

**DIABEVAKSIN: PENGEMBANGAN VAKSINASI PENCEGAH  
KOMPLIKASI DIABETES BERBASIS INDUKSI NATURAL  
ANTIBODI ANTI-AGE**

**TUGAS AKHIR**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



Oleh :

**LAILI FITRI NI'AMITA**

**0910714039**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2012**

**DIABEVAKSIN: PENGEMBANGAN VAKSINASI PENCEGAH  
KOMPLIKASI DIABETES BERBASIS INDUKSI NATURAL  
ANTIBODI ANTI-AGE**

**TUGAS AKHIR**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



Oleh :

**LAILI FITRI NI'AMITA**

**0910714039**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2012**



**LEMBAR PERSETUJUAN**

**DIABEVAKSIN: PENGEMBANGAN VAKSINASI PENCEGAH  
KOMPLIKASI DIABETES BERBASIS INDUKSI NATURAL ANTIBODI  
ANTI-AGE**

**TUGAS AKHIR**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum

Oleh :

**LAILI FITRI NI'AMITA**

NIM: 0910714039

Disetujui oleh:

Pembimbing I

Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS

NIP. 19500525 198002 1 001





**LEMBAR PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**DIABEVAKSIN: PENGEMBANGAN VAKSINASI PENCEGAH  
KOMPLIKASI DIABETES BERBASIS INDUKSI NATURAL ANTIBODI  
ANTI-AGE**

Oleh :

LAILI FITRI NI'AMITA

NIM: 0910714039

Dan dinyatakan lulus oleh:

Pembimbing I

Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS

NIP. 19500525 198002 1 001

Mengetahui:

Ketua Program Studi

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.ParK

NIP: 195204 10 198002 1 001



## LEMBAR PERSEMBAHAN

# UNIVERSITAS BRAWIJAYA

*Untuk Allah SWT, Sang Maha Hidup dan Pemilik Kehidupan,  
Inilah salah satu buah pemikiran yang kupersembahkan untuk nikmat Iman,  
Islam, dan segala anugerah yang Kau hadirkan  
dalam hidupku,,,*

*Untuk Mama dan Papa tercinta, orang tua terbaik yang Allah pilihkan  
untukku, pemilik segudang cinta, kasih sayang, pengertian,  
dan perhatian,  
Selalu memberi yang terbaik dan tak pernah mengharap balasan dari putra-  
putri beliau,  
Karya ini adalah bukti terlewatnya tangga pertama perwujudan mimpi dan  
harapan yang Mama dan Papa titipkan padaku,,, ^^*

*Untuk adek-adekku tersayang, Adhin dan Bagus,  
Jika pelangi itu indah karena perbedaan warnanya, maka kalian lah pelukis  
warna-warna dalam indahnyanya kehidupanku,  
Sayang semuanyaaa,,, ^^*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala berkat dan kurnia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “DIABEVAKSIN: Pengembangan Vaksinasi Pencegah Komplikasi Diabetes Berbasis Induksi Natural Antibodi Anti-AGE” ini dengan sebaik-baiknya.

Penelitian ini membahas hasil penelitian tentang pengembangan vaksin baru untuk mencegah terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus dengan memanfaatkan peranan sistem imun (interaksi antigen-antibodi) dalam tubuh penderita itu sendiri. Mengingat tingginya angka morbiditas dan mortalitas akibat komplikasi DM, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi solusi untuk meningkatkan *quality of life* dari penderita DM yang jumlahnya makin meningkat di seluruh dunia.

Dengan selesainya penelitian ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Dr. M. Rasjad Indra, MS, sebagai dosen pembimbing yang senantiasa membimbing peneliti untuk bisa menyelesaikan penelitian ini.
3. Mama dan Papa tercinta, adek-adek tersayang Adhin dan Bagus, serta seluruh keluarga besar atas segala pengertian dan kasih sayang selama ini.
4. Segenap anggota tim diabevaksin yang telah menyelesaikan penelitian ini (Mas Iil, Lidia, Nana, Dek Fetreo dan juga Prof. Rasyad). *Diabevaksin is nothing without you all.*



5. Para karyawan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Mas Ali, Mas Memet, Mas Yudha, Mas Ivan, Mb Heni, Mb Bunga, Mb Tarina) yang telah membantu penelitian ini.
6. Teman-teman TOA (Adiba, Nisa, Fada, Ratih, Rayu, Maya, Aik, Nana, Lidia, Imi, Ingrid) dan Nisa Basya. Kalian adalah keluarga yang kupilih sendiri di antara orang-orang terbaik yang Allah kirimkan dalam hidupku. Thanks for loving, caring, and sharing all this time, guys! ^^
7. Keluarga An-Nahl (Mb Tata, Mb Nina, Mb Nyun, Ayunin, Ike), Mb Hida, Mb Tika, Mb Puput, Mb Bitho, Mb Nastiti, Amal, Dyah, Emi, Aan, Rindu, Dek Filza, Dek Dila, Dek Wanty, Dek Tata, Dek Dita, Dek Fadhilah, Dek Ida, Dek Hesti, Dek Fifi, Dek Dewi, Dek Beddy. Terimakasih sudah menjadi orang tua, saudara, sahabat, dan adek yang senantiasa bersabar menjagaku.
8. Semua pihak yang telah membantu peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.  
Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.  
Akhirnya, semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 15 November 2012

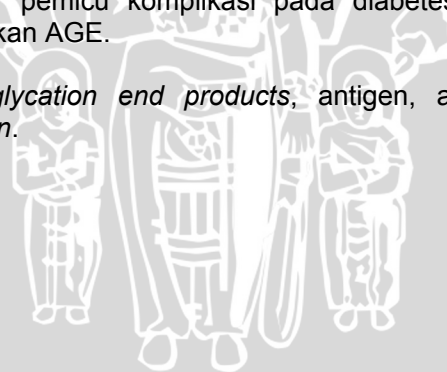
Penulis

## ABSTRAK

Ni'amita, Laili Fitri. 2012. *DIABEVAKSIN: Pengembangan Vaksinasi Pencegah Komplikasi Diabetes Berbasis Induksi Natural Antibodi Anti-AGE*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: Prof. Dr.dr.M. Rasjad Indra, MS.

Diabetes mellitus merupakan penyakit degeneratif dimana terjadi kondisi hiperglikemia kronis yang mampu mengakibatkan berbagai macam komplikasi yang dipicu oleh *Advanced Glycation End Product* (AGE). Selama ini terapi menggunakan *aminoguanidine* dan *crosslinker* lainnya membutuhkan terapi jangka panjang dan mahal sehingga pengembangan vaksinasi akan menjanjikan untuk terapi di masa depan. Penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit sebagai hewan coba, yang dibagi ke dalam 5 kelompok penelitian, kelompok kontrol negatif, kontrol positif, vaksinasi AGE-BSA, vaksinasi KLH, dan vaksinasi AGE-BSA-KLH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksinasi menggunakan AGE-BSA, KLH maupun AGE-BSA-KLH menghambat peningkatan kadar AGE yang signifikan ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ) dengan korelasi yang sangat kuat ( $r=-0.925$ ) dan pengaruh vaksinasi terhadap penghambatan peningkatan AGE sebesar 84%, peningkatan anti-AGE ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ), penghambatan peningkatan MDA ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ), penurunan berat liver ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ) dan penghambatan peningkatan glukosa darah pasca mencit divaksinasi dan didiabeteskan ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ). Penelitian ini menunjukkan bahwa vaksinasi menggunakan AGE-BSA, KLH dan AGE-BSA-KLH berpotensi untuk menurunkan faktor pemicu komplikasi pada diabetes mellitus melalui penghambatan pembentukan AGE.

Kata kunci: *advanced glycation end products*, antigen, antibodi, diabetes, *keyhole limpet hemocyanin*.



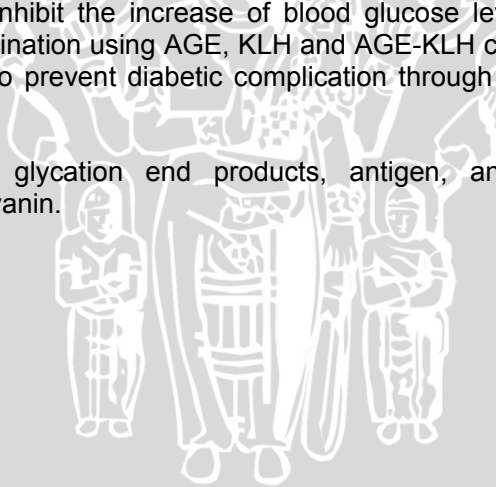


**ABSTRACT**

Ni'amita, Laili Fitri. 2012. *DIABEVACCINE: Development of Vaccination to Prevent Diabetes Complication Based on the Induction of Natural Antibody Anti-AGE*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: Prof. Dr.dr.M. Rasjad Indra, MS.

Diabetes mellitus is one of the degenerative disease, with chronic hyperglycemia that will lead into increase of Advanced Glycation End Product (AGE). To date, aminoguanidine and other crosslinker agent to inhibit AGE need to be consumed forever. Therefore, vaccine development held promising potential in the future. This research used Randomized Posttest Only Controlled Group Design with 40 Balb/C mice as experimental animals, which is divided into 5 study groups, negative control, positive control, vaccination with AGE, vaccination with KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), and vaccination with AGE-KLH conjugates. The research results show that vaccination using AGE, KLH or AGE-KLH inhibit the increase of AGE significantly ( $p = 0.000$ ,  $p < 0.05$ ) with a very strong correlation ( $r = -0.925$ ). Vaccination using AGE, KLH, or AGE-KLH conjugates will able increase anti-AGE level significantly ( $p = 0.000$ ,  $p < 0.05$ ), inhibit the increase in MDA level ( $p = 0.000$ ,  $p < 0.05$ ), decrease liver weight ( $p = 0.000$ ,  $p < 0.05$ ) and inhibit the increase of blood glucose level ( $p = 0.000$ ,  $p < 0.05$ ). Therefore, vaccination using AGE, KLH and AGE-KLH conjugates may be a potential approach to prevent diabetic complication through inhibition of AGE formation.

Keywords: advanced glycation end products, antigen, antibody, diabetes, keyhole limpet hemocyanin.



**DAFTAR ISI**

Judul .....	i
Lembar Persetujuan .....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Lembar Persembahan.....	iv
Kata Pengantar.....	v
Abstrak.....	vii
Abstract.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel .....	xiii
Daftar Gambar .....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Diabetes Mellitus.....	5
2.1.1 Definisi, Etiologi.....	5
2.1.2 Komplikasi Diabetes Mellitus I.....	5
2.1.3 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe II.....	6

2.2 Advanced Glycation End Products (AGE).....	7
2.2.1 Sifat Biokimia AGE.....	7
2.2.2 Peningkatan Stress Oksidatif Melalui Aktivasi AGE.....	8
2.2.3 Autoantibodi terhadap AGE.....	12
2.2.4 Jalur Eliminasi Age pada Tubuh.....	12
2.3 Protein Karier KLH ( <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> ).....	13
2.4 Prinsip Vaksinasi.....	14

**BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....17**

3.1 Kerangka Konsep.....	17
3.2 Hipotesis Penelitian .....	19

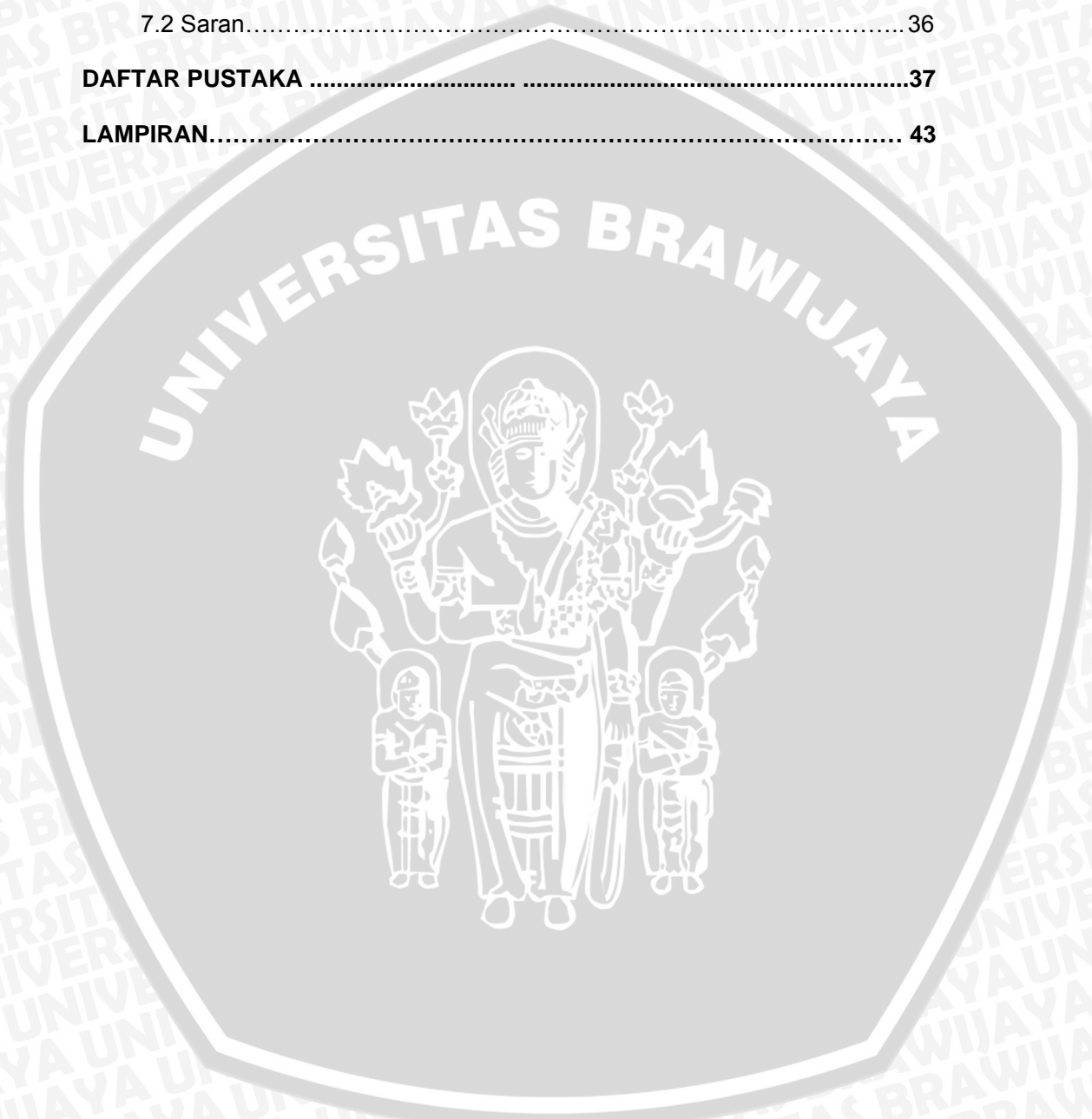
**BAB IV METODE PENELITIAN.....20**

4.1 Rancangan Penelitian .....	20
4.2 Variabel Penelitian .....	20
4.2.1 Variabel Bebas Penelitian.....	20
4.2.2 Variabel Tergantung Penelitian.....	21
4.3 Tempat dan Waktu penelitian.....	21
4.4 Subjek dan Kriteria Inklusi Penelitian.....	21
4.5 Estimasi Besar Sampel.....	22
4.6 Definisi Operasional .....	23
4.7. Alat dan Bahan Penelitian.....	23
4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit.....	23
4.7.2 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit.....	24
4.7.3 Alat dan Bahan untuk Pencegahan Infeksi.....	24



4.7.4	Alat dan Bahan untuk Pembuatan AGE-BSA.....	24
4.7.5	Alat dan Bahan untuk Konjugasi & Koupling Protein Karier.....	24
4.7.6	Penambahan Adjuvan.....	24
4.7.7	Alat dan Bahan untuk Mengukur Kadar AGE dalam Serum Mencit.....	24
4.8	Prosedur Penelitian.....	24
4.8.1	Persiapan Hewan Coba.....	25
4.8.2	Pembuatan Antigen AGE-BSA.....	25
4.8.3	Pemberian Perlakuan.....	25
4.8.4	Induksi DM tipe II.....	25
4.8.5	Pengukuran Ekspresi AGE dengan Metode ELISA.....	26
4.8.6	Analisis Data.....	27
<b>BAB V</b>	<b>HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>	<b>28</b>
5.1	Hasil Penelitian.....	28
5.1.1	Kadar AGE dalam Sirkulasi Mencit.....	28
5.1.2	Kadar Anti-AGE dalam Sirkulasi Mencit.....	29
5.1.3	Kadar Kompleks Imun.....	29
5.1.4	Berat Organ Mencit.....	30
5.1.5	Glukosa Darah Mencit.....	31
5.2	Analisis Pathway.....	32
<b>BAB VI</b>	<b>PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
6.1	Kadar AGE, Anti-AGE, & Imun Kompleks pada Mencit.....	33
6.2	Berat Hepar & Pankreas Mencit.....	34
6.3	Glukosa Darah Mencit.....	35

<b>BAB VII PENUTUP</b> .....	<b>36</b>
7.1 Kesimpulan.....	36
7.2 Saran.....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>43</b>



DAFTAR TABEL

Tabel 5. 2.1 Analisis Data..... 32





**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2..2.1 Jalur Produksi Radikal Bebas dalam Kondisi Hiperglikemi.....11

Gambar 2.2.2 Mekanisme AGE dalam Menyebabkan Disfungsi Vaskuler .....11

Gambar 5.1.1 Kadar AGE dalam Sirkulasi Mencit.....28

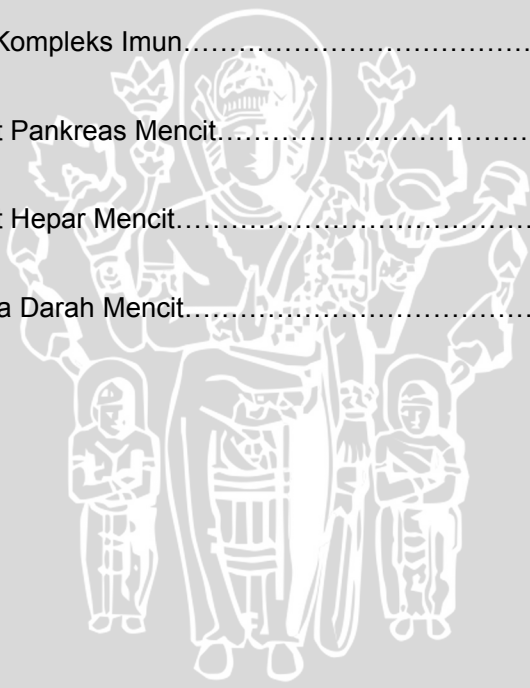
Gambar 5.1.2 Kadar Anti AGE dalam Sirkulasi Mencit.....29

Gambar 5.1.3 Kadar Kompleks Imun.....30

Gambar 5.1.4 A Berat Pankreas Mencit.....30

Gambar 5.1.4 B Berat Hepar Mencit.....30

Gambar 5.1.5 Glukosa Darah Mencit.....31



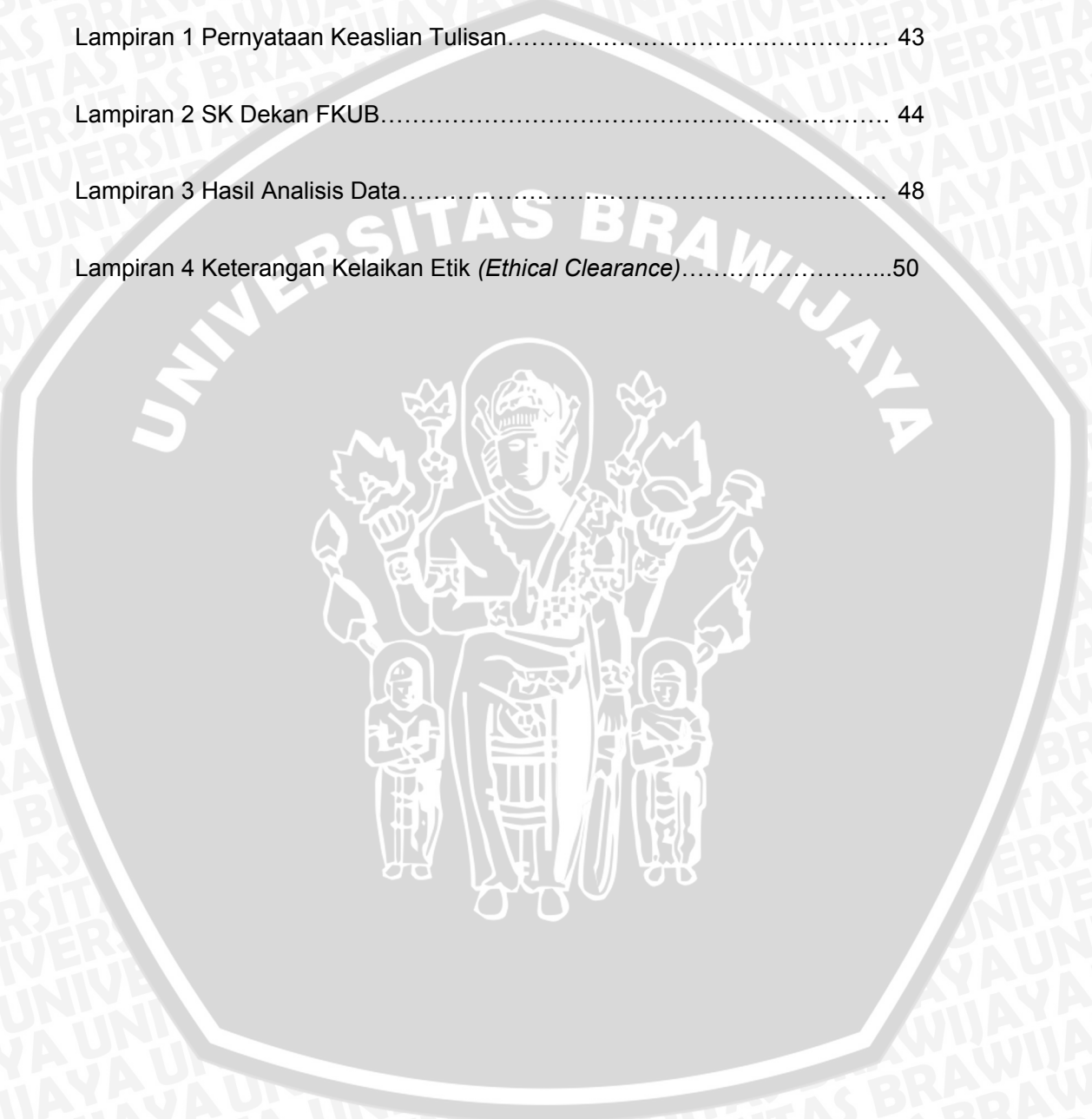
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan..... 43

Lampiran 2 SK Dekan FKUB..... 44

Lampiran 3 Hasil Analisis Data..... 48

Lampiran 4 Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*).....50



**DAFTAR SINGKATAN**

AGE	<i>Advanced Glycation End Product</i>
AGE-BSA	<i>Advanced Glycation End Product Bovine Serum Albumin</i>
AGE-BSA-KLH	<i>Advanced Glycation End Product Bovine Serum Albumin Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
CD-4	<i>Cluster of Difference-4</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
ELISA	<i>Enzim-lynked Immuno Sorbent Assay</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
IgM	<i>Immunoglobulin M</i>
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Sinthase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
RAGE	<i>Receptor of Advanced Glication End Product</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan keadaan hiperglikemia (peningkatan glukosa darah) kronik disertai berbagai kelainan metabolik akibat gangguan hormonal. Diabetes merupakan salah satu masalah kesehatan yang paling serius di abad 21 (Donnath *et al.*, 2003). Jumlah penderita DM usia 20-79 tahun di dunia berkisar 150 juta pada tahun 2003 dan diestimasi akan meningkat menjadi 333 juta pada 20 tahun kedepan (International Diabetes Foundation, 2005), dimana 90-95% penderita DM ialah menderita diabetes mellitus tipe II (King *et al.*, 2003).

