



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Pensinyalan FOXO1 pada tikus dengan diet restriksi vitamin B12  
yang mengalami hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin**

**TESIS**

**MARCEL ANTONI**

**1706121350**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK**

**JAKARTA**

**2020**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Pensinyalan FOXO1 pada tikus dengan diet restriksi vitamin B12  
yang mengalami hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik  
(M.Biomed)**

**MARCEL ANTONI**

**1706121350**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN FISILOGI**

**JAKARTA**

**2020**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Marcel Antoni

NPM : 1706121350

Tanda Tangan :

Tanggal : 13 Juli 2020



## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Marcel Antoni  
NPM : 1706121350  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Pensinyalan FOXO1 pada tikus dengan diet restriksi vitamin B12 yang mengalami hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M.Biomed) pada Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed, Ph.D

()

Pembimbing II : Dr. dr. Trinovita Andraini, M.Biomed, Ph.D

()

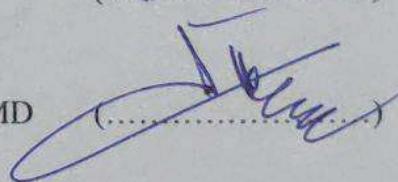
Penguji I : dr. Nurul Paramita, M.Biomed, Sp.KFR

()

Penguji II : Prof. Dr. dr. Sri Widia Jusman, MS

()

Penguji III : Prof. Dr. dr. Pradana Soewondo, Sp.PD-KEMD

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 30 Juli 2020

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik

Prof. Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya naikkan kepada Juruselamat saya, Tuhan Yesus Kristus, Sang Gembala Agung, karena atas segala kasih dan karunia-Nya, tesis ini akhirnya dapat saya selesaikan.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, akan sulit bagi saya menyelesaikan tesis ini. Oleh sebabnya, dengan segala kerendahan hati, saya ingin mengucapkan terima kasih saya sebesar-besarnya kepada:

1. Istri saya tercinta, dr. Linda Fransiska, yang senantiasa memberikan kepada saya dukungan baik cinta, waktu, tenaga, materi, dan semangat bagi saya untuk menyelesaikan studi S2 ini. Juga anak-anak saya tercinta, baik Louis Maximilian Geraldly dan Louanne Michelle Gavrila, yang senantiasa menjadi penghiburan dan pendorong bagi saya.
2. Papa dan mama saya, Yusuf Riswan dan Lilik Hwadiati Poernomo yang senantiasa mendoakan dan telah memberikan segalanya untuk saya, sedari kecil hingga saat ini.
3. dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed, Ph.D, selaku Pembimbing I dan Dr. dr. Trinovita Andraini, M.Biomed, Ph.D selaku Pembimbing II yang telah memberikan banyak waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing saya, baik selama masa studi, penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian, publikasi jurnal, penyusunan tesis, bahkan sampai dengan ujian tesis.
4. dr. Nurul Paramita, M.Biomed, Sp.KFR, selaku Penguji I; Prof. Dr. dr. Sri Widia Jusman, MS selaku Penguji II, dan Prof. Dr. dr. Pradana Soewondo, Sp.PD-KEMD selaku Penguji III, yang telah memberikan saran dan masukan-masukan yang sangat membangun bagi saya, baik saat ujian proposal maupun saat ujian tesis.
5. Seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik FKUI dan staf pengajar di kekhususan Fisiologi, Prof. Dr. dr. Neng Tine Kartinah, MS, AIFO; Dr. dr. Minarma Siagian, MS AIFM; Dr. dr. Dewi Irawati Soeria Santoso, MS; dr. Sophie Yolanda, M.Biomed; dr. Nurhadi Ibrahim, Ph.D; Dr. dr. Ermita Ilyas, MS; drg. Antonia, MS; Gulshan Fahmi El Bayani, S.Gz, M.Biomed, yang telah mengarahkan dan membimbing saya selama masa studi dalam memahami ilmu biomedik secara umum dan ilmu fisiologi manusia secara khusus.

6. Prof. drg. Endang Winiati Bachtiar, M.Biomed, Ph.D selaku Kepala Laboratorium Oral Biology, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, yang memberikan kesempatan kepada saya, untuk melakukan penelitian tesis di Laboratorium Oral Biology, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia; juga kepada semua staf Laboratorium *Oral Biology*, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia atas segala bantuan dan keramahannya, selama saya melakukan penelitian disana.
7. Prof. Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik sekaligus Kepala Klaster *Molecular Biology and Proteomics Core Facilities* IMERI-FKUI, yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk mengikuti kursus *real-time* PCR dan Western Blot, juga memberikan saya kesempatan untuk melakukan penelitian disana; juga Resda, Sekar dan Edwin atas ilmu dan pengalaman-pengalaman yang diberikan; yang telah mengajarkan saya cara melakukan *real-time* PCR dan Western Blot, selama dan bahkan sesudah kursus.
8. Teman-teman di kekhususan fisiologi, dr. Rickie, Taufiq, Randika Arrody, dan Luluk Nuraziza Widhowati atas kerjasama dan dukungan yang diberikan selama masa studi; juga dr. Irena Ujianti, M.Biomed, atas segala bantuan, masukan dan nasihat berharga yang diberikan kepada saya dalam menyelesaikan publikasi jurnal dan juga selama masa penelitian.
9. dr. Heriyanto, M.Biomed, sebagai teman baik di pekerjaan maupun studi, yang telah memberikan bantuan baik waktu dan tenaga bagi saya dalam menyelesaikan tesis ini.
10. Pengurus Yayasan Pendidikan Tinggi Krida Wacana, Rektorat, Dekan, Wakil-wakil Dekan, serta rekan-rekan di Universitas Kristen Krida Wacana, atas kesempatan bagi saya, menempuh pendidikan S2 di FKUI, dan juga atas semangat serta dukungan moral yang diberikan bagi saya, selama menempuh pendidikan S2.
11. Staf administrasi Departemen Fisiologi FKUI, Ibu Rini, Pak Makhsan, Pak Satam, Pak Sugeng dan Pak Andi, yang telah banyak membantu penulis selama masa studi hingga akhir penelitian.
12. Semua pihak yang telah membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa memberikan balasan atas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis saya ini. Akhir kata, saya menyadari segala keterbatasan dan kekurangan saya dalam penyusunan tesis ini. Segala bentuk saran, kritik dan masukan yang membangun, akan saya terima, sebagai bekal saya melakukan penelitian yang lebih baik lagi di kemudian hari. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dalam dunia kesehatan di Indonesia.

Jakarta, 13 Juli 2020

Marcel Antoni

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Marcel Antoni  
NPM : 1706121350  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberika kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Pensinyalan FOXO1 pada tikus dengan diet restriksi vitamin B12 yang mengalami hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin**

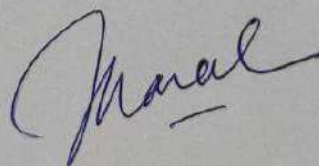
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada Tanggal : 13 Juli 2020

Yang menyatakan



Marcel Antoni



## ABSTRAK

Nama : Marcel Antoni  
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Pensinyalan FOXO1 pada tikus dengan diet restriksi vitamin B12 yang mengalami hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin  
Pembimbing Tesis : dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed, Ph.D dan Dr. dr. Trinovita Andraini, M.Biomed, Ph.D

**Latar belakang:** Vitamin B12 merupakan kofaktor enzim *metionin sintase* yang berperan pada proses remetilasi homosistein menjadi metionin sehingga, mencegah akumulasi homosistein (hiperhomosisteinemia). Defisiensi vitamin ini dapat menyebabkan terjadinya hiperhomosisteinemia dan memicu stres oksidatif yang menyebabkan resistensi insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah resistensi insulin yang diinduksi restriksi vitamin B12 dapat menurunkan kontrol insulin terhadap proses glukoneogenesis melalui pensinyalan FOXO1 dan ekspresi gen targetnya, G6Pc.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan 24 jaringan hati tersimpan tikus jantan *Sprague-Dawley*, berusia 36-40 minggu; yang terbagi dalam 4 kelompok: kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi pakan khusus restriksi vitamin B12 selama 4, 8, dan 12 minggu. Semua sampel jaringan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel jaringan yang sama, yang digunakan dalam penelitian oleh Sianipar, dkk, berjudul “Dampak Restriksi Vitamin B12 Terhadap Kadar Homosistein, HOMA-IR, dan Gambaran Histopatologi Perlemakan Hati Non-Alkoholik Pada Tikus”. Terhadap 24 sampel jaringan hati tersebut dilakukan pemeriksaan Western Blot untuk membandingkan aktivitas protein FOXO1 dan pemeriksaan *real time-PCR* untuk membandingkan ekspresi gen G6Pc antar kelompok sampel.

**Hasil:** Tidak terdapat perbedaan bermakna, baik aktivitas protein FOXO1 maupun ekspresi gen G6Pc antara kelompok restriksi vitamin B12 dengan kelompok kontrol.

**Kesimpulan:** Pada keadaan resistensi insulin yang dipicu oleh hiperhomosisteinemia, pada kondisi restriksi vitamin B12, proses glukoneogenesis tergantung insulin melalui inhibisi jalur pensinyalan FOXO1 dan G6Pc tidak berbeda dibandingkan kelompok kontrol. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk melihat kemungkinan apakah hiperglikemia pada kondisi ini dapat disebabkan melalui jalur lain atau adanya penurunan utilisasi glukosa dan proses glikogenesis.

**Kata Kunci:** Diet restriksi vitamin B12, hiperhomosisteinemia, resistensi insulin, glukoneogenesis, FOXO1, G6Pc.

## ABSTRACT

Name : Marcel Antoni  
Study Program : Program Magister Ilmu Biomedik  
Thesis Title : FOXO1 signaling in rat with vitamin B12 restriction diet  
that has hyperhomocysteinemia and insulin resistance  
Thesis Advisor : dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed, Ph.D and  
Dr. dr. Trinovita Andraini, M.Biomed, Ph.D

**Background:** Vitamin B12 is a cofactor of the enzyme methionine synthase which plays a role in the remethylation process of homocysteine to methionine so as to prevent the accumulation of homocysteine (hyperhomocysteinemia). Deficiency of this vitamin can cause hyperhomocysteinemia and trigger oxidative stress which causes insulin resistance. This study aims to determine whether insulin resistance induced restriction of vitamin B12 can reduce insulin control of gluconeogenesis through FOXO1 signaling and the expression of its target gene, G6Pc.

**Methods:** This study used 24 stored liver tissue of Sprague-Dawley male rats, aged 36-40 weeks; divided into 4 groups: the control group and the treatment group who were given special food restriction of vitamin B12 for 4, 8, and 12 weeks. All tissue samples used in this study were the same tissue samples, which were used in a study by Sianipar, et al., titled "The Impact of Vitamin B12 Restriction on Homocysteine, HOMA-IR, and Histopathological Descriptions of Non-Alcoholic Fatty Liver in Mice". Western Blot tests were performed on 24 liver tissue samples to compare FOXO1 protein activity and real time-PCR examination to compare G6Pc gene expression between sample groups.

**Results:** There was no significant difference, either the FOXO1 protein activity or G6Pc gene expression between the vitamin B12 restriction group and the control group.

**Conclusion:** In a state of insulin resistance triggered by hyperhomocysteinemia, under conditions of vitamin B12 restriction, gluconeogenesis depends on insulin through the inhibition of the FOXO1 signaling pathway and G6Pc no different than the control group. Further research is needed to see the possibility of whether hyperglycemia in this condition can be caused by other pathways or by a decrease in glucose utilization and the process of glycogenesis.

**Keywords:** Vitamin B12 restriction diet, hyperhomocysteinemia, insulin resistance, gluconeogenesis, FOXO1, G6Pc.

## DAFTAR ISI

JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Pertanyaan Penelitian .....	3
1.4 Hipotesis Penelitian .....	3
1.5 Tujuan Penelitian .....	3
1.5.1 Tujuan umum .....	3
1.5.2 Tujuan Khusus .....	3
1.6 Manfaat Penelitian .....	4
1.7 Kerangka Teori .....	5
1.8 Kerangka Konsep .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1 Vitamin B12, metabolisme homosistein, dan hiperhomosisteinemia .....	7
2.1.1 Vitamin B12 (kobalamin) .....	7
2.1.2 Homosistein dan peran vitamin B12 dalam metabolisme homosistein .....	8
2.1.3 Hiperhomosisteinemia, stres oksidasi dan homosistein tiolakton .....	10
2.2 Insulin, resistensi insulin dan hubungan stres oksidasi akibat kondisi hiperhomosisteinemia dengan resistensi insulin .....	12
2.2.1 Insulin, sekresi insulin, peran insulin dalam tubuh dan pensinyalan insulin .....	12
2.2.2 Resistensi insulin .....	16
2.2.3 Hubungan hiperhomosisteinemia dengan resistensi insulin .....	17

2.3 Forkhead Box O (FOXO) dan Glucose 6 Phosphatase (G6Pc) .....	19
2.3.1 FOXO sebagai faktor transkripsi.....	19
2.3.2 Bentuk-bentuk modifikasi protein FOXO .....	20
2.3.3 Peran FOXO1 dalam tubuh .....	22
2.3.4. <i>Glucose-6-phosphatase</i> (G6Pc) .....	25
2.4 Produksi glukosa hati .....	27
2.4.1 Glikogenolisis .....	28
2.4.2 Glukoneogenesis .....	29
2.4.3 Pengaruh hormon lain (bukan insulin) terhadap produksi glukosa hati .....	34
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	42
3.1 Desain Penelitian .....	42
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	42
3.3 Subjek Penelitian .....	42
3.3.1 Penetapan Jumlah Hewan Coba .....	42
3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	43
3.5 Prosedur penelitian.....	44
3.5.1 Pemeriksaan ekspresi gen G6P dengan metode RT-PCR (metode 3 steps) .....	44
3.5.2 Pemeriksaan protein FOXO1 dengan metode <i>Western Blot</i> .....	47
3.6 Diagram Alur Penelitian .....	49
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	50
BAB 5 PEMBAHASAN .....	54
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
6.1 Kesimpulan .....	58
6.2 Saran .....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik.....	63
Lampiran 2. Bukti submit jurnal .....	64
Lampiran 3. Hasil Western Blot.....	65
Lampiran 4. Hasil real-time PCR.....	66
Lampiran 5. Artikel Publikasi.....	71
RIWAYAT HIDUP .....	81
DANA PENELITIAN .....	82

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.3.1. Berbagai aktivitas keluarga FOXO terhadap sel .....	20
Tabel. 3.1 Variabel penelitian dan definisi operasionalnya .....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1.	Peristiwa absorpsi vitamin B12, sirkulasi enterohepatic (a) dan multidrug resistance (MDR) memfasilitasi keluarnya vitamin B12 dari membran basolateral enterosit (b).....	8
Gambar 2.1.2.	Metabolisme homosistein .....	10
Gambar 2.1.3.1	Oksidasi molekul homosistein menyebabkan pembentukan <i>reactive oxygen species</i> (ROS) .....	11
Gambar 2.1.3.2	Pembentukan mixed disulfide turut menyebabkan pembentukan <i>reactive oxygen species</i> (ROS) .....	11
Gambar 2.2.1.1	Mekanisme sekresi hormon insulin.....	13
Gambar 2.2.1.2	Jalur pensinyalan insulin .....	15
Gambar 2.2.3	Patofisiologi resistensi insulin yang dipicu oleh stress oksidatif....	18
Gambar 2.3.3.1.	Pengaturan produksi glukosa dan ambilan lipoprotein di hati oleh FOXO1.....	23
Gambar 2.3.3.2.	Pengaturan lipogenesis oleh FOXO1 di hati .....	23
Gambar 2.3.3.3.	Pengaturan nafsu makan oleh FOXO1 di hipotalamus .....	24
Gambar 2.3.4.	Model multikomponen sistem enzim glukosa-6-fosfatase G6P memasuki lumen retikulum endoplasma melalui transporter G6P.....	26
Gambar 2.4.1.	Kontrol terpadu glikogenolisis dan glikogenesis oleh protein kinase dependen-cAMP .....	29
Gambar 2.4.2.1.	Proses glikolisis dan glukoneogenesis di hati.....	32
Gambar 2.4.2.2.	Kontrol glikolisis dan glukoneogenesis di hati oleh- fruktosa 2,6 bisfosfat dan enzim bifungsional PFK-2/F-2,6-ase (6-fosfofrukto-2-kinase / fruktosa 2,6 –bisfosfatase).....	33
Gambar 2.4.3.1.	Regulasi transkripsi glukoneogenesis hati dalam kondisi makan dan puasa .....	35
Gambar 2.4.3.2.	Efek glukagon terhadap produksi glukosa hati.....	37
Gambar 2.4.3.3.	Peran glukokortikoid dalam homeostasis glukosa .....	38
Gambar 2.4.3.4.	Pengaruh epinefrin terhadap metabolisme glukosa darah.....	40
Gambar 4.1.1	Kurva standar BSA .....	50
Gambar 4.1.2	Ekspresi FOXO1 pada restriksi vitamin B12 .....	51

Gambar 4.1.3	Ekspresi FOXO1 pada restriksi vitamin B12 .....	52
Gambar 4.2.1	Kurva amplifikasi G6Pc dan $\beta$ -actin .....	52
Gambar 4.2.2	<i>Melt curve</i> G6Pc dan $\beta$ -actin .....	53
Gambar 4.2.3	Ekspresi relating G6Pc pada restriksi vitamin B12.....	53

## DAFTAR SINGKATAN

AgRP	: Agouti related peptide
AGE	: Advanced Glycation End-Products
BHMT	: Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase
CREB	: cAMP-Response Element-Binding Protein
DAG	: Diacylglycerol
ERK	: Extracellular signal-Regulated Kinase
FOXO1	: Forkhead box protein O1
G6Pc	: Glucose-6-Phosphatase catalytic subunit
Grb2	: Growth factor receptor bound protein 2
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase 3
Gck	: Glucokinase
GIF	: Gastric Intrinsic Factor
GLUT 4	: Glucose transporter type 4
Hcy	: Homocysteine
HHcy	: Hyperhomocysteinemia
HDL	: High Density Lipoprotein
HDL-C	: High Density Lipoprotein-Cholesterol
HOMA-IR	: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
HC	: Haptocorrin
IRS	: Insulin Receptor Substrate
IKK	: I $\kappa$ B Kinase
IL 6	: Interleukin 6
IL 1 $\beta$	: Inteleukin 1 $\beta$
IRE 1 $\alpha$	: Inositol-Requiring Enzyme 1-alpha
JNK	: c-Jun N-terminal Kinase
MCP1	: Monocyt Chemoattractant Protein 1
MT	: Methyl Transferase
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NOS	: Nitric Oxide Synthase



PPAR $\gamma$	: Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PERK	: Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PGC 1- $\alpha$	: Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1 Alpha
PI3K	: Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKB	: Protein Kinase B
PKC	: Protein Kinase C
PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	: phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfat
PDK1	: Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PEPCK	: Phosphoenoloyruvate Carboxy Kinase
POMC	: Pro-opiomelanocortin
PRMT	: Protein Arginine Methyltransferases
ROS	: Reactive Oxygen Species
Ser-307	: Serine 307
SAM	: S-adenosylmethionine
SAH	: S-adenosylhomocysteine
TC	: Transcobalamin
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Faktor-alpha
UPR	: Unfolded Protein Response
THF	: N-5-methyltetrahydrofolate
TLR	: Toll Like Receptor

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik

Lampiran 2. Bukti Submit Jurnal

Lampiran 3. Hasil Western Blot

Lampiran 4. Hasil real-time PCR

Lampiran 3. Artikel Publikasi

# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)*, dari tahun 1999 sampai 2004, di Amerika Serikat, prevalensi defisiensi vitamin B12 adalah sebanyak 2,9%, 10,6% dan 25,7%, dengan nilai patokan kadar vitamin B12 dalam serum, masing-masing < 148 pmol/liter, < 200 pmol/liter, dan < 256 pmol/ liter; dengan kasus pada perempuan (3,3%) lebih banyak daripada laki-laki (2,4%).<sup>1</sup> Penyebab-penyebab terjadinya defisiensi vitamin B12 antara lain, kurangnya konsumsi vitamin B12, gangguan absorpsi vitamin B12<sup>2</sup>, juga dapat disebabkan gangguan pada proses metabolisme vitamin B12.<sup>1</sup> Berdasarkan beberapa penelitian, defisiensi vitamin B12 dapat meningkatkan risiko gangguan kardiovaskuler<sup>3</sup>, metabolik<sup>4</sup>, neurologi dan hematologi<sup>5</sup>.

Salah satu peran vitamin B12 dalam proses metabolisme adalah kofaktor enzim dalam reaksi remetilasi homosistein.<sup>6</sup> Homosistein merupakan produk antara reaksi transmetilasi metionin.<sup>7</sup> Kelebihan homosistein berbahaya bagi tubuh, maka tubuh mengatur kadar homosistein dalam darah, melalui 2 jalur; yaitu jalur transulfurasi, dimana kelebihan homosistein dieliminasi melalui urin, dan melalui jalur remetilasi, dengan mengubah homosistein menjadi metionin.<sup>8</sup> Jalur remetilasi, dibagi lagi menjadi 2, yaitu jalur remetilasi yang bergantung ketersediaan folat dan vitamin B12 dan yang tidak. Pada jalur remetilasi yang bergantung folat dan vitamin B12 inilah, vitamin B12 berperan sebagai kofaktor enzim *methionine synthase*; dengan *N-5-methyltetrahydrofolate* (THF) bertindak sebagai donor metilnya.<sup>7</sup> Karena reaksi remetilasi yang bergantung folat dan vitamin B12 berlangsung di banyak jaringan, defisiensi vitamin B12 menyebabkan akumulasi homosistein dalam darah / dikenal sebagai kondisi hiperhomosisteinemia.<sup>4</sup> Pada kondisi hiperhomosisteinemia, oksidasi terhadap molekul homosistein menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS); demikian juga reaksi antara molekul homosistein dengan molekul senyawa lain, juga menyebabkan pembentukan ROS.<sup>9</sup> Ditambah lagi, produk sampingan metabolisme homosistein, homosistein tiolakton bersifat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan protein.<sup>10</sup>

ROS yang terbentuk dari metabolisme homosistein dapat memicu aktivasi proses inflamasi, melalui aktivasi NFκβ dan produksi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti *Tumor*

*Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *interleukin 6* (IL-6), yang selanjutnya mengaktifkan *Jun N-Terminal Kinase* (JNK) / JAK-STAT-SOCS, yang mengganggu fungsi reseptor insulin, menyebabkan kondisi resistensi insulin.<sup>11</sup> Beberapa penelitian seperti oleh Najib (2001)<sup>12</sup>, Li (2013)<sup>13</sup> dan Sianipar (2018)<sup>4</sup>, telah membuktikan bahwa kondisi hiperhomosisteinemia dapat menginduksi resistensi insulin. Insulin dalam keadaan fisiologis, mengatur metabolisme glukosa, lemak dan protein. Terhadap metabolisme glukosa, insulin berperan dalam menghambat proses glukoneogenesis.<sup>14</sup> Salah satu mekanisme pengendalian terhadap proses glukoneogenesis tersebut adalah dengan mengendalikan produksi enzim-enzim yang terlibat dalam proses glukoneogenesis.<sup>15, 16</sup> Dalam jalur pensinyalan insulin, di bawah jalur PI3K-Akt, terdapat protein hilir yang memiliki fungsi dalam glukoneogenesis, yang dikendalikan oleh insulin, yaitu FOXO1.<sup>15</sup> FOXO1 ini sebenarnya merupakan faktor transkripsi yang memiliki banyak peran metabolik, namun dalam proses glukoneogenesis, FOXO1 berperan dalam transkripsi gen *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) dan *glucose 6 phosphatase* (G6Pc).<sup>17, 18</sup> Baik PEPCK dan G6Pc merupakan enzim-enzim penting dalam proses glukoneogenesis. PEPCK berperan dalam dekarboksilasi oksaloasetat menjadi fosfoenolpiruvat, sedangkan G6Pc berperan dalam transportasi dan hidrolisis glukosa 6 fosfat menjadi glukosa bebas dan fosfat inorganik.<sup>19, 20</sup> Insulin melalui Akt memfosforilasi FOXO1 sehingga menghambat aktivitas transkripsinya terhadap gen-gen ini.<sup>15</sup> Namun, pada kondisi resistensi insulin, kendali insulin terhadap FOXO1 hilang, menyebabkan FOXO1 terus aktif mentranskripsi gen-gen glukoneogenik seperti PEPCK dan G6Pc.<sup>21, 22</sup>

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan tentang defisiensi vitamin B12 yang telah dilakukan oleh Sianipar, dkk. Pada penelitian tersebut, telah diketahui bahwa defisiensi vitamin B12 menyebabkan hiperhomosisteinemia yang memicu resistensi insulin, yang ditandai dengan hiperglikemia dan peningkatan indeks *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR).<sup>4</sup> Dengan menggunakan jaringan tersimpan hati tikus dari penelitian tersebut, penelitian ini bertujuan menganalisis penyebab terjadinya hiperglikemia dari hasil penelitian Sianipar, dkk tersebut, secara khusus kaitan resistensi insulin akibat defisiensi vitamin B12 terhadap proses glukoneogenesis yang diperankan oleh FOXO1 terhadap ekspresi gen targetnya G6Pc.

## 1.2 Rumusan Masalah

Pada penelitian lain, telah diketahui, bahwa restriksi vitamin B12 dapat menyebabkan hiperhomosisteinemia. Kondisi hiperhomosisteinemia dapat menyebabkan resistensi insulin melalui pembentukan homosistein tiolaktan dan ROS yang memicu aktivasi jalur inflamasi

JNK dan IKK $\beta$ , yang mengganggu kerja reseptor tirosin dan IRS-1. Resistensi insulin menyebabkan deregulasi FOXO1, sehingga FOXO1 dalam keadaan defosforilasi dan aktif berperan dalam transkripsi gen-gen glukoneogenik; menyebabkan kondisi hiperglikemia. Saat ini belum diketahui bagaimana resistensi insulin yang dipicu oleh hiperhomosisteinemia yang disebabkan diet restriksi vitamin B12 dapat menyebabkan hiperglikemia, apakah melibatkan aktivitas faktor transkripsi FOXO1 dan ekspresi G6Pc.

### **1.3 Pertanyaan Penelitian**

1. Apakah terdapat perbedaan aktivitas FOXO1, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi gen G6Pc, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu?

### **1.4 Hipotesis Penelitian**

1. Terdapat perbedaan aktivitas FOXO1, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu.
2. Terdapat perbedaan ekspresi gen G6Pc, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu.

### **1.5 Tujuan Penelitian**

#### **1.5.1 Tujuan umum**

Menganalisis apakah diet restriksi vitamin B12 yang mengakibatkan hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin dapat memengaruhi aktivitas FOXO1 dan ekspresi gen G6Pc pada hewan coba.

