

**PERBANDINGAN PENGARUH VITAMIN A TERHADAP PERSENTASE
SEL APOPTOSIS DAN SEL NORMAL NEURON PIRAMIDAL KORTEKS
CEREBRI TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Lia Dia Farida

NIM 145070100111007

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**PERBANDINGAN PENGARUH VITAMIN A TERHADAP PERSENTASE
SEL APOPTOSIS DAN SEL NORMAL NEURON PIRAMIDAL KORTEKS
CEREBRI TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Lia Dia Farida

NIM 145070100111007

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PERBANDINGAN PENGARUH VITAMIN A TERHADAP PERSENTASE SEL
APOPTOSIS DAN SEL NORMAL NEURON PIRAMIDAL KORTEKS CEREBRI
TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2**

Oleh:

Lia Dia Farida
145070100111007

Telah diuji pada
Hari: Selasa

Tanggal: 10 April 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Syifa Mustika, Sp.PD
NIP. 197804302012122001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji III,

drg. Prasetyo Adi, MS
NIP. 195604161983031001

dr. Imam Sarwono, Sp.PA
NIP. 195211111980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001



*Tugas Akhir ini saya persembahkan
untuk Ibuk dan Ayah saya,
"Akhirnya ada sarjana di keluarga
kita. Semoga dapat berlanjut hingga
menjadi dokter yang amanah".*

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lia Dia Farida

NIM : 145070100111007

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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

Malang, 3 April 2018

Yang membuat pernyataan,

Lia Dia Farida

NIM. 145070100111007

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah, kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala, atas petunjuk dan karunia-Nya serta limpahan rahmat-Nya, sehingga penulis *akhirnya* dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini dengan lancar dan tepat waktu. Tugas Akhir yang berjudul "Perbandingan Pengaruh Vitamin A terhadap Persentase Sel Apoptosis dan Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2" ini merupakan salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

- 1 Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- 2 dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K) sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- 3 dr. Prasetyo Adi, MS, selaku Pembimbing I, yang telah membimbing saya dengan sabar dalam mengerjakan Tugas Akhir ini, dan juga telah membentuk pola pikir saya terhadap dunia penelitian sehingga minat saya semakin meningkat untuk menjadi seorang peneliti
- 4 dr. Imam Sarwono, Sp.PA, selaku Pembimbing II yang santai tetapi selalu memberikan solusi, dan senantiasa membantu saya dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini sehingga dapat selesai sesuai target.

Penulis mohon maaf karena telah menyibukkan masa pensiun Dokter untuk tetap menjadi dosen pembimbing saya.

5. Yang tercinta, Ibuk saya, Nurmahmudah, dan Ayah saya, Supeno, juga kakak dan adik saya, Choirul Anam Lukmana dan Risa Yuliana yang senantiasa memberikan dukungan dalam bentuk doa, kasih sayang, dan motivasi kepada saya sehingga dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

6. Untuk dr. Novi Khila Firani, Sp.PK, selaku partner penelitian drg. Prasetyo Adi yang bersedia menjadikan variable ini sebagai penelitian paying saya, yang berkenan memberikan data tersebut kepada saya sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.

7. Kepada segenap tim pengelola Tugas Akhir FKUB khususnya dr. Elly Mayangsari, M.Biomed, dr. Yhusi Karina, M. Biomed serta mbak Betty Anggraeni Permatasari, SAP yang telah membantu saya dalam melengkapi administrasi Tugas Akhir.

8. Untuk sahabat saya, Geng Wisuda Disek (Della Putri Arumsari, S.T.P, Zahirotul Ilmi, S.Kep, Putri Wijayanti, S.Gz, dan Dea Amanda Lutfi Harris, S.T.) yang dengan sabar menemani saya sejak zaman SMPN 4 Kepanjen 2007 hingga kini.

9. Untuk sahabat saya di Program Studi Kimia FMIPA UB (Malisa Yuliardi Putri, S.Si, Ningtyas Megarahayu, S.Si, Masitha Dwi Amira, S.Si dan Anindya Cahya Fatcha, S.Si) yang bersedia menemani masa transisi saya dari menjadi mahasiswa FMIPA menjadi mahasiswa FK. Serta seluruh teman-teman saya di Kimia-C 2013 Semester 1-2 yang tak dapat saya sebutkan satu per satu.

10 Sahabat saya yang tiap hari SMS Signa 3x1, sahabat se-introvert dan se-OCD yang sering sampai di kelas Pendidikan Dokter A pukul 06.00 WIB,

Annisa Aulia Maghfirani Sudarmadi. Terima kasih tidak pernah bosan dengan diri ini.

11 Sahabat se-per-hijrah-an penulis, Fastabiqul Khairat (Iis Novianti Rosyida, Hastin Nurul Hidayati, Kurnia Auliyana Ar Rahmah, Khalifah Lummi Wewang, Yussika Fernanda dan Fathia Rosyida) yang selalu mengingatkan saya untuk kembali kepada Allah SWT, menemani susah-senang di masa prelinik P.S. Kedokteran UB.

12 Sahabat seperjuangan di Lembaga Studi Ilmiah Mahasiswa (LSIM) FKUB periode 2015-2018 dan sahabat se-per-drama-an di Badan Analisis dan Pengembangan Ilmiah Nasional (BAPIN-ISMKI) periode 2016-2018 yang sudah membuat hidup di perkuliahan begitu berwarna karena organisasi.

13 Sahabat semeja dan seperjuangan di Kelas Diseksi 2015, 2016, 2017, untuk kakak-kakak, teman-teman, dan adik-adik tingkat yang sudah berjuang melawan bau cadaver dan myalgia akibat terlalu lama berdiri di Laboratorium Anatomi Makros FKUB.

14 Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh sebab itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 3 April 2018

Penulis

ABSTRAK

Farida, Lia Dia. 2018. **Perbandingan Pengaruh Vitamin A terhadap Persentase Sel Apoptosis dan Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Prasetyo Adi, MS, (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA

Diabetes Melitus (DM) merupakan sekumpulan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari defek sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Hiperglikemia kronis pada DM diasosiasikan dengan terjadinya penurunan fungsi kognitif dan memori pada penderitanya yang diwakili dengan meningkatnya kehilangan neuron pada korteks serebri. Hiperglikemia memicu produksi *advanced glycation end-products* (AGEs) dan merusak sel-sel target melalui beberapa mekanisme. AGEs memodifikasi protein intraseluler sehingga fungsinya menjadi berubah, memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS), dan meningkatkan ekspresi gen-gen pro-inflamasi. Vitamin A bersifat antioksidan karena struktur rantai hidrofofik unit polietilen yang dapat menetralkan radikal bebas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal lapisan neuron piramidal pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2. Penelitian ini menggunakan uji eksperimental murni secara *in vivo* di laboratorium dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Sampel histopatologi diamati dengan pengecatan HE di bawah perbesaran objektif 40X. Hasil analisis menggunakan one-way ANOVA diperoleh nilai signifikansi 0.003 dan koefisien korelasi Spearman diperoleh (r) -0.791 yang berarti korelasi negatif yang kuat. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu terdapat pengaruh signifikan dari pemberian vitamin A terhadap berkurangnya persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

Kata Kunci: Vitamin A, Diabetes Melitus tipe 2, Neuron Piramidal Korteks Cerebri.

ABSTRACT

Farida, Lia Dia. 2018. **Comparison of Vitamin A Effects to Apoptotic and Normal Cells Percentage of Pyramidal Neurons in Cerebral Cortex of Rats Model Type 2 Diabetes Mellitus.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Prasetyo Adi, MS, (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA.

Diabetes Mellitus (DM) is a cluster of metabolic diseases characterized by hyperglycaemia resulted from insulin secretion defect, insulin activity defect or both. Chronic hyperglycaemia in DM is associated with memory and cognitive function impairment that represented by the increase in neuronal loss in cerebral cortex. Hyperglycaemia triggers production of advanced glycation end-products (AGEs) and disrupts target cells through several pathways. AGEs modify intracellular proteins and impair their function, lead to reactive oxygen species (ROS) production, and promote expression of pro-inflammatory genes. Vitamin A has antioxidant property because of its chains of hydrophobic polyethylene unit structure that neutralize free radicals. The objective of this experiment is to compare the effect of Vitamin A on Percentage between Apoptosis and Normal Pyramidal Neurons in Cerebral Cortex of Type 2 Diabetic Rats Model. This study is conducted with pure experimental design in vivo in the laboratory with Randomized Post Test Only Controlled Group. Histological samples are observed with H&E staining under objective magnification of 40X. The data is analysed with one-way ANOVA with significance value of 0.003 and Spearman correlation coefficient of (r) -0.791 which means strong negative correlation. It is concluded that there is significant effect of vitamin A on percentage between apoptosis and normal pyramidal neuron in cerebral cortex of type 2 diabetic rats model.

Keyword: Vitamin A, Type 2 Diabetes Mellitus, Pyramidal Neuron Cerebral Cortex.

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Judul.....	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Halaman Persembahan.....	iv
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	v
Kata Pengantar.....	vi
Abstrak.....	vii
Abstract.....	x
Daftar Isi.....	xi
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Singkatan.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4 Manfaat penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Diabetes Melitus.....	6
2.1.1 Regulasi Homeostasis Glukosa.....	6
2.1.2 Definisi Diabetes Melitus.....	7
2.1.3 Klasifikasi Diabetes Melitus.....	7
2.1.4 Etiologi dan Klasifikasi Diabetes Melitus.....	9
2.1.5 Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2.....	10
2.1.6 Diagnosis Diabetes Melitus.....	11
2.1.7 Penatalaksanaan Diabetes Melitus.....	13
2.1.8 Komplikasi Diabetes Melitus.....	14
2.1.9 Mekanisme Kerusakan Organ yang Diinduksi Hiperglikemia.....	15
2.1.9.1 Meningkatnya Fluks Jalur Polyol.....	15
2.1.9.2 Peningkatan Pembentukan AGEs Intraseluler.....	16
2.1.9.3 Aktivasi Protein Kinase C (PKC).....	17
2.1.9.4 Peningkatan Fluks Jalur Heksosamin.....	17
2.1.10 Penurunan Fungsi Kognitif pada Penderita DM.....	18
2.2 Mekanisme Kematian Sel.....	19
2.2.1 Apoptosis.....	20
2.2.2 Nekrosis.....	21

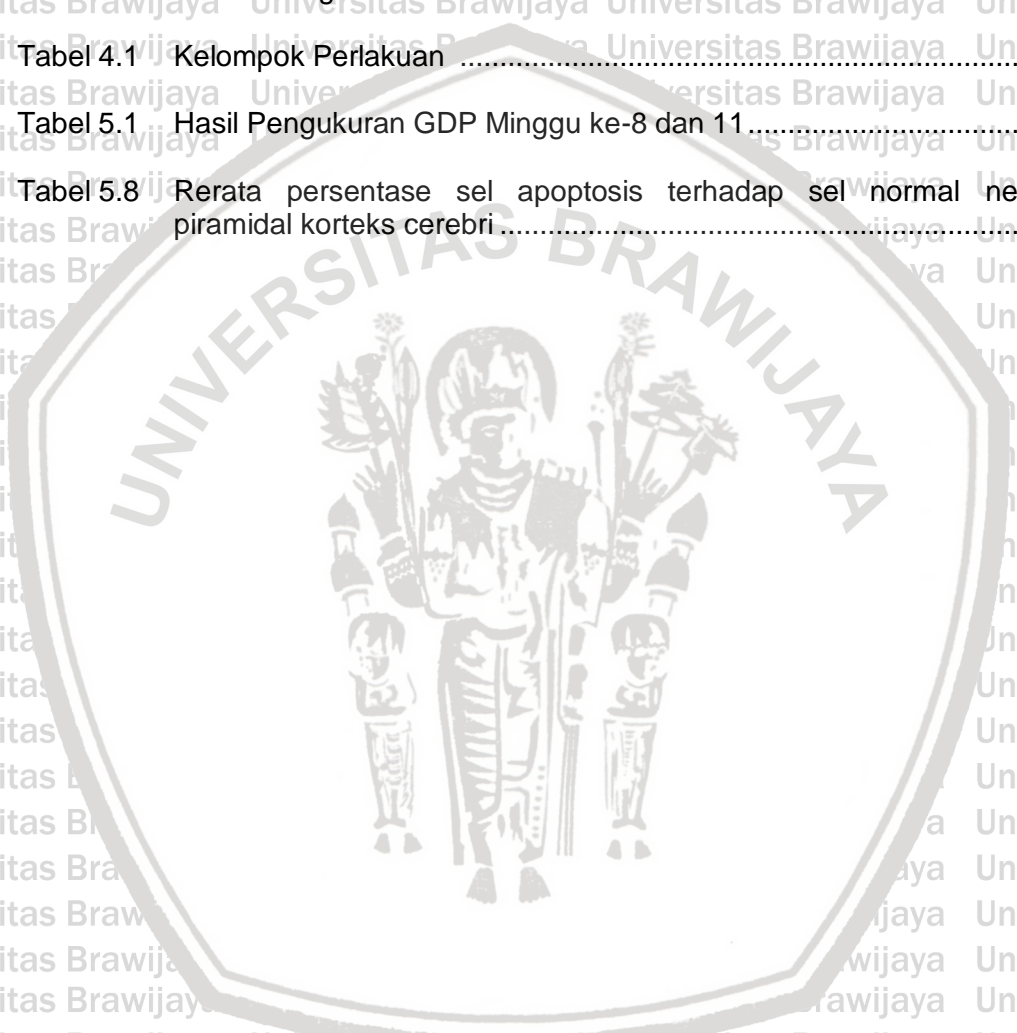
2.3	Neuron Piramidal Korteks Cerebri.....	22
2.2.1	Apoptosis Neuron Piramidal.....	22
2.4	Pengaruh Vitamin A terhadap Fungsi Kognitif Penderita DM.....	24
2.5	Hewan Coba Model Diabetes Melitus Tipe 2.....	25
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		26
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	26
3.2	Hipotesis Penelitian.....	28
BAB 4. METODE PENELITIAN		29
4.1	Rancangan penelitian.....	29
4.2	Sampel penelitian.....	29
4.2.1	Jumlah Sampel.....	30
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	31
4.4	Variabel penelitian.....	31
4.4.1	Variabel bebas.....	31
4.4.2	Variabel terikat.....	31
4.4.3	Variabel terkendali.....	31
4.5	Definisi operasional.....	32
4.5.1	Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.....	32
4.5.2	Dosis Suplemen Vitamin A.....	32
4.5.3	Neuron Piramidal Korteks Cerebri.....	32
4.5.4	Sel Apoptosis Neuron Piramidal Korteks Cerebri.....	33
4.5.5	Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri.....	33
4.6	Bahan dan alat penelitian.....	34
4.6.1	Bahan dan alat pemeliharaan hewan coba.....	34
4.6.2	Bahan dan alat diet normal.....	34
4.6.3	Bahan dan alat diet tinggi lemak.....	34
4.6.4	Bahan dan alat induksi streptozotocin (STZ).....	35
4.6.5	Bahan dan alat pembuatan sediaan vitamin A.....	35
4.6.6	Bahan dan alat pengukuran glukosa darah tikus.....	35
4.6.7	Bahan dan alat pembedahan dan fiksasi tikus.....	35
4.6.8	Bahan dan alat pembuatan preparat histologis.....	35
4.6.8.1	Pencetakan jaringan.....	35
4.6.8.2	<i>Embedding</i>	36
4.6.8.3	Pemotongan.....	36
4.6.8.4	Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).....	36
4.6.9	Bahan dan alat pengamatan histopatologi korteks cerebri tikus.....	36
4.7	Metode pengumpulan data.....	36
4.7.1	Prosedur penelitian.....	36
4.7.1.1	Pemeliharaan hewan coba.....	36
4.7.1.2	Pembuatan dan pemberian diet normal.....	37

4.7.1.3	Pembuatan dan pemberian diet tinggi lemak.....	37
4.7.1.4	Pembuatan dan injeksi larutan STZ pada tikus.....	37
4.7.1.5	Pengukuran kadar glukosa darah tikus.....	38
4.7.1.6	Pembuatan dan pemberian vitamin A pada tikus ...	39
4.7.1.7	Pembedakan dan pengambilan organ otak tikus....	39
4.7.1.8	Pembuatan preparat histopatologi jaringan otak tikus	39
4.7.1.9	Pengamatan histopatologi jaringan otak tikus.....	41
4.7.2	Pengumpulan data.....	42
4.8	Pengolahan/Analisis Data.....	43
4.9	Bagan Alur Penelitian	44
BAB 5.	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	46
5.1	Karakteristik Tikus.....	46
5.2	Hasil pengukuran glukosa darah puasa.....	47
5.3	Gambaran histologi korteks cerebri pada berbagai kelompok.....	48
5.4	Persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri	52
5.5	Uji beda rata-rata pemberian vitamin A dengan Persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal	54
5.5.1	Uji Normalitas.....	55
5.5.2	Uji Homogenitas.....	55
5.5.3	Uji One-way ANOVA.....	55
5.5.4	Uji <i>Post-hoc</i> Tukey.....	55
5.6	Uji hubungan antara dosis vitamin A dengan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal.....	56
BAB 6.	PEMBAHASAN	57
6.1	Persentase sel apoptosis terhadap sel piramidal neuron piramidal korteks cerebri pada masing-masing kelompok.....	57
6.2	Keterbatasan Penelitian.....	61
BAB 7.	PENUTUP	63
7.1	Kesimpulan	63
7.2	Saran.....	63
DAFTAR PUSTAKA.....		64
LAMPIRAN		69

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.2	Klasifikasi Etiologik Diabetes Melitus	8
Tabel 2.4	Kriteria Diagnosis Diabetes Melitus	12
Tabel 4.1	Kelompok Perlakuan	30
Tabel 5.1	Hasil Pengukuran GDP Minggu ke-8 dan 11	47
Tabel 5.8	Rerata persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri	52



