan nitrat dari sampel menggunakan kurva standar nitrit dan kurva standar nitrat.

**Cara penghitungan**

1. Konsentrasi nitrit pada sampel diukur seperti cara yang sudah dijelaskan diatas. Misal diperoleh  $X \mu\text{mol/L}$ .
2. Mengukur kadar nitrat dari sampel setelah terlebih dahulu mengubah kandungan nitrat menjadi nitrit. dengan memberikan enzim nitrat reduktase. Misal diperoleh harga  $Y \mu\text{mol/L}$ .
3. Maka diperoleh data sebagai berikut;  
Konsentrasi nitrit pada sampel tersebut  $X \mu\text{mol/L}$ , maka konsentrasi nitrat pada sampel tersebut adalah  $(Y - X) \mu\text{mol/L}$ .



## Lampiran 6

### Pemeriksaan *insulitis* dan pemeriksaan enzim *iNOS*

#### Pemeriksaan *insulitis*

##### Prinsip :

Pemeriksaan *insulitis* dilaksanakan dengan menentukan derajat *insulitis* dilaksanakan dengan memberikan skor. Skor 0, tidak diketemukan lesi; skor 1, terdapat *periinsulitis* tanpa penetrasi pulau Langerhans; skor 2, kurang dari 25% pulau Langerhans diinfiltrasi; skor 3, lebih dari 25%-75% pulau Langerhans diinfiltrasi; skor 4, > 75% atau terjadi degenerasi. Derajat *insulitis* untuk setiap tikus dihitung dengan menjumlahkan semua skor yang diperoleh dari setiap pulau Langerhans yang diperiksa dibagi dengan jumlah pulau Langerhans yang diperiksa (Rabinovitch et al, 1995). Indeks *insulitis* setiap menit dihitung dengan membagi derajat *insulitis* yang diperoleh dengan angka 4. Indeks *insulitis* 0 (nilai terendah) menyatakan tidak terdapat *insulitis* pada seluruh jaringan pankreas mencit tersebut, sedangkan indeks *insulitis* 1 (nilai terbesar) menyatakan *insulitis* atau degenerasi menyeluruh pada pulau – pulau Langerhans pankreas (Gierling et al, 1994).

##### Cara kerja:

###### Pembuatan *parafin block* :

1. Jaringan pankreas yang diperoleh dari prosedur 4.6.1 dicuci dengan *PBS*.
2. Difiksasi dengan formalin 10%.
3. Dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), masing-masing 60 menit.
4. *Clearing* menggunakan xylol 2 kali masing-masing 60 menit.

5. Difiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C
6. Di *block* dengan parafin keras dalam cetakan dan diamkan selama sehari.
7. Selanjutnya ditempelkan pada holder lalu dilakukan pemotongan setebal 4-6  $\mu\text{m}$  dengan menggunakan *rotary microtome*
8. *Mounting* pada obyek dengan gelatin 5%.

#### Proses deparafinisasi:

1. *Slide* direndam dalam xylol 2 kali, masing-masing selama 5 menit
2. Dilaksanakan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50%, dan 30%), masing-masing 5 menit
3. Dibilas dalam dH<sub>2</sub>O selama 5 menit.

#### Proses Pewarnaan Hematoxylen-Eosin :

1. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7.4 selama 5 menit.
2. Diwarnai dengan hematoxylen-Eosin selama 10 menit.
3. Direndam dalam air kran selama 10 menit.
4. Dibilas dengan dH<sub>2</sub>O.
5. Dilakukan pendehidrasiun menggunakan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit.
6. Diwarnai dengan eosin selama 3 menit.
7. Dibilas dengan alkohol 30%.
8. Dicuci dengan dH<sub>2</sub>O selama 5 menit dan dianginkan agar kering.
9. *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan dengan *cover glass*.

#### Pemeriksaan enzim *iNOS*

##### Prinsip:

Enzim *iNOS* pada jaringan pankreas yang mengalami *pancreatitis* diekspresi oleh sel  $\beta$  dan makrofag. Dengan pemulasan secara imunohistokimia terhadap protein

IGG5, protein ini akan tampak kecoklatan, yang mengitari sel yang mengekspresinya.