#### **1.5.2 Tujuan Khusus**

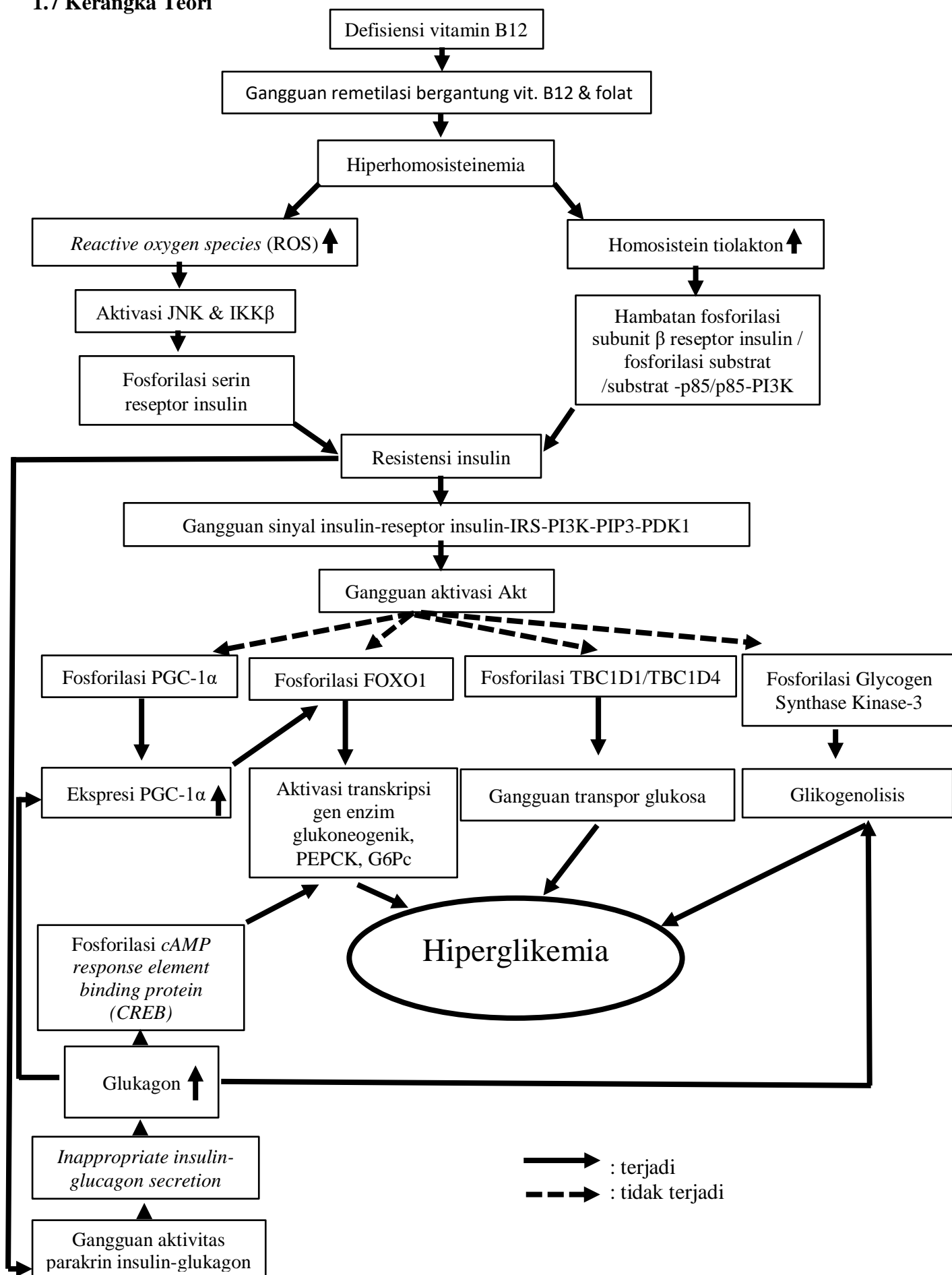
- a. Menganalisis perbedaan aktivitas FOXO1, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu.

- b. Menganalisis perbedaan ekspresi gen G6Pc, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin, akibat kondisi hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu.

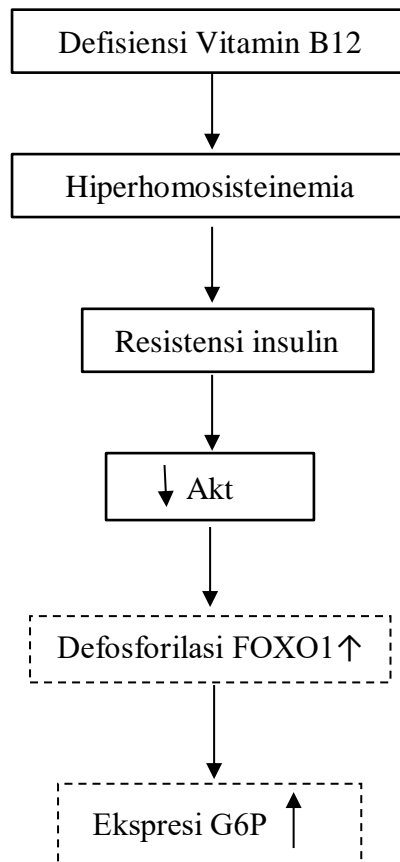
### **1.6 Manfaat Penelitian**

- a. Pada bidang penelitian dan pendidikan, diharapkan memberikan pemahaman tentang pengaruh resistensi insulin yang dipicu hiperhomosisteinemia yang disebabkan diet restriksi vitamin B12 terhadap aktivitas FOXO1 dan ekspresi G6Pc.
- b. Untuk masyarakat, diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang pentingnya peranan vitamin B12 bagi tubuh dalam mencegah penyakit akibat gangguan metabolik.

## 1.7 Kerangka Teori



## 1.8 Kerangka Konsep



----- : diteliti  
\_\_\_\_\_ : tidak diteliti



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

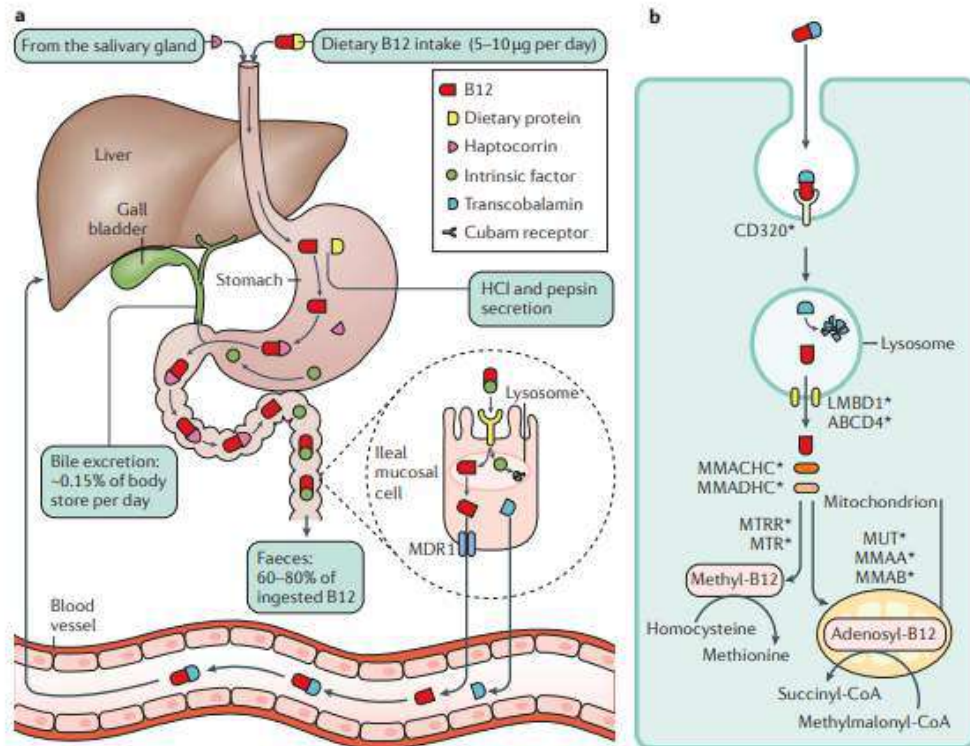
### 2.1 Vitamin B12, metabolisme homosistein, dan hiperhomosisteinemia

#### 2.1.1 Vitamin B12 (kobalamin)

Vitamin B12 merupakan vitamin larut air yang tidak dapat disintesis sendiri oleh organisme tingkat tinggi seperti manusia, melainkan harus diperoleh dari bahan makanan.<sup>2</sup> Bentuk-bentuk vitamin B12 antara lain adenosilkobalamin, metilkobalamin, yang keduanya berperan sebagai kofaktor enzim dalam tubuh.<sup>1</sup> Adenosilkobalamin merupakan bentuk simpanan, yang diubah menjadi mekobalamin, saat diperlukan. Bentuk lainnya adalah hidrosikobalamin dan sianokobalamin. Hidrosikobalamin dihasilkan oleh mikroorganisme. Bentuk ini dapat diubah menjadi sianokobalamin. Sianokobalamin sendiri merupakan bentuk sampingan vitamin B12, dengan penambahan gugus sianida (-CN). Bentuk ini juga sering digunakan sebagai antidotum pada kasus keracunan sianida.<sup>23</sup>

Proses absorpsi kobalamin melibatkan peran 3 protein, yaitu *haptocorrin* (HC), faktor intrinsik (IF), dan transkobalamin (TC).<sup>1</sup> Awalnya, kobalamin terikat, dan membentuk kompleks dengan *haptocorrin* (HC) saliva. Tujuannya adalah mencegah degradasi kobalamin oleh asam di lambung. Ketika mencapai duodenum, oleh protease pankreas *haptocorrin* (HC) dipecah, sehingga kobalamin terlepas dan kemudian kobalamin ini berikatan dengan faktor intrinsik gaster (GIF) yang dihasilkan oleh sel-sel parietal.<sup>24</sup> Di enterosit ileum bagian distal, terdapat reseptor *cubam*, yang fungsinya memfasilitasi ambilan kompleks kobalamin-faktor intrinsik (IF) dengan bantuan ion kalsium. Oleh aktivitas lisosomal, kobalamin terlepas dari ikatannya dengan faktor intrinsik (IF). Pada perjalanan selanjutnya, kobalamin berikatan dengan transkobalamin (TC). Di plasma, kompleks ikatan kobalamin-transkobalamin, selanjutnya diendositosis oleh reseptor membran, dan melalui aktivitas lisosomal di sel target, ikatan ini mengalami degradasi.<sup>1</sup> Di sel target, kobalamin mengalami metabolisme menjadi 2 bentuk, yaitu 5'-*deoxyadenosylcobalamin* dalam mitokondria dan metilkobalamin dalam sitosol. *Adenosylcobalamin* berperan sebagai kofaktor enzim *methylmalonil CoA mutase* dalam perubahan *methylmalonil CoA* menjadi *succinyl CoA*, sedangkan metilkobalamin

berperan sebagai kofaktor enzim *methionine synthase* dalam proses remetilasi homosistein menjadi metionin<sup>2</sup> Gambar 2.1.1 menggambarkan proses absorpsi dan metabolisme kobalamin dalam tubuh kita.



**Gambar 2.1.1** Peristiwa absorpsi vitamin B12, sirkulasi enterohepatik (a) dan keterlibatan vitamin B12 dalam metabolisme seluler dalam tubuh (b) *Multidrug resistance* (MDR) memfasilitasi keluarnya vitamin B12 dari membran basolateral enterosit. CD 320: reseptor permukaan sel, untuk vitamin B12. *Lysosomal cobalamin transporter1* LMBD1); *lysosomal membrane transporter 4* (ABCD4); *methylmalonic aciduria* (MMACHC); *homocystinuria* tipe C (MMADHC) ; *methylmalonil CoA* (MUT); *methyl-malonil aciduria* tipe A (MMAA) dan B (MMAB) ; *methionine synthase reductase* (MTRR); *methionine synthase* (MTR).<sup>1</sup>

Sebelum membahas akibat defisiensi vitamin B12 terhadap terjadinya hiperhomosisteinemia dan dampak negatif akibat kondisi hiperhomosisteinemia, terhadap proses metabolik dalam tubuh, akan dipaparkan terlebih dahulu tentang homosistein, dan peran vitamin B12 dalam metabolisme metionin-homosistein.

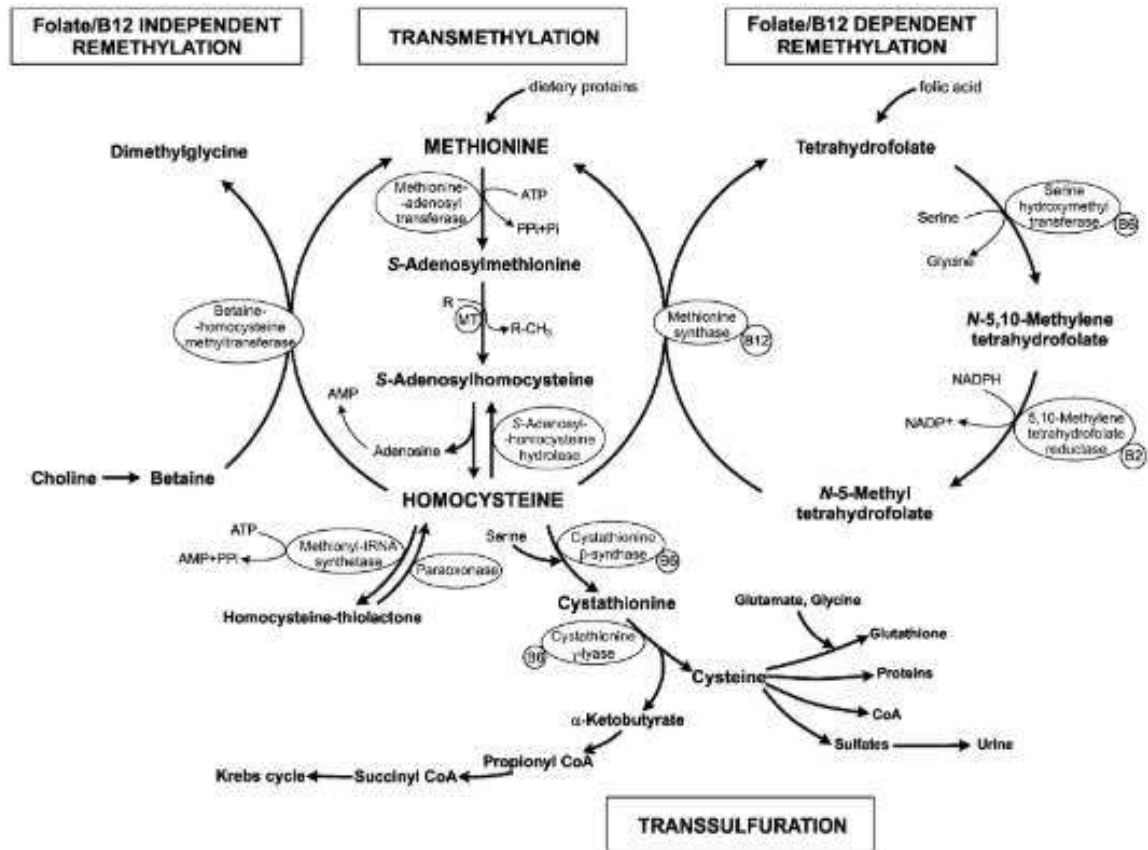
### 2.1.2 Homosistein dan peran vitamin B12 dalam metabolisme homosistein

Homosistein merupakan asam amino non-esensial yang mengandung senyawa sulfur. Kadarnya dalam plasma adalah berkisar antara 5-15 µmol/L.<sup>25</sup> Dalam plasma, ada 2 bentuk homosistein yaitu terikat protein dan tidak terikat protein (bebas). Kedua bentuk

ini, dapat berada dalam bentuk tereduksi (mengandung gugus sulfhidril, mencapai 99% dari total) dan bentuk teroksidasi / disebut juga homosistin (mengandung ikatan disulfida).<sup>4</sup> Homosistein merupakan hasil transmetilasi asam amino esensial metionin. Pada proses transmetilasi, metionin yang berasal dari makanan, dengan bantuan ATP dan enzim *methionine-adenosyltransferase*, diubah menjadi *S-adenosylmethionine* (SAM).<sup>7</sup> Fungsi SAM adalah sebagai donor metil bagi enzim *methyltransferase* (MT). Hasil reaksi ini, *S-adenosylhomocysteine* (SAH), kemudian dihidrolisis oleh *S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase* menjadi homosistein dan adenosin.<sup>26</sup> Dalam kadar berlebih, homosistein berbahaya bagi tubuh, sehingga tubuh mempunyai 2 mekanisme regulasi untuk menjaga kadarnya dalam rentang normal. 2 mekanisme regulasi tersebut, yaitu melalui reaksi remetilasi dan trans-sulfurasi.<sup>26</sup> Pada reaksi remetilasi, terjadi perubahan kembali homosistein secara enzimatik menjadi metionin. Sedangkan pada reaksi trans-sulfurasi, homosistein dikonversi menjadi sistein untuk selanjutnya dioksidasi menjadi sulfat untuk dikeluarkan melalui urin.<sup>7</sup>

Pada reaksi trans-sulfurasi, homosistein, bersama serin dan dengan bantuan enzim *cystathionine  $\gamma$ -lyase*, dan vitamin B6 sebagai kofaktornya diubah menjadi *cystathionine*. Selanjutnya *cystathionine* diubah menjadi *cysteine* dan  *$\alpha$ -ketobutyrate* dengan bantuan enzim *cystathionine- $\gamma$ -lyase* dan vitamin B6 sebagai kofaktornya.<sup>26</sup> *Cysteine* menjadi prekursor untuk sintesis protein, *coenzyme A*, sulfat dan glutation. Kelebihan *cysteine* dioksidasi menjadi *taurin* atau sulfat anorganik atau diekskresikan dalam urin. Reaksi trans-sulfurasi berlangsung di hati, ginjal, usus halus, pankreas dan lensa.<sup>7</sup> Pada kondisi normal, sekitar 50% homosistein mengalami proses remetilasi menjadi metionin kembali. Jalur remetilasi dibagi menjadi 2.<sup>26</sup> Jalur remetilasi yang pertama merupakan jalur remetilasi yang bergantung pada ketersediaan vitamin B dan folat. Folat dalam bentuk *N-5-methyltetrahydrofolate* (THF) fungsinya sebagai donor metil bagi homosistein, dan dengan bantuan enzim *methionine synthase* dan vitamin B12 sebagai kofaktornya, diubah menjadi metionin. Reaksi remetilasi yang pertama ini berlangsung hampir di seluruh jaringan tubuh, sehingga defisiensi vitamin B12 dapat menyebabkan peningkatan kadar homosistein dalam darah (hiperhomosisteinemia).<sup>4, 26</sup> Jalur remetilasi yang kedua, merupakan jalur remetilasi yang tidak bergantung folat dan vitamin B12. Bertindak sebagai donor metil dalam reaksi remetilasi jenis kedua ini adalah betain. Betain berasal dari *choline*; dan dengan bantuan enzim *betaine-homocysteine S-methyltransferase*

(BHMT), homosistein diubah kembali menjadi metionin.<sup>7, 26</sup> Reaksi remetilasi yang kedua ini berlangsung hanya di hati. Homosistein dibentuk di berbagai jaringan.<sup>7</sup> Gambar 2.1.2. menggambarkan proses metabolisme homosistein dalam tubuh.



Gambar 2.1.2 Metabolisme homosistein<sup>7</sup>

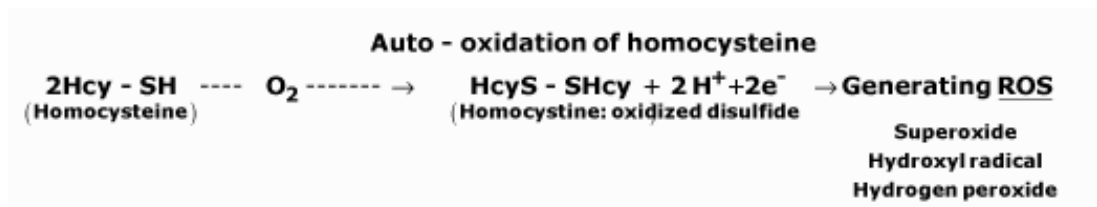
Dari pemaparan tentang metabolisme metionin-homosistein diatas, telah jelas peran vitamin B12 dalam proses remetilasi homosistein menjadi metionin, dan defisiensi vitamin B12 dapat menyebabkan hiperhomosisteinemia. Berdasarkan hasil penelitian Ghosh diet restriksi vitamin B12 pada tikus, menyebabkan kenaikan kadar homosistein secara progresif mulai dari 4 minggu pemberian sampai dengan 12 minggu pemberian.<sup>27</sup>

### 2.1.3 Hiperhomosisteinemia, stres oksidasi dan homosistein tiolakton

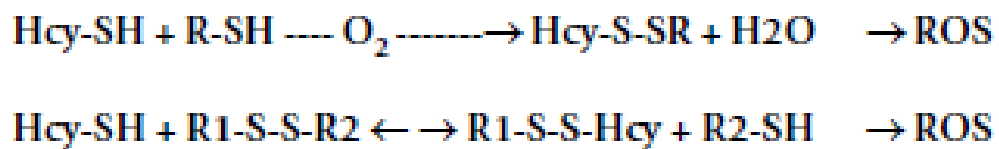
Hiperhomosisteinemia merupakan suatu kondisi dimana kadar homosistein dalam darah melebihi rentang normal. Derajat hiperhomosisteinemia dibagi menjadi 3, yaitu *moderate* (16-30  $\mu\text{M}$ ), *intermediate* (31-100  $\mu\text{M}$ ) dan *severe* (>100  $\mu\text{M}$ ).<sup>4</sup> Selain disebabkan defisiensi vitamin B12 (yang telah dijelaskan di atas), vitamin B6, dan folat; kondisi hiperhomosisteinemia juga dapat disebabkan polimorfisme genetik enzim-enzim

yang terlibat dalam metabolisme homosistein.<sup>28</sup> Selain itu, diet tinggi metionin juga dapat menyebabkan hiperhomosisteinemia.<sup>29</sup>

Pada kondisi hiperhomosisteinemia, oksidasi gugus tiol homosistein yang mengikat protein plasma (melalui ikatan disulfida), terutama albumin; dengan molekul plasma tiol lainnya atau molekul homosistein lain, menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS).<sup>9</sup> Gambar 2.1.3.1 dan 2.1.3.2 berikut memperlihatkan mekanisme pembentukan ROS oleh homosistein. Selain oksidasi homosistein, hambatan aktivitas enzimatis antioksidan dalam sel, gangguan *superoksida dismutase* ekstrasel dari permukaan endotelium, aktivasi oksidasi NADPH, pembentukan superoksida anion yang bergantung *nitric oxide synthase* (NOS) menyebabkan stres oksidatif.<sup>9</sup>



**Gambar 2.1.3.1** Oksidasi molekul homosistein menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)<sup>9</sup>



**Gambar 2.1.3.2** Pembentukan *mixed disulfide* turut menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). R= senyawa organik dalam plasma dengan gugus tiol (-SH) seperti sistein, gamma-glutamylcysteine, glutation, dapat bereaksi dengan homosistein<sup>9</sup>

Selain menimbulkan stress oksidatif, homosistein dapat menyebabkan perubahan struktur protein. Perubahan struktur protein; disebabkan homosistein menempel pada protein, kemudian menyebabkan homosisteinilasi protein.<sup>10</sup> Semakin tinggi kadar homosistein, homosisteinilasi semakin meningkat. Ada 2 contoh homosisteinilasi, pertama *S-homocysteinylation*, yaitu ketika gugus tiol homosistein melekat pada gugus tiol lain dari residu Cys molekul protein, membentuk ikatan disulfida. Yang kedua *N-homocysteinylation*, dimana kelompok amino homosistein berinteraksi dengan ε-

kelompok amino dari residu lisin pada protein.<sup>4, 30</sup> *N-homocysteinylation* disebabkan reaktivitas homosistein tiolakton. Homosistein tiolakton sendiri terbentuk akibat kesalahan fungsi *editing* beberapa *aminoacyl-tRNA synthetase* (AARS).<sup>10</sup> Akibat homosisteinilasi, terjadi perubahan struktur dan fungsi protein. Perubahan struktur dan fungsi protein ini dapat berupa *activation of unfolded protein response*, degradasi protein, inaktivasi enzim, dan lain-lain.<sup>31</sup> Modifikasi terhadap protein menyebabkan sistem imunitas tubuh mengenalinya sebagai protein asing. Hal ini kemudian dapat memicu respon inflamasi tubuh.

## **2.2 Insulin, resistensi insulin dan hubungan stres oksidasi akibat kondisi hiperhomosisteinemia dengan resistensi insulin**

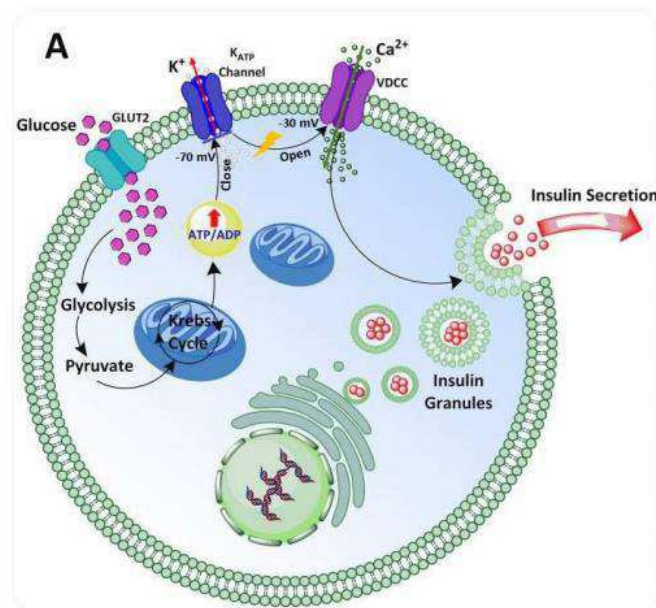
Sebelum membahas hubungan antara stres oksidasi akibat kondisi hiperhomosisteinemia dengan resistensi insulin, maka akan dibahas dahulu tentang insulin, sekresi insulin, peran insulin dalam tubuh, pensinyalan insulin, dan mekanisme-mekanisme terjadinya resistensi insulin secara umum.

### **2.2.1 Insulin, sekresi insulin, peran insulin dalam tubuh dan pensinyalan insulin**

Insulin merupakan hormon yang dihasilkan sel-sel  $\beta$  pankreas, melalui translasi RNA insulin oleh ribosom yang melekat retikulum endoplasma untuk membentuk proinsulin. Di aparatus golgi, proinsulin terbelah membentuk insulin, yang membentuk rantai A dan B dan dihubungkan oleh ikatan disulfida, dan rantai peptida C yang disebut peptida penghubung (peptida C).<sup>16</sup>

Sekresi insulin dipengaruhi glukosa yang terdapat dalam makanan. Sel-sel beta memiliki sejumlah besar pengangkut glukosa (GLUT-2), yang memungkinkan ambilan glukosa.<sup>14</sup> Glukosa yang sudah masuk dalam sel, terfosforilasi menjadi glukosa-6-fosfat dengan bantuan glukokinase. Glukosa-6-fosfat dioksidasi menjadi adenosin trifosfat (ATP), yang menghambat kanal kalium peka ATP. Hal ini akan memicu depolarisasi dan pembukaan kanal kalsium berpintu listrik (*voltage-gated calcium channel*). Masukan ion kalsium akan menyebabkan *docking* dan *releasing* insulin dari vesikel melalui proses eksositosis.<sup>32</sup> Saat disekresikan ke darah, insulin hampir seluruhnya beredar dalam bentuk tidak terikat. Waktu paruhnya dalam plasma rata-rata sekitar 6 menit, dan dalam waktu 10-15 menit, insulin sudah tidak dijumpai dalam sirkulasi. Sisa insulin yang tidak terikat

ke reseptor target, didegradasi oleh enzim insulinase di hati, sebagian lagi dimetabolisme di ginjal dan otot.<sup>33</sup> Gambar 2.2.1.1 menggambarkan mekanisme sekresi insulin.