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Regulasi Homeostasis Glukosa.....	7
Gambar 2.3 Perubahan Metabolik Selama Perkembangan DM Tipe 2	11
Gambar 2.5 Tahapan Respons Seluler terhadap Stres dan Stimuli <i>Injurious</i> ...	19
Gambar 2.6 Ilustrasi Skematik Perubahan Morfologi Kematian Sel.....	22
Gambar 2.7 Histologi Korteks Cerebri.....	23
Gambar 2.8 Potongan Korteks Cerebri dan Striatum	24
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	26
Gambar 4.2 Bagan Alur Penelitian	44
Gambar 5.2 Regio korteks cerebri yang dihitung untuk masing-masing preparat	48
Gambar 5.3 Enam lapisan korteks cerebri dari pia mater hingga corpus callosum	49
Gambar 5.4 Penampakkan histologi korteks cerebri pada kontrol negatif	49
Gambar 5.5 Penampakkan histologi korteks cerebri pada kontrol positif.....	50
Gambar 5.6 Penampakkan histologi korteks cerebri pada kelompok vitamin A dosis 50mg/kgBB.....	50
Gambar 5.7 Penampakkan histologi korteks cerebri pada kelompok vitamin A dosis 100mg/kgBB	51
Gambar 5.8 Penampakkan histologi korteks cerebri pada kelompok vitamin A dosis 150mg/kgBB.....	51
Gambar 5.9 Grafik rerata persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Kebutuhan Vitamin A	69
Lampiran 2 Deskripsi Hasil Pengukuran Rerata Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal	71
Lampiran 3 Output SPSS	72
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	76
Lampiran 5 Surat Pernyataan Kelayakan Etik	77



DAFTAR SINGKATAN

ADA	: <i>American Diabetes Association</i>
AGES	: <i>Advanced Glycation End Products</i>
ATP	: <i>Adenosine Tri-Phosphate</i>
DAG	: <i>Diacylglycerol</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GDPT	: <i>Glukosa Darah Puasa Terganggu</i>
GLP	: <i>Glucagon-Like Peptide</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
HbA1c	: <i>Hemoglobin A1c</i>
HDL	: <i>High-Density Lipoprotein</i>
HE	: <i>Hematoxylin-Eosin</i>
HHS	: <i>Hyperglycemic Hyperosmolar State</i>
IGT	: <i>Impaired Glucose Tolerance</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KAD	: <i>Ketoasidosis Diabetik</i>
NFκB	: <i>Nuclear Factor- Kappa B</i>

NGSP : *National Glycohemoglobin Standardization Program*

NAD⁺ : *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)*

NADPH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*

NO : *Nitrite Oxide*

PKC : *Protein Kinase C*

RAR : *Retinoic Acid Receptor*

Riskesdas : *Riset Kesehatan Dasar*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

STZ : *Streptozotocin*

TGF : *Transforming Growth Factor*

TGT : *Toleransi Glukosa Terganggu*

TTGO : *Tes Toleransi Glukosa Oral*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNM : *Terapi Nutrisi Medis*

TZD : *Thiazolidinediones*

UDP : *Uridine diphosphate*

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PERBANDINGAN PENGARUH VITAMIN A TERHADAP PERSENTASE SEL APOPTOSIS DAN SEL NORMAL NEURON PIRAMIDAL KORTEKS CEREBRI TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

Oleh:

Lia Dia Farida

145070100111007

Telah diuji pada
Hari: Selasa
Tanggal: 10 April 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Syifa Mustika, Sp.PD
NIP. 197804302012122001

Pembimbing-I/Penguji-II,

dr. Prasetyo Adi, MS
NIP. 195604161983031001

Pembimbing-II/Penguji III,

dr. Imam Sarwono, Sp.PA
NIP. 195211111980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Farida, Lia Dia. 2018. **Perbandingan Pengaruh Vitamin A terhadap Persentase Sel Apoptosis dan Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Prasetyo Adi, MS, (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA

Diabetes Melitus (DM) merupakan sekumpulan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari defek sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Hiperglikemia kronis pada DM diasosiasikan dengan terjadinya penurunan fungsi kognitif dan memori pada penderitanya yang diwakili dengan meningkatnya kehilangan neuron pada korteks cerebri. Hiperglikemia memicu produksi *advanced glycation end-products* (AGEs) dan merusak sel-sel target melalui beberapa mekanisme. AGEs memodifikasi protein intraseluler sehingga fungsinya menjadi berubah, memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS), dan meningkatkan ekspresi gen-gen pro-inflamasi. Vitamin A bersifat antioksidan karena struktur rantai hidrofobik unit polietilen yang dapat menetralkan radikal bebas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal lapisan neuron piramidal pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2. Penelitian ini menggunakan uji eksperimental murni secara *in vivo* di laboratorium dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Sampel histopatologi diamati dengan pengecatan HE di bawah perbesaran objektif 40X. Hasil analisis menggunakan one-way ANOVA diperoleh nilai signifikansi 0.003 dan koefisien korelasi Spearman diperoleh (r) -0.791 yang berarti korelasi negatif yang kuat. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu terdapat pengaruh signifikan dari pemberian vitamin A terhadap berkurangnya persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

Kata Kunci: Vitamin A, Diabetes Melitus tipe 2, Neuron Piramidal Korteks Cerebri.

ABSTRACT

Farida, Lia Dia. 2018. **Comparison of Vitamin A Effects to Apoptotic and Normal Cells Percentage of Pyramidal Neurons in Cerebral Cortex of Rats Model Type 2 Diabetes Mellitus**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Prasetyo Adi, MS, (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA.

Diabetes Mellitus (DM) is a cluster of metabolic diseases characterized by hyperglycaemia resulted from insulin secretion defect, insulin activity defect or both. Chronic hyperglycaemia in DM is associated with memory and cognitive function impairment that represented by the increase in neuronal loss in cerebral cortex. Hyperglycaemia triggers production of advanced glycation end-products (AGEs) and disrupts target cells through several pathways. AGEs modify intracellular proteins and impair their function, lead to reactive oxygen species (ROS) production, and promote expression of pro-inflammatory genes. Vitamin A has antioxidant property because of its chains of hydrophobic polyethylene unit structure that neutralize free radicals. The objective of this experiment is to compare the effect of Vitamin A on Percentage between Apoptosis and Normal Pyramidal Neurons in Cerebral Cortex of Type 2 Diabetic Rats Model. This study is conducted with pure experimental design in vivo in the laboratory with Randomized Post Test Only Controlled Group. Histological samples are observed with H&E staining under objective magnification of 40X. The data is analysed with one-way ANOVA with significance value of 0.003 and Spearman correlation coefficient of (r) -0.791 which means strong negative correlation. It is concluded that there is significant effect of vitamin A on percentage between apoptosis and normal pyramidal neuron in cerebral cortex of type 2 diabetic rats model.

Keyword: Vitamin A, Type 2 Diabetes Mellitus, Pyramidal Neuron Cerebral Cortex.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Diabetes Melitus (DM) merupakan sekumpulan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari defek sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (American Diabetes Association, 2014). Hiperglikemia kronis pada DM dihubungkan secara langsung pada kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ terutama pembuluh darah, saraf, ginjal, retina, dan jantung (Tripathi dan Srivastava, 2006). Selain itu, hiperglikemia pada DM juga diasosiasikan dengan terjadinya penurunan fungsi kognitif dan memori pada penderitanya (Gispén dan Biessels, 2000; Gold *et al*, 2007). Dalam skala luas, DM dibagi menjadi dua kategori, yaitu DM tipe 1 dan 2, tetapi terdapat DM jenis lain yang didasarkan pada proses patogenik yang kini lebih dalam dipahami, seperti DM gestasional dan DM tipe lainnya. Walaupun prevalensi DM tipe 1 dan 2 bertambah di seluruh dunia, prevalensi DM tipe 2 meningkat sangat tajam, diduga dikarenakan bertambahnya obesitas, berkurangnya aktivitas fisik seiring dengan banyaknya negara yang terindustrialisasi, dan bertambah tuanya populasi (Kasper *et al*, 2016)

Secara global, diperkirakan 8,5 persen atau 422 juta orang menderita DM pada tahun 2014 dan penyakit ini menjadi sebab 1,5 juta kematian pada tahun 2012 (WHO, 2016). Pada tahun 2040, 642 juta orang akan menderita DM (*International Diabetes Federation*, 2015). Di Indonesia, proporsi penduduk berumur ≥ 15 tahun dengan DM adalah 6,9 persen (Riskesmas, 2013). *International Diabetes Federation* (IDF) memprediksi adanya kenaikan jumlah

penyandang DM di Indonesia dari 9,1 juta pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta pada tahun 2035 (Rudijanto *et al*, 2015).

Hiperglikemia menjadi patofisiologi utama dalam perjalanan penyakit diabetes melitus. Hiperglikemia memicu produksi *advanced glycation end-products* (AGEs) dan merusak sel-sel target melalui beberapa mekanisme. AGEs memodifikasi protein intraseluler sehingga fungsinya menjadi berubah, memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS), dan meningkatkan ekspresi gen-gen pro-inflamasi (Kuhad *et al*, 2009). Hal tersebut kesemuanya berujung pada induksi apoptosis sel-sel neuronal pada sistem saraf pusat (Kuhad *et al*, 2009).

Di sisi lain, sistem saraf pusat, terutama bagian korteks cerebri, memiliki tugas dalam kognisi (Bressler dan Kelso, 2001). Neuron-neuron dalam korteks cerebri berfungsi dalam integrasi informasi sensoris dan inisiasi respons motor volunter. Neuron terbanyak penyusun korteks adalah neuron piramidal yang mengeluarkan lecutan (*bursts*) listrik sesuai input sinaptiknya (Mescher, 2013; Hammond, 2015). Oleh sebab itu, dengan adanya hiperglikemia yang memicu peningkatan AGEs pada sistem saraf pusat, efek akhir yang terjadi adalah penurunan fungsi kognitif dan memori pada penderita yang berprogres seiring berjalannya waktu (Gold *et al*, 2007; Kuhad *et al*, 2009; Dash, 2013).

Penurunan fungsi kognitif ini tidak hanya komplikasi yang terjadi pada penderita DM dengan usia lanjut (>70 tahun), tetapi juga pada pasien DM dengan usia muda dan produktif (Messier, 2005; Ruis *et al*, 2009). Hal tersebut semakin menambah daftar panjang penurunan kualitas hidup penderita akibat DM. Oleh sebab itu, diperlukan suatu solusi untuk memecahkan problem penurunan fungsi kognitif pada penderita DM.

Vitamin A adalah jenis vitamin yang sering ditemukan. Vitamin ini banyak ditemukan dalam bentuk beta-karoten dan karotenoid yang dapat ditemui dalam buah-buahan berwarna terang (Holick *et al*, 2002). Vitamin A merujuk pada sekelompok hidrokarbon tidak jenuh yang secara nutrisi aktif, termasuk senyawa-senyawa retinol dan beberapa karotenoid (Damodaran *et al*, 2008). Chen dan Napoli (2007) membuktikan bahwa metabolit vitamin A, *all-trans*-retinoic acid, menstimulasi translasi dan menginduksi pembentukan *spines* (dendrit) neuron hippocampus melalui RAR α yang memicu transkripsi protein sintesis dendrit. Di sisi lain, defisiensi vitamin A menyebabkan terjadinya penurunan fungsi memori dan kognitif (Etchamendy *et al*, 2003). Vitamin A juga bersifat antioksidan karena struktur rantai hidrofobik unit polietilen yang dapat menetralkan oksigen *singlet* (1O_2) dan radikal bebas *thiol*, mengikat dan menstabilisasi radikal peroksil (Palace *et al*, 1999). Dengan sifat antioksidan dan faktor transkripsi yang dimilikinya, diharapkan vitamin A dapat menetralkan stres oksidatif yang diakibatkan oleh hiperglikemia pada penderita DM tipe 2, sehingga dapat mencegah terjadinya penurunan fungsi kognitif pada penderitanya.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan tersebut, belum ada penelitian yang menitikberatkan pada bagaimana pengaruh vitamin A terhadap penurunan fungsi kognitif yang diakibatkan DM tipe 2 secara mikrostruktural. Oleh sebab itu, diperlukan suatu penelitian untuk menganalisis perbandingan pengaruh pemberian vitamin A terhadap penurunan fungsi kognitif pada penderita DM tipe 2 dengan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar) jantan model DM tipe 2 melalui persentase jumlah sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbandingan pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel apoptosis dan sel normal neuron piramidal pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membandingkan pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menghitung persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model yang telah diberikan diet normal, model diabetes melitus tipe 2, serta model diabetes melitus tipe 2 dengan diberi vitamin A dengan dosis berbeda.
2. Membandingkan pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

Merupakan pembuktian secara ilmiah dan dasar pengembangan teori mengenai pengaruh pemberian vitamin A terhadap persentase sel

apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri pada penderit diabetes melitus tipe 2.

1.4.2 Manfaat Praktis

Menjadikan vitamin A sebagai kandidat agen terapi untuk menghambat progresivitas penurunan fungsi kognitif pada penderit diabetes melitus tipe 2.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

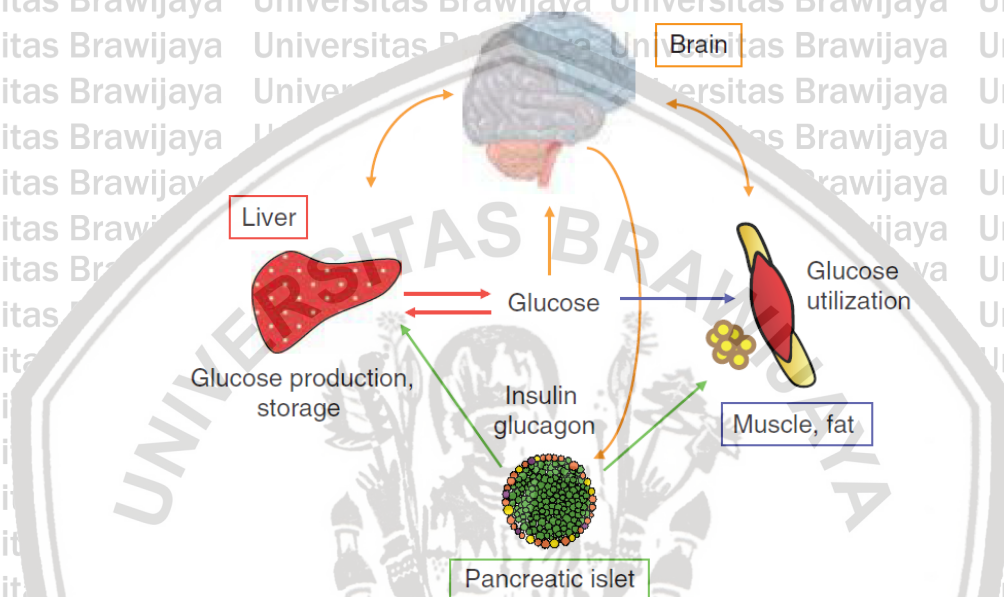
2.1 Diabetes Melitus

2.1.1 Regulasi Homeostasis Glukosa

Homeostasis glukosa mencerminkan keseimbangan antara produksi glukosa hepatic dan utilisasi serta pengambilan glukosa perifer. Insulin adalah regulator yang paling penting dalam keseimbangan ini, tetapi input neural, sinyal metabolik, dan hormon lainnya (misalnya, glucagon) menciptakan control terintegrasi atas suplai dan utilisasi glukosa. Organ-organ yang meregulasi glukosa dan lipid berkomunikasi dalam mekanisme neural dan humoral dengan lemak dan otot yang memproduksi adipokines, myokines, dan metabolit-metabolit yang mempengaruhi fungsi liver. Pada saat puasa, level insulin yang rendah meningkatkan produksi glukosa dengan meningkatkan glukoneogenesis dan glikolisis hepatic serta menurunkan pengambilan glukosa di jaringan yang sensitif insulin (otot rangka dan lemak), sehingga meningkatkan mobilisasi prekursor-prekursor seperti asam amino dan asam lemak bebas (lipolisis) (Kasper *et al*, 2016).

Glukagon, disekresikan oleh sel alfa pankreas saat level glukosa darah atau insulin rendah, menstimulasi glikogenolisis dan gluconeogenesis oleh liver dan medulla ginjal. Secara post-prandial, beban glukosa menghasilkan peningkatan insulin dan penurunan glucagon, mengakibatkan turunnya kadar glukosa. Insulin meningkatkan penyimpanan karbohidrat dan sintesis lemak serta protein. Sebagian besar glukosa pos-prandial digunakan oleh otot rangka, suatu efek pengambilan glukosa yang distimulasi insulin. Jaringan lainnya, terutama

otak, menggunakan glukosa secara insulin-independen. Faktor-faktor yang disekresikan myosit otot rangka (irisin), adiposity (leptin, resistin, adiponektin, dsb), dan tulang juga turut serta mempengaruhi homeostasis glukosa (Kasper *et al*, 2016).



Gambar 2.1 Regulasi homeostasis glukosa (Kasper *et al*, 2016)

2.1.2 Definisi Diabetes Melitus

Diabetes Melitus (DM) merupakan sekumpulan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari defek sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (American Diabetes Association, 2014). Bergantung pada etiologi DM, faktor-faktor yang berkontribusi pada terjadinya hiperglikemia termasuk berkurangnya sekresi insulin, berkurangnya utilisasi glukosa, dan meningkatnya produksi glukosa (Kasper *et al*, 2016).

2.1.3 Klasifikasi Diabetes Melitus

DM diklasifikasikan dalam basis proses patogenik yang berujung pada hiperglikemia. Dua kategori luas DM adalah DM tipe 1 dan tipe 2. Kedua tipe DM

ini didahului dengan fase homeostasis glukosa abnormal seringnya dengan berprogresnya proses patogeniknya. DM tipe 1 adalah akibat dari defisiensi insulin total atau nyaris total. DM tipe 2 adalah kelompok heterogen gangguan-gangguan yang ditandai dengan variasi derajat resistensi insulin, sekresi insulin yang terganggu, dan meningkatnya produksi glukosa. DM tipe didahului oleh periode homeostasis glukosa yang terganggu, disebut dengan Glukosa Darah Puasa Terganggu (GDPT) dan Toleransi Glukosa Terganggu (TGT) (Kasper *et al*, 2016; Rudijanto *et al*, 2015).

