

**PROFIL GEN IL-10 DAN EKSPRESI PROTEIN IL-10 PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 (DMT2)**

**TESIS**

oleh  
**YOHANES BARE**  
166090100111009



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PROFIL GEN IL-10 DAN EKSPRESI PROTEIN IL-10 PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 (DMT2)**

**TESIS**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh  
**YOHANES BARE**  
**166090100111009**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**HALAMAN PENGESAHAN TESIS**

**PROFIL GEN IL-10 DAN EKSPRESI PROTEIN IL-10 PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 (DMT2)**

**YOHANES BARE  
166090100111009**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 28 Mei 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D.  
NIP. 19631127 198903 2 001

Dr. Drs. Agung P. Warih Marhendra, M.Si.  
NIP. 19650616 199111 1 001

Mengetahui  
Ketua Program Studi S-2 Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si., M.P., D.Sc.  
NIP. 19781025 200312 1 002

**SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS****Judul Tesis** :**PROFIL GEN IL-10 DAN EKSPRESI PROTEIN IL-10 PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 (DMT2)**Nama : Yohanes Bare  
NIM : 166090100111009**KOMISI PEMBIMBING**Ketua : Prof. Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D  
Anggota : Dr. Drs. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si**KOMISI PENGUJI**Dosen Penguji I : Dr. Titin Andri Wihastuti, S.Kp., M.Kes  
Dosen Penguji II : Nia Kurniawan, S.Si., M.P., D.Sc

Tanggal Ujian : 28 Mei 2018

### **PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang sepengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka

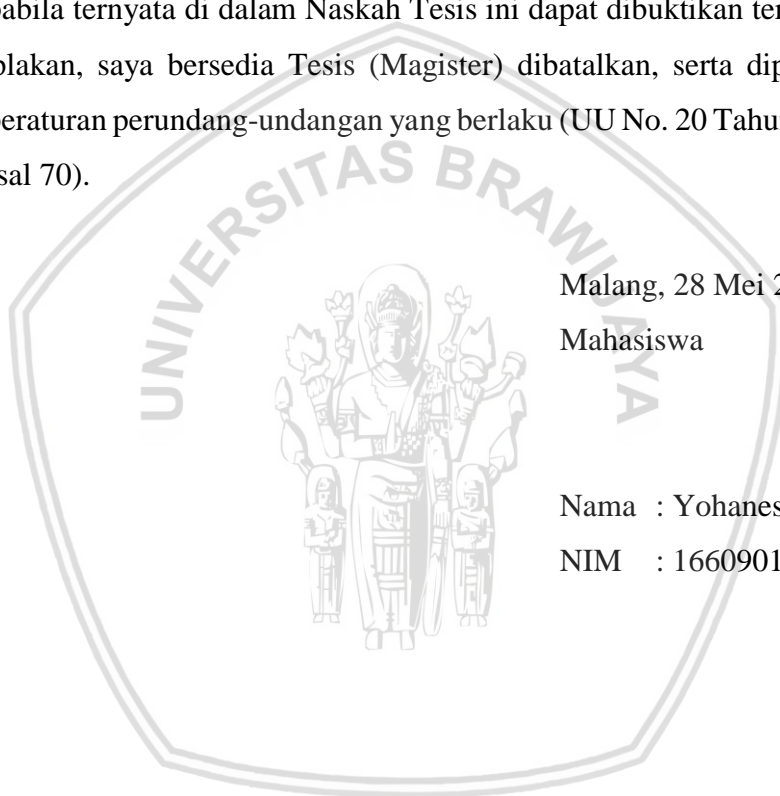
Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (Magister) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 28 Mei 2018

Mahasiswa

Nama : Yohanes Bare

NIM : 166090100111009



## RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Detulate-Ende, Indonesia 11 November 1991 merupakan anak ketiga dari empat bersaudara. Ayah Gerardus Gedo dan Ibu Benedikta Waga. Penulis menyelesaikan pendidikan pada SDN Sinda Kabor pada tahun 2005 dan menyelesaikan tingkat menengah pertama di SMPN 1 (kelas Akselerasi) Maumere pada tahun 2007. Tahun 2010 menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Maumere. Penulis melanjutkan pendidikan S1 Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Nusa Cendana. Tahun 2014 penulis berkesempatan melakukan penelitian yang mengkaji analisis struktur anatomi akar pada bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L). Tahun 2016 penulis berkesempatan untuk mendapat beasiswa LPDP Indonesia batch 2 tahun 2016 (PK 78) dan melanjutkan studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penulis berkesempatan untuk bergabung dengan Pusat Studi SMONAGENES dan melakukan penelitian dengan kajian Profil gen dan ekspresi protein IL-10 pada tikus (*Rattus norvegicus*) Model DMT2. Penulis pernah mengikuti konferensi *ISERD International Conference on Medical and Health Sciences (ICMHS)* Seoul, Korea Selatan 2018 dan mendapatkan penghargaan sebagai *Best Presentation* serta *Excellent Paper*.

Malang, 28 Mei 2018

Yoahens Bare

## PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**RINGKASAN****Profil Gen IL-10 Dan Ekspresi Protein IL-10 Pada organ Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)**

Yohanes Bare, Agung Pramana W. Marhendra, Fatchiyah  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya

2018

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) adalah penyakit metabolik kronis yang di tandai dengan resistensi insulin. Resistensi insulin menyebabkan hiperglikemia mengakibatkan komplikasi seperti *microangiopathy* dan *macroangiopathy*. Sistem imun memproduksi IL-10 sebagai sitokin anti-inflamasi yang berperan sebagai imunostimulator dan immunosupresan pada sistem organ. Penelitian ini bertujuan menginvestigasi profil gen IL-10 dan ekspresi protein IL-10 pada organ ( ileum, otak, jantung, ginjal, hati, lambung dan paru-paru) tikus (*Rattus norvegicus*) model DMT2. Penelitian ini menggunakan 3 tikus jantan pada kelompok DMT2 dan 3 tikus jantan kelompok kontrol. Metode penelitian, isolasi, amplifikasi dan sekuensing DNA menggunakan primer IL-10. Profil pita protein menggunakan *Experion pro-260* dan *dot blotting*. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan profil gen IL-10 pada kelompok kontrol dan DMT2. Pada kelompok DMT2 ditemukan delapan mutasi pada organ otak dan dua puluh tujuh pada organ lambung. Profil pita protein dari kelompok kontrol dan DMT2 berbeda, tingkat ekspresi IL-10 kelompok DMT2 pada organ ileum, otak dan hati sangat tinggi. Kesimpulan dari penelitian ini, hewan model DMT2 menunjukkan adanya mutasi pada organ otak dan lambung serta menginduksi meningkatnya tingkat ekspresi protein IL-10 pada ileum, otak dan hati.

**Kata Kunci:** DMT2, gen IL-10, hiperglikemia, protein IL-10



## SUMMARY

### Profil IL-10 Gene and Protein in organ of *Rattus norvegicus* Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) Model

Yohanes Bare, Agung P W Marhendra, Fatchiyah

Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Science,  
Brawijaya University

2018

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disease caused by insulin resistance. Insulin resistance causes hyperglycemia resulting in complications such as macroangiopathy and microangiopathy. IL-10 is a potential anti-inflammatory to improve the function and restore organ function. This study aims to determine the profile of IL-10 gene and expression of IL-10 protein in various organs of the T2DM rat model. This research was conducted using six male rats of the *Rattus norvegicus* strain Wistar divided into two groups, control group (C) and T2DM group (DM) during two months of hypercholesterolemia, injected with STZ 25mg/kgBB after one week of hypercholesterolemia. The DNA isolated from rat organs (ileum, brain, heart, kidney, liver, gastric and lung). The DNA was amplified and sequenced by primer IL-10 gene and then the IL-10 gene sequence was aligned by Bioedit v 7.2. The expression of IL-10 protein of rat tissues was analyzed using Experion-Pro260 gel and dot blotting. In this study, we found some mutations in the T2DM group of brain (eight mutations) and gastric (twenty-seven mutations) compared to other tissues of both groups. Interestingly, these mutations may control the IL-10 protein expression which is the lowest of IL-10 in gastric against with IL-10 brain (higher). In the T2DM group, the level of expression of IL-10 protein of ileum, brain and liver was higher than other tissues. This study concludes that the T2DM animal model triggers mutation of the IL-10 gene in brain, gastric and higher level of expression of IL-10 protein of ileum, brain, liver and suppressing in gastric.

**Keywords:** hyperglycaemia, IL-10 gene, protein IL-10, T2DM

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa karena atas Rahmat dan Berkat-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D. Selaku pembimbing I
2. Dr. Drs. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si. Selaku pembimbing II
3. Dr. Titin Andri Wihastuti, S.Kp., M.Kes, Selaku penguji I dan Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc, Selaku penguji II
4. Bapak Gerardus Gedo dan Ibu Benedikta Waga, kedua orang tua terus memberi semanga selama masa perkuliahan dan penyusunan tugas akhir
5. Hibah Penelitian Unggulan PTN Kemenristek Dikti 2017
6. LPDP Indonesia angkatan 78 tahun 2016 dan Dana Tesis LPDP tahun 2017
7. Teman-teman WG Smonagenes
8. Teman-teman Magister Biologi angkatan 2016

Penulisan tesis ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini sangat bermanfaat.

Malang, 28 Mei 2018

Yohanes Bare

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) .....	4
2.2 Patofisiologi DMT2 .....	4
2.3 Kerusakan Organ DMT2 .....	6
2.4 Inflamasi Pada DMT2 .....	8
2.5 Sistem Imun DMT2 .....	9
2.6 Interleukin 10 (IL-10) .....	11
2.7 Hewan Model DMT2 .....	15
2.8 Kerangka Konsep Penelitian .....	17
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
3.2 Kelaikan Etik .....	19
3.3 Prosedur Penelitian .....	19
3.4 Kerangka Operasional Penelitian .....	25
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Amplifikasi DNA organ menggunakan primer Gen IL-10 .....	27
4.2 Sekuensing dan Pensejajaran Sekuen Gen IL-10 .....	28
4.3 Profil Pita Protein Organ .....	32
4.4 Tingkat Ekspresi Protein IL-10 Organ .....	39
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	42
5.2 Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
<b>LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1 Profil Pita Protein Kelompok Tikus Kontrol (C) dan kelompok tikus DMT2 (DM) .....	35
2 Densitas protein IL-10.....	40



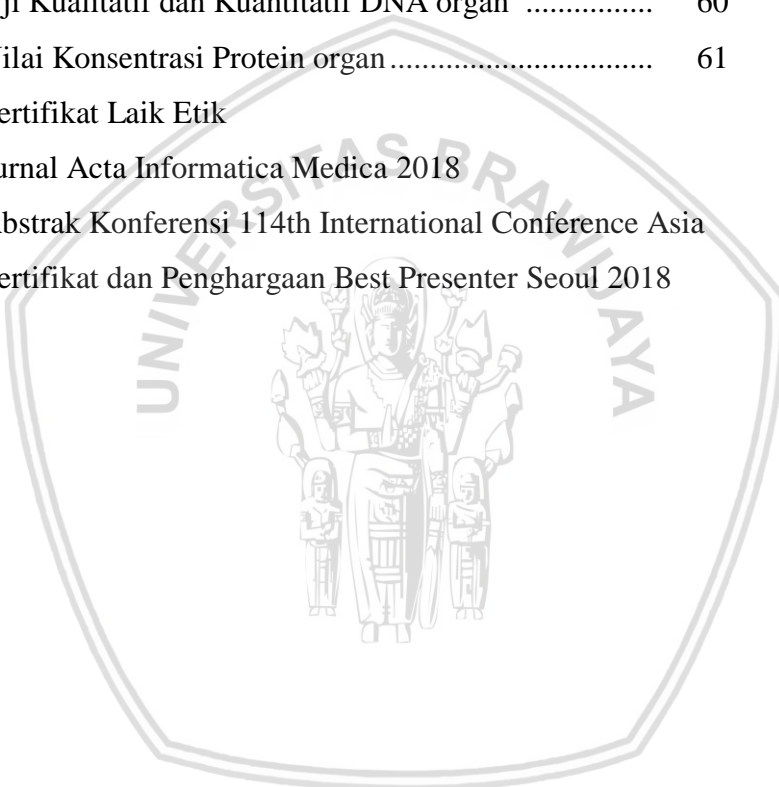
**DAFTAR GAMBAR**

Nomor	Halaman
1 Patofisiologi DMT2.....	5
2 Mekanisme umpan balik negatif pro-inflamasi dan anti-inflamasi.....	11
3 Jalur mekanisme IL-10 menghambat respon inflamasi .....	13
4 Mekanisme Il-10 sebagai anti-inflamasi dalam sistem Imun .....	14
5 Kerangka Konsep Penelitian.....	17
6 Alur Kegiatan Penelitian .....	19
7 Kerangka Operasional Penelitian.....	25
8 Uji kualitatif DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer IL-10.....	28
9 Profil gen IL-10 pada Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model DMT2.....	29
10 Pensejajaran asam amino terjemahan gen IL-10.....	31
11 Profil protein berdasarkan berat molekul protein dengan menggunakan Experion pro260.....	34
12 Ekspresi Protein IL-10 menggunakan metode dot blot.....	39
13 Signaling aktivasi IL-10 dari DC dan sel epitel melalui jalur STAT1 DAN STAT3.....	41



## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Tabulasi Bahan dan Reagen yang digunakan dalam Penelitian .....	50
2	Sekuen Primer Gen IL-10 .....	53
3	Komposisi dan Program PCR Gen IL-10.....	59
4	Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA organ .....	60
5	Nilai Konsentrasi Protein organ .....	61
6	Sertifikat Laik Etik	
7	Jurnal Acta Informatica Medica 2018	
8	Abstrak Konferensi 114th International Conference Asia	
9	Sertifikat dan Penghargaan Best Presenter Seoul 2018	



## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

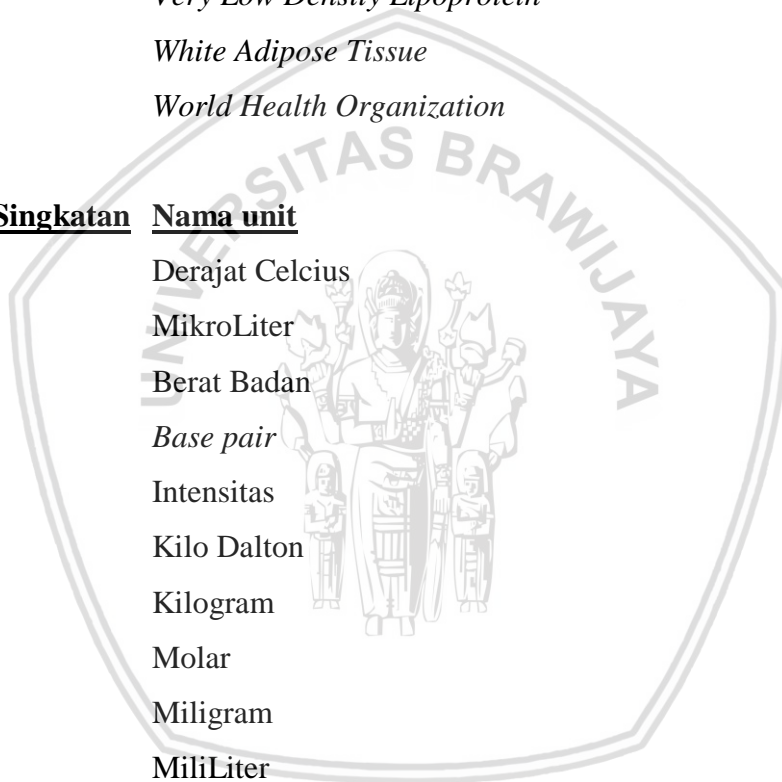
<b><u>Simbol/Singkatan</u></b>	<b><u>Keterangan</u></b>
DC	<i>Dendrit Cell</i>
ddNTPS	<i>Dideoxynucleotides</i>
DM	Diabetes Melitus
dNTPS	<i>Deoxynucleotides</i>
DMG	Diabetes Melitus Gestasional
DMT1	Diabetes melitus tipe 1
DMT2	Diabetes mellitus tipe 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EtBr	Ethidium Bromida
GLUT	<i>glucose transporter</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-11	Interleukin 11
IL-13	Interleukin 13
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes in Adults</i>
MS	<i>Multiple Sklerosis</i>
NaCl	Natrium Klorida
NaOAc	Sodium Asetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes mellitus</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pro-K	Proteinase K
ROS	<i>Reactive Oxygen Spesies</i>
SELT	Limfosit T



SEL B	Limfosit B
SDS	Sodium Dodecil Sulfat
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TBE	Tris-Cl, <i>Boric acid</i> , dan EDTA
TE	Tris-Cl dan EDTA
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Alpha
Tris-Cl	Trisaminometan-Klorida
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WAT	<i>White Adipose Tissue</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

**Simbol/Singkatan   Nama unit**

$^{\circ}\text{C}$	Derajat Celcius
$\mu\text{L}$	MikroLiter
BB	Berat Badan
bp	<i>Base pair</i>
INT	Intensitas
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
mL	MiliLiter
mM	MiliMolar
$\text{mm}^2$	Milimeter persegi
ng	nanogram
nmol	nanomole
pmol	picomole
rpm	<i>Rotation per minute</i>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik kronis, berdasarkan faktor penyebabnya diklasifikasikan menjadi 4 tipe yaitu diabetes melitus tipe I (DMT1), diabetes melitus tipe 2 (DMT2), selain itu ada tipe lain yang dikenal sebagai *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA), dan diabetes melitus gestasional (DMG). Badan Kesehatan Dunia (WHO) melaporkan DMT2 sangat berisiko usia 18 tahun keatas kasusnya 8,5%. Prevelensi DMT2 di Indonesia menempati peringkat kelima tahun 2017, akan meningkat pada tahun 2030 menjadi 21,3 juta penduduk Indonesia (Roglic, 2016; WHO, 2017).

Patologis DMT2 ditandai dengan resistensi insulin. Resistensi insulin menyebabkan penumpukan didalam darah (hiperglikemia). Hiperglikemia yang berlangsung dalam waktu yang lama akan menyebabkan rusaknya pembuluh darah dan kerusakan organ di sekitarnya (stress oksidatif). Stress menyebabkan kondisi inflamasi (Elaziz dkk., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Kusminski dkk., 2009; Nolan dkk., 2011; Pratley, 2013).

Inflamasi yang terjadi pada DMT2 mempengaruhi sistem imun untuk memberikan respon dengan menginduksi sitokin inflamasi berupa sitokin yang pro-inflamasi (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) dan sitokin anti-inflamasi (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13). IL-10 merupakan salah satu sitokin anti-inflamasi yang memiliki fungsi dalam menjaga sistem imunitas dalam tubuh. IL-10 bekerja dengan menguatkan sistem imun (imunostimulator) dengan menekan kondisi inflamasi atau menekan reaksi sistem imun yang berlebihan (imunosupresan) yang berasal dari kerja sitokin pro-inflamasi sehingga kekebalan atau daya tahan tubuh selalu optimal menjaga kesehatan tubuh. Respon IL-10 yang dihasilkan dari sistem imun humoral sel T dan seluler sel B ( Baratawidjaja dkk., 2011; Ouyang dkk., 2011; Fujio dkk., 2010; Blair dkk., 2010; Heine dkk., 2008; Iwata dkk., 2011; Milovanovic dkk., 2009).

IL-10 digunakan sebagai indikator kondisi patologis terhadap suatu penyakit inflamasi. Bartosik-Psujek dan Stelmasiak (2006) melaporkan bahwa level IL-10 dalam tubuh dapat digunakan sebagai indikator gangguan *Multiple Sklerosis* (MS). Penelitian Araya dkk. (2009) menjelaskan mengenai kondisi level IL-10 pada penderita sindrom nefrotik sangat rendah dibandingkan dengan pasien sehat. Lee dkk. (2006) dan Wegner dkk. (2008) menunjukkan level IL-10 pada penderita DMT1 sangat rendah di bawah orang sehat. Yaghini dkk. (2011) menemukan adanya perbedaan signifikan antara level IL-10 pada serum penderita DMT2

dibandingkan orang yang sehat. Tetapi belum jelas apakah di setiap organnya juga berbeda level IL-10 dari serum.

Inflamasi DMT2 menyebabkan komplikasi *microangiopathy* (retinopati, nefropati, neuropati) dan *macroangiopathy* (peningkatan risiko penyakit kardiovaskular, penyakit arteri perifer (PAD)). Selain mengalami komplikasi inflamasi DMT2 menyebabkan kerusakan organ lain seperti otak dan sistem pencernaan (Elaziz et al., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Kusminski et al., 2009; Nolan et al., 2011; Pratley, 2013). Tingkat kerusakan di beberapa organ tersebut pada DMT2 diduga mempengaruhi ekspresi sitokin pada respon imun seperti inflamasi. Inflamasi yang terjadi mengakibatkan level IL-10 pada serum menurun. Oleh karena itu, pada studi ini perlu dipelajari ekspresi gen IL-10 di dalam tubuh perlu untuk dikaji profilnya sebagai gambaran terkait dengan tingkat inflamasi yang terjadi pada organ yang ada. Penting untuk mengkaji inflamasi setiap organ DMT2 dengan menggunakan marker sitokin anti-inflamasi IL-10. Belum ada penelitian yang mengkaji inflamasi secara genetik yang terjadi pada setiap organ penderita DMT2. Pada penelitian ini menganalisis profil gen IL-10 dan ekspresi IL-10 organ pada DMT2 dibandingkan dengan kondisi hewan kontrol.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana profil sekuen gen IL-10 organ (hati, ginjal, jantung, lambung, paru-paru, ileum, otak) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Model DMT2?
2. Bagaimana profil protein IL-10 organ (hati, ginjal, jantung, lambung, paru-paru, ileum) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Model DMT2?