**Gambar 2.2.1.1** Mekanisme sekresi hormon insulin<sup>34</sup>

Pada metabolisme karbohidrat, insulin berperan dalam ambilan, penyimpanan dan penggunaan glukosa oleh hampir semua jaringan tubuh, terutama otot, jaringan adiposa dan hati. Di otot, insulin meningkatkan metabolisme dan ambilan glukosa otot.<sup>14</sup> Dalam keadaan istirahat, membran otot hanya sedikit permeabel terhadap glukosa, namun, dengan adanya insulin, terjadi transpor glukosa cepat ke dalam sel otot. Jika setelah makan otot tidak aktif, 2-3% glukosa akan disimpan dalam bentuk glikogen otot. Glikogen ini dapat digunakan oleh otot untuk menghasilkan energi.<sup>16</sup> Glikogen akan digunakan saat kebutuhan energi besar atau dalam keadaan anaerob, melalui proses glikolisis. Di hati, insulin meningkatkan ambilan, penyimpanan dan penggunaan glukosa oleh hati, melalui hambatan fosforilasi di hati; peningkatan aktivitas enzim glukokinase, dan peningkatan aktivitas enzim glikogen sintase, untuk meningkatkan glikogenesis hati. Ketika kadar glukosa darah rendah, yang terjadi adalah sebaliknya.<sup>14</sup>

Terhadap metabolisme lemak, insulin memicu sintesis dan penyimpanan lemak, saat jumlah karbohidrat yang masuk melebihi penggunaan energi. Mekanismenya adalah dengan meningkatkan pengangkutan glukosa ke dalam sel-sel hati. Ketika glikogen hati mencapai 5-6%, glikogen yang sudah ada akan menghambat sintesis glikogen yang baru, dan melalui jalur piruvat, glukosa diubah menjadi asetil KoA, sebagai bahan pembentuk

asam lemak.<sup>16</sup> Mekanisme lainnya, kelebihan ion sitrat dan isositrat mengaktifkan asetil KoA karboksilase, yang berperan dalam proses karboksilasi asetil KoA menjadi malonil KoA, yang merupakan tahap pertama sintesis asam lemak. Sebagian besar asam lemak ini disintesis dalam hati, membentuk trigliserida.<sup>16, 19</sup>

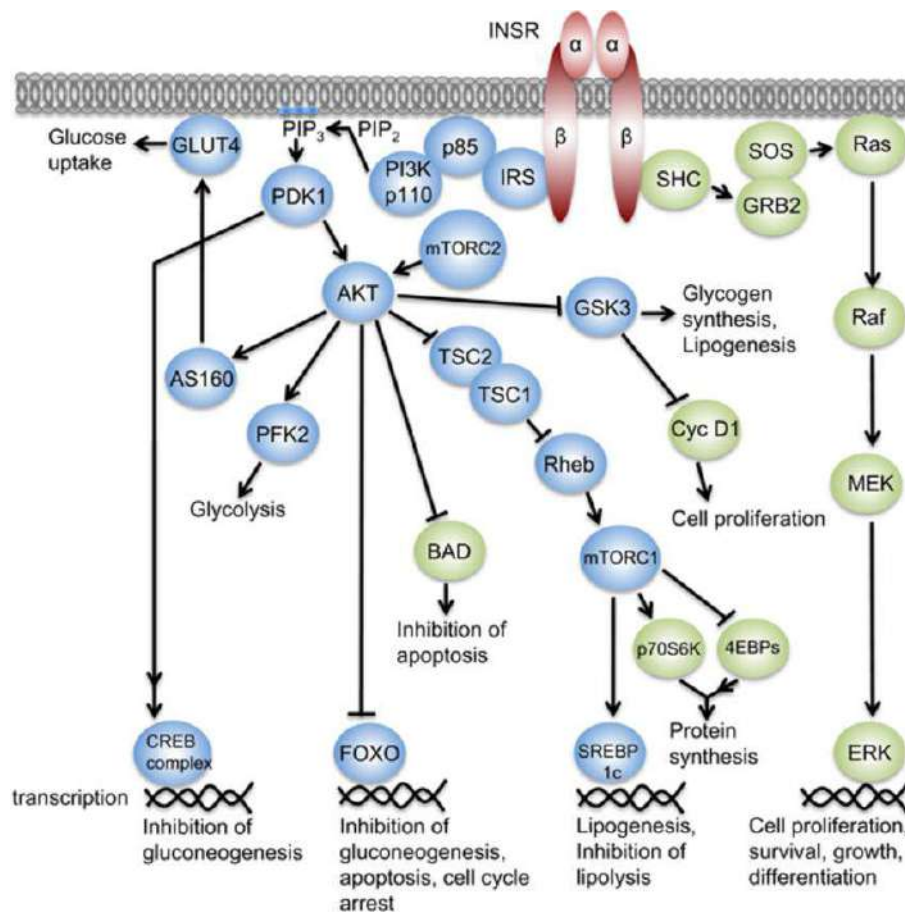
Terhadap metabolisme protein, insulin meningkatkan sintesis dan penyimpanan protein. Bersama dengan *growth hormone*, insulin merangsang pengangkutan sejumlah besar asam amino ke dalam sel; insulin juga meningkatkan translasi mRNA, dan meningkatkan kecepatan transkripsi dan sintesis protein. Insulin menghambat katabolisme protein, dan menekan proses glukoneogenesis.<sup>14</sup>

Dalam menjalankan peran metaboliknya, insulin berikatan dengan reseptornya pada sel sasaran. Reseptor insulin terdiri dari kombinasi 4 subunit yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. 2 subunit  $\alpha$  di bagian luar membran, sedangkan 2 subunit  $\beta$  menembus membran dan menonjol ke arah sitoplasma. Insulin berikatan dengan subunit  $\alpha$  di bagian luar membran, dan karena subunit  $\alpha$  bersambung dengan subunit  $\beta$ , subunit  $\beta$  akan mengalami autofosforilasi (Tyr-1158, Tyr-1162, dan Tyr-1163)<sup>16</sup>, dan mengaktifkan tirosin kinase setempat, yang kemudian memfosforilasi berbagai enzim intrasel lainnya yang termasuk dalam kelompok enzim yang disebut *insulin receptor substrate* (IRS). Serangkaian protein *insulin receptor substrate* (IRS) 1 ~ 4 direkrut dan difosforilasi, dengan IRS1 dan IRS2 menjadi yang paling banyak diekspresikan.<sup>15</sup>

Fosforilasi terhadap protein IRS selanjutnya menyebabkan perekrutan dan pengikatan molekul pensinyalan yang mengandung domain SH2, mengaktifkan dua jalur transduksi sinyal dalam sel: 1) jalur *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) - *protein kinase B* (Akt atau PKB); protein IRS terfosforilasi mengikat subunit p85 dari PI3K dan merekrut subunit katalitik P110 untuk mengaktifkan PI3K<sup>15</sup>; PI3-kinase yang teraktivasi menghasilkan *phosphatidyl-inositol-3,4-bisfosfat* (PIP2) dan *phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfat* (PIP3), yang kemudian mengikat *phosphoinositidedependent kinase 1* (PDK1). PDK1 kemudian mengaktifkan protein kinase Akt, yang mengaktifkan berbagai substrat dan memediasi berbagai efek insulin. Antara lain monofosforilasi terhadap AS160, menyebabkan *glucose transporter 4* (GLUT4) ditranslokasi ke membran sel untuk mengambil glukosa; fosforilasi *glycogen synthase kinase 3* (GSK) menyebabkan hambatan terhadap aktivitas GSK3, sehingga meningkatkan aktivitas glikogen sintase, yang kemudian meningkatkan penyerapan glukosa / menurunkan kadar glukosa darah



dan meningkatkan sintesis glikogen seluler.<sup>15</sup> Fosforilasi terhadap faktor transkripsi, *fork head box protein O1* (FOXO1), mendeaktivasi FOXO1, dan pada akhirnya menghambat transkripsi *glucose 6 phosphatase* (G6Pc) dan *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), menghambat glukoneogenesis hati. Aktivasi *rapamycin* (mTOR), meningkatkan sintesis protein dan pertumbuhan sel, dll. Namun, aktivasi Akt juga dapat dihambat, misalnya oleh *tribbles homolog 3* (TRB3), suatu homolog mamalia dari *Drosophila tribbles*, yang berperan sebagai modulator negatif Akt, dengan berikatan langsung dengan Akt, menghambat aktivitas kinase. Jumlah TRB3 meningkat pada tikus dengan diabetes (*db/db mice*).<sup>35</sup> 2) Jalur protein kinase *Ras-mitogen-activated* (MAPK): jalur pensinyalan pertumbuhan. Keluarga MAPK mamalia termasuk p38, *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) dan *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK). IRS1 / 2 mengaktifkan MAPK dengan mengikat *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), mengatur transkripsi gen dan mengatur proliferasi dan diferensiasi sel dengan berinteraksi dengan jalur PI3K-Akt.<sup>36,37</sup> Gambar 2.2.1.2 menggambarkan jalur pensinyalan insulin.



Gambar 2.2.1.2 Jalur pensinyalan insulin<sup>38</sup>

### 2.2.2 Resistensi insulin

Resistensi insulin merupakan kondisi menurunnya kemampuan insulin baik endogen maupun eksogen dalam jumlah tertentu, merangsang penggunaan glukosa tubuh / menurunnya respon terhadap insulin dari sel target / organ, tempat kerja hormon insulin, seperti otot, jaringan lemak dan hati.<sup>39</sup> Beberapa mekanisme terjadinya resistensi insulin, antara lain:

#### 1. Lipotoksitas

Peningkatan kadar asam lemak bebas yang beredar, seperti yang terjadi pada obesitas, akan memicu aktivasi JNK, IKK, PKC dan fosforilasi Ser-307 IRS-1. Asam lemak palmitat berperan khusus memicu stres retikulum endoplasma, produksi sitokin dan aktivasi JNK. (namun, pemberian bersama oleat dapat mencegah hal ini, sehingga diketahui bahwa pemberian kombinasi asam lemak dapat memengaruhi pensinyalan insulin). Metabolit lipid diasil gliserol (DAG) juga dapat memicu resistensi insulin melalui aktivasi PKC  $\theta$  dan memicu fosforilasi Ser-307 IRS-1. Demikian juga dengan *sphingolipid ceramide* pada penderita obesitas dapat memicu resistensi insulin yang berat, melalui aktivasi PKC dan aktivasi JNK. Seramid juga meningkatkan interaksi PP2A dengan Akt, fosforilasi Thr-34 oleh PKC  $\zeta$ , sehingga menurunkan ikatan PIP<sub>3</sub> dengan Akt. Demikian juga, yang terakhir, peningkatan rasio *phosphatidylcholine* terhadap *phosphatidylethanolamine* di retikulum endoplasma memicu stres retikulum endoplasma dan memicu resistensi insulin.<sup>15</sup>

#### 2. Inflamasi

Inflamasi ringan kronik diyakini sebagai pemicu terjadinya resistensi insulin pada penderita obesitas. Ada 2 jenis sel yang terlibat pada peristiwa ini, yaitu adiposit dan makrofag. Keduanya dapat mengeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi yang menginduksi resistensi insulin. Sekresi MCP-1 oleh adiposit menyebabkan akumulasi makrofag ke jaringan lemak dan memicu resistensi insulin. Sekresi sitokin-sitokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mengaktivasi Ser/Thr kinase, menurunkan IRS-1, GLUT4 dan ekspresi *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) dan aktivasi *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) adiposit. Aktivasi *Toll-like receptor* (TLR)-2 dan -4, oleh lipopolisakarida memicu aktivasi jalur inflamasi *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B).<sup>11, 15</sup>

#### 3. Hiperglikemia

Glukosa, jika kadarnya melebihi kadar fisiologis, akan memengaruhi sensitivitas insulin di otot dan jaringan lemak dan sekresi insulin dari sel  $\beta$ . Diduga hal ini berkaitan dengan stres oksidatif, yang dipicu oleh *advanced glycosylation end product* (AGE) yang akan memfosforilasi Ser-307 IRS-1 dan membentuk *methylglyoxal-IRS-1*. Hiperglikemia juga memicu aktivasi JNK, memicu *O-GlcNAcylation* dari reseptor insulin, mengaktifkan jalur PKC melalui sintesis *de novo* DAG.<sup>15</sup>

#### 4. Disfungsi mitokondria dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)

ROS biasanya terbentuk sebagai produk samping rantai transpor elektron dan gangguan mitokondria. Stres oksidatif memicu aktivasi ‘stres kinase’ yang menyebabkan fosforilasi serin IRS. Kerusakan mitokondria oleh oksidasi asam lemak di hati meningkatkan DAG, aktivasi PKC $\epsilon$ , dan menurunkan aktivitas PI3K.<sup>11, 15</sup>

#### 5. Stres retikulum endoplasma

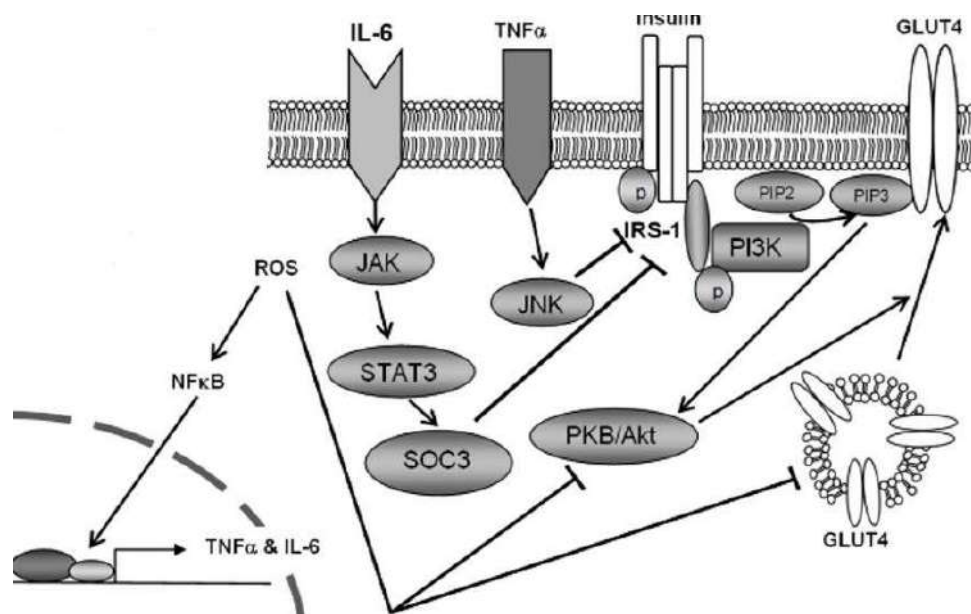
Respon stres retikulum endoplasma atau *unfolded protein response* (UPR) yang merupakan mekanisme kontrol pembentukan protein di retikulum endoplasma; contoh melalui jalur *protein kinase R-like ER kinase* (PERK), *inositol-requiring enzyme 1 alpha* (IRE-1 $\alpha$ ), di jaringan adiposa dan hati memicu aktivasi JNK dan IKK, fosforilasi terhadap Ser-307 IRS-1, dan menyebabkan resistensi insulin.<sup>13, 15</sup>

### 2.2.3 Hubungan hiperhomosisteinemia dengan resistensi insulin

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, oksidasi terhadap molekul homosistein menyebabkan pembentukan ROS<sup>40</sup>; dan kegagalan fungsi editing *aminoacyl-tRNA synthetase* (AARS) menghasilkan homosistein tiolakton.<sup>10</sup> Stres oksidatif yang bersifat kronis menginduksi jalur sinyal stres, NF $\kappa$ B, JNK dan p38 MAPK. Serin Kinase IKK yang teraktivasi memfosforilasi I $\kappa$ B, sehingga NF $\kappa$ B yang tidak aktif, menjadi aktif, dan mengalami translokasi ke dalam inti, memicu ekspresi gen-gen pro-inflamasi, seperti *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan interleukin 6 (IL-6).<sup>41</sup> Selain IKK, sejumlah *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) juga teraktivasi pada stres oksidatif. TNF- $\alpha$  mengaktifkan *Jun N-Terminal Kinase* (JNK), demikian juga IL-6 mengaktifkan JAK-STAT-SOCS yang merupakan regulator negatif sinyal insulin; menyebabkan fosforilasi *serine / threonine kinase* reseptor insulin / substrat reseptor insulin (IRS), mengganggu kemampuannya mengaktifkan jalur sinyal dibawahnya. Homosisteinilasi oleh

homosistein tiolakton terhadap protein menyebabkan kerusakan protein dan memicu timbulnya respon inflamasi.<sup>11, 42</sup>

Najib, dkk, pada penelitiannya, menunjukkan beberapa hal, yaitu: homosistein tiolakton menghambat autofosforilasi insulin terhadap subunit  $\beta$  reseptor insulin, menghambat ikatan subunit  $\beta$  reseptor insulin dengan substratnya dan dengan p85. Homosistein tiolakton juga menghambat aktivitas PI3K dan menghambat kerja insulin dalam pembentukan glikogen.<sup>12</sup> Li, dkk, dalam penelitiannya mengemukakan bahwa hiperhomosisteinemia menyebabkan aktivasi JNK, c-Jun dan p-65 yang memicu produksi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *interleukin 6* (IL-6). Aktivasi JNK menghambat Akt, demikian juga kehadiran sitokin-sitokin pro-inflamasi, dan pada akhirnya mengganggu pensinyalan insulin.<sup>13</sup> Dan pada penelitian Sianipar, dkk, diperlihatkan keterkaitan antara hiperhomosisteinemia yang dipicu diet restriksi vitamin B12 dengan peningkatan kadar glukosa darah, insulin dan kenaikan nilai HOMA IR, menandakan terjadinya resistensi insulin.<sup>4</sup> Gambar 2.2.3 menggambarkan patofisiologi terjadinya resistensi insulin, yang dipicu oleh stres oksidatif.



**Gambar 2.2.3** Patofisiologi resistensi insulin yang dipicu oleh stres oksidatif<sup>42</sup>

Dari pemaparan di atas, telah jelas bahwa insulin bekerja melalui jalur-jalur pensinyalan, dengan melibatkan protein-protein hilir spesifik<sup>15</sup>, dalam pengaturan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein.<sup>16</sup> Dari banyaknya jalur dalam pensinyalan insulin, yang menjadi fokus dalam penelitian ini adalah jalur pensinyalan insulin terhadap

proses glukoneogenesis, melalui aksis PI3K-Akt-FOXO1.<sup>15</sup> FOXO1 merupakan salah satu protein hilir pensinyalan insulin, dalam pengaturan aktivitas glukoneogenesis. Insulin menghambat aktivitas glukoneogenesis dengan menekan aktivitas FOXO1.<sup>18</sup> Berikut akan dijelaskan tentang protein FOXO, bentuk-bentuk pengaturan aktivitas protein FOXO dalam tubuh, dan peran protein FOXO1 dalam tubuh. Juga akan dijelaskan bagaimana insulin mengatur aktivitas glukoneogenesis melalui FOXO1, dan pengaruh resistensi insulin terhadap aktivitas FOXO1.

### **2.3 *Forkhead Box O (FOXO) dan Glucose 6 Phosphatase (G6Pc)***

#### **2.3.1 FOXO sebagai faktor transkripsi**

*Forkhead Box O* (gen FOXO) merupakan faktor transkripsi, dengan adanya domain pengikatan DNA di bagian N-terminal dari proteinnya. Saat ini diketahui terdapat 4 gen FOXO pada mamalia, yaitu FOXO1, FOXO3a, FOXO4, dan FOXO6. FOXO1 merupakan faktor transkripsi keluarga FOXO yang paling awal ditemukan, dan diketahui terlibat dalam banyak proses metabolisme dalam tubuh.<sup>18</sup> FOXO1 dan FOXO3 diekspresikan di banyak jaringan. FOXO4 diekspresikan di otot, ginjal, dan jaringan kolorektal, sedangkan FOXO6 diekspresikan di otak dan hati.<sup>17, 18, 43</sup> FOXO dapat mengaktifasi atau menghambat target hilirnya. Haeusler dkk mengemukakan adanya indikasi sinergisitas keluarga FOXO dalam menimbulkan efek metaboliknya dalam tubuh. Dalam penelitiannya, Haeusler dkk menunjukkan bahwa ablasi 3 gen FOXO menghasilkan kadar glukosa darah puasa yang lebih baik dan juga memperbaiki sensitivitas terhadap insulin.<sup>44</sup> Dalam tabel 2.3.1 berikut diperlihatkan berbagai aktivitas selular keluarga FOXO.

**Tabel 2.3.1. Berbagai aktivitas keluarga FOXO terhadap sel<sup>17</sup>**

FOXO	Cellular function	Pathway or target
FOXO1, FOXO3, and FOXO4	Proliferation (-/+)	G1-S phase entry, G2-M cell cycle
FOXO1, FOXO3, and FOXO4	Apoptosis (+/-)	Extrinsic and intrinsic apoptotic pathways
FOXO1, FOXO3	Metabolism (+)	Glucose-6-phosphatase Phosphoenolpyruvate carboxykinase PGC1 Apolipoprotein C-III B cell translocation gene 1
FOXO3	Differentiation (+/-)	DNA binding 1 Myostatin, neurogenin 3, and NK homeobox factor 6.1
FOXO1, FOXO3	Oxidative stress (-)	Glutathione, selenoprotein P, manganese superoxide dismutase, and peroxiredoxin III
FOXO1, FOXO3	Atrophy (+)	Gabarapl1, Atg12, calcineurin/nuclear-factor, and atrogin-1
FOXO1	Inflammation (+)	IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and Tlr4
DAF-16, FOXOs	Aging (-)	P53, SIRT1, NF- $\kappa$ B, MnSOD, heat-shock proteins, and antimicrobial agents
DAF-16, FOXO3	Reproduction (-)	Cell cycle inhibitor p27 enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransferase (Galt) Prostaglandins

(+) : meningkatkan; (-) : menurunkan

### 2.3.2 Bentuk-bentuk modifikasi protein FOXO

Sesuai judul penelitian ini, yang bertujuan melihat pengaruh restriksi vitamin B12 terhadap proses glukoneogenesis oleh faktor transkripsi FOXO1, maka pembahasan akan lebih difokuskan terhadap FOXO1 dari antara anggota keluarga FOXO lainnya. Dalam tubuh, FOXO1 mengalami berbagai modifikasi pada tingkat protein, yang dinamakan modifikasi paska-translasi dan modifikasi pada tingkat mRNA, sesuai dengan sinyal yang berasal dari lingkungannya; semua bentuk modifikasi itu akan memengaruhi aktivitas FOXO1.<sup>17</sup>

Beberapa mekanisme modifikasi paska-translasi / tingkat protein, antara lain:

#### 1. Fosforilasi

Insulin melalui jalur *phosphoinositide 3-kinase* / protein kinase B (PI3K / PKB) memfosforilasi FOXO1 pada situs *Threonine 24*, *Serine 256*, dan *Serine 319* dan FOXO3a pada *Serine 253*; hal ini meningkatkan afinitas terhadap *chaperone* protein 14-3-3 $\zeta$ , menyebabkan retensi sitoplasma / translokasi FOXO1 dari inti ke sitoplasma,

dan dengan demikian menghambat aktivitas FOXO1 sebagai faktor transkripsi.<sup>45</sup> Namun, fosforilasi FOXO1 oleh *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) atau *macrophage-stimulating 1* (Mst1) menyebabkan efek sebaliknya. Cao, dkk dalam penelitiannya, menemukan suatu *nuclear phosphatase*, SCP4 yang dapat memicu transkripsi gen-gen glukoneogenik, PEPCK dan G6Pc dengan mendefosforilasi FOXO1/3a. Lebih lanjut Cao, dkk mengidentifikasi SCP4 sebagai protein fosfatase di inti. Hal ini membedakannya dengan protein fosfatase yang berperan di sitoplasma, seperti *protein phosphatase 2* (PP2A) dan *dual-spesific phosphatase ; mitogen-activated protein kinase phosphatase 3* (DUSP6; MKP3).<sup>46</sup>

## 2. Asetilasi

Asetilasi oleh *histone acetyltransferase cAMP-response element-binding protein* (CREB)-*binding protein* (CBP) terhadap FOXO1, akan menurunkan aktivitas FOXO1 sebagai faktor transkripsi. Sebaliknya deasetilasi FOXO1 oleh *Sirt1*, meningkatkan aktivitas transkripsi FOXO1 dengan mengatur pengikatan DNA-nya pada gen target tertentu. Hormon tiroid melalui reseptor tiroidnya, mengaktifasi transkripsi gen-gen glukoneogenik melalui cara ini (deasetilasi oleh *Sirt1*).<sup>17</sup>

## 3. Ubiquitinasi

Ubiquitinasi dapat berperan ganda pada regulasi protein FOXO. *Polyubiquitinasi*, menyebabkan FOXO mengalami degradasi *proteasome*. Beberapa ligase E3 mendegradasi FOXO melalui proses ubiquitinasi. Sedangkan *monoubiquitinasi* efeknya berlawanan dengan *polyubiquitinasi*, yang justru meningkatkan aktivitas transkripsi FOXO. Contohnya, *monoubiquitinasi* oleh stres oksidatif terhadap FOXO4 pada K199 dan K211.<sup>18</sup>

Bentuk lain modifikasi, yaitu pada tingkat mRNA melalui proses metilasi mRNA. Terdapat 2 lokasi pengikatan khusus adenosin dalam urutan pengkodean mRNA FOXO1. Contohnya metilasi adenosin oleh protein METTL3 menjadi *N 6-Methyladenosine* (m6A). Juga demetilasi m6A menjadi adenosin oleh massa lemak dan protein.<sup>18</sup>

### 2.3.3 Peran FOXO1 dalam tubuh

Beberapa peran FOXO1 dalam tubuh:

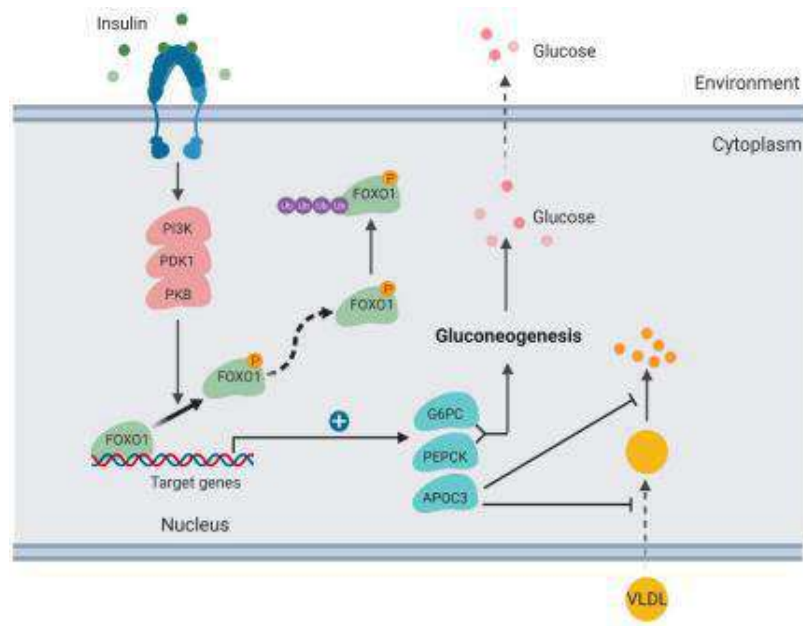
#### 1. Produksi glukosa hati

FOXO1 berperan dalam glukoneogenesis hati saat puasa. Pada kondisi puasa, kadar glukosa yang rendah menghambat sekresi insulin. Akibatnya, fosforilasi dan degradasi terhadap FOXO1 oleh insulin menurun, dan sebaliknya aktivitas transkripsi FOXO1 terhadap gen-gen glukoneogenesis seperti pada G6Pc dan PEPCK meningkat.<sup>47</sup> *FOXO1 binding sites* (IRE), terdapat pada promotor kedua gen ini. Hal ini ditunjukkan oleh percobaan dengan tikus mutan dengan diabetes yang sudah kehilangan aktivitas FOXO1 nya, terjadi perbaikan nilai glukosa puasa. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha* (PGC 1- $\alpha$ ) dan *protein arginine methyltransferases* (PRMT) telah diketahui berperan sebagai ko-aktivator FOXO1 dalam proses glukoneogenesis ini.<sup>48, 49</sup> Yoon dkk, mengatakan PGC-1 $\alpha$  terlibat dalam aktivasi G6Pc maupun PEPCK. Dalam aktivasi transkripsi PEPCK, PGC-1 $\alpha$  berperan dalam ko-aktivator reseptor glukokortikoid dan *liver-enriched transcription factor, hepatic nuclear factor-4 $\alpha$*  (HNF-4 $\alpha$ ).<sup>50</sup> Ekspresi PGC-1 $\alpha$  adalah melalui *CREB-dependent transcriptional mechanism*.<sup>47</sup> Keterlibatan PGC dalam patogenesis diabetes melitus tipe 2 dianggap sangat penting.<sup>51</sup> Selain berperan sebagai aktivator transkripsi gen-gen glukoneogenik, FOXO1 bersama dengan SIN3a juga berperan sebagai represor gen glukokinase (Gck). Di bawah pengaruh insulin, FOXO1 dihambat aktivitasnya, sehingga produksi glukosa melalui glukoneogenesis dihambat, namun penggunaan glukosa meningkat melalui glikolisis, sintesis glikogen dan *de novo lipogenesis*.<sup>52</sup>

#### 2. Penyerapan lipoprotein hati

Pada metabolisme trigliserida, yang menjadi target FOXO1 adalah *apolipoprotein C-III* (ApoC3). FOXO1 meningkatkan transkripsi ApoC3. Pada resistensi insulin, peningkatan ekspresi ApoC3 oleh FOXO1 tidak terkendali, dan hal ini menyebabkan hipertrigliseridemia dan aterosklerosis.<sup>18</sup> Peran FOXO1 pada proses produksi glukosa hati dan penyerapan lipoprotein hati, diperlihatkan pada gambar 2.3.3.1 berikut ini.