Berdasarkan catatan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 1998, Indonesia menduduki peringkat keenam dengan jumlah penderita diabetes mellitus terbanyak setelah India, Cina, Rusia, Jepang, dan Brasil. Di Indonesia, diperkirakan tahun 2020 nanti akan ada 178 juta penduduk di atas umur 20 tahun, dan dari jumlah tersebut bila diasumsikan prevalensi DM 5%, maka akan didapatkan 9 juta penderita diabetes mellitus (Depkes, 2007). Prevalensi diabetes mellitus di Manado mencapai 6 %, di Kotamadya Surabaya 4,16 % (Suyono, 2004). Di Desa Sangsit Buleleng Bali prevalensi diabetes mellitus 7,5 % (Suastika *et al.*, 2004). Fenomena ini diperparah dengan adanya dugaan bahwa 50% dari penderita diabetes mellitus di Indonesia masih belum terdiagnosis (Perkeni, 2006) dan perkiraan bahwa dua-pertiga kematian akibat diabetes terjadi pada negara berkembang (Roglic, 2006).

Diabetes mellitus merupakan penyakit yang tidak dapat disembuhkan secara total, akan tetapi diabetes dapat dihambat dan dikendalikan perkembangannya. Namun, pengobatan diabetes yang tersedia saat ini seringkali masih memiliki banyak efek samping dan tidak mampu mengembalikan homeostasis glukosa normal dan harganya mahal (Rang dan Dale, 1991). Pada diabetes mellitus, kadar glukosa darah yang tinggi membuat proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs (*advanced glycation end product*) (Basta *et al.* 2004). Interaksi antara AGE dengan RAGE (*receptor for advanced glycation end product*) akan meningkatkan produksi ROS intraseluler (Yan *et al.*, 1994; Wautier *et al.*, 2001). Radikal bebas bersifat sangat reaktif karena cenderung mendapat elektron dari substansi lain dan mampu menyebabkan komplikasi seperti gangguan fungsi pembuluh darah, arterosklerosis dan lainnya (Basta *et al.* 2004). Salah satu marker *stress oxidative* yang berperan penting dalam pembentukan LDL sehingga dapat menginduksi terjadinya *atherosclerosis* pada pembuluh darah adalah MDA (Palinski dalam Nakhjavanin *et al.*, 2010).

Studi imunologis menggunakan antibodi AGE yang dimodifikasi mampu digunakan untuk mendeteksi AGE secara *in-vivo*. Penggunaan AGE-BSA (*Advanced Glycation End Product Bovine Serum Albumin*) sebagai antigen pada mencit berhasil menghasilkan anti-AGE monoclonal dan anti-AGE poliklonal pada kelinci (Horiuchi *et al.*, 1991). Hal ini menunjukkan bahwa adanya respon imun terhadap antigen AGE. Namun persiapan antigen yang lebih baik harus terus dikembangkan untuk mendapatkan hasil maksimal. Diketahui KLH merupakan salah satu protein karier yang mampu meningkatkan antigenitas dari suatu zat, sehingga respon imun untuk eradikasi zat yang dikouplingkan dengan

KLH akan meningkat (Kliegman *et al.*, 2007). Untuk mengetahui peran antibodi tersebut yang kemungkinan bersifat protektif terhadap komplikasi diabetes mellitus type II melalui depleksi AGE, dengan demikian maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut khususnya penggunaan AGE-BSA-KLH dalam induksi natural antibodi pada mencit model diabetes.

## **1.2 Rumusan masalah**

- 1.2.1 Bagaimana pengaruh vaksinasi dengan AGE-BSA, KLH dan AGE-BSA-KLH terhadap kadar AGE dalam sirkulasi mencit model diabetes?
- 1.2.2 Bagaimana pengaruh vaksinasi dengan AGE-BSA, KLH dan AGE-BSA-KLH terhadap kadar anti-AGE dalam sirkulasi mencit model diabetes?
- 1.2.3 Bagaimana pengaruh vaksinasi dengan AGE-BSA, KLH dan AGE-BSA-KLH terhadap kadar glukosa darah mencit model diabetes?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

1. Mengetahui pengaruh dari vaksinasi AGEs-BSA-KLH terhadap peningkatan antibodi AGEs untuk mencegah komplikasi diabetes dengan pengukuran pada marker penting penyebab komplikasi diabetes.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui pengaruh vaksinasi dengan menggunakan AGE-BSA, KLH, AGE-BSA-KLH terhadap kadar AGE dalam sirkulasi mencit model diabetes.



2. Mengetahui pengaruh vaksinasi dengan menggunakan AGE-BSA, KLH, AGE-BSA-KLH terhadap kadar anti-AGE dalam sirkulasi mencit model diabetes.
3. Mengetahui pengaruh vaksinasi dengan menggunakan AGE-BSA, KLH, AGE-BSA-KLH terhadap kadar glukosa darah mencit model diabetes.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat Akademik**

1. Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya tentang pencegahan diabetes mellitus menggunakan vaksinasi.

##### **1.4.2 Manfaat Praktis**

1. Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan perusahaan industri obat untuk menciptakan suatu alternatif baru dalam pencegahan terhadap diabetes mellitus, khususnya vaksin diabetes mellitus menggunakan AGE-BSA, KLH, maupun AGE-BSA-KLH.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Mellitus

##### 2.1.1 Definisi, Etiologi

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolisme yang secara genetis dan klinis termasuk heterogen dengan manifestasi berupa hilangnya toleransi glukosa. Jumlah penderita DM usia 20-79 tahun di dunia berkisar 150 juta pada tahun 2003 dan diestimasi akan meningkat menjadi 333 juta pada 20 tahun kedepan (International Diabetes Foundation, 2005), dimana 90-95% penderita DM ialah menderita diabetes mellitus tipe II (King *et al.*, 2003). Berdasarkan catatan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 1998, Indonesia menduduki peringkat keenam dengan jumlah penderita DM terbanyak setelah India, Cina, Rusia, Jepang, dan Brasil. Di Indonesia, diperkirakan tahun 2020 nanti akan ada 178 juta penduduk di atas umur 20 tahun, dan dari jumlah tersebut bila diasumsikan prevalensi DM 5 persen, maka akan didapatkan 9 juta penderita DM (Depkes, 2007).

##### 2.1.2 Komplikasi Diabetes Mellitus

Komplikasi diabetes mellitus meliputi komplikasi akut dan komplikasi kronis. Komplikasi akut diabetes mellitus yaitu *diabetic ketoacidosis* (DKA) dan juga *hyperosmolar hiperglycemic state* (HHS) (Fauci et al, 2008). *Diabetic Ketoacidosis* (DKA) lebih banyak terjadi pada diabetes mellitus tipe 1 dimana pada diabetes tipe ini terjadi kondisi insufisiensi absolut dari insulin sehingga tubuh akan mengalami kondisi asam yang berlebihan. Sedangkan HHS atau

*hyperosmolar hyperglycemic state* lebih banyak terjadi pada diabetes mellitus tipe 2 dimana terjadi kondisi insufisiensi insulin relative yang terutama ditandai oleh dehidrasi (Rani Azis et al, 2006). Selain DKA dan HHS, hipoglikemi juga merupakan komplikasi akut dari diabetes mellitus. Hipoglikemi merupakan kondisi dimana kadar glukosa darah sangat rendah jauh dibawah normal sehingga sangat membahayakan karena bias timbul koma seperti halnya pada *Diabetic Ketoacidosis* (Michael S, German, MD, 2007).

Komplikasi kronis diabetes mellitus meliputi berbagai organ dalam tubuh serta sangat menentukan mortalitas dan morbiditas dari diabetes mellitus. Komplikasi kronis ini dibagi menjadi mikrovaskular dan makrovaskular. Komplikasi mikrovaskular terjadi pada pembuluh darah terkecil, kapiler, dan arteriole prekapiler. Hal ini terjadi karena penebalan membrane basalis dari kapiler. Komplikasi ini meliputi retina, ginjal, saraf tepi (Michael S, German, MD, 2007). Komplikasi makrovaskular diabetes mellitus penyakit cerebrovascular, penyakit arteri coroner, dan penyakit arteri perifer. Selain mikrovaskular dan makrovaskular, juga terdapat komplikasi non vaskular seperti gastroparesis, infeksi dan juga perubahan pada kulit (Fauci et al, 2008).

### **2.1.3 Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe II**

Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe II sangat kompleks, pada awalnya, terjadi kegagalan aksi insulin dalam upaya menurunkan gula darah, mengakibatkan sel  $\beta$  pankreas akan mensekresikan insulin lebih banyak untuk mengatasi kekurangan insulin. Dalam keadaan ini toleransi glukosa dapat masih normal, dan suatu saat akan terjadi gangguan dan menyebabkan gangguan



toleransi glukosa (IGT) dan belum terjadi diabetes (DeFronzo *et al.*, 1992). Apabila keadaan resistensi insulin bertambah berat disertai beban glukosa yang terus menerus terjadi, sel  $\beta$  pankreas dalam jangka waktu yang tidak lama tidak mampu mensekresikan insulin untuk menurunkan kadar gula darah, disertai peningkatan glukosa hepatic dan penurunan penggunaan glukosa oleh otot dan lemak yang mempengaruhi kadar gula darah puasa dan posprandial yang sangat karakteristik pada Diabetes Melitus Tipe II. Akhirnya sekresi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas akan menurun dan terjadi hiperglikemia yang bertambah berat dan terus menerus berlangsung (Ostenson, 2001).

## **2.2 Advanced Glycation End-Products (AGE)**

### **2.2.1 Sifat Biokimia dari AGE**

Faktor yang menjadi kunci dalam pembentukan AGE ialah kecepatan dari terjadinya proses glikosidasi protein, derajat hiperglikemi dan banyaknya pemicu terjadinya stress oksidatif (Schmidt *et al.*, 1994; Brownlee, 1995). Jika salah satu atau lebih dari kondisi tersebut terpenuhi, maka protein intraseluler dan ekstraseluler memungkinkan untuk mengalami glikasi dan oksidasi. Proses pembentukan AGE yang disebut sebagai reaksi Maillard, dimulai dari Schiff base dan Amadori product. 1-amino-1-deoxyketose yang diproduksi dari reaksi antara grup karbonil dari glukosa tereduksi dengan protein, lipid dan asam nukleat (Tanaka *et al.*, 1988). Pada saat proses reorganisasi reaksi Amadori, grup karbonil yang sangat reaktif yakni  $\alpha$ -dicarbonyls atau oxoaldehydes yang juga meliputi 3-deoxyglucosone and methylglyoxal terakumulasi, fenomena ini disebut juga sebagai terjadinya stress karbonil (Baynes dan Thorpe, 1999).  $\alpha$ -dicarbonyls telah dibuktikan mampu bereaksi dengan amino, sulfhydryl dan grup fungsional

guanidine pada protein (Lo *et al.*, 1994). Reaksi ini berakibat terjadinya denaturasi, perubahan warna kecoklatan dan cross link dari protein target (Frye *et al.*, 1998). Selain itu,  $\alpha$ -dicarbonyls juga mampu bereaksi dengan grup fungsional lysine dan arginine protein yang pada akhirnya menghasilkan komponen AGE yang stabil seperti N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine (CML), yang merupakan AGE non fluoresen (Ahmed *et al.*, 1986).

### **2.2.2 Peningkatan Stress Oksidatif Melalui Aktivasi *Advanced Glycation End-Products* (AGE)**

AGEs merupakan produk akibat glikasi nonenzimatik protein yang beragam dalam struktur kimiawinya. FFI, AFGP, N-carboxymethyl lysine, pyrrolin, dan pentosidin adalah contoh dari AGEs (Wautier *et al.*, 2001). Glukosa adalah suatu aldehid yang bersifat reaktif, yang dapat bereaksi secara spontan, walaupun lambat dengan protein. Melalui proses yang disebut dengan glikosilasi non enzimatis, protein mengalami modifikasi. Gugus aldehid glukosa bereaksi dengan gugus amino yang terdapat pada suatu protein, membentuk produk glikosilasi yang bersifat reversibel (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Produk ini mengalami serangkaian reaksi dengan gugus NH<sub>2</sub> dari protein dan mengadakan ikatan silang membentuk *advanced glycation end-products* (AGEs) (Wautier *et al.*, 2001).

Glukosa dapat juga menjalankan glikasi secara langsung, dimana molekul glukosa secara kovalen berikatan dengan protein membentuk *Schiff base*. Molekul-molekul ini dapat melakukan penataan ulang membentuk *Amadori adduct*. *Amadori adduct* kemudian mengalami dekomposisi menjadi deoxyglucose, yang dianggap lebih reaktif dibanding gula turunannya.