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis profil gen IL-10 organ (hati, ginjal, jantung, lambung, paru-paru, ileum, otak) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Model DMT2.
2. Menganalisis profil protein IL-10 pada organ (hati, ginjal, jantung, lambung, paru-paru, ileum, otak) tikus (*Rattus norvegicus*) Model DMT2.

## 1.4 MANFAAT PENELITIAN

### a. Manfaat Teoritis

Hasil dari penelitian diharapkan menjadi literatur ilmiah mengenai profil gen IL-10 dan ekspresi IL-10 sebagai salah satu sitokin yang memiliki fungsi anti-inflamasi pada tikus

(*Rattus norvegicus*) model DMT2 dibandingkan kontrol sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut berbasis nutrigenomik.

**b. Manfaat Praktis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan pertimbangan medis untuk melakukan terapi klinis terhadap penderita DMT2 dengan bentuk terapi khusus berupa nutrisi sehat untuk memperbaiki sekuen gen IL-10 untuk organ yang mengalami mutasi.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) adalah penyakit metabolik. DMT2 dipengaruhi oleh faktor genetik berupa rendahnya sekresi insulin, resistensi insulin dan faktor lingkungan seperti obesitas, terlalu banyak makan, kurangnya olahraga, stres serta penuaan. Penderita DMT2 lebih tinggi pada pria dibandingkan wanita. DMT2 adalah penyakit metabolik yang memiliki ciri khas resistensi insulin. Resistensi Insulin pada DMT2 memiliki korelasi terhadap kerusakan pada reseptor insulin. Kerusakan reseptor insulin mengakibatkan terganggunya pembentukan glikogen serta regulasi homeostasis gula. Resistensi insulin menyebabkan penggunaan glukosa menjadi terhambat oleh jaringan dan output glukosa hepatic meningkat (hiperglikemia). DMT2 mempengaruhi metabolisme karbohidrat, lemak, protein (Kohei, 2010; ADA, 2017; Ndraha, 2014).

Hiperglikemia yang cukup lama didalam tubuh menyebabkan komplikasi dalam tubuh yaitu *microangiopathy* (retinopati, nefropati, neuropati) dan *macroangiopathy* (peningkatan risiko penyakit kardiovaskular, penyakit arteri perifer (PAD)). Hiperglikemia menyebabkan kerusakan organ otak dan sistem pencernaan (Elaziz et al., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Kusminski et al., 2009; Nolan et al., 2011; Pratley, 2013).

#### 2.2 Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)

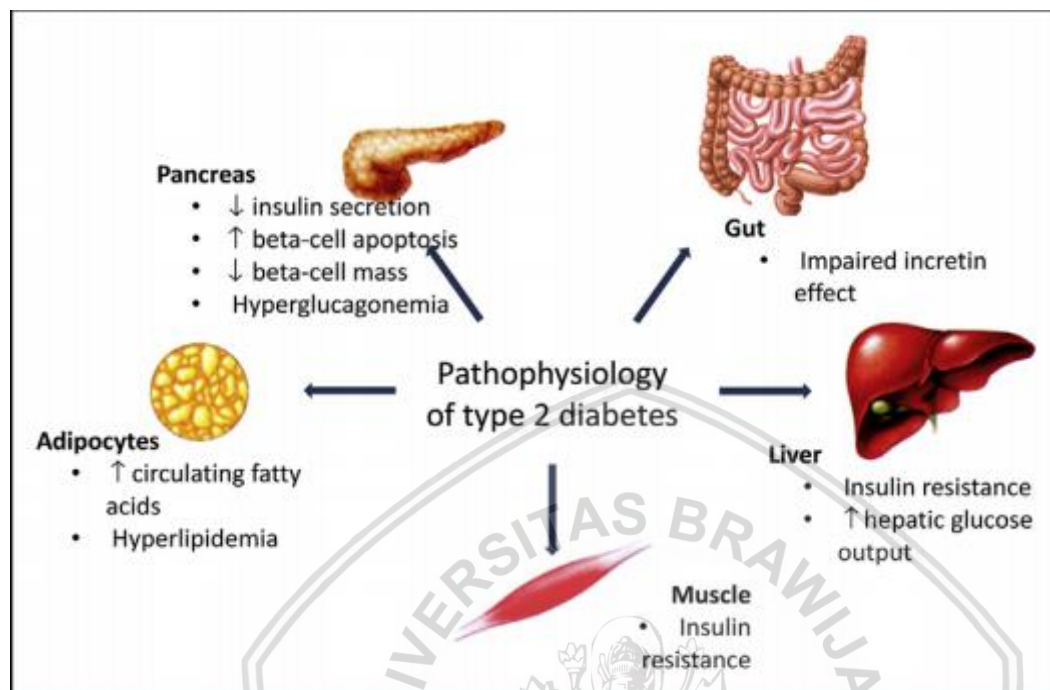
Patofisiologi pada penderita DMT2 tidak terlepas dari adanya gejala inflamasi. Resistensi terhadap insulin yang menyebabkan peningkatan produksi dari gula hati yang dikeluarkan. Pada penderita DMT2 gangguan yang sering dialami adalah lemak hati atau *fatty liver* sekitar hampir 50% (Manaf, 2009; ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Ndraha, 2014; Pratley, 2013).

Penurunan sekresi insulin mempengaruhi glukoneogenesis sehingga menyebabkan hiperglikemia dan penurunan simpanan glikogen oleh hepar. Resistensi insulin pada jaringan adiposa meningkatkan asam lemak bebas dari adiposit. Kondisi ini meningkatkan sintesis lemak *very low density lipoprotein* (VLDL) dan trigliserida. Steatosis dalam hati dapat menyebabkan penyakit lemak hati non alkohol dan fungsi hati yang abnormal (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Ndraha, 2014; Pratley, 2013).

Pada jaringan otot mengalami resistensi terhadap insulin. Resistensi insulin pada otot berpengaruh terhadap keseimbangan gula dalam darah dan otot. Patofisiologi DMT2



mempengaruhi sistem pencernaan yaitu menimbulkan gangguan pada sistem pencernaan. Pada organ pankreas menyebabkan penurunan sekresi insulin, banyak sel  $\beta$  mengalami apoptosis (Gambar 1) (Pratley, 2013).



**Gambar 1.** Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2). Pada organ pankreas menyebabkan menurunnya sekresi insulin, meningkatkan apoptosis sel  $\beta$  dan *hyperglucogenia*. Pada sistem pencernaan menyebabkan gangguan sistem pencernaan. Organ hati menyebabkan resistensi insulin dan meningkatnya gula hepatic. Pada adiposa meningkatnya sirkulasi asam lemak dan *hyperlipidemia* (Pratley, 2013)

Kondisi patofisiologi dari DMT2 menyebabkan komplikasi bagi penderitanya, komplikasi ini diakibatkan karena kondisi hiperglikemia yang terjadi dalam tubuh.

### 2.3 Kerusakan Organ Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)

Patologis penderita DMT2 meningkatkan kerusakan jaringan (stress oksidatif) akan mengarah kepada ke organ. Didalam tubuh terdapat 2 jaringan yang memiliki fungsi sebagai pengontrol glukosa dalam darah yaitu otot dan hati. Ciri kusus DMT2 yaitu organ hati dan otot mengalami penurunan fungsi yang karena terjadi hambatan tidak sentifitasnya jaringan terhadap insulin. Hambatan utama yakni pada tahap pembentukan, pengaktifan, serta penempatan (translokasi) dari *glucose transporter* (GLUT). Hambatan ini menyebabkan PPAR $\gamma$  tidak mengalami aktivasi. PPAR $\gamma$  merupakan suatu *nuclear receptor* yang bila teraktivasi akan berfungsi dalam proses transkripsi, dan juga translokasi *glucose transporter*.

Jaringan hepar berperan dalam mengatur homeostasis glukosa tubuh. Kondisi hiperglikemia dalam darah disebabkan karena GLUT 2 tidak tidak bekerja dalam metabolisme gula dalam darah. Peninggian kadar glukosa darah, ditentukan oleh peningkatan produksi

glukosa secara endogen yang berasal dari proses glukoneogenesis dan glikogenolisis di jaringan hepar. Insulin berperan melalui efek inhibisi hormon tersebut terhadap mekanisme produksi glukosa endogen secara berlebihan. Semakin tinggi tingkat resistensi insulin, semakin rendah kemampuan inhibisinya terhadap proses glikogenolisis dan glukoneogenesis, dan semakin tinggi tingkat produksi glukosa dari hepar (Gambar 1). Hiperglikemia dalam hepar jika tidak segera diatasi maka akan berdampak buruk terhadap organ lain (Manaf, 2009; ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Ndraha, 2014; Pratley, 2013).

Pada otot rangka penggunaan glukosa non-oksidatif mengalami penurunan dibandingkan dengan metabolisme glukosa oksidatif melalui glikolisis pada kondisi DMT2 (Gambar 1). Insulin reseptor dan aktivitas tirosin kinase di otot berkurang, tetapi perubahan ini kemungkinan sekunder untuk hiperinsulinemia. Pada jaringan otot resistensi insulin menyebabkan terhambatnya translokasi GLUT 4 ke membran plasma sehingga menyebabkan penumpukan gula dalam darah (Kusminski dkk., 2009).

Selain 2 jaringan yang memiliki peran dalam mengontrol gula dalam darah terdapat beberapa organ pada penderita DMT2 yaitu jantung, ginjal, saraf, dan mata. Hiperglikemia melemahkan bahkan merusak dinding pembuluh darah kapiler yang terdapat pada jaringan tubuh yang memiliki fungsi sebagai suplai makan saraf. Hiperglikemia menyebabkan sel schwann saraf perifer mengalami kerusakan karena sel schwan saraf perifer tidak mereduksi transportasi glukosa yang berlebihan dari darah ke dalam sel. Kerusakan sel schwan menyebabkan komplikasi yang disebut neuropati diabetik (*diabetic neuropathy*). Neuropati diabetik akan mengganggu impuls saraf yang bekerja sebagai penghantar pesan yang mengakibatkan saraf tidak bisa mengirim atau menghantar pesan. Kondisi tersebut tergantung dari kerusakan saraf dan saraf mana yang terkena, pasien DMT2 prevalensi neuropati pada populasi klinik berkisar 7.6% s/d 68.0% (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; King, 2012; Ndraha, 2014).

DMT2 terkait dengan gangguan yang terjadi pada ginjal, dimana kapiler sel mesangial glomerulus neuron yang berfungsi untuk menyaring darah tidak bekerja. Sel mesangial glomerulus neuron merupakan sel tidak mereduksi transportasi glukosa yang berlebihan dari darah ke dalam sel. Kerusakan yang semakin lama akan menyebabkan komplikasi yang disebut nefropati. Patologis nefropati yang terjadi adalah racun yang harus dikeluarkan dari ginjal tidak dapat dikeluarkan, sedangkan protein yang diperlukan dan dipertahankan oleh ginjal bocor keluar. Penderita DMT2 sangat berisiko mengalami kerusakan ginjal. Prevalensi mikroalbuminuria pada populasi pasien DMT2 klinik berkisar 2.5% s/d 57.0%. DMT2



prevalensi *overt nephropathy* pada populasi klinik berkisar 5.4% s/d 20.0% (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; King, 2012; Ndraha, 2014).

DMT2 memiliki dampak juga terhadap organ penglihatan dapat merusak mata serta menyebabkan kebutaan. Glukosa darah yang tinggi bisa merusak sel endotel kapiler retina karena sel tidak mereduksi transportasi glukosa yang berlebihan dari darah ke dalam sel. Selain merusak retina, menyebabkan katarak diakibatkan lensa yang biasanya jernih bening dan transparan menjadi keruh menghambat masuknya sinar dan makin diperparah dengan adanya glukosa darah yang tinggi. Peningkatan tekanan darah didalam pembuluh darah dapat merusak saraf pada mata dan menyebabkan glaukoma. Kerusakan yang semakin lama akan menyebabkan komplikasi yang disebut retinopati. Prevelensi DMT2 retinopati pada populasi klinik berkisar 10.6% s/d 47.3% (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; King, 2012; Ndraha, 2014).

Jantung koroner ditandai dengan penumpukan lemak pada dinding yang rusak dan menyebabkan penyempitan pembuluh darah. Jantung koroner berdampak terhadap suplai darah menuju otot jantung berkurang dan tekanan darah meningkat. Prevalensi penyakit jantung koroner dengan penyakit DMT2 berkisar 1.0% s/d 25.2% pada populasi klinik dan 1.8% s/d 43.4% (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; King, 2012; Ndraha, 2014; Pratley, 2013).

Hiperglikemia pada penderita DMT2 memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan jaringan maupun organ yang berada disekitarnya seperti otak, ovarium, dan sistem pencernaan (Elaziz dkk., 2014; Kahn, 2003; King, 2012; Kusminski dkk., 2009; Nolan dkk., 2011; Pratley, 2013).

## **2.4 Inflamasi pada Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)**

Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap infeksi maupun cedera jaringan non infeksi. Inflamasi dapat terjadi secara lokal, sistemik, akut dan kronis yang menimbulkan kelainan patologis. Inflamasi ditandai oleh gejala rubor, calor, tumor, dolor dan fungsiolesa (Kresno, 2013). Patologis DMT2 menyebabkan inflamasi pada jaringan seperti hiperglikemia, dislipidemia dan stress oksidatif.

### **a Hiperglikemia**

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan level glukosa dalam darah yang sangat tinggi. Glukosa yang tinggi menyebabkan kerusakan fungsi sel  $\beta$  sehingga perannya dalam mensekresikan insulin mengalami penurunan. Level glukosa dalam darah merupakan faktor utama patogenesis DMT2. Level glukosa yang tinggi merupakan racun untuk sel  $\beta$ , gula tersebut akan masuk sel  $\beta$  pankreas dan menginduksi sitokin pro-inflamasi IL-1 $\beta$ , IL-6, dan IL-1. Keberadaan sitokin pro-inflamasi ini menjadi penyebab jaringan mengalami inflamasi (Akhas dkk., 2013; Dinarello, 2011; Sultani dkk., 2012; Yao dkk., 2013).

## **b Dislipidemia**

Dislipidemia merupakan suatu kondisi ketika sirkulasi dari lemak mengalami perubahan disebabkan resistensi insulin dan kelebihan nutrisi. Perubahan konsentrasi lemak pada sel  $\beta$  mempengaruhi profil sel lipid. Lipid terbagai menjadi lemak jenuh (palmitat) yang sebagai pro-apoptosis sel  $\beta$  dan asam lemak (oleat) yang berfungsi sebagai pelindung sel  $\beta$  dari asam lemak dan glukosa. (Akhas dkk., 2013; Dinarello, 2011; Sultani dkk., 2012; Yao dkk., 2013). Asam lemak, lipoprotein memberi efek positif terhadap fungsi normal sel  $\beta$ . *Very low density lipoproteins* (VLDL) dan *low density lipoprotein* (LDL) berbahaya dan dapat menyebabkan pro-apoptosis terhadap sel  $\beta$ . *High density lipoprotein* (HDL) sebagai pelindung sel  $\beta$  dari efek yang ditimbulkan lipoprotein. Kondisi tingginya kadar VLDL dan LDL dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada jaringan tubuh (Akhas dkk., 2013; Dinarello, 2011; Sultani dkk., 2012; Yao dkk., 2013).

## **c Stress Oksidatif**

Patogenesis DMT2 juga diperankan oleh stress oksidatif, hal ini terjadi karena kerusakan jaringan yang disebabkan oleh hiperglikemia yang kronis. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan stress oksidatif adalah resistensi insulin, intoleransi glukosa, hipoksia, inaktif fisik, mediator pro-inflamasi, hiperglikemia dan dislipidemia. Faktor penyebab stress oksidatif dalam menghancurkan struktur dan fungsi sel  $\beta$  pankreas. Stress oksidatif juga merupakan potensi regenerasi ROS dengan sitokin pro-inflamasi sekitar sel  $\beta$ . Penghancuran sel  $\beta$  karena stress oksidatif menjadi potensi inflamasi dan resistensi insulin pada jaringan perifer dengan generasi ROS pada sel endotelial untuk menghilangkan fungsi normal (Akhas dkk., 2013; Dinarello, 2011; Sultani dkk., 2012; Yao dkk., 2013).

## **2.5 Sistem Imun Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)**

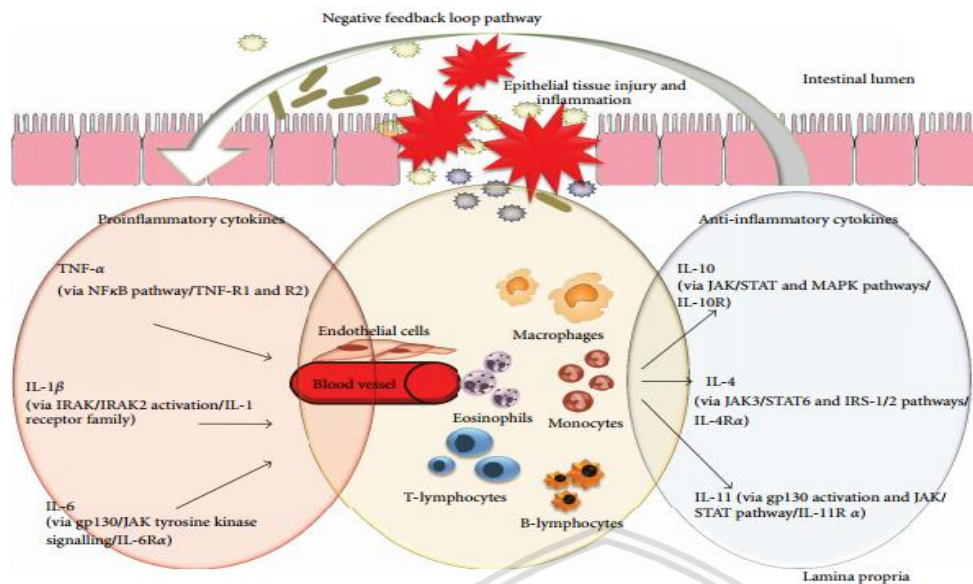
Sistem imunitas merupakan sistem yang berperan penting dalam menjaga tubuh manusia sebagai perlindungan agen asing yang masuk ke dalam tubuh. Agen asing tersebut dapat berupa patogen (virus, bakteri, jamur dan protozoa), produk tumbuhan atau hewan serta zat kimia lainnya. Sistem imun yang bekerja dibentuk oleh kerja molekul seperti protein, sel, jaringan dan organ (Baratawidjaja, 2011; Nazir, 2013).

Respon imun diperantarai oleh berbagai sel dan molekul larut yang disekresi oleh sel-sel tersebut. Reaksi imun dalam menanggapi infeksi adalah mensekresi sistem imun. Sel-sel utama yang terlibat dalam reaksi imun adalah limfosit (sel B, sel T, dan sel NK), fagosit (neutrofil, eosinofil, monosit, dan makrofag), sel asesori (basofil, sel mast, dan trombosit), sel-sel jaringan, dan lain-lain. Bahan larut yang disekresi dapat berupa antibodi, komplemen,

mediator radang, dan sitokin. (Kresno, 2013). Imunitas seluler bekerja dengan diperantarai limfosit yang berasal dari timus atau juga disebut sel T. Sel T tersebut akan mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba atau mengaktifkan sel Tc sebagai efektor yang menghancurkan sel terinfeksi. Imunitas humoral bekerja dengan diperantarai antibodi yang dihasilkan oleh sel B melalui sum-sum tulang. Sel B tersebut akan melepaskan untuk menyingkirkan mikroba ekstraseluler. Sistem imun humoral tersebut berkaitan dengan produksi antibody IgA, IgD, IgE, IgG dan IgM (Baratawidjaja, 2011; Male dkk., 2006).

Kondisi hiperglikemia didalam darah yang semakin lama akan menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah dan meningkatkan kerusakan organ (stress oksidatif). Stress oksidatif akan menuju kepada inflamasi. Gejala inflamasi disebabkan karena adanya peningkatan jumlah sitokin yang pro terhadap inflamasi yang sangat tinggi. Sitokin pro-inflamasi merupakan sitokin yang disekresi oleh sel-sel imunokompeten sebagai respon terhadap suatu infeksi atau peradangan yang terjadi di suatu jaringan. Beberapa sitokin pro-inflamasi yang menjadi faktor terjadinya DMT2 diantaranya adalah TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis-Alpha) dan IFN- $\gamma$  (Interferon-Gamma) (Cruz dkk., 2012).

Ketika terjadi kerusakan pada jaringan epitel maka sistem imun akan berkerja bersamaan dengan memproduksi sitokin yang pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi. Sitokin diproduksi oleh sel endotelial, makrofag, eosinofil, monosit, limfosit T dan limfosif B. Sitokin pro-inflamasi diproduksi untuk meningkatkan tingkat inflamasi sehingga mempercepat pembentukan antibodi, sitokin pro-inflamasi yang terbentuk yaitu TNF- $\alpha$  (melalui jalur NFkB atau TNF-R1 dan TNF-R2), IL-1 $\beta$  (melalui aktivasi IRAK/IRAK2/ reseptor IL-1), dan IL-6 (melalui gp130/JAK sinyal tirosin kinase/IL-6R $\alpha$ ) (Gambar 2) (Pickup, 2004; Sultani dkk., 2012).



