

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Mekanisme vaksin p85 dalam menurunkan kadar P85 pada jaringan lemak tikus

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan 90-95% kasus diabetes melitus dan terjadi akibat adanya resistensi insulin. Resistensi insulin merupakan mekanisme yang melibatkan reaksi seluler yang kompleks dan diinduksi oleh beberapa faktor terutama obesitas dan konsumsi makanan yang berlebihan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pada orang dengan obesitas terdapat overekspresi p85. Adanya overekspresi dari p85 ini diketahui mempengaruhi terjadinya resistensi insulin pada DM tipe 2. Overekspresi p85 terjadi karena adanya ketidakseimbangan komposisi antara 2 subunit enzim PI 3-kinase kelas 1A yaitu *catalytic subunit* p110 dan *regulatory subunit* p85.

Resistensi insulin pada overekspresi p85 terjadi melalui 3 mekanisme. Mekanisme pertama yaitu p85 menyebabkan inhibisi pada ikatan p110-p85 $\alpha$  heterodimer dengan reseptornya pada *tyrosine-phosphorylated IRS protein* melalui sifatnya sebagai antagonis kompetitif pada reseptor tersebut. IRS merupakan suatu ligan yang diaktifkan oleh tirosin kinase yang memiliki fungsi sebagai jalur transduksi insulin dalam meregulasi *regulatory subunit* protein di dalam sel, termasuk p85. Fosforilasi tyrosine pada golongan IRS membentuk homolog-homolog (SH2) domain yang berikatan dengan P13K dan GRB-2. P13K adalah

heterodimer yang terdiri dari subunit p85 dan subunit p110. Subunit p110 terdiri dari p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , dan p110 $\delta$ . Subunit-subunit tersebut akan berikatan dengan isoform p85 (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ ). Mekanisme kedua yaitu p85 mampu mengaktivasi *lipid phosphatase* (PTEN) yang mengakibatkan terjadinya hambatan pada aktivasi reseptor insulin. Protein regulator p85 $\alpha$  yang berlebih pada kondisi resistensi insulin akan berikatan secara langsung dengan PTEN dan meningkatkan aktivitas PTEN. *N-terminal SH3-BH region* merupakan region yang memfasilitasi pengikatan dan regulasi PTEN dan hanya terdapat pada *regulatory subunit* p85 $\alpha$ , tidak pada p55 $\alpha$  dan p50 $\alpha$  yang merupakan isoform dari p85. Mekanisme ketiga didasarkan pada penelitian oleh Taniguchi et al (2007) yang menunjukkan bahwa p85 mampu mengaktivasi kompleks *Jun N terminal kinase* (JNK) yang berperan dalam proses degradasi reseptor insulin di permukaan sel. Ketiga mekanisme ini menunjukkan bahwa p85 berperan penting dalam proses resistensi insulin yang mengawali terjadinya diabetes mellitus tipe 2 (Draznin, 2006, Taniguchi, 2007, Chagpar, 2010).

Vaksin dapat menginduksi imunitas melalui stimulasi dari pembentukan antibodi, imunitas seluler, maupun keduanya. Perlindungan yang diinduksi oleh kebanyakan vaksin diyakini dimediasi secara primer oleh limfosit B, yang menghasilkan antibodi. Antibodi tersebut dapat menginaktivasi toksin, menetralkan antigen asing dan mencegah penempelan ke reseptor seluler, memfasilitasi fagositosis dan pembunuhan bakteri, berinteraksi dengan komplemen untuk melisis

bakteri, dan mencegah adhesi bakteri ke permukaan mukosa. 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 (Kliegman et al., 2007).

Pada penelitian ini, pencegahan resistensi insulin diharapkan dapat dilakukan dengan pemberian vaksin berbasis induksi antibodi spesifik terhadap p85. Vaksin ini dibuat menggunakan antigen p85. Berdasarkan prinsip vaksinasi yang telah dipaparkan sebelumnya, diharapkan vaksin ini mampu menginduksi terbentuknya antibodi spesifik terhadap p85, sehingga ekspresi p85 yang berlebihan pada kondisi resistensi insulin dapat ditekan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari rata-rata ekspresi p85 tiap kelompok, nilai terendah didapatkan pada kelompok antigen p85+ajuvan, antigen p85, dan kontrol negatif berturut-turut. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin p85, baik dengan ajuvan maupun tidak dengan ajuvan, mampu menurunkan ekspresi p85 pada jaringan lemak tikus hingga kadar yang hampir sama dengan keadaan normal (kontrol negatif). Dari hasil analisis terhadap kadar p85 dari lima kelompok sampel penelitian menggunakan uji One-way ANOVA (*Analysis of Variance*), didapatkan nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat minimal 2 kelompok yang memiliki kadar p85 berbeda signifikan. Kemudian analisis dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey dan didapatkan