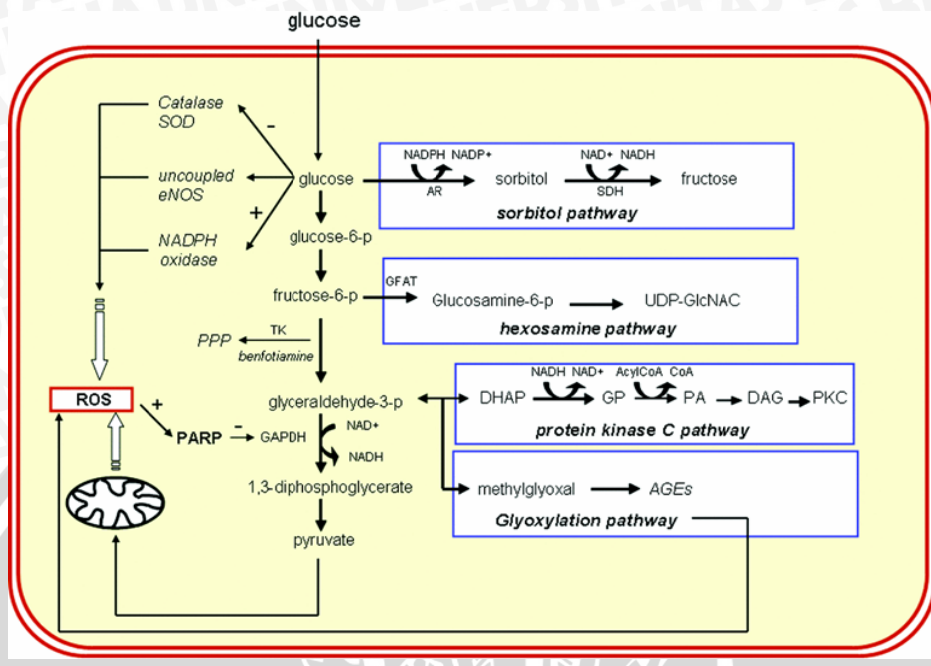
Pembentukan AGEs juga disebut dengan reaksi *Maillard*, yang merupakan rangkaian reaksi kimia yang terkait dalam rangkaian yang sangat rumit. Pembentukan AGEs melalui jalur klasik yaitu lewat reaksi Maillard antara glukosa atau gula tereduksi lainnya dan residu *N-terminal amino acid* dan atau gugus amino protein yang dikenal dengan *Schiff base* yang menghasilkan Amadori product seperti *fructose lysine* (Wautier *et al.*, 2001).

Sebagian besar AGEs adalah bentuk yang tidak stabil, senyawa reaktif dan produk akhirnya sulit untuk dianalisis dengan lengkap. Akumulasi AGEs pada kolagen dapat menurunkan elastisitas jaringan ikat sehingga menimbulkan perubahan pada pembuluh darah dan membran basalis. AGEs dapat dibentuk pada beberapa kondisi selama fermentasi, memasak, atau oksidasi di atmosfer. AGEs bersifat toksik dan dapat menginduksi mutagenesis bakteri. AGEs dibentuk dalam jumlah berlebih selama proses penuaan, diabetes mellitus, dan gagal ginjal. Terbentuknya AGEs dapat merusak sel karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Pada endotel mikrovaskular manusia, AGEs menghambat produksi prostasiklin dan mengakibatkan agregasi trombosit, stabilisasi fibrin hingga memudahkan trombosis (Wautier *et al.*, 2001). Komplikasi diabetes akibat peningkatan AGE adalah penyakit vascular sistemik (percepatan atherosclerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata sebagai penyebab kebutaan dan degenerasi retina (retinopati diabetik), katarak, kerusakan ginjal sebagai penyebab gagal ginjal serta kerusakan saraf tepi (neuropati diabetik) (Halliwell dalam Setiawan, 2005)

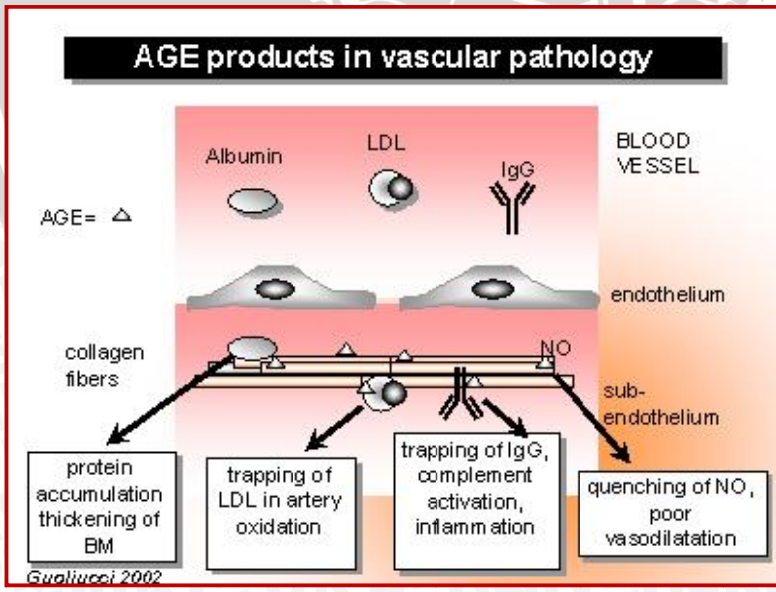
Pada diabetes, AGEs didapatkan di dalam beberapa jaringan, seperti hati, ginjal, dan eritrosit yang lebih peka ke dalam pembentukan AGEs dibandingkan



jaringan yang lain. Ikatan glukosa kepada gugus amino seperti apo B dan pada lipid di dalam LDL memudahkan terjadinya oksidasi LDL. Sehingga pembentukan AGEs menjadi salah satu penyebab terjadinya komplikasi pada diabetes (Mohora *et al*, 2006). AGE bekerja melalui 2 jalur, jalur pertama yaitu dengan merubah struktur intrasel maupun ekstrasel protein, jalur kedua yaitu dengan berikatan dengan reseptornya (RAGE) yang merupakan salah satu bentuk immunoglobulin yang terletak di membran plasma dari monosit, makrofag, sel endotel dan sel-sel vaskuler. Kedua jalur AGE tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan sel dan juga gangguan vaskuler. Jalur AGE yang berikatan dengan reseptornya ini selanjutnya akan menyebabkan terbentuknya ROS dan menginduksi terjadinya respon inflamasi yang berkelanjutan. AGEs yang terikat pada reseptor di *cell-surface* yang disebut RAGE yang terdapat di sel endotel, mesangial dan macrophages, menyebabkan terjadinya aktivasi postreseptor yang akan menghasilkan intraselular ROS dan pengaktifan ekspresi gen tertentu. Ekspose AGEs pada sel endotel akan mengaktifkan NF-KB, meningkatkan produksi molekul adhesi (termasuk vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) dan aktivitas NOS, serta menurunkan kadar GSH. Ini semua merupakan dampak buruk secara langsung akibat kadar glukosa yang tinggi pada endotelium vaskuler (Mohora *et al*, 2006). . AGEs berperan dalam proses *aging* dan berperan penting dalam proses komplikasi kronis dari diabetes seperti kerusakan vaskuler dan juga berperan dalam komplikasi dari sindrom metabolik. (Basta et al 2002). Selain itu penelitian Tan *et al* (2002) mendapatkan hasil bahwa ditemukannya AGE dalam plasma pada hewan coba model diabetes dan juga pada pasien diabetes yang mengalami penyakit kardiovaskuler dan kerusakan sel endotel.



Gambar 2.2.1 Jalur produksi radikal bebas dalam kondisi hiperglikemi (Schalkwijk, 2005)



Gambar 2.2.2 Mekanisme AGE dalam menyebabkan disfungsi vaskuler (Guyton dan Hall, 2004)

### 2.2.3 Autoantibodi terhadap *Advanced Glycation End Product* (AGE)

AGE yang terdiri atas berbagai macam jenis bahan protein yang terglikasi memiliki sifat antigenik (Horiuchi *et al.*, 1991). Penelitian Baydanoff *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa keberadaan AGE dalam tubuh mencit mampu menjadi antigen yang menstimulasi respon imun untuk memproduksi autoantibody. Selain itu, Vay *et al.*, (2000) menunjukkan bahwa autoantibody terhadap albumin serum yang termodifikasi oleh AGE maupun IgG yang termodifikasi oleh AGE ditemukan pada manusia sehat maupun penderita DM.

Selama ini, peran antibody anti-AGE pada penderita diabetes masih kurang banyak diketahui apakah bersifat protektif atau justru malah memperparah terjadinya komplikasi vaskuler. . Penelitian Turk *et al.*, (2001) menunjukkan antibody anti-AGE mampu berikatan dengan antigen yang termodifikasi oleh AGE untuk membentuk imun kompleks yang soluble dalam tubuh. Selain itu, disebutkan bahwa terdapat korelasi berkebalikan yang sangat erat antara kadar AGE dalam serum dengan kadar AGE-IC pada sampel darah penderita DM ( $r=-0.8$ ). Penelitian Baydanoff *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa keberadaan AGE dalam tubuh mencit mampu menjadi antigen yang menstimulasi respon imun untuk memproduksi autoantibody.

Vay *et al.*, (2000) menunjukkan bahwa autoantibody terhadap albumin yang termodifikasi oleh AGE ditemukan pada manusia sehat maupun penderita diabetes mellitus. Antibody anti-AGE dapat dibentuk dengan induksi dari berbagai macam jenis protein yang terglikasi oleh AGE (Turk *et al.*, 2001). Meski belum dijelaskan secara lebih lanjut manakah struktur yang menjadi epitope terbanyak dari berbagai jenis bahan AGE. Pembuktian secara kualitatif menggunakan immunohistokimia menunjukkan bahwa anti-AGE dari salah satu



bahan tertentu mampu bereaksi dengan AGE yang terbentuk dari AGE dengan bahan lainnya (Turk *et al.*, 2001).

#### 2.2.4 Jalur Eliminasi AGE pada Tubuh

Jalur eliminasi AGE secara *in vivo* dilakukan secara endositosis oleh beberapa jenis sel. Takata *et al.*, (1988) menunjukkan bahwa protein termodifikasi AGE secara efisien dieliminasi dari sirkulasi melalui endositosis dari sel sinusoidal hepatosit. Selain itu makromolekul AGE juga dieliminasi melalui makrofag, liver endothelial cell dan kupfer cell melalui reseptor scavenger (Bard *et al.*, 1998) Hal serupa dialami oleh oxLDL yang juga diendositosis oleh liver endothelial cell dan kupfer Cell (VanBerkel *et al.*,1991). Jalur eliminasi AGE melalui endositosis oleh makrofag meliputi berbagai macam reseptor, diduga dua pertiga dari endositosis oleh makrofag dan diperantarai oleh reseptor macrophage scavenging reseptor sedangkan sepertiganya difasilitasi oleh FcγRII-B2 CD36, SR-BI, RAGE dan MARCO reseptor (Bard *et al.*, 1998).

#### 2.3 Protein Karier KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*)

KLH adalah suatu protein dengan berat molekul yang besar yang berasal dari hemolimfa moluska laut (*Megathura crenulata*) (Siwek *et al.*, 2010). KLH merupakan model protein dengan solubilitas yang tinggi dan mudah dikenali oleh sel-sel imun seperti sel *T-helper* (Bliss *et al.*, 1996). Pada prinsip vaksinasi, reaksi imun dengan pembentukan antibodi melalui rangsangan sel imun yang bertugas mengenali antigen seperti MHC. Sel-sel yang bertugas dalam pengenalan antigen tersebut lebih mengenali antigen dengan berat molekul yang besar dan memiliki kompleks kimiawi yang lebih banyak (Abbas, 2007., Sell,

1996). KLH sebagai protein karier mampu meningkatkan antigenitas dari suatu zat, sehingga zat yang dikouplingkan dengan KLH akan meningkatkan pembentukan antibodi sebagai suatu respon imun tubuh terhadap antigen (Kliegman *et al.*, 2007)

Pada suatu penelitian, induksi KLH pada tikus model diabetes mampu menurunkan level *glycated peptides* dan secara jelas menurunkan albuminuria, proteinuria, dan deposit dari *glycation end products* pada ginjal, dan juga menurunkan kerusakan sel secara histology (Shcheglova, 2009). Dalam penelitian yang sama juga telah dilakukan AGE yang dikouplingkan dengan KLH dalam uji coba in vitro, dari penelitian tersebut didapatkan bahwa AGE-KLH meningkatkan respon imun melalui respon IgG yang lebih cepat daripada IgG pada keadaan normal (tanpa AGE-KLH) dan IgG bekerja lebih selektif pada L chain yang merupakan salah satu molekul mayor protein yang mengalami glikosilasi pada serum model diabetes (Shcheglova, 2009).