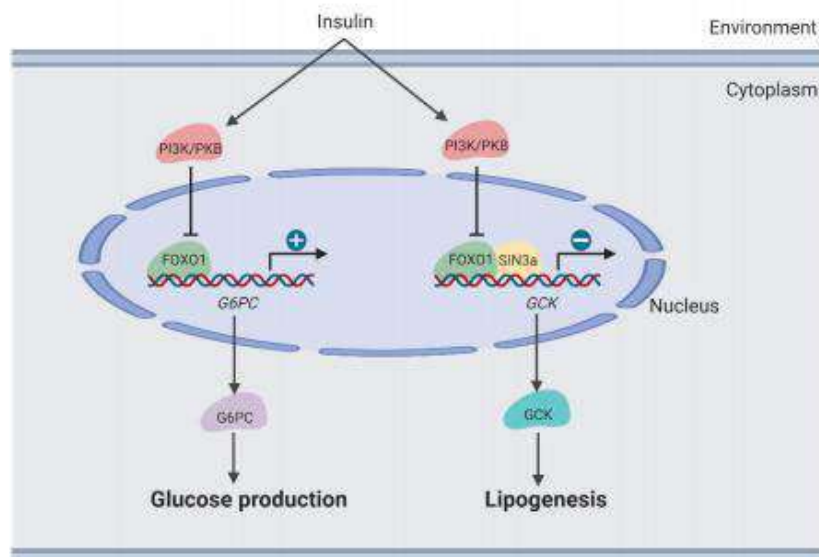




**Gambar 2.3.3.1.** Pengaturan produksi glukosa dan ambilan lipoprotein di hati oleh FOXO1<sup>18</sup>

### 3. Lipogenesis hati

Di klinik, terapi penurunan glukosa darah biasa diikuti oleh peningkatan lipogenesis. Hal ini distimulasi oleh penekanan glukokinase (Gck) yang bergantung FOXO1. Aktivitas Gck yang meningkat menginduksi perlemakan hati. Aktivitas Gck ditekan oleh SIN3 *Transcription Regulator Family Member A* (SIN3A).<sup>18</sup> Gambar 2.3.3.2 berikut memperlihatkan aktivitas FOXO1 terhadap lipogenesis.



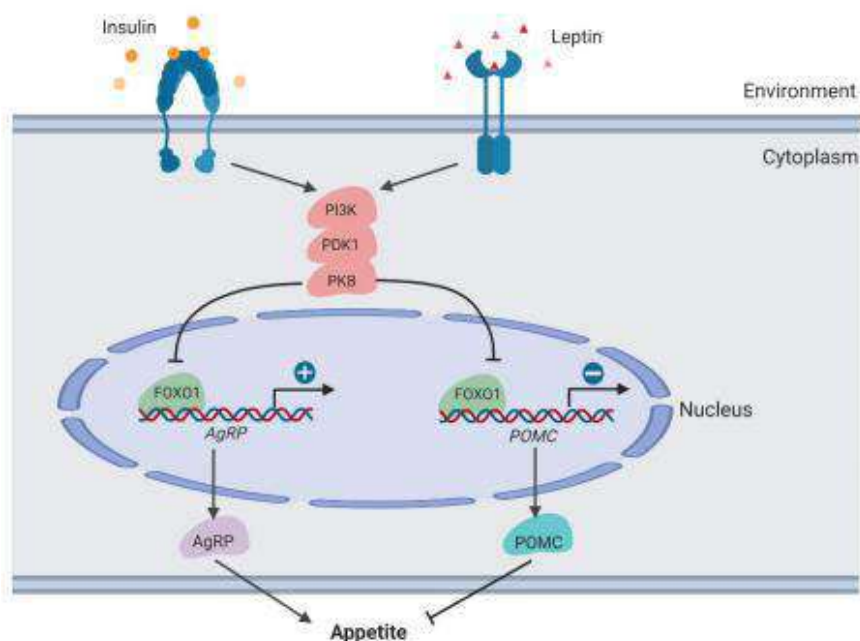
**Gambar 2.3.3.2.** Pengaturan lipogenesis oleh FOXO1 di hati<sup>18</sup>

#### 4. Metabolisme lipid dalam adiposit

Target regulasi FOXO1 berikutnya adalah PPAR $\gamma$ , dan bersifat inhibisi. Dalam kondisi normal, dibawah pengaruh insulin, FOXO1 terdegradasi, sehingga transkripsi PPAR $\gamma$  berlangsung. Hal ini memicu adipogenesis. Selain itu, FOXO1 juga menekan aktivitas transkripsi gen Ucp1. Ucp1 merupakan biomarker termogenesis jaringan adiposa. Hambatan terhadap FOXO1 akan meningkatkan pembakaran lemak, termogenesis dan pengeluaran energi.<sup>18</sup>

#### 5. Perilaku Makan di Hipotalamus

FOXO1 juga berperan dalam pengaturan perilaku makan. Untuk menimbulkan efek itu, FOXO1 bekerja pada neuron hipotalamus, *pro-opiomelanocortin* (POMC) dan *agouti-related peptide* (AgRP), yang keduanya memiliki efek saling berlawanan. POMC menekan nafsu makan dan menurunkan berat badan. Sedangkan AgRP meningkatkan asupan makanan dan meningkatkan berat badan. Leptin dan insulin mengaktifkan jalur PI3K / PDK1/ PKB-FOXO1. Protein FOXO1 yang tidak aktif, mengaktifkan transkripsi POMC, dan menghambat transkripsi AgRP. Pada tikus dengan *knockout* PDK1, fosforilasi FOXO1 dihambat, sehingga transkripsi POMC dihambat dan sebaliknya ekspresi AgRP meningkat, dan pada akhirnya meningkatkan keinginan makan.<sup>18, 53</sup> Gambar 2.3.3.3 berikut menggambarkan pengaturan nafsu makan oleh FOXO1 di hipotalamus.



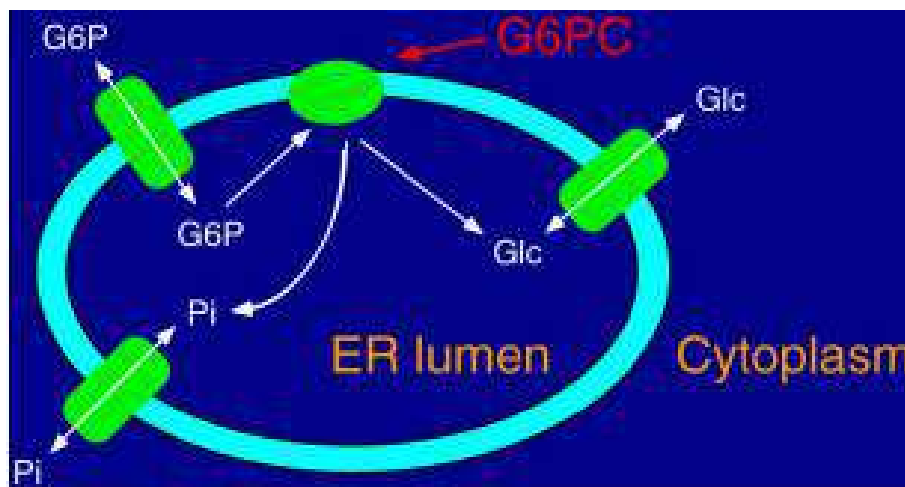
**Gambar 2.3.3.3.** Pengaturan nafsu makan oleh FOXO1 di hipotalamus<sup>18</sup>

Seperti telah dijelaskan di atas, FOXO1 berperan dalam proses glukoneogenesis, dan insulin menekan aktivitas FOXO1, dengan memfosforilasi FOXO1, sehingga FOXO1 menjadi tidak aktif dan kemudian mengalami degradasi.<sup>18</sup> Pada kondisi resistensi insulin, dimana pengaruh inhibisi insulin terhadap FOXO1 menurun / hilang, maka aktivitas FOXO1 akan meningkat. Dan juga telah dijelaskan di atas, dalam proses glukoneogenesis, yang menjadi target transkripsi FOXO1 adalah gen-gen enzim yang terlibat dalam proses glukoneogenesis, salah satu enzim tersebut adalah *glucose-6-phosphatase* (G6Pc).<sup>20</sup> Oleh karenanya, perlu dibahas dahulu mengenai enzim G6Pc dan perannya proses glukoneogenesis.

#### **2.3.4. *Glucose-6-phosphatase* (G6Pc)**

Glukosa-6-fosfatase merupakan kumpulan beberapa protein yang masing-masing memiliki peran dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis glukosa 6-fosfat (G6P) menjadi glukosa dan fosfat anorganik. Lokasinya terletak atau sebagai bagian dari membran integral retikulum endoplasma. Ada 3 anggota G6Pc, yaitu G6Pc, G6Pc2 dan G6Pc3.<sup>54</sup> Baik G6Pc2, maupun G6Pc3, masing-masing memiliki aktivitas dan fungsi sama dengan G6Pc namun hanya separuhnya dari aktivitas G6Pc. Tempat aktivitas utama dari G6Pc adalah di hati. Fungsi hidrolisis dan transportasi G6Pc diperankan oleh protein-protein yang berbeda, namun dalam hal transportasi hasil hidrolisis G6Pc, yaitu G6P dan fosfat anorganik diduga difasilitasi oleh protein yang sama. G6Pc mengkatalisis tahap akhir jalur glukoneogenik dan glikogenolitik.<sup>19</sup> Mutasi terhadap gen G6Pc menyebabkan hipoglikemia berat. Ada 2 jenis mutasi terhadap gen ini, yaitu mutasi pada gen G6Pc menghasilkan GSD tipe 1a, sedangkan mutasi pada transporter G6P menghasilkan GSD tipe 1b.<sup>55</sup> Mutasi GSD tipe 1a ditandai oleh hipoglikemia berat *post-absorptif*, disertai hiperlipidemia, hiperurisemia, dan asidemia laktat. Zingone, dkk, dalam publikasinya, menyatakan, terapi pada tikus defisiensi G6Pase (G6Pase *-/-*) dengan *adenoviral vector containing the murine G6Pase gene* (Ad-mG6Pase) memperbaiki profil glukosa plasma, kolesterol, trigliserid dan asam urat; juga mengurangi ukuran hati dan ginjal yang mengalami pembesaran sebelum dilakukan terapi.<sup>56</sup> Hasil yang hampir serupa juga disampaikan oleh Roseman, dkk.<sup>57</sup> Di sisi lain, Kyle dkk, melakukan uji pada tikus dengan diabetes (*ob/ob* mice), dengan *2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified phosphorotioate antisense oligonucleotides* (ASO) yang spesifik terhadap *glucose 6-phosphate*

*transporter-1* (G6PT1); hasil dari penelitiannya menunjukkan penurunan aktivitas glukoneogenesis glukagon / memperbaiki profil glukosa darah, tanpa menimbulkan kelainan-kelainan seperti pada penyakit GSD 1a / tikus dengan *knockout* gen G6PT1.<sup>58</sup> Overekspresi G6Pc menyebabkan produksi glukosa hati meningkat, seperti yang terlihat pada resistensi insulin atau hipoinsulinemia. Ekspresi G6Pc juga dipengaruhi oleh glukagon, yang bekerja melalui cAMP, glukokortikoid, glukosa, dan asam lemak, yang meningkatkan ekspresi G6Pc.<sup>47</sup> Insulin, *tumor nekrosis factor* (TNF) dan interleukin-6, memiliki efek sebaliknya. Namun insulin merupakan regulator utama. Mengenai glukosa yang dikatakan turut meningkatkan ekspresi FOXO1, Rossetti dkk mengemukakan bahwa hal ini mungkin bertujuan mencegah penyimpanan glukosa hati yang berlebihan dan sebagai persiapan memasuki fase postabsorptif, dimana tubuh memerlukan glukosa.<sup>20</sup> Gambar 2.3.4 menunjukkan mekanisme kerja protein-protein G6Pc dalam aktivitas hidrolisis dan transportasi substrat, G6P ke dalam lumen retikulum endoplasma dan hasil berupa glukosa dan fosfat anorganik keluar dari retikulum endoplasma, menuju sitosol.



**Gambar 2.3.4** Model multikomponen sistem enzim glukosa-6-fosfatase (G6Pc).<sup>20</sup>

Dalam kondisi resistensi insulin, hilangnya pengaruh inhibisi insulin terhadap FOXO1, menyebabkan aktivitas transkripsi FOXO1 terhadap gen-gen glukoneogenesis meningkat, diantaranya G6Pc.<sup>18</sup> G6Pc merupakan enzim penting yang terlibat dalam tahap akhir glukoneogenesis, yaitu dalam hidrolisis dan transportasi glukosa 6 fosfat menjadi glukosa bebas dan fosfat inorganik. Ketiadaan enzim ini dapat menyebabkan hipoglikemia berat seperti yang telah dijelaskan di atas.<sup>20</sup>

Pada akhirnya jika dirangkaikan kembali, terdapat hubungan antara restriksi vitamin B12 dengan hiperhomosisteinemia.<sup>4</sup> Hiperhomosisteinemia akan memicu stres oksidasi dan inflamasi, menyebabkan resistensi insulin.<sup>11</sup> Resistensi insulin menyebabkan kendali insulin terhadap regulasi karbohidrat, lemak dan protein melemah atau hilang. Dalam regulasi karbohidrat, pengaruh inhibisi insulin melalui jalur Akt terhadap proses glukoneogenesis oleh FOXO1 menurun / hilang, akibatnya aktivitas transkripsi FOXO1 terhadap G6Pc meningkat, mendorong proses glukoneogenesis.<sup>18</sup> Glukoneogenesis menyebabkan hiperglikemia.<sup>14</sup>

Namun, proses glukoneogenesis tidak hanya dipengaruhi insulin saja. Hormon-hormon stres (glukagon, glukokortikoid, epinefrin dan *growth hormone*) juga tidak kalah perannya dalam proses glukoneogenesis.<sup>47</sup> Untuk mendapatkan gambaran seluas-luasnya terhadap proses glukoneogenesis bahkan lebih luas lagi yaitu pada lingkup produksi glukosa hati, maka dalam tinjauan pustaka ini, pembahasan akan diperluas, tidak hanya terbatas pada proses glukoneogenesis dan peran insulin secara tunggal, namun juga sedikit membahas tentang produksi glukosa hati, dimana glikogenolisis dan glukoneogenesis termasuk didalamnya dan juga keterlibatan hormon-hormon (selain insulin) dalam proses produksi glukosa hati.<sup>59-61</sup> Tujuannya adalah agar memberikan sudut pandang seluas-luasnya ketika melakukan analisis hasil penelitian ini.

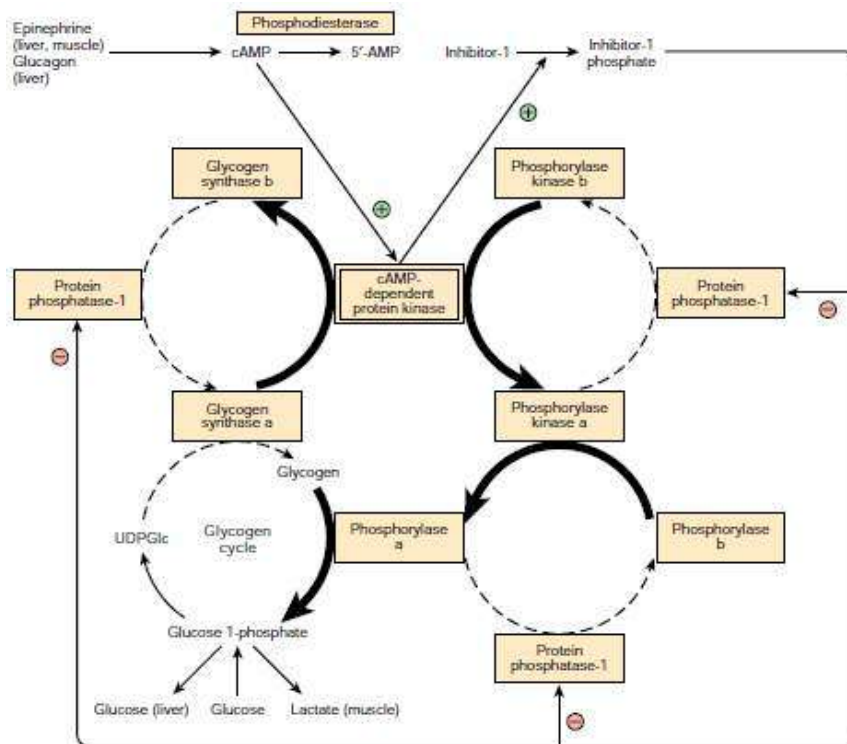
## **2.4 Produksi glukosa hati**

Produksi glukosa hati memenuhi 90% kebutuhan glukosa tubuh. Ini merupakan sumasi dari berbagai proses dalam tubuh, antara lain glukoneogenesis, glikogenolisis, glikogenesis, glikolisis, dan jalur-jalur lainnya<sup>62</sup>; dan merupakan hasil kolaborasi berbagai hormon. Dalam keadaan tidak puasa, kelebihan glukosa disimpan sebagai cadangan, baik dalam bentuk glikogen (melalui proses glikogenesis) maupun dalam bentuk lemak untuk digunakan ketika dibutuhkan, yaitu saat puasa / kelaparan, atau saat kebutuhan energi meningkat, misalnya ketika sakit.<sup>16</sup> Pada kondisi puasa / kelaparan, hati berusaha memenuhi kebutuhan energi / glukosa, untuk menjaga kadar glukosa darah normal (euglikemia) dan untuk memenuhi kebutuhan energi, khususnya pada organ-organ yang pemenuhan energinya bergantung glukosa, seperti sel-sel saraf, sel-sel darah merah dan sel-sel medula renal.<sup>19</sup> Dalam kondisi puasa / kelaparan, kebutuhan energi / glukosa dipenuhi melalui proses glikogenolisis dan glukoneogenesis. Dalam uraian

berikut, saya akan membahas kedua mekanisme tersebut (glikogenolisis dan glukoneogenesis).

#### **2.4.1 Glikogenolisis**

Dalam memicu glikogenolisis, hormon epinefrin dan glukagon mengaktifkan adenil siklase yang terdapat di membran sel hepatosit. Kemudian akan menyebabkan terbentuknya adenosin monofosfat siklik (cAMP). cAMP mengaktifkan protein kinase dependen cAMP<sup>47, 59</sup>, yang mengkatalisis perubahan glikogen sintase a menjadi glikogen sintase b dan perubahan fosforilase kinase b menjadi fosforilase kinase a. Fosforilase kinase a mengkatalisis perubahan fosforilase b menjadi fosforilase a; dan selanjutnya fosforilase a diperlukan untuk mengkatalisis pemecahan glikogen menjadi glukosa-1-fosfat. Di hati, glukosa-1-fosfat mengalami defosforilasi, sehingga akhirnya glukosa bebas dilepaskan. Protein kinase dependen cAMP juga selain mengkatalisis reaksi-reaksi tersebut di atas, juga mengkatalisis perubahan inhibitor 1 menjadi inhibitor 1 fosfat. Inhibitor 1 fosfat akan menekan aktivitas protein fosfatase 1 yang berperan dalam perubahan fosforilase kinase a menjadi fosforilase kinase b, perubahan glikogen sintase b menjadi glikogen sintase a, dan perubahan fosforilase a menjadi fosforilase b.<sup>19</sup> Gambar 2.4.1 berikut menggambarkan kontrol terpadu glikogenolisis dan glikogenesis oleh protein kinase dependen-cAMP.



**Gambar 2.4.1** Kontrol terpadu glikogenolisis dan glikogenesis oleh protein kinase dependen-cAMP.<sup>19</sup>

## 2.4.2 Glukoneogenesis

Glukoneogenesis adalah proses sintesis glukosa atau glikogen dari prekursor non-karbohidrat, seperti laktat (merupakan produk glikolisis anaerob), gliserol, asam-asam amino glukogenik dan propionat (substrat utama pada hewan ruminansia).<sup>19, 63</sup> Glukoneogenesis terutama terjadi di hati, selain itu juga di ginjal dan usus. Seperti telah dijelaskan, tujuan glukoneogenesis adalah untuk menjamin ketersediaan glukosa dalam keadaan puasa / kelaparan, untuk organ-organ yang pemenuhan energinya bergantung pada glukosa, seperti otak, mata, ginjal, dan sel-sel yang jumlah mitokondrianya sedikit, yang tidak mampu melakukan fosforilasi oksidatif, dan memerlukan energi dengan / melalui glikolisis anaerob.<sup>19, 64</sup> Di hati, laktat diubah menjadi glukosa melalui proses glukoneogenesis. Glukosa ini kemudian dipecah kembali melalui glikolisis anaerob, dan menghasilkan laktat, demikian seterusnya (siklus Cori).<sup>19</sup> Triasilgliserol dalam jaringan adiposa dipecah menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Gliserol masuk aliran darah menuju hati. Dengan bantuan enzim gliserol kinase, gliserol mengalami fosforilasi menjadi gliserol fosfat. Selanjutnya gliserol fosfat dioksidasi oleh gliserol fosfat dehidrogenase menjadi dihidroksiaseton fosfat.<sup>64</sup> Asam amino glukogenik harus melalui

siklus asam sitrat sebelum memasuki proses glukoneogenesis. Melalui siklus ini, asam amino glukogenik mengalami katabolisme menjadi  $\alpha$ -ketoglutarat, suksinil CoA, dan fumarat. Selanjutnya alfa ketoasid dikonversi menjadi oksaloasetat, substrat bagi enzim *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK). Oksaloasetat yang dihasilkan, direduksi menjadi malat, diangkut keluar mitokondria ke sitosol. Di sitosol, malat dioksidasi kembali menjadi oksaloasetat. Glukoneogenesis merupakan kebalikan dari proses glikolisis, namun pada prosesnya, glukoneogenesis memerlukan keterlibatan 4 enzim kunci, yaitu *pyruvate carboxylase*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), *fructose 1,6-biphosphatase* dan *glucose 6 phosphatase* (G6Pc); reaksi glukoneogenesis bersifat reversibel, sedangkan reaksi glikolisis bersifat eksergonik dan ireversibel.<sup>19, 64</sup>

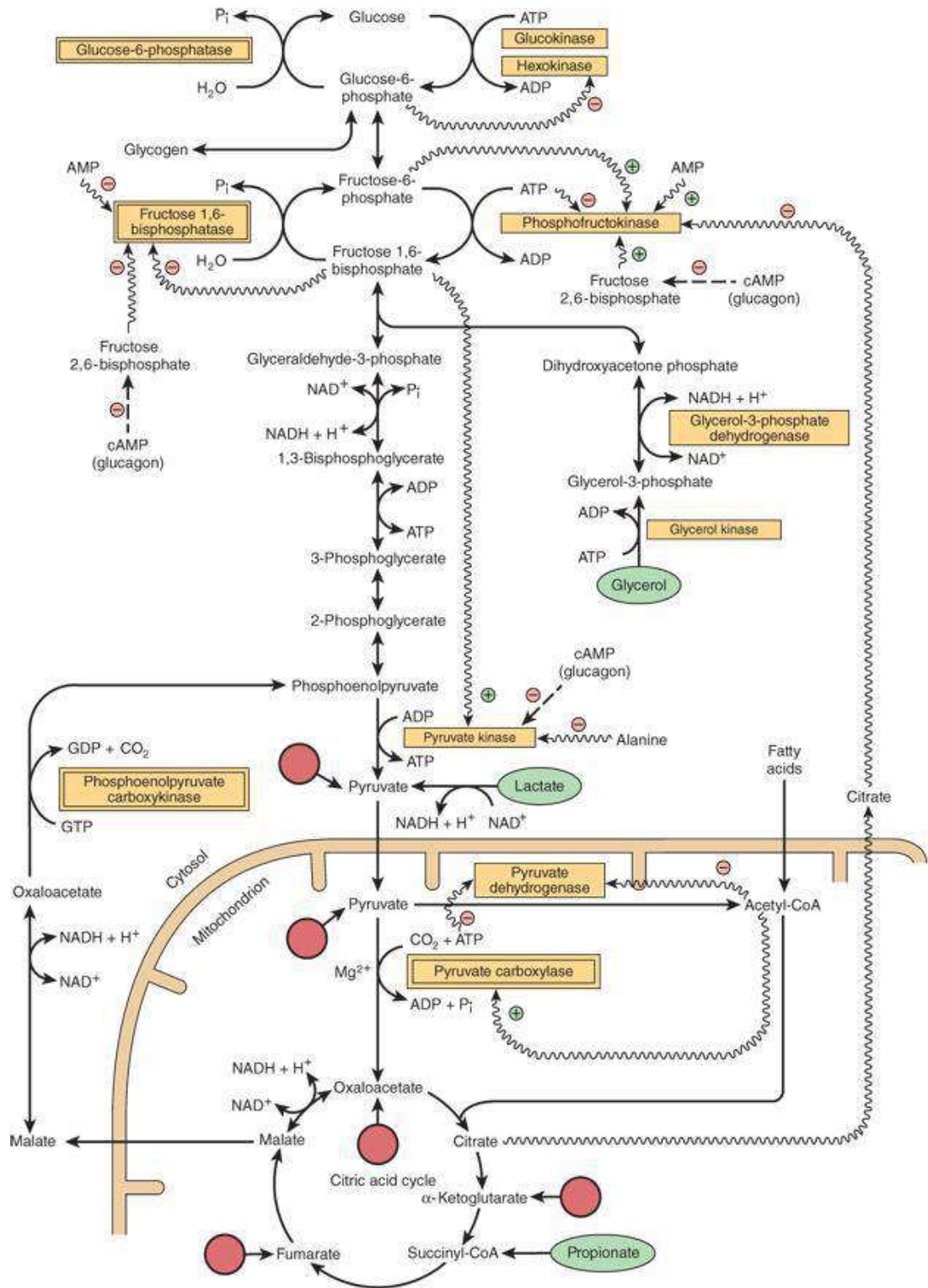
Dimulai dari piruvat, tahap-tahap reaksi glukoneogenesis adalah sebagai berikut:

1. Di dalam mitokondria, piruvat mengalami karboksilasi oleh enzim *pyruvate carboxylase* membentuk oksaloasetat. *Pyruvate carboxylase* memerlukan ATP dan biotin. Reaksi ini sangat penting dan merupakan langkah awal, untuk mem-*bypass* reaksi ireversibel yang dikatalisis oleh enzim piruvat kinase.
2. Di dalam sitosol, oksaloasetat mengalami dekarboksilasi dan disusun kembali untuk membentuk fosfoenolpiruvat (PEP) dengan bantuan enzim *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) (demikian pula PEPCK yang berlokasi di mitokondria, mengubah OAA menjadi PEP, kemudian menuju sitoplasma). *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) membutuhkan GTP untuk aktivasi. Seperti langkah nomor 1 di atas, reaksi ini pun penting untuk mem-*bypass* reaksi ireversibel yang dikatalisis oleh enzim *pyruvate kinase*.
3. PEP terhidrasi membentuk 2-fosfoglisarat oleh enzim *enolase*.
4. *2-phosphoglycerate* dikonversi menjadi *3-phosphoglycerate* oleh enzim *phosphoglycerate mutase*.
5. *3-fosfoglisarat* difosforilasi oleh enzim *phosphoglycerate kinase*, membentuk 1,3-bisfosfoglisarat. ATP diperlukan dalam reaksi ini.
6. 1,3-bisfosfoglisarat mengalami reduksi oleh enzim *glyceraldehyde 3-phosphate dehidrogenase* menjadi gliseraldehida 3-fosfat. Bertindak sebagai donor elektron adalah NADH.
7. Gliseraldehid 3 fosfat mengalami isomerisasi membentuk dihidroksiaseton fosfat dengan bantuan enzim *triose phosphate isomerase*.



