

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Definisi, Klasifikasi dan Prevalensi Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) kronik disertai gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein akibat defek sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. DM dapat terjadi dengan gejala khasnya poliuria, polidipsi, penglihatan kabur, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya. Pada keadaan paling berat, ketoasidosis atau keadaan hiperosmolar non-ketotik dapat muncul dan mengakibatkan stupor, koma, hingga kematian jika terapi yang efektif tidak dilakukan (WHO, 1999).

DM dibagi menjadi dua kategori utama berdasar pada sekresi insulin endogen yaitu *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) atau diabetes mellitus tipe 1 dan *non insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM) atau diabetes melitus tipe 2. DM tipe 2 merupakan tipe diabetes yang paling sering terjadi, yaitu 90-95% dari penderita DM. DM tipe 2 terjadi akibat penurunan sensitivitas reseptor insulin dan gangguan pada proses sinyal insulin. Penurunan sensitivitas dan gangguan proses sinyal insulin ini menyebabkan glukosa tidak dapat di hantarkan ke dalam sel sehingga terjadi hiperglikemia yang dapat menyebabkan berbagai komplikasi (WHO, 1999; King *et al*, 2003).

Estimasi data prevalensi diabetes mellitus di dunia menunjukkan sebanyak 6,4% atau 285 juta orang pada tahun 2010 dan akan meningkat menjadi 7,7% atau 439 juta orang pada 2030. Indonesia menempati urutan ke-9 dalam estimasi epidemiologi DM dunia pada tahun 2010 dengan 7 juta kasus dan diperkirakan akan terus naik menjadi peringkat ke-5 pada tahun 2030 dengan 20 juta kasus (Shaw *et al*, 2010).

2.1.2 Patogenesis dan Mekanisme Terjadinya Komplikasi pada Diabetes Melitus Tipe 2

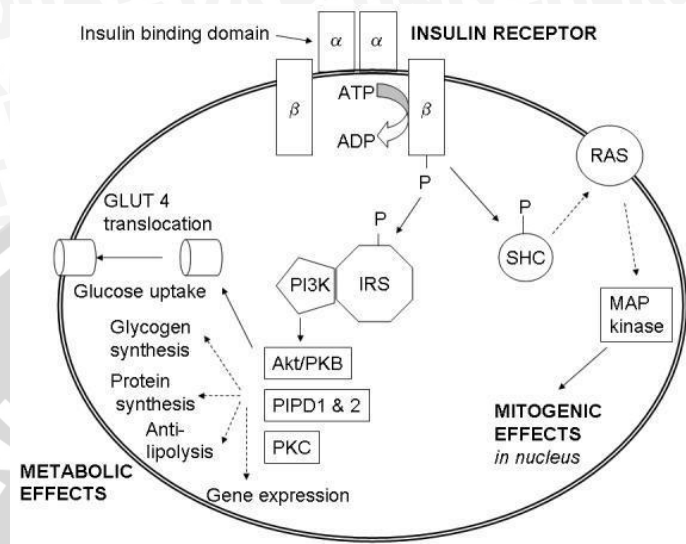
Gejala diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2) diawali karena terjadinya resistensi insulin yang terjadi di sel terutama hepar dan otot. Resistensi insulin merupakan mekanisme yang melibatkan reaksi seluler yang kompleks dan diinduksi oleh beberapa faktor terutama obesitas dan konsumsi makanan yang berlebihan. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya gangguan transportasi glukosa ke dalam sel dan peningkatan kadar glukosa dalam darah atau hiperglikemia. Hiperglikemia mengakibatkan terjadinya peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) seperti anion superoksida. Peningkatan anion superoksida oleh mitokondria dipercaya sebagai penyebab meningkatnya produksi *advanced glycation end product* (AGE) dan menyebabkan NO menjadi inaktif sehingga tak mampu membentuk peroksinitrit (Beckman, 2001). Selain itu juga terjadi aktivasi faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan AP-1 serta peningkatan sintesa faktor protrombotik seperti *tissue factor* (TF) dan *plasma activating factor-1* (PAI-1). Hal tersebut memicu timbulnya konstiksi pembuluh darah yang diikuti dengan