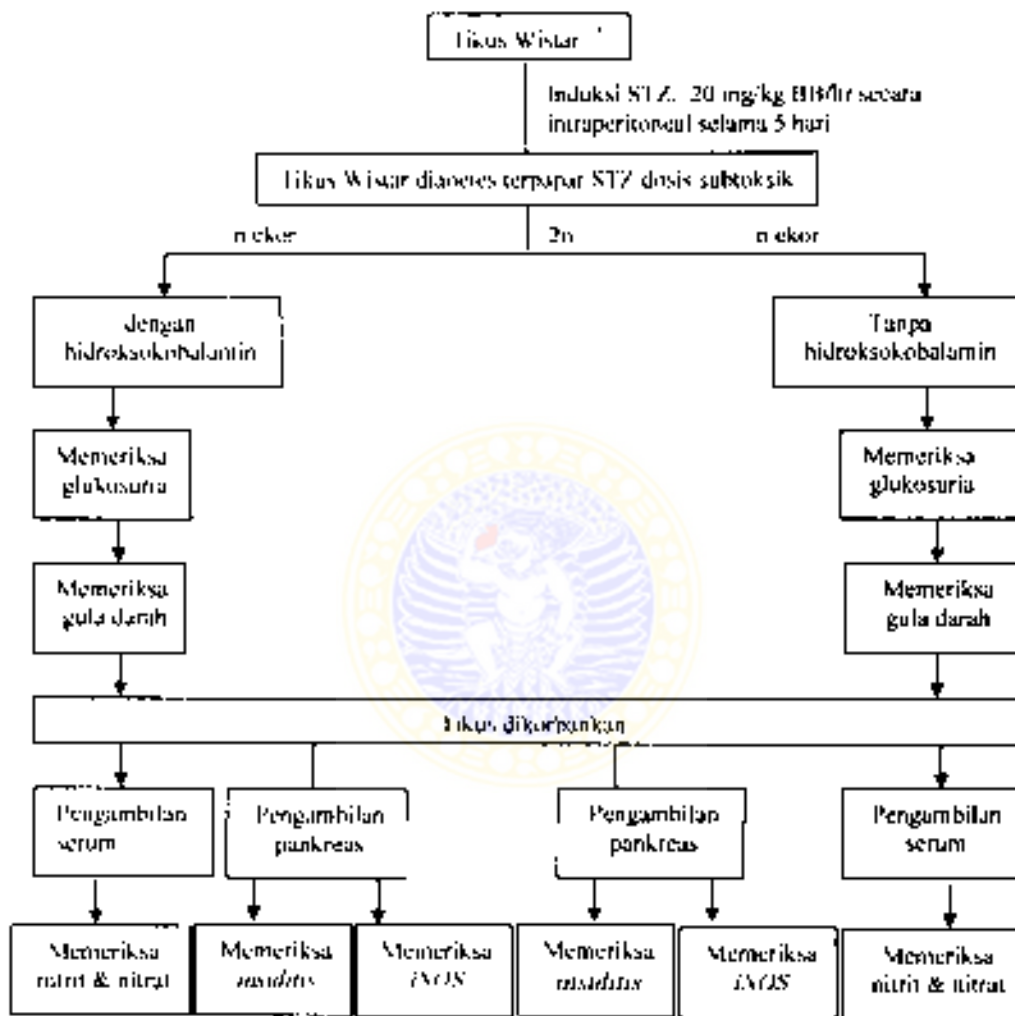
#### Cara kerja :