8. Gliseraldehid 3 fosfat dan dihidroksiaseton fosfat mengalami kombinasi, membentuk fruktosa 1,6-bifosfat dengan bantuan enzim *aldolase*.
9. Fruktosa 1,6-bifosfat mengalami defosforilasi membentuk fruktosa 6-fosfat dengan bantuan enzim *fructose 1,6-biphosphatase* atau FBPase-1. Reaksi ini juga sangat penting untuk glukoneogenesis dan diperlukan untuk mem-*bypass* reaksi ireversibel yang dikatalisis oleh enzim glikolitik *phosphofruktokinase-1*.
10. Fruktosa 6-fosfat dikonversi menjadi glukosa 6-fosfat oleh enzim isomerase fosfoheksosa.
11. Glukosa 6-fosfat mengalami defosforilasi untuk membentuk glukosa oleh *glucose 6-phosphatase* (G6Pc), yang kemudian masuk aliran darah. Reaksi ini penting, untuk mem-*bypass* reaksi ireversibel yang dikatalisis oleh enzim glikolitik heksokinase.<sup>64</sup>

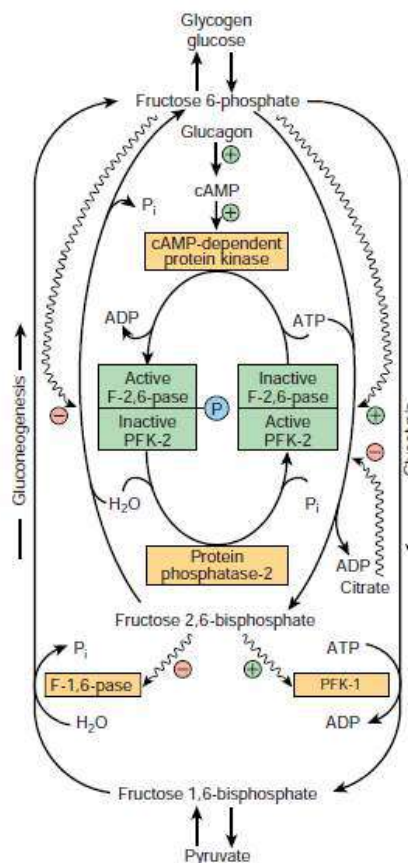
Gambar 2.4.2.1 berikut menggambarkan proses glukoneogenesis dan glikolisis di hati.



Gambar 2.4.2.1 Proses glikolisis dan glukoneogenesis di hati<sup>19</sup>

Fruktosa 2,6 bisfosfat merupakan aktivator alosterik paling poten untuk fosfofruktokinase-1 dan inhibitor fruktosa 1,6 bisfosfatase. Fruktosa 2,6 bisfosfat meniadakan inhibisi ATP terhadap fosforuktokinase-1 dan meningkatkan afinitas enzim

tersebut terhadap fruktosa 6 fosfat. Fruktosa 2,6 bisfosfat menghambat fruktosa 1,6 bisfosfat dengan meningkatkan  $K_m$  fruktosa 1,6 bisfosfat. Fruktosa 2,6 bisfosfat merupakan hasil fosforilasi fruktosa 6 fosfat oleh fosfofruktokinase 2. Protein enzim ini juga dapat menguraikannya kembali, karena memiliki aktivitas fruktosa 2,6 bisfosfatase. Sebagai kontrol enzim bifungsional ini adalah fruktosa 6 fosfat. Jika pasokan glukosa berlebih, fruktosa 2,6 bisfosfat meningkat, mengaktifkan fosfofruktokinase 1 dan menghambat fruktosa 1,6 bisfosfat.<sup>59</sup> Sebaliknya, dalam kondisi puasa, glukagon merangsang pembentukan cAMP, mengaktifkan protein kinase dependen cAMP, yang akan menginaktivkan fosfofruktokinase 2, yang mengaktifkan (secara fosforilasi) fruktosa 2,6 bisfosfatase. Maka, terjadi glukoneogenesis yang disebabkan penurunan fruktosa 2,6 bisfosfat yang menginaktivkan fosfofruktokinase 1 dan menghilangkan inhibisi terhadap 1,6 bisfosfatase. Gambar 2.4.2.2 berikut, akan menunjukkan kontrol glikolisis dan gluconeogenesis di hati oleh fruktosa 2,6 bisfosfat dan enzim bifungsional PFK-2/F-2,6-ase (6 -fosfofrukto-2-kinase / fruktosa 2,6 –bisfosfatase).<sup>19</sup>



**Gambar 2.4.2.2** Kontrol glikolisis dan glukoneogenesis di hati oleh fruktosa 2,6 bisfosfat dan enzim bifungsional PFK-2/F-2,6-ase (6-fosfofrukto-2-kinase / fruktosa 2,6 –bisfosfatase).<sup>19</sup>

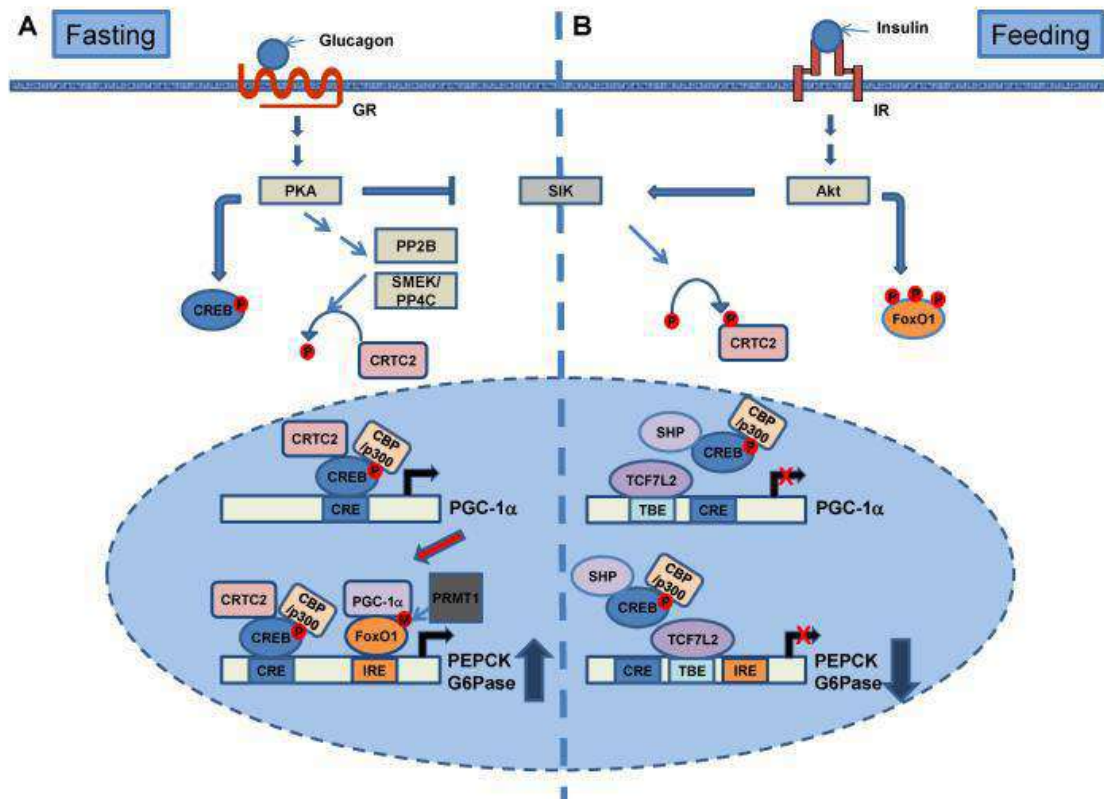
### 2.4.3 Pengaruh hormon lain (bukan insulin) terhadap produksi glukosa hati

Proses glukoneogenesis tidak hanya dipengaruhi atau dikendalikan oleh insulin. Beberapa hormon yang telah diketahui dapat memengaruhi proses glukoneogenesis, diantaranya:

#### 1. Glukagon

Glukagon adalah hormon yang terdiri dari 29 asam amino, yang disekresikan sel-sel alfa pulau pankreas, yang efeknya berlawanan dengan efek hormon insulin. Hormon ini sering disebut juga hormon hiperglikemik.<sup>14</sup> Sekresi glukagon dipicu oleh perubahan konsentrasi glukosa darah, asam amino khususnya alanin dan arginin, asam lemak bebas, dan stres. Glukagon memicu glikogenolisis dan glukoneogenesis. Ketika glukagon mengikat reseptor transmembrannya pada membran sel, terjadi perubahan konformasi dan aktivasi protein-G $\alpha$ s. Hal ini meningkatkan kadar cAMP melalui aktivasi *adenilat cyclase*. Kemudian protein kinase A (PKA) dan *cAMP response element-binding* (CREB) teraktivasi.<sup>59</sup> Aktivasi CREB menginduksi transkripsi G6Pc dan PEPCK, karena terdapat AMP binding element (CRE) pada promotor kedua gen tersebut. Lebih lanjut, CREB memiliki beberapa ko-aktivator transkripsi, diantaranya CBP/p300 (namun dianggap tidak cukup kuat pengaruhnya dalam meningkatkan aktivitas glukoneogenik CREB), CRTC2 yang terletak pada sitosol, dan saat diaktivasi secara defosforilasi oleh *AMP-activated protein kinase* dan kinase-kinase yang terkait dengannya, seperti *salt-inducible kinase-1* (SIK1) dan SIK2, CRTC2 mengalami translokasi ke inti dan berinteraksi dengan CREB mengaktifkan proses glukoneogenesis. Walaupun aktivitas FOXO1 menurun, CRTC2 mampu memicu ekspresi gen glukoneogenik hati. Selain menginduksi transkripsi gen-gen glukoneogenik secara langsung, CREB juga penting untuk memodulasi efek PGC-1 $\alpha$  dan *estrogen-related receptor gamma* (ERR $\gamma$ ), dimana keduanya berperan sebagai regulator transkripsi gen-gen glukoneogenik. Sebagai represor transkripsi, antara lain SHP, sebagai represor reseptor inti. SHP secara langsung menghambat *cAMP-dependent hepatic gluconeogenesis* dengan ‘berkompetisi’ dengan CRTC2 berikatan dengan CREB; selain itu ada juga DAX-1 yang menghambat koaktivator transkripsi, seperti PGC-1 $\alpha$  pada promotor PEPCK dan G6Pc. Dan yang terakhir, sebagai penekan aktivitas glukoneogenik adalah TCF7L2, yang cara kerjanya adalah dengan memicu sekresi insulin, melalui peningkatan sekresi GLP-1 pada sel L usus atau melalui efeknya

terhadap sekresi sel  $\beta$  pankreas. Cara lainnya, adalah dengan menempel pada *regulatory element* dekat CRE dan IRE gen-gen glukogenik (menghambat ko-aktivator glukoneogenesis)<sup>47</sup> Gambar 2.4.3.1 berikut menggambarkan regulasi transkripsi glukoneogenesis hati dalam kondisi makan dan puasa.

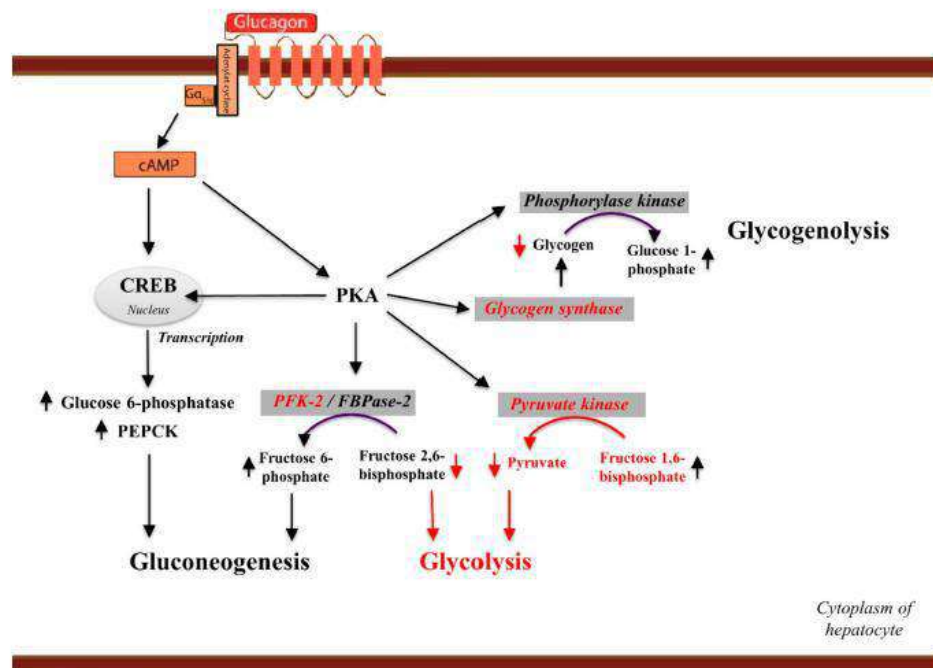


**Gambar 2.4.3.1** Regulasi transkripsi glukoneogenesis hati dalam kondisi makan dan puasa.<sup>47</sup>

Keterangan: (A) Aktivasi transkripsi glukoneogenesis hati selama puasa. Dalam keadaan puasa, glukagon memicu aktivasi PKA dan fosforilasi CREB pada serin 133, yang selanjutnya memicu penempelan nya dengan CBP/p300. PKA juga memicu defosforilasi CRTC2 pada serin 171, melalui inaktivasi SIK kinase dan aktivasi SMEK4 / PP4c dan PP2B, menyebabkan translokasi inti dan meningkatkan pengikatan nya pada CREB. Hal ini memicu ekspresi PEPCK dan G6Pc, meningkatkan glukoneogenesis pada awal puasa. Pada saat yang sama, CREB / CRTC 2 meningkatkan ekspresi PGC -1 $\alpha$  dan ERR $\gamma$ , regulator transkripsi glukoneogenesis pada fase puasa lanjut. PRMT 1 juga terlibat sebagai regulator glukoneogenesis FOXO1. (B) Regulasi transkripsi glukoneogenesis saat makan. Makan memicu penurunan kadar plasma glukagon dan meningkatkan sekresi insulin. Insulin mengaktivasi Akt, yang kemudian memicu aktivasi SIK kinase, memicu fosforilasi CRTC2. Akt juga memfosforilasi FOXO1, menginaktivasi transkripsi gen glukoneogenesis hati. Sebagai penekan transkripsi antara lain SHP, DAX-1, TCF7L2, yang turut menginaktifkan gen glukoneogenik seperti PGC -1 $\alpha$

Aktivasi PKA juga menyebabkan beberapa peristiwa intraseluler lainnya, antara lain fosforilasi protein fosfo-fruktokinase 2 (PFK-2) dan *fructose 2,6-bisphosphatase* (FBPase2). Akibatnya, PFK-2 dihambat sementara FBPase2 teraktivasi. Hal ini menyebabkan peningkatan 6-fosfat fruktosa dan memicu glukoneogenesis. Selanjutnya,

penurunan kadar *fructose 2,6-bisphosphatase* menurunkan aktivitas glikolisis.<sup>59</sup> Berikutnya, PKA mengaktifasi piruvat kinase; meningkatkan kadar fruktosa 1,6 bifosfat, dengan menurunkan kadar piruvat. Hal ini pun menekan laju glikolisis. Terakhir, PKA mengaktifasi fosforilase kinase, meningkatkan konversi glikogen menjadi glukosa 1-fosfat, menghambat glikogen sintase / menghambat glikogenesis. Selama puasa jangka pendek (kurang dari 12 jam), kebutuhan glukosa dipenuhi melalui glikogenolisis, tetapi jika simpanan glikogen menipis, kebutuhan glukosa bergantung glukoneogenesis. Glukoneogenesis memerlukan waktu lebih panjang dibandingkan glikogenolisis dan sangat bergantung pada kandungan glikogen dan ketersediaan substrat glukoneogenik dalam sirkulasi. Pada sebuah penelitian, dibandingkan respon pemberian glukagon eksogen pada pasien-pasien yang mendapat diet rendah karbohidrat (LCD) dengan pasien-pasien diabetes tipe 1 yang mendapatkan diet karbohidrat tinggi (HCD) dan diobati dengan insulin; ditemukan pada pasien-pasien kelompok yang pertama, produksi glukosa menurun; hal ini diduga disebabkan penyimpanan glikogen yang berkurang. Disisi lain, pemberian glukagon akut setelah periode LCD meningkatkan kadar asam lemak bebas (FFA) dan keton dibandingkan pemberian glukagon setelah HCD. Hal ini mengindikasikan penggunaan lemak daripada karbohidrat; menyebabkan peningkatan oksidasi lemak dan ketogenesis. Hal ini juga mengindikasikan bahwa glukagon mengatur homeostasis glukosa terutama melalui glikogenolisis daripada glukoneogenesis.<sup>59</sup> Glukagon juga berperan dalam terjadinya hiperglikemia pada diabetes, daripada disebabkan efek defisiensi insulin. Defisiensi insulin pada diabetes, mengganggu penggunaan glukosa perifer, peningkatan lipolisis dan pelepasan asam amino dari otot, tetapi hiperglikemia yang terjadi lebih disebabkan kadar glukagon yang tinggi.<sup>65</sup> Gambar 2.4.3.2 berikut menjelaskan peran glukagon dalam metabolisme glukosa dalam tubuh



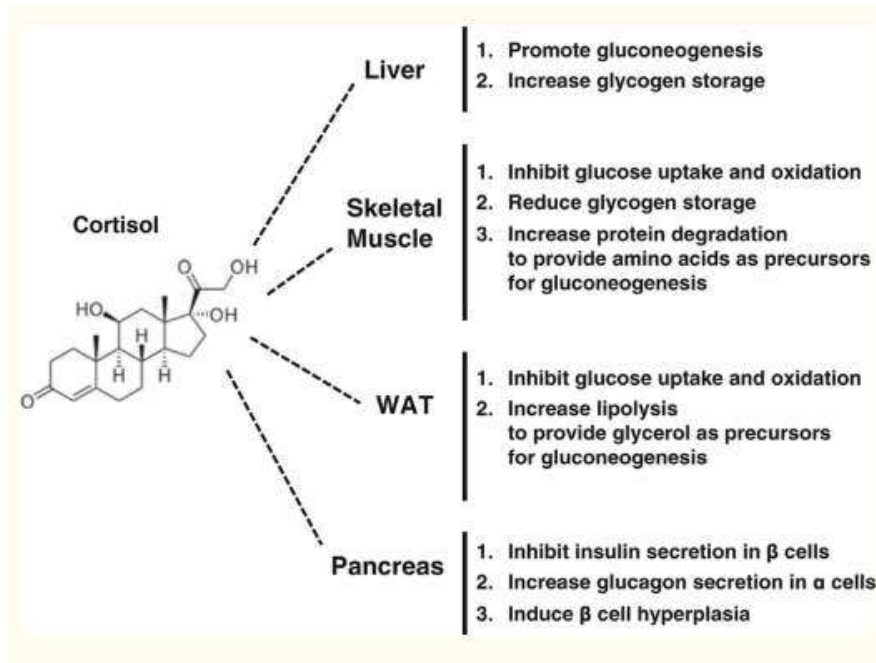
**Gambar 2.4.3.2** Efek glukagon terhadap produksi glukosa hati<sup>59</sup>

## 2. Glukokortikoid

Glukokortikoid (GC) merupakan hormon stres yang turut berperan pada regulasi homeostasis glukosa mamalia. Dikatakan demikian, karena GC berperan penting dalam adaptasi metabolik pada kondisi stres, seperti puasa / kelaparan, untuk mempertahankan kadar glukosa plasma dan kebutuhan energi selama kondisi stres; khususnya untuk organ-organ yang kebutuhan energinya bergantung glukosa.<sup>14</sup> GC memicu glukoneogenesis hati; dalam hal ini GC juga membantu dalam ketersediaan substrat untuk glukoneogenesis, misalnya dengan memicu degradasi protein otot rangka dan lipolisis jaringan adiposa putih (WAT). GC membantu aktivasi transkripsi gen glukoneogenik, seperti PC, PCK1, FBP1, PFKFB1, G6PC dan transporter G6P (SLC37A4), GC mengurangi penggunaan glukosa dalam otot rangka dan jaringan adiposa putih (WAT), berlawanan dengan efek insulin.<sup>16</sup> Dalam hal mengurangi penggunaan glukosa, GC menekan proses oksidasi nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH) untuk membentuk  $\text{NAD}^+$  (karena untuk menimbulkan glikolisis diperlukan oksidasi NADH). Paparan GC terus menerus menyebabkan hiperglikemia dan resistensi insulin. Simpanan glikogen hati ditingkatkan oleh GC, sedangkan di otot rangka, GC bersifat permisif terhadap glikogenolisis oleh katekolamin atau menghambat sintesis glikogen. GC juga

meningkatkan kadar glukagon plasma, dan terhadap pulau pankreas, GC menginduksi hiperplasia pulau pankreas.<sup>61</sup>

Gambar 2.4.3.3 berikut menggambarkan peran glukokortikoid dalam homeostasis glukosa.



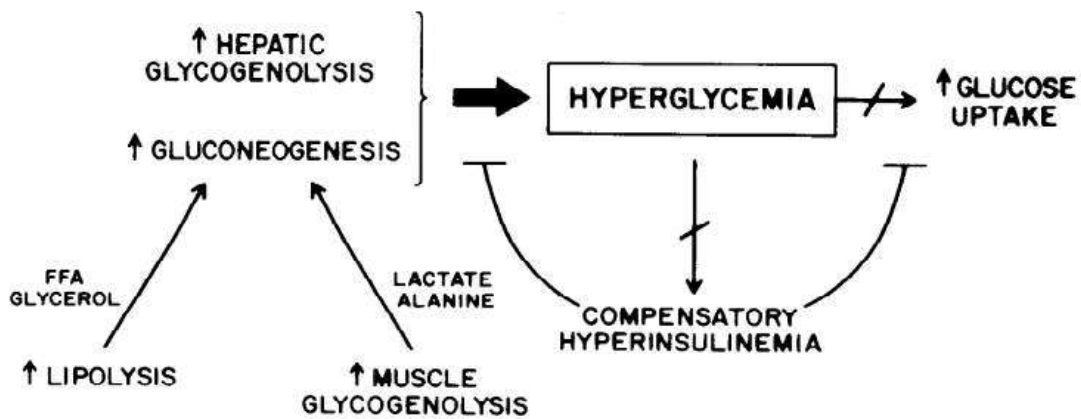
**Gambar 2.4.3.3** Peran glukokortikoid dalam homeostasis glukosa<sup>61</sup>

### 3. Epinefrin

Epinefrin berperan dalam metabolisme glukosa tubuh. Epinefrin merangsang glikogenolisis dan glukoneogenesis pada keadaan *post-absorptive*. Peran epinefrin dalam glikogenolisis diperlihatkan pada gambar 2.6.4.1a. Dalam proses glikogenolisis, efek epinefrin begitu singkat, dan hal ini tidak disebabkan karena kekurangan glikogen. Namun, perubahan kadar glukosa akibat glikogenolisis, dipengaruhi fluktuasi epinefrin. Tanpa fluktuasi ini ( kadar epinefrin tetap), proses glikogenolisis menurun. Dalam glukoneogenesis, epinefrin, seperti halnya glukagon, juga memicu fosforilasi PKA, inhibisi piruvat kinase dan fosforilasi enzim *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 (PFK2/FBPase 2)*; yang meningkatkan aktivitas fosfatase, memampukannya untuk menurunkan produksi *fructose-2,6-bisphosphate*, inhibitor enzim *fructose-2,6-bisphosphatase 1 (FBPase-1)*. PFK2/FBPase-2 yang terfosforilasi memfasilitasi translokasi inti dan inaktivasi *glucokinase (GCK)*<sup>47</sup>; juga merangsang asprosin (suatu peptida hormon dari jaringan adiposa yang mengaktifkan sinyal cAMP-



PKA hati) pada produksi glukosa hati (HGP). Epinefrin juga merangsang *cAMP-PKA-dependent activation* dari CREB-CBP-kompleks CRTC2. Saat puasa, CRTC2 mengalami defosforilasi dan berada dalam inti. Selanjutnya hal ini menyebabkan inhibisi *serine/threonine kinase* SIK2 (yang seharusnya memfosforilasi CRTC2, dan fosforilasi *inositol-1,4,5-trisphosphate receptors* (IP<sub>3</sub>R), yang menyebabkan peningkatan kadar Ca<sup>2+</sup> intrasel, dan aktivasi fosfatase CRTC2, kalsineurin. FOXO1 dan CRTC2, melalui CREB, memicu ekspresi PGC1 $\alpha$ . FOXO1 dan PGC1 $\alpha$  merangsang transkripsi G6Pc dalam durasi yang panjang.<sup>47</sup> Melihat peran epinefrin, baik dalam glikogenolisis maupun glukoneogenesis, epinefrin menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah. Selain itu, epinefrin juga menghambat penggunaan glukosa di jaringan perifer. Epinefrin disekresikan pada kondisi stres. Pada percobaan untuk melihat efek epinefrin pada hewan coba, diketahui bahwa epinefrin meningkatkan produksi glukosa hati secara signifikan, namun hanya sebentar, kemudian mengalami penurunan, meskipun epinefrin masih terus diberikan. Disisi lain, ambilan glukosa perifer tidak berubah secara signifikan. Hal penting lain yang perlu diketahui adalah, epinefrin dapat bekerja langsung pada hati. Dalam jumlah yang sedikit, epinefrin mampu merangsang produksi glukosa hati, tanpa memengaruhi kadar glukagon sistemik. Dan ketika glukagon dihambat oleh somatostatin, produksi glukosa oleh epinefrin tidak terhambat. Demikian pula, efek epinefrin terhadap hati tidak dapat dianggap sebagai akibat defisiensi insulin. Terhadap glukoneogenesis, epinefrin meningkatkan, baik mobilisasi substrat pembentuk glukosa dari perifer, maupun proses pengubahannya menjadi glukosa dalam hati. Ketika kadar glukosa meningkat, epinefrin menghambat sekresi sel  $\beta$  sebagai respon kompensasi terhadap hiperglikemia. Epinefrin juga mampu memperlambat efek insulin dalam menekan produksi glukosa.<sup>66</sup> Gambar 2.4.3.4 berikut memperlihatkan pengaruh epinefrin terhadap metabolisme glukosa tubuh.