peningkatan tekanan darah. Keadaan ini juga menyebabkan peningkatan proliferasi otot polos pembuluh darah yang menyebabkan terjadinya penyempitan lumen pembuluh darah. Sedangkan peningkatan NF- κ B dan AP-1 akan mendorong timbulnya reaksi inflamasi akibat pelepasan berbagai kemokin (mis: MCP-1), sitokin (mis: IL-1) dan *cell adhesion molecules* (mis: ICAM-1) (Creager, 2003). Hal inilah yang menyebabkan awal pembentukan lesi aterosklerosis dan berakibat pada berbagai macam komplikasi vaskuler penyebab kematian pada diabetes (Esper *et al*, 2008).

2.1.3 Mekanisme Insulin

Insulin memiliki peran dalam mengontrol uptake glukosa ke dalam sel. Mekanisme kontrol tersebut merupakan suatu reaksi berantai yang kompleks dengan melibatkan berbagai sinyal protein (Sesti, 2006). Reaksi diawali saat insulin berikatan dengan reseptor insulin sehingga menyebabkan autofosforilasi dan aktivasi reseptor tersebut (Kwei *et al*, 2008). Reseptor insulin memiliki struktur heterotetramer yang terdiri dari subunit glikoprotein 2 α dan 2 β , yang dihubungkan dengan ikatan disulfide dan berlokasi di membrane sel. Gen yang mengkode reseptor insulin terletak pada lengan pendek dari kromosom 19. Insulin berikatan dengan subunit α ekstraseluler, yang mengakibatkan perubahan bentuk sehingga mengakibatkan ikatan ATP pada komponen intraseluler dari subunit β . Ikatan ATP akan memicu fosforilasi dari subunit β melalui enzim tirosin kinase (Wilcox, 2005). Reseptor insulin yang teraktivasi kemudian memicu fosforilasi *insulin receptor substrate* (IRS), yang selanjutnya

membentuk sebuah kompleks dengan *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3-Kinase) yang memulai kaskade reaksi terhadap sinyal dari reseptor insulin (Kwei *et al*, 2008).



Gambar 2.1 Skema jalur sinyal insulin (Wilcox, 2005)

2.1.4 *Insulin receptor substrate (IRS)*

Terdapat 4 jenis protein IRS pada seluruh sel dalam tubuh. IRS-1 merupakan IRS paling banyak terdapat dalam tubuh dan terutama diekspresikan di otot rangka dan jaringan adiposit. IRS-2 merupakan IRS penting di liver, yang berfungsi dalam aktivitas perifer dari insulin dan pertumbuhan dari sel β pankreas. IRS-3 ditemukan hanya pada jaringan adiposit, sel β , dan liver. Sedangkan IRS-4 ditemukan di timus, otak dan ginjal (Wilcox, 2005). IRS yang telah terfosforilasi akan secara spesifik mengikat *src-homology-2 domain protein* (SH2), yang meliputi enzim penting PI 3-kinase dan *phosphotyrosine phosphatase* SHPTP2 (atau Syp). PI 3-kinase akan mengakibatkan translokasi dari protein glukosa transporter, glikogen, lipid dan sintesis protein, anti-lipolisis, serta

mengatur glukoneogenesis di liver. PI 3-kinase bekerja melalui *serine* dan *threoninekinase* seperti Akt/protein kinase B (PKB), protein kinase C (PKC) dan *PI dependent protein kinases 1&2* (PIPD 1&2) (Boura-Halfon, 2009).