**Gambar 2.** Mekanisme umpan balik negatif antara sitokin pro-inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-6) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10, IL-4, dan IL-11) yang pada kerusakan usus dan inflamasi (Sultani dkk., 2012)

Sitokin anti-inflamasi diproduksi untuk menghentikan inflamasi yang terjadi dengan menguatkan sistem imun (imunostimulator) dengan menekan kondisi inflamasi atau menekan reaksi sistem imun yang berlebihan (imunosupresan) yang berasal dari kerja sitokin pro-inflamasi. Sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10 (melalui jalur JAK/STAT dan MAPK/IL-10R), IL-4 (melalui jalur JAK/STAT6 dan IRS-1/2/ IL-4R $\alpha$ ), IL-11 (melalui aktivasi gp130 dan JAK/STAT/IL-11R $\alpha$ ) (Gambar 2) (Pickup, 2004; Sultani dkk., 2012).

## 2.6 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 adalah mediator protein yang terdiri atas 3 polipeptida 178 asam amino (Kresno, 2013) berat molekul kira-kira antara 17kD (Kresno, 2013), 18kD (Soeroso, 2007), 19kD dan 20kD yang terukur dengan menggunakan analisis elektroforesis (Ogawa dkk., 2008).

IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi dalam sistem imun. IL-10 berfungsi inhibitor kuat terhadap produksi sitokin oleh Th1 termasuk IL-2 dan IFN $\gamma$ . Fungsi utamanya adalah menghambat dan menghilangkan inflamasi, selain mengendalikan perkembangan dan diferensiasi sel B, sel NK, sel Th, sel CD8, mastosit, granulosit, sel dendrit keratinosit dan sel endotelia. IL-10 merupakan protein yang berfungsi sebagai mediator peptida yang dihasilkan oleh sel suatu reaksi imunologik, berfungsi sebagai pengkodean/signal intraseluler antar sel dalam pengaturan respon inflamasi lokal maupun sistemik (Kresno, 2013).

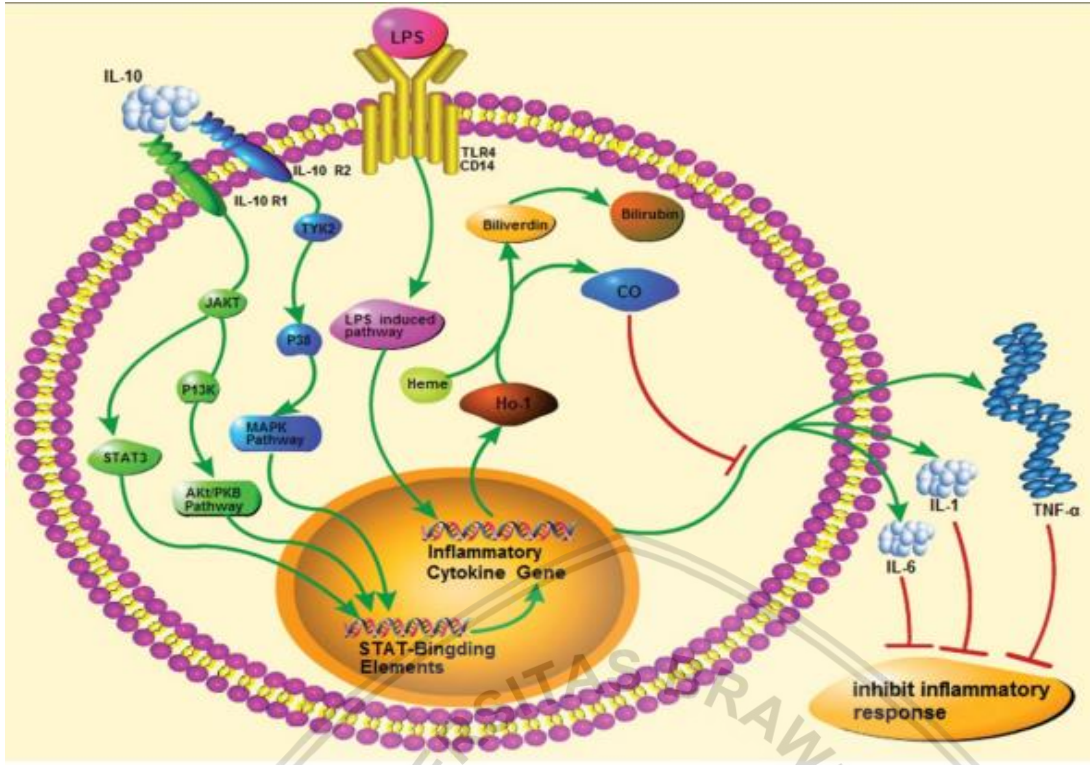
Agan-agen yang menghambat produksi IL-10 adalah IL-4 dan IFN $\gamma$ . Efek supresif IL-10 pada monosit dan sintesis sitokin oleh sel Th1 diduga karena IL-10 mempunyai efek supresi secara umum terhadap fungsi imun. Peranan IL-10 pada sistem layanan kesehatan digunakan pada peneliti pre-klinik untuk mengevaluasi potensinya sebagai immunosupresif pada berbagai penyakit seperti autoimun, infeksi, transplantasi dan kanker (Baratawidjaja, 2011; Kresno, 2013).

Produksi IL-10 dalam tubuh manusia terdapat pada kelompok yang berbeda, yaitu imunitas humoral dan sistem imunitas seluler. Sistem imunitas humoral IL-10 disekresi oleh sel B memproduksi antibodi pada manusia. (Bouaziz dkk., 2010; Iwata dkk., 2011). IL-10 dalam peranannya sebagai anti-inflamasi memiliki pasangan dari golongan sitokin yaitu IL-12 untuk menghambat peradangan yang terjadi didalam tubuh manusia. Respon imun yang diberikan sangat berpengaruh dalam proses imun yang terjadi pada penderita diabetes (Bagavant dan Fu, 2009).

Imunitas seluler diproduksi oleh sel T berupa Produksi IL-10 juga termasuk CD8+ sel T melalui aktivasi atau interaksi dari dengan ligan CD40 (Gilliet dan Liu, 2002). IL-10 diekpresikan oleh sistem imunitas dalam tubuh yaitu oleh makrofag dan DCs. Neutrofil juga memiliki fungsi sebagai penghasil IL-10 melalui respon TLR dan Tipe C lektin co-aktivasi MyD88 dan SYK masing-masing (Zhang dkk., 2009).

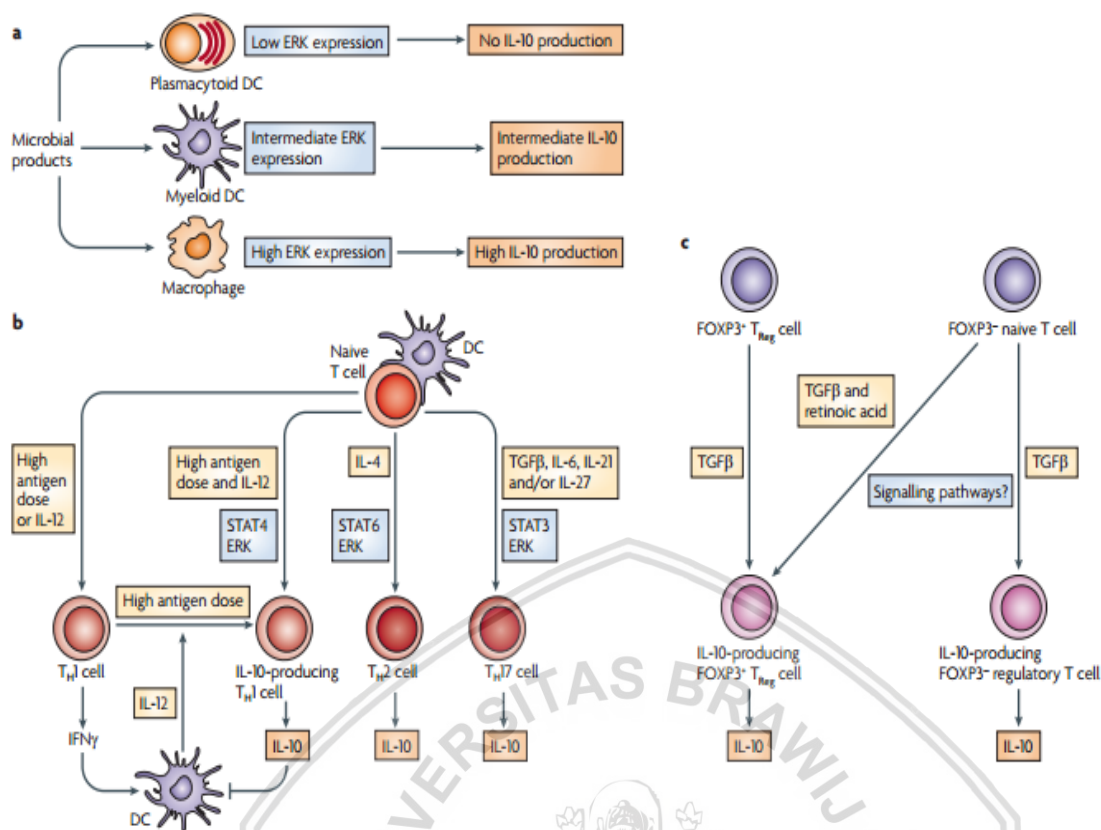
IL-10 merupakan golongan sitokin yang memiliki potensi sebagai anti-inflamasi, yang memiliki fungsi untuk menghambat ekspresi dari sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-1 $\beta$  yang diaktifkan oleh makrofag.





**Gambar 3.** Jalur mekanisme IL-10 menghambat respon inflamasi. Protein IL-10 yang diterima kemudian masuk kedalam sel melalui STAT binding elemen kemudian menginduksi gen sitokin inflamasi, serta memberikan respon dengan menginhibit respon inflamasi (Yao dkk., 2013)

IL-10 memiliki 2 reseptor yang memiliki sistem yang berbeda yaitu IL-10R1 dan IL-10R2. IL-10R1 memiliki afinitas yang sangat tinggi sedangkan IL-10R2 yang memiliki reseptor dengan afinitas yang sangat rendah. Aktifitas dari IL-10 merupakan sinyal sel yang dianggap terikat dari kedua reseptor yaitu pertama IL-10R1 dan kemudian IL-10R2. Reseptor IL-10 terletak dijalur kelas JAK/STAT3 tetapi aktivasi jalur JAK/STAT3 oleh IL-10 tidak memiliki sifat sebagai anti-inflamasi (Gambar 3) (Yao dkk., 2013).



**Gambar 4.** Mekanisme IL-10 sebagai anti-inflamasi dalam sistem Imun, jalur a melalui *Plasmacytoid DC*, *Mieloid DC* dan makrofag. Jalur b melalui sel T naive. Jalur c melalui FOXP3<sup>-</sup> (Saraiva dan O’Garra, 2010)

Sistem kerja dan produksi IL-10 dalam menanggapi akibat induksi mikroba yang berupa virus atau jamur dari luar tergantung terhadap jumlah mikroba yang masuk (Gambar 4). Apabila yang masuk dalam jumlah yang sedikit maka yang berekspressi adalah *Plasmacytoid DC* dengan ekspresi ERK yang sangat rendah produksi ini dapat langsung menghambat kinerja virus yang masuk. Kasus selanjutnya apabila mikroba yang masuk dalam jumlah sedang maka akan ditanggapi oleh *Myeloid DC* dengan ekspresi ERK yang dihasilkan dalam komunikasi sel akan menghasilkan IL-10 dalam jumlah yang sedikit sesuai dengan kebutuhan. Jika mikroba yang masuk dalam jumlah besar maka akan langsung dihambat oleh makrofag dengan ekspresi ERK yang sangat tinggi menghasilkan IL-10 dalam jumlah yang tinggi juga dalam menanggapi mikroba yang masuk untuk menstabilkan kondisi tubuh (Saraiva dan O’Garra, 2010).

Ketika jaringan dalam tubuh mengalami luka kemudian terinfeksi dan radang akan ada pelepasan dari sitokin-sitokin secara bersamaan baik pro-inflamasi maupun anti-inflamasi (Gambar 4). IL-12 bertindak sebagai agen pro-inflamasi yang memiliki fungsi untuk menaikkan dosis antigen yang berasal dari luar. IL-12 akan menginduksi Th1 dan memproduksi IFN $\gamma$  yang juga memiliki fungsi sebagai pro-inflamasi untuk menaikkan dosis antigen. Pada saat yang

bersama juga respon juga dikeluarkan oleh sitokin anti-inflamasi yaitu Th1, Th2 dan Th17 yang secara bersamaan akan memproduksi IL-10 sebagai respon terhadap antigen dengan dosis yang tinggi. Selain dihasilkan oleh kelompok T helper, IL-10 juga diproduksi oleh T regulator sebagai agen anti-inflamasi (Saraiva dan O'Garra, 2010).

Tingkat ekspresi IL-10 didalam tubuh memiliki korelasi terhadap kondisi inflamasi. Pada saat tubuh mengalami inflamasi ekspresi interleukin 10 (IL-10) mengalami penurunan, hal ini terjadi karena adanya aktivitas sitokin proinflamasi yang memiliki korelasi terhadap peningkatan inflamasi dalam tubuh.

## 2.7 Hewan Model Diabetes Melitus tipe 2

Hewan model DMT2 penelitian secara *in vivo* adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain winstar. Tikus putih memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dari mencit, lebih cerdas, tenang, mudah dikerjakan dengan perlakuan yang wajar, kurang suka berkumpul serta tidak memiliki kelenjar empedu (Kusumawati, 2004). Pembuatan hewan model DMT2 terdiri atas pemberian pakan atau nutrisi yang dapat menstimulus resistensi insulin, pankreatektomi parsial, pemberian senyawa deabetonik atau secara genetik. Dalam menginduksi hewan model untuk mengalami diabetes terdapat 2 komponen bahan yang biasa digunakan yaitu: *streptozotocin* (STZ) atau alloxan.

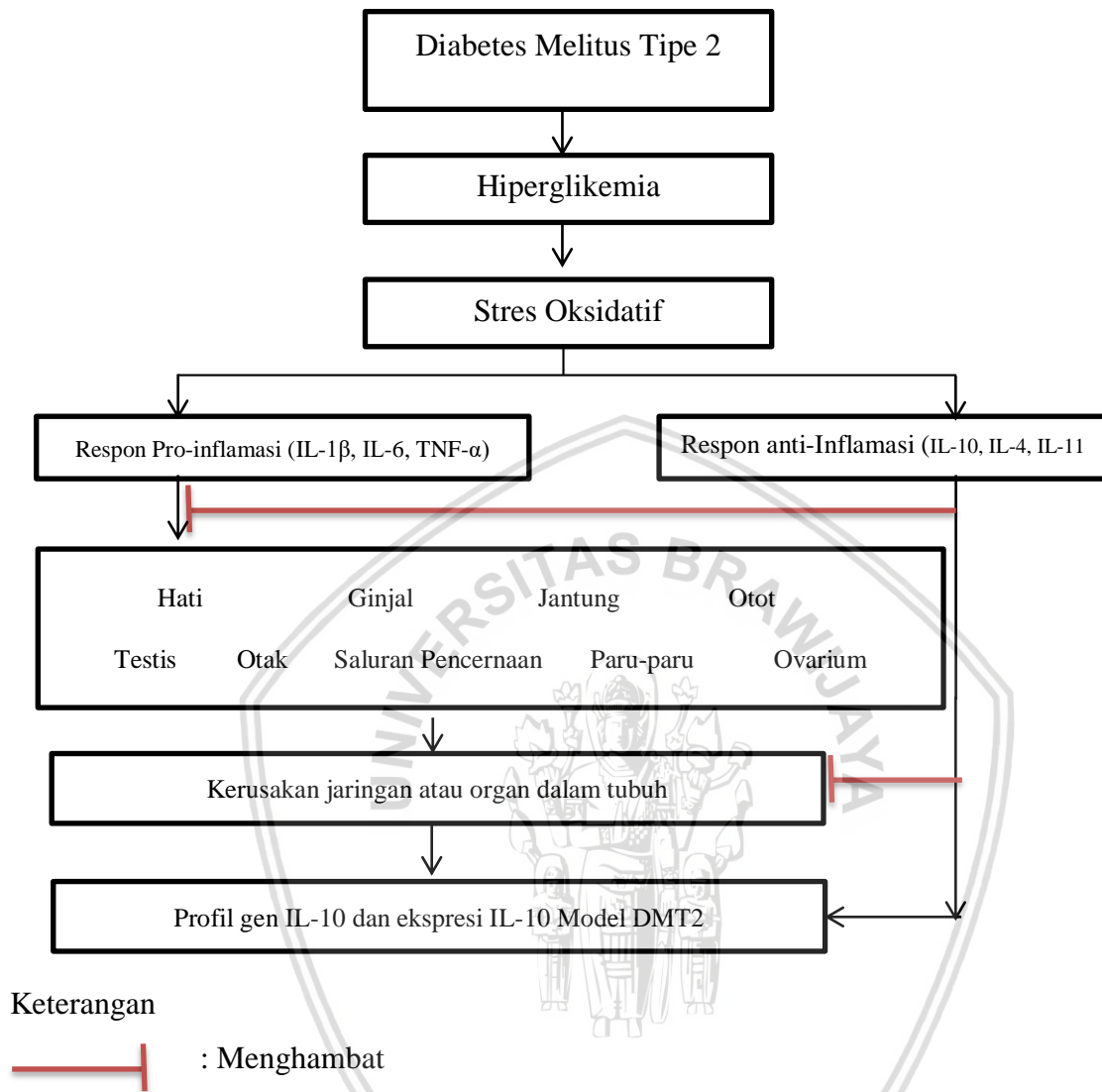
STZ adalah 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D glucopyranose yang diproduksi oleh *Streptomyces achromogenes*, dosis tinggi STZ yang diberikan pada hewan coba berbeda-beda tergantung hewan tersebut pada tikus jantan dosis yang disarankan adalah 36-65mg/kg (Rees, 2005; Srinivasan dan Ramarao, 2007) Struktur STZ memiliki kemiripan dengan struktur glukosa menyebabkan zat ini dikenali oleh Glucose transporter 2 (GLUT 2) pada sel  $\beta$  pankreas. STZ kemudian masuk kedalam sel  $\beta$  pankreas menyebabkan akilasi DNA yang berujung pada pembentukan radikal hidroksil. Selain itu STZ juga melepaskan nitrit oksida yang berpartisipasi pada kerusakan DNA. Pemberian STZ menyebabkan peningkatan kondisi gula dalam darah (hiperglikemia) karena kerusakan masala pada sel  $\beta$  penghasil insulin. Kerusakan ini sel  $\beta$  juga menyebabkan pelepasan sejumlah besar insulin dari pankreas kedalam darah yang akan menyebabkan hipoglikemia. yang terjadi dan mengamati regenerasi dari sel  $\beta$  (King, 2012; Rackhman dkk., 2011; Rees, 2005; Srihari dkk., 2013; Szkudelski, 2001).

Dalam melakukan induksi kimia pada hewan coba terdapat satu kelemahan yaitu bahan kimia yang digunakan dapat menjadi racun yang sangat berbahaya bagi organ lain dalam tubuh, dimana racun tersebut dapat mengubah isoenzim P450 yang terdapat pada hati, ginjal, paru-paru, usus, testis dan otak setelah diberi injeksi STZ atau alloxan (King, 2012; Lee dkk., 2010).





## 2.8 Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 5.** Kerangka Konsep Penelitian

DMT2 merupakan salah satu penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan resistensi insulin. Resistensi insulin dapat mengakibatkan penumpukan gula dalam darah (hiperglikemia). Hiperglikemia menyebabkan kerusakan jaringan (stress oksidatif). Stress oksidatif menyebabkan kondisi inflamasi didalam tubuh. Sistem imun merespon inflamasi dengan menginduksi sitokin pro-inflamasi untuk meningkatkan inflamasi, selain itu respon anti-inflamasi memproduksi anti-inflamasi IL-4, IL-10, IL-11 yang memiliki fungsi untuk memodulasi, koordinasi atau preparasi respon yang berlebihan baik dari inflamasi maupun respon pro-inflamasi dalam rangka mengembalikan fungsi organ dengan menyembuhkan tingkat kerusakan organ target maupun organ non-target. Penelitian bertujuan untuk

menganalisis profil gen DNA dan ekspresi menggunakan primer IL-10 organ dari kerusakan patologis tersebut pada kondisi DMT2 dibandingkan dengan kontrol.



### BAB III METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

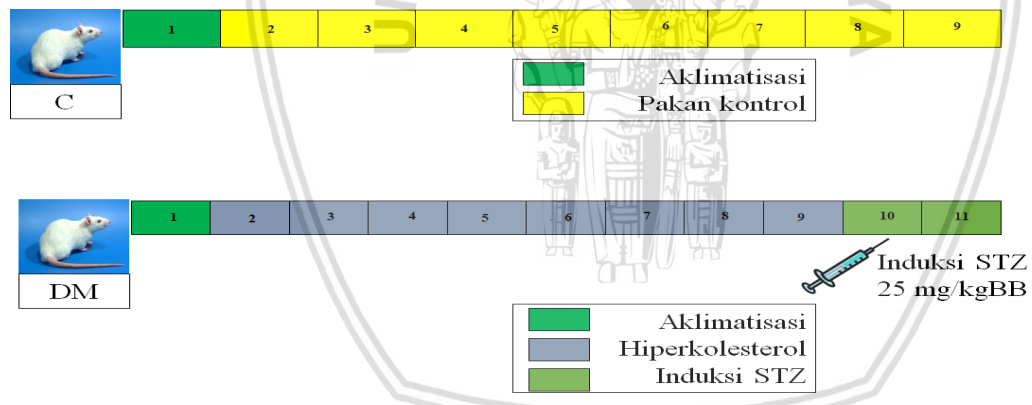
Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan agustus 2017 sampai Januari 2018. Lokasi penelitian di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Biologi Molekuler, Institut Biosains, Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.2 Kelaikan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Laik Etik oleh Komisi Etik Universitas Brawijaya dengan nomor sertifikat 417-KEP-UB Tahun 2015.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

Pelaksanaan kegiatan penelitian dari berbagai tahap yang dilaksanakan diuraikan sebagai berikut:



**Gambar 6.** Alur kegiatan penelitian. Aklimatisasi selama 1 minggu, selanjutnya kelompok kontrol diberi pakan kontrol sedangkan kelompok DMT2 diberi pakan diet tinggi kolesterol (Lampiran 1). Induksi STZ (25mg/kgBB) kelompok DMT2 setelah 1 minggu hiperkolesterol. Angka 1-11 menunjukkan waktu (dalam minggu).