**Gambar 2.4.3.4** Pengaruh epinefrin terhadap metabolisme glukosa tubuh<sup>60</sup>

Dalam hubungannya dengan hormon-hormon stres lainnya, seperti glukagon dan kortisol, efek produksi glukosa hati meningkat, jika hormon-hormon tersebut diberikan dalam bentuk kombinasi. Dengan demikian kadar glukosa plasma juga meningkat; misalnya pada pemberian kombinasi epinefrin dan glukagon atau epinefrin dan kortisol; kadar glukosa plasma meningkat sampai 50%-100%. Pada pemberian kombinasi ketiga hormon tersebut, kadar plasma glukosa meningkat 200%-400%, dibandingkan pemberian tunggal atau kombinasi ganda hormon-hormon tersebut. Fenomena sinergisme hormonal ini menjelaskan terjadinya gambaran diabetes dalam jangka pendek pada individu nondiabetes selama kondisi stres, misalnya saat sakit berat. Pada kondisi diabetes, epinefrin meningkatkan kadar glukosa plasma dan nilai dasar glukosa darah dari sebelum pemberian epinefrin; berbeda dengan efek glukagon pada subyek dengan diabetes. Dan hal ini / hiper-responsivitas epinefrin ini tidak mudah dinormalkan kembali dengan pemberian insulin.<sup>60</sup>

#### 4. *Growth Hormone* (GH)

Pengaruh *Growth Hormone* (GH) terhadap metabolisme glukosa adalah memicu glukoneogenesis dan glikogenolisis di hati dan ginjal. Penderita akromegali dan pajanan terhadap GH dosis tinggi memperlihatkan aktivitas glukoneogenesis di hati dan ginjal. Dalam peristiwa glukoneogenesis, GH meningkatkan ekspresi mRNA dari 2 gen glukoneogenik utama, PEPCCK dan G6Pc. GH meningkatkan glikogenolisis subyek dewasa sehat, sebaliknya, bedah otak bagian hipofisis pada pasien akromegali, menurunkan glikogenolisis. Namun demikian, pada uji hewan, peningkatan glikogenolisis juga diikuti oleh pembentukan glikogen. GH bekerja dengan menghambat penyerapan glukosa dalam jaringan lemak. Dalam suatu penelitian hewan, nampak GH

menekan jumlah transporter glukosa 1 dan 4 (GLUT1) / GLUT4 pada membran adiposit. Mekanismenya adalah, melalui aktivasi GH terhadap subunit p85, yang menjadi regulator negatif jalur *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K); dan dengan demikian, translokasi GLUT 4 ke membran plasma adiposit terganggu.

Selain hambatan *uptake* glukosa pada sel lemak, GH juga mengaktifasi lipase pada jaringan adiposa visceral, menyebabkan fluks asam lemak bebas (FFA) ke dalam sirkulasi. Fluks FFA menginduksi inflamasi yang menghambat kerja *insulin receptor substrat-1* (IRS-1) menyebabkan resistensi insulin. Peningkatan fluks FFA meningkatkan serapan FFA oleh hepatosit meningkatkan oksidasi lipid hati dan akumulasi *acetyl coenzim A* (*Acetyl-coA*). *Acetyl-CoA* merangsang kerja enzim-enzim glukoneogenesis, yaitu piruvat karboksilase dan fosfoenolpiruvat karboksinase, dan perubahan glukosa 6 fosfat menjadi glukosa. Pada otot rangka, GH memicu penyerapan FFA dalam otot rangka melalui peningkatan aktivitas lipoprotein lipase. Re-esterifikasi trigliserida dari FFA menghasilkan akumulasi lipid intermediet seperti *diacylglycerol* (DAG) dan seramid pada otot rangka. Baik *diacylglycerol* (DAG) maupun seramid dapat mengganggu jalur pensinyalan insulin. *Protein Kinase C Theta* diaktifkan oleh *diacylglycerol* (DAG), menghambat IRS-1 melalui fosforilasi serin; sedangkan seramid menghambat Akt / protein kinase B. Produksi *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) dan pertumbuhan somatik oleh GH dimediasi melalui *Janus kinase 2* (JAK2) / transduser sinyal dan aktivator transkripsi 5 (STAT5). Aktivasi STAT5 meningkatkan ekspresi SOCS, mengganggu JAK2 / STAT5, menurunkan aksi GH. Ekspresi berlebih protein SOCS menginduksi resistensi insulin, melalui hambatan fosforilasi IRS-1 oleh insulin atau melalui degradasi IRS-1. Kelebihan GH diikuti oleh peningkatan kadar IGF-1. Karena reseptor IGF-1 dan insulin memiliki kemiripan dalam struktur dan fungsi biologis. Ikatan IGF-1 dengan reseptornya memicu autofosforilasi domain kinase intraseluler dan aktivasi kaskade pensinyalan hilir, yang terlibat dalam transkripsi gen-gen yang terlibat dalam metabolisme substrat, pertumbuhan sel dan diferensiasi. Baik reseptor insulin maupun reseptor IGF-1 dapat saling bertukar peran satu sama lain, pada kondisi yang diperlukan.<sup>67</sup>

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental tahap 2 menggunakan jaringan biologis tersimpan. (Jaringan biologis tersimpan berupa jaringan hati tikus Spraque-Dawley yang didapatkan dari penelitian tahap 1 berjudul “Dampak Restriksi Vitamin B12 Terhadap Kadar Homosistein, HOMA-IR, dan Gambaran Histopatologi Perlemakan Hati Non-Alkoholik Pada Tikus”, tahun 2018)<sup>10</sup>

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada Juli 2019 sampai dengan Februari 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Gigi UI (FKG-UI), untuk pemeriksaan defosforilasi FOXO1 jaringan hati tikus dengan metode *Western Blot*, dan pemeriksaan ekspresi gen glukoneogenik G6Pc, jaringan hati tikus dengan teknik *Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.

### **3.3 Subjek Penelitian**

Penelitian tahap 2 ini menggunakan sampel jaringan hati tikus Spraque-Dawley jantan berumur 36-40 minggu, yang berasal dari penelitian tahap 1 berjudul “Dampak Restriksi Vitamin B12 Terhadap Kadar Homosistein, HOMA-IR, dan Gambaran Histopatologi Perlemakan Hati Non-Alkoholik Pada Tikus”<sup>10</sup>. Penelitian tersebut diketuai dr. Imelda R. Sianipar dan juga merupakan bagian dari penelitian tesis mahasiswa PMIB FKUI, yang telah diujikan di FKUI Jakarta, pada tanggal 10 Juli 2018.

#### **3.3.1 Penetapan Jumlah Hewan Coba**

Jumlah total sampel yang digunakan adalah 24 ekor (terdiri atas 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus), berasal dari perhitungan dengan menggunakan rumus Federer :

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

, dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok perlakuan sama dengan 4, sedangkan  $n$  merupakan jumlah tikus tiap kelompok. Jumlah sampel tersebut (24 ekor), adalah adekuat berdasarkan rumus *Resource Equation Method*:

$$E = \text{total jumlah hewan coba} - \text{total jumlah kelompok}$$

Dengan interpretasi:

- $E < 10$  → Sampel kurang  
 $E = 10-20$  → Sampel adekuat  
 $E > 20$  → Sampel lebih dari cukup

### 3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Pada penelitian ini, terdapat 2 variabel, yakni variabel bebas dan variabel terikat, sebagai berikut:

Tabel 3.1 Variabel penelitian dan definisi operasionalnya

Variabel	Nama variabel	Definisi	Cara pengukuran	Satuan
Terikat	Gen G6Pc	Gen protein yang terlibat dalam tahap akhir glukoneogenesis hati, berfungsi memecah glukosa 6 fosfat menjadi glukosa bebas dan fosfat inorganik	<i>real-time</i> PCR/ ekspresi relatif	-
Terikat	Protein FOXO1	Faktor transkripsi glukoneogenesis dan lipogenesis di bawah kontrol insulin	Western Blot- dengan teknik analisis imunofluoresensi, mengukur rerata normalized signal	/pixels

### 3.5 Prosedur penelitian

#### 3.5.1 Pemeriksaan ekspresi gen G6P dengan metode RT-PCR (metode 3 steps)

##### 3.5.1.1 Tahap pembuatan homogenat

RNA total dari jaringan hati tikus kelompok kontrol, perlakuan 4, 8 dan 12 minggu. diisolasi dan diekstraksi menggunakan Quick-RNA<sup>TM</sup> Miniprep Plus, Zymo Research.

Tahapan pembuatan homogenat sebagai berikut:

1. Memberi label pada tabung-tabung Eppendorf yang akan digunakan
2. Memasukkan jaringan sampel yang akan diuji pada tabung-tabung yang sudah diberi label
3. Menambahkan DNA/RNA shield, pada tiap tabung berisi sampel, kemudian membuat homogenat, dengan menghaluskan secara mekanik
4. Menambahkan PK digestion buffer dan proteinase K pada masing-masing tabung berisi homogenat sampel, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit, agar jaringan terlarut dengan baik
5. Melakukan sentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 G, untuk memisahkan pelet dari supernatannya.
6. Memindahkan supernatan tiap sampel ke dalam tabung-tabung Eppendorf baru yang sudah diberikan label, kemudian ditambahkan RNA lisis buffer sebanyak 1:1

##### 3.5.1.2 Tahap isolasi RNA

Tahapan isolasi RNA dilakukan dengan mengikuti prosedur sebagai berikut:

1. Memberi label pada *collecting tube* yang akan digunakan, dan masing-masing *collecting tube* dipasangkan dengan spin-away Filter (*yellow*)
2. Menuang homogenat tiap sampel ke dalam *collecting tube-spin away filter*
3. Melakukan sentrifugasi pada 12.000G selama 30 detik. Supernatan disimpan
4. Pada masing-masing *collecting tube* berisi supernatan, ditambahkan etanol 100% dengan perbandingan 1:1
5. Hasil campuran supernatan dan etanol 100% pada nomor 4, ditransfer ke *collecting tube* baru yang sudah diberi label dan dipasangi *Zymo Spin III CG column*.
6. Melakukan sentrifugasi 12.000G selama 30 detik. Supernatan dibuang.

7. Ke dalam tiap-tiap Zymo-Spin III CG column-collecting tube, ditambahkan RNA wash buffer, kemudian disentrifugasi kembali pada 12.000 G selama 30 detik. Supernatan dibuang
8. Campuran DNase I dan DNA *digestion* buffer, dimasukkan ke dalam tiap-tiap Zymo-Spin III CG column-collecting tube sebelumnya.
9. Melakukan inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit.
10. Memasukkan RNA prep buffer ke dalam tiap-tiap Zymo-Spin III CG column-collecting tube sebelumnya, kemudian disentrifugasi 12.000 G selama 30 detik. Supernatan dibuang.
11. Memasukkan kembali RNA wash buffer ke dalam tiap-tiap Zymo-Spin III CG column-collecting tube sebelumnya, kemudian disentrifugasi kembali pada 12.000 G selama 30 detik. Supernatan dibuang.
12. Memasukkan kembali RNA wash buffer dan disentrifugasi 12.000 G selama 2 menit.
13. Mentransfer Zymo-Spin III CG column ke set tabung Eppendorf steril, dan menambahkan DNase/RNase *free-water*, kemudian disentrifugasi kembali 12.000 G selama 30 detik.
14. Supernatan berisi RNA diperiksa konsentrasinya dengan *MicroDrop Varioskan Lux* dan kemudian disetarakan konsentrasinya menjadi 100 ng/ $\mu$ L dengan menambahkan DNase/RNase *free-water*.

### 3.5.1.3 Tahap sintesis cDNA

Setelah tahap isolasi RNA, dilanjutkan ke tahap sintesis cDNA dengan menggunakan ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA *remover*, Toyobo. Prosedur pengerjaan sebagai berikut:

1. Pada tabung PCR yang sudah diberikan label, disiapkan campuran berikut (dikerjakan di atas es).

4x DN Master Mix	2 $\mu$ l
RNA <i>template</i>	1 $\mu$ l
Nuclease <i>free water</i>	<u>5 <math>\mu</math>l</u>
Total	8 $\mu$ l

Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit.

2.	Hasil reaksi no.1 diatas	8 $\mu$ l
	5x RT <i>master mix</i> II	<u>2 <math>\mu</math>l</u>
	Total	10 $\mu$ l

Reaksi transkriptase terbalik dilakukan dengan mesin PCR konvensional, diatur sebagai berikut:

- Inkubasi pada 37°C selama 15 menit
- Dilanjutkan pada suhu 98°C selama 5 menit.

3. cDNA disimpan pada suhu -20°C, untuk kemudian diukur konsentrasinya dengan *MicroDrop Varioskan Lux* dan disetarakan konsentrasinya menjadi 100 ng/ $\mu$ l dengan penambahan DNase/RNase *free-water*, dan kemudian dilanjutkan ke tahap *real-time* PCR.

#### 3.5.1.4 Tahap pemeriksaan real-time RT-PCR

Real Time RT-PCR dikerjakan menggunakan *Applied Biosystem™ StepOne™ Real-Time PCR System*, dan *SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit, Biorline*. Gen  $\beta$ -Actin, digunakan sebagai kontrol internal. Primer  $\beta$ -actin: *forward* 5'- CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG - 3', *reverse* 5'- GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA -3'. Primer G6Pc: *forward* 5'- ACT CCC AGG ACT GGT TTG TC -3', *reverse* 5'- CCA GAT GGG AAA GAG GAC AT -3'.

Reaksi RT-PCR terdiri dari campuran 10  $\mu$ L *SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX*, 0,8  $\mu$ L *forward primer*, 0,8  $\mu$ L *reverse primer*, *cDNA template* 200 ng /  $\mu$ L, *nuclease free-water* 6,4  $\mu$ L. Protokol yang digunakan: aktivasi *polymerase* pada suhu 95°C selama 2 menit, dilanjutkan 40 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 5 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 10 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 20 detik. *Melting curve* diamati untuk melihat kemunculan *amplicon* tunggal. *Non-template control* (NTC) digunakan sebagai kontrol negatif. Data *real-time* RT-PCR dihitung berdasarkan metode Livak.

#### Rasio ekspresi:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{2^{\Delta C_t \text{ target (calibrator-test)}}}{2^{\Delta C_t \text{ ref (calibrator-test)}}} \\
 &= 2^{-[(C_t \text{ target (tes)} - C_t \text{ target (calibrator)}) - (C_t \text{ ref (test)} - C_t \text{ ref (calibrator)})]} \\
 &= 2^{-\Delta \Delta C_t}
 \end{aligned}$$



Perhitungan dilakukan dengan membagi nilai ekspresi rata-rata dari sampel kelompok perlakuan dengan sampel kelompok kontrol. Hasilnya menunjukkan peningkatan atau penurunan ekspresi pada kelompok perlakuan. Data dianalisis dengan SPSS 24.

### **3.5.2 Pemeriksaan protein FOXO1 dengan metode *Western Blot***

#### **3.5.2.1 Pembuatan homogenat**

Sebelum dilakukan pemeriksaan FOXO1 dengan metode *Western Blot*, dilakukan pembuatan homogenat dari jaringan hati dan selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi protein sampel dengan menggunakan kurva standar. Proses pengerjaan tersebut sesuai dengan protokol sebagai berikut:

1. Memberi label pada tabung yang akan digunakan.
2. Menambahkan 10x *RIPA lysis buffer* pada masing-masing tabung sampel dan membuat homogenat sampel dengan cara sonikasi.
3. Memisahkan pelet dan supernatan dengan cara sentrifugasi, pada kecepatan 12.000 rpm, selama 20 menit, pada 4°C.
5. Memindahkan supernatan ke tabung baru yang sudah diberi label.
6. Membuat kurva standar dengan BSA.
7. Mengukur konsentrasi protein sampel berdasarkan kurva standar, dengan menggunakan *MicroDrop Varioskan Lux*.
8. Membuat *working protein* dengan menyetarakan konsentrasi sampel yang akan diuji (ditetapkan konsentrasi protein tiap sampel 5 mg/ml)

#### **3.5.2.5. Tahap elektroforesis**

Prosedur pengerjaan elektroforesis dilakukan dengan mengikuti protokol sebagai berikut:

1. Memberi label pada tabung yang akan digunakan
2. Menambahkan TruPAGE™ LDS *sample buffer* 2x
3. Memanaskan campuran sampel dan sampel buffer, kemudian diloading ke gel elektroforesis dan elektroforesis dijalankan

### **3.5.2.6 Tahap transfer**

1. Menggunakan membran PVDF, direndam dahulu dalam metanol
2. Membuat *sandwich* untuk transfer
3. Mengisi *chamber* transfer dengan transfer buffer
4. Melakukan transfer
5. Merendam membran hasil transfer dalam *blocking buffer*

### **3.5.2.7 Tahap deteksi**

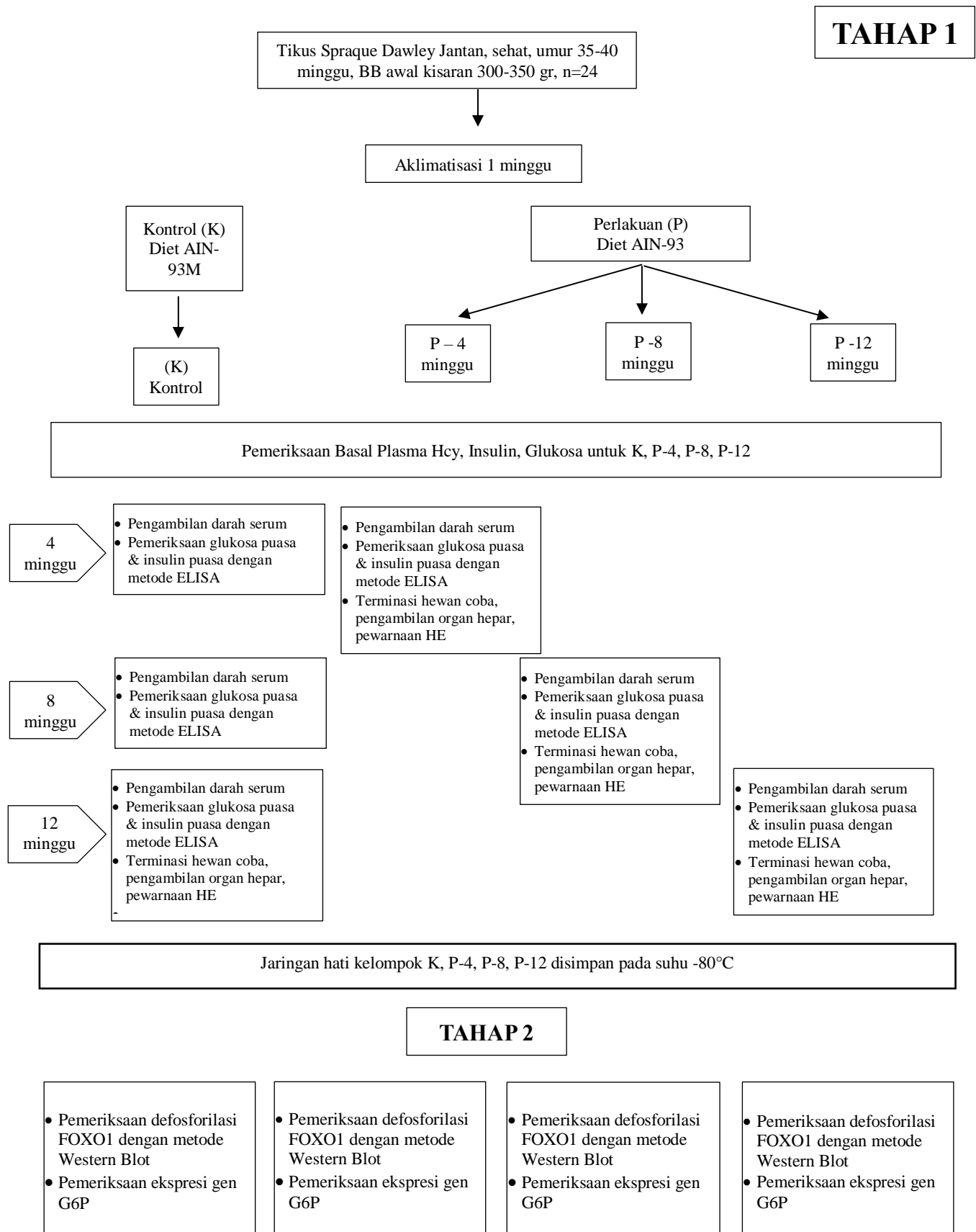
#### **3.5.2.7.1 Inkubasi antibodi primer**

1. Membuat pengenceran antibodi primer dengan dengan perbandingan 1:500 untuk antibodi anti FOXO1 dan 1:2.000 untuk antibodi anti GAPDH
2. Membran hasil transfer diinkubasi dalam larutan antibodi primer pada suhu kamar.
3. Membilas membran dengan dengan *orbital shaker*.

#### **3.5.2.7.2 Inkubasi antibodi sekunder**

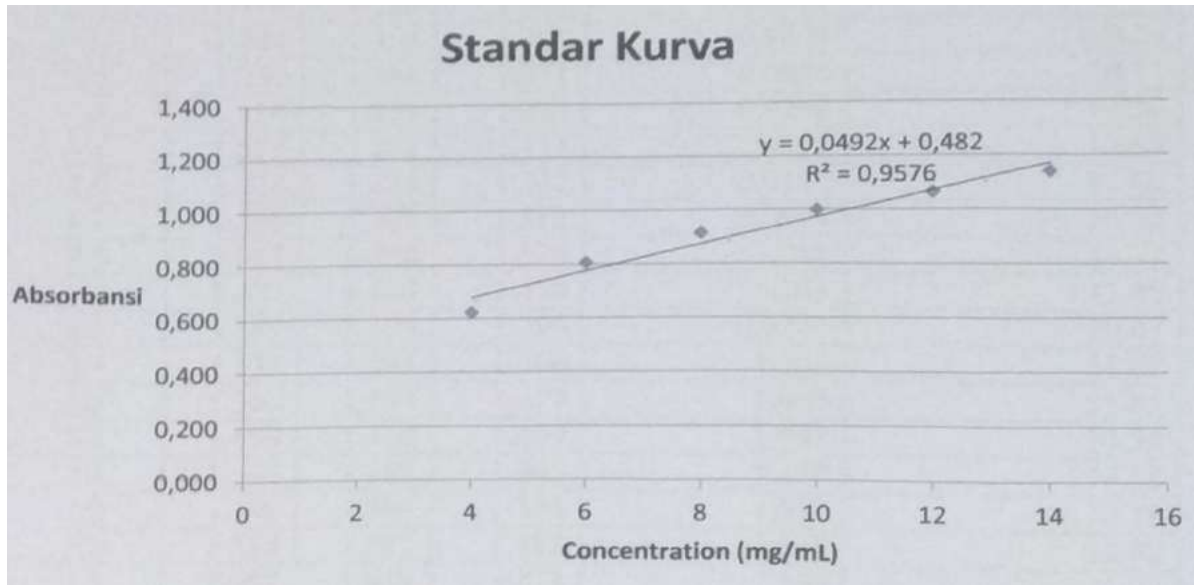
1. Mengencerkan antibodi sekunder dengan perbandingan 1:10.000
2. Membran diinkubasi pada suhu kamar.
3. Membilas membrane pada *orbital shaker*.
4. Membran dikeringkan kemudian dianalisis dengan mesin *reader Licor Oddysey*.