#### 2.4 Prinsip Vaksinasi

Vaksin dapat didefinisikan sebagai keseluruhan atau sebagian mikroorganisme yang diberikan untuk mencegah timbulnya penyakit infeksi. Vaksin dapat terdiri atas seluruh mikroorganisme yang inaktif, beberapa bagian dari organisme, kapsul polisakarida terkonjugasi oleh protein karier, mikroorganisme yang dilemahkan, dan toxoid (Kliegman *et al.*, 2007).

Agen vaksin dapat mengandung berbagai variasi kandungan selain antigen utama untuk vaksin. *Suspending fluid* dapat berupa air steril atau saline tetapi dapat berupa cairan yang kompleks yang mengandung beberapa protein dan kandungan lain yang berasal dari sistem biologis yang digunakan untuk

pertumbuhan immunobiologik. *Preservative, stabilizer, dan antimicrobial agent* digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan untuk mencegah degradasi dari antigen. Komponen tersebut dapat berupa gelatin, 2-*phonoxyethanol*, dan agen antimikrobal yang spesifik. Adjuvan digunakan dalam berbagai vaksin untuk menambah respon imun (Kliegman *et al.*, 2007).

Vaksin dapat menginduksi imunitas melalui stimulasi dari pembentukan antibodi, imunitas seluler, maupun stimulasi keduanya. Perlindungan yang diinduksi oleh kebanyakan vaksin diyakini dimediasi secara primer oleh limfosit B, yang menghasilkan antibodi. Antibodi tersebut dapat menginaktivasi toksin, menetralkan virus dan mencegah penempelan ke reseptor seluler, memfasilitasi fagositosis dan pembunuhan bakteri, berinteraksi oleh komplemen untuk melisis bakteri, dan mencegah adhesi bakteri ke permukaan mukosa (Kliegman *et al.*, 2007).

Kebanyakan respon limfosit B membutuhkan bantuan dari limfosit T, CD-4 sel helper. Limfosit T tersebut akan menginduksi antibodi dalam jumlah banyak, dimulai dari IgM secara primer sampai IgG yang persisten dalam waktu lama, dan menginduksi memori. Vaksin limfosit T dependen yang merupakan turunan protein dapat menginduksi respon imun secara baik, baik pada bayi yang baru lahir. Secara kontras, antigen polisakarida dapat menginduksi limfosit B tanpa bantuan dari limfosit T. Vaksin limfosit T independent tersebut hanya menghasilkan respon imun yang lemah pada anak-anak kurang dari dua tahun, imunitas jangka pendek, dan tidak adanya dari respon booster pada paparan ulangan antigen. Untuk mengatasi masalah tersebut, polisakarida harus dikonjugasi, atau digabungkan secara kovalen kepada protein karier, mengubah vaksin tersebut menjadi vaksin limfosit T dependen. Vaksin terkonjugasi dapat



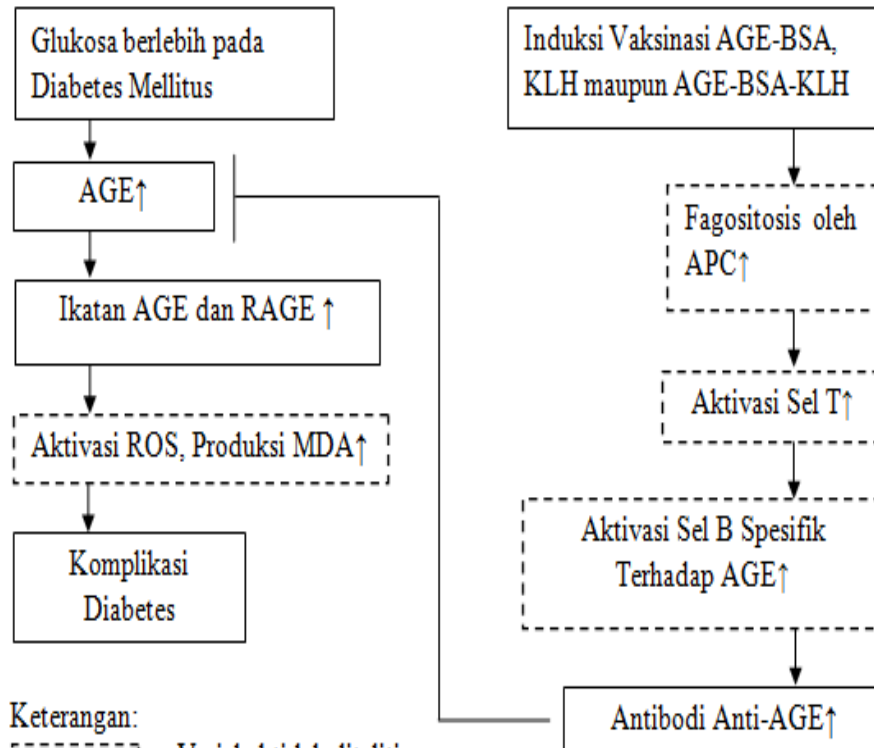
menginduksi antibodi lebih banyak, sel memori dapat memberikan respon booster pada paparan ulangan antigen, dan imunitas jangka panjang (Kliegman *et al.*, 2007).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

----- : Variabel tidak diteliti

----- : Variabel diteliti

AGE : *Advanced Glycation End Product*

RAGE : *Receptor for Advanced Glycation End Product*

NFκB : *Nuclear Factor Kappa B*

MDA : *Malondialdehida*

Pada pasien diabetes mengalami peningkatan kadar glukosa dalam darah. Melalui serangkaian proses dengan melakukan ikatan silang dengan protein maka gugus aldehid glukosa tersebut bisa membentuk *advanced glycation end-products* (AGEs). AGEs ini bisa menyebabkan rusaknya sel karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Pada endotel mikrovaskular manusia, AGEs menghambat produksi prostasiklin dan mengakibatkan agregasi trombosit, stabilisasi fibrin hingga memudahkan trombosis. Selanjutnya AGEs tersebut akan berikatan dengan reseptor yang terdapat pada sel endotel, mesangial, dan makrofag yaitu RAGEs sehingga terjadi aktivasi postreseptor yang akan menghasilkan intraselular ROS dan pengaktifan ekspresi gen tertentu. ROS tersebut yang bisa menginduksi terjadinya berbagai komplikasi diabetes, dengan salah satu marker pentingnya ialah MDA yang berperan dalam modifikasi LDL. AGEs tersebut berupa molekul protein BSA (Bovine Serum Albumin) yang mengalami glikosilasi (AGEs-BSA) dan sifatnya sebagai immunogen masih lemah. Diketahui bahwa KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) adalah molekul protein dengan HMW (*High Molecul Weight*) dan memiliki potensi yang kuat untuk dikenali oleh sel-sel imun. Kombinasi AGEs-BSA-KLH akan meningkat berat molekulnya dan akan lebih mudah dikenali oleh sel imun sebagai antigen. Sehingga AGEs-BSA tersebut akan dikombinasi dengan KLH sebagai protein karier untuk meningkatkan immunogenitas dari AGE.

Pada prosesnya ialah, AGEs-BSA-KLH ini menginduksi kerja dari sel-sel imun dalam tubuh, dengan aktivasinya sel dendrit yang akan menghasilkan teraktivasinya limfosit T yang berperan dalam reaksi pembentukan antibodi terhadap AGEs. Limfosit T akan menghasilkan sel-sel CD4+ dan CD8- yang



pada awal induksi AGEs-BSA-KLH akan mengalami penurunan lalu akan meningkat jumlahnya setelah beberapa waktu dari induksi sebagai respon tubuh membentuk antibodi yang akan menyerang AGEs. Sehingga pada akhirnya, limfosit T ini yang berperan dalam menyerang antigen AGEs tersebut akan menyebabkan penurunan kadar AGEs pada darah. Dengan penurunan AGEs ini menimbulkan efek penurunan juga pada pembentukan ROS, dengan marker pentingnya adalah penurunan MDA. Proses tersebut akan menurunkan terjadinya komplikasi diabetes yang disebabkan oleh reaksi dari AGEs dan pembentukan ROS.

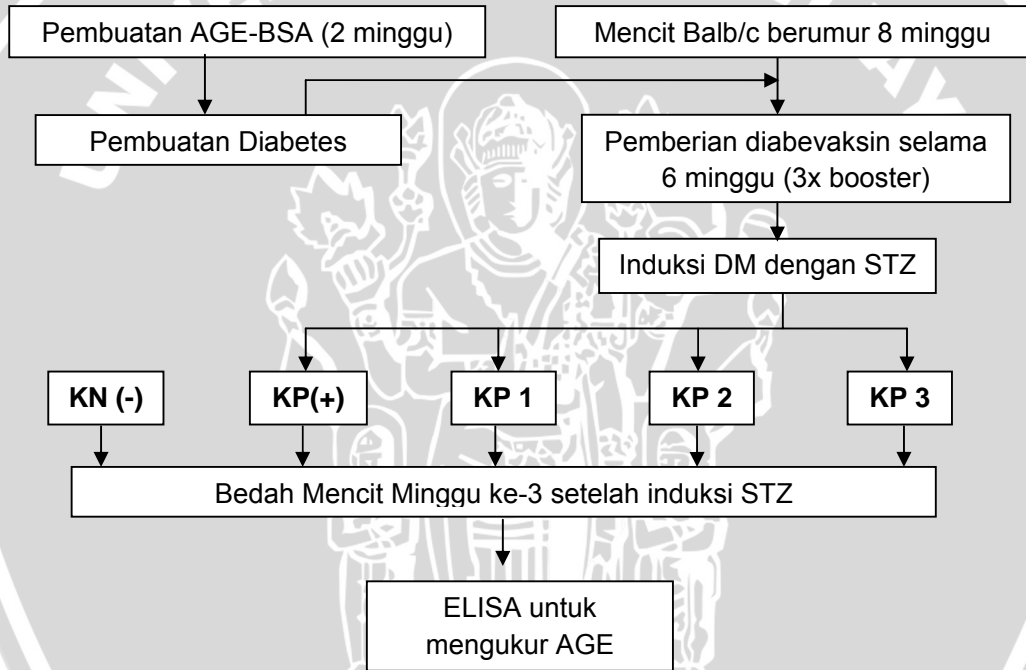
### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan prinsip diabevaksin dengan AGE-BSA-KLH terhadap mencit model diabetes dan prinsip reaksi imunitas pada tubuh terhadap AGE sebagai salah satu produk dari peningkatan kadar glukosa, maka akan didapatkan hasil penghambatan peningkatan kadar AGE dalam serum dengan induksi vaksin anti AGE-BSA tersebut yang telah dikombinasikan dengan protein karier KLH melalui reaksi imun pembentukan antibodi terhadap AGE tersebut. Penghambatan peningkatan kadar AGE tersebut selanjutnya juga bisa menyebabkan penurunan pada kadar MDA sebagai salah satu marker penting terbentuknya ROS. Sehingga dengan penurunan AGE dalam serum tersebut akan mencegah proses menuju komplikasi diabetes seperti terbentuknya ROS.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Desain Penelitian adalah sebagai berikut:



### 4.2 Variabel Penelitian

#### 4.2.1 Variabel Bebas Penelitian

Vaksin diabetes mellitus dengan menggunakan berbagai bahan yaitu KLH, AGE-BSA-KLH dan AGE-BSA-KLH yang dibagi dalam kelompok:

1. KN (-): kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan induksi STZ dan tanpa diberikan vaksinasi).
2. KP (+): kelompok kontrol positif (mencit yang diberikan induksi STZ)

tanpa diberikan vaksinasi).

3. KP1: kelompok mencit yang diberikan vaksinasi KLH 100  $\mu$ l/ injeksi lalu diberikan STZ.
4. KP2: kelompok mencit yang diberikan vaksinasi AGE-BSA 100  $\mu$ l/ injeksi lalu diberikan STZ.
5. KP3: mencit yang diberikan vaksinasi AGE-BSA-KLH 100  $\mu$ l/ injeksi lalu diberikan STZ.