Proses imunohistokimia terhadap IGG5

1. *Slide* preparat dicuci dengan *PBS* pH 7,4
2. Dipaparkan pada  $H_2O_2$  3% selama 10 menit
3. Dicuci dengan *PBS* pH 7,4 selama 5 menit, tiga kali
4. Di bloking dengan menggunakan serum *BSA* 2%, selama 60 menit
5. Diinkubasi dengan antibodi primer, semalam pada suhu 4°C
6. Dicuci dengan *PBS* pH 7,4 selm 5 menit, tiga kali
7. Ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel histin, dilanjutkan dengan inkubasi selama 1 jam.
8. Dicuci dengan *PBS* pH 7,4 selama 5 menit, tiga kali
9. Di tetesi dengan *SA-HRP* (*Strept-Avidin Horse Radix Peroxidase*) selama 40 menit
10. Dicuci dengan *PBS* pH 7,4 selama 5 menit . tiga kali
11. Ditambahkan *chromogen* untuk *HRP*, yaitu DAB (*Diamino Benzidine*)
12. Dibilas dengan  $dH_2O$
13. Dicuci dengan *PBS* pH 7,4 selama 5 menit, tiga kali
14. Dilakukan *counterstaining* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit
15. Dicuci dengan air kran
16. Dikeringkan dengan cara dianginkan, dan *mounting* dengan menggunakan entelan serta *cover glass*.

## Lampiran 7

Diagram alur pemeriksaan nitrit dan nitrat, gula darah, indeks *Insulinitis*, dan enzim *iNOS* hewan coba tikus yang terpapar STZ, dengan dan tanpa pemberian hidroskobalamin.





## Lampiran #

### Pembuatan sediaan jaringan pankreas

Sahari setelah timbulnya hiperglikemia hewan coba tikus dikorbankan dengan diberi sodiumfenobarbital dosis letal (Suarez-Pinzon et al, 1997), sebesar 660 mg/kg untuk tikus (*Merck Index*, 1976).

Hewan coba tikus yang pankreasnya akan digunakan untuk bahan penelitian diperlakukan sebagai berikut :

1. Saluran empedu dibebaskan dengan cara menyingkirkan duodenum dan hati.
2. Saluran empedu diklem pada tempat masuk menuju duodenum
3. Bagian atas saluran empedu dibebaskan, dengan cara diseksi ke arah hati
4. Darah tikus diambil seluruhnya dengan melakukan pungsi pada jantung
5. Kelenjar pankreas dipisahkan lalu ditempatkan pada tabung plastik 15 ml
6. Kelenjar pankreas yang didapat, difiksasi dalam larutan DFA 4%

## Lampiran 9

### Memperiapkan serum darah

1. Darah diambil dari prosedur pembuatan sediaan jaringan pankreas nomor 4
2. Darah ditampung dalam tabung *ependorf* (kira-kira 1 -1.5 ml)
3. Darah dibiarkan antara 30 menit sampai 1 jam
4. Dibiarkan hingga terlihat 2 lapisan (serum dan endapan sel darah)
5. Selanjutnya disentrifus 3000 rpm selama 1 menit
6. Serum dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* lain