### 3.6 Diagram Alur Penelitian

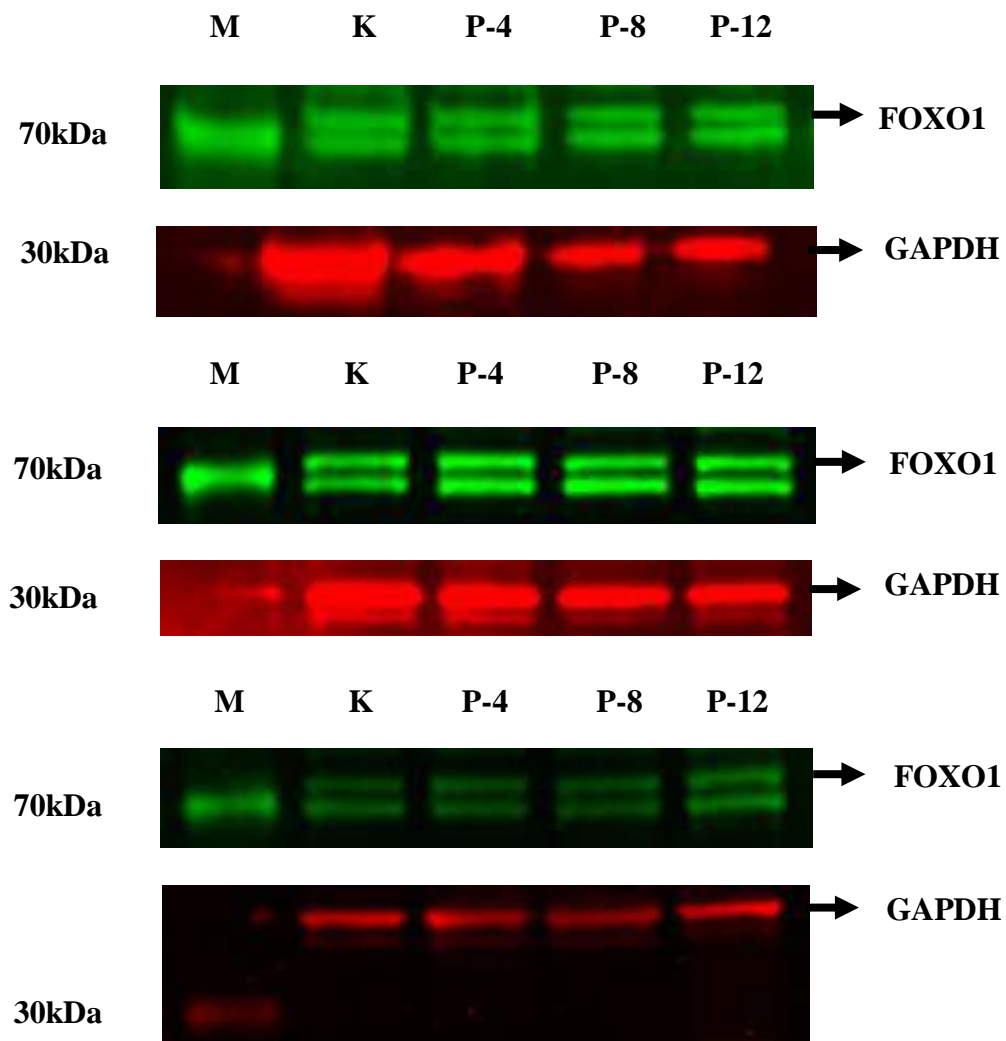


## BAB 4 HASIL PENELITIAN

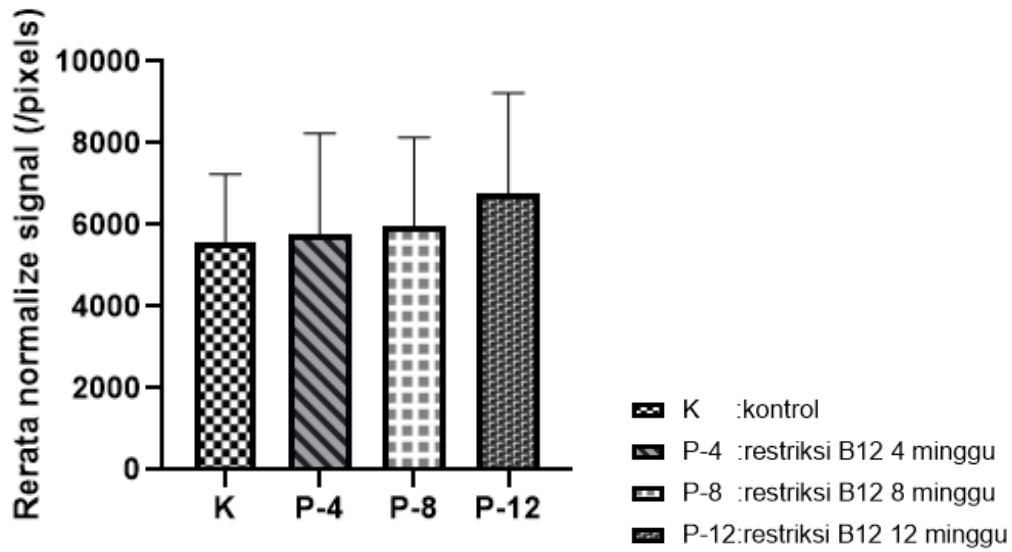
### 4.1 Ekspresi protein FOXO1 pada restriksi vitamin B12



Gambar 4.1.1 Kurva standar BSA



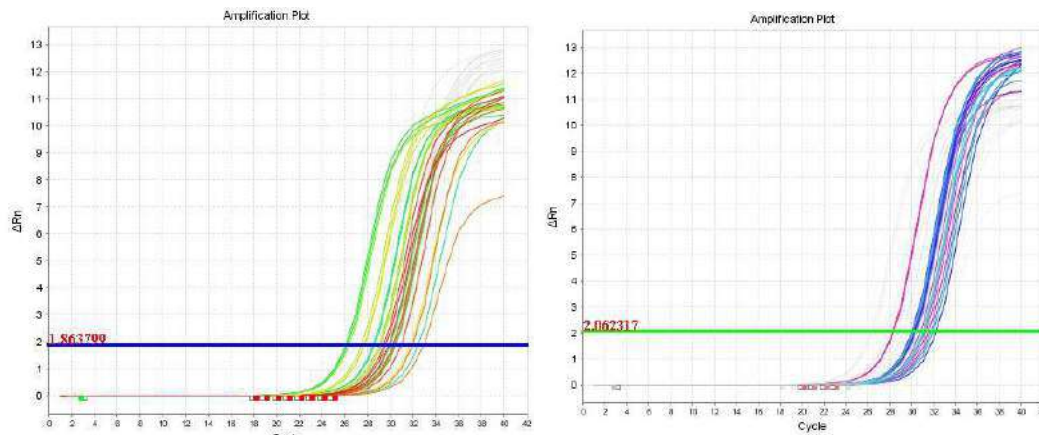
**Gambar 4.1.2** Ekspresi FOXO1 pada restriksi vitamin B12



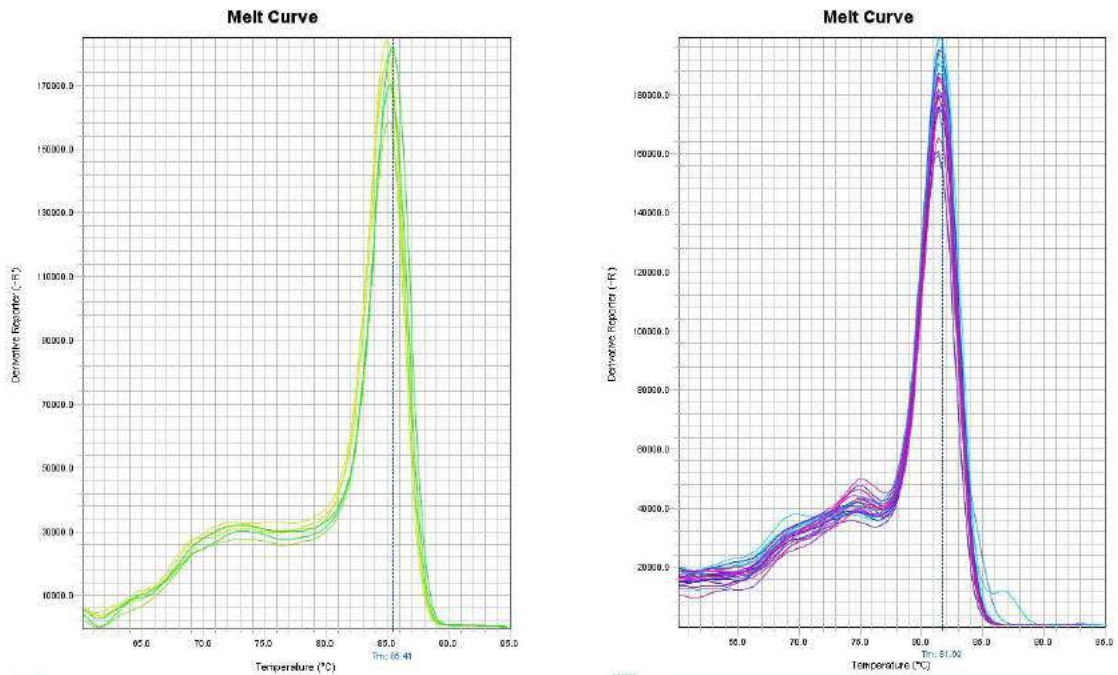
**Gambar 4.1.3.** Ekspresi FOXO1 pada restriksi vitamin B12

Uji *One Way-Anova* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok restriksi vitamin B12, 4, 8 dan 12 minggu terhadap kontrol.  $n=21$ ;  $p=0,982$  ( $p>0.05$ ).

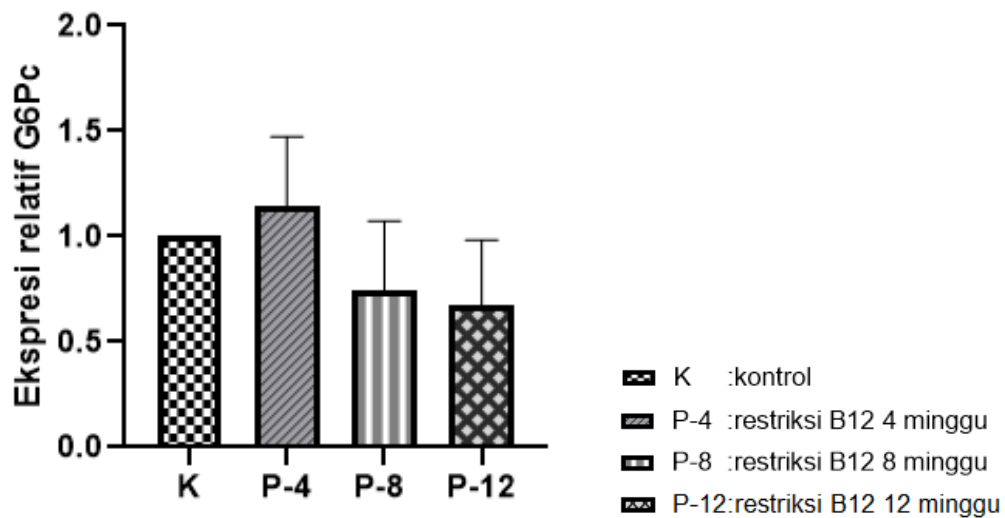
## 4.2 Ekspresi relatif G6c pada restriksi vitamin B12



**4.2.1** Kurva amplifikasi  $\beta$ -actin (kiri) dan G6Pc (kanan)



**Gambar 4.2.2** Melt curve  $\beta$ -actin (kiri) ( $T_m$ : 85.41°C) dan G6Pc (kanan) ( $T_m$ : 81,69°C)



**Gambar 4.2.3** Ekspresi relatif G6Pc pada restriksi vitamin B12

Uji *One Way-Anova* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok restriksi vitamin B12, 4, 8 dan 12 minggu terhadap kontrol.  $n=16$ ;  $p=0,622$  ( $p>0.05$ )

## BAB 5 PEMBAHASAN

Sebelum membahas lebih lanjut tentang hasil penelitian ini; dikarenakan penelitian ini, merupakan penelitian lanjutan dari penelitian Sianipar dkk berjudul “Dampak Restriksi Vitamin B12 Terhadap Kadar Homosistein, HOMA-IR, dan Gambaran Histopatologi Perlemakan Hati Non-Alkoholik Pada Tikus”; dan dengan menggunakan sampel jaringan biologis tersimpan (jaringan hati tikus *Sprague Dawley*), yang sama yang digunakan dalam penelitian tersebut; maka pertama-tama saya merujuk data hasil penelitian Sianipar, dkk, untuk membuat kajian terhadap hasil-hasil yang diperoleh dalam penelitian ini. Pada hasil penelitian Sianipar dkk, didapatkan hasil: konsentrasi homosistein plasma, yang meningkat secara bermakna pada kelompok restriksi vitamin B12 dibandingkan kontrol. Kadar insulin plasma, menurun pada kelompok restriksi vitamin B12 dibandingkan kontrol. Kadar glukosa plasma, yang meningkat secara bermakna pada kelompok restriksi vitamin B12 dibandingkan kontrol. Dan yang terakhir adalah nilai HOMA-IR yang meningkat secara bermakna pada kelompok restriksi vitamin B12 dibandingkan kontrol.<sup>4</sup>

Pada pemeriksaan aktivitas FOXO1 tidak ditemukan perbedaan bermakna antara kelompok restriksi vitamin B12 terhadap kelompok kontrol. Ekspresi FOXO1 yang tidak meningkat, mungkin menandakan masih adanya pengaruh inhibisi insulin terhadap FOXO1. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa meskipun terjadi penurunan fungsi reseptor insulin dan regulasi insulin terhadap protein-protein *downstream* dari reseptor insulin (termasuk FOXO1), namun tidak menghilangkan kemampuan insulin dalam menekan produksi glukosa hati. Menurut Hatting, dkk, hal ini mungkin disebabkan insulin masih dapat meneruskan sinyalnya melalui jalur lain, seperti melalui reseptor *insulin growth factor* (IGF).<sup>68, 69</sup> Reseptor insulin dan reseptor IGF memiliki kemiripan, sebagai reseptor tirosin kinase; sehingga walaupun insulin maupun *insulin growth factor-1* (IGF-1) memiliki afinitas lebih tinggi terhadap reseptornya masing-masing, namun insulin masih dapat berikatan dengan reseptor IGF-1, demikian juga IGF-1 dengan reseptor insulin<sup>15</sup>, dan pada akhirnya dapat meneruskan efek metabolik keduanya (baik insulin maupun IGF-1). Titchenell dkk, juga mengemukakan pada ketiadaan FOXO1, sinyal insulin diteruskan melalui jaringan ekstra-hepatik untuk meregulasi produksi glukosa hati. Pada kondisi resistensi insulin, sinyal inhibisi insulin melalui Akt terhadap FOXO1 lemah atau tidak ada, sehingga meningkatkan aktivitas transkripsi



FOXO1 terhadap gen targetnya dalam proses glukoneogenesis (salah satunya adalah G6Pc). Namun, disisi lain, jika insulin masih dapat meneruskan efek inhibisinya melalui Akt terhadap FOXO1 (misalnya melalui reseptor IGF), maka hal ini dapat memodulasi / melemahkan aktivitas transkripsi FOXO1 melalui jalur reseptor insulin yang tidak terhambat, akibatnya aktivitas transkripsi FOXO1 (melalui jalur reseptor insulin) tetap ada namun mengalami penurunan. Hal inilah yang mungkin membuat gambaran grafik hasil ekspresi protein FOXO1 antara kelompok restriksi, 4, 8, dan 12 minggu, menjadi tidak jauh berbeda dengan kontrol.

Hasil pemeriksaan ekspresi G6Pc pada penelitian ini, sesuai dengan hasil ekspresi protein FOXO1, dimana keduanya menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok restriksi vitamin B12 terhadap kontrol. Hal ini sesuai dengan teori bahwa aktivitas protein FOXO1 memengaruhi ekspresi G6Pc.<sup>15</sup>

Pada kondisi normal, insulin menekan ekspresi G6Pc dengan memfosforilasi FOXO1, CRTC2, menghambat ekspresi PGC-1 $\alpha$  oleh CREB.<sup>47</sup> Namun, pada kondisi resistensi insulin, efek inhibisi insulin terhadap FOXO1 terganggu, sehingga ekspresi PEPCK dan G6Pc meningkat. Beberapa penelitian yang mendukung hal ini, antara lain; penelitian Valenti, dkk terhadap pasien-pasien steatohepatitis, pasien-pasien steatosis tanpa hepatitis, pasien-pasien dengan gambaran histologi hati normal dan tanpa kelainan metabolik, dan pasien-pasien yang mengidap hepatitis C kronis; menemukan bahwa ekspresi FOXO1, PEPCK dan G6Pc sebanding dengan indeks HOMA-IR; dan menunjukkan hasil yang lebih tinggi pada pasien-pasien dengan steatohepatitis dibandingkan pasien-pasien dengan steatosis atau pasien-pasien dengan gambaran hati normal. Kondisi inflamasi pada pasien-pasien steatohepatitis, menginduksi resistensi insulin. Resistensi insulin menyebabkan efek inhibisi insulin terhadap FOXO1 terganggu, memicu ekspresi gen-gen glukoneogenesis baik PEPCK maupun G6Pc.<sup>21</sup> Demikian juga penelitian Yu, dkk, yang menunjukkan bahwa hiperhomosisteinemia yang dipicu oleh diet tinggi metionin menyebabkan resistensi insulin, dan peningkatan ekspresi PEPCK.<sup>22</sup>

Namun, pemeriksaan ekspresi G6Pc pada penelitian ini menunjukkan hasil yang kontradiktif dengan hasil penelitian-penelitian tersebut, dimana ekspresi G6Pc tidak meningkat, padahal berdasarkan data penelitian sebelumnya oleh Sianipar, dkk, telah jelas terjadi resistensi insulin pada kelompok tikus dengan restriksi vitamin B12 (ditunjukkan dengan kadar glukosa plasma dan indeks HOMA-IR yang tinggi). Hal ini mengindikasikan bahwa hiperglikemia yang terjadi mungkin tidak berkaitan dengan peningkatan ekspresi G6Pc.

Lebih lanjut; oleh karena G6Pc merupakan enzim yang berperan pada tahap akhir glukoneogenesis hati, maka hiperglikemia yang terjadi mungkin bukan merupakan hasil glukoneogenesis hati. Berdasarkan studi kepustakaan, produksi glukosa hati berkontribusi atas  $\pm 90\%$  produksi glukosa tubuh, dan glukoneogenesis berkontribusi atas  $\pm 50\%$  produksi glukosa hati<sup>62</sup>; dengan kata lain glukoneogenesis berkontribusi atas sebagian besar produksi glukosa dalam tubuh. Jika hiperglikemia yang terjadi, bukan disebabkan oleh proses glukoneogenesis hati; maka beberapa kondisi lain yang dapat menyebabkan hiperglikemia perlu dipertimbangkan. Insulin dalam regulasi glukosa tubuh memengaruhi beberapa proses penting, antara lain meningkatkan utilisasi glukosa di jaringan, meningkatkan sintesis glikogen dan meningkatkan glukoneogenesis. Pada kondisi resistensi insulin, utilisasi glukosa menurun, glikogenolisis meningkat, demikian juga glukoneogenesis. Oleh karena ekspresi G6Pc tidak meningkat pada penelitian ini, maka hiperglikemia yang terjadi mungkin disebabkan oleh sebab lain, seperti gangguan utilisasi glukosa jaringan dan glikogenolisis. Namun, hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut. Penelitian Samuel, dkk terhadap pasien-pasien diabetes melitus tipe 2 juga memperlihatkan tidak adanya peningkatan ekspresi PEPCCK1 dan G6Pc, meskipun pada pasien-pasien ini jelas terjadi hiperglikemia; sehingga Samuel, dkk membuat kesimpulan bahwa ekspresi PEPCCK1 dan G6Pc tidak berhubungan dengan peningkatan glukoneogenesis pada pasien-pasien diabetes tipe 2.

Proses glukoneogenesis juga tidak hanya dipengaruhi insulin-FOXO1 saja; seperti telah dipaparkan di bagian tinjauan pustaka, banyak hormon-hormon diluar insulin yang memengaruhi glukoneogenesis seperti glukagon<sup>59</sup>, epinefrin<sup>60</sup>, kortisol<sup>61</sup>, dengan protein-protein koaktivator dan represor yang memengaruhi glukoneogenesis, seperti CREB, PGC-1 $\alpha$ , dll<sup>47, 48</sup>; sehingga untuk mendapatkan gambaran yang utuh dari proses glukoneogenesis, juga penting untuk mengkaji peran hormon-hormon selain insulin yang juga terlibat dalam glukoneogenesis.

Pada akhirnya, hal lain yang mungkin perlu dipertimbangkan, yang turut memengaruhi proses glukoneogenesis adalah ketersediaan substrat dalam proses glukoneogenesis.<sup>70</sup> Glukoneogenesis memerlukan substrat untuk membentuk glukosa, seperti laktat yang berasal dari konversi piruvat; sedangkan piruvat berasal dari hasil glikogenolisis otot rangka. Pada kondisi resistensi insulin, juga terjadi lipolisis. Lipolisis menghasilkan *nonesterified fatty acid* (NEFA) dan gliserol.<sup>70</sup> Menurut hasil penelitian Kalemba, dkk gliserol merupakan substrat penting, yang mendorong glukoneogenesis (penggunaannya mencapai 75%), dibandingkan

dengan piruvat / laktat, dan glutamin. Yang menarik dalam penelitian Kalembe, dkk; adalah temuan bahwa gliserol memicu ekspresi G6Pc, dan sebaliknya menekan ekspresi PEPCK. Sedangkan substrat lainnya tidak memengaruhi ekspresi kedua enzim tersebut.<sup>63</sup> Hasil temuan Kalembe ini memperlihatkan pengaruh substrat pada proses glukoneogenesis.

Data hasil ekspresi FOXO1 dan G6Pc juga memperlihatkan variasi antar hewan coba dalam 1 kelompok. Hal ini mungkin disebabkan oleh distribusi lesi yang tidak sama pada jaringan hati yang diambil ketika dilakukan pemeriksaan. Ratziu, dkk melakukan penelitian yang bertujuan mencari kemungkinan terjadinya perbedaan diagnosis dan penetapan derajat kerusakan hati pada pasien dengan *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH), mengungkapkan bahwa distribusi lesi akibat NASH pada hati tidak sama diseluruh jaringan hati, menimbulkan variabilitas sangat besar pada tiap bagian jaringan hati yang dilakukan biopsi.<sup>68, 71</sup> Hal ini mungkin juga dapat menyebabkan dan menjadi penjelasan mengapa terdapat perbedaan variasi ekspresi FOXO1 dan G6Pc antar sampel dalam 1 kelompok pada penelitian ini.

## **BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan tidak terdapat perbedaan aktivitas FOXO1 (FOXO1 terdefosforilasi), antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus dengan restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu; dan tidak terdapat perbedaan ekspresi gen G6Pc, antara kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus dengan perlakuan, yang mendapatkan diet restriksi vitamin B12 selama 4, 8, 12 minggu. Berdasarkan hasil penelitian ini, hiperglikemia yang terjadi (hasil dari penelitian Sianipar, dkk), bukan disebabkan oleh glukoneogenesis; pengaruh insulin terhadap utilisasi glukosa jaringan dan proses glikogenolisis perlu dipertimbangkan dalam menyebabkan hiperglikemia. Diduga insulin masih dapat menghambat aktivitas FOXO1 dan ekspresi G6Pc melalui jalur lain, seperti melalui reseptor lain yang memiliki kemiripan struktur dan fungsi dengan reseptor insulin. Ketersediaan substrat tertentu yang mendorong proses glukoneogenesis juga perlu dikaji lebih lanjut.

### **6.2 Saran**

Berdasarkan kesimpulan yang telah dipaparkan, beberapa hal yang disarankan untuk penelitian berikutnya, antara lain:

1. Perlu diteliti kembali pengaruh insulin terhadap proses glikogenolisis dan utilisasi glukosa perifer untuk memperjelas mekanisme terjadinya hiperglikemia.
2. Perlu diteliti kembali pengaruh insulin terhadap proses glukoneogenesis melalui jalur lainnya, misalnya melalui reseptor yang memiliki kemiripan struktur dan fungsi dengan reseptor insulin.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17040.
2. Ankar A, Kumar A. Vitamin B12 Deficiency (Cobalamin). *StatPearls* [Internet]. 2019.
3. Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol*. 2013;61(4):289-94.
4. Sianipar IR, Ujianti I, Yolanda S, Murthi AK, Amani P, Santoso DIS. Dampak restriksi vitamin B12 terhadap kadar homosistein, HOMA-IR, dan gambaran histopatologi perlemakan hati non-alkoholik pada tikus: Universitas Indonesia; 2018; 38-42.
5. Dubaj C, Czyż K, Furmaga-Jabłońska W. Vitamin B12 deficiency as a cause of severe neurological symptoms in breast fed infant – a case report. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020;46(1):40.
6. Kräutler B. Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. *Subcell Biochem*. 2012;56:323-46.
7. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, et al. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(10):1733.
8. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(1):75-81.
9. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J*. 2004;3:4.
10. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *The FASEB Journal*. 1999;13(15):2277-83.
11. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(5):567-75.
12. Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol*. 2001;27(1):85-91.
13. Li Y, Zhang H, Jiang C, Xu M, Pang Y, Feng J, et al. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(14):9583-92.
14. Sherwood L. *Fisiologi Manusia Dari Sel ke Sistem*. 8 ed: EGC; 2016. 841 p.
15. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
16. Hall JE. *Buku ajar fisiologi kedokteran Guyton dan Hall*. 12 ed: Elsevier; 2016. 4 p.
17. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:925350.
18. Peng S, Li W, Hou N, Huang N. A Review of FoxO1-Regulated Metabolic Diseases and Related Drug Discoveries. *Cells*. 2020;9(1):184.
19. Robert K. Murray DAB, Kathleen M. Botam, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil. *Biokimia Harper*. 29 ed. 29, editor. Jakarta: EGC; 2016. 922 p.
20. Hutton JC, O'Brien RM. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(43):29241-5.
21. Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, et al. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*. 2008;57(5):1355-62.

22. Yu X, Huang Y, Hu Q, Ma L. Hyperhomocysteinemia stimulates hepatic glucose output and PEPCK expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(12):1027-32.
23. Obeid R, Fedosov SN, Nexo E. Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(7):1364-72.
24. Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE, Randaccio L. Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalamin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4386-91.
25. Maron BA, Loscalzo J. The treatment of hyperhomocysteinemia. *Annu Rev Med*. 2009;60:39-54.
26. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217-46.
27. Ghosh S, Sinha JK, Putcha UK, Raghunath M. Severe but Not Moderate Vitamin B12 Deficiency Impairs Lipid Profile, Induces Adiposity, and Leads to Adverse Gestational Outcome in Female C57BL/6 Mice. *Front Nutr*. 2016;3:1.
28. Pietrzik K, Brönstrup A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatr*. 1998;157 Suppl 2:S135-8.
29. Jakubowski H. Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess. *The Journal of Nutrition*. 2006;136(6):1741S-9S.
30. Zang T, Pottenplackel LP, Handy DE, Loscalzo J, Dai S, Deth RC, et al. Comparison of Protein N-Homocysteinylation in Rat Plasma under Elevated Homocysteine Using a Specific Chemical Labeling Method. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(9):1195.
31. Mercié P, Garnier O, Lascoste L, Renard M, Closse C, Durrieu F, et al. Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2000;5:403-11.
32. Wilairat Leeanansaksiri PR, Chavaboon Dechsukhum, editor *Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells: The Promising Tools for Insulin-Producing Cell Generation*. 2016.
33. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA). 2000; 1-82.
34. Castiello FR, Heileman K, Tabrizian M. Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities. *Lab Chip*. 2016;16(3):409-31.
35. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*. 2003;300(5625):1574-7.
36. Meyts PD. *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. South Dartmouth (MA): MDTextcom, Inc. 2016; 1-55.
37. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014;220(2):T1-t23.
38. Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell death & disease*. 2015;6(12):e2037-e.
39. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S135-48.
40. Meikle WG, Corby-Harris V, Carroll MJ, Weiss M, Snyder LA, Meador CAD, et al. Exposure to sublethal concentrations of methoxyfenozide disrupts honey bee colony activity and thermoregulation. *PLoS One*. 2019;14(3):e0204635.
41. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013;7(1):14-24.
42. du Toit EF, Donner DG. Myocardial Insulin Resistance: An Overview of Its Causes, Effects, and Potential Therapy. *Insulin Resistance*. 2012; 189-211.
43. Gross DN, van den Heuvel AP, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene*. 2008;27(16):2320-36.

44. Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D. FoxOs function synergistically to promote glucose production. *J Biol Chem*. 2010;285(46):35245-8.
45. Zhang K, Li L, Qi Y, Zhu X, Gan B, DePinho RA, et al. Hepatic suppression of Foxo1 and Foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice. *Endocrinology*. 2012;153(2):631-46.
46. Cao J, Yu Y, Zhang Z, Chen X, Hu Z, Tong Q, et al. SCP4 Promotes Gluconeogenesis Through FoxO1/3a Dephosphorylation. *Diabetes*. 2018;67(1):46-57.
47. Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep*. 2013;46(12):567-74.
48. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
49. Choi D, Oh KJ, Han HS, Yoon YS, Jung CY, Kim ST, et al. Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. *Hepatology*. 2012;56(4):1546-56.
50. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):131-8.
51. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):179-83.
52. Langlet F, Haeusler RA, Linden D, Ericson E, Norris T, Johansson A, et al. Selective Inhibition of FOXO1 Activator/Repressor Balance Modulates Hepatic Glucose Handling. *Cell*. 2017;171(4):824-35.e18.
53. Tikhanovich I, Cox J, Weinman SA. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28 Suppl 1(0 1):125-31.
54. Marcolongo P, Fulceri R, Gamberucci A, Czeglé I, Banhegyi G, Benedetti A. Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(3):2608-18.
55. Beyzaei Z, Geramizadeh B. Molecular diagnosis of glycogen storage disease type I: a review. *EXCLI J*. 2019;18:30-46.
56. Zingone A, Hiraiwa H, Pan C, Lin B, Chen H, Ward J, et al. Correction of Glycogen Storage Disease Type 1a in a Mouse Model by Gene Therapy. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:828-32.
57. Roseman DS, Khan T, Rajas F, Jun LS, Asrani KH, Isaacs C, et al. G6PC mRNA Therapy Positively Regulates Fasting Blood Glucose and Decreases Liver Abnormalities in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease 1a. *Mol Ther*. 2018;26(3):814-21.
58. Sloop K, Showalter A, Cox A, Cao J, Siesky A, Zhang H, et al. Specific Reduction of Hepatic Glucose 6-Phosphate Transporter-1 Ameliorates Diabetes while Avoiding Complications of Glycogen Storage Disease. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:19113-21.
59. Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, et al. Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13):3314.
60. Sherwin RS, Sacca L. Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *Am J Physiol*. 1984;247(2 Pt 1):E157-65.
61. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:99-126.
62. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(10):572-87.
63. Kalembe KM, Wang Y, Xu H, Chiles E, McMillin SM, Kwon H, et al. Glycerol induces G6pc in primary mouse hepatocytes and is the preferred substrate for gluconeogenesis both in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2019;294(48):18017-28.
64. Melkonian EA, Asuka E, Schury MP. Physiology, Gluconeogenesis. *StatPearls*. Treasure Island (FL). 2020; 1-10.