Kompleks IRS-1 dan PI3-Kinase mengkatalis produksi *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate* (PIP3) yang kemudian berinteraksi dengan *phosphosinositide-dependent kinase 1*(PDK1). Interaksi kompleks PIP3-PDK1 menyebabkan terjadinya fosforilasi *proteinkinase B* (PKB)/Akt dan *protein kinase C* (PKC). PKB/Akt dan PKC yang teraktivasi memicu translokasi *glucose transporter* (GLUT4) dari kompartemen internal menuju membran sel. Dengan adanya GLUT4 pada membran sel, maka sebuah sel dapat melakukan uptake glukosa dari lingkungannya (Kwei *et al*, 2008; Boura-Halfon, 2009).

2.1.5 Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-kinase)

PI 3-kinase merupakan golongan enzim yang memfosforilasi *phosphatidylinositol* (PI) *lipids* pada *3' position*. Enzim ini dibagi menjadi 3 kelas berdasarkan kemiripan rangkaian dan properti biokimiawinya yaitu kelas 1 (1A dan 1B), kelas 2 dan kelas 3. Diantara PI-3 kinase tersebut, kelas 1A merupakan golongan enzim yang berperan penting dalam meregulasi berbagai respon sel, termasuk pembelahan sel, survival, dan sinyal terhadap respon pada *tyrosine kinase receptor* seperti pada sinyal insulin (Munugalavadla, 2005; Jimenez, 2002; Wilcox, 2005).

PI3-kinase kelas 1A merupakan heterodimer yang terdiri dari *catalytic subunit* p110 dan *regulatory subunit* p85 α . Kedua enzim ini

banyak ditemukan di bagian sitoplasma sel pada sel yang normal. Pada saat teraktivasi, enzim tersebut akan bergerak menuju membran plasma yang kemudian akan berikatan dengan substratnya yaitu *phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate* (PI-4,5-P2) dan mengaktivasi *phospholipid second messengers* (PIP3). PIP3 tersebut kemudian akan berikatan dengan *pleckstrin homology* (PH) domain dari *protein kinase B/Akt* (PKB/Akt) yang akan menginduksi reaksi berantai yang berperan penting dalam translokasi *glucose transporter* (GLUT-4) menuju permukaan sel pada sel otot dan adiposa dan mengawali transportasi glukosa ke dalam sel (Foster, 2003; Luo, 2005; Wilcox, 2005).

2.1.6 Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)

PTEN merupakan antagonis dari jalur sinyal *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) kelas 1 (Chalhoub, 2009). Berbeda dengan jalur tirosin fosfatase lainnya, PTEN mengatur sinyal PI3-kinase dengan mendefosforilasi sinyal lipid antara PIP3.(Chalhoub, 2009). PTEN bertindak untuk menekan sinyal PI3K dan mematikan sinyal proliferasi dan anti-apoptosis (Chagpar, 2010). Dalam respon terhadap rangsangan ekstraseluler (misalnya, insulin, faktor pertumbuhan, kemokin), subunit katalitik dari PI3K (P110) direkrut untuk reseptor *tirosin kinase* (RTKs) atau reseptor *G protein-coupled* (GPCRs) pada membran sel melalui *regulatory subunit* (P85 atau P110), di mana terjadi fosforilasi *phosphatidylinositol-4,5bifosfat* (PIP2) untuk menghasilkan *phosphatidylinositol-3, trisphosphate 4,5* (PIP3). PTEN menekan kerja sinyal PI3K dengan

defosforilasi PIP3 pada posisi D3 untuk menghasilkan PIP2 (Chalhoub, 2009). Aktifitas PTEN dikendalikan oleh jalur PI3K, sehingga jika subunit regulasi PI3K1A (p85) menghilang, maka akan terjadi penurunan aktivitas PTEN (Barber *et al*, 2006).

2.1.7 Glucose Transporter 4 (GLUT-4)

GLUT-4 merupakan protein transporter glukosa utama yang berperan dalam memfasilitasi glukosa untuk masuk ke dalam sel. GLUT-4 yang inaktif berada di dalam sel, sehingga untuk mentransportasi glukosa, GLUT-4 harus ditranslokasikan ke membran sel (Bryant, 2002).