Tabel 2.2 Klasifikasi etiologik Diabetes Melitus (ADA, 2014; ADA, 2016)

DM Tipe 1	Karena destruksi sel beta pankreas, mengarah ke defisiensi insulin absolut. A. <i>Immune mediated</i> B. Idiopatik
DM Tipe 2	Karena berkurangnya sekresi insulin yang progresif, dengan latar belakang resistensi insulin. Mulai dari predominan resistensi insulin dengan defisiensi insulin relative hingga predominan defek sekresi dengan resistensi insulin)
DM Gestasional	DM yang didiagnosis pada trimester kedua atau ketiga kehamilan yang bukan secara jelas DM
Tipe DM Spesifik karena Sebab Lain	A. Defek genetic pada fungsi sel beta pankreas B. Defek genetic pada kerja insulin C. Penyakit pada fungsi eksokrin pankreas D. Endokrinopati E. Induksi obat atau zat kimia F. Infeksi G. Bentuk tidak umum dari DM yang diinduksi imun H. Sindrom genetik lain yang biasanya diasosiasikan dengan DM

2.1.4 Etiologi dan Faktor Risiko Diabetes Melitus Tipe 2

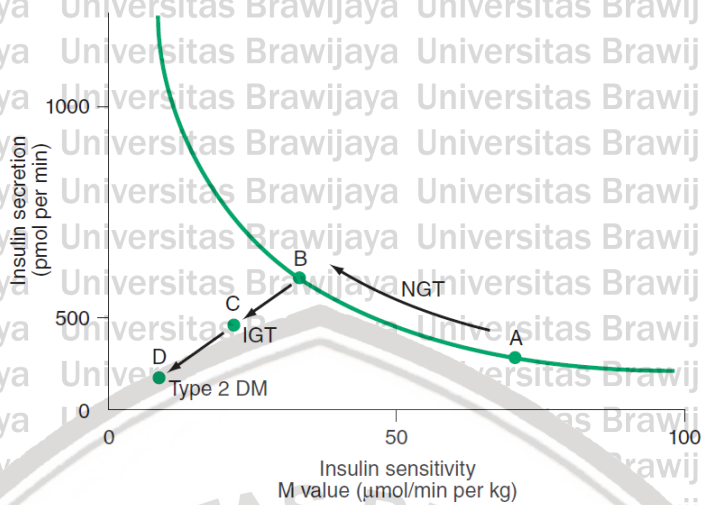
Diabetes melitus tipe 2 terjadi ketika tubuh menjadi resisten terhadap insulin atau ketika pankreas berhenti memproduksi cukup insulin. Etiologi DM tipe 2 melibatkan interaksi yang kompleks antara faktor lingkungan dan genetic.

Beberapa faktor utama di bawah ini akan meningkatkan risiko terjadinya DM tipe 2 (Khardori, 2015):

- Usia, risiko lebih tinggi pada usia lebih dari 45 tahun; walaupun DM tipe 2 terjadi dengan frekuensi yang terus meningkat pada individu muda
- Obesitas, berat badan yang lebih besar dapat menyebabkan semakin resistennya insulin. Faktor ini juga terkait dengan faktor stres; dengan terlalu banyak makan terutama mengkonsumsi glukosa sederhana (glukosa, sukrosa, dan fruktosa), merokok, konsumsi alkohol yang berlebih, serta gangguan sistem saraf dan endokrin, seperti peningkatan kortisol dan kelainan sekresi hormon seks (Kaku, 2010)
- Riwayat keluarga diabetes tipe 2, pada tingkat pertama hubungan
- Ras, keturunan Hispanik, penduduk asli Amerika, Afrika-Amerika, Asia-Amerika, atau Pasifik
- Kurangnya aktivitas fisik
- Riwayat toleransi glukosa terganggu (TGT) atau glukosa darah puasa terganggu (GDPT)
- Hipertensi ($> 140/90$ mmHg) atau dislipidemia (kadar kolesterol HDL < 40 mg/dL atau trigliserida tingkat > 150 mg/dL)
- Riwayat diabetes gestasional

2.1.5 Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2

DM tipe 2 ditandai dengan sekresi insulin yang terganggu, resistensi insulin, produksi glukosa hepatic yang berlebih, dan metabolisme lemak yang terganggu. Obesitas, terutama obesitas visceral atau sentral (yang dibuktikan dengan *hip-waist ratio*), sangat umum ditemui pada DM tipe 2 (80% atau lebih pasien adalah obese). Pada stadium awal gangguan ini, toleransi glukosa masih nyaris-normal, walaupun sudah terjadi resistensi insulin, karena sel beta pankreas melakukan kompensasi dengan meningkatkan sekresi insulin (hiperinsulinemia). Seiring dengan berprogresnya resistensi insulin dan kompensasi hiperinsulinemia, pulau Langerhans pankreas tidak dapat lagi mempertahankan status hiperinsulinemianya. Dengan demikian, terjadi TGT, ditandai dengan peningkatan glukosa post-prandial. Seiring dengan kegagalan pulau Langerhans, penurunan lebih lanjut dari sekresi insulin beserta peningkatan produksi glukosa hepatic berujung pada diabetes melitus dengan hiperglikemia puasa (Longo *et al*, 2012). Walaupun resistensi insulin dan terganggunya sekresi insulin keduanya berkontribusi pada pathogenesis DM tipe 2, kontribusi relatif dua hal tersebut berbeda pada individu satu dengan yang lain (Kasper *et al*, 2016).



Gambar 2.3 Perubahan metabolic selama perkembangan DM Tipe 2 (Kasper et al, 2016)

Sekresi insulin dan sensitivitas insulin saling berhubungan, dan seiring dengan individu yang semakin resisten terhadap insulin (dengan bergerak dari titik A ke B), sekresi insulin meningkat. Kegagalan kompensasi dalam meningkatkan sekresi insulin akan berakibat pada toleransi glukosa terganggu (TGT/IGT, titik C) pada fase awalnya, kemudian berakhir pada DM tipe 2 (titik D). NGT, *normal glucose tolerance* (Kasper et al, 2016).

2.1.6 Diagnosis Diabetes Mellitus

Menurut Rudijanto et al (2015), diagnosis DM ditegakkan atas dasar pemeriksaan kadar glukosa darah. Pemeriksaan glukosa darah yang dianjurkan adalah pemeriksaan glukosa secara enzimatis dengan bahan plasma darah vena. Pemantauan hasil pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan pemeriksaan glukosa darah kapiler dengan glukometer. Diagnosis tidak dapat ditegakkan atas dasar adanya glukosuria.

Berbagai keluhan dapat ditemukan pada penyandang DM. Kecurigaan adanya DM perlu dipikirkan apabila terdapat keluhan seperti:

- Keluhan klasik DM: poliuria, polidipsia, polifagia dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya.
- Keluhan lain: lemah badan, kesemutan, gatal, mata kabur, dan disfungsi ereksi pada pria, serta pruritus vulva pada wanita.

Tabel 2.4 Kriteria Diagnosis Diabetes Melitus (Sumber: ADA, 2014)

Pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL. Puasa adalah kondisi tidak ada asupan kalori minimal 8 jam.

atau

Pemeriksaan glukosa plasma ≥ 200 mg/dL 2 jam setelah Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan beban glukosa 75 gram.

atau

Pemeriksaan glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan keluhan klasik.

atau

Pemeriksaan HbA1c $\geq 6,5\%$ dengan menggunakan metode yang terstandarisasi oleh *National Glycohaemoglobin Standardization Program* (NGSP).

Hasil pemeriksaan yang tidak memenuhi kriteria normal atau kriteria DM digolongkan ke dalam kelompok prediabetes yang meliputi: toleransi glukosa terganggu (TGT) dan glukosa darah puasa terganggu (GDPT) (Kasper *et al*, 2016).

- Glukosa Darah Puasa Terganggu (GDPT): Hasil pemeriksaan glukosa plasma puasa antara 100-125 mg/dl dan pemeriksaan TTGO glukosa plasma 2-jam < 140 mg/dl;
- Toleransi Glukosa Terganggu (TGT): Hasil pemeriksaan glukosa plasma 2-jam setelah TTGO antara 140-199 mg/dl dan glukosa plasma puasa < 100 mg/dl

- Bersama-sama didapatkan GDPT dan TGT
- Diagnosis prediabetes dapat juga ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan HbA1c yang menunjukkan angka 5,7-6,4%.

2.1.7 Penatalaksanaan Diabetes Melitus

Menurut Rudijanto *et al* (2015), tujuan penatalaksanaan secara umum adalah meningkatkan kualitas hidup penyandang diabetes. Tujuan penatalaksanaan meliputi:

- Tujuan jangka pendek: menghilangkan keluhan DM, memperbaiki kualitas hidup, dan mengurangi risiko komplikasi akut.
- Tujuan jangka panjang: mencegah dan menghambat progresivitas penyulit mikroangiopati dan makroangiopati.
- Tujuan akhir pengelolaan adalah turunnya morbiditas dan mortalitas DM.

Untuk mencapai tujuan tersebut perlu dilakukan pengendalian glukosa darah, tekanan darah, berat badan, dan profil lipid, melalui pengelolaan pasien secara komprehensif. Tatalaksana tersebut meliputi sebagai berikut.

a. Edukasi

Upaya edukasi dilakukan secara komprehensif dan meningkatkan motivasi pasien untuk memiliki perilaku hidup sehat. Edukasi berupa pemantauan glukosa mandiri, perawatan kaki, ketaatan penggunaan obat-obatan, berhenti merokok, meningkatkan aktifitas fisik, dan mengurangi asupan kalori dan diet tinggi lemak (Rudijanto *et al*, 2015).

b. Terapi Nutrisi Medis (TNM)

Prinsip pengaturan makan yaitu makanan yang seimbang, sesuai dengan kebutuhan kalori masing-masing individu. Komposisi makanan yang dianjurkan

terdiri dari karbohidrat 45%-65% terutama dengan serat tinggi, lemak 20%-25% kebutuhan kalori, protein 10%-20% total asupan energi (Rudijanto *et al*, 2015).

c. Latihan Jasmani

Waktu yang disarankan adalah secara teratur 3-5 kali seminggu, masing-masing selama kurang lebih 30-45 menit, dengan total 150 menit perminggu.

Latihan lebih baik yang bersifat aerobik seperti jalan cepat, jogging, bersepeda santai dan berenang (Rudijanto *et al*, 2015; ADA, 2016).

d. Terapi Farmakologis

Terapi ini diberikan kepada pasien bersamaan dengan edukasi terhadap pasien, pengaturan makan dan latihan jasmani. Terapi farmakologis terdiri dari obat oral dan bentuk suntikan (Rudijanto *et al*, 2015)

- Obat antihyperglikemik oral: pemicu sekresi insulin (sulfonilurea, glinid); peningkat sensitivitas insulin (metformin, tiazolidindion (TZD)); penghambat absorpsi glukosa di saluran pencernaan (acarbose)
- Obat antihyperglikemik suntik : Insulin, agonis GLP1/Incretin Mimetic
- Terapi Kombinasi

2.1.8 Komplikasi Diabetes Melitus

Komplikasi DM dibagi menjadi dua, yaitu komplikasi akut dan komplikasi kronis. Komplikasi akut DM karena hiperglikemia berat adalah ketoasidosis diabetik (KAD) dan *hyperglycemic hyperosmolar state* (HHS). Komplikasi akut lain yang sering terjadi adalah hipoglikemia (Rudijanto *et al*, 2015).

Komplikasi kronis yang diakibatkan DM dapat dibagi menjadi komplikasi vaskuler dan nonvaskuler. Komplikasi-komplikasi ini sama untuk DM tipe 1 dan 2.

Komplikasi vaskuler DM terbagi lagi menjadi komplikasi mikrovaskuler (retinopati, neuropati, nefropati) dan makrovaskuler (penyakit jantung coroner, arteri perifer,

serebrovaskuler). Komplikasi mikrovaskuler adalah spesifik karena diabetes, sedangkan makrovaskuler adalah sama dengan non-diabetes tetapi terjadi pada frekuensi yang lebih besar pada individu dengan diabetes. Komplikasi nonvaskuler DM termasuk gastroparesis, infeksi, perubahan kulit, dan hilangnya pendengaran. Namun, belum jelas mengenai apakah DM tipe 2 meningkatkan risiko demensia atau terganggunya fungsi kognitif (Kasper *et al*, 2016).

2.1.9 Mekanisme Kerusakan Organ yang Diinduksi Hiperglikemia

Hiperglikemia merupakan penyebab utama terjadinya berbagai komplikasi pada penderita diabetes melitus. Terdapat empat hipotesis utama mengenai mekanisme hiperglikemia dalam menyebabkan komplikasi DM, yaitu meningkatnya fluks jalur polyol, meningkatnya pembentukan *advanced glycation end-products* (AGEs), aktivasi protein kinase C (PKC), dan meningkatnya fluks jalur heksosamin (Brownlee, 2001). Keempat jalur ini merupakan akibat dari suatu proses yang diinduksi hiperglikemia, yaitu overproduksi superoksida dalam rantai transport-elektron mitokondria. Hiperglikemia meningkatkan gradien proton di atas nilai ambang sebagai akibat dari overproduksi donor elektron pada siklus asam trikarboksilat (Du *et al*, 2001).

2.1.9.1 Meningkatkan Fluks Jalur Polyol

Pada individu non-diabetik, metabolisme glukosa melalui jalur polyol memiliki persentase sangat sedikit dari total glukosa yang digunakan. Namun, dalam kondisi hiperglikemik, peningkatan glukosa intraseluler mengakibatkan naiknya konversi enzimatis menjadi polialkohol sorbitol, bersamaan dengan turunnya NADPH. Pada jalur polyol, sorbitol dioksidasi menjadi fruktosa oleh enzim sorbitol dehydrogenase, dan NAD⁺ direduksi menjadi NADH (Brownlee, 2001).

Beberapa mekanisme diajukan untuk menjelaskan efek detrimental pada gluksa jalur polyol yang diinduksi hiperglikemia. Hal ini termasuk stres osmotik yang diinduksi sorbitol, berkurangnya aktivitas $(Na^+ + K^+)ATPase$, meningkatnya NADH/NAD⁺ sitosolik, dan menurunnya NADPH sitosolik. Sorbitol tidak dengan mudah berdifusi melewati membrane sel, sehingga hal ini diajukan sebagai penyebab stres osmotik sel. Di sisi lain, oksidasi sorbitol oleh NAD⁺ meningkatkan konsentrasi triose fosfat yang pada akhirnya mengakibatkan peningkatan pembentuk metilglioksal (suatu prekursor AGEs) dan diasilgliserol (DAG, yang dapat mengaktivasi PKC) (Brownlee, 2001). Reduksi glukosa menjadi sorbitol melalui NADPH, akan mengkonsumsi NADPH. Karena NADPH dibutuhkan untuk meregenerasi glutathion (GSH) yang tereduksi, seiring dengan turunnya NADPH, hal ini akan menginduksi atau memperparah stres oksidatif intraseluler (Lee dan Chung, 1999).

2.1.9.2 Peningkatan Pembentukan AGEs Intraseluler

Hiperglikemia intraseluler adalah pencetus utama dalam pembentukan AGEs intraseluler maupun ekstraseluler. Produksi prekursor AGEs intraseluler merusak sel-sel target melalui tiga mekanisme umum. Pertama, protein intraseluler yang dimodifikasi AGEs memiliki fungsi yang berubah. Kedua, komponen matriks ekstraseluler yang dimodifikasi oleh prekursor AGEs berinteraksi secara abnormal dengan komponen matriks lainnya dan dengan reseptor matriks protein (integrins) pada sel. Ketiga, protein plasma yang dimodifikasi oleh AGEs pada sel-sel endothelium, mesangial, dan makrofag, menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang dimediasi reseptor. Ligasi reseptor AGEs ini akan mengaktivasi faktor transkripsi pleiotropik NF- κ B dan menyebabkan perubahan patologis dalam ekspresi gen (Brownlee, 2001).

Akumulasi AGEs di jaringan merupakan sumber utama terbentuknya radikal bebas sehingga mampu meningkatkan stres oksidatif (Setiawan dan Suhartono, 2005).

2.1.9.3 Aktivasi Protein Kinase C (PKC)

Hiperglikemia intraseluler meningkatkan jumlah DAG. DAG kemudian mengaktivasi PKC. Hiperglikemia juga mengaktivasi isoform PKC secara tidak langsung melalui ikatan dengan reseptor AGEs dan meningkatkan aktivitas jalur polyol, yang diduga melalui peningkatan ROS. Peningkatan aktivasi PKC ini mengakibatkan abnormalitas aliran darah, perubahan permeabilitas vaskuler, oklusi kapiler melalui penurunan fibrinolysis, peningkatan ekspresi gen pro-inflamasi melalui meningkatnya NF- κ B, dan peningkatan produksi ROS melalui meningkatnya NAD(P)H oksidase (Brownlee, 2001; Yerneni *et al*, 1999).

2.1.9.4 Peningkatan Fluks Jalur Heksosamin

Pembentukan *shunt* karena glukosa intraseluler eksekif melalui jalur heksosamin menyebabkan pula beberapa manifestasi dalam komplikasi DM. Pada jalur heksosamin ini, fruktosa-6-fosfat dialihkan dari jalur glikolisis untuk menyediakan substrat bagi reaksi yang memerlukan UDP-N-asetilglukosamin, seperti sintesis proteoglikan dan pembentuk *O-linked* glikoprotein. Inhibisi pada enzim di konversi glukosa menjadi glukosamin akan memblokir peningkatan transkripsi TFG- α dan TGF- β 1 yang diinduksi hiperglikemia. Jalur ini memiliki peran penting dalam resistensi insulin yang diinduksi hiperglikemia (Marshall *et al*, 1991). Aktivasi jalur heksosamin oleh hiperglikemia mengakibatkan banyak perubahan pada ekspresi gen maupun fungsi protein, yang keduanya berkontribusi pada pathogenesis komplikasi DM (Brownlee, 2001).