##### 3.3.1 Pembuatan hewan coba DMT2

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan usia 2 bulan berjumlah 6 ekor diperoleh dari LPPT Gajah Mada dan diaklimatisasi selama 1 minggu. Pembuatan hewan coba model DM dilakukan pada kelompok perlakuan DM dengan pemberian diet tinggi kolesterol 2 bulan (Lampiran 1). Kadar kolesterol hewan coba diukur setiap 2 minggu sekali dengan *cholesterol stick*. Injeksi larutan STZ yang diberikan dengan dosis 25mg/kgBB dilakukan secara intravena steralis dengan spuit 1ml setiap 2 minggu

sekali dilakukan pengukuran kadar gula darah menggunakan *glucometer stick* melalui sampel darah yang diambil secara intravena ekor lateral.

### 3.3.2 Pembedahan dan Pengambilan organ

Pembedahan dilakukan dengan sterilisasi alat bedah dengan cara disemprot alkohol 70%. Masing – masing tikus didislokasi pada bagian leher, disemprot bagian ventral dengan alkohol 70%, dibedah dan diambil organ hati, ginjal, ileum, otak, paru-paru, otak dan jantung. Organ kemudian dicuci dengan PBS 10mM sebanyak 2 kali dan disimpan dalam 2 botol penyimpanan organ masing-masing berisi PBS 10mM dan Larutan Paraformaldehyde (PFA) 4% (Fatchiyah dkk., 2015).

### 3.3.3 Isolasi DNA

Sebanyak 0,1g masing-masing organ hati, ginjal, ileum, lambung, paru-paru, otak dan jantung digerus menggunakan mortar dan pistil yang dingin dan steril hingga halus. Sampel ditambahkan 0,5mL buffer lisis dicampur hingga homogenkan. Diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 jam setiap 30 menit di *mix gentle* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung 1,5mL steril yang baru dan ditambahkan larutan fenol-klorofom-Isoamil alkohol (25:24:1) sebanyak 1X volume. Lalu divortex sebentar dan dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tube 1,5mL yang baru dan ditambahkan larutan etanol absolut sebanyak 2,5X volume. Lalu dihomogenkan dengan mengocok tabung dan dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan 13.000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pada pelet yang tersisa ditambahkan 1X volume etanol 70%. Lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dikering-anginkan pada suhu ruang selama semalaman. Pelet yang telah dikering-anginkan dilarutkan dengan buffer TE pH 7,6 sebanyak 50 µL, diinkubasi pada *water bath* suhu 55°C selama 5 menit, lalu dihomogenkan dan dilakukan spindown. DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C (Fatchiyah dkk., 2011; Sambrook dan Russell, 2012.).

### 3.3.4 Uji kuantitatif dan kualitatif DNA

Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prinsip kerja spektrofotometer adalah radiasi sinar UV yang diserap oleh DNA dalam larutan. Kemurnian DNA dilihat dengan membagi nilai OD260 (*optical density* 260) dengan OD280 (*optical density* 280). DNA isolat dikatakan murni jika rasio kedua OD tersebut berkisar antara 1,8-2,0 (Fatchiyah dkk., 2011). Sampel DNA sebanyak 1µL dimasukkan dalam kuvet dan dibaca dengan spektrofotometer. Data kemurnian dan konsentrasi dicatat. Sampel dikualifikasi

menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Ethidium Bromida (EtBr) sebanyak 1 $\mu$ l ditambahkan serta dicampurkan hingga homogen, selanjutnya dituang larutan ke dalam cetakan dan didiamkan hingga mengeras. Gel yang sudah tercetak dimasukkan ke dalam *chamber* dan diberi buffer TBE 1x pH 8. Sampel DNA dan *loading dye* perbandingan 1:1 dicampur di atas kertas parafilm dan dimasukkan ke dalam sumuran pada gel. Sampel tersebut dielektroforesis pada 50volt selama sekitar 60 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan UV transiluminator *GelDoc*. Gel agarose dimasukkan kedalam alat UV transiluminator. Disimpan gambar hasil pembacaan pada komputer dan dianalisis (Fatchiyah dkk., 2011).

### 3.3.5 Amplifikasi gen IL-10

PCR *mix solution* dibuat untuk 10 $\mu$ l dilakukan dengan memasukkan 3,5 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 5 $\mu$ l *Go Taq Green* (Promega), 0,5 $\mu$ l primer *forward* 10pmol, 0,5 $\mu$ l primer *reverse* 10pmol dan 0,5 $\mu$ l sampel (100ng/ $\mu$ l) ke dalam PCR *tube*, lalu dihomogenasi menggunakan *mix gentle finger*. Primer yang digunakan untuk analisis gen IL-10 diambil dari sekuen exon 1 pada NCBI dengan gen ID NC\_005111.4 region 47738933-4774392. IL-10-Forward 5'ATAAAAGGGGGA CACCGGGC3' dan IL-10-reverse 5'CTCATAACCCATGGCTTGGC 3'. Sampel dimasukkan dalam mesin PCR dan diatur program PCR untuk 1 siklus dengan *hot start* pada 95°C selama 5 menit, kemudian 35 siklus dengan denaturasi pada 95°C selama 45 detik, *annealing* pada 57°C selama 45 detik, ekstensi pada 72°C selama 45 detik, dilanjutkan 1 siklus ekstensi akhir pada 72°C selama 7 menit. Produk PCR disimpan pada suhu -20°C (Fatchiyah dkk., 2011)

### 3.3.6 Uji kualitatif Produk PCR

Uji kualitatif DNA yang teramplifikasi, menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% pada 50volt selama 60 menit. Pengamatan gel yang telah dielektroforesis dapat dilakukan dengan *Chemidoc Gel Imaging* (Fatchiyah dkk., 2011).

### 3.3.7 Purifikasi PCR

Produk DNA hasil PCR diambil 40 $\mu$ l dan dimasukkan dalam *microtube* steril 1,5mL. Ditambahkan aquades steril sebanyak 1X volume dan dilakukan *mix gentle finger*. Selanjutnya ditambahkan larutan fenol sebanyak 1X volume dan di *vortex* selama 1 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13000rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Supernatan diambil dengan *micropipet* dan dipindahkan kedalam *microtube* steril 1,5mL yang baru. Selanjutnya ditambahkan larutan klorofom sebanyak 1Xvolume dan di *vortex* selama 1 menit. Setelah itu, disentrifugasi kembali sampel dengan kecepatan 13000rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Supernatan yang dihasilkan dimasukkan kedalam *microtube* steril 1.5mL yang baru.



Larutan ditambahkan NaOAc 3M pH 5,2 sebanyak 0,1X volume dan etanol absolut dingin sebanyak 2,5X volume. Inkubasi sampel selama 60 menit pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kemudian disentrifugasi sampel dengan kecepatan 13000rpm selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan yang terbentuk diambil dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 $\mu\text{l}$ . Sentrifugasi kembali sampel dengan kecepatan 13000rpm selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan buffer TE 1x pH 7,6 sebanyak 25 $\mu\text{l}$  dan di simpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sampel DNA yang diperoleh, dikualifikasi menggunakan gel agarosa 1,5%. Selanjutnya pita DNA yang terbentuk dapat dilihat menggunakan *Chemidoc Gel Imaging* (Fatchiyah dkk., 2011).

### 3.3.8 Sequencing Gen IL-10

Hasil purifikasi PCR diambil 5 $\mu\text{l}$  dalam *microtube* steril 1,5mL. Primer yang sama saat proses PCR sebanyak 5 $\mu\text{l}$  dimasukkan kedalam *microtube*. Selanjutnya ditambahkan dNTPS, fluoresen berlabel ddNTPS, *amplytaq FS polymerase enzyme*, dan buffer. Homogenasi sampel dengan *mix gentle finger*. Setelah itu, sampel di amplifikasi dengan *thermocycler*. Hasil amplifikasi tersebut kemudian dimasukkan kedalam mesin *sequencing* ABL PRIMS 3730 DNA *Sequencer* (Pareek dkk., 2011).

### 3.3.9 Analisis Data

Data hasil *sequencing* selanjutnya disejajarkan menggunakan program *BioEdit ver 7.2*. Kemudian dianalisis perubahan profil gen dari IL-10 tikus DMT2 dibandingkan dengan kelompok kontrol .

### 3.3.10 Isolasi Protein

Sampel masing-masing organ hati, ginjal, ileum, lambung, paru-paru, otak dan jantung ditimbang sebanyak 0,1gr, kemudian dicuci dengan PBS 10mM pH 7,4 sebanyak 3x, dilanjutkan dengan homogenasi dalam mortar dingin. Homogenat yang terbentuk ditambah 0,5mL buffer ekstrak dan dimasukkan dalam tabung Eppendorf 1,5mL. Homogenat dalam tabung disentrifugasi pada kecepatan 10.000rpm suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, supernatan diambil, diukur konsentrasinya menggunakan nanodrop spektrofotometer. Sampel Protein disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Fatchiyah dkk., 2011).

### 3.3.11 Analisis Experion pro260

Pewarna gel dipreparasi dengan melarutkan *stain* (ST) 4 $\mu\text{L}$  dan pelarut (GT) 104 $\mu\text{l}$ . Larutan (GS) tersebut di *vortex* selama 10 detik. Sebanyak 108 $\mu\text{l}$  GS dipindahkan ke tabung yang terdapat filter dan disentrifugasi 10.000g selama 5 menit pada suhu ruang. Filtrat GS siap digunakan. *Reducing sample buffer* (RSB) disiapkan dengan menambah 1 $\mu\text{l}$  merkaptoethanol dalam 30 $\mu\text{l}$  *Reducing buffer* (RB) di *vortex* dan di *spindown*. Sampel dan *ladder* disiapkan

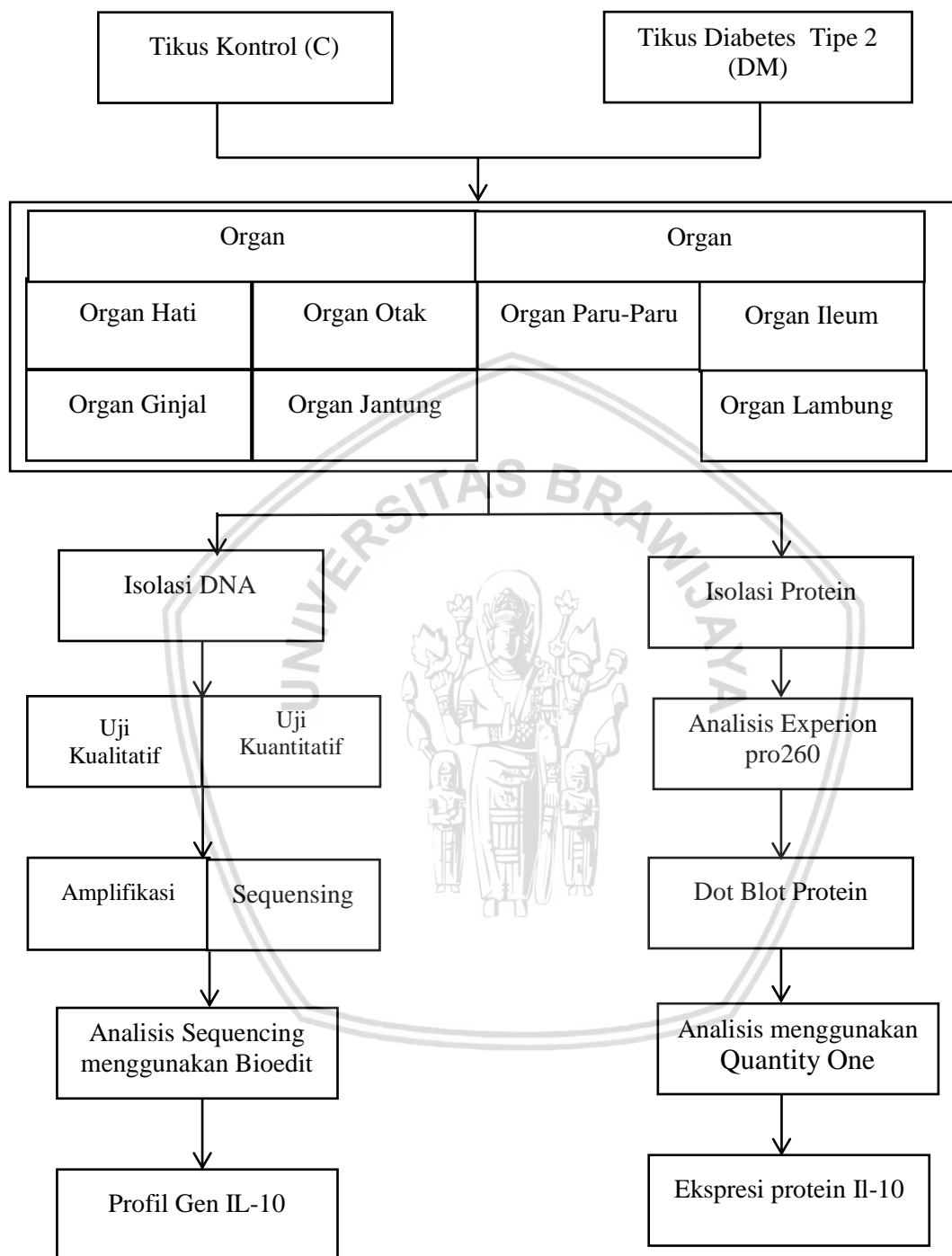
dengan menambahkan 2µl RB pada 4µl sampel dan 2µl RB pada 4µl *ladder*, *divortex* dan *dispindown* selama 30 detik dan diinkubasi 100°C selama 5 menit. Sampel dan *ladder* ditambah 84µl aquabides steril dan di *mix gentle*. *Loading* sampel dilakukan dengan memasukkan 12µl GS ke *well* GS dan dilakukan priming. Selanjutnya 12µl GS pada *well* GS, 12µl filtrat G pada *well* G, 6µl *Ladder* dan 6µl sampel pada masing-masing *well* (Catalog Bio-Rad®, Hercules, CA).

### 3.3.12 Dot Blot Protein

Protein diencerkan dengan pelarut Tris-Cl sehingga mendapatkan konsentrasi yang sama. Membran PVDF direndam dengan metanol lalu dicuci menggunakan aquades dan diletakan dalam alat dot blot. Sampel protein dimasukan dalam membran yang terletak pada alat dot blot dan degasi selama 30 menit. Kemudian diblocking menggunakan PBS skim 5% selama satu jam, setelah itu dibersihkan dan dicuci menggunakan PBS Tween 20% selama 3x3 menit. Diinkubasi menggunakan antibodi Primer IL-10 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dalam TBS selama 2 jam sambil digoyang. Dicuci menggunakan PBST selama 3x3 menit, kemudian diinkubasi menggunakan Anti Rabbit IgG *Alkaline Phospate* (AP) 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dalam TBS selama 1 jam sambil digoyang. Dicuci menggunakan PBST sebanyak 3x3 menit, diinkubasi dengan substrat berupa *western blue substrat solution* selama 30 menit reaksi dihentikan dengan memberikan aquades. Densitas kespesifikan antibodi diukur dengan *software Quantity One* (Fatchiyah dkk., 2011; Rohmah dkk., 2013; Biorad, 2018).



### 3.4 Kerangka Operasional Penelitian



**Gambar 7.** Kerangka Operasional penelitian

Pelaksanaan penelitian ini menggunakan metode *in vivo*, hewan coba yang digunakan berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan strain winstar kontrol (C) dan model diabetes melitus tipe 2 (DM). Preparasi dimulai dengan membedah tikus model dan menyimpan dari organ (ginjal, hati, otak, lambung, paru-paru, ileum dan jantung) di suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk

dilanjutkan pada tahap pengambilan data fisiologis. Proses pengambilan data dilaksanakan isolasi DNA, uji kualitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian uji kualitatif menggunakan gel agarosa 0,8%, amplifikasi dan DNA sequencing menggunakan primer IL-10, hasil sequencing dibaca menggunakan *software bioedit*. Untuk profil protein dimulai dengan isolasi protein organ, kemudian analisis experion pro260, untuk menentukan ekspresi IL-10 dengan protein jaringan di isolasi dengan menggunakan dot blot protein. Hasil protein diukur menggunakan *software quantity one*.



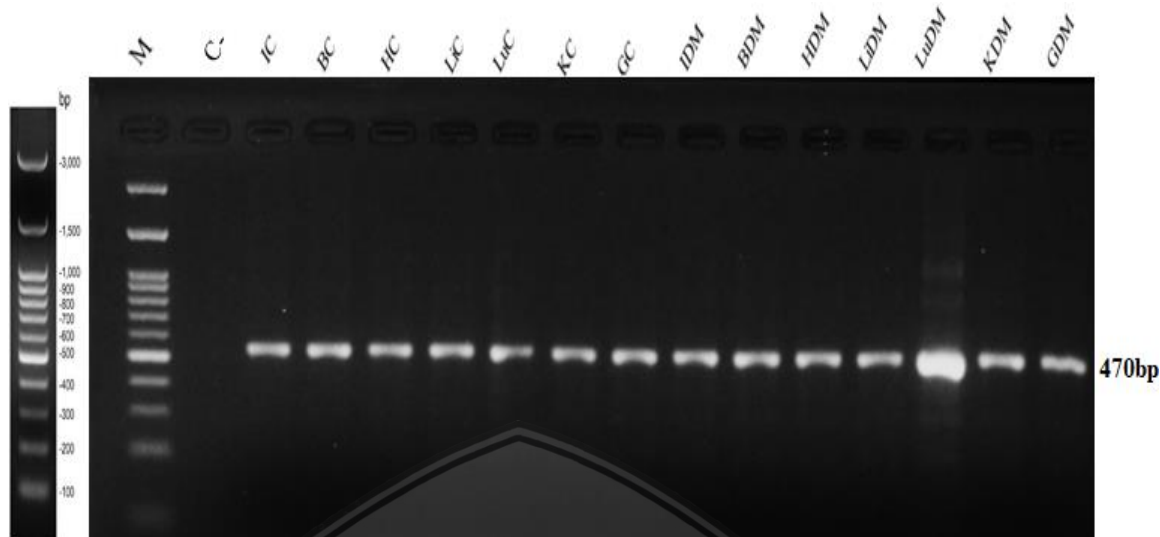
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Amplifikasi DNA organ menggunakan gen IL-10

DNA hasil isolasi dari organ tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar di uji kuantitatif sebelum di analisis selanjutnya. Uji kuantitatif menggunakan nanodrop spektrofotometer menunjukkan hasil konsentrasi DNA yang sangat bervariasi (Lampiran 4). Pada kelompok kontrol (C) ileum (IC) 2661,63ng/μL, otak (BC) 2613,42ng/μL, jantung (HC) 998,98ng/μL, hati (LiC) 1241,48ng/μL, paru-paru (LuC) 555,91ng/μL, ginjal (KC) 1909,72ng/μL, lambung (GC) 1189,95ng/μL. Pada kelompok diabetes melitus tipe 2 (DMT2) ileum (IDM) 1911,35ng/μL, otak (BDM) 205,25ng/μL, jantung (HDM) 978ng/μL, hati (LiDM) 3255,98ng/μL, paru-paru (LuDM) 1237,66ng/μL, ginjal (KDM) 231,08ng/μL, lambung (GDM) 4026,05ng/μL dengan konsentrasi terendah pada organ otak (BDM) yaitu 205,25ng/μL dan yang paling tertinggi lambung (GDM) 4026,05ng/μL. Tingkat kemurnian DNA yang diperoleh dari isolasi organ tikus diperoleh antara 1,79 sampai 2,06 nilai konsentrasi ini menunjukkan DNA yang hasil isolasi murni sesuai dengan standar kemurnian DNA yaitu 1,80-2,0 dan digunakan analisis selanjutnya (Fatchiyah dkk., 2011; Gathak dkk., 2013). DNA hasil isolasi di uji kualitasnya menggunakan gel elektroforesis 0,8%, diperoleh pita yang muncul berada diatas marker 1kb (Lampiran 4).

Amplifikasi DNA menggunakan gen IL-10 menunjukkan adanya pita yang yang terbentuk, pita yang terbentuk menunjukkan semua organ yang yang di PCR berhasil teramplifikasi dengan sempurna. Sekuen gen IL-10 yang di uji kualitasnya menggunakan gelelektroforesis 1,5% menunjukkan besar basa nukleotida yaitu sekitar 470bp (Gambar 8). Keberhasilan dalam amplifikasi gen IL-10 dipengaruhi oleh suhu *anaelning* yang yang tepat dalam melakukan amplifikasi.