perbedaan yang tidak bermakna diantara kelompok kontrol negatif dengan kelompok antigen p85+ajuvan ( $p=0,469$ ), kelompok antigen p85 ( $p=0,756$ ), dan kelompok ajuvan ( $p=0,148$ ) dengan  $p<0,05$  dinyatakan sebagai batas signifikansi. Selain itu, terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol positif dengan kelompok antigen p85+ajuvan ( $p=0,000$ ), kelompok antigen p85 ( $p=0,000$ ), dan kelompok ajuvan ( $p=0,000$ ). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian vaksinasi dengan antigen p85+ajuvan, antigen p85, dan ajuvan memiliki pengaruh yang hampir sama dalam menurunkan kadar p85 pada jaringan lemak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.

Salah satu permasalahan dalam metode vaksinasi yang masih menjadi perdebatan hingga saat ini adalah efektivitas antibodi yang dihasilkan dari induksi vaksin dalam mengikat antigen intraselular seperti p85 $\alpha$ . Regulatory subunit p85 $\alpha$  merupakan sebuah protein yang berada di sitoplasma sel, terutama pada sel adiposit. Berbagai penelitian mengenai induksi antibodi dan vaksinasi yang telah berkembang lebih banyak terbatas pada antigen maupun patogen ekstraselular. Namun demikian penelitian terbaru menunjukkan bahwa antibodi terbukti juga berperan dalam mekanisme imunitas intraselular. Penelitian oleh Disis (2004) menunjukkan bahwa vaksinasi menggunakan *HER-2/neu intracellular domain protein* terbukti mampu meningkatkan kadar antibodi terhadap protein tersebut pada pasien dengan *HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancers*. Antibodi yang dihasilkan terbukti mampu berikatan secara spesifik pada protein *HER-2/neu* yang diekspresikan oleh *human*

*breast cancer cell line SKBR3* (Disis, 2004). Penelitian lain oleh Douglas (2013) menunjukkan bahwa protein *heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1* (hnRNP A1) mampu menginduksi pembentukan autoantibodi yang diduga berperan pada patogenesis penyakit autoimun *multiple sclerosis* (MS). Antibodi IgG yang dihasilkan mampu melakukan penetrasi ke dalam sel saraf dan menyebabkan redistribusi dari protein hnRNP A1. Mekanisme ini dipercaya terjadi melalui endositosis yang di mediasi oleh *clathrin* yang terdapat pada permukaan sel (Douglas, 2013). Selain itu, beberapa penelitian juga membuktikan bahwa sel-sel tubuh mengekspresikan reseptor IgG pada bagian sitoplasma, *tripartite motif containing 21* (TRIM21) yang mampu mengikat antibodi dengan afinitas yang lebih tinggi dibandingkan reseptor IgG lainnya dalam tubuh. Ikatan yang terjadi menyebabkan perekrutan antibodi IgG ke dalam sitosol dan menginduksi degradasi antigen target melalui ubiquitinasi (Rhodes, 2007; Mallery, 2010). Selain itu, berdasarkan studi imunologis penggunaan p85 sebagai antigen terbukti mampu menginduksi pembentukan antibodi spesifik pada kelinci. Antibodi tersebut mampu berikatan secara spesifik dengan *regulatory subunit* p85 yang diekspresikan pada sitoplasma sel secara *in vitro* (Mc Ilroy, 1997; Backer, 2010).

## **6.2 Pengaruh pemberian vaksinasi p85 dalam menurunkan berat visceral fat**

Obesitas merupakan suatu kondisi dimana ditandai dengan terjadinya peningkatan berat badan dan penumpukan lemak yang