Translokasi GLUT-4 pada sel adiposit dan sel otot membutuhkan insulin dan konsentrasi glukosa yang tinggi, jika kondisi insulin rendah, GLUT-4 akan tersequester didalam vesikel intrasel (Bryant, 2002; Wilcox, 2005). PI 3-kinase juga merupakan protein yang penting dalam translokasi GLUT-4 ke membran sel pada sel otot dan adiposa serta menginduksi enzim-enzim yang bekerja pada downstream (Wilcox, 2005). Translokasi intraselular GLUT-4 ke membran plasma dirangsang oleh ekspresi bentuk aktif protein kinase B atau isoform atipikal protein kinase C pada percobaan kultur sel (Sheperd *et al*, 1999; Shulman, 2000). GLUT-4 dalam kondisi inaktif terikat oleh protein RAB. Protein yang terfosforilasi akan mengaktifkan GLUT-4 dengan cara berikatan dengan protein RAB sehingga protein Rab release (lepas) dari GLUT-4 dan dapat berpindah ke membran sel (Zullies, 2006). DM tipe 2 terjadi karena ketidakmampuan insulin menstimulasi translokasi GLUT-4 sehingga transport dan

metabolisme glukosa pada jaringan otot maupun adiposa tidak dapat terjadi. (Bryant, 2002).

2.2 Mekanisme *Regulatory Subunit Enzyme p85 Overexpression* dalam Menginduksi Terjadinya Resistensi Insulin

Proses utama yang berperan dalam aktivasi sinyal insulin adalah melalui jalur *insulin receptor substrate (IRS)-1/phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI 3-kinase)*. PI 3-kinase merupakan golongan enzim yang memfosforilasi *phosphatidylinositol (PI) lipids* pada *3' position*. Enzim ini dibagi menjadi 3 kelas berdasarkan kemiripan rangkaian dan properti biokimiawinya yaitu kelas 1 (1A dan 1B), kelas 2 dan kelas 3. Diantara PI-3 kinase tersebut, kelas 1A merupakan golongan enzim yang berperan penting dalam meregulasi sinyal terhadap respon pada *tyrosine kinase receptor* seperti pada sinyal insulin (Munugalavadla, 2005). PI 3-kinase kelas 1A merupakan heterodimer yang terdiri dari *catalytic subunit p110* dan *regulatory subunit p85*. Enzim ini banyak ditemukan di bagian sitoplasma sel pada sel yang normal. Pada saat teraktivasi, enzim tersebut akan bergerak menuju membran plasma yang kemudian akan berikatan dengan substratnya yaitu *phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PI-4,5-P2)* dan mengaktivasi *phospholipid second messengers (PIP3)*. PIP3 dan PI-4,5-P2 tersebut kemudian akan berikatan dengan *pleckstrin homology (PH) domain* dari *protein kinase B/Akt (PKB/Akt)* yang akan menginduksi reaksi berantai yang berperan penting dalam translokasi *glucose transporter (GLUT-4)* menuju permukaan sel dan mengawali transportasi glukosa ke dalam sel (Foster, 2003; Luo, 2005). Pada orang