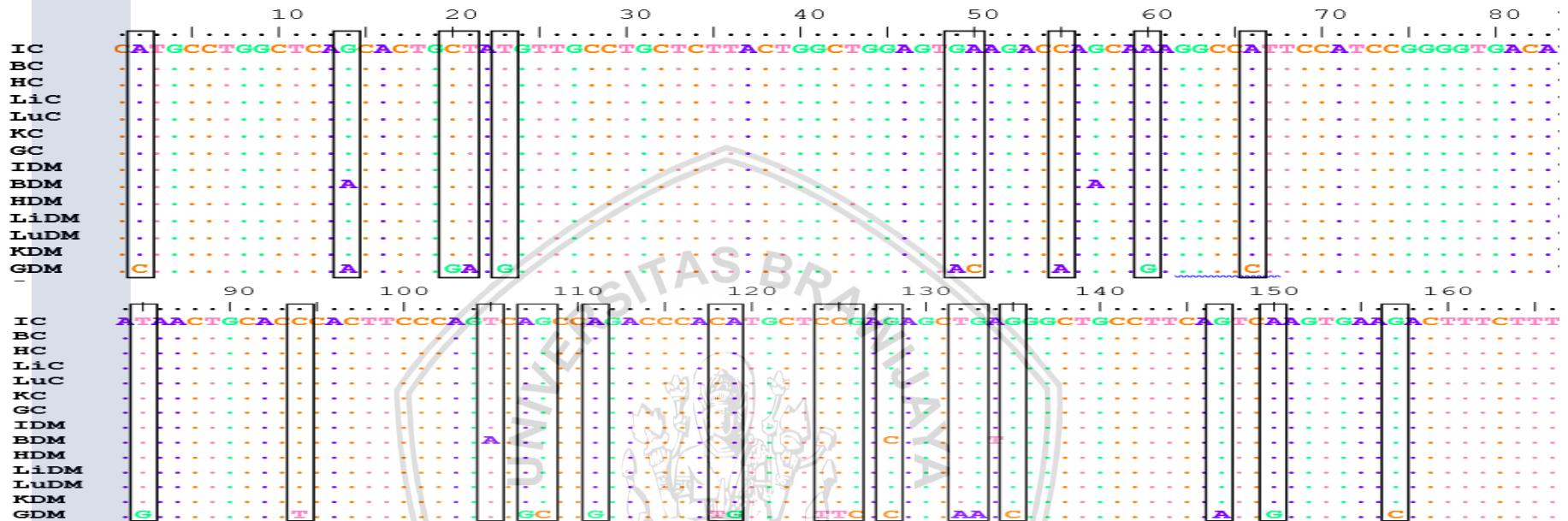


**Gambar 8.** Uji kualitatif DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer IL-10. Marker DNA loader 100bp (M). Kelompok tikus kontrol (ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok tikus model DMT2 (ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM)).

PCR produksi untuk di sekuensing, sampel hati diambil dan digunakan untuk gradien temperatur ( $53^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $57^{\circ}\text{C}$ ,  $59^{\circ}\text{C}$ ,  $61^{\circ}\text{C}$ ) untuk menentukan suhu *annealing* yang paling tepat untuk gen IL-10 dan diperoleh hasil terbaik amplifikasi pada suhu  $57^{\circ}\text{C}$ . Selain itu desain primer IL-10 yang dibuat memiliki komposisi basa G dan C dalam primer yang berjumlah 40-60% (Fatchiyah dkk., 2011).

#### 4.2 Sekuensing dan pensejajaran Sekuen Gen IL-10

DNA yang telah teramplifikasi dipurifikasi dengan fenol dan kloroform. Sampel hasil purifikasi tersebut selanjutnya diterjemahkan dengan metode Sanger *sequencing* pada ABI PRIMS 3730xl DNA *Sequencer* (Koein, Jerman). Penerjemahan basa nukleotida gen IL-10 pada kelompok kontrol dan DMT2 untuk mengetahui susunan basa nukleotida dari kedua kelompok tersebut untuk dianalisis. Hasil *sequencing* gen IL-10 dari kelompok kontrol dan kelompok DMT2 disejajarkan dengan sekuen gen IL-10 dari NCBI (Gambar 9).



BDM	G14→A14, G57→A57, T105→A105, G128→C128, G135→T135, G147→A147, A150→G150, G157→C157
GDM	A2→C2, G14→A14, C20→G20, T21→A21, T23→G23, G49→A49, A50→C50, C55→A55, A60→G60, A66→C66, T85→G85, C94→T94, A107→G107, G108→C108, A111→G111, C118→T118, A119→G119, C124→T124, C125→T125, G126→C126, G128→C128, T132→A132, G133→A133, G135→C135, G147→A147, A150→G150, G157→C157

**Gambar 9.** Profil gen IL-10 pada Tikus (*Rattus norvegicus*) model DMT2. Pensejajaran Gen IL-10 menggunakan software bioedit. Mutasi gen IL-10 kelompok DMT2 pada organ Otak dan Lambung. Kelompok tikus kontrol (ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok tikus DMT2 (ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM)). Warna kuning menunjukkan adanya mutasi yang sama organ BDM dan GDM, warna hijau menunjukkan mutasi yang sama tetapi basa yang termutasi berbeda.

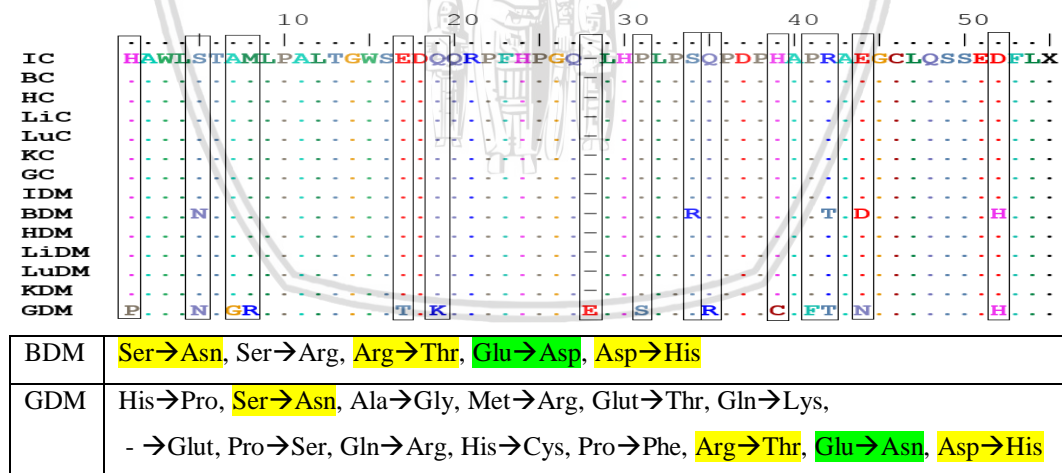
Pensejajaran sekuen gen IL-10 exon 1 166bp menunjukkan adanya mutasi pada kelompok DMT2 khususnya organ otak (BDM) ditemukan delapan mutasi dan organ lambung (GDM) ditemukan dua puluh tujuh basa nukleotida (Gambar 9). Sedangkan pada organ ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC), ileum (IDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM) tidak ditemukan mutasi. Terdapat lima kesamaan mutasi yang ditemukan pada BDM dan GDM lima mutasi yaitu  $G_{14} \rightarrow A_{14}$ ,  $G_{128} \rightarrow C_{128}$ ,  $G_{147} \rightarrow A_{147}$ ,  $A_{150} \rightarrow G_{150}$ ,  $G_{157} \rightarrow C_{157}$ . Mutasi pada BDM adalah  $G_{57} \rightarrow A_{57}$ ,  $T_{105} \rightarrow A_{105}$ ,  $G_{135} \rightarrow T_{135}$  sedangkan mutasi pada GDM  $A_2 \rightarrow C_2$ ,  $C_{20} \rightarrow G_{20}$ ,  $T_{21} \rightarrow A_{21}$ ,  $T_{23} \rightarrow G_{23}$ ,  $G_{49} \rightarrow A_{49}$ ,  $A_{50} \rightarrow C_{50}$ ,  $C_{55} \rightarrow A_{55}$ ,  $A_{60} \rightarrow G_{60}$ ,  $A_{66} \rightarrow C_{66}$ ,  $T_{85} \rightarrow G_{85}$ ,  $C_{94} \rightarrow T_{94}$ ,  $A_{107} \rightarrow G_{107}$ ,  $G_{108} \rightarrow C_{108}$ ,  $A_{111} \rightarrow G_{111}$ ,  $C_{118} \rightarrow T_{118}$ ,  $A_{119} \rightarrow G_{119}$ ,  $C_{124} \rightarrow T_{124}$ ,  $C_{125} \rightarrow T_{125}$ ,  $G_{126} \rightarrow C_{126}$ ,  $T_{132} \rightarrow A_{132}$ ,  $G_{133} \rightarrow A_{133}$ ,  $G_{135} \rightarrow C_{135}$  (Gambar 9).

Mutasi yang terjadi pada BDM merupakan jenis mutasi *substitusi transvers* dan *substitusi transisi*, terjadi perubahan basa nukleotida pada beberapa urutan sekuen gen digantikan dengan basa nukleotida yang lainya (Gambar 9) (Saitou, 2013). Mutasi ini sekitar 5% dari total sekuen DNA exon 1 IL-10, mutasi ini menyebabkan meningkatnya sitokin proinflamasi sebagai mediator kerusakan organ karena menurunkan kinerja sitokin anti-inflamasi IL-10 (Kierzebaum, 2016). Meningkatnya sitokin pro-inflamasi dapat menyebabkan gangguan sistem saraf, pada penelitian ini menunjukkan adanya korelasi antara penyakit DMT2 dengan kerusakan sistem saraf. Menurut (Nordisk, 2013) total penderita DMT2 68% mengalami komplikasi berupa gangguan sistem saraf (neuropati). Tingginya konsentrasi gula dalam darah dapat merusak dinding pembuluh darah kapiler yang terdapat pada jaringan tubuh yang memiliki fungsi sebagai suplai makan saraf. Menyebabkan sel schwann saraf perifer mengalami kerusakan karena sel schwan saraf perifer tidak mereduksi transportasi glukosa yang berlebihan dari darah ke dalam sel (ADA, 2017; Elaziz dkk., 2014; King, 2012; Ndraha, 2014). Rika dan Fatchiyah (2017) melaporkan pada otak kelompok DMT2 menunjukkan penurunan proliferasi sel dan apoptosis sel, hal ini sangat berpengaruh terhadap fungsi kerja dari mikroglia sel pada sistem saraf pusat. Ketika terjadi inflamasi pada jaringan otak direspon dengan nekrosis yang dipicu oleh meningkatnya sitokin seperti TNF-



$\alpha$  pada jaringan melalui tahap Piknosis, karyoreksis dan karyolisis (Kierzebaum, 2016).

Mutasi yang terjadi pada GDM merupakan jenis mutasi *Substitusi transisi* dan *substitusi transversi* dengan jumlah mutasi sekitar 16% dari total sekuen DNA (ambar 9) (Saitou, 2013). Mutasi yang terjadi pada lambung DMT2 (GDM) menyebabkan penurunan efektifitas kinerja IL-10 sebagai sitokin anti-inflamasi sehingga terjadi peningkatan mediator proinflamasi TNF- $\alpha$  meningkatkan kerusakan organ pada lambung. Hasil Penelitian (Tseng, 2016) pada penderita DM dapat meningkatkan resiko kanker pada lambung, dikarenakan insulin yang digunakan tidak berefek terhadap mukosa lambung (Tseng, 2016). Ekspresi IL-10 pada lambung untuk melawan inflamasi. IL-10 memiliki fungsi sebagai pengatur homeostasis dari mukosa lambung dan menghambat perkembangan metaplasia mukosa. Ketika terjadi DMT2 pada lambung dapat menurunkan fungsi IL-10 sebagai pengatur homeostasis dan metaplasia mukosa. Oleh karena itu, penyelidikan lebih lanjut mengenai peran epitel IL-10 pada jaringan lambung sangat dibutuhkan.



**Gambar 10.** Pensejajaran asam amino terjemahan gen IL-10. Kelompok tikus kontrol (ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok tikus model DMT2 (ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM)). Warna kuning menunjukkan adanya mutasi yang sama organ BDM dan GDM, warna hijau menunjukkan mutasi yang sama tetapi basa yang termutasi berbeda

Mutasi yang terjadi pada BDM dan GDM menyebabkan *frameshift mutation* asam amino (Gambar 10). Persamaan tiga mutasi yang terjadi pada organ otak (BDM) dan organ lambung (GDM) berpengaruh terhadap susunan asam amino yaitu dapat menginduksi asam amino (Ser-Arg-Asp) mengalami perubahan menjadi Asn-Thr-His. Sedangkan pada asam amino empat puluh empat BDM dan GDM mengalami *frameshift mutation* asam amino tetapi asam amino yang terbentuk berbeda BDM (Glu→Asp), GDM (Glu→Asn). Mutasi lain pada BDM juga menginduksi perubahan asam amino Ser menjadi Arg dan pada GDM menginduksi asam amino (His-Ala-Met-Glut-Gln-Pro-Gln-His-Pro) menjadi Pro-Gly-Arg-Thr-Lys-Ser-Arg-Cys-Phe. Pada studi ini ditemukan asam amino baru yaitu pada nomor dua puluh delapan dengan asam amino Glut pada GDM yang tidak ditemukan pada organ kedua kelompok (Gambar 10).

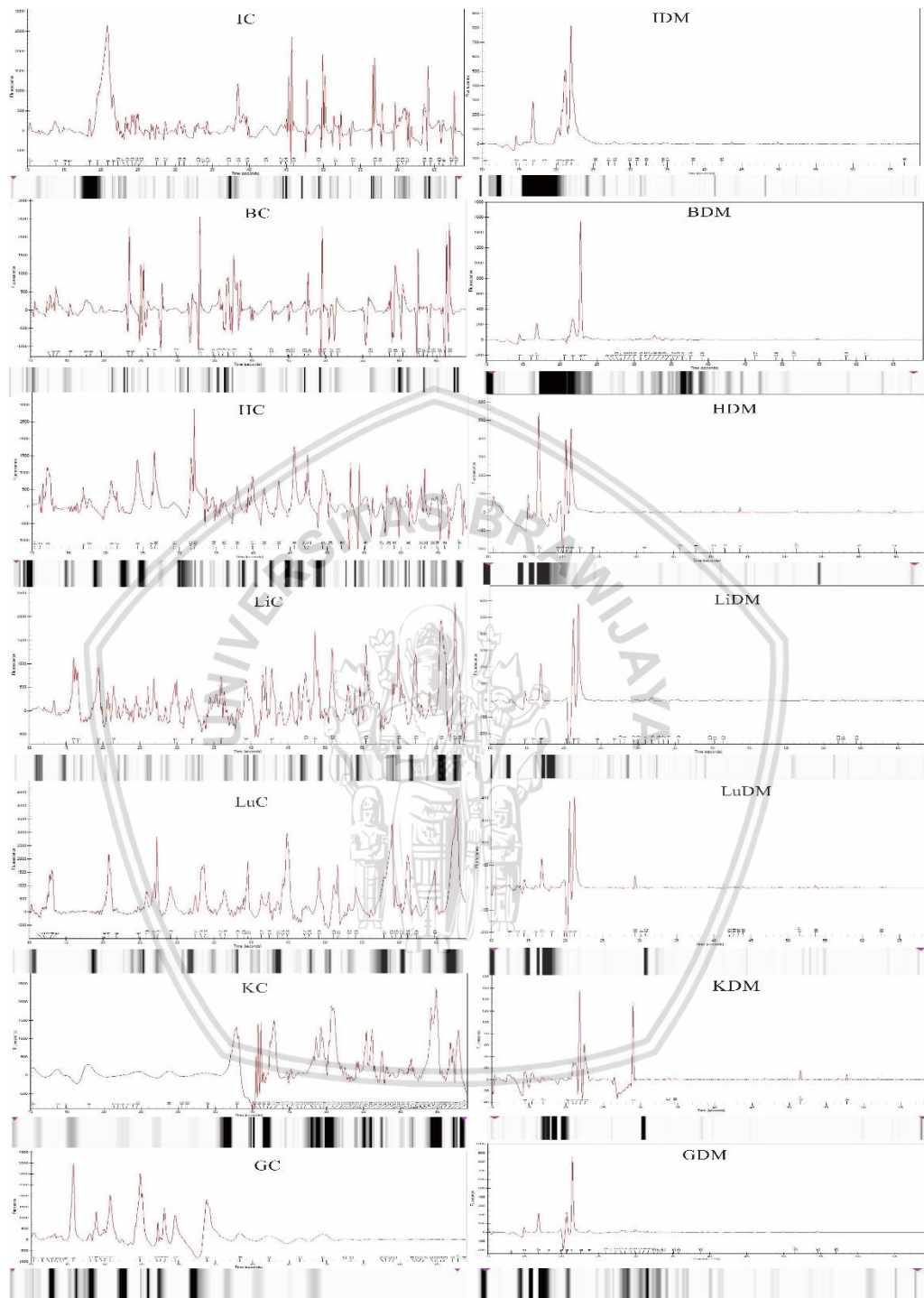
Kryukov dkk. (2007) menyimpulkan bahwa 20% mutasi baru pada manusia mengakibatkan hilangnya fungsi, sedangkan 53% memiliki efek merugikan dan 27% netral secara efektif berhubungan dengan fenotipe. Pada studi ini diperoleh mutasi yang terjadi pada organ BDM maupun organ GDM tidak menonaktifkan fungsi gen IL-10 tersebut tetapi menurunkan kinerja sebagai anti-inflamasi pada kondisi DMT2.

Pada studi ini pembuatan hewan model DMT2 dengan pemberian STZ 25mg/kgBB dengan asumsi pembuatan hewan model penyakit metabolik tidak dibuat hewan model secara genetik. Pembuatan hewan coba model DMT2 secara genetik, paling banyak menggunakan program *knockout* sistem. Program ini dapat secara efisien meregulasi kerusakan metabolisme pada hewan coba sehingga mengalami intoleransi glukosa (Betran dan Hanson, 2001).

### 4.3 Profil Pita Protein Organ

Profil pita protein yang ditemukan dari kelompok tikus kontrol (C) dan kelompok tikus DMT2 menunjukkan hasil yang berbeda (Gambar 11). Ileum (IC) 43 pita, otak (BC) 38 pita, jantung (HC) 36 pita, hati (LiC) 38 pita, paru-paru (LuC) 40 pita, ginjal (KC) 63 pita, lambung (GC) 39 pita, Ileum (IDM) 19 pita, otak (BDM) 31 pita, jantung (HDM) 17 pita, hati (LiDM) 25 pita, paru-paru (LuDM) 19

pita, ginjal (KDM) 13 pita, lambung (GDM) 28 pita. Pita yang tersparasi pada kelompok tikus kontrol (C) dan kelompok tikus DMT2 menunjukkan jumlah pita yang berbeda, secara keseluruhan terlihat jumlah pita protein yang terbentuk pada kelompok kontrol lebih banyak dibandingkan dengan pita protein pada kondisi DMT2. Perbedaan pita yang tersparasi pada gel menunjukkan bahwa pada organ dalam kondisi DMT2 mengalami kehilangan beberapa pita protein jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada IDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 8kDa, 12kDa, 13kDa, 14kDa, 15kDa, 16kDa, 40kDa, 41kDa, 46kDa, 47kDa, 89kDa, 108kDa, 137kDa, 144kDa, 216kDa, sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentuk dengan berat molekul sekitar 4kDa, 20kDa, 37kDa, 65kDa, 75kDa, 150kDa, 239kDa, 249kDa yang tidak ditemukan pada IC (Tabel 1). Pada BDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 2kDa, 5kDa, 8kDa, 12kDa, 13kDa, 14kDa, 16kDa, 18kDa, 20kDa, 34kDa, 40kDa, 79kDa, 100kDa, 198kDa, 203kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentuk dengan berat molekul sekitar 6kDa, 7kDa, 9kDa, 10kDa, 25kDa, 27kDa, 29kDa, 31kDa, 33kDa, 35kDa, 43kDa, 47kDa, 48kDa, 51kDa, 55kDa, 59kDa, 65kDa, 72kDa, 75kDa, 83kDa, 93kDa, 108kDa, 190kDa, 228kDa yang tidak ditemukan pada BC (Tabel 1). Pada HDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 2kDa, 3kDa, 10kDa, 11kDa, 12kDa, 14kDa, 15kDa, 16kDa, 18kDa, 35kDa, 41kDa, 42kDa, 47kDa, 59kDa, 79kDa, 104kDa, 117kDa, 139kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentuk dengan berat molekul sekitar 4kDa, 5kDa, 6kDa, 7kDa, 8kDa, 77kDa, 97kDa, 120kDa, 136kDa, 157kDa yang tidak ditemukan pada HC (Tabel 1). Pada LiDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 9kDa, 12kDa, 13kDa, 41kDa, 47kDa, 60kDa, 105kDa, 123kDa, 137kDa, 201kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentuk dengan berat molekul sekitar 6kDa, 7kDa, 8kDa, 26kDa, 29kDa, 39kDa, 43kDa, 57kDa, 70kDa, 112kDa, 126kDa, 131kDa, 159kDa yang tidak ditemukan pada LiC (Tabel 1).



**Gambar 11.** Profil protein berdasarkan berat molekul protein dengan Menggunakan Experion pro260. Kelompok tikus kontrol (Ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok Tikus model DMT2 (Ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM)).