berlebihan di dalam tubuh (*abdominal visceral fat*). Penelitian telah menunjukkan bahwa manusia dengan lemak *visceral* lebih berisiko tinggi terhadap penyakit seperti diabetes mellitus, dimana pembentukan lemak *visceral* dapat diukur dengan menggunakan CT scan dan membutuhkan waktu yang panjang untuk munculnya manifestasi klinik hingga 5 sampai 10 tahun (Wander et al, 2013). Penumpukan lemak *visceral* ditunjukkan dengan aktifitas hiperlipolitik dimana aktifitas tersebut resisten terhadap efek antilipolitik insulin. Meningkatnya asam lemak bebas di dalam darah dan hipergliserolemia di dalam vena porta akan meningkatkan produksi TG dan akan memicu peningkatan produksi glukosa di dalam hepar dan menurunkan *clearance* insulin hepar yang dapat mengakibatkan terjadinya dislipidemia, hiperinsulin, resistensi insulin dan diabetes (Nagao et al, 2013; Cruz et al, 2002). Hasil Uji ANOVA terhadap berat *visceral fat* menunjukkan nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Uji Post Hoc Tukey didapatkan perbedaan yang bermakna pada hubungan antara kontrol negatif dengan kelompok ajuvan dan kontrol positif dengan kelompok antigen p85 yang berarti pemberian vaksinasi dengan antigen p85 tidak memberikan penurunan yang lebih baik pada berat dari *abdominal visceral fat*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa obesitas dan diet tinggi energi menjadi penyebab utama terjadinya resistensi insulin melalui peningkatan ekspresi protein subunit p85 sehingga kadar p85 dan berat *visceral fat* digunakan sebagai indikator resistensi insulin pada penelitian ini. Pemberian vaksinasi p85 mampu menurunkan kadar p85

pada jaringan lemak tikus dan menurunkan berat lemak tikus yang diinduksi DM tipe 2 secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Kedua mekanisme inilah yang secara sinergis mampu mencegah terjadinya resistensi insulin pada diabetes mellitus tipe 2 yang diinduksi oleh obesitas.

### 6.3 Pengaruh pemberian vaksinasi p85 terhadap glukosa darah

Pada DM terjadinya resistensi insulin yang menyebabkan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga jumlah glukosa dalam darah tetap tinggi atau disebut hiperglikemia. 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 (King et al, 2000; WHO, 2010). Pada penelitian ini kadar glukosa darah digunakan sebagai indikator terjadinya diabetes mellitus. Pada uji One-way ANOVA (*Analysis of Variance*) didapatkan nilai yang tidak bermakna  $p = 0,078$  ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Namun demikian dapat dilihat bahwa kadar glukosa memiliki kecenderungan semakin menurun pada kelompok perlakuan yang diberikan vaksinasi antigen p85 dan p85 dengan ajuvan jika dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok yang hanya diberikan ajuvan. Hal ini dapat disebabkan karena manifestasi glukosa darah terhadap DM dipengaruhi dengan banyak faktor yang mungkin pada penelitian ini belum tergambarkan secara keseluruhan. Namun setidaknya

hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksinasi dengan antigen p85 mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi diabetes melitus tipe 2. Terjadinya penurunan kadar glukosa dalam darah tikus pada kelompok yang di vaksinasi sesuai dengan penelitian yang menunjukkan terjadinya peningkatan sensitivitas insulin saat terdapat gangguan pada aktivitas enzim tersebut (Terauchi, 1999). Hambatan pada aktivitas *regulatory subunit* p85 secara *in vitro* pada sel *L6 myotube* juga terbukti mampu meningkatkan sensitivitas insulin melalui peningkatan transpor glukosa ke dalam sel (Terauchi, 1999; Ueki, 2002).

#### **6.4 Aplikasi klinis protein p85 sebagai vaksin DM tipe 2**

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik kronis dengan prevalensi tertinggi dan penyebab kematian terbesar di dunia dan hingga saat ini belum ditemukan metode pencegahan yang efektif untuk mengatasi penyakit tersebut. Sehingga aplikasi klinis yang diharapkan dari penelitian ini kedepannya adalah pemberian vaksinasi dengan p85 memiliki potensi yang sangat kuat sebagai kandidat metode preventif yang efektif dalam mencegah terjadinya penyakit diabetes melitus tipe 2 dan komplikasi yang disebabkan oleh penyakit tersebut. Saat ini, penelitian ini berada pada tahap *explorational stage roadmap* pengembangan vaksin dimana pada tahap ini dilakukan kajian pustaka dan dilakukan percobaan secara *in vivo*. Selanjutnya akan dilakukan yaitu tahap penelitian pre-clinical stage dengan melakukan percobaan secara *in vitro* untuk



mengetahui dosis vaksin, mekanisme kerja vaksin, dan potensi induksi protein p85 $\alpha$  dalam meningkatkan respon antibodi spesifik.