2.1.10 Penurunan Fungsi Kognitif pada Penderita Diabetes Melitus

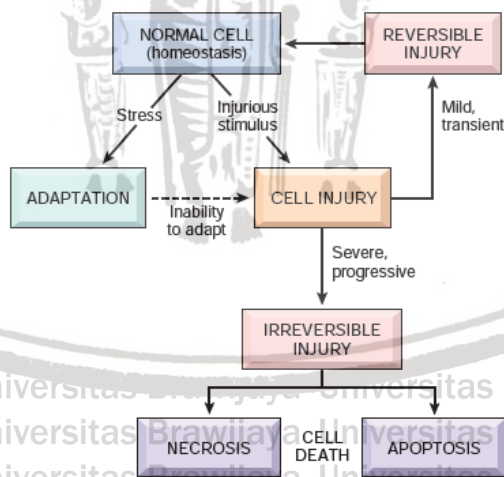
Hiperglikemia menjadi patofisiologi utama dalam perjalanan penyakit diabetes melitus. Hiperglikemia memicu produksi *advanced glycation end-products* (AGEs) dan merusak sel-sel target melalui beberapa mekanisme. AGEs memodifikasi protein intraseluler sehingga fungsinya menjadi berubah, memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS), dan meningkatkan ekspresi gen-gen pro-inflamasi (Kuhad *et al*, 2009). Hal tersebut kesemuanya berujung pada induksi apoptosis sel-sel neuronal pada sistem saraf pusat (Kuhad *et al*, 2009).

Di sisi lain, sistem saraf pusat, terutama bagian korteks cerebri, memiliki tugas dalam kognisi (Bressler dan Kelso, 2001). Neuron-neuron dalam korteks cerebri berfungsi dalam integrasi informasi sensoris dan inisiasi respons motor. Neuron terbanyak penyusun korteks adalah neuron piramidal yang mengeluarkan lecutan (*bursts*) listrik sesuai input sinaptiknya (Mescher, 2013; Hammond, 2015). Oleh sebab itu, dengan adanya hiperglikemia yang memicu peningkatan AGEs pada sistem saraf pusat, efek akhir yang terjadi adalah penurunan fungsi kognitif dan memori pada penderita yang berprogres seiring berjalannya waktu (Gold *et al*, 2007; Kuhad *et al*, 2009; Dash, 2013).

Penurunan fungsi kognitif ini tidak hanya komplikasi yang terjadi pada penderita DM dengan usia lanjut (>70 tahun), tetapi juga pada pasien DM dengan usia muda dan produktif (Messier, 2005; Ruis *et al*, 2009). Hal tersebut semakin menambah daftar panjang penurunan kualitas hidup penderita akibat DM.

2.2 Mekanisme Kematian Sel

Kematian sel, yaitu hasil akhir dari *injury* seluler progresif, adalah salah satu fenomena krusial pada evolusi penyakit terhadap jaringan dan organ. Jika batas respons adaptif sel terlampaui atau sel terpapar stres atau agen *injury*, kekurangan nutrisi esensial, atau menjadi rusak karena mutasi yang mempengaruhi konstituen penting sel, maka akan terjadi sekuens kejadian yang disebut *injury* (cedera) sel. Cedera pada sel bersifat reversible hingga pada titik tertentu, tetapi jika stimulus stres tetap ada atau cukup parah sejak awal, maka sel akan mengalami cedera irreversible yang akhirnya menyebabkan kematian sel. Kematian sel diakibatkan berbagai sebab, termasuk iskemia (berkurangnya aliran darah), infeksi, dan toksin. Terdapat dua jalur utama kematian sel, nekrosis dan apoptosis (Kumar *et al*, 2015).



Gambar 2.5 Tahapan Respons Seluler terhadap Stres dan Stimuli *Injurious* (Kumar *et al*, 2015)

2.2.1 Apoptosis

Apoptosis adalah jalur kematian sel yang diinduksi oleh program kematian sel yang diregulasi ketat, dimana sel yang akan dimatikan mengaktifkan enzim-enzim intrinsic yang mendegradasi DNA inti selnya sendiri beserta protein inti dan sitoplasmanya. Sel-sel apoptotik mengubah dirinya menjadi fragmen-fragmen, yang disebut *apoptotic bodies*, yang berisi sebagian sitoplasma dan nukleus. Membran plasma pada sel apoptotik dan *apoptotic bodies* tetap intak, tetapi strukturnya diubah sedemikian rupa sehingga struktur ini menjadi target spesifik untuk fagositosis. Sel mati dan fragmennya segera difagositosis sebelum isi sel keluar, sehingga proses ini tidak memicu proses inflamasi jaringan sekitar.

Apoptosis dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis. Secara fisiologis, apoptosis dapat ditemui pada destruksi sel selama embryogenesis, involusi jaringan dependen hormon selama *withdrawal*, eliminasi limfosit *self-reactive* yang berpotensi bahaya, kematian sel host yang telah melakukan fungsinya, misalnya neutrophil setelah respons inflamasi akut. Pada kondisi patologis, apoptosis disebabkan oleh kerusakan DNA, akumulasi protein *misfolded*, kematian sel pada infeksi tertentu (misalnya apoptosis sel T limfosit pada infeksi HIV), atrofi patologis pada parenkim organ setelah obstruksi duktus (Kumar *et al*, 2015).

Fitur morfologis pada sel yang mengalami apoptosis adalah sebagai berikut (Kumar *et al*, 2015).

- Penyusutan ukuran sel. Sel berukuran lebih kecil, sitoplasma padat dan organellanya tersusun lebih rapat (pada cedera sel, fitur awalnya adalah pembengkakan sel, bukan penyusutan).

- Kondensasi kromatin. Hal ini adalah fitur utama apoptosis. Kromatin beragregasi secara perifer, di bawah membran inti, menjadi massa padat.

Inti sel dapat memecah menjadi dua atau lebih fragmen.

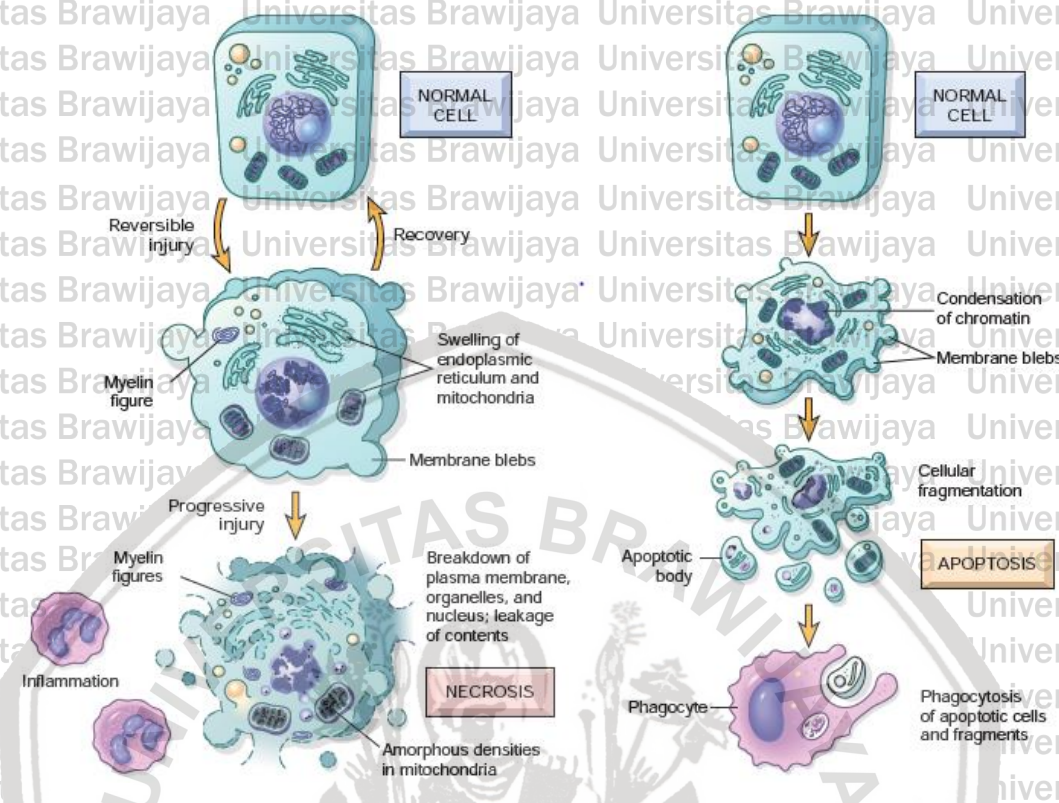
- Pembentukan blebs sitoplasmik dan *apoptotic bodies*.
- Fagositosis sel apoptotik atau *apoptotic bodies*, biasanya oleh makrofag.

2.2.2 Nekrosis

Penampakan morfologis nekrosis adalah hasil dari denaturasi protein intraseluler dan digesti enzimatis sel yang mengalami *injury* letal. Sel-sel nekrotik tidak dapat mempertahankan integritas membran dan terjadi pengeluaran isi sel, suatu proses yang mencetuskan inflamasi pada jaringan sekitarnya. Enzim-enzim yang mencerna sel nekrotik diturunkan dari lisosom dari sel yang sekarat dan lisosom dari leukosit yang dipanggil sebagai bagian dari reaksi inflamasi.

Perubahan inti sel (*nuclear changes*) nekrotik muncul dengan satu dari tiga pola, kesemuanya disebabkan oleh kerusakan DNA nonspesifik. Basofilia kromatin dapat menjadi pudar (*karyolisis*), suatu perubahan yang agaknya menggambarkan hilangnya DNA karena degradasi enzimatis oleh endonuclease.

Pola kedua (yang juga ditemui pada sel apoptotik) adalah piknosis, ditandai dengan penyusutan inti sel dan peningkatan basofilia. Pada pola ini, kromatin berkondensasi menjadi massa yang solid, basofilik, dan menyusut. Pola ketiga disebut *karyorrhexis*, yaitu nukleus yang piknotik mengalami fragmentasi. Seiring berjalannya waktu (satu atau dua hari), nukleus pada sel nekrotik hilang sepenuhnya (Kumar *et al*, 2015).



Gambar 2.6 Ilustrasi Skematik Perubahan Morfologi Kematian Sel (Kumar et al, 2015)

2.3 Neuron Piramidal Korteks Cerebri

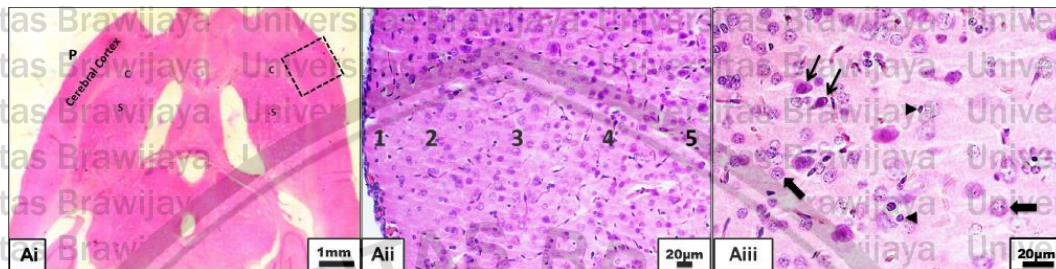
Sistem saraf pusat, terutama bagian korteks cerebri, memiliki tugas dalam kognisi (Bressler dan Kelso, 2001). Neuron-neuron dalam korteks cerebri berfungsi dalam integrasi informasi sensoris dan inisiasi respons motor volunter.

Neuron terbanyak penyusun korteks adalah neuron piramidal yang mengeluarkan lecutan (*bursts*) listrik sesuai input sinaptiknya (Mescher, 2013; Hammond, 2015).

2.3.1 Apoptosis Neuron Piramidal

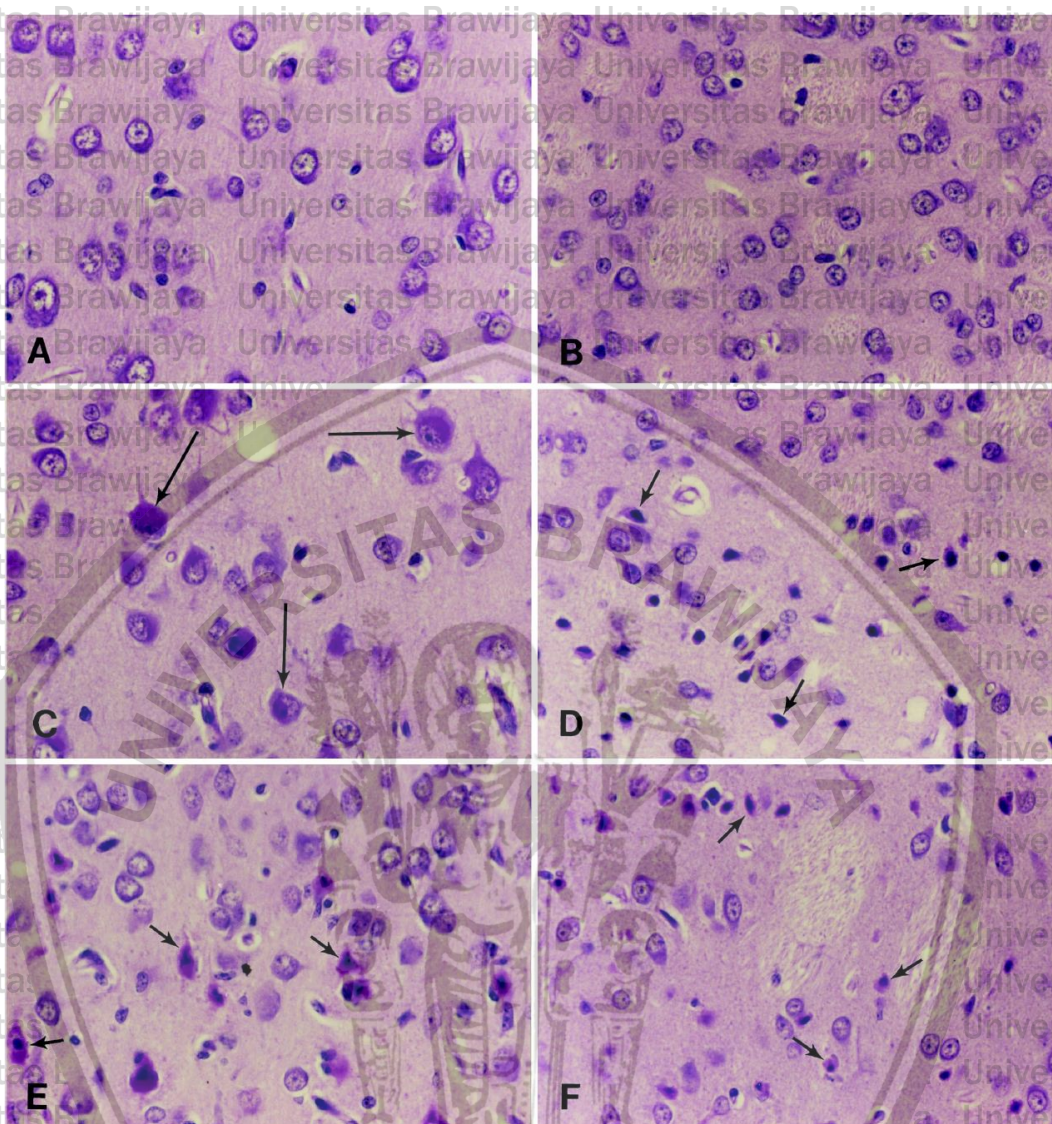
Neuron piramidal adalah neuron pada lapisan III atau V korteks cerebri, dengan soma berbentuk segitiga dan memiliki dendrit apical yang mengarah ke permukaan korteks dan akson basal yang mengarah ke substantia alba. Neuron

piramidal yang mengalami apoptosis adalah yang ditandai dengan perikaryon basofilik dengan piknosis atau karyorrhexis inti sel. Hal ini dicirikan dengan penyusutan ukuran sel, kondensasi, fragmentasi, *apoptotic body* pada inti sel (Towfighi dan Mauger, 1998; Nishimura *et al*, 1999).



Gambar 2.7 Histologi Korteks Cerebri

Keterangan: (Ai) Potongan horizontal cerebrum menunjukkan struktur histologis umum korteks cerebri. (Aii) Enam lapisan korteks cerebri: (1) lapisan molekuler luar, (2) granular luar, (3) piramidal luar, (4) granular dalam, (5) piramidal dalam, dan (6) multiforme. (Aiii) Fotomikrograf menunjukkan komponen seluler utama korteks cerebri: sel piramidal, granular, dan glia (Bahey *et al*, 2015).



Gambar 2.8 Potongan Korteks Cerebri dan Striatum

Keterangan: Potongan Korteks Cerebri (A) dan Striatum (B) normal pada tikus control, dan potongan korteks cerebri dextra (C, E) dan striatum (D, F) pada tikus dengan ligasi A. carotis communis dextra dan hipoksia-iskemia dalam 8% O₂ selama 60 menit pada 13 hari postnatal dengan periode *recovery* 24 jam (C, D) dan 72 jam (E, F). Korteks cerebri menunjukkan neuron *ballooned* reaktif dan asidofilik ada 24 jam *recovery* (panah panjang) dan neuron yang mati pada 72 jam *recovery* (panah pendek). Striatum menunjukkan neuron-neuron yang mati pada 24 jam dan 72 jam *recovery* (panah pendek). H&E X400 (Sumber: Towfighi dan Mauger, 1998).

2.4 Pengaruh Vitamin A terhadap Fungsi Kognitif Penderita DM

Vitamin A adalah jenis vitamin yang sering ditemukan. Vitamin ini banyak ditemukan dalam bentuk beta-karoten dan karotenoid yang dapat ditemui dalam buah-buahan berwarna terang (Holick *et al*, 2002). Vitamin A merujuk pada

sekelompok hidrokarbon tidak jenuh yang secara nutrisi aktif, termasuk senyawa-senyawa retinol dan beberapa karotenoid (Demodaran *et al*, 2008).

Chen dan Napoli (2007) membuktikan bahwa metabolit vitamin A, *all-trans-retinoic acid*, menstimulasi translasi dan menginduksi pembentukan *spines* (dendrit) neuron hippocampus melalui RAR α yang memicu transkripsi protein sintesis dendrit. Di sisi lain, defisiensi vitamin A menyebabkan terjadinya penurunan fungsi memori dan kognitif (Etchamendy *et al*, 2003). Vitamin A juga bersifat antioksidan karena struktur rantai hidrofobik unit polietilen yang dapat menetralkan oksigen *singlet* (1O_2) dan radikal bebas *thiol*, mengikat dan menstabilisasi radikal peroksil (Palace *et al*, 1999). Dengan sifat antioksidan dan faktor transkripsi yang dimilikinya, diharapkan vitamin A dapat menetralisasi stres oksidatif yang diakibatkan oleh hiperglikemia pada penderita DM tipe 2, sehingga dapat mencegah terjadinya penurunan fungsi kognitif pada penderitanya.