## Lampiran 10

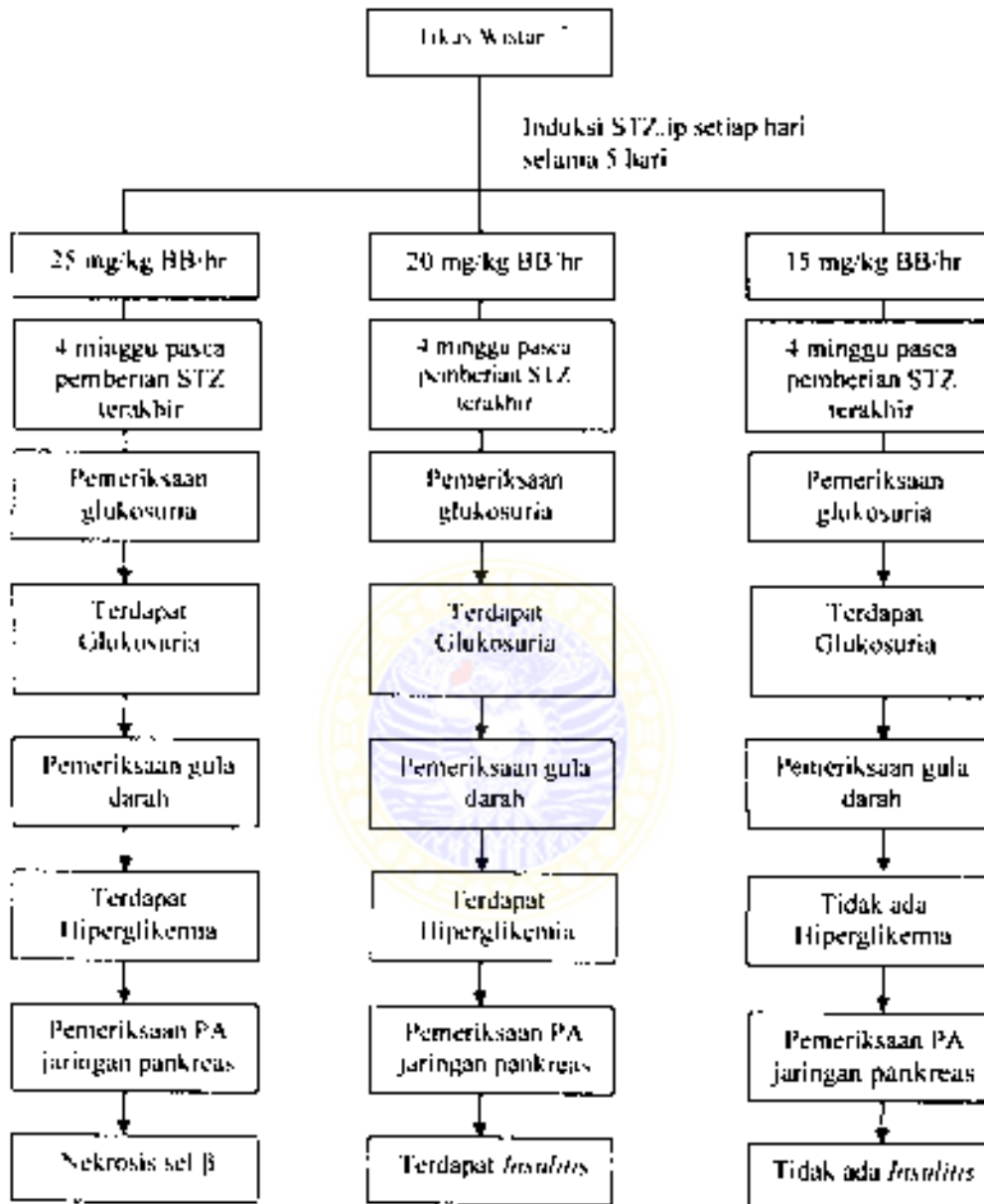
### Pembuatan hewan coba tikus Wistar diabetes MLD-STZ

Tikus putih galur Wistar jantan usia 4 minggu diberi streptozocin (MP Biomedicals Inc. Ohio) 20 mg/kg BB/hr setiap hari selama 5 hari secara intraperitoneal. Tikus mengalami hiperglikemia jika konsentrasi gula darah >181 mmol/l. (Elias, 1996). Streptozocin (STZ) dilarutkan dalam bufer sodium sitrat (pH 4.0) dingin. Larutan ini disuntikkan intraperitoneal dalam waktu tidak lebih dari 5 menit setelah dibuat. Timbulnya hiperglikemia dipantau melalui urin (glukosuria) dua hari sekali, menggunakan *Kit Glukosuria Test- Urinean*. Hewan coba mengalami glukosuria jika *test strip* yang dipergunakan menunjukkan warna hijau. selanjutnya hewan coba dikorbankan untuk pemeriksaan *insulinitis* dan enzim *iNOS* pada pulau Langerhans jaringan pankreas.

### Optimasi Dosis Streptozocin (STZ) untuk menghasilkan tikus Wistar diabetes MLD-STZ

Terdapat tiga dosis Streptozocin untuk diuji kemampuannya dalam menghasilkan tikus Wistar diabetes MLD-STZ, yaitu 25 mg/kg BB/hr, 20 mg/kg BB/hr, atau 15 mg/kg BB/hr. Streptozocin diberikan secara intraperitoneal setiap hari selama 5 hari. Tikus menderita diabetes MLD-STZ jika ditemukan kadar gula darah >181 mg/dl dan terjadi *insulinitis* (Elias, 1996).