65. Unger RH. Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy. *Metabolism*. 1978;27(11):1691-709.
66. Deibert DC, DeFronzo RA. Epinephrine-induced insulin resistance in man. *The Journal of clinical investigation*. 1980;65(3):717-21.
67. Kim S-H, Park M-J. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;22(3):145-52.
68. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1411(1):21-35.
69. Titchenell PM, Chu Q, Monks BR, Birnbaum MJ. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nature communications*. 2015;6:7078-.
70. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(1):177-97.
71. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1898-906



## Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik



**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

Gedung Fakultas Kedokteran UI  
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430  
PO.Box 1358  
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,  
3922977, 3927360, 3153236  
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288  
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id  
fk.ui.ac.id

Nomor : KET-1015/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2019

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**

---

*ETHICAL APPROVAL*

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**"Gangguan Pensinyalan FOXO1 Tikus dengan Resistensi Insulin dan Hiperhomosisteinemia pada Restriksi Vitamin B12".**  
No. Protokol: 19-09-1076

**Peneliti Utama** : dr. Imelda Rosalyn Sianipar, Ph.D., M.Biomed  
*Principal Investigator*

**Nama Institusi** : Fisiologi FKUI  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.  
*and approves the above mentioned protocol.*

Jakarta, 16 SEP 2019

Ketua  
Chair



**Prof. Dr. Nita Sita Sitorus, Ph.D., Sp.M(K)**



\* *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan  
\*\* Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
  - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
  - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subyek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai.
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPK FKUI-RSCM.

---

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.  
All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

## Lampiran 2. Bukti submit jurnal

### Submission Confirmation

---



Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences

**Manuscript ID**

MJMHS-2020-0759

**Title**

Expression of Foxo1 Protein and Glucose 6 Phosphatase Gene in Rat with Vitamin B12 Restriction Diet

**Authors**

Antoni, Marcel  
Andraini, Trinovita  
Santoso, Dewi  
Ujianti, Irena  
Sianipar, Imelda

**Date Submitted**

06-Aug-2020

## Lampiran 3. Hasil Western Blot

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
2	0000009_02	800	M1	B01	18006.07422	260	558	#NUM!	#NUM!
3	0000009_02	800	M1	B02	7034.449219	125	341	#NUM!	#NUM!
4	0000009_02	800	M1	B03	31923.11719	70	682	#NUM!	#NUM!
5	0000009_02	800	M1	B04	6878.535156	38	713	#NUM!	#NUM!
6	0000009_02	800	M1	B05	6570.671875	25	651	#NUM!	#NUM!
7	0000009_02	800	M1	B06	2843.214844	8	527	#NUM!	#NUM!
8	0000009_02	800	K1	B01	3574.84375	74.4157618	272	3574.84375	1
9	0000009_02	800	11	B01	2914.554688	74.4157618	333	5454.644978	0.534325277
10	0000009_02	800	21	B01	885.0078125	78.3060739	304	1636.626872	0.540751119
11	0000009_02	800	31	B01	2658.949219	79.3330936	297	4699.551206	0.565787902
12	0000009_02	800	K2	B01	1111.023438	80.383153	165	11891.9347	0.093426635
13	0000009_02	800	12	B01	427.8574219	83.6784425	315	2341.617898	0.182718719
14	0000009_02	800	22	B01	656.3710938	84.8276707	280	2642.536055	0.248386807
15	0000009_02	800	32	B01	720.140625	84.8276707	252	3437.98226	0.209466068
16									

1	Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
2	0000012_01	800	M1	B01	15959.207	260	576	#NUM!	#NUM!
3	0000012_01	800	M1	B02	4380.164063	125	416	#NUM!	#NUM!
4	0000012_01	800	M1	B03	25495.53906	70	576	#NUM!	#NUM!
5	0000012_01	800	M1	B04	4443.511719	38	576	#NUM!	#NUM!
6	0000012_01	800	M1	B05	5884.375	25	768	#NUM!	#NUM!
7	0000012_01	800	M1	B06	2606.359375	8	576	#NUM!	#NUM!
8	0000012_01	800	K2	B01	843.484375	72.6914381	272	#NUM!	#NUM!
9	0000012_01	800	12	B01	1353.386719	72.6914381	272	1804.392091	0.750051347
10	0000012_01	800	22	B01	1816.128906	74.5886439	297	1816.128906	1
11	0000012_01	800	32	B01	1248.625	74.5886439	297	1823.989327	0.684557186
12	0000012_01	800	K3	B01	585.8085938	78.6491463	238	707.2549758	0.828284867
13	0000012_01	800	13	B01	16.58984375	78.6491463	297	33.15873014	0.500316016
14	0000012_01	800	23	B01	397.484375	79.7230592	272	781.5822481	0.508563719
15	0000012_01	800	33	B01	828.8710938	78.6491463	264	1838.437668	0.45085624
16									

1	Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
2	0000007_01	800	M1	B01	2674.289063	260	348	#NUM!	#NUM!
3	0000007_01	800	M1	B02	301.8554688	125	464	#NUM!	#NUM!
4	0000007_01	800	M1	B03	222.0546875	70	290	#NUM!	#NUM!
5	0000007_01	800	M1	B04	12432.28906	38	464	#NUM!	#NUM!
6	0000007_01	800	M1	B05	3470.105469	25	464	#NUM!	#NUM!
7	0000007_01	800	M1	B06	5324	8	522	#NUM!	#NUM!
8	0000007_01	800	K3	B03	1743.949219	41.818616	217	5976.947874	0.291779225
9	0000007_01	800	13	B03	2801.132813	43.141892	256	5355.090922	0.523078479
10	0000007_01	800	23	B03	3315.664063	43.141892	264	12666.64191	0.261763464
11	0000007_01	800	33	B03	3255.515625	43.141892	288	14782.17278	0.220232551
12	0000007_01	800	K4	B03	8654.65625	43.141892	280	8654.65625	1
13	0000007_01	800	14	B03	7666.710938	43.141892	256	8501.965106	0.901757516
14	0000007_01	800	24	B03	6126.015625	41.818616	217	9916.619687	0.617752401
15	0000007_01	800	34	B03	5204.140625	41.818616	196	13734.66124	0.378905641
16									

1	Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
2	0000011_01	800	M1	B01	10237.80859	260	464	#NUM!	#NUM!
3	0000011_01	800	M1	B02	958.5195313	125	348	#NUM!	#NUM!
4	0000011_01	800	M1	B03	260.1367188	70	290	#NUM!	#NUM!
5	0000011_01	800	M1	B04	24692.73828	38	464	#NUM!	#NUM!
6	0000011_01	800	M1	B05	4266.523438	25	464	#NUM!	#NUM!
7	0000011_01	800	M1	B06	7646.671875	8	290	#NUM!	#NUM!
8	0000011_01	800	K1	B01	4695.558594	41.5444008	280	4695.558594	1
9	0000011_01	800	11	B01	2218.683594	44.0948992	256	4341.869023	0.510997357
10	0000011_01	800	21	B01	2408.824219	45.5616268	306	5475.008694	0.439967195
11	0000011_01	800	31	B01	4010.386719	45.5616268	280	5830.152174	0.68786999
12	0000011_01	800	K6	B01	1040.136719	50.6934853	252	5068.313493	0.205223438
13	0000011_01	800	16	B01	2198.140625	52.630954	256	11353.80552	0.193603864
14	0000011_01	800	26	B01	2309.523438	56.7942875	231	6128.746068	0.376834578
15	0000011_01	800	36	B01	1278.796875	61.2408157	272	4464.556019	0.286433157
16									



Sample No	Target No	Task	Reporter	QueueId	RQ Min	RQ Max	O_Range	O_Min	O_Max	O_SD	IO	IO_Min	IO_Max	IO_SE	HK_Cover	HK_Conv	AutoMet	O_Tresh	AutoMet	Baseline	Baseline	Efficiency	Tm1	Tm2	Tm3	Comment	HPFNQ	HIGHSD	OUTLIERNG
40 A1	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	85.8829				N	N	N
40 A2	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	20	1	84.9724				N	N	N
11 A3	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	85.1259				N	N	N
11 A4	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	85.2706				N	N	N
13 A5	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	14	1	85.1259				N	N	N
14 A6	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	85.1259				N	N	N
15 A7	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	16	1	85.41954				N	N	N
16 A8	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	20	1	84.82364				N	N	N
17 B1	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	17	1	85.58391				N	N	N
18 B2	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	85.1259				N	N	N
19 B3	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	85.1259				N	N	N
20 B4	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.67466				N	N	N
21 B5	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.67466				N	N	N
22 B7	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.9724				N	N	N
24 B8	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	84.9724				N	N	N
26 C1	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	85.41954				N	N	N
26 C2	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.9724				N	N	N
27 C3	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.9724				N	N	N
28 C4	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	19	1	84.9724				N	N	N
29 C5	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	18	1	84.9724				N	N	N
30 C6	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	17	1	84.9724				N	N	N
31 C7	K5	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	17	1	84.9724				N	N	N
32 C8	K5	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	25	1	84.9724				N	N	N
33 D1	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	23	1	81.24821				N	N	N
34 D2	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	24	1	81.24821				N	N	N
35 D3	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	31	1	81.09824				N	N	N
36 D4	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	31	1	81.09824				N	N	N
37 D5	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.24821				N	N	N
38 D6	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.24821				N	N	N
39 D7	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.24821				N	N	N
40 D8	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.24821				N	N	N
41 E1	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.24821				N	N	N
42 E2	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
43 E3	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
44 E4	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
45 E5	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	26	1	81.24821				N	N	N
46 E6	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	24	1	81.24821				N	N	N
47 E7	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	26	1	81.24821				N	N	N
48 E8	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	23	1	81.24821				N	N	N
49 F1	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	28	1	81.54617				N	N	N
50 F2	K4	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	29	1	81.29719				N	N	N
51 F3	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
52 F4	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
53 F5	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
54 F6	K3	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
55 F7	K5	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	27	1	81.24821				N	N	N
56 F8	K5	ExoData	UNKNOWN SYBR	None	0.023936	2.44641	26.4422	26.4422	0.183432								TRUE	1.001237	TRUE	3	35	1	77.82716				N	N	N

Part No	Sample N	Target N	Task	Reporter	Quardnar RQ	ROI Min	ROI Max	Ci	C Mean	Ci SD	AO	AO Mean	AO SE	HK Count	HK Count AO	Autamat	OK Thru	Autamat	Burline	S Burline	Efficiency	TM1	TM2	TM3	Gamma	AMP RIC	HIGHSD	OUTLIER	HTP																					
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57

Sample Setup

Results

Raw Data

Multicomponent Data

Amplification Data

BioGroup An ...







## Lampiran 5. Artikel Publikasi

# Expression of Foxo1 Protein and Glucose 6 Phosphatase Gene in Rat with Vitamin B12 Restriction Diet

Marcel Antoni<sup>1</sup>, Trinovita Andraini<sup>2</sup>, Dewi Irawati Soeria Santoso<sup>2</sup>, Irena Ujjianti<sup>3</sup>, Imelda Rosalyn Sianipar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

<sup>1</sup>Department of Medical Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta 11470, Indonesia

<sup>2</sup>Department of Medical Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

<sup>3</sup>Doctoral Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

### Correspondence Author:

Imelda Rosalyn Sianipar, Ph.D

Email: [imelda.rosalyn@ui.ac.id](mailto:imelda.rosalyn@ui.ac.id)

Tel:+6231930373

## ABSTRACT

**Introduction:** Based on our previous study, vitamin B12 deficiency can cause hyperhomocysteinemia and insulin resistance (marked by hyperglycemia and increase of HOMA-IR index). **Objective:** By using rats' liver tissue from (that) previous study, the present

study aims to determine the mechanism of hyperglycemia; its relationship with gluconeogenesis process, related to expression of Foxo1 protein and G6Pc gene. **Methods:** Rats' liver tissue consists of 4 groups; control, restriction of vitamin B12 for 4, 8 and 12 weeks. Foxo1 expression was examined by Western Blot. Whereas the G6Pc expression was checked by real-time PCR. **Results:** There were no significant differences in the expression of Foxo1 ( $P > 0.05$ ) and G6Pc gene ( $P > 0.05$ ) between the control group and restriction of vitamin B12, 4, 8 and 12 weeks. **Conclusion:** In condition of insulin resistance, triggered by vitamin B12 restriction; expression of Foxo1 and G6Pc are involved in driving gluconeogenesis process, causing hyperglycemia. This happened due to absence of inhibitory effect of Foxo1 by insulin, similar to normal condition in the control group where the expression of Foxo1 and G6Pc increases during fasting.

**Keywords:** vitamin B12, hyperhomocysteinemia, insulin resistance, Foxo1, glucose 6 phosphatase (G6Pc)

## INTRODUCTION

The population of vitamin B12 deficiency in the world, is estimated to be greater than is known, because in general, a person does not realize that he has vitamin B12 deficiency, until the emergence of health problems occurs related to vitamin B12 deficiency. Vitamin B12 deficiency occurs worldwide, with the highest prevalence in Asia and Africa, especially in the group of pregnant women and children (1). Vitamin B12 deficiency has also been known to be associated with an increased risk of cardiovascular disorders (2), metabolic (3), blood and nerve disorders (4). Vitamin B12 deficiency can be caused by less consumption of vitamin B12,

disruption of the absorption process of vitamin B12, or interference with the process of metabolism in the body (1,5).

Deficiency of vitamin B12 can induce hyperhomocysteinemia, in relationship with the process of re-methylation of homocysteine to methionine (3). Vitamin B12 is a cofactor for methionine synthase enzyme in this reaction, so that vitamin B12 deficiency can cause accumulation of homocysteine (6,7). From several studies, it is known that homocysteine can trigger insulin resistance through oxidative stress which induces an inflammatory process (8-10).

As we know, insulin is a hormone produced by pancreatic  $\beta$  cells plays an important role in the metabolic processes of glucose, fat and protein. In glucose metabolism process, insulin prevents the condition of hyperglycemia after meals (11). Under normal conditions, after eating, insulin is secreted and by binding to their receptors on target cells, insulin increases uptake and utilization of glucose in tissues, increases glycogenesis and inhibits the process of gluconeogenesis. In contrast to fasting condition, counter-insulin hormones (glucagon, epinephrine), which play a role in increasing blood glucose levels (12, 13). There are 2 main insulin signaling pathways through its receptors, the PI3K-Akt pathway and Grb2 / SOS / Race / MAPK (14). The process of metabolism of glucose, fat and protein is under the influence of insulin through the PI3K-Akt pathway. Under the PI3K-Akt pathway, there are many proteins that are regulated by insulin activity, both activated and inhibited in order to fulfill insulin function in maintaining glucose levels remain normal (13,15). One of the downstream proteins in insulin signaling is Foxo1 (14,16). Foxo1 is a protein that plays a role in the transcription of gluconeogenic enzyme genes, to encourage the process of gluconeogenesis. Under normal conditions, after eating, insulin through the PI3K-Akt pathway, inhibits Foxo1 transcription activity by phosphorylating Foxo1 at the Thr-24, Ser-256 and Ser-319 sites, causing Foxo1 to exit the nucleus, and thereby inhibiting transcriptional activity (17,18). In fasting conditions, where blood glucose levels are low, and insulin is not secreted, Foxo1 remains in the nucleus,

so Foxo1 transcription activity will continue. The genes that are the target of Foxo1 transcription in the process of gluconeogenesis are the enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (19) and glucose 6 phosphatase (G6Pc) gene. PEPCK is an enzyme that plays a role in the decarboxylation of oxaloacetate to phosphoenolpyruvate (19), whereas G6Pc plays a role in the transportation and hydrolysis of glucose 6 phosphate to free glucose and inorganic phosphate. G6Pc enzyme deficiency causes free glucose cannot be released into the blood and causes hypoglycemia (20).

## **MATERIALS AND METHODS**

The samples used in the present study were rats' liver tissue sample of male Sprague Dawley rats aged 36-40 weeks, from our previous study. Rats' body weight ranged between 300 to 350 grams (purchased from the RI Research and Health Agency). Based on the Federer formula, the total samples used were 24 rats. Rats were placed individually in rooms with good ventilation. Room temperature was kept between 18-26 ° C. Humidity kept between 30-70%. Rats kept getting 12 hours of light and dark cycles. We make sure that rats' cages are kept clean every day. After a week of acclimation, as randomly, we divided rats into four groups. The first group fed with AIN-93M (Research Diets Inc., USA) ad libitum as a control group (Group 1, n = 6, designated as C). The second group fed with modified AIN-93M ad libitum (AIN-93M with restricted-B12) with additional pectin / cellulose as a source of fiber for four weeks (Group 2, n = 6). The third group fed with a modified ad-libitum AIN-93M diet (Group 3, n = 6) for eight weeks. And the last, the fourth group fed with a modified ad-libitum AIN-93M diet (Group 4, n = 6) for 12 weeks. The content of vitamin B12 in modified diets is lower than that of a control diet. Modified foods contain 50 g of pectin / kg. It aims to bind pectin with intrinsic factors in the intestine, so that interfering their binding with vitamin B12. Food intake was observed every day, and body weight was measured weekly. After 4, 8 and 12 weeks of feeding,

rat's liver tissue were taken. Before rat's liver tissue were taken, the four groups of rats fasted for 12 hours. All animal procedures were based on Declaration of Helsinki. Ethical approval for experiment obtained from Medical Ethical Committee, Universitas Indonesia (No.184/UN2.F1/ETIK/2017).

### **Examination of Foxo1 protein expression**

From each liver tissue sample from each group, protein isolation was carried out with RIPA buffer 10x, centrifugation at a speed of 12,000 rpm, for 20 minutes, at 4 ° C. A standard curve for measuring protein concentration, created using BSA. Then, we did electroforesis followed by wet transfer on PVDF membrane. Antibody labeling using anti-GAPDH mouse (Cell Signaling Technology # 97166, MW: 37 kDa) with a concentration of 1: 2,000 and anti-Foxo1 rabbit (Ab-256) (Sigma-Aldrich. SAB4300410, MW: 78-82 kDa) with a concentration of 1: 500.

### **Examination of G6Pc gene expression**

From each liver tissue sample from each group, isolation and extraction of total RNA was carried out using Quick-RNA<sup>TM</sup> Miniprep Plus, Zymo Research. Continue to the cDNA synthesis stage using ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover, Toyobo. Real-time RT-PCR is done using the Applied Biosystem<sup>TM</sup> StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR System, and SensiFAST<sup>TM</sup> SYBR® Hi-ROX Kit, Bioline. The  $\beta$ -actin gene, is used as an internal control. Primary  $\beta$ -actin: forward 5' - CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG - 3', reverse 5' - GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA -3'. G6Pc Primer: forward 5' - ACT CCC AGG ACT GGT TTG TC -3', reverse 5'- CCA GAT GGG AAA GAG GAC AT -3'.

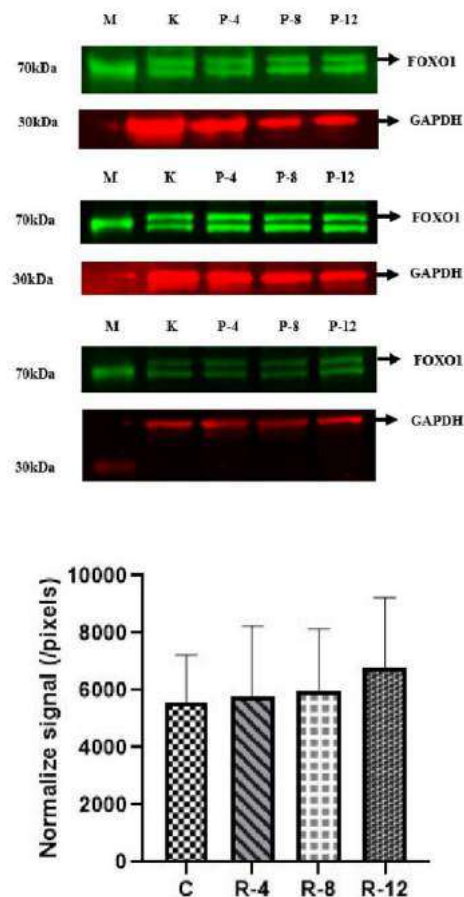
## Statistical analysis

Both statistical analysis for Foxo1 expression and G6Pc gene expression were performed using One-Way ANOVA analysis. All data processing was performed using SPSS 24.

## RESULTS

### Foxo1 protein expression

In figure 1a, Foxo1 with molecular weight 78-2kDa were detected in all groups. In figure 1b, shown, there were not significant difference of Foxo1 expression between the vitamin B12, 4, 8 and 12-week restriction groups to control group ( $P > 0.05$ ).

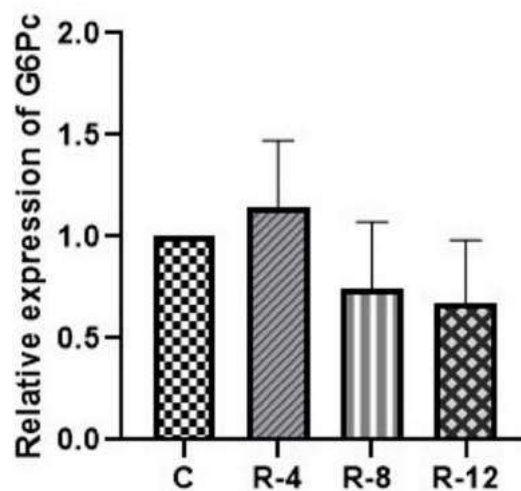


**Figure 1a:** FOXO1 protein band expression in vitamin B12 deficiency. Figure 1: FOXO1 expression in vitamin B12 restriction. M= marker; K= control group; P-4 = 4 weeks of B12 restriction diet group; P-8 = 8 weeks of B12 restriction diet group; P-12 = 12 weeks of B12 restriction diet group.

**Figure 1b:** FOXO1 protein band expression in vitamin B12 deficiency (7x repetition). FOXO1 expression in vitamin B12 restriction. (N=24,  $P > 0.05$ ) C= control group; R-4 = 4 weeks of B12 restriction diet group; R-8 = 8 weeks of B12 restriction diet group; R-12 = 12 weeks of B12 restriction diet group. There were not significant difference of FOXO1 expression between the vitamin B12, 4, 8 and 12-week restriction groups to control group ( $P > 0.05$ ) Data are given as means  $\pm$  SD (n = 5).

### Glucose 6 Phosphatase (G6Pc) gene expressions

In figure 3, shown, there were not significant difference of G6Pc expression between the vitamin B12 restriction groups (4, 8 and 12-weeks to control group ( $P > 0.05$ )).



**Figure 2:** Data are given as means  $\pm$  SD (n = 5). Figure 3: Relative expression of G6Pc in vitamin B12 restriction. (N=24,  $P > 0.05$ ) C= control group; R-4 = 4 weeks of B12 restriction diet group; R-8 = 8 weeks of B12 restriction diet group; R-12 = 12 weeks of B12 restriction diet group. There were not significant difference of G6Pc expression between the vitamin B12 restriction groups (4, 8 and 12-weeks to control group ( $P > 0.05$ )).

## DISCUSSION

The results of Foxo1 expression between the control group and the restriction group of vitamin B12 for 4, 8 and 12 weeks, didn't show significant differences. This might be due to the condition of insulin resistance, the effect of insulin inhibition on Foxo1 is lost, so that Foxo1 remains in the nucleus and it is active as a transcription factor. This is similar to normal

conditions, when fasting, the inhibitory effect of insulin on Foxo1 is also absent. The difference is, in conditions of insulin resistance, although high blood insulin levels, insulin cannot work due to interference with the receptors, whereas in normal condition, when fasting, low blood glucose levels, inhibit insulin secretion so that there is no effect of insulin inhibition on Foxo1 due to low insulin levels. This is what might cause no significant difference between the control group and the restriction group of vitamin B12, 4, 8 and 12 weeks.

The results of the relative expression of the G6Pc gene also did not show significant differences between the control group and the restriction group of vitamin B12, 4, 8 and 12 weeks; these results are consistent with the expression of the Foxo1 protein, clarifying the effect of Foxo1 on G6Pc. Thus these results reinforce the alleged involvement of the gluconeogenesis process, and specifically the PI3K-Akt-Foxo1 pathway in the pathogenesis of hyperglycemia in insulin-resistant mice, which is caused by hyperhomocysteinemia due to vitamin B12 deficiency.

## **CONCLUSION**

Hyperglycemia that occurs, based on the results of the first phase of research (3) involves the process of gluconeogenesis through increased Foxo1 activity and expression of its target gene G6Pc.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the staff of the Immunoendocrinology Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, for their assistance and support.

## **REFERENCES**

1. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17040.
2. Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol*. 2013;61(4):289-94.
3. Sianipar, I. R., Ujianti, I., Yolanda, S., Murthi, A. K., Amani, P., & Santoso, D. I. S. (2019). Developing vitamin B12 deficient rat model based on duration of restriction



- diet: Assessment of plasma vitamin B12, homocysteine (hcy), and blood glucose levels. Paper presented at the *AIP Conference Proceedings*, , 2092 doi:10.1063/1.5096672
4. Dubaj C, Czyż K, Furmaga-Jabłońska W. Vitamin B12 deficiency as a cause of severe neurological symptoms in breast fed infant – a case report. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020;46(1):40.
  5. Alex Ankar, Kumar A. *Vitamin B12 Deficiency (Cobalamin)*: StatPearls Publishing; 2020.
  6. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217-46.
  7. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(10):1733.
  8. Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol*. 2001;27(1):85-91.
  9. Li Y, Zhang H, Jiang C, Xu M, Pang Y, Feng J, et al. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(14):9583-92.
  10. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(5):567-75.
  11. Hall JE. *Buku ajar fisiologi kedokteran Guyton dan Hall*. 12 ed: Elsevier; 2016. 4 p.
  12. Sherwood L. *Fisiologi Manusia Dari Sel ke Sistem*. 8 ed: EGC; 2016. 841 p.
  13. Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. CREB and Foxo1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep*. 2013;46(12):567-74.
  14. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
  15. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
  16. Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell death & disease*. 2015;6(12):e2037-e.
  17. Peng S, Li W, Hou N, Huang N. A Review of Foxo1-regulated metabolic diseases and related drug discoveries. *Cells*. 2020;9(1):184.
  18. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:925350.

19. Robert K. Murray DAB, Kathleen M. Botam, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil. Biokimia Harper. 29 ed. 29, editor. Jakarta: EGC; 2016. 922 p.
20. Hutton JC, O'Brien RM. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. The Journal of biological chemistry. 2009;284(43):29241-5.

## RIWAYAT HIDUP



Nama lengkap : Marcel Antoni  
 NPM : 1706121350  
 Alamat : Jl. Tanjung Duren Barat 6 No.23B, RT 11/07,  
 Tanjung Duren Utara, Grogol-Petamburan,  
 Jakarta Barat  
 Umur / Kelamin / Agama : 36 tahun / Laki-laki / Kristen  
 Tempat dan Tanggal Lahir : Jakarta, 3 Maret 1984  
 Asal Instansi : Fakultas Kedokteran UKRIDA  
 Alamat Instansi : Jl. Arjuna Utara No.6, Kebon Jeruk, Jakarta Barat  
 Riwayat Pendidikan :  
     SD : SD Sandika, Jakarta Pusat (Lulus Tahun 1996)  
     SMP : SMP Van Lith, Jakarta Pusat (Lulus Tahun 1999)  
     SMA : SMA Budi Mulia, Jakarta Pusat (Lulus Tahun 2002)  
     S1 : Dokter Umum FK Ukrida (Lulus Tahun 2008)  
 Pengalaman Penelitian : -  
 Publikasi : -  
 Biaya penelitian berasal dari : Hibah PITTA A 2019, Mandiri

## **DANA PENELITIAN**

Dana penelitian ini bersumber dari dana hibah PITTA A tahun anggaran 2019 dan pembiayaan pribadi / mandiri.