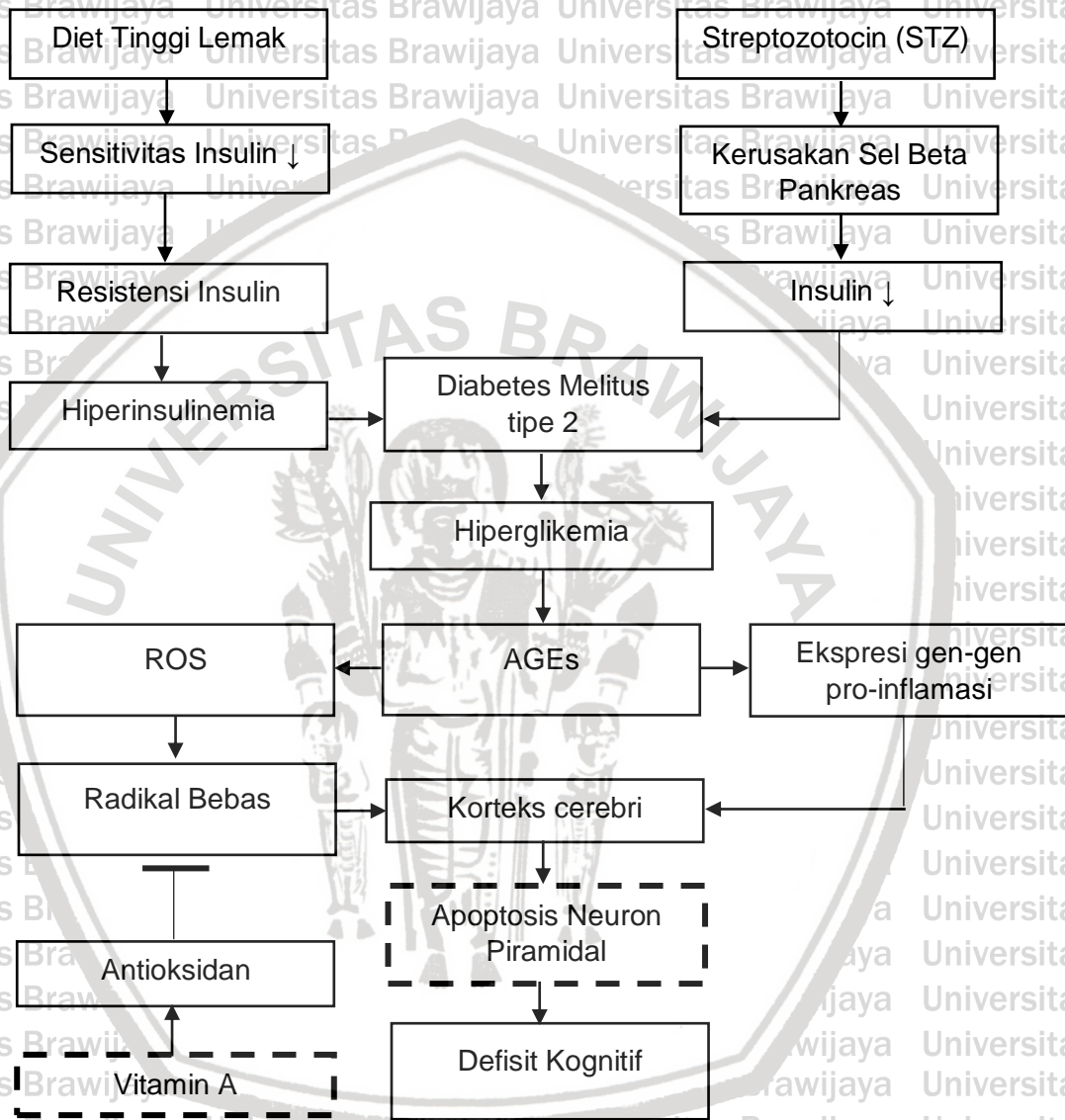
2.5 Hewan Coba Model Diabetes Melitus Tipe 2

Pada penelitian ini menggunakan hewan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Untuk mendapatkan hewan dengan model diabetes melitus tipe 2, hewan tersebut diberi makan diet tinggi lemak dan diinjeksi streptozotocin (STZ). Beberapa penelitian melaporkan bahwa tikus yang diberi makan dengan diet tinggi lemak mengembangkan resistensi insulin tetapi tidak hiperglikemia ataupun diabetes. Diet tinggi lemak digunakan untuk memulai resistensi insulin dimana merupakan salah satu fitur penting dari diabetes melitus tipe 2. Bersamaan dengan itu, streptozotocin (STZ) secara luas digunakan untuk menyebabkan diabetes melitus dengan menginduksi kematian sel β melalui alkilasi DNA (Zhang *et al.*, 2008).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

= Variabel yang diteliti

= Variabel yang tidak diteliti secara langsung

= Efek mengakibatkan

= Efek menghambat

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Diet tinggi lemak mengakibatkan turunya sensitivitas insulin sehingga menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Resistensi insulin akan mengakibatkan hiperinsulinemia untuk mengkompensasi kebutuhan tubuh akan insulin. Resistensi insulin ini merupakan fitur utama dalam diabetes melitus tipe 2.

2. Pemberian STZ menyebabkan kerusakan sel beta pankreas, sehingga mengakibatkan menurunnya produksi insulin. Lama kelamaan, insulin tubuh tidak akan bisa mengkompensasi tingginya glukosa darah sehingga terjadi kondisi hiperglikemia. Dengan demikian, diagnosis diabetes melitus tipe 2 yang ditandai dengan hiperglikemia, dapat ditegakkan. Hiperglikemia menyebabkan peningkatan *advanced glycation end-products* (AGEs) yang kemudian meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan ekspresi gen-gen pro-inflamasi. ROS bertindak sebagai radikal bebas dan menyebabkan stres oksidatif jaringan. Ketika radikal bebas menyerang korteks cerebri, hal ini menyebabkan apoptosis neuron piramidal. Apoptosis neuron piramidal pada korteks menyebabkan terjadinya defisit kognitif. Terjadinya apoptosis neuron piramidal ini dihitung dengan rasio neuron piramidal yang mengalami apoptosis terhadap neuron yang normal.

Vitamin A merupakan mikronutrien yang bersifat antioksidan. Antioksidan ini dapat meredam radikal bebas yang diproduksi oleh ROS akibat hiperglikemia. Pemberian vitamin A ini menurunkan stres oksidatif pada korteks cerebri, sehingga dapat mencegah terjadinya apoptosis neuron piramidal. Hal ini ditandai dengan turunya persentase sel apoptosis dan sel normal neuron piramidal korteks cerebri. Dengan demikian, defisit kognitif pada penderita DM akibat hiperglikemia dapat dicegah.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian vitamin A dapat menurunkan persentase sel apoptosis terhadap sel normal lapisan neuron piramidal korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* di laboratorium dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Teknik *sampling* yang digunakan adalah *Simple Random Sampling*. Pada penelitian ini, data diambil pada akhir penelitian setelah dilakukan perlakuan, kemudian hasil-hasil yang diperoleh dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar) jantan yang dipelihara di Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tikus putih yang dipilih adalah yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

Kriteria inklusinya meliputi:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar)
- b. Jantan, karena tikus betina memiliki hormon estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak maupun kolesterol
- c. Warna bulu putih
- d. Usia 6-8 minggu
- e. Berat badan 150-200 gram
- f. Kondisi sehat, aktif bergerak, dan tidak ada kelainan anatomis.

Kriteria eksklusinya adalah tikus putih yang mati selama penelitian berlangsung.

Pada penelitian ini, subjek dibagi menjadi dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan, sehingga total kelompok yang diperlukan adalah lima kelompok.

Tabel 4.1 Kelompok Penelitian

1	Kontrol Negatif (KN)	Pemberian diet normal dan tidak diinduksi <i>Streptozotocin</i> (STZ)
2	Kontrol Positif (KP)	Pemberian diet tinggi lemak dan diinduksi STZ (model DM tipe 2), tetapi tidak diberikan terapi
3	Perlakuan I (P1)	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan vitamin A dengan dosis 50 mg/kg BB
4	Perlakuan II (P2)	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan vitamin A dengan dosis 100 mg/kg BB
5	Perlakuan III (P3)	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan vitamin A dengan dosis 150 mg/kg BB

4.2.1 Jumlah Sampel

Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok menggunakan Rumus Federer (1963) dalam (Wahyuni, 2008) adalah sebagai berikut:

$$(p - 1)(n - 1) \geq 15$$

dengan p : jumlah perlakuan (5 kelompok, yaitu KN, KP, P1, P2, P3)

n : jumlah ulangan

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Dengan demikian, tikus yang dibutuhkan adalah minimal 5 ekor untuk setiap kelompok sehingga dibutuhkan 25 ekor tikus.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama lima bulan, yaitu bulan Agustus sampai dengan Desember 2017. Pemeliharaan dan perawatan tikus dilaksanakan di Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

Pengamatan histologis neuron piramidal korteks cerebri tikus dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah suplemen vitamin A.

4.4.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase sel apoptosis terhadap sel normal lapisan neuron piramidal korteks cerebri tikus.

4.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah berat badan, usia, jenis kelamin, pakan hewan, dan kondisi lingkungan kandang hewan.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model diabetes melitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar) jantan dengan berat badan kisaran 150-200 gram yang diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi streptozotocin (STZ) dengan dosis rendah 30 mg/kgBB (Zhang *et al*, 2008). Diagnosis diabetes melitus diukur dengan kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL (Rudijanto *et al*, 2015).

4.5.2 Dosis Suplemen Vitamin A

Suplemen vitamin A merupakan vitamin A dalam bentuk tablet dengan merk dagang IPI yang kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk, lalu dimasukkan ke dalam kertas obat dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150 mg/kgBB.

Penentuan dosis vitamin A diadaptasi dari hasil penelitian Nyamthab dan Umesh (2014) tentang evaluasi ekstrak biji tomat (*Solanum lycopersicum*), yang kaya vitamin A, sebagai antidiabetes pada dosis 50-200 mg/kgBB. Pada penelitian tersebut, dosis ekstrak biji tomat 50 mg/kgBB menunjukkan hasil yang signifikan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini juga menggunakan dosis minimal 50 mg/kgBB. Kemudian untuk dosis lainnya mengikuti deret aritmatika n, 2n, 3n, sehingga dosis yang dipakai adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150 mg/kgBB. Dengan berat badan rata-rata tikus adalah 300 gram (0,3 kg), maka dosis yang dipakai untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 15 mg, 30 mg, dan 45 mg.

4.5.3 Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Organ otak tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar jantan dipotong secara coronal pada level Eminentia mediana, Infundibulum. Kemudian dicat dengan

pengecatan HE. Neuron diamati pada seluruh ketebalan korteks cerebri pada lima area ketebalan 1 mm^2 , yaitu region medialis, dorsal superior, dorsal inferior, lateral superior, dan lateral inferior (Guadana-Ferraz, 1997; Towfighi dan Mauger, 1998). Pengamatan dilakukan dengan perbesaran objektif 40X dengan perangkat lunak Olympus OlyVIA.

Neuron piramidal adalah neuron pada lapisan III dan V korteks cerebri, dengan soma berbentuk segitiga dan memiliki dendrit apikal yang mengarah ke permukaan korteks dan dendrit basal yang mengarah ke substantia alba (Mescher, 2013; Gelfo *et al*, 2009).

4.5.4 Sel Apoptosis Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Lokasi dan metode pengamatan neuron dilakukan seperti pada poin 4.5.3 (neuron piramidal korteks cerebri). Neuron piramidal yang mengalami apoptosis adalah yang ditandai dengan nukleus basofilia dengan piknosis atau karyorrhexis inti sel (Yue *et al*, 1997; Towfighi dan Mauger, 1998; Rao *et al*, 2014). Hal ini dicirikan dengan penyusutan ukuran sel, kondensasi nukleus, fragmentasi nukleus, *apoptotic body* (Towfighi dan Mauger, 1998; Nishimura *et al*, 1999).

4.5.5 Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Lapisan Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Persentase sel apoptosis neuron diadaptasi dari penelitian Towfighi dan Mauger (1998) dan Bahey *et al* (2015). Sel normal neuron piramidal dan sel apoptosis dihitung pada 5 area yang mencakup keseluruhan ketebalan korteks cerebri, masing-masing dengan luas 1 mm^2 pada mikroskop cahaya perbesaran objektif 40X. Total sel apoptosis kemudian dijadikan persentase terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri.

Pengamatan seluler untuk lokasi *substantia grisea* dan *alba* serta morfologi neuron normal dan apoptosis dikonfirmasi terlebih dahulu oleh dokter spesialis patologi anatomi untuk validitas penelitian. Setelah tervalidasi, peneliti dan laboran melakukan pengamatan dan penghitungan neuron secara manual dengan perangkat lunak yang telah disebutkan.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan dan Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang digunakan sebanyak 30 ekor. Hewan tersebut dipelihara di Laboratorium Biokimia-Biomolekuler FKUB. Alat yang digunakan untuk pemeliharaan adalah bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup terbuat dari anyaman kawat. Satu bak digunakan untuk satu ekor tikus. Alat lainnya adalah rak untuk meletakkan kandang tikus, botol air minum, timbangan "*Saltorius melter*", baskom serba guna untuk alat bantu menimbang berat badan dan mengganti sekam, sarung tangan lateks, dan masker. Bahan yang digunakan adalah pakan normal atau tinggi lemak, air minum, dan sekam untuk kandang tikus.

4.6.2 Bahan dan Alat Diet Normal

Bahan untuk membuat diet normal adalah BR1, tepung terigu, dan air. Alat yang digunakan adalah timbangan, mangkuk plastik, loyang, gelas ukur, dan sarung tangan.

4.6.3 Bahan dan Alat Diet Tinggi Lemak

Bahan untuk membuat diet tinggi lemak adalah BR1 221,75 gram, tepung terigu 132,25, asam kolat 0,098 gram, kolesterol 7,105 gram, dan minyak

babi 184,24 gram (Handayani *et al*, 2009). Sedangkan alatnya adalah timbangan, mangkuk plastik, loyang, gelas ukur, dan sarung tangan.

4.6.4 Bahan dan Alat Induksi Streptozotocin (STZ)

Bahan untuk larutan STZ adalah *Streptozotocin* 100 gram, larutan penyangga sitrat 3 mL, dan akuades. Alat untuk induksi STZ adalah spuit disposabel "Terumo" 1 mL dan 3 mL.

4.6.5 Bahan dan Alat Pembuatan Sediaan Vitamin A

Bahan yang digunakan adalah tablet vitamin A merk IPI 6000 IU (1,8 mg). Sedangkan alat yang digunakan adalah blender kering, cawan petri, dan kertas obat.

4.6.6 Bahan dan Alat Pengukuran Glukosa Darah Tikus

Bahan yang digunakan adalah darah kapiler dari ekor tikus. Alat-alat yang digunakan adalah jarum 26 G, *Glucose Blood Analyzer* merk "Easy Touch", *alcohol swab*, dan serbet.

4.6.7 Bahan dan Alat Pembedahan dan Fiksasi Tikus

Bahan yang digunakan untuk pembedahan tikus adalah NaCl 0,9%, formalin 10%. Alat yang digunakan adalah gunting bedah, pinset, cawan petri, papan bedah, pins/jarum pentul, alcohol 70% (spray), gelas beaker, dan kapas. Pembiusan dilakukan dengan spuit disposabel 1 mL dan ketamine dosis 0,2 cc.

4.6.8 Bahan dan Alat Pembuatan Preparat Histologis

4.6.8.1 Pencetakan Jaringan

Bahan yang dipakai adalah organ otak yang telah difiksasi, alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 90%, alcohol 95%, xylol I dan II, dan parafin. Alat yang digunakan adalah *tissue basket* dan *tissue processor*.

4.6.8.2 Embedding

Bahan yang dipakai adalah potongan jaringan dan parafin. Alat yang digunakan adalah cetakan.

4.6.8.3 Pemotongan

Bahan yang dipakai adalah blok jaringan dalam parafin beku dan air hangat (40°C). Alat yang digunakan adalah *rotary microtome* dengan ketebalan 4-5 mikrometer, gelas objek, dan inkubator suhu 56°C.

4.6.8.4 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Bahan yang dipakai adalah jaringan otak yang telah dipotong, xylol III, II, I, alkohol absolut I, II, III, 95%, 90%, 80%, 70%, pewarna Hematoksilin, akuades, dan pewarna Eosin. Alat yang digunakan adalah gelas objek dan kaca penutup.

4.6.9 Bahan dan Alat Pengamatan Histopatologi Korteks Cerebri Tikus

Bahan yang digunakan adalah preparat histologis jaringan otak, sedangkan alat yang dipakai adalah mikroskop cahaya dan perangkat lunak Olympus OlyVIA *Virtual Slide Image*.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian

4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Pada penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB.

Sebelum penelitian dimulai, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu dengan penimbangan berat badan. Pada masa adaptasi, tikus diberi pakan normal masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti satu kali setiap harinya. Penggantian sekam dilakukan setiap tiga kali dalam

seminggu, sedangkan saat setelah diinjeksi STZ serta tikus sudah mulai ada tanda klinis DM, yaitu pengeluaran urin yang banyak, maka penggantian sekam dilakukan setiap dua hari sekali

4.7.1.2 Pembuatan dan Pemberian Diet Normal

Diet normal sebagai pakan standar yang digunakan dalam penelitian adalah *crumble* yang dibuat dengan mencampurkan tepung terigu, dicetak lalu dikeringkan. Setiap harinya satu ekor diberikan sekitar 25 gram diet normal, 1 kali dalam sehari dengan meletakkan pakan di atas anyaman kawat penutup kandang sehingga bisa diraih oleh tikus. Hanya saat masa adaptasi semua tikus diberikan diet normal ini, sedangkan untuk memulai perlakuan, diet normal hanya diberikan pada kontrol negatif.

4.7.1.3 Pembuatan dan Pemberian Diet Tinggi Lemak

Pembuatan diet tinggi lemak dengan mencampurkan semua bahan diet tinggi lemak, dicetak, lalu dikeringkan. Setiap harinya satu ekor tikus diberikan sebanyak 25 gram diet tinggi lemak, 1 kali dalam sehari dengan meletakkan pakan di atas anyaman kawat penutup kandang sehingga bisa diraih oleh tikus.