#### 4.2.2 Variabel Tergantung Penelitian

1. Kadar glukosa darah mencit
2. Kadar AGE serum mencit
3. Kadar Anti-AGE serum mencit

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4 Subjek dan Kriteria Inklusi Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/C jantan. Pemakaian mencit sebagai hewan coba yang mudah ditangani, mudah dipelihara dan mudah berkembangbiak. Kriteria mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Termasuk galur Balb/C



2. Jenis kelamin jantan
3. Umur 6-8 minggu
4. Berat badan 20-25 gram
5. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif.

#### 4.5 Estimasi Besar Sampel

Selanjutnya jumlah mencit dihitung dengan rumus (Indra, 1999)

$$p(n-1) > 15$$

Dimana:  $n$  = jumlah sampel tiap perlakuan

$p$  = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan ( $p$ ) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negative, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai  $n$  sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15$$

$$n-1 > 3$$

$$n > 4$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor mencit sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 25 mencit. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena mencit mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan, total mencit yang digunakan yaitu 30 (Sudigdo, Sofyan, 2008).

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c jantan berusia 8 minggu yang dibeli dari Pusvetma Surabaya.
2. Streptozotocin: pemberian streptozotocin dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya diabetes mellitus dengan merusak sel beta pancreas.
3. AGE-BSA merupakan bentuk *Advanced Glycation End Product* diperoleh dengan mereaksikan glukosa menggunakan metode Gasic-Milenkovic *et al.*,(2003)
4. KLH: KLH digunakan sebagai protein karier, didapat dari CV Cristallindo Surabaya
5. EDC: EDC merupakan crosslinker yang mampu mengikat KLH dan AGE-BSA sehingga didapatkan ikatan yang stabil, didapat dari CV Cristallindo Surabaya
6. Freund's Complete Adjuvant (CFA) dan Freund's Incomplete Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit

Bahan dan alat yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *cornfeed* (makanan standar mencit), dan alkohol 70% untuk memandikan mencit yang disemprotkan tiap hari.

#### 4.7.2 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit

Alat: pisau bedah, papan bedah, pinset, Potter-*Homogenizer*. Bahan: PBS.

#### 4.7.3 Alat untuk Pencegahan Infeksi

Alat: tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, *cotton ball*. Bahan: alkohol.

#### 4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan AGE-BSA

BSA, 1 M glukosa , 100 mM PBS.

#### 4.7.5 Alat dan Bahan Konjugasi dan Koupling Protein Karier

*Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) 2 mg, MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) pH 4.5-5.0, 0.1 M, EDC 10 mg, Hapten: larutkan 1-2 mg dari hapten dalam coupling buffer, Purification buffer: 0.083 M sodium phosphate, 0.9 M NaCl, pH 7.2. A 10 ml D-Salt™.

#### 4.7.6 Penambahan Adjuvan

Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml

#### 4.7.7 Alat dan Bahan untuk Mengukur Kadar AGE dalam Serum Mencit

Alat: Anti-AGE ELISA Kit, tabung *polypropylene*, *microplate*, *well plate*, 25 spuit insulin 1cc, vacutainer heparin tube.



## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji mencit galur Balb/C, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan).Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium parasitologi selama tujuh hari.

### 4.8.2 Pembuatan Antigen AGE-BSA

*Glycated Bovine Serum Albumin* (AGE-BSA) diproduksi dengan metode yang telah dilakukan oleh Gasic-Milenkovic (Gasic-Milenkovic *et al.*, 2003). 1 mM BSA diinkubasi dengan 1 M glukosa dalam 100 mM PBS, dengan pH 7,4 selama 6 minggu pada suhu 50°C. Glukosa yang berlebihan dibuang dengan cara didialisis dengan PBS.

### 4.8.3 Pemberian perlakuan

Mencit diinjeksi KLH, AGE-BSA, AGE-BSA-KLH dilakukan secara intraperitoneal. Hari pertama injeksi diberikan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan pada 2 minggu selanjutnya dilakukan injeksi IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) tiap dua minggu sebagai booster selama 4 minggu. Setelah itu dilakukan pembedahan mencit dan pengambilan darah intracardial.

26

### 4.8.4 Induksi Diabetes Mellitus Tipe II

Pada hari 14 setelah injeksi KLH, AGE-BSA, AGE-BSA-KLH ,STZ (Streptozotocin) dimasukkan kedalam 50mM-citric acid buffer dan Nicotinamide

dileburkan kedalam normal salin saat akan digunakan. Mencit Balb/c dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal 100 mg/kg. Kerusakan Beta Pankreas ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemi pada hari ke-7 pasca induksi.

#### 4.8.5 Pengukuran Ekspresi AGE serum dengan Metode ELISA

Isolasi darah dari mencit melalui injeksi intra-cardial, simpan dalam vacutainer heparin untuk mencegah koagulasi. Masukkan darah kedalam eppendorf, sentrifugasi 2000rpm lalu setelah sel darah merah mengendap, ambil serum. Sentrifugasi serum, encerkan serum dengan *Assay buffer* dengan perbandingan 1:10, 10 $\mu$ L Sampel + 90  $\mu$ L *Assay Buffer*. Hasil kemudian dimasukkan kedalam mikroplate ELISA diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Penambahan 50 $\mu$ L blocking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Pencucian reagen dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 $\mu$ l antibodi primer dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1:500 selama 2 jam. Suspensi diambil dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 3 Kali @5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam tris buffer salin dengan perbandingan 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween selama 2 @ 5 menit. Penambahan 50 $\mu$ L substrat pNPP dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dicuci dengan PBS-Tween selama 2 @ 5 menit. Substrat TMB dimasukkan dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan NAOH 1 N selama 15 menit. Hasil dibaca pada ELISA reader dengan  $\lambda$  405 nm.

#### 4.8.6 Analisis Data

Hasil pengukuran AGE serum dan grade morfologi endotel aorta kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows XP* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : Uji normalitas data, Uji homogenitas varian , Uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test (uji Least Significant Difference)*, Uji korelasi *Pearson*.





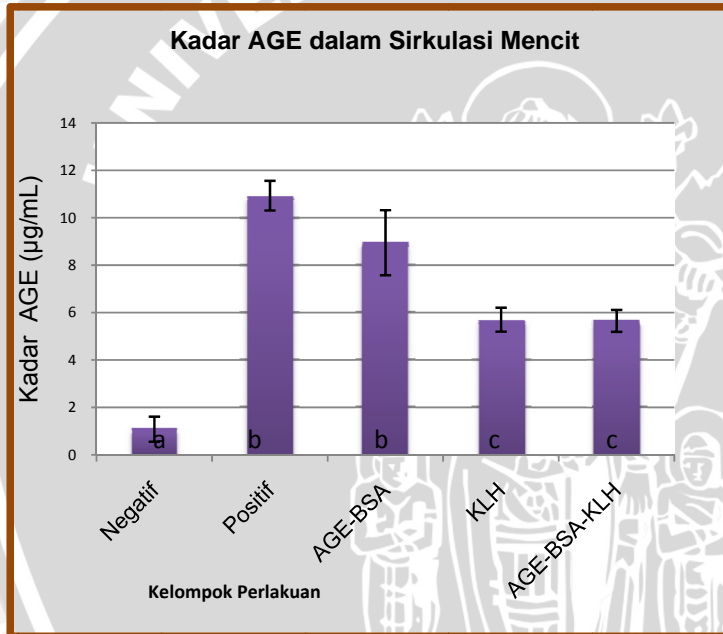
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Kadar AGE dalam Sirkulasi Mencit

Hasil penelitian kadar AGE pada sirkulasi mencit disajikan dalam grafik dibawah ini:

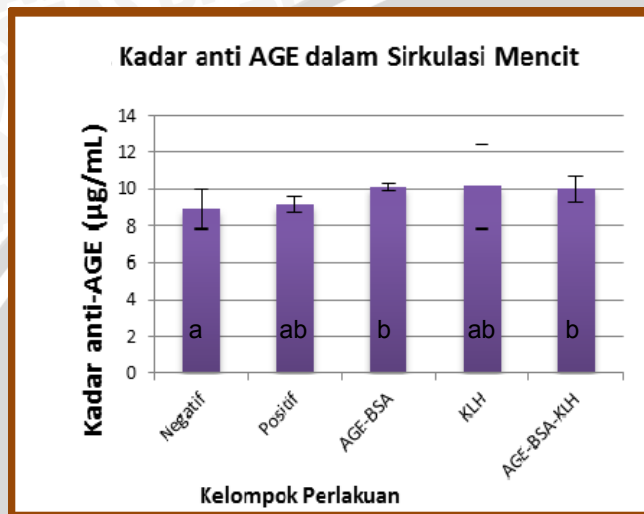


Gambar 5.1.1 Kadar AGE dalam sirkulasi mencit. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Hasil analisis Anova menunjukkan perbedaan signifikan pada kadar AGE ( $p = 0.000$ ;  $p < 0.05$ ), Korelasi Pearson menunjukkan korelasi berkebalikan yang sangat kuat dan signifikan ( $r = -0.925$ ;  $p = 0.000$ ) antara vaksinasi dengan kadar AGE. Uji regresi linier menunjukkan bahwa 84% penghambatan peningkatan AGE diakibatkan vaksinasi ( $r \text{ square} = 0.856$ ;  $\text{adjusted } r \text{ square} = 0.849$ ).

### 5.1.2 Kadar Anti-AGE dalam Sirkulasi Mencit

Hasil penelitian kadar AGE pada sirkulasi mencit disajikan dalam grafik dibawah ini:

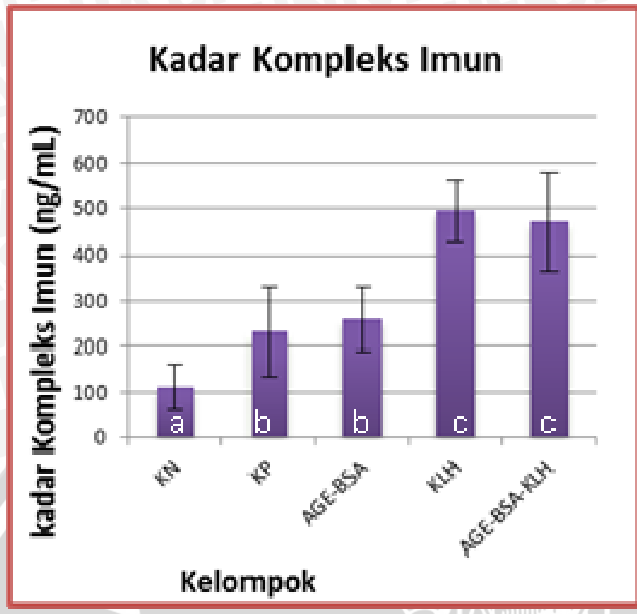


Gambar 5.1.2. Kadar Anti-AGE dalam sirkulasi mencit. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Hasil analisis Anova pada kadar Anti-AGE menunjukkan perbedaan signifikan ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ).