**Tabel 1.** Profil Pita Protein Kelompok Tikus kontrol (C) dan Kelompok Tikus DMT2 (DM)

NO PITA	Berat Molekul (kDa) Kelompok Kontrol (C)							Berat Molekul (kDa) Kelompok DMT2 (DM)						
	IC	BC	HC	LiC	LuC	KC	GC	IDM	BCM	HDM	LiDM	LuDM	KDM	GDM
1	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260
2	216,61	203,3	139,64	201,2	134,4	204,18	200,46	249	228,09	159	159	158,13	260	252,6
3	144,46	198,3	117,21	138,9	130,2	176,26	137,7	239	190,37	136,2	138,8	149,81	177,94	235,2
4	134,72	100,2	104,4	137,5	128,3	152,34	131,16	150	108,48	120,6	131,8	138,57	165,76	215,3
5	108,72	79,5	79,66	123,21	100,35	138,6	115,9	75	93,12	97,29	126,5	42,58	118,72	175
6	89,67	40,6	59,73	105,3	59,45	132,03	109,36	65,6	83,37	77	112,3	39,8	108,2	150,1
7	47,47	34,6	47,28	83,3	58,7	116,7	74,11	37	75,16	44,19	83,3	34,9	99,64	117,2
8	47,12	20,4	44,1	60,03	50,56	102,46	49,94	20	72,82	19,3	70,3	24	94,12	100,6
9	46,16	18,41	42,81	47,1	43,23	49,99	49,5	19,4	65,22	17,4	57,2	21	85,2	95,8
10	41,71	18,39	41,27	44,98	43,1	48,57	49,06	17	65,16	13,01	44,2	19,3	71,98	91
11	40,58	18,34	35,57	44,57	37,65	48,13	43,88	11,5	59,41	8,91	43,2	18,3	68,4	88,6
12	19,92	18,32	19,39	44,1	35,67	47,6	43,18	10	55,2	7,28	39,1	17	65,9	86,2
13	19,3	18,2	18,97	41,2	27,3	47,25	42,48	7,8	51,37	6,32	29,2	10,8	63,21	72,9
14	18,69	16,78	18,71	19,2	20,1	45,93	41,86	7	48,64	5,7	26,1	7,4	61,53	70,1
15	17,79	16,45	18,16	18,67	19,9	45,49	19,76	5,5	47,41	5,23	19,3	6,2	58,82	54,2
16	17,48	16,3	18,08	18,5	19,56	43,9	19,51	5	43,41	4,9	17,6	5,4	54,77	49
17	17,35	15,7	17,67	18,21	19,32	43,55	18,73	4,8	35,29	1,2	14	3	52,41	35,5
18	16,78	15,34	17,11	18,1	19,01	42,58	17,91	4,4	33,35		11	2,7	50,39	21,8
19	16,11	14,9	16,59	17,97	18,56	41,52	16,79	4,1	31,4		8,9	1,2	46,5	19
20	15,79	14,79	16,16	17,89	18,03	40,29	15,74	1,2	29,18		7,3		43,77	17,8
21	15,45	14,66	15,6	14,56	17,56	39,32	14,54		27,24		6,3		41,87	11,6
22	14,67	14,56	15,14	13,97	17,04	37,91	13,4		25,57		5,6		33,25	10



NO PITA	Berat Molekul (kDa) Kelompok Kontrol (C)							Berat Molekul (kDa) Kelompok DMT2 (DM)						
	IC	BC	HC	LiC	LuC	KC	GC	IDM	BCM	HDM	LiDM	LuDM	KDM	GDM
23	14,56	14,1	14,76	13,45	16,9	20,56	13,01		19,21		2,4		31,5	6,7
24	14,35	13,8	14,06	13,2	16,54	19,94	12,86		17,3		1,3		19,3	6,1
25	13,85	13,56	13,95	12,9	16,32	19,77	12,77		15		1,2		17,6	5,5
26	13,69	13,45	13,34	12,7	16,23	19,66	12,14		11,33				9,9	5,1
27	13,17	12,07	12,63	12,5	16,1	19,53	11,07		10,73				7,37	2,3
28	12,87	11,9	12,54	12,02	15,9	19,41	10,85		9,48				6,94	1,2
29	12,2	11,23	12,01	11,21	15,89	19,32	10,76		7,96				6,15	
30	12,05	11,2	11,27	9,66	15,65	19,11	10,55		6,37				4,3	
31	11,97	11,01	11,07	9,56	12,89	19,03	10,36		1,2				1,2	
32	11,83	8,44	10,27	9,3	12,54	18,85	8,6							
33	11,75	5,88	10,06	8,44	11,73	18,73	6,2							
34	11,47	2,55	3,54	5,88	6,68	18,66	5,55							
35	11,3	2,45	2,12	2,67	6,54	18,5	5,12							
36	11,09	2,3	1,2	2,35	6,34	18,4	4,54							
37	10,73	1,2		2,3	5,89	18,05	4,17							
38	10,44			1,2	4,3	17,96	2,8							
39	8,48				1,2	17,85	1,2							
40	8,38					17,59								
41	7,83					17,46								
42	5,96					17,31								
43	1,2					16,97								
44						16,84								
45						16,73								



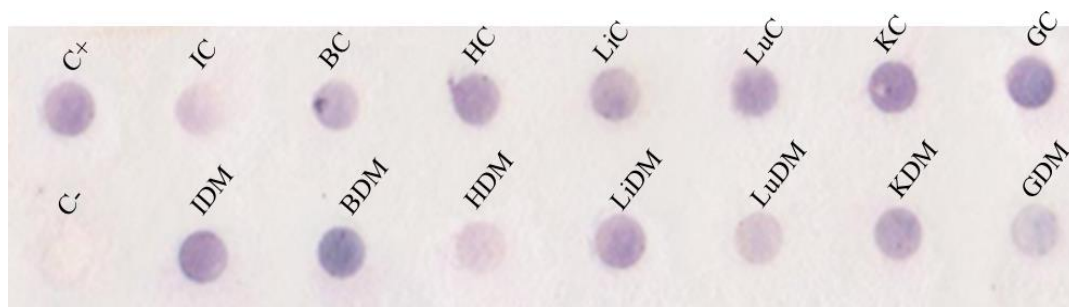
NO PITA	Berat Molekul (kDa) Kelompok Kontrol (C)							Berat Molekul (kDa) Kelompok DMT2 (DM)						
	IC	BC	HC	LiC	LuC	KC	GC	IDM	BCM	HDM	LiDM	LuDM	KDM	GDM
46						16,59								
47						16,51								
48						16,41								
49						15,62								
50						14,59								
51						13,83								
52						13,65								
53						13,18								
54						12,04								
55						11,91								
56						11,64								
57						11,56								
58						11,33								
59						11,22								
60						10,3								
61						7,32								
62						5,72								
63						1,2								

Pada LuDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 4kDa, 11kDa, 12kDa, 15kDa, 16kDa, 20kDa, 27kDa, 35kDa, 37kDa, 43kDa, 50kDa, 58kDa, 59kDa, 100kDa, 128kDa, 130kDa, 134kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentung dengan berat molekul sekitar 2kDa, 3kDa, 10kDa, 21kDa, 24kDa, 34kDa, 39kDa, 42kDa, 138kDa, 149kDa, 158kDa yang tidak ditemukan pada LuC (Tabel 1). Pada KDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 5kDa, 11kDa, 12kDa, 13kDa, 14kDa, 15kDa, 16kDa, 20kDa, 37kDa, 39kDa, 40kDa, 41kDa, 42kDa, 43kDa, 45kDa, 47kDa, 48kDa, 49kDa, 102kDa, 116kDa, 132kDa, 138kDa, 152kDa, 176kDa, 201kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentung dengan berat molekul sekitar 4kDa, 6kDa, 9kDa, 31kDa, 33kDa, 61kDa, 68kDa yang tidak ditemukan pada KC (Tabel 1). Pada GDM menunjukkan adanya beberapa pita yang hilang yaitu pita protein dengan berat sekitar 4kDa, 8kDa, 10kDa, 12kDa, 14kDa, 15kDa, 16kDa, 18kDa, 41kDa, 42kDa, 43kDa, 74kDa, 109kDa, 115kDa, 131kDa, 137kDa, 200 kDa sedangkan terdapat pita-pita baru yang terbentung dengan berat molekul sekitar 21kDa, 35kDa, 54kDa, 70kDa, 72kDa, 86kDa, 88kDa, 91kDa, 95kDa, 100kDa, 117kDa, 150kDa, 175kDa, 215kDa, 235kDa, 252 kDa yang tidak ditemukan pada GC (Tabel 1).

Hasil penelitian Pareire dkk (2008) dan Menge dkk (2010) melaporkan pada DMT2 dengan resisten insulin mempengaruhi metabolisme protein. Resistensi insulin menghambat stimulasi sintesis protein. Pada kondisi DMT2 menyebabkan metabolisme protein yang rusak dan proses sekresi insulin berkurang serta sintesis asam amino yang perlu di kaji lagi mengenai faktor sekresi insulin dan sintesis asam amino. Pada DMT2 terjadi proses aktivasi protein kinase, aktivasi ini akan meningkatkan pembentukan ROS dalam sel dalam sel dan menyebabkan kerusakan struktural dan fungsional vaskuler sehingga mengganggu permeabilitas seluler, memunculkan inflamasi, apoptosis, serta peningkatan produksi endothelin-1 (ET-1) yang akan menyebabkan vasokontraksi dan agregasi platelet (Paneni dkk., 2013).

#### 4.4 Tingkat Ekspresi Protein IL-10 organ

Uji dot blot dilakukan untuk mengetahui keberadaan antigen dan uji ini dapat dipakai untuk memperkirakan konsentrasi antigen (Fatchiyah dkk., 2011). Ikatan antara protein IL-10 dengan antibodi pada metode dot blot yang diperoleh dalam penelitian ini berupa lingkaran biru-keunguan pada membran *Polyvinylidene difluoride* (PVDF), menunjukkan bahwa antibodi primer dan antibodi sekunder memiliki reaksi positif dengan protein IL-10.



**Gambar 12.** Ekspresi Protein IL-10 menggunakan metode dot blot. Kelompok tikus kontrol (ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok tikus model DMT2 (Ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM)).

Uji dot blot untuk mengetahui densitas protein IL-10 tidak menggunakan elektroforesis untuk memisahkan protein berdasarkan dengan berat molekulnya (Guillemin dkk., 2009) tetapi dalam hasil experion260 ditemukan pita dengan berat sekitar 17kDa dan 19kDa yang menunjuk berat molekul pita protein IL-10 (Gambar 11) ( Kresno, 2013; (Ogawa et al., 2008).

Densitas dari protein IL-10 yang ditemukan pada semua organ berbeda (Gambar 12). Pada IDM ( $2.759.354,29\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari IC ( $2.553.996,48\text{INT}/\text{mm}^2$ ), BDM ( $2.808.508,06\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari BC ( $2.649.776,71\text{INT}/\text{mm}^2$ ), HC ( $3.176.825,78\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari HDM ( $2.296.954,44\text{INT}/\text{mm}^2$ ), LiDM ( $2.941.045,60\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari LiC ( $2.613.062,42\text{INT}/\text{mm}^2$ ), LuC ( $2.627.342,82\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari LuDM ( $2.345.950,05\text{INT}/\text{mm}^2$ ), KC ( $2.946.701,58\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari KDM ( $2.556.843,24\text{INT}/\text{mm}^2$ ), dan GC ( $2.754.359,06\text{INT}/\text{mm}^2$ ) lebih tinggi dari GDM ( $1.619.154,67\text{INT}/\text{mm}^2$ ) (Tabel 2).

**Tabel 2.** Densitas protein IL-10 pada organ Tikus

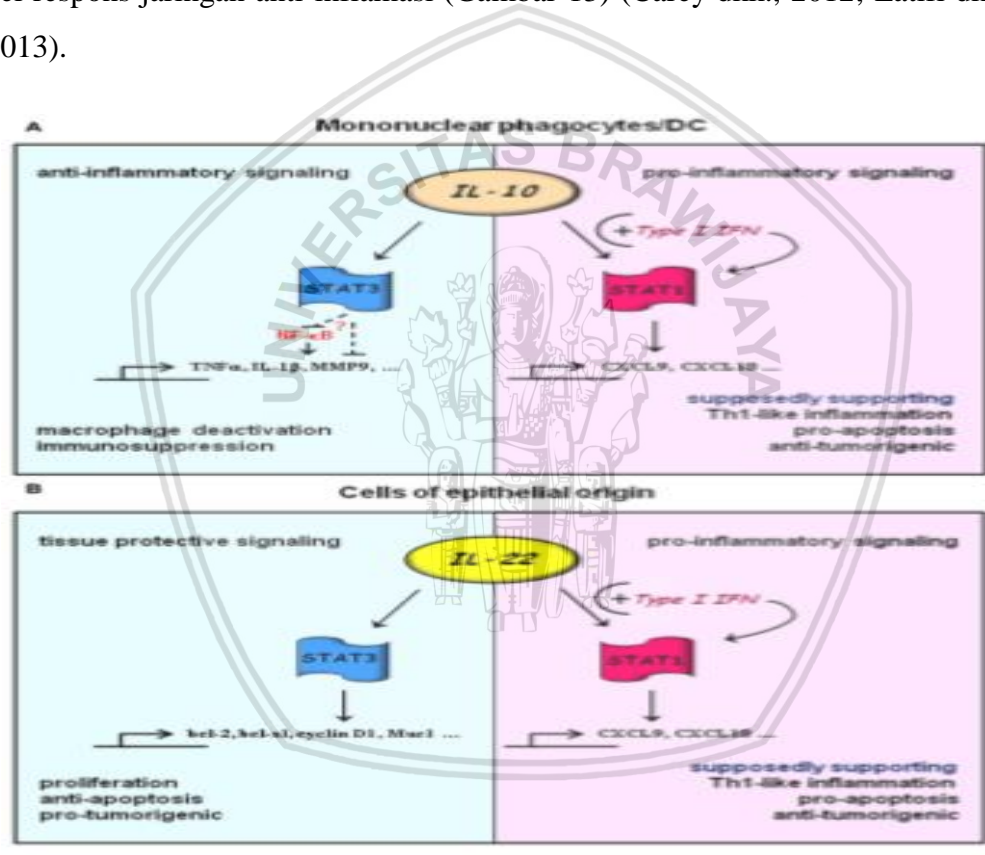
Sampel	IC	BC	HC	LiC	LuC	KC	GC
Densitas (INT/mm <sup>2</sup> )	2.553.996,48	2.649.776,71	3.176.825,78	2.613.062,42	2.627.342,82	2.946.701,58	2.754.359,06
Sampel	IDM	BDM	HDM	LiDM	LuDM	KDM	GDM
Densitas (INT/mm <sup>2</sup> )	2.759.354,29	.808.508,06	2.296.954,44	2.941.045,60	2.345.950,05	2.556.843,24	1.619.154,67

Hal menarik dari penelitian ini ditemukan performa yang berbeda dari ekspresi protein IL-10 pada organ IDM, BDM, dan LiDM, yaitu kondisi peradangan menunjukkan kinerja fungsi IL-10 yang berbeda (Tabel 2). Penelitian sebelumnya Rohmah dkk. (2015) Kerusakan ileum



juga terkait dengan perubahan sitokin inflamasi, peningkatan sitokin pro-inflamasi IL-17 dan penurunan sitokin anti-inflamasi IL-10 pada hewan model *Rheumatoid Arthritis*. Tingginya ekspresi protein IL-10 pada organ IDM, BDM, dan LiDM, dipengaruhi oleh faktor aktivasi IL-10 oleh sel dendrit.

Pada penyakit yang berhubungan dengan inflamasi seperti DMT2, menunjukkan tingkat ekspresi IL-10 rendah jika dibandingkan dengan sitokin proinflamasi. Pada DMT2 organ jantung (HDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM) dan lambung (GDM), rendahnya ekspresi IL-10 dikarenakan signaling aktivasi IL-10 oleh sel dendrit pada dalam tubuh diaktifkan oleh STAT3 pada tipe sel responsif. Dalam kondisi ini, IL-10 akan menyebabkan penghambatan dalam sel respons jaringan anti-inflamasi (Gambar 13) (Carey dkk., 2012; Latifi dkk., 2002; Mühl, 2013).



**Gambar 13.** Signaling aktivasi IL-10 dari DC dan sel epiter melalui jalur STAT1 dan STAT3. Jalur STAT1 sinyak pro-inflamasi, jalur STAT3 sinyal anti-inflamasi (Mühl, 2013)

Aktivasi melalui jalur STAT3 menghambat secara langsung atau tidak langsung NF-κB turunan sitokin pro-inflamasi utama dan molekul efektor (Gambar 13). Sedangkan kelompok DMT2 organ ileum (IDM), otak (BDM), dan hati (LiDM) menunjukkan tingkat ekspresi protein IL-10 yang lebih tinggi dibandingkan organ jantung (HDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM) dan lambung (GDM). Perbedaan tinggi ekspresi IL-10 diperngaruhi oleh aktivasi STAT, pada

organ ileum (IDM), otak (BDM), dan hati (LiDM) tahap aktivasi protein IL-10 melalui jalur aktivasi STAT1. Pada tahap ini berlawanan dengan jalur aktivasi STAT3, tahap ini berkorelasi meningkatkan inflamasi yang terjadi dengan proses sel Th-1 yang dapat menyebabkan apoptosis dalam sel dan tidak dapat mengontrol pertumbuhan tumor (Gambar 13) (Carey dkk., 2012; Latifi dkk., 2002; Mühl, 2013).



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh beberapa hasil yang disimpulkan bahwa

1. Hewan Model DMT2 menunjukkan adanya mutasi gen IL-10 khusus pada organ otak (BDM) terdapat delapan mutasi dan organ lambung (GDM) terdapat dua puluh tujuh mutasi sedangkan organ lain pada 2 kelompok hewan tidak mengalami mutasi. Mutasi pada BDM dan GDM menyebabkan terjadinya *frameshift mutation* pada asam amino yang menyusun gen IL-10.
2. Profil pita protein yang terdapat pada kelompok DMT2 sangat berbeda dengan kelompok kontrol karena beberapa pita tidak terekspresi. Tingkat ekspresi protein IL-10 pada Hewan model DMT2 dan hewan kontrol berbeda. Pada DMT2 ekspresi protein IL-10 organ ileum, otak dan hati lebih tinggi dibandingkan organ jantung, paru-paru, ginjal dan lambung hal ini berdampak terhadap fungsi organ.

#### 5.2 SARAN

Untuk memperbaiki mutasi yang terjadi pada organ otak dan lambung kelompok DMT2 perlu dilakukan penelitian lebih lanjut nutrisi sehat untuk memperbaiki sekuen DNA yang mengalami mutasi yang terjadi berbasis nutrigenomik.



## DAFTAR PUSTAKA

- ADA. 2017. Diabetes Mellitus Type 2. Retrieved May 9, 2017, from <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/>
- Akhas, M. S. H., Rehman, K., & Chen, S. 2013. Role of Inflammatory Mechanism in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*, 525–531. <https://doi.org/10.1002/jcb:24402>
- Araya, C., Diaz, L., Wasserfall, C., Atkinson, M., Mu, W., Johnson, R., & Garin, E. 2009. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*, *24*(9), 1691–1698. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1214-x>
- Bagavant, H., & Fu, S. M. 2009. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus: *Current Opinion in Rheumatology*, *21*(5), 489–494. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32832efff1>
- Baratawidjaja, K. G. 2014. *Imunologi Dasar Edisi ke-11*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bartosik-Psujek, H., & Stelmasiak, Z. 2006. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *108*(7), 644–647. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2005.10.011>
- Betran, C. E., & Hanson. 2001. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin*, pp. 103–121.
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. 2010. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, *32*(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., & Musette, P. 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *European Journal of Immunology*, *40*(10), 2686–2691. <https://doi.org/10.1002/eji.201040673>
- Carey, A. J., Tan, C. K., & Ulett, G. C. 2012. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes, 159–167. <https://doi.org/10.4161/jkst.19918>



- Dinareello, C. A. 2011. Blocking Interleukin-1 $\beta$  in acute and chronic autoinflammatory Disease. *Journal International Medical*, 269, 16–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02313.x>
- Elaziz, D. S. A., Hafez, M. H., Galal, N. M., Meshaal, S. S., & El Marsafy, A. M. 2014. CD4+ CD25+ cells in type 1 diabetic patients with other autoimmune manifestations. *Journal of Advanced Research*, 5(6), 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.09.004>
- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., & Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Gathak, S., Muthukumaran, B. R., & Nachimuthu, K. S. 2013. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis, 24(4), 224–231.
- Gilliet, M., & Liu, Y.-J. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(6), 695–704. <https://doi.org/10.1084/jem.20011603>
- Heine, G., Niesner, U., Chang, H.-D., Steinmeyer, A., Zügel, U., Zuberbier, T., Worm, M. 2008. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes IL-10 production in human B cells. *European Journal of Immunology*, 38(8), 2210–2218. <https://doi.org/10.1002/eji.200838216>
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), 530–541. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>
- Kahn, S. E. 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Kierzebaum, A. 2016. *Histology and Cell Biology*. Canada: Elsevier.
- King, A. J. 2012. The use of animal models in diabetes research: Animal models of diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- Kohei, K. 2010. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ*, 53(1), 41–46.
- Kresno, S. B. 2013. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur laboratorium. Edisi Kelima*. Jakarta: Badan Penerbit FK UNiversitas Indonesia.
- Kryukov, G. V., Pennacchio, L. A., & Sunyaev, S. R. 2007. Most Rare Missense Alleles Are Deleterious in Humans: Implications for Complex Disease and Association Studies.

*The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 727–739.  
<https://doi.org/10.1086/513473>

Kusminski, C. M., Shetty, S., Orci, L., Unger, R. H., & Scherer, P. E. 2009. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*, 14(12), 1484–1495. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0352-8>

Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Latifi, S. Q., O’Riordan, M. A., & Levine, A. D. 2002. Interleukin-10 Controls the Onset of Irreversible Septic Shock. *Infection and Immunity*, 70(8), 4441–4446. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4441-4446.2002>

Lee, J. H., Yang, S. H., Oh, J. M., & Lee, M. G. 2010. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol*, 62, 1–23. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.01.0001>

Lee, M., Park, H., Youn, J., Oh, E. T., Ko, K., Kim, S., & Park, Y. 2006. Interleukin-10 Plasmid Construction and Delivery for the Prevention of Type 1 Diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1079(1), 313–319. <https://doi.org/10.1196/annals.1375.048>

Male, D., B, J., B R, D., & R, I. 2006. *Immunology Seven Edition*. Kanada: Edisi Elsevier.