Pemberian diet tinggi lemak pada kelompok perlakuan tikus dilakukan mulai minggu ke-2 hingga akhir penelitian pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.

4.7.1.4 Pembuatan dan Injeksi Larutan STZ pada Tikus

Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan ke dalam 3 mL larutan penyangga sitrat pH 4.5, lalu di-*vortex* hingga homogen, sehingga dihasilkan larutan STZ stok. Larutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C (Handayani *et al*, 2009). Prosedur injeksi STZ ke tikus adalah dengan cara memposisikan tikus dengan abdomen menghadap kearah penyuntik. Abdomen didesinfeksi dengan

alkohol 70%, kulit tikus dicubit hingga bagian otot tercubit. Setelah itu spuit yang sudah diisi dengan STZ disuntikkan dengan cara intraperitoneal. Setelah diinjeksikan, semprotkan kembali dengan dengan alkohol 70%. Setelah diinjeksi STZ, 1 minggu setelahnya dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk mengkonfirmasi keadaan DM tipe 2 (Zhang *et al.*, 2008).

4.7.1.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Tikus diukur kadar glukosa darahnya yang diperoleh dari darah ujung ekor (Vena lateralis). Tikus yang akan diambil darahnya diletakkan pada tempat yang hanya cukup untuk satu ekor tikus saja dengan posisi ekor ke luar. Kemudian ekor tikus dibasahi dengan air hangat untuk memperlihatkan/memperjelas (vasodilatasi) vena lateralis. Setelah itu ekor diberi alkohol dan ditusuk dengan jarum untuk mengambil darahnya. Urut ekor ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka. Pengukuran glukosa darah menggunakan alat (Easy Touch) beserta strip untuk pengukuran glukosa darah. Selanjutnya darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan *glucometer*. Kemudian, dibiarkan selama 6 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar, dimana satuan skala pengukuran yang terbaca adalah mg/dL.

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dua kali, yaitu satu minggu setelah dilakukan injeksi STZ (untuk menegakkan diagnosis diabetes melitus) dan tiga minggu setelah pemberian perlakuan atau sebelum pembedahan dilakukan. Sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 10 jam, karena kadar glukosa darah yang diukur adalah kadar glukosa darah puasa. Kadar glukosa darah puasa normal pada tikus adalah 100 mg/dl (Handayani *et al.*, 2009). Diagnosis DM ditegakkan bila kadar glukosa darah puasa tikus adalah ≥ 140 mg/dL (7,8 mmol/L) (Zhang *et al.*, 2008).

4.7.1.6 Pembuatan dan Pemberian Vitamin A pada Tikus

Vitamin A didapatkan dalam bentuk tablet merk IPI 6000 IU (1,8 mg), kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender. Setelah itu dikemas ke dalam kertas obat dengan dibagi sesuai dosisnya, yaitu 15 mg, 30 mg, dan 45 mg. Cara pemberian ke tikus dengan cara menggunakan sonde langsung menuju lambung tikus sekali sehari, dimana vitamin A tersebut dilarutkan dengan aquades 2 mL kemudian diaduk, dimasukkan ke dalam spuit, lalu disondekan ke tikus.

4.7.1.7 Pembedahan dan Pengambilan Organ Otak Tikus

Tikus dibius dengan ketamin dosis 0,2 mL, kemudian pengambilan darah dilakukan secara intrakardial. Hal ini dikarenakan pengambilan darah untuk uji kadar insulin serum yang diperlukan bagi penelitian lain. Setelah tikus di-*euthanasia*, dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ otak tikus. Organ otak diambil dan difiksasi menggunakan formalin 10% untuk dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE (Wibowo, 2007).

4.7.1.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Otak Tikus

a. Fiksasi

Jaringan kemudian difiksasi dalam larutan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10% minimal 48 jam hingga mengeras. Setelah terfiksasi dengan sempurna, sampel organ di-*trimming* setebal $\pm 0,5$ cm pada potongan coronal di bagian *Eminentia mediana* dari *Infundibulum*. Potongan kemudian dimasukkan ke dalam *tissue cassette* untuk dimasukkan dalam *automatic tissue processor*.

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi digunakan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan sampel yang diuji. Sampel direndam di dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (30%, 50%, 75%, 95%, dan alkohol absolut) masing-masing selama 2 jam.

c. *Clearing*

Jaringan yang sudah menjalani proses dehidrasi kemudian dimasukkan ke dalam larutan *xylol* untuk melarutkan alkohol dan parafin. Ada 2 tahap proses *clearing* yaitu menggunakan *xylol I* dan *xylol II*.

d. Infiltrasi

Infiltrasi adalah proses pengisian ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian tersebut dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom.

e. *Embedding*

Embedding adalah proses penanaman jaringan dalam blok parafin. Parafin yang digunakan adalah parafin *histoplast*. Proses *embedding* dilakukan dengan menggunakan alat *tissue embedding console*.

f. Pemotongan (*Sectioning*)

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 mikron. Pemotongan dilakukan dengan alat *rotary microtome spencer*. Sediaan kemudian diletakkan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

g. Deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, sampel jaringan ditempatkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas

70-80°C, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

h. Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE)

- 1) Cat utama Harris Hematoksin selama 10-15 Menit
- 2) Cuci dengan air mengalir selama 15 Menit
- 3) Alkohol asam 1 % 2-5 Celup
- 4) Amonia lithium karbonat 3-5 Celup (bila kurang biru)
- 5) Eosin 10-15 Menit

i. Alkohol Bertingkat

- 1) Alkohol 70% 3 menit
- 2) Alkohol 80% 3 menit
- 3) Alkohol 96% 3 menit
- 4) Alkohol Absolut 3 menit

j. Penjernihan (*Clearing*)

- 1) Xylol 15 menit
- 2) Xylol 15 menit

k. *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

Slide / *object glass* ditutup dengan *cover glass* dan biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering siap untuk diamati.

4.7.1.9 Pengamatan Histopatologi Jaringan Otak Tikus

Pengamatan preparat histologi dilakukan dengan mengadaptasi dari penelitian Towfighi dan Mauger (1998) dan Bahey, *et al* (2015). Preparat

histopatologi jaringan otak tikus diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 40X. Pada 5 area korteks cerebri, neuron yang diamati adalah neuron piramidal pada seluruh ketebalan korteks tiap-tiap lapang pandangan. Pada setiap lapang pandang, dilakukan hitung sel yang mengalami apoptosis dan sel normal untuk kemudian dibandingkan dengan jumlah sel yang normal. Hitung perbandingan ini kemudian dilakukan hingga seluruh area dihitung, untuk kemudian diambil jumlah total sel apoptosis dan sel normal lalu diambil persentasenya.

Pengamatan seluler untuk lokasi subtantia grisea dan alba serta morfologi neuron normal dan apoptosis dikonfirmasi terlebih dahulu oleh dokter spesialis patologi anatomi untuk validitas penelitian. Setelah tervalidasi, peneliti dan laboran melakukan pengamatan dan penghitungan neuron secara manual dengan perangkat lunak yang telah disebutkan.

4.7.2 Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, data yang dikumpulkan adalah sebagai berikut.

1. Sisa pakan tikus yang dihitung setiap hari selama penelitian berlangsung.
2. Berat badan tikus yang diukur setiap minggu, dengan rincian setiap 4 kali selama penelitian berlangsung, yaitu:
 - a. pada awal adaptasi
 - b. minggu ke-2 (setelah adaptasi)
 - c. minggu ke-8 (setelah diberikan diet tinggi lemak serta diinjeksi STZ)
 - d. minggu ke-13 (pada akhir penelitian).

3. Kadar glukosa darah yang diukur satu minggu setelah dilakukan injeksi STZ dan 3 minggu setelah pemberian perlakuan/sebelum dilakukan pembedahan.
4. Rata-rata persentase sel apoptosis terhadap sel normal lapisan neuron piramidal koreks serebri yang diperoleh dari 10 lapang pandangan.

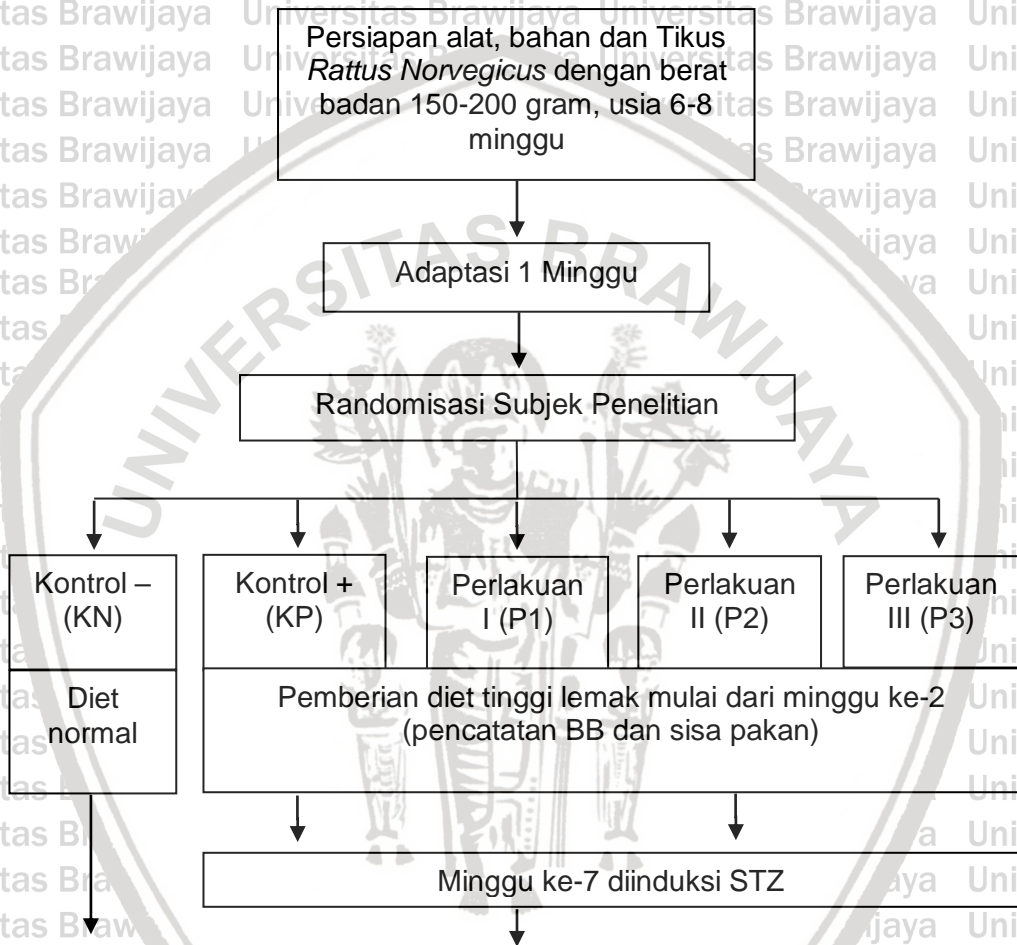
4.8 Pengolahan/Analisis Data

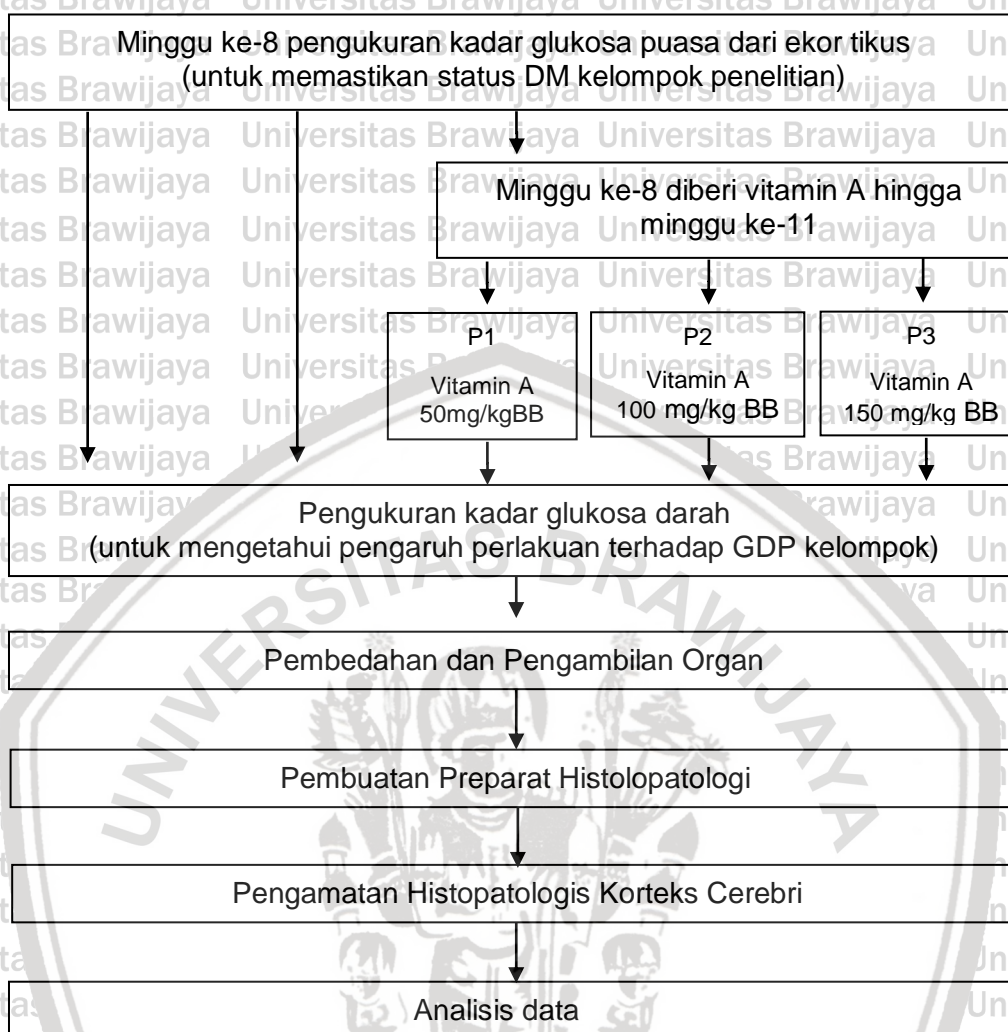
Dalam penelitian ini seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS Statistics 20. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

1. Uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui normalitas distribusi data karena $n < 50$.
2. Uji homogenitas dengan uji Levene untuk mengetahui homogenitas data antarkelompok.
3. Analisis komparasi dengan uji One Way ANOVA (*Analysis of Variance*) jika data berdistribusi normal dan homogen serta >2 kelompok. Jika data terdistribusi tidak normal atau tidak homogen, maka menggunakan uji Kruskal-Wallis.
4. Analisis lanjutan Post-Hoc jika telah diketahui ada perbedaan, untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan. Analisis post-hoc untuk uji One Way ANOVA adalah uji Tukey. Sedangkan Analisis Post-Hoc untuk uji Kruskal-Wallis adalah uji Mann-Whitney.
5. Uji korelasi dan regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel satu dengan variabel lainnya, yaitu dosis pemberian vitamin A

dengan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri.

4.9 Bagan Alur Penelitian





Gambar 4.2 Bagan Alur Penelitian

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Karakteristik Tikus

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan yang dipelihara selama tiga bulan dengan diberikan beberapa asupan makanan dan perlakuan. Tikus yang digunakan telah melalui beberapa persyaratan, yaitu usia 6-8 minggu, berat badan 150-200 gram, sehat yang ditandai dengan aktifnya bergerak, bulu tikus putih dan bersih. Tikus yang digunakan adalah sejumlah 6 ekor tiap kelompok perlakuan tikus, tetapi yang berhasil hingga diberikan perlakuan, bedah, hingga digunakan menjadi preparat histologi adalah sebanyak 20 tikus dari total jumlah tikus yang dipelihara. Selama rentang waktu pemeliharaan, tikus diberikan asupan makanan normal atau tinggi lemak sesuai dengan jenis kelompok perlakuan. Kemudian, setiap minggunya dilakukan pengukuran berat badan tikus dan nilai gula darah puasa (GDP) pada setiap kelompok untuk mengevaluasi status hiperglikemia. Setelah penelitian selesai, tikus dibedah kemudian diambil organ otak untuk digunakan dalam sampel pembuatan preparat parafin blok. Preparat tersebut selanjutnya diamati dibawah mikroskop untuk mengetahui gambaran histopatologi dari sampel tiap kelompok perlakuan. Pada pengamatan histologi di Laboratorium Patologi Anatomi, tiap sampel preparat dihitung jumlah sel apoptosis dan sel normal neuron piramidal korteks cerebri kemudian dijadikan persentase antara sel apoptosis dan sel normal.