**Diagram alur penentuan dosis optimum streptozocin untuk menghasilkan tikus Wistar diabetes MLD-STZ.**



## Lampiran 11

### Membuat Buffer sitrat pH 4.5 10 mM

Buffer sitrat digunakan sebagai pelarut streptozotocin

Cara membuatnya:

1. Menimbang Asam sitrat 0.09553 g
  2. Menimbang Sodium sitrat 0.1478 g
- } Untuk 100ml

Dalam penelitian ini membuat 50 ml Buffer sitrat sehingga

1. Menimbang 0.0475 g Asam sitrat
2. Menimbang 0.74 g Sodium sitrat
3. Bahan yang sudah ditimbang dimasukkan dalam gelas beker dan ditambah aquades 30 ml
4. Dilakukan pengecekan pH pada 4.5
5. Dipindahkan ke labu ukur 50 ml dan ditambah aquades steril hingga tanda batas
6. Dipindahkan dalam botol
7. Dilakukan sterilisasi

### Membuat Phosphat Buffer Saline pH 4.6

Buffer Phosphat digunakan untuk mengijeksi kelompok tikus non perlakuan (kontrol) dan pelarut dari Hidroksokobalamin

Dalam penelitian ini membuat 250 ml PBS sehingga Menimbang :

1. KCl 0.05g
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05g
3. NaCl 2g
4.  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  0.54g
5. Bahan yang sudah ditimbang dimasukkan dalam beker gelas
6. Ditambahkan aquades steril 200 ml
7. Dilakukan pengecekan pH pada 4.6
8. Dipindahkan ke labu ukur 250 ml
9. Ditambahkan aquades steril hingga mencapai tanda batas
10. Dipindahkan dalam botol
11. Dilakukan sterilisasi

## Lampiran 12

**Kadar gula darah hewan coba tikus wistar yang menerima Streptozocin (STZ) dosis subtoksik, secara intraperitoneal, setiap hari selama 5 hari**

| Tikus No | Kontrol | Kadar gula darah mg/dl |                   |                    |
|----------|---------|------------------------|-------------------|--------------------|
|          |         | STZ 25 mg/kg BB/hr     | STZ 20 mg/kgBB/hr | STZ 15 mg/kg BB/hr |
| 1        | 107     | 425                    | 405               | 160                |
| 2        | 93      | 445                    | 434               | 175                |
| 3        | 131     | 421                    | 411               | 150                |
| 4        | 112     | 475                    | 451               | 170                |
| 5        | 130     | 509                    | 408               | 165                |
| 6        | 116     | 460                    | 436               | 177                |
| 7        | 96      | 500                    | 440               | 134                |
| 8        | 100     | 425                    | 405               | 151                |
| 9        | 107     | 500                    | 443               | 174                |



## Lampiran 13

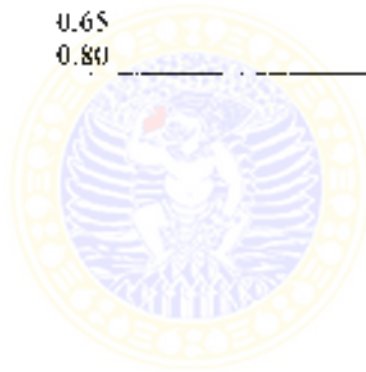
Jumlah sel penghasil iNOS dalam Pulau Langerhans jaringan pankreas :1) hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, ip, selama 5 hari; 2) hewan coba tikus kelompok kontrol; 3) hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, ip, selama 5 hari diteruskan dengan pemberian hidrosokobalamin 20mg/kgBB/hr 5 hari pasca pemberian streptozocin terakhir. Hidrosokobalamin diberikan secara im, sebanyak lima kali dalam 4 minggu