dengan DM tipe 2 terjadi ketidakseimbangan komposisi antara 2 subunit enzim PI 3-kinase kelas 1A yaitu *catalytic subunit* p110 dan *regulatory subunit* p85. *Diet-induced* obesitas menghasilkan peningkatan yang signifikan terhadap ekspresi subunit protein regulator p85 dari PI 3-kinase kelas 1A dalam otot skelet, hepar dan jaringan adiposit. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi p85 bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi insulin pada penderita DM tipe 2. p85 menyebabkan inhibisi pada ikatan p110 dengan *tyrosinephosphorilated IRS protein* dan mengaktivasi *lipid phosphatase* (PTEN) yang mengakibatkan terjadinya hambatan pada aktivasi reseptor insulin. Penelitian oleh Taniguchi et al (2007) juga menunjukkan bahwa p85 mampu mengaktivasi kompleks *Jun N-terminal kinase* (JNK) yang berperan dalam proses degradasi reseptor insulin di permukaan sel. Ketiga mekanisme tersebut menunjukkan bahwa p85 berperan penting dalam proses resistensi insulin yang mengawali terjadinya diabetes melitus tipe 2 (Draznin, 2006, Taniguchi, 2007, Chapgar, 2010).

2.3 Potensi *Regulatory Subunit Enzyme p85* sebagai Target Vaksinasi

Peran penting *regulatory subunit enzyme p85* dalam proses resistensi insulin juga ditunjukkan dengan peningkatan sensitivitas insulin yang terjadi saat terdapat gangguan pada produksi dan aktivitas enzim tersebut. Penelitian oleh Ueki et al (2002) menunjukkan hambatan pada aktivitas enzim p85 secara *in vitro* pada sel *L6 myotube* mampu meningkatkan sensitivitas insulin yang ditunjukkan dengan peningkatan

transpor glukosa ke dalam sel. Penelitian lain oleh Barbour *et al* (2005) juga menunjukkan pada tikus dengan kerusakan genetik yang mengakibatkan gangguan pada produksi enzim p85, terjadi peningkatan sensitivitas insulin yang signifikan di banding kelompok kontrol yang produksi enzimnya normal (Ueki, 2002; Barbour, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa inhibisi enzim p85 merupakan target yang potensial dalam pengembangan terapi pencegahan DM tipe 2. Beberapa studi imunologis dengan menggunakan antibodi terhadap p85 dilakukan untuk mendeteksi enzim p85 secara *in vitro* dan mempelajari fungsinya pada berbagai jenis sel. Penelitian oleh Backer (2010) menunjukkan bahwa penggunaan p85 sebagai antigen mampu menginduksi pembentukan antibodi yang spesifik pada kelinci. Antibodi tersebut mampu berikatan secara spesifik dengan enzim p85 yang diekspresikan pada sitoplasma sel secara *in vitro*. Antibodi terhadap p85 dan p110 secara keseluruhan mampu berikatan secara spesifik dan menghambat aktivitas enzim tersebut pada *GRC + LR73 cells* (Mc Ilroy, 1997). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat respon imunologis tubuh terhadap antigen p85 tersebut yang menunjukkan bahwa enzim p85 merupakan target vaksinasi yang menjanjikan.

2.4 Prinsip Vaksinasi

Vaksin dapat didefinisikan sebagai keseluruhan atau sebagian mikroorganisme yang diberikan untuk meningkatkan respon imunitas terhadap mikroorganisme tersebut. Vaksin dapat terdiri dari seluruh mikroorganisme yang inaktif, bagian dari organisme, kapsul polisakarida

terkonjugasi oleh protein karier, mikroorganisme yang dilemahkan, dan toxoid serta protein-protein yang bersifat imunogenik. Vaksin dapat menginduksi imunitas melalui stimulasi dari pembentukan antibodi. 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 serta memfasilitasi fagositosis bakteri. Aktivitas antibodi tersebut terus dikembangkan pemanfaatannya sehingga pada saat ini tidak hanya terbatas pada pencegahan pada infeksi namun juga pada beberapa penyakit yang melibatkan reaksi imunologis tertentu (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 mulai pada bayi yang baru lahir. Vaksin terkonjugasi dengan karier protein dapat menginduksi antibodi lebih banyak, sel memori dapat memberikan respon booster pada paparan ulangan antigen, dan imunitas jangka panjang. Ajuvan digunakan dalam berbagai vaksin untuk menambah respon imun (Kliegman *et al.*, 2007).