5.2 Hasil Pengukuran Gula Darah Puasa

Gula darah puasa (GDP) diukur pada minggu ke 8 dan 11 dengan tujuan mengevaluasi apakah tikus pada kelompok perlakuan telah menjadi model DM tipe 2. Berikut tabel hasil pengukuran GDP pada minggu ke 8 dan 11.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran GDP Minggu ke-8 dan 11

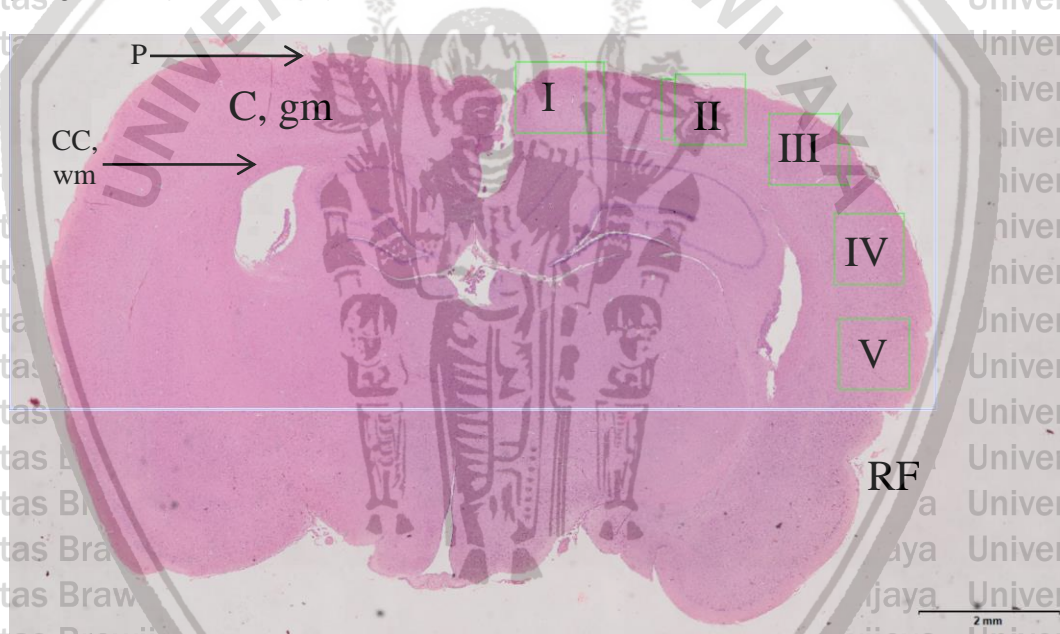
Kelompok	Rata-rata \pm SD (mg/dL)	
	Minggu ke-8	Minggu ke-11
KN	111.67 \pm 15.95	87 \pm 21,93
KP	162.33 \pm 50.02	108 \pm 13,75
P1	179.00 \pm 36.06	257,33 \pm 153,21
P2	221.00 \pm 87.18	123,67 \pm 40,05
P3	152.67 \pm 13.28	88,67 \pm 8,51

Berdasarkan tabel tersebut, dapat disimpulkan bahwa pada minggu ke-8 seluruh kelompok penelitian (kecuali kontrol negative) telah mengalami kondisi hiperglikemia dan dapat dinyatakan sebagai kondisi DM. Hal ini mengacu kriteria yang menyatakan tikus dikatakan positif DM jika kadar glukosa darah acak \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) atau GDP \geq 140 mg/dL (7,8 mmol/L) (Zhang *et al*, 2008).

Pada minggu ke-11, dilakukan kembali pengukuran GDP tikus untuk melihat efek vitamin A terhadap glukosa darah. Berdasarkan Tabel 5.1, KN tetap pada GDP normal. KP mengalami penurunan glukosa darah menjadi pada taraf normal. P1 mengalami peningkatan GDP dan tetap berstatus DM. P2 dan P3 mengalami penurunan kadar GDP dengan kembali ke GDP normal, yaitu $<$ 140 mg/dL.

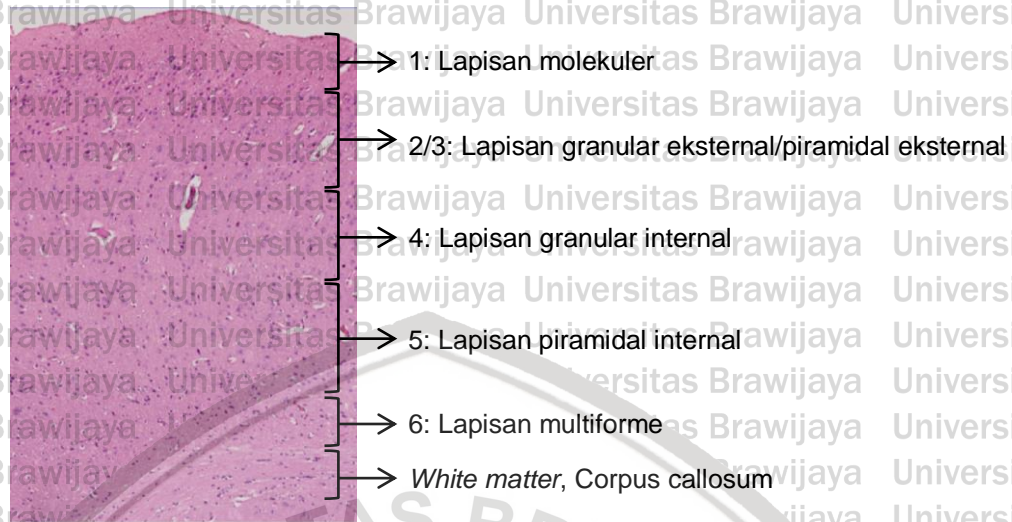
5.3 Gambaran Histologi Korteks Cerebri pada Berbagai Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Preparat histopatologi parafin blok yang menjadi sampel dalam penelitian ini adalah jaringan otak yang diwarnai dengan teknik pengecatan Hematoksin-Eosin, lalu dipindai untuk menjadi gambar preparat maya (*virtual slide image*). Pengamatan menggunakan perangkat lunak Olympus OlyVIA dengan perbesaran objektif 40X. Pengamatan preparat histologi dilakukan untuk menghitung sel apoptosis dan sel normal neuron piramidal korteks cerebri pada seluruh ketebalan korteks (minimum luas 1 mm²) pada 5 area dalam hemisfer yang sama (Gambar 5.1).



Gambar 5.2 Regio Korteks Cerebri yang Dihitung untuk Masing-Masing Preparat

Keterangan: Angka I-V menunjukkan masing-masing regio korteks yang akan diamati, yaitu seluruh ketebalan korteks dengan luas minimum 1 mm² pada hemisfer kiri dari arah medial hingga perbatasan dengan *rhinal fissure* (RF). (HE, perbesaran objektif 0,55X). (C, gm = Cortex, gray matter; CC, wm = Corpus callosum, white matter; Regio I = medial; II = dorsal superior; III = dorsal inferior; IV = lateral superior; V = lateral inferior; RF = *rhinal fissure*; P = Pia mater)



Gambar 5.3 Enam Lapisan Korteks Cerebri dari Pia Mater hingga Corpus Callosum

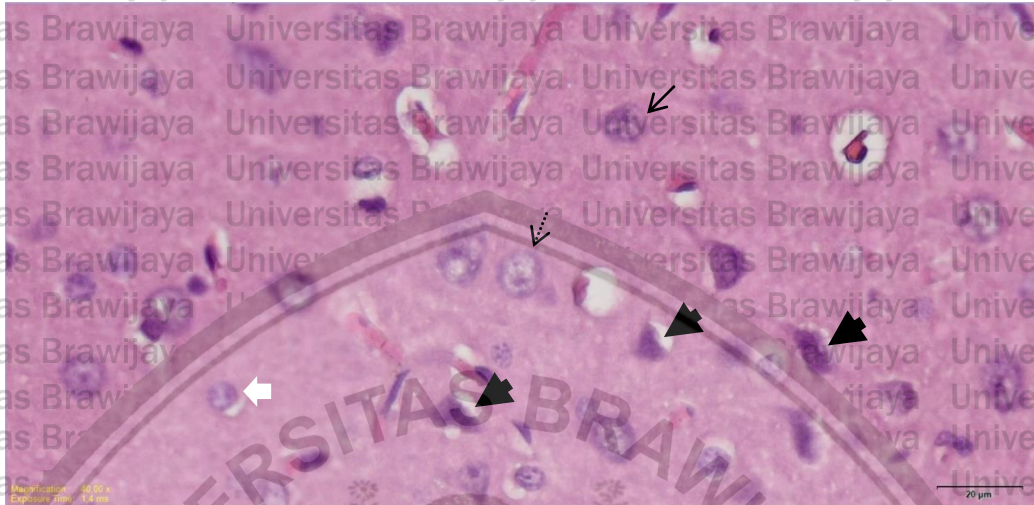
Keterangan: Pengecatan HE, Perbesaran objektif 4X

Gambar 5.2 menunjukkan enam lapisan korteks cerebri yang berada di antara pia mater dan *white matter*. Keenam lapisan tersebut adalah lapisan molekuler, granular eksternal, piramidal eksternal, granular internal, piramidal eksternal, dan multiforme. Jenis-jenis sel utama pada korteks cerebri ini adalah: sel piramidal yang ditandai dengan sitoplasma basofilik dan dendrit apikal, sel granular yang ditandai dengan bentuk bulat dan nukleolus prominen, dan sel glia yang berukuran kecil.



Gambar 5.4 Penampakan Histologi Korteks Cerebri pada Kontrol Negatif (KN)

Keterangan: tanda panah: neuron piramidal, ditandai dengan adanya *processus apicalis* (dendrit apikal); panah putus-putus: sel granular, panah putih: sel glia. (HE, perbesaran objektif 40X).



Gambar 5.5 Penampakkan Histologi Korteks Cerebri pada Kontrol Positif (KP)

Keterangan: tanda panah: neuron piramidal, ditandai dengan adanya *processus apicalis* (dendrit apikal); panah putus-putus: sel granular, kepala panah: neuron mati, panah putih: sel glia. (HE, perbesaran objektif 40X).



Gambar 5.6 Penampakkan Histologi Korteks Cerebri pada Kelompok Perlakuan Vitamin A Dosis 50 mg/kgBB (P1)

Keterangan: tanda panah: neuron piramidal, ditandai dengan adanya *processus apicalis* (dendrit apikal); panah putus-putus: sel granular, kepala panah: neuron mati, panah putih: sel glia. (HE, perbesaran objektif 40X).



Gambar 5.7 Penampakkan Histologi Korteks Cerebri pada Kelompok Perlakuan Vitamin A Dosis 100 mg/kgBB (P2)

Keterangan: tanda panah: neuron piramidal, ditandai dengan adanya processus apicalis (dendrit apical); panah putus-putus: sel granular, kepala panah: neuron mati, panah putih: sel glia. (HE, perbesaran objektif 40X).



Gambar 5.8 Penampakkan Histologi Korteks Cerebri pada Kelompok Perlakuan Vitamin A Dosis 150 mg/kgBB (P3)

Keterangan: tanda panah: neuron piramidal, ditandai dengan adanya processus apicalis (dendrit apical); panah putus-putus: sel granular, kepala panah: neuron mati, panah putih: sel glia. (HE, perbesaran objektif 40X).

5.4 Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Setelah jumlah sel apoptosis dan sel normal neuron piramidal korteks cerebri diperoleh, keduanya dijadikan bentuk persentase antara sel apoptosis terhadap sel normal. Dengan demikian, semakin tinggi persentase yang diperoleh, maka jumlah sel apoptosis akan semakin tinggi bila dibandingkan dengan neuron viabel yang ada. Sebaliknya, apabila diperoleh persentase yang rendah, maka berarti jumlah sel apoptosis rendah dibandingkan neuron piramidal yang viabel. Berikut adalah rerata persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri pada masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 5.8 Rerata Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri

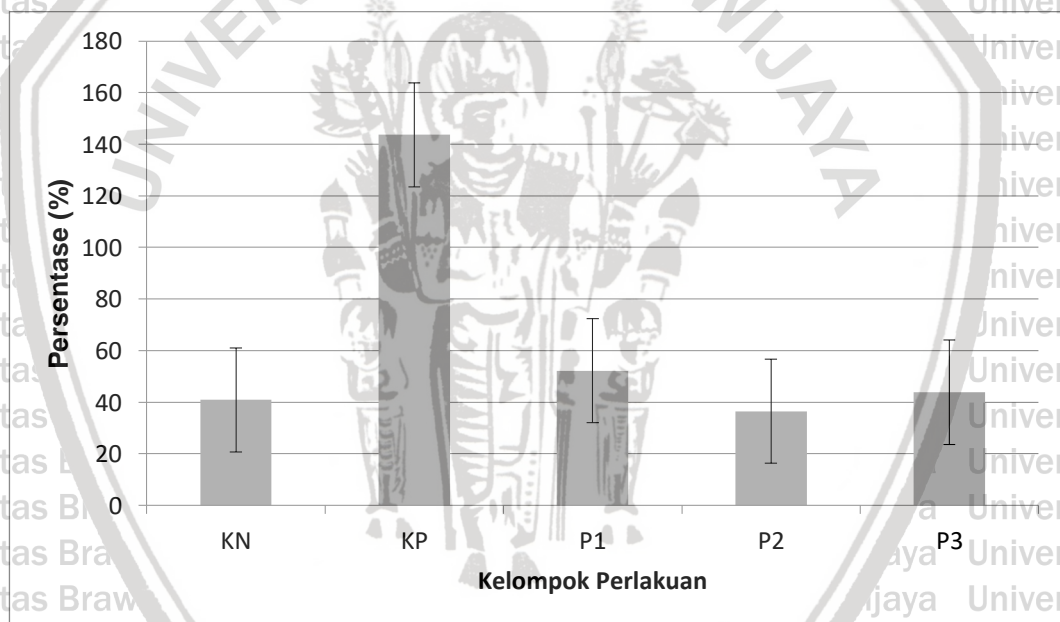
Kelompok Perlakuan	N	Mean (Rerata)	Std. Deviation
KN (Kontrol Negatif)	5	40.88438	5.209397
KP (Kontrol Positif)	5	143.65713	72.524227
P1 (Dosis 50mg/kgBB)	3	52.23691	9.369108
P2 (Dosis 100mg/kgBB)	2	36.50823	8.154612
P3 (Dosis 150mg/kgBB)	5	43.91482	11.394584
Total	20	68.60044	56.114289

Berdasarkan table 5.2, diketahui bahwa KN, KP, dan P3 memiliki jumlah sampel sesuai standar statistik, yaitu 5, sedangkan P1 dan P2, sejumlah 3 dan 2 berturut-turut. Penurunan jumlah sampel pada kelompok P1 dari sebelumnya 5 menjadi 3 tikus adalah dikarenakan 2 tikus mati saat penelitian berlangsung, yaitu pada saat fase pemeliharaan hewan coba. Pada P2, 2 tikus mati saat penelitian berlangsung pada fase pemeliharaan hewan coba, dan 1 tikus

mengalami kerusakan dalam pembuatan preparat histologis sehingga sampel jaringan korteks cerebri tidak dapat diamati.

Secara statistik, karena P2 tidak dapat memenuhi syarat jumlah sampel, maka hasil penelitian menjadi tidak terdistribusi normal. Untuk itu, dilakukan transformasi data dengan $1/n$ dengan harapan untuk memperkecil jangkauan (*range*) data. Dengan transformasi ini, diperoleh distribusi data yang normal.

Namun, karena P1 dan P2 memiliki jumlah sampel yang kecil, validitas internal dalam penelitian ini menjadi kurang.



Gambar 5.9 Grafik Rerata Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Tabel 5.8 diproyeksikan menjadi Gambar 5.9. Gambar 5.9 menunjukkan bahwa kelompok KN (Kontrol Negatif DM) memiliki rerata persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri yang terkecil, sementara rerata persentase terbesar dimiliki kelompok KP. Di antara kelompok

P1 (Dosis 1), P2 (Dosis 3), dan P3 (P3), ketiganya memiliki persentase yang jauh lebih kecil daripada KP. Kelompok P2 memiliki persentase yang lebih kecil daripada KN, menjadikannya kelompok dengan persentase terkecil. Walaupun pada P3 mengalami kenaikan persentase sel, tetapi P3 dapat dikatakan memiliki persentase sel yang hampir sama dengan P2. Merujuk pada tabel dan grafik tersebut, dapat diartikan bahwa dosis yang lebih besar berpengaruh terhadap perubahan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri yang lebih besar pula. Dengan demikian, dari tabel dan grafik tersebut dapat disimpulkan bahwa dari perlakuan yang telah diberikan, dosis vitamin A 100 mg/dL adalah dosis optimum untuk menurunkan persentase sel apoptosis dan sel neuron piramidal tikus yang telah diinduksi menjadi model DM tipe 2.

5.5 Uji Beda Rata-Rata antara Pemberian Vitamin A dengan Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Data persentase sel apoptosis dan sel neuron piramidal korteks cerebri dianalisis secara statistik dengan program SPSS for Windows versi 20.0 dengan tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$. Analisis data dilakukan dengan tujuan akhir menyimpulkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan dari persentase neuron yang diteliti.

Pengujian yang dilakukan menggunakan metode uji beda rata-rata, yaitu uji one-way ANOVA (untuk >2 kelompok perlakuan). Sebelum dilakukan pengujian tersebut, ada asumsi yang mendasari, yaitu normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk, dan uji homogenitas dengan Levene. Jika data

yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji Kruskal-Wallis (pengganti one-way ANOVA).

5.5.1 Uji Normalitas

Normalitas distribusi data dianalisis menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah data $n < 50$. Hasil dari Uji Normalitas bervariasi dari kisaran 0,857. Hal ini dapat disimpulkan data yang didapat terdistribusi normal pada setiap kelompoknya karena nilai $p > 0,05$.

5.5.2 Uji Homogenitas

Untuk menguji apakah sebaran data adalah homogen atau tidak digunakan uji Levene. Dalam langkah ini didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,56. Nilai ini memiliki arti bahwa data yang didapat homogen atau dengan kalimat lain, tidak adanya varian antarkelompok data karena $p > 0,05$.

5.5.3 Uji One-way ANOVA

Dalam melakukan uji ANOVA, syarat yang harus dipenuhi adalah data terdistribusi normal dan homogen. Tujuan dari dilakukannya uji ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan diantara seluruh kelompok perlakuan.

Hasil dari uji ANOVA terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri memberikan hasil signifikansi sebesar 0,003 ($p < 0,05$). Dari nilai ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pada Pemberian Vitamin A terhadap Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteksi Cerebri Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.

5.5.4 Uji *Post-hoc* Tukey

Uji *post-hoc* merupakan langkah untuk menentukan kelompok mana saja yang memiliki perbedaan secara bermakna. Pada uji ini disebut bermakna atau signifikan jika $p < 0,05$. Uji *post-hoc* dengan menggunakan fungsi Tukey HSD

didapatkan perbedaan bermakna antara KP dengan KN, P1, P2, P3. Namun, tidak ada perbedaan secara signifikan ($p > 0,05$) antara KN, P1, P2, P3. Hal ini berarti P1, P2, P2 memiliki pengaruh yang secara statistik signifikan terhadap KP, tetapi ketiga kelompok perlakuan ini tidak memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan.