### 5.1.3 Kadar Kompleks Imun

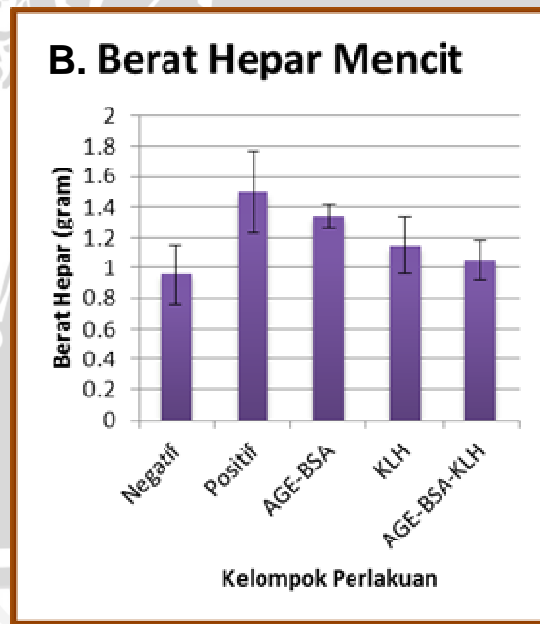
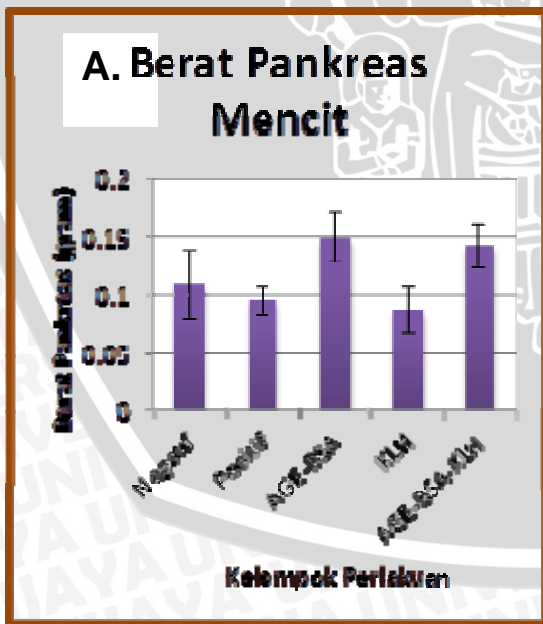
Hasil analisis Anova menunjukkan perbedaan signifikan pada kadar Imun Kompleks ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ). Korelasi pearson menunjukkan korelasi berkebalikan yang kuat dan signifikan ( $r = 0,862$ ;  $p = 0,000$ ) antara vaksinasi dengan kadar kompleks imun. Uji regresi linier menunjukkan bahwa 73% peningkatan imun kompleks diakibatkan vaksinasi ( $r \text{ square} = 0,744$ ;  $\text{adjusted } r \text{ square} = 0,731$ ) seperti yang tersaji dalam grafik dibawah ini:



Gambar 5.1.3 Kadar kompleks imun

#### 5.1.4 Berat Organ Mencit

Hasil penelitian berat organ mencit disajikan dalam grafik dibawah ini:



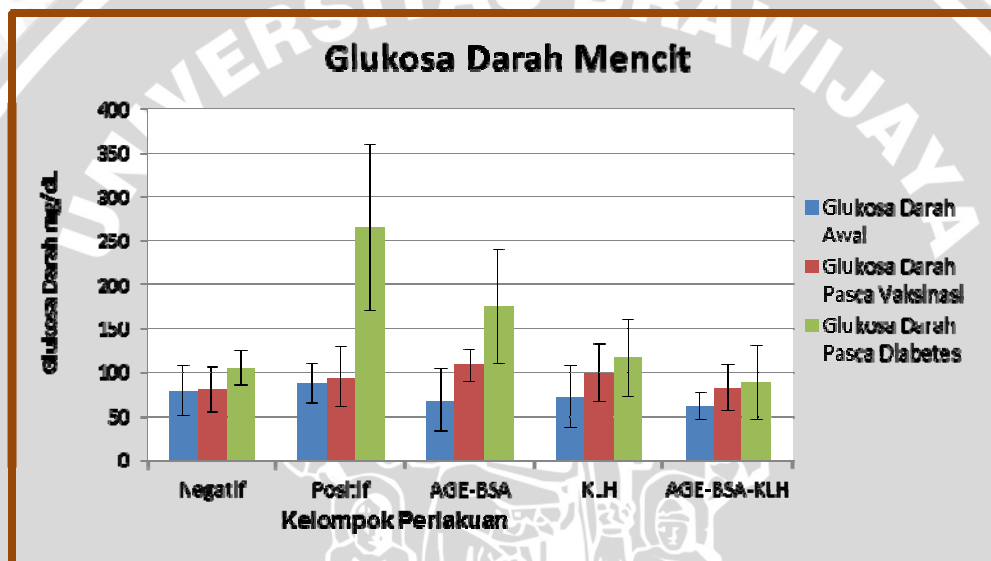
Gambar 5.1.4. A. Berat pankreas mencit. B. Berat hepar mencit



Hasil analisis Anova menunjukkan berat pankreas ( $p=0.001$ ;  $p<0.05$ ), berat hepar ( $p=0.003$ ;  $p<0.05$ ). Korelasi pearson menunjukkan terdapat korelasi sedang dan signifikan ( $r=-0.498$ ;  $p=0.010$ ) antara vaksinasi dengan berat hepar.

### 5.1.5 Glukosa Darah Mencit

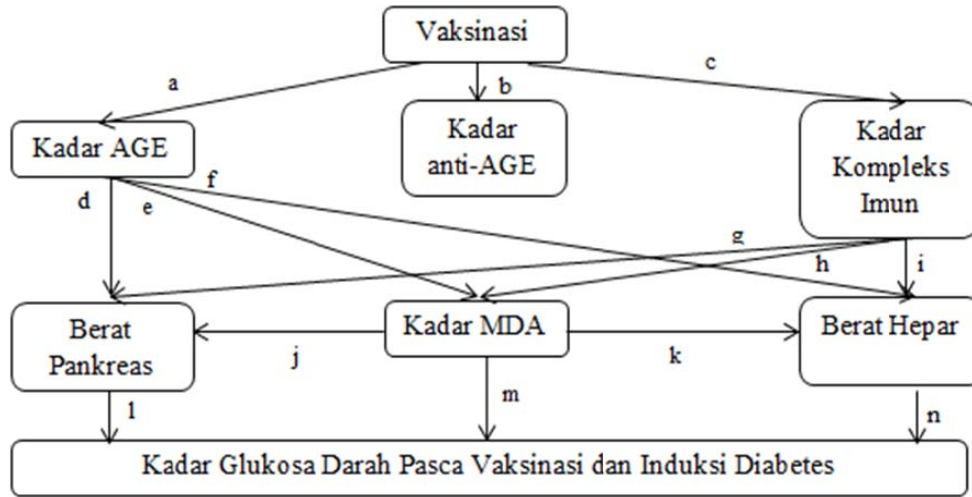
Hasil penelitian berat organ mencit disajikan dalam grafik dibawah ini:



Gambar 5.1.5 Glukosa darah mencit

Hasil uji anova menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok pada glukosa darah awal ( $p=0.376$ ;  $p<0.05$ ); glukosa darah pasca vaksinasi ( $p=0.490$ ;  $p<0.05$ ) namun, ada perbedaan yang signifikan pada glukosa darah pasca diabetes ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ). Korelasi pearson menunjukkan korelasi berkebalikan yang kuat dan signifikan ( $r=-0.765$ ;  $p=0.000$ ) antara vaksinasi dengan kadar glukosa darah pasca diabetes. Uji regresi linier menunjukkan bahwa 56% penurunan kadar glukosa diakibatkan vaksinasi ( $r^2=0.585$ ;  $adjusted\ r\ square=0.565$ ).

5.2 Analisis Pathway



No	Keterangan	Korelasi	Signifikansi	Persentase Efek
a	Vaksinasi-AGE	-0.925	0.000*	84.9%
b	Vaksinasi-antiAGE	0.321	0.111	-
c	Vaksinasi-Imun Kompleks	0.753	0.000*	53.9%
d	AGE-Berat Pankreas	-0.177	0.388	-
e	AGE-MDA	0.784	0.000*	59.8%
f	AGE-Berat Hepar	0.492	0.012**	21.1%
g	Kompleks Imun-Berat Pankreas	0.090	0.732	-
h	Kompleks Imun-MDA	-0.689	0.002*	45.3%
i	Kompleks Imun-Berat Hepar	-0.469	0.058	16.7%
j	MDA-Berat Pankreas	-0.153	0.456	-
k	MDA-Berat Hepar	0.481	0.013**	19.9%
l	Berat Pankreas-Kadar Glukosa	-0.122	0.551	-
m	MDA-Kadar Glukosa	0.500	0.009*	21.9%
n	Berat Hepar-Kadar Glukosa	0.428	0.029**	14.9%

\* Signifikan pada p<0.01 (2 Tailed)

\*\* Signifikan pada p<0.05 (2 Tailed)

Tabel 5.2.1 Analisis Data

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Kadar AGE, Anti-AGE dan Imun Kompleks pada Mencit

AGE yang terdiri atas berbagai macam jenis bahan protein yang terglikasi memiliki sifat antigenik (Horiuchi *et al.*, 1991). Penelitian Baydanoff *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa keberadaan AGE dalam tubuh mencit mampu menjadi antigen yang menstimulasi respon imun untuk memproduksi autoantibodi. Pada penelitian ini telah dibuktikan bahwa vaksinasi AGE-BSA maupun AGE-BSA-KLH meningkatkan kadar anti-AGE yang signifikan dibanding dengan kontrol positif ( $p=0.000$ ). Antibodi anti-AGE dapat bereaksi dari berbagai macam jenis protein yang terglikasi oleh AGE dan membentuk *AGE-Immune Complex* (Turk *et al.*, 2001). Hal ini dibuktikan dengan adanya peningkatan kompleks imun pada kelompok vaksinasi AGE-BSA maupun AGE-BSA-KLH. Hal ini mengakibatkan peningkatan jalur eliminasi AGE melalui endositosis oleh makrofag melalui *FcγRII-B2 receptor* (Bard *et al.*, 1998). Dengan demikian, maka akan terjadi penurunan kadar AGE pada sirkulasi. Hal ini dibuktikan dengan adanya perbedaan yang signifikan pada kadar AGE antara kontrol positif dengan mencit yang divaksinasi AGE-BSA ( $p=0.000$ ) dan AGE-BSA-KLH ( $p=0.000$ ) (Gambar.5.1.1).

Sementara itu, pada kelompok yang divaksinasi dengan KLH saja ternyata juga mengalami penghambatan peningkatan kadar AGE dibanding dengan kontrol positif ( $p=0.000$ ) (Gambar.5.1.1). Ternyata KLH merupakan glikoprotein konjugat yang diketahui memiliki kesamaan struktur dengan konjugat karbonil reaktif (Wagner *et al.*, 1995). KLH telah dibuktikan imunogenik dan



mampu mengakibatkan produksi antibodi anti-KLH yang reaktif terhadap karbonil pada mencit (Armentano *et al.*, 2006). Diduga anti-KLH akan bereaksi dengan karbonil reaktif dan menurunkan produksi AGE, khususnya yang berasal dari IgG terglykasi yang mengespresikan L-Chain (Gugliucci dan Menini, 1998). Hal ini ditunjukkan dengan tidak meningkatnya anti-AGE secara signifikan pada kelompok KLH (Gambar.5.1.2). Dengan demikian maka vaksinasi menggunakan AGE-BSA, KLH maupun AGE-BSA-KLH berpotensi sebanyak 84% untuk menghambat peningkatan kadar AGE dalam sirkulasi mencit model diabetes. Pada kelompok vaksinasi KLH dan AGE-BSA-KLH, terdapat peningkatan kadar imun kompleks yang signifikan dibanding kontrol positif ( $p=0.000$ ) (Gambar 5.1.3). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi antara antibodi-antigen pada vaksinasi mencit.

## 6.2 Berat Hepar dan Pankreas Mencit

Penderita diabetes akan mengalami perubahan morfologi pada sel beta pankreas, baik dalam ukuran maupun jumlahnya sehingga mengakibatkan penurunan berat pankreas (Butler *et al.*, 2001). Pada gambar.5.1.4 A ditunjukkan perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan AGE-BSA ( $p=0.015$ ) maupun AGE-BSA-KLH ( $p=0.001$ ). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbaikan sel pankreas pada kelompok vaksinasi AGE-BSA dan AGE-BSA KLH. Pada kondisi diabetes, terjadi peningkatan berat hepar akibat hipertrofi yang dipicu peningkatan glukosa darah (Horie *et al.*, 1997). Pada gambar 5.1.4B dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan KLH ( $p=0.009$ ) maupun AGE-BSA-KLH ( $p=0.016$ ). Hal ini menunjukkan bahwa

peningkatan berat hepar akibat hipertrofi dapat dihambat dengan vaksinasi KLH dan AGE-BSA-KLH.