| Tikus<br>No | Kontrol | Jumlah sel penghasil iNOS |  |
|-------------|---------|---------------------------|--|
|             |         | Menerima streptozocin     | Menerima streptozocin diteruskan dengan hidrosokobalamin |
| 1           | 3       | 25                        | 8  |
| 2           | 7       | 26                        | 14   |
| 3           | 8       | 25                        | 7  |
| 4           | 5       | 21                        | 9  |
| 5           | 6       | 18                        | 8  |
| 6           | 7       | 25                        | 10   |
| 7           | 4       | 24                        | 8  |
| 8           | 6       | 26                        | 8  |
| 9           | 7       | 27                        | 13   |

## Lampiran 14

Indeks *invulitis* hewan coba tikus yang: 1) menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, ip, selama 5 hari; 2) hewan coba tikus kontrol; 3) hewan coba tikus menerima streptozocin 20 mg/kg BB/hr, ip, dalam 5 hari, diteruskan dengan pemberian hidrosokobalamin 20 mg/kg BB/hr 5 hari pasca penyuntikan streptozocin terakhir. Dilaksanakan secara im, sebanyak 5 kali pemberian dalam 4 minggu

| Tikus<br>No | Kontrol | Indeks <i>invulitis</i> |   |
|-------------|---------|-------------------------|---|
|             |         | streptozocin            | streptozocin diteruskan<br>hidrosokobalamin |
| 1           | 0       | 0,80                    | 0,50  |
| 2           | 0       | 0,70                    | 0,40  |
| 3           | 0       | 0,65                    | 0,45  |
| 4           | 0       | 0,70                    | 0,35  |
| 5           | 0       | 0,85                    | 0,60  |
| 6           | 0       | 0,75                    | 0,35  |
| 7           | 0       | 0,75                    | 0,45  |
| 8           | 0       | 0,65                    | 0,45  |
| 9           | 0       | 0,80                    | 0,50  |





## Lampiran 15

**Kadar Nitrit dan Nitrat pada hewan coba tikus; 1) kelompok hewan coba tikus kelompok kontrol, 2) kelompok hewan coba tikus yang menerima streptozocin 20mg/kgBB/hr, secara ip, selama 5 hari, 3) kelompok hewan coba tikus yang menerima streptozocin, secara ip, selama 5 hari, diteruskan dengan pemberian hidrosokobalamin 5 hari pasca pemberian streptozocin terakhir. Diberikan sebanyak 5 kali pemberian, dalam waktu 4 minggu**

| Tikus No | Menerima streptozocin   |                        |                        |                        | Kontrol                |                        |
|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|          | Diberi Hidrosokobalamin |                        | Tanpa hidrosokobalamin |                        |                        |                        |
|          | Nitrit $\mu\text{m/L}$  | Nitrat $\mu\text{m/L}$ | Nitrit $\mu\text{m/L}$ | Nitrat $\mu\text{m/L}$ | Nitrit $\mu\text{m/L}$ | Nitrat $\mu\text{m/L}$ |
| 1        | 15,954                  | 13,535                 | 92,762                 | 44,162                 | 5,940                  | 8,036                  |
| 2        | 6,969                   | 3,679                  | 76,338                 | 43,887                 | 14,860                 | 14,084                 |
| 3        | 4,800                   | 8,944                  | 78,931                 | 52,324                 | 15,840                 | 15,096                 |
| 4        | 6,644                   | 14,324                 | 77,429                 | 47,005                 | 9,900                  | 11,060                 |
| 5        | 10,571                  | 10,155                 | 92,659                 | 48,809                 | 10,880                 | 13,072                 |
| 6        | 10,562                  | 5,708                  | 79,089                 | 44,559                 | 12,860                 | 13,084                 |
| 7        | 5,747                   | 11,303                 | 84,430                 | 50,667                 | 7,920                  | 8,048                  |
| 8        | 12,314                  | 8,644                  | 80,924                 | 43,915                 | 12,880                 | 12,072                 |
| 9        | 9,664                   | 10,148                 | 81,555                 | 45,791                 | 13,860                 | 12,084                 |