Menge, B. A., Schrader, H., Ritter, P. R., Ellrichmann, M., Uhl, W., Schmidt, W. E., & Meier, J. J. 2010. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regulatory Peptides*, 160(1–3), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.08.001>

Milovanovic, M., Heine, G., Zuberbier, T., & Worm, M. 2009. Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(5), 671–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03233.x>

Mühl, H. 2013. Pro-inflammatory signaling by IL-10 and IL-22: bad habit stirred up by interferons? *Frontiers in Immunology*, 4, 18.

Nazir, N. 2013. Immunomodulatory activity of isoflavones isolated from *Iris kashmiriana*: Effect on T-lymphocyte proliferation and cytokine production in Balb/c mice. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.12.006>

Ndraha, S. 2014. Diabetes Melitus Tipe 2 Dan Tatalaksana Terkini. *Medicinus*, 27, 9–16.

- Nolan, C. J., Damm, P., & Prentki, M. 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 169–181. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60614-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60614-4)
- Nordisk, N. 2013. *Changing Diabetes in Indonesia*. Denmark: Novo Nordisk Company.
- Ogawa, Y., Duru, E. A., & Ameredes, B. T. 2008. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Current Molecular Medicine*, 8(5), 437–445. <https://doi.org/10.2174/156652408785160907>
- Ouyang, W., S, R., N K, C., P A, V., & S G, H. 2011. Regulation and function of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review Immunology*, 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Pereira, S., Marliss, E. B., Morais, J. A., Chevalier, S., & Gougeon, R. 2008. Insulin Resistance of Protein Metabolism in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 57(1), 56–63. <https://doi.org/10.2337/db07-0887>
- Pickup, J. C. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(3), 813–823. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.3.813>
- Pratley, R. E. 2013. The Early Treatment of Type 2 Diabetes. *The American Journal of Medicine*, 126. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.-2013.06.007>
- Rackhman, C. L., Chagastelles, P. C., Nardi, N. B., Hauge-Evans, A. C., Jones, P. M., & King, A. J. 2011. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 54: 1127–1135. *Diabetologia*, 54, 1127–1135. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2053-4>
- Rees, D. A., & J C, A. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 22, 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x>
- Rika, M., & Fatchiyah. 2017. Influence of CSN1S2 protein from Caprine milk Etawah Breed (EB) on histology of microglial cells in rat (*Rattus norvegicus*) Type-2 diabetes mellitus (T2DM) (p. 060001). <https://doi.org/10.1063/1.5012734>
- Roglic, G. (Ed.). 2016. *Global report on diabetes*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Rohmah, R. N., Widjajanto, E., & Fatchiyah, F. 2015. Protective effect of CSN1S2 protein of goat milk on ileum microstructure and inflammation in rat-CFA-induced rheumatoid arthritis. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(7), 564–568.
- Rohmah, R. N., Widyasari, S., Aulanni'am, A., & Fatchiyah, F. 2013. Cloning and Expression of hGAD65 Gene in E. Coli BL21. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 18(1), 52–57.



- Saitou, N. 2013. Mutation. In N. Saitou, *Introduction to Evolutionary Genomics* (Vol. 17, pp. 27–54). London: Springer London. [https://doi.org/10.1007/-978-1-4471-5304-7\\_2](https://doi.org/10.1007/-978-1-4471-5304-7_2)
- Sambrook, J., & Russell, D. W. 2012. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.-1038/nri2711>
- Soeroso, A. 2007. Sitokin. *Jurnal Oftalmologi Indonesia, Volume 5 No 3*, 117–180.
- Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., & Satyanarayana, U. 2013. Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1794–1802. <https://doi.org/-10.1016/j.jff.2013.08.008>
- Srinivasan, K., & Ramarao, P. 2007. Srinivasan K, Ramarao P (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125: 451–472. *Indian Journal Medical Research*, 125, 451–472.
- Sultani, M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., & Gibson, R. J. 2012. Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulator Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Hindawi Publishing Corporation Chemotherapy Research and Practi*. <https://doi.org/10.1155/2012/490804>
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50(6), 537–546.
- Tseng, C.-H. 2016. Metformin reduces gastric cancer risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Aging (Albany NY)*, 8(8), 1636.
- Wegner, M., Winiarska, H., Bobkiewicz-Kozłowska, T., & Dworacka, M. 2008. IL-12 serum levels in patients with type 2 diabetes treated with sulphonylureas. *Cytokine*, 42(3), 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.cy-to.2008.02.014>
- WHO. 2017. Diabetes. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/fact-sheets/fs312/en/>
- Yaghini, N., Mahmoodi, M., A. GhR, H. GhH, H. Khoramdelazad, & A. Mkazemi. 2011. Serum levels of interleukin 10 (IL-10) in patients with type 2 diabetes. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 752–752.
- Yao, Y., Simard, A. R., Shi, F.-Do., & Hao, J. 2013. IL-10 producing Lym-phocytes in Inflammatory Disease. *International Review of Immunology*, 1–13. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.762361>
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., & Lo-Man, R. 2009. Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory

Properties of Neutrophils. *Immunity*, 31(5), 761–771.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.016>





**LAMPIRAN 1. Tabulasi Bahan dan Reagen Yang digunakan dalam Penelitian Pakan Tinggi Kolesterol**

<b>Bahan</b>	<b>Komposisi (%)</b>
Comfeed bar	50
Tepung terigu	25
Telur Bebek	5
Lemak Kambing	17
Minyak kelapa	2,89
Asam Kolat	0,11

**Larutan Streptozotzin**

<b>Bahan</b>	<b>Konsentrasi (mM)</b>
Asam Sitrat pH 4,5	10mM
Asam Sitrat C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	
Aquabides 2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Na Sitrat pH 4,5	10mM
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub>	
Aquabides 2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	

**Bahan dan Reagen Isolasi DNA Organ**

<b>Bahan</b>	<b>Konsentrasi (mMol)</b>
1. Buffer Lisis (500µl)	
Tris-Cl pH 8	10mM
EDTA pH 8	25mM
NaCl	10mM

SDS	0,5%
Proteinase-K	10mg/mL
Aquades	
2. Buffer TE 1X (50 µl)	
Tris-Cl pH 7.6	10mM
EDTA pH 7.6	1mM
Aquades	
3. Gel Agarosa 0.8% (40 mL)	
Serbuk agarose	
Aquades	
4. Gel Agarosa 1.5% (40mL)	
Serbuk agarose	
Aquades	
5. TBE 10X (500mL)	
Tris-Cl	89mM
Borat Acid	89mM
EDTA	2mM
Aquades	

### Bahan Isolasi Protein Organ

Bahan	Konsentrasi (mMol)
1. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 (1 Liter)	
NaCl	10mM
KCl	10mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
ddH <sub>2</sub> O	
2. Bufer ekstrak (500mL)	

PMSF dalam DMSO	1mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50mM
Nonidet P-40	0,5%
Aquabides	

### Bahan dan Regaen Dot Blot Protein

Bahan	Konsentrasi
1. Phospat Buffer Saline Tween (PBST)	
PBS	10mM
Tween	20%
2. Bloto 5%	
PBS	10mM
Susu Skim	
3. Tris Buffer Saline (TBS) pH7,4 (1Liter)	
NaCl	
Aquades	

## LAMPIRAN 2. Sekuen Primer gen IL-10

### **Rattus norvegicus strain mixed chromosome 13, Rnor\_6.0**

NCBI Reference Sequence: NC\_005112.4

#### **FASTA Graphics**

LOCUS NC\_005112 4460 bp DNA linear CON 27-JUL-2016  
DEFINITION Rattus norvegicus strain mixed chromosome 13, Rnor\_6.0.  
ACCESSION NC\_005112 REGION: 47738933..47743392  
VERSION NC\_005112.4  
DBLINK BioProject: [PRJNA12455](#)  
BioSample: [SAMN02808228](#)  
Assembly: [GCF\\_000001895.5](#)

KEYWORDS RefSeq.  
SOURCE Rattus norvegicus (Norway rat)  
ORGANISM Rattus norvegicus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha;  
Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4460)  
AUTHORS Gibbs,R.A., Weinstock,G.M., Metzker,M.L., Muzny,D.M.,  
Sodergren,E.J., Scherer,S., Scott,G., Steffen,D., Worley,K.C.,  
Burch,P.E., Okwuonu,G., Hines,S., Lewis,L., DeRamo,C., Delgado,O.,  
Dugan-Rocha,S., Miner,G., Morgan,M., Hawes,A., Gill,R., Celera,  
Holt,R.A., Adams,M.D., Amanatides,P.G., Baden-Tillson,H.,  
Barnstead,M., Chin,S., Evans,C.A., Ferriera,S., Fosler,C.,  
Glodek,A., Gu,Z., Jennings,D., Kraft,C.L., Nguyen,T.,  
Pfannkoch,C.M., Sitter,C., Sutton,G.G., Venter,J.C., Woodage,T.,  
Smith,D., Lee,H.M., Gustafson,E., Cahill,P., Kana,A.,  
Doucette-Stamm,L., Weinstock,K., Fectel,K., Weiss,R.B., Dunn,D.M.,  
Green,E.D., Blakesley,R.W., Bouffard,G.G., De Jong,P.J.,  
Osoegawa,K., Zhu,B., Marra,M., Schein,J., Bosdet,I., Fjell,C.,  
Jones,S., Krzywinski,M., Mathewson,C., Siddiqui,A., Wye,N.,  
McPherson,J., Zhao,S., Fraser,C.M., Shetty,J., Shatsman,S.,  
Geer,K., Chen,Y., Abramzon,S., Nierman,W.C., Havlak,P.H., Chen,R.,  
Durbin,K.J., Egan,A., Ren,Y., Song,X.Z., Li,B., Liu,Y., Qin,X.,  
Cawley,S., Worley,K.C., Cooney,A.J., D'Souza,L.M., Martin,K.,  
Wu,J.Q., Gonzalez-Garay,M.L., Jackson,A.R., Kalafus,K.J.,  
McLeod,M.P., Milosavljevic,A., Virk,D., Volkov,A., Wheeler,D.A.,  
Zhang,Z., Bailey,J.A., Eichler,E.E., Tuzun,E., Birney,E.,  
Mongin,E., Ureta-Vidal,A., Woodwark,C., Zdobnov,E., Bork,P.,  
Suyama,M., Torrents,D., Alexandersson,M., Trask,B.J., Young,J.M.,  
Huang,H., Wang,H., Xing,H., Daniels,S., Gietzen,D., Schmidt,J.,  
Stevens,K., Vitt,U., Wingrove,J., Camara,F., Mar Alba,M.,  
Abril,J.F., Guigo,R., Smit,A., Dubchak,I., Rubin,E.M., Couronne,O.,  
Poliakov,A., Hubner,N., Ganten,D., Goesele,C., Hummel,O.,  
Kreitler,T., Lee,Y.A., Monti,J., Schulz,H., Zimdahl,H.,  
Himmelbauer,H., Lehrach,H., Jacob,H.J., Bromberg,S.,  
Gullings-Handley,J., Jensen-Seaman,M.I., Kwitek,A.E., Lazar,J.,  
Pasko,D., Tonellato,P.J., Twigger,S., Ponting,C.P., Duarte,J.M.,  
Rice,S., Goodstadt,L., Beatson,S.A., Emes,R.D., Winter,E.E.,  
Webber,C., Brandt,P., Nyakatura,G., Adetobi,M., Chiaromonte,F.,  
Elnitski,L., Eswara,P., Hardison,R.C., Hou,M., Kolbe,D., Makova,K.,  
Miller,W., Nekrutenko,A., Riemer,C., Schwartz,S., Taylor,J.,  
Yang,S., Zhang,Y., Lindpaintner,K., Andrews,T.D., Caccamo,M.,  
Clamp,M., Clarke,L., Curwen,V., Durbin,R., Eyraas,E., Searle,S.M.,  
Cooper,G.M., Batzoglou,S., Brudno,M., Sidow,A., Stone,E.A.,  
Venter,J.C., Payseur,B.A., Bourque,G., Lopez-Otin,C., Puente,X.S.,  
Chakrabarti,K., Chatterji,S., Dewey,C., Pachter,L., Bray,N.,  
Yap,V.B., Caspi,A., Tesler,G., Pevzner,P.A., Haussler,D.,  
Roskin,K.M., Baertsch,R., Clawson,H., Furey,T.S., Hinrichs,A.S.,  
Karolchik,D., Kent,W.J., Rosenbloom,K.R., Trumbower,H.,  
Weirauch,M., Cooper,D.N., Stenson,P.D., Ma,B., Brent,M.,  
Arumugam,M., Shteynberg,D., Copley,R.R., Taylor,M.S., Riethman,H.,  
Mudunuri,U., Peterson,J., Guyer,M., Felsenfeld,A., Old,S.,  
Mockrin,S. and Collins,F.

CONSRMT Rat Genome Sequencing Project Consortium  
TITLE Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into  
mammalian evolution  
JOURNAL Nature 428 (6982), 493-521 (2004)  
PUBMED [15057822](#)

REFERENCE 2 (sites)  
 AUTHORS Lowe,T.M. and Eddy,S.R.  
 TITLE tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence  
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 25 (5), 955-964 (1997)  
 PUBMED [9023104](#)  
 REMARK This is the methods paper for tRNAscan-SE.  
 COMMENT REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000084.5.

On Aug 7, 2014 this sequence version replaced NC 005112.3.  
 Assembly name: Rnor\_6.0  
 The genomic sequence for this RefSeq record is from the whole-genome assembly released on 2014/07/01 by the Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center (BCM-HGSC) on behalf of the Rat Genome Sequencing Consortium (RGSC). The Rnor\_6.0 assembly is a mixed assembly of clones and contigs from the whole genome shotgun project ABR00000000.7.

##Genome-Assembly-Data-START##  
 Assembly Provider :: Rat Genome Sequencing Consortium  
 Assembly Date :: MAY-2014  
 Assembly Method :: Atlas Assembly suite v. 2.0; CLCbio v. 1.0; Velvet v. 1.0; PBJelly v. 2.0  
 Assembly Name :: Rnor\_6.0  
 Genome Coverage :: 3x BAC; 6x WGS ABI Sanger reads; 10.0x PacBio  
 Sequencing Technology :: Sanger; SOLiD; PacBio  
 ##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##  
 Annotation Provider :: NCBI  
 Annotation Status :: Full annotation  
 Annotation Version :: Rattus norvegicus Annotation Release 106  
 Annotation Pipeline :: NCBI eukaryotic genome annotation pipeline  
 Annotation Software Version :: 7.1  
 Annotation Method :: Best-placed RefSeq; Gnomon  
 Features Annotated :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA  
 ##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES  
 source 1..4460  
 /organism="Rattus norvegicus"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="mixed"  
 /db\_xref="taxon:10116"  
 /chromosome="13"  
 /sex="pooled males and females"  
 /note="pooled female animals of strain BN/SsNHsdMCW plus one male of strain SHR (also known as SHR-Akr)"  
 gene 1..4460  
 /gene="Il10"  
 /gene\_synonym="IL10X"  
 /note="interleukin 10; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: BestRefSeq,Gnomon."  
 /db\_xref="GeneID:25325"  
 /db\_xref="RGD:2886"  
 mRNA join(1..759,1628..1687,1977..2129,3127..3851)  
 /gene="Il10"  
 /gene\_synonym="IL10X"  
 /product="interleukin 10, transcript variant X2"  
 /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence includes similarity to: 100% coverage of the annotated genomic feature by RNAseq alignments, including 3 samples with support for all annotated introns"  
 /transcript\_id="XM\_006249712.3"  
 /db\_xref="GeneID:25325"  
 /db\_xref="RGD:2886"  
 mRNA join(1..759,1628..1687,1977..2651)  
 /gene="Il10"



```

/gene_synonym="IL10X"
/product="interleukin 10, transcript variant X1"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence
includes similarity to: 100% coverage of the annotated
genomic feature by RNAseq alignments, including 8 samples
with support for all annotated introns"
/transcript_id="XM_008769426.2"
/db_xref="GeneID:25325"
/db_xref="RGD:2886"
mRNA
join(594..759,1628..1687,1977..2129,3127..3192,4224..4460)
/gene="Il10"

```

```

/gene_synonym="IL10X"
/product="interleukin 10"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: BestRefSeq."
/transcript_id="NM_012854.2"
/db_xref="GeneID:25325"
/db_xref="RGD:2886"
CDS
join(595..759,1628..1687,1977..2129,3127..3192,4224..4316)
/gene="Il10"

```

```

/gene_synonym="IL10X"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: BestRefSeq."
/codon_start=1
/product="interleukin-10 precursor"
/protein_id="NP_036986.2"
/db_xref="GeneID:25325"
/db_xref="RGD:2886"
/translation="MPGSALLCCLLLLAGVKTSKGHSIRGDNNTFFVPSQTHMLREL
RAAFSQVKTFQKKDQLDNILLTDSLQDFKGYLGCQALSEMIKFYLVVEMPQAEHNG
PEIKEHLNSLGEKCLKTLWIQLRRCRFLPCENKSKAVEQVKNDFNKLDQKGVYKAMNE
FDIFINCIEAVTLKMKN"
CDS
join(595..759,1628..1687,1977..2129,3127..3318)
/gene="Il10"

```

```

/gene_synonym="IL10X"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Gnomon."
/codon_start=1
/product="interleukin-10 isoform X2"
/protein_id="XP_006249774.1"
/db_xref="GeneID:25325"
/db_xref="RGD:2886"
/translation="MPGSALLCCLLLLAGVKTSKGHSIRGDNNTFFVPSQTHMLREL
RAAFSQVKTFQKKDQLDNILLTDSLQDFKGYLGCQALSEMIKFYLVVEMPQAEHNG
PEIKEHLNSLGEKCLKTLWIQLRRCRFLPCENKSKAVEQVKNDFNKVLGHGKENAWN
VTSVRPLARAERGPDLFRPNLECGNQMV"
CDS
join(595..759,1628..1687,1977..2405)
/gene="Il10"

```

```

/gene_synonym="IL10X"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Gnomon."
/codon_start=1
/product="interleukin-10 isoform X1"
/protein_id="XP_008767648.1"
/db_xref="GeneID:25325"
/db_xref="RGD:2886"
/translation="MPGSALLCCLLLLAGVKTSKGHSIRGDNNTFFVPSQTHMLREL
RAAFSQVKTFQKKDQLDNILLTDSLQDFKGYLGCQALSEMIKFYLVVEMPQAEHNG
PEIKEHLNSLGEKCLKTLWIQLRRCVSSRPVLSPVATQQTLSPTIQPGHAHPDTHRLDR
GLGKSRGTPGVRSACLCLSGESGGGFEAITREDLRIAFLLFVSHCGSLATPLSSREG"

```

ORIGIN

```

1 acacacaatg gaagaatcaa agagagtgag ttttgagggt aatcagccct ctctgtttc
61 ctttgggtaa ctgagtgcta aggtgacctc ctggtcagca agaaatagcg gacattcaac
121 ccaggttgag tggaggaaat aattatttct caatcctaata gtgctctgga atagcccatt
181 tatgcacgtc attgtgactt acgagtgcgt gaatggaacc cacagttgta gattctctgt
241 acatagaaca gctgtctgcc tcaggaaata caacttttag tattgagaag ctaaaaagaa
301 aaaaaattaa aagagagata gcgcttacta aaaatagccg taatgcagaa gttcattctt
361 accagttctc ttgtgcttac aatgcaaaaa aaagaaaaaa gaaaaaaaaa ttaagctcaa
421 aaaagtgcac ggtctagaag agggaggagc cttgcccagg aagtttgtaa attgagaggc
481 cctgctgcac cttcggtaata aaagggggac accggggcagg agatctacac attagggact