5.6 Uji Hubungan antara Dosis Vitamin A dengan Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal Korteks Cerebri

Pengujian dilakukan dengan menggunakan uji Pearson apabila data parametrik (kedua data terdistribusi normal). Bila syarat uji Pearson tidak terpenuhi, maka pengujian dilakukan dengan uji Spearman. Untuk dosis vitamin A, diambil dari kelompok KP, P1, P2, dan P3 untuk melihat ada-tidaknya korelasi. Berdasarkan uji normalitas, tidak semua data terdistribusi normal, yaitu Dosis ($p < 0,05$), sehingga uji dilakukan dengan uji Korelasi Spearman. Korelasi Spearman didapatkan signifikansi $p < 0,001$, maka dapat disimpulkan bahwa ada hubungan antara pemberian vitamin A dengan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal dengan koefisien korelasi yang didapatkan adalah $-0,791$, yang berarti terdapat korelasi negatif dengan kekuatan korelasi sangat kuat. Karena terdapat korelasi, maka pengujian dilanjutkan dengan uji linear regresi yang memberikan hasil akhir persamaan:

$$\text{Persentase} = 126,867 - (\text{dosis vit A}) \cdot 0,688.$$

Berdasarkan persamaan tersebut dapat diartikan bahwa tiap penambahan 1 dosis vitamin A, persentase sel apoptosis terhadap sel normal berkurang sebanyak $0,688$.

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Persentase Sel Apoptosis terhadap Sel Normal Neuron Piramidal

Korteks Cerebri pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan

Diabetes mellitus (DM) diasosiasikan dengan komplikasi jangka panjang yang menyerang otak, yang bermanifestasi sebagai kemampuan kognitif yang buruk dan abnormalitas lain yang terlihat dengan pencitraan otak bila dibandingkan dengan populasi normal (Biessels *et al*, 2008). Orang dengan DM tipe 2 memiliki penurunan kognitif lebih besar dibandingkan dengan orang dewasa tanpa DM tipe 2, dengan efisiensi psikomotor, fungsi eksekutif dan keterampilan belajar dan memori adalah yang paling banyak dipengaruhi (Stewart dan Liolitsa, 1999).

Studi dengan pencitraan struktural otak menunjukkan bahwa densitas (kepadatan) *gray matter* korteks lebih rendah pada pasien diabetes dengan retinopati dibandingkan dengan pasien DM yang tidak mengalami retinopati (Musen *et al*, 2006; Wessels *et al*, 2006). Hal ini mengimplikasikan bahwa salah satu faktor yang berperan dalam patologi kerusakan struktural otak pada penderita DM adalah adanya komorbiditas mikrovaskular.

Hiperglikemia menjadi patofisiologi utama dalam perjalanan penyakit diabetes melitus. Hiperglikemia memicu produksi *advanced glycation end-products* (AGEs) dan merusak sel-sel target melalui beberapa mekanisme. AGEs memodifikasi protein intraseluler sehingga fungsinya menjadi berubah, memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS), dan meningkatkan ekspresi gen-gen

pro-inflamasi (Kuhad *et al*, 2009). Hal tersebut kesemuanya berujung pada induksi apoptosis sel-sel neuronal pada sistem saraf pusat (Kuhad *et al*, 2009).

Korteks cerebri, memiliki 6 lapisan yang berada di antara pia mater di superficial dan substantia alba di profundus. Keenam lapisan tersebut, dari superficial ke profundus adalah lapisan molekuler, granular eksternal, piramidal eksternal, granular internal, piramidal internal, dan multiforme (Guadano-Ferraz, 1997; Mescher, 2013). Masing-masing lapisan ini terdiri atas populasi sel-sel yang berbeda, yang tersuspensi di dalam neuropil dan dipisahkan oleh pembuluh darah kecil. Jenis sel utama pada korteks ini adalah neuron piramidal yang memiliki sitoplasma basofilik dan dendrit apical, neuron granular yang ditandai dengan bentuk sel bulat dan nucleolus prominen, dan sel-sel glia yang berukuran kecil dengan nucleus yang padat (Bahey *et al*, 2015).

Berdasarkan uraian tersebut, didapati bahwa hal ini bersesuaian dengan temuan histopatologi persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal pada kelompok-kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif DM (KN) ditemukan persentase sel yang kecil, yaitu berarti terdapat lebih banyak neuron piramidal normal daripada sel yang secara morfologis mati. Sebaliknya, pada kontrol positif DM (KP), ditemukan jumlah sel piramidal yang mati lebih banyak daripada sel normal. Populasi sel piramidal pada KN lebih banyak daripada KP. Hal ini menunjukkan sitostruktural yang lebih baik pada KN.

Untuk kelompok P1, P2, dan P3, gambaran histologi korteks cerebri mendekati kontrol negatif, dengan P2 memiliki persentase sel apoptosis yang lebih kecil dibanding KN. Hal ini disebabkan oleh vitamin A yang memiliki sifat antioksidan karena struktur rantai hidrofobik unit polietilen yang dapat

menetralkan oksigen *singlet* (1O_2) dan radikal bebas *thiol*, mengikat dan menstabilisasi radikal peroksil (Palace *et al*, 1999). Di samping itu, Chen dan Napoli (2007) membuktikan bahwa metabolit vitamin A, *all-trans-retinoic acid*, menstimulasi translasi dan menginduksi pembentukan *spines* (dendrit) neuron hippocampus melalui RAR α yang memicu transkripsi protein sintesis dendrit. Di sisi lain, defisiensi vitamin A menyebabkan terjadinya penurunan fungsi memori dan kognitif (Etchamendy *et al*, 2003). Dengan sifat antioksidan dan faktor transkripsi yang dimilikinya, hal ini menunjukkan bahwa vitamin A dapat menetralsasi stres oksidatif yang diakibatkan oleh hiperglikemia pada penderita DM tipe 2 sekaligus memperbaiki neuron secara struktural.

Namun, perbaikan neuron melalui pembentukan *spines* (dendrit) neuron melalui RAR α yang memicu transkripsi protein sintesis dendrit, dapat dilakukan apabila *injury* pada neuron bersifat reversible atau sel masih dalam tahap degeneratif (Chen dan Napoli, 2007). Untuk sel yang telah mengalami kematian (*irreversible injury*), maka neuron tersebut tidak bisa dikembalikan fungsinya (Kumar *et al*, 2015). Berdasarkan uraian tersebut, dapat dikatakan bahwa vitamin A memperbaiki neuron piramidal melalui netralisasi ROS dan perbaikan struktural dengan memicu pembentukan dendrit neuron.

Namun, berdasarkan hasil penelitian, diperoleh hasil bahwa persentase sel apoptosis pada P2 lebih kecil daripada P3, sehingga dosis optimum vitamin A adalah 100 mg/kgBB. Pada P3, terjadi kenaikan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh proses autooksidasi dan stress anti-oksidatif yang terjadi pada dosis 150mg/kgBB.

Autooksidasi merupakan proses oksidasi spontan suatu zat karena paparan oksigen sehingga membentuk peroksida atau hidroperoksida, yang memiliki sifat seperti radikal bebas (Awad dan Bradford, 2010). Karena tingginya kadar vitamin A dalam tubuh melebihi kadar radikal bebas yang akan dinetralkan, maka vitamin A ini akan terpapar dengan oksigen di dalam jaringan sehingga mengalami autooksidasi dan bersifat seperti radikal bebas kemudian menginduksi stres oksidatif yang dapat merusak membran sel dan DNA sel target sehingga menyebabkan kematian sel. Hal ini bersesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al* (2003) bahwa autooksidasi dari campuran likopen dan vitamin A dapat menginduksi apoptosis sel pada sel leukemia promyelositik HL-60. Selain itu, mekanisme lain yang mungkin mendasari terjadinya peningkatan sel apoptosis pada P3 adalah karena stress anti-oksidatif. Stress anti-oksidatif merupakan kebalikan dari stress oksidatif, yaitu tingginya level antioksidan dalam tubuh hingga menyebabkan berkurangnya oksidan fisiologis tubuh (Poljsak dan Milisav, 2012). Hal ini juga bersesuaian dengan temuan penelitian Towler (2013) yang menyatakan bahwa defisiensi ROS mitokondria pada diabetes mellitus dapat menyebabkan penurunan densitas mitokondria renal podosit sehingga dapat mencetuskan albuminuria. Pada penelitian lain, sesuai dengan autooksidasi, retinol pada konsentrasi lebih besar dari dosis fisiologis tubuh, dapat menginduksi stress oksidatif dan apoptosis pada sel fibroblast manusia (Gimeno *et al*, 2004). Oleh karena mekanisme-mekanisme tersebut, persentase sel apoptosis pada P3 mengalami peningkatan apabila dibandingkan dengan P2.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, yaitu kriteria kematian neuron piramidal ditegakkan secara morfologis. Determinasi secara morfologis ini memiliki kekurangan dalam membedakan secara pasti apakah neuron benar-benar mengalami apoptosis atau masih dalam tahap degeneratif. Selain itu, kesalahan dalam pengecatan dapat menyebabkan munculnya artifak sel-sel basofilik, yaitu sel yang secara morfologis mati (basofilik) tetapi artifak. Kualitas pengecatan berperan penting dalam integritas sel yang diamati karena basofilia dan penyusutan neuronal merupakan artifak yang umum ditemukan. Artifak ini disebabkan oleh penanganan kasar dan kompresi organ otak yang belum difiksasi secara sempurna saat diseksi calvaria dan juga dapat diakibatkan pengeringan jaringan otak yang kurang sempurna sebelum fiksasi dan pemotongan (Rao *et al*, 2014). Dengan demikian, diperlukan pengecatan imunohistokimia untuk menyingkirkan kemungkinan kesalahan pengecatan HE. Oleh sebab itu, diperlukan pengecatan imunohistokimia untuk membedakan viabilitas neuron dan menyingkirkan kemungkinan kesalahan pengecatan HE, misalnya dengan petanda apoptosis (caspase-9) atau nukleus neuron (NeuN).

Keterbatasan lain dalam penelitian ini adalah terdapat beberapa kelompok yang jumlahnya kurang memenuhi target, seperti P1 (3 sampel), P2 (2 sampel), dan P3 (3 sampel), yang seharusnya 5. Hal ini menyebabkan hasil pada penelitian ini, walaupun signifikan, kurang dapat menggambarkan populasi karena $n < 5$. Berkurangnya jumlah tersebut dikarenakan terdapat tikus yang mati saat penelitian dan adanya 1 slide histologis yang rusak saat proses blok parafin sehingga tidak dapat diamati. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih

lanjut dengan jumlah sampel yang memenuhi standar statistik agar hasil yang diperoleh dapat lebih menggambarkan populasi,



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah:

Vitamin A dapat menurunkan persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri tikus model diabetes melitus tipe 2.

Dosis optimum untuk menurunkan persentase sel apoptosis adalah vitamin A 100 mg/kgBB.

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Proses pengamatan sebaiknya dilakukan dengan metode yang lebih spesifik untuk menilai apoptosis sel, misalnya dengan penanda caspase-3 fluoresensi, supaya lebih mudah dalam membedakan sel apoptosis dengan sel degeneratif, juga membedakan sel apoptosis dengan nekrosis, juga untuk menghindari kesalahan akibat pengamatan HE.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek vitamin A terhadap persentase sel apoptosis terhadap sel normal neuron piramidal korteks cerebri model diabetes mellitus tipe 2 pada hewan lebih tinggi dengan jumlah sampel yang lebih besar.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek vitamin A terhadap fungsi kognitif pasien dengan DM tipe 2.

DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan; Vol 37; Suppl: S81.
- American Diabetes Association. 2016. American Diabetes Association Standard of Medical Care in Diabetes—2016. *Diabetes Care*. 2016 Jan Vol. 39; Supp 1.
- Awad A.B. dan Bradford P.G. 2010. *Adipose Tissue and Inflammation*. 1st ed. Florida: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Bahey N.G., Elaziz H.O.A., Gadalla K. 2015. Toxic effect of aflatoxin B1 and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus. *Tissue and Cell*, 47 (2015), pp. 559-566.
- Biessels G.J., Deary I.J., Ryan C.M. 2008. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol* 2008; 7, pp. 184-190.
- Bressler, S. and Kelso, J. 2001. Cortical coordination dynamics and cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(1), pp.26-36.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414:813–20.
- Chen, N. dan J. L. Napoli. 2007. All-Trans-Retinoic Acid Stimulates Translation and Induces Spine Formation in Hippocampal Neurons through A Membrane-Associated RAR. *The FASEB Journal* 22(1): 236-245.
- Lee, A.Y.W. dan Chung, S.S.M. 1999. Contribution of Polyol Pathway to Oxidative Stress in Diabetic Cataract. *The FASEB Journal*, 13(1), pp.23-30.
- Dash, S. 2013. Cognitive Impairment and Diabetes. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2(3): 218-223.
- Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. 2008. *Fennema's Food Chemistry*. Ed 4. Florida: CRC Press.
- Du, X., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. and Brownlee, M. 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9), pp.1341-1348.
- Etchamendy N., et al. 2003. Vitamin A Deficiency and Relational Memory Deficit in Adult Mice: Relationships with Changes in Brain Retinoid Signaling. *Behavioural Brain Research* 145(1-2): 37-49.

- Gelfo, F., De Bartolo, P., Giovine, A., Petrosini, L. and Leggio, M. 2009. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(4), pp.353-365.
- Gimeno A., Zaragosa R., Vivo-Sese I., Vina J.R., Miralles V.J. 2004. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology*. Vol 13(1): 45-54.
- Gispén W.H. dan Biessels G.J. 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neuroscience*. Vol 23: 542-549.
- Gold S.M., et al. 2007. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*. Vol 50: 711-719.
- Guadano-Ferraz A., Obregon M.J., Germain D., Bernal J. 1997. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Neurobiology* 94(1), pp. 10391-10396.
- Hammond C. 2015. *Cellular and Molecular Neurophysiology*. 4th ed. Massachusetts: Academic Press.
- Handayani W., Rudijanto A., dan Indra M.R. 2009. Susu Kedelai Menurunkan Resistensi Insulin pada Rattus norvegicus Model Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 25 (2).
- Holick, C. N., et al. 2002. Dietary Carotenoids, Serum Beta-Carotene, and Retinol and Risk of Lung Cancer in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* 156(6): 536-547. Web.
- International Diabetes Association. 2015. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. Brussels: International Diabetes Association.
- Ji X, Zhang L, Liu R, Liu Y, Song J, Dong H, Jia Y, Zhou Z. 2014. Potential targets for protecting against hippocampal cell apoptosis after transient cerebral ischemia reperfusion injury in aged rats. *Neural Regener. Res*. 2014 Jun. Vol 9, Issue 11: 1122-1128.
- Kaku, K. 2010. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and its Treatment Policy. *Japan Medical Association Journal*, 53(1): 41-46.
- Kasper, D. L., et al. 2016. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. New York: McGraw-Hill Education.
- Khadori, R. 2015. *Type 2 Diabetes Mellitus*. Medscape, [daring], <http://emedicine.medscape.com/article/117853-author>, diakses pada 1 Januari 2017.

- Kuhad A, Bishnoi M, Tiwari V, Chopra K. 2009. Suppression of NF- κ B signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacol Biochem Be*. Vol 92: 251-259.
- Kumar V, Abbas A.K., Aster J.C. 2015. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. Ottawa: Elsevier.
- Longo, D. L., et al. 2012. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York: McGraw-Hill Education.
- Marshall S., Bacote V, dan Traxinger R.R. 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, pp.4706-4712.
- Messier, C. 2005. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiology of Aging*, 26(1), pp.26-30.
- Mescher, A. L. 2013. *Junquiera's Basic Histology Text and Atlas*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Medical.
- Musen G, Lyoo IK, Sparks CR, et al. 2006. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes*; 55: 326–33.
- Nugroho, A. E. 2006. Animal Models of Diabetes Mellitus: Pathology and Mechanism of Some Diabetogenics. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity* 7(4): 378-382. Web. 2 Jan. 2017.
- Nishimura, R., et al. 1999. Apoptosis in Breast Cancer and Its Relationship to Clinicopathological Characteristics and Prognosis. *Journal of Surgical Oncology* 71: 226-234.
- Nyamthabad, S. dan Umesh, M. 2014. Evaluation of Antidiabetic Activity of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Seed Extract. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 4(1): 811-814.
- Palace, V. P., et al. 1999. "Antioxidant Potentials of Vitamin A and Carotenoids and Their Relevance to Heart Disease". *Free Radical Biology and Medicine* 26(5-6): 746-761.
- Polsjak B, dan Milisav I. 2012. The Neglected Significance of "Antioxidative Stress". *Oxidative Med and Cel Longevity*, 2012: 1-12.
- Rao D.B., Little P. 2014. Brain: Introduction. NTP Nonneoplastic Lesion Atlas. National Toxicology Program. [daring] <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/nervous/brain/index.htm>. Diakses pada 22 Desember 2017.

- Riskesdas. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Jakarta: Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Rudijanto, A., et al. 2015. *Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. 1st ed. Jakarta: PB PERKENI.
- Ruis, C., et al. 2009. Cognition in the Early Stage of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 32(7): 1261-1265.
- Setiawan, B. dan Suhartono, E. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 55 (2): 86-91.
- Stewart R, Ljolitsa D. 1999. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med*; 16: 93–112.
- Towfighi J., Mauger D. 1998. Temporal evolution of neuronal changes in cerebral hypoxia– ischemia in developing rats: a quantitative light microscopic study”. *Brain Res Dev*. Vol 109: 169-177.
- Towler D.A. 2013. Mitochondrial ROS deficiency and diabetic complications: AMP[K]-lifying the adaptation to hyperglycemia. *J Clin Investigation* 123(11): 4573-4576.
- Tripathi B. K., Srivastava A.K. 2006. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Medical Science Monitor* 12(7): RA130-147. Web.
- Wahyuni, A.S. 2008. *Statistika Kedokteran*. Jakarta: Bomboedoea Communication.
- Wibowo, B.A. 2007. *Kajian Histomorfologi Otak Tikus Putih pada Kondisi Hiperglikemia dan Pemberian Vitamin E*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- World Health Association. 2016. *Global Report on Diabetes*. Geneva: World Health Association.
- Wessels AM, Simsek S, Remijnse PL, et al. 2006. Voxel-based morphometry demonstrates reduced grey matter density on brain MRI in patients with diabetic retinopathy. *Diabetologia*; 49: 2474–80.
- Yerneni, K., Bai, W., Khan, B., Medford, R. and Natarajan, R. 1999. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 48(4), pp.855-864.
- Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., Cooper, C., Cady, E., Wyatt, J., Reynolds, E., Edwards, A. and Squier, M. 1997. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 23(1), pp.16-25.

Zhang, M., et al. 2008. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Experimental Diabetes Research* 2008: 1-9.

Zhang H., Kotake-Nara E., Ono H., Nagao A. 2003. A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Rad Biol and Med*, 25(12): 1653-1663.