### 6.3 Glukosa Darah Mencit

STZ (*Streptozotocin*) terbukti mampu merusak rantai DNA pada sel beta pankreas yang mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah (Okamoto dan Yamamoto, 1983). Pada kondisi normal, kadar glukosa darah puasa mencit berkisar antara  $\pm 85$  mg/dL, sedangkan untuk mencit diabetes yakni  $\pm 163$  mg/dL (Firdous *et al.*, 2009). Pada kelompok vaksinasi, terjadi penghambatan peningkatan kadar AGE yang kemungkinan juga mengakibatkan penurunan ROS. Hal ini didukung dengan penghambatan peningkatan MDA yang merupakan produk dari ROS. ROS merupakan faktor yang mengakibatkan terjadinya resistensi insulin di IRS-1 (Baynes dan Thorpe, 1999). Penurunan ROS akan mengakibatkan resistensi tidak terjadi dan glukosa darah terserap dengan baik, sehingga kadar glukosa dalam darah pada kelompok vaksinasi tidak akan meningkat. Penghambatan peningkatan kadar glukosa yang signifikan dibanding kontrol positif tampak pada kelompok vaksinasi KLH ( $p=0.000$ ) dan AGE-BSA-KLH ( $p=0.000$ ) (Gambar.5.1.5).

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

1. Vaksinasi dengan AGE-BSA, KLH dan AGE-BSA-KLH mampu menghambat peningkatan kadar AGE pada mencit model diabetes.
2. Vaksinasi dengan AGE-BSA dan AGE-BSA-KLH mampu meningkatkan kadar anti-AGE pada mencit model diabetes.
3. Vaksinasi dengan KLH dan AGE-BSA-KLH mampu menghambat peningkatan kadar glukosa darah pada mencit model diabetes.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara in vitro untuk mengetahui efek antibodi hasil vaksinasi AGE-BSA, KLH, dan AGE-BSA-KLH pada sel HUVEC manusia untuk mengetahui mekanisme kerja antibodi.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui efek penggunaan vaksinasi pasif dengan antibodi monoklonal anti-AGE maupun anti-KLH pada hewan coba model diabetes.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. *Identification of N- $\epsilon$ -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein.* J Biol Chem. 1986; 261: 4889–4894.
- Armentano F, Knight T, Makker S, Tramontano A. 2006. *Induction of covalent binding antibodies.* Immunol Lett 103: 51–57.
- Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, et al. 2002. *Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: A mechanism for amplification of inflammatory responses.* Circulation. 105:816–822.
- Basta G, Schmidt AM, DeCaterina R. 2004. *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes.* Cardiovasc Res. 582–92.
- Bård, Jukka, Norie, Hiroyuki dan Seikoh. *Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells.* Biochem. J. (1997) 322 (567–573).
- Baydanoff S, Konova E, Ivanova N. *Determination of anti-AGE antibodies in human serum.* Glycoconj J. 1996; 13: 335-9.
- Baynes JW, Thorpe SR. *Role of oxidative stress in diabetes complications, a new perspective on an old paradigm.* Diabetes. 1999;48:1–9.
- Brownlee M. *Advanced protein glycosylation in diabetes and aging.* Annu Rev Med. 1995; 46: 223–234.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2001. *Cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.* Diabetes 32: 102-110.
- C G Ostenson. *The Pathophysiology of type 2 Diabetes Mellitus: an overview.* Acta Physiologica Scandinavia. 2001. 171: 241-247.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2007. **P2M, PL, LITBANGKES.** (Online).<http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=283&Itemid=2>, Diakses 5 Oktober 2010. Jam 08.13.

Donnath, M.Y., Gross, D.J., Cerasi, E., and Kaiser, N. *Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islet of Psammomys obesus during development of diabetes.* 2003. *Diabetes.* 48:738.

Fauci, et al. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* The McGraw-Hill Companies, Inc: United States America. Chapter.338.

Firdous M, Koneri R, Sarvaraidu Ch, Harish M, Shubhapiya Kh. 2009. *NIDDM Antidiabetic Activity Of Saponins Of Momordica Cymbalaria In Streptozotocin-Nicotinamide NIDDM Mice.* Journal of Clinical and Diagnostic Research. (3)1460-1465.

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. *Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins.* *J Biol Chem.* 1998; 273: 18714–18719.

G. Roglic. 2006. *Diabetes mortality.* In: Gan D, ed. *Diabetes atlas.* 3rd ed. (Belgium: International Diabetes Federation, 2006) pp. 219–36.

Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Deuther-Conrad W dan Munch G. 2003. *Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs).* *J Neurochem* 87: 44-55.

Gugliucci A, Menini T: *Circulating advanced glycation peptides in streptozotocin-induced diabetic rats: Evidence for preferential modification of IgG light chains.* *Life Sci* 62 : 2141– 2150, 1998.

Guyton dan Hall. 2004. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.* Jakarta : EGC.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. 1999. *Oxygen-Toxicity, Oxygen Radicals, Transition-Metals And Disease.* *Biochemical Journal* Volume: 219 Issue: 1 Pages: 1-14

Horie K, Miyata T, Maeda K. 1997. *Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal*

glomerular lesions. Implications for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997;100:2995-3004.

Horiuchi, S., Araki, N. and Morino, Y. *Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the maillard reaction: evidence for the presence of a common structure.* 1991. *J. Biol. Chem.* 266, 7329–7332.

International Diabetes Federation. 2005. *Diabetes e-Atlas.* (Online) <http://www.eatlas.idf.org>, Diakses 5 Oktober 2010. Jam 08.07.

King, H., Aubert, R.E., and Herman, W.H. 2003. *Global Prevalence of Diabetes.* *Diabetes Care.* 21:1414.

Kliegman, R.M., Behrman, R.E., Jenson, H.B., Stanton, B.F. 2007. *Nelson Textbook of Pediatric* (18th Edition). New York: Saunders.

Mansjoer, Arif. 2007. *Kapita Selekt Kedokteran. Edisi Ketiga.* Jakarta: Media Aesculapius.

Michael S., German MD. 2007. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* (8<sup>th</sup> Edition). San Fransisco: Mc Graw hill.

Mohora, M., B. Vîrgolici, F. Paveliu, D. Lixandru, C. Muscurel, M. Greabu. 2006. *Free radical activity in obese patients with type 2 diabetes mellitus.* *Rom. J. Intern. Med* 1: 69 – 78.

Nakhjavani, M., Esteghamati, A., Nowroozi, S., Asgarani, F., Rashidi, A., Khalilzadeh, O. 2010. *Type 2 Diabetes mellitus Duration: An Independent Predictor of Serum Malondialdehyde Levels.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730399> diakses tanggal 7 Oktober 2011.

Pratico. 2008. *Basics of Oxidative Stress Immunity Today.* <http://www.immunitytoday.com/index.html> diakses tanggal 21 November 2008. Pukul 22.00.



- Price, S.A. and Wilson, L.M. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-proses Penyakit (Volume 2 Edisi 6)*. Jakarta : EGC.
- Ralph A., Defronzo ., M Abdul Ghani. *Type 2 Diabetes Can Be Prevented With Early Pharmacological Intervention*. Diabetes care. 2006: 34: 202-209.
- Rang HP & Dale MM. 1991. *The Endocrine System Pharmacology*, pp 504–508. Harlow, UK: Longman Group Ltd.
- Rani Azis, et al. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam (Jilid III Edisi IV)* .Jakarta: Pusat Penerbitan FKUI. P 1874 dan 1878.
- Resnick HE, Shorr RI, Kuller L, et al. *Prevalence and clinical implications of American Diabetes Association-defined diabetes and other categories of glucose dysregulation in older adults*. J Clin Epidemiol. 2001;54:869-876.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. 2005. *Vascular complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction*. Clinical Science 109: 143–159.
- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *ArteriosclerThromb*. 1994; 14: 1521–1528.
- Schulz LO., Ravussin E., Valencia ME., Esparza J., Bennett PH., *Effects of a Traditional Lifestyle on Obesity in Pima Indians*. Diabetes Care.1994. 17(9):1067-74.
- Setiawan B dan Suhartono E. 2005. *Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus*. Majalah Kedokteran Indonesia Volume: 55 Nomor : 2.
- Shcheglova T., Makker S., Tramontano A. 2009. *Reactive Immunization Suppresses Advanced Glycation and Mitigates Diabetic Retinopathy*. J Am Soc Nephrol 20: 1012–1019
- Suastika, K., Aryanna, I.G.P, dan Saraswati, I.M.R., Budhiarta, A.A.G, Sutanegara, I.N.D. 2004. *Metabolic Syndrome in Rural Population of Bali*. In. J Of Obesity. 28 (Suppl.1) : 26-29 May : 555.

- Sudigdo, Sofyan .2008. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis Edisi 3*. Sagung Seto:Jakarta;hal 313.
- Suyono, S. 2004. *Kecendrungan Peningkatan Jumlah Penyandang Diabetes*. In: Soegondo S., Soewondo P., Subekti I., editor. *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. 4th Ed. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. p.1-6.
- Takata, K., Horiuchi, S., Araki, N., Shiga, M., Saitoh, M. and Morino, Y. *Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins*. 1988. *J. Biol. Chem.* 263, 14819–14825.
- Tan K, Chow W, Ai V, Metz C, Bucala R, et al. 2002. *Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 25:1055–1059
- Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. *Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen*. *J Mol Biol.* 1988; 203: 495–505.
- Turk, Z., S. Ljubic, N. Turk, and B. Benko. 2001. *Detection of Autoantibodies Against Advanced Glycation End Products and AGE- immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus*. *Clin.Chim.Acta.* 303: 105–115.
- Uchigata Y., Yamamoto H., Nagai H., Okamoto H., *Effect of Poly(ADP- ribose) Synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis*. *Diabetes*. 1983. 32(4): 316-8.
- VanBerkel, T. J. C., de Rijke, Y. B. and Kruijt, J. K. 1991. *Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors : Function in Relation to Disease*. *Biol. Chem.* 226, 2282–2289.
- Vay D., Vidali M., et al. *Antibodies Against advanced Glycation End Product Nepsilon- (Carboxymethyl) lysine in Healthy Controls and Diabetic Patients*. *Diabetologia*.2000. 43(11): 1358-8.
- Wagner J, Lerner RA, Barbas CF . 1995. *Efficient aldolase catalytic anti- bodies that use the enamine mechanism of natural enzymes*. *Science* 270:1797–1800.

Wautier MP, Chappey O, Corda S, et al. 2001. *Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 280:E685–94.

WHO. 1998. *Diabetes*. (Online) [http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/), Diakses 5 Oktober 2010. Jam 08.17.

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al. 1994. *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins*. J Biol Chem. 269:9889–97.





## Lampiran 1

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Laili Fitri Ni'amita

NIM : 0910714039

Program Studi : Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas  
Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 November 2012

Yang membuat pernyataan,

(Laili Fitri Ni'amita)

NIM 0910714039

Lampiran 2

SK Dekan (4 lembar)



Lampiran 3

Hasil Analisis Data

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat_Vaksinasi	Between Groups	111.096	4	27.774	5.038	.003
	Within Groups	159.875	29	5.513		
	Total	270.971	33			
Berat_Diabetes	Between Groups	46.007	4	11.502	1.346	.277
	Within Groups	247.875	29	8.547		
	Total	293.882	33			
Glukosa_Awal	Between Groups	3154.529	4	788.632	1.099	.376
	Within Groups	20811.500	29	717.638		
	Total	23966.029	33			
Glukosa_Vaksinasi	Between Groups	2814.809	4	703.702	.815	.526
	Within Groups	25032.750	29	863.198		
	Total	27847.559	33			
Glukosa_Diabetes	Between Groups	161201.816	4	40300.454	12.345	.000
	Within Groups	94671.625	29	3264.539		
	Total	255873.441	33			
Berat_Pankreas	Between Groups	.019	4	.005	5.856	.001
	Within Groups	.024	29	.001		
	Total	.043	33			
Berat_Hepar	Between Groups	1.149	4	.287	5.287	.003
	Within Groups	1.576	29	.054		
	Total	2.725	33			
Berat_Aorta	Between Groups	.001	4	.000	13.898	.000
	Within Groups	.001	29	.000		
	Total	.002	33			
Kadar_AGE	Between Groups	407.194	4	101.798	300.169	.000
	Within Groups	9.835	29	.339		
	Total	417.029	33			
Immune_complex	Between Groups	531952.391	4	132988.098	19.523	.000
	Within Groups	115804.100	17	6812.006		
	Total	647756.491	21			



Kadar_MDA_Trans	Between Groups	.001	4	.000	13.437	.000
	Within Groups	.001	29	.000		
	Total	.001	33			
Kadar_anti_AGE	Between Groups	6.876	4	1.719	.961	.000
	Within Groups	51.858	29	1.788		
	Total	58.733	33			



Lampiran 4

Lembar *Ethical Clearance* (1 lembar)