```





541 tgctcttata ctaccatagc cacaaacgag ccttgacagaa aacagagcct cagcatgcct  
 601 ggctcagcac tgctatggtt cctgctctta ctggctggag tgaagaccag caaaggccat  
 661 tccatccggg gtgacaataa ctgcaccacc tccacagtea gccagaccga catgctccga  
 721 gagctgaggg ctgacctcag tcaagtgaag actttctttg taagtataat gccacacctag  
 781 cctttcttcc taggatcaac tgaatatatgc attctgatgg aactgtagct ctctctctcc  
 841 tcctctctct cctctctctc ctctctctcc tcctctctct cctctctctc ctctctctcc  
 901 tgctactcct cctctatctc cagcatctat tacccttaaa cttgaatcca gagagtccca  
 961 ggccaagcca tgggttatga gttaaactaa atccaggcat agctgaaaac taggttaact  
 1021 agctagctag ctagctagct agctagggtta actcctagct agctaggagg tgaatgcatt  
 1081 gactctccca tgctcaagaa ctttctgtta agtttccgat gagaccccat gttttgctgg  
 1141 ctaggacaaa gcctggggta gaagatacat gctgtctctg cttagtctca agatctggag  
 1201 gaccaaaatc tgggggtttg ggggaacacc agagctcagg aaactgctgt aggaggcca  
 1261 gagaaggcag agaaccatgc aaagcagagg cttgccgtaa gggactccag acaggaaggc  
 1321 ttgacacagg tgccctagaa acctcaactg actcatctga aagaagacca ggctgggtc  
 1381 aaacttctcc caatctgtta aattcagtca gaagttttta aaaacaactt gatccaaaga  
 1441 ggaaggactt tgatttaact ccgggctcta gcaccatcta atcctgtttt taaaactcac  
 1501 ctttccaaag tcaccagggc taccttgatt acaaattcaa aactctacaa atggaaaagg  
 1561 tattcaaatg gcacgcgtga tgggtattcc cccagccctt gtattcatgg tctattgtc  
 1621 cctccagcaa aagaaggacc agctggacaa catactgctg acagattcct tactgcagga  
 1681 ctttaaggtta agaatccact ggggtcctgg gagcaattaa gtgattaggg aggggaggtg  
 1741 ctgcttgtag cagagagagc tgggtcctgg gccctggcct tcaaaaagag aagtgagaag  
 1801 accttaactc agcatattgc cagcagtcga gggttatgaa gagctcattc tgtggtaaag  
 1861 agagaaaatg taactggggg gggggggtcc cctagggaca agactgtcca tcaacattag  
 1921 tggcaacagt ccatccttcc aataagccac acccaacctt tgatccctgc ctttagggtt  
 1981 acttggtttg ccaagccttg tcagaatga tcaagtttta cctggtagaa gtgatgccc  
 2041 aggcagagaa ccattggcca gaaatcaagg agcatttgaa ttcctggga ggaagctga  
 2101 agaccctctg gatacagctg cgacgctgtg tgagtgcag accagttctt tccctgtag  
 2161 ccaccacaaca aacactgtct cctacaatcc agccaggcca tggcatcca gacacacaca  
 2221 gactgacagc aggactaggt aaatctagag ggacacccgg agtcagatct cttgcttctc  
 2281 tgtctctggg cgagagtggg ggtggtcttg aggcgatcac acgtgaagat ttgcgtatag  
 2341 ccttctctgt atttgtgagt cattgtgggt cattagctac tcccctctct tcaaggaag  
 2401 gctagggtct cagtcatagt tccctcgtgt tgggctgctc agccaaggct cccaagcag  
 2461 aggaaaaatc tggctctgt atctctctt ttggaaagca aagtcagtgc cacacacctg  
 2521 gctgataga aatctccccg tatlctcaga agggccagaa gactactgtc tctaagcag  
 2581 tatctatgaa tagcatatcc aggcacateta tgtctctgac tgaagtgatt ccttctgctc  
 2641 tgttgtttct tcttctctct ctcaaccgata ctggaaaatc agttggagtc taactgtgcc  
 2701 caacgatggt tctggcccaa caatttggcg ccagtaactg aggccttttc cgatccactc  
 2761 tcagacacct agaaaatagct gctggtggtt gagattggag ctagacaagg agagacatta  
 2821 aaaacataac atgttttggg gctggctcgg aggaacaaaa cccaagacct acctaagttc  
 2881 acaccacagc tcagcaaaccc atgatttcaa agacatacat tgtatctctc ttaggctgtt  
 2941 ttctctggca cagaaaagata aagggccaat catggctcag ttctcctgg gggctaggaa  
 3001 gtgataatcg aagataagca agggtagctc cttctctatt acaagaagat agtttctctc  
 3061 caagagccat ggatacaggg ttccagcaag aattatcaac actctttttt ttttttctt  
 3121 ctacagcctc gatttctccc ctgtgagaat aaaagcaagg cagtggagca ggtgaagaat  
 3181 gattttaata aggtaagcct gggccatggc aaagagaacg cgtggaactg gacctcctc  
 3241 cgtccactcg caagggcaga aagagggccc gacctattcc gaccgaacct ggagtgggg  
 3301 aaccagcaaa tgggtgtgacc tcctctgcca gttagaaagc caccacctca gtcacatttg  
 3361 ttttctgcaa agogtctctg gcagtttcta aatgactgct ccacttttgc agcttttgg  
 3421 cttagactga ccagacagcc tataagcgca gagcgtagg tgetggggag agcgcctag  
 3481 gaaacagaaa gtacagaaaag taccttgttg ggaaacagcg agaaccaca agtacagaaa  
 3541 gcagacatgc atgagtgcac gcaggtacat cttggggctc agcctggatg ctctctggaa  
 3601 ccagaaggag caggaagcag aattcttagg ggtcccagg cactctccac ctggcaaca  
 3661 aaatgaggtt tcatacttcc ttctgctctg gaacctatc aacctagtt cccagaagcc  
 3721 atgtggccca catcttcttt gtggctagc cagagctcca acatcagtgg ccatggattc  
 3781 catgacagca ggccagagca ggggggtgaa gactgcctac acacgcaaaa cattaataaa  
 3841 aaaatgtttt tccttgttat ctctatcact gtctctgctt gaaattgctt cctctagcat  
 3901 ctttgcaata cattctgcat acgcattatg tgggactggt cctctggggg gggggggggg  
 3961 agttgaaaag gctctactct gaagacagtg ctttgagaac cgaatgctc ccttcccta  
 4021 ctgaccctgc gcagtgttta aagtcgggaga aggtgcaagg gaagacacag ccccttcca  
 4081 aagcagatga acaaatctgc tttgggtcct tcagctcca acacaagaaa gctgagatct  
 4141 ttctacactc agtggccttc ctagtgcagg gagcccctca gccctccaat gggctctaac  
 4201 cagattcttc tctcccaca cagctccaag acaaagggtg ctacaaggcc atgaatgagt  
 4261 ttgacatctt catcaactgc atagaagcct acgtgacact caaaatgaaa aattgacca  
 4321 cccggcatct actggactgc aggcataaaa tagagcttct aaatctgatc cagagatctt  
 4381 agctaacggg agcaactcct tggaaaacct cgtttgtacc tctctccaaa atatttatta  
 4441 cctctgatac ctcagttccc

Warna Hijau : Primer  
 Warna Kuning : Sekuen DNA ekson 1-5

**LAMPIRAN 3. Komposisi dan Program PCR Gen IL-10****Komposisi *reaction mix* PCR**

Tabung PCR berisi 10 $\mu$ L yang terdiri:

Bahan	Volume
ddH <sub>2</sub> O	3,5 $\mu$ L
<i>PCR Mix</i>	5 $\mu$ L
Primer Forward IL-10	0,5 $\mu$ L
Primer Reverse IL-10	0,5 $\mu$ L
Sampel DNA	0,5 $\mu$ L

**Program PCR Gen IL-10**

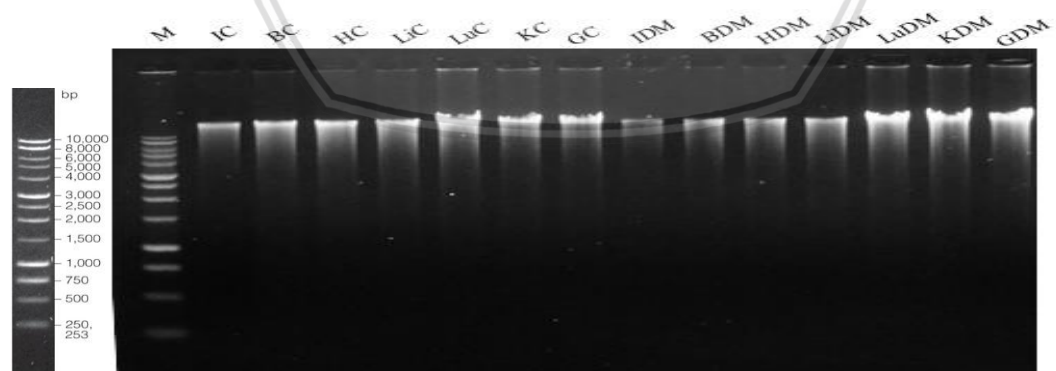
Program	Jumlah Siklus	Tahapan	Suhu	Waktu
Gen IL-10	1	Hot Start	95° C	5 menit
	35	Denaturasi	95° C	45 sekon
		Annealing	57° C	45 sekon
		Ekstensi	72° C	45 sekon
	1	Ekstensi akhir	72° C	7 menit

#### LAMPIRAN 4. Uji kualitatif dan Kuantitatif DNA

**Tabel 1.** Konsentrasi dan kemurnian DNA organ

Kelompok	Sampel	Konsentrasi (ng/μL)	Kemurnian (260Å/280Å)
Kontrol	Ileum (IC)	2661.63	2.04
	Otak (BC)	2613.42	1.95
	Jantung (HC)	998.98	2.02
	Hati (LiC)	1241.48	1.79
	Paru-paru (LuC)	555.91	1.90
	Ginjal (KC)	1909.72	1.87
	Lambung (GC)	1189.95	1.91
DMT2	Ileum (IDM)	1911.35	1.96
	Otak (BDM)	205.25	1.88
	Jantung (HDM)	978	1.80
	Hati (LiDM)	3255.98	2.05
	Paru-paru (LuDM)	1237.66	2.06
	Ginjal (KDM)	231.08	2.05
	Lambung (GDM)	4026.05	1.86

#### Kualitatif DNA *Whole Genom*



**Gambar 1.** Uji kualitatif DNA *Whole genom* organ. Marker DNA loader 1kb (M). Kelompok tikus kontrol (ileum (IC), otak (BC), jantung (HC), hati (LiC), paru-paru (LuC), ginjal (KC), lambung (GC)) dan kelompok Tikus model DMT2 (ileum (IDM), otak (BDM), jantung (HDM), hati (LiDM), paru-paru (LuDM), ginjal (KDM), lambung (GDM))



**LAMPIRAN 5. Nilai Kosentrasi Protein organ****Tabel 2. Konsentrasi Protein organ**

Kelompok	Sampel	Konsentrasi (mg/mL)
Kontrol	Ileum (IC)	37,16
	Otak (BC)	25,02
	Jantung (HC)	15,59
	Hati (LiC)	37,04
	Paru-paru (LuC)	38,38
	Ginjal (KC)	27,7
	Lambung (GC)	41,05
DMT2	Ileum (IDM)	72,80
	Otak (BDM)	41,58
	Jantung (HDM)	15,08
	Hati (LiDM)	35,62
	Paru-paru (LuDM)	43,81
	Ginjal (KDM)	17,56
	Lambung (GDM)	40,40





**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 417-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : PENGHAMBATAN MEKANISME GLIKOSILASI PADA  
PENYAKIT DIABETES DENGAN PROTEIN SUSU  
KAMBING ETHAWAH SEBAGAI ANTI-GLIKASI : KAJIAN  
NUTRIGENOMIK

**PENELITI** : FATCHIYAH

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 17 September 2015  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001





## DIFFERENTIAL PROFILE PROTEIN RATTUS NORVEGICUS TYPE 2 DIABETES MELLITUS (T2DM) MODEL

<sup>1</sup>YOHANES BARE, <sup>2</sup>AGUNGPRAMANA W MARHENDRA, <sup>3</sup>FATCHIYAH

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, East Java, Indonesia

<sup>2</sup>Research Centre of Smart Molecule of Natural Genetics Resources UB, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, East Java, Indonesia

**Abstract:** Type 2 diabetes mellitus (T2DM) caused by resistance insulin. Resistance insulin leads to hyperglycaemia. Prolong hyperglycaemia caused damage organ and complication such as nephropati (kidney), liver and cardio vascular diseases. Meanwhile hyperglycaemia inhibits protein metabolism. This study focused to investigate profile protein organ kidney, liver and heart in T2DM rat animal model. This research was used rats group T2DM (DM) and normal rats as a control (C). We isolated Protein from tissues and SDS-Page to investigate profil protein. This result we found has different profile protein in T2DM rats (DM) compared with control rats (C). Several protein has absen in T2DM condition and several protein has found in T2DM condition, meanwhile in control rats we found several protein different T2DM rats group. This study concluded has different profile protein in rats group T2DM (DM) and rats control group (C).

**Keywords:** Hyperglycaemia, SDS-PAGE, T2DM

### I. INTRODUCTION

Type 2 Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease. T2DM has characteristic by resistance insulin. Resistance insulin causes hyperglycemia, the condition causing metabolic disorders in the body. Hyperglycaemia lead to complication in T2DM patients such as nephropathy (kidney), increased risk cardiovascular, damage tissue liver [1-3]. Insulin resistance has affects metabolic pathways amino acids and protein metabolism in T2DM[4]. Menge [5] shown in T2DM deficits some amino acid, while impaired glucose tolerance (IGT) and alterations in insulin secretion found in patients with type 2 diabetes could theoretically disturb amino acid metabolism in muscle and liver. In this study we investigated profile protein in heart, liver and kidney T2DM rats compared with control rats.

### II. METHOD

#### Experimental Animal

The animal that used rat (*Rattus norvegicus*) were divided into group normal rats group (C) and T2DM group (DM)[6]. This study has been evaluated and approved by the research ethics committee Brawijaya University, Malang, East Java, Indonesia (Registration number, KEP-90-UB).

### III. PROTEIN EXTRACTION

Extraction protein from organ kidney, liver and heart based on [7] with some modification. Quality of protein using NanoDrop spectrophotometer.

### SDS-PAGE

Profile band protein using SDS PAGE based on [7]. Protein samples and Reducing Sample Buffer (1:1). Samples were heated at 100°C for 5 minutes, running electrophoresis was performed at 200mA. Band visualized by Coomassie Brilliant Blue (CBB) gel staining. The protein band of the electrophoresis results in the molecular weight. Determined by measuring the mobility of protein molecules in polyacrylamide gels based on standard molecular weight curves of standard proteins. Molecular weight measured by Retardation Factor (Rf) [8]:

$$Rf = \frac{\text{Mobilty band protein}}{\text{Mobilty protein until finish}}$$

Continue Rf to regresi linear:  $Y = a + bX$ ,  $Y =$  Molecular weight,  $X = Rf$  value.

### IV. RESULT AND DISCUSSION

SDS-PAGE separates the protein molecules by size and shape of the particles. The pore size of the gel is determined by the amount of acrylamide used per unit volume of the reaction medium and the degree of crosslinking. The greater the acrylamide concentration used the smaller the pore size of the gel. The proteins identified in the test using this process are all organs with thick and thin bands.

Differential Profile Protein Rattus Norvegicus Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) Model

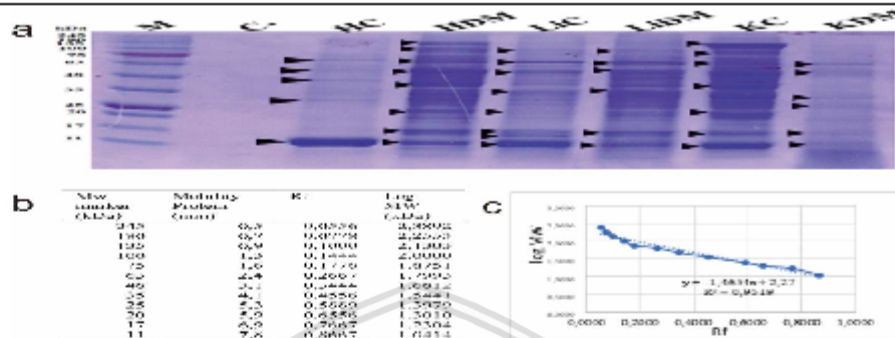


Figure 1. Profile protein Using SDS-PAGE. (a) Protein from organ Rattus norvegicus using SDS-PAGE (C=Control negative, HC=heart control, HDM=heart T2DM, LiC=liver control, LiDM=liver T2DM, KC=kidney control, KDM=kidney T2DM). (b) Molecular weight protein based on mobility protein. (c) Log Molecular Weight Protein organ Rattus norvegicus.

Principles used in electrophoresis to separate protein molecules with different charges. The results obtained show the protein well but there is a large band showing the da tone that shows very thin bands. Gunanti [9]it was explained that the thickness and thinness of protein bands in the SDS-PAGE result was due to genetic differences between the proteins.

HC					HDM				
No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)	No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)
1	2.1	0.2435	0.9632	91.9	1	1	0.1111	2.1877	154.1
2	2.8	0.3111	0.8204	66.1	2	1.5	0.1667	2.0857	131.8
3	3.6	0.4000	0.6572	48.4	3	2.3	0.2556	1.9224	83.6
4	5	0.5889	0.4215	33.5	4	3	0.3333	1.7796	60.2
5	7.5	0.8333	0.8613	7.3	5	4	0.4444	1.5756	37.6
					6	5.8	0.6444	1.2083	16.2
					7	7.1	0.7889	0.9131	8.8
					8	7.8	0.8667	0.8003	6.3

LiC					LiDM				
No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)	No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)
1	1.5	0.1667	2.0857	121.8	1	1.5	0.1444	2.1265	133.8
2	2.3	0.2556	1.9224	83.6	2	2.1	0.2333	1.9632	91.9
3	3	0.3333	1.7796	60.2	3	2.7	0.3000	1.8408	69.3
4	4.3	0.4778	1.5144	32.7	4	4	0.4444	1.5756	37.6
5	5.3	0.5889	1.3103	20.4	5	7	0.7778	0.9635	9.3
6	7	0.7778	0.9635	9.2	6	7.8	0.8667	0.8002	6.3
7	7.3	0.8111	0.9023	8.0					
8	7.8	0.8667	0.8002	6.3					

KC					KDM				
No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)	No	Mobility Protein (cm)	Rf	Rf(a/b) sumbu x	MW (kDa)
1	1	0.1111	2.1877	154.1	1	2.5	0.2778	1.8816	76.1
2	1.7	0.1889	2.0448	110.9	2	2.9	0.3222	1.8000	63.1
3	2.5	0.2778	1.8816	76.1	3	4.7	0.5222	1.4327	37.1
4	3.9	0.4333	1.5960	39.4	4	5.3	0.5889	1.3103	20.4
5	5.8	0.6444	1.2083	16.2	5	7.3	0.8111	0.9023	8.0
6	7.1	0.7889	0.9431	8.8	6	7.8	0.8667	0.8002	6.3
7	7.9	0.8778	0.7798	6.0					

\*Gel=9cm

Figure 2. Molecular weight protein organ Rattus norvegicus based on mobility protein. HC=heart control, HDM=heart T2DM, LiC=liver control, LiDM=liver T2DM, KC=kidney control, KDM=kidney T2DM



Protein band showed similarity and variability in all sample. In organ heart has variability protein band, we found has protein absent in T2DM such as 91,9kDa, 66,1 kDa, 45,4kDa, 23,5 kDa, and 7,3kDa. Many protein occurs in heart T2DM such as 154,1kDa, 121,8kDa, 83,6kDa, 60,2kDa, 37,6kDa, 16,2kDa, 8,8kDa, and 6,3kDa. In organ liver control (LiC) 8 protein band and liver T2DM (LiDM) 6 protein band showed has similarity and variability protein band. The similarity protein band in molecular weight 6,3kDa. The variability protein band in LiDM shown has many protein has lost in T2DM case such as 121,8kDa, 83,6kDa, 60,2kDa, 32,7kDa, 20,4kDa, 9,2kDa, 8,0kDa, besides that we found new protein with molecular weight 133,8kDa, 91,9kDa, 69,3kDa, 37,6kDa, and 9,2kDa.

Protein in kidney control (KC) and kidney T2DM (KDM) has similarity in protein with molecular weight 76,1kDa. Variability protein in KDM has absent some protein compared with KC such as 154,1kDa, 110,9kDa, 39,4kDa, 16,2kDa, 8,8kDa, 6,0kDa and we also found protein 63,1kDa, 27,1kDa, 20,4kDa, 8,0kDa, and 6,3kDa. This variability is related to gene coding that will be performed on the basis of either organ function as well as under normal conditions. The protein products available in organs under normal conditions are associated with genes encoded to carry out their functions[10].

#### CONCLUSION

In this study, we concluded that T2DM animal model has show different amount and profile band protein compared with control rat.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by DGHE, Ministry of Science, Technology and Higher Education and LPDPIndonesia 2017. Thanks to Yoga Tribakti Rahmat for kindness in laboratory and Biosains Institute UB for providing the laboratory equipments.

#### REFERENCES

- [1] C. M. Kuzminski, S. Shetty, L. Orzi, R. H. Ungar, and P. E. Scharer, "Diabetes and apoptosis: lipotoxicity," *Apoptosis*, vol. 14, no. 12, pp. 1484–1495, Dec. 2009.
- [2] C. J. Nolan, P. Damm, and M. Proutki, "Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management," *Lancet*, pp. 169–181, 2011.
- [3] D. S. A. Elaziz, M. H. Hafiz, N. M. Galal, S. S. Meshal, and A. M. El Marafy, "CD4+ CD25+ cells in type 1 diabetic patients with other autoimmune manifestations," *Journal of Advanced Research*, vol. 5, no. 6, pp. 647–655, Nov. 2014.
- [4] P. Tessari et al., "Insulin resistance of amino acid and protein metabolism in type 2 diabetes," *Clinical Nutrition*, vol. 30, no. 3, pp. 267–272, Jun. 2011.
- [5] B. A. Menge et al., "Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes," *Regulatory Peptides*, vol. 160, no. 1–3, pp. 75–80, Feb. 2010.
- [6] M. Rika and Fatchiyah, "Influence of CSNIS2 protein from Caprine milk Etawah Breed (EB) on histology of microglial cells in rat (*Rattus norvegicus*) Type-2 diabetes mellitus (T2DM)," 2017, p. 060001. AIP Proceeding
- [7] Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, and S. Rahayu, *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga, 2011.
- [8] F. A. Rantam, *Metode Imunologi*. Surabaya: Airlangga University Press, 2003.
- [9] G. Mahaswari, U. Fajriah, and S. Subakti, "Karakterisasi Protein *Lernaea cyprinacea* Dengan Metode Elektrofresis SDS-PAGE," *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, vol. 2, pp. 62–66, 2010.
- [10] E. Tadjuidjo and R. S. Hagda, "The Eyes Absent Proteins in Development and Disease," *Cell Mol Life Science*, vol. 70 (11), pp. 1897–1913, 2013.

\*\*\*



Lampiran 9. Sertifikat dan Penghargaan Best Presenter, Seoul 2018





