

LAPORAN AKHIR
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (M)



**Efektifitas Retinol dalam Mengatasi Resistensi Insulin secara *in vitro* pada
Kultur Adiposit yang Dipapar Glukosa Tinggi**
Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

dr. Novi Khila Firani, Mkes. (NIDN 0002117601)

dr. Bambang Prijadi, MS. (NIDN 0024035204)

Dibiayai oleh :
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya
Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan
SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 153/SK/2013 tanggal 28 Maret 2013

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
November 2013

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Efektifitas Retinol dalam Mengatasi Resistensi Insulin secara *in vitro* pada Kultur Adiposit yang Dipapar Glukosa Tinggi

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : dr. Novi Khila Firani, MKes
NIDN : 0002117601
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Pendidikan Dokter
Nomor HP : 08121634787
Alamat surel (e-mail) : Jl. Mertojoyo Blok H no.2 Malang (novikhila@yahoo.com)
Anggota (1)

Nama Lengkap : dr. Bambang Prijadi, MS
NIDN : 0024035204
Perguruan Tinggi Anggota : Universitas Brawijaya

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 57.500.000
Biaya Keseluruhan : Rp. 127.500.000

Malang, 6 Desember 2013

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran UB

Dr. Karyono Mintaroen, SpPA
NIP. 19501161980021001

Ketua

dr. Novi Khila Firani, MKes
NIP. 197611022003122001

Mengetahui,
Pjs. Ketua LPPM Universitas Brawijaya

Prof. Dr. In Sjir Chuzzaemi, MS
NIP. 195305141980022001

ABSTRAK

Resistensi insulin berperan dalam patogenesis diabetes mellitus (DM). Pada studi sebelumnya diketahui bahwa kadar serum retinol pada pasien DM lebih rendah daripada orang yang sehat, yang berkorelasi dengan peningkatan kadar glukosa darah pasien. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan pengaruh retinol dalam meningkatkan ekspresi reseptor insulin dan enzim phosphoinositol-3 kinase (PI3K), yang berperan dalam sinyal insulin intraseluler, pada kultur adiposit dengan paparan glukosa yang tinggi (25 mM) sebagai model resistensi insulin secara in vitro. Retinol diberikan pada dosis 0,1 μ M, 1 μ M, dan 10 μ M. Ekspresi insulin reseptor dan PI3K diukur dengan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan glukosa tinggi (25mM) pada kultur adiposit menyebabkan penurunan ekspresi insulin reseptor dan enzim PI3K, dibandingkan pada kultur adiposit pada kondisi glukosa normal (5mM). Terapi retinol dosis 0,1 μ M, 1 μ M, dan 10 μ M pada kultur adiposit yang dipapar glukosa tinggi diketahui dapat meningkatkan ekspresi enzim PI3K dan ekspresi insulin reseptor. Temuan ini menunjukkan bahwa terapi retinol dalam kondisi glukosa tinggi, dapat menginduksi peningkatan reseptor insulin dan ekspresi PI3K, yang selanjutnya diharapkan dapat menurunkan resistensi insulin dalam kondisi hiperglikemia.

Kata kunci : retinol, kultur adiposit yang dipapar glukosa tinggi, insulin reseptor, phosphatidilinositol-3 kinase

ABSTRACT

Insulin resistance plays a role in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM). In the previous studies it was known that serum retinol level in DM patient was lower than healthy people, which correlated with an increase in glucose levels of these patients. This study aimed to explain the effect of retinol in enhancing the expression of insulin receptor and phosphoinositol-3 kinase (PI3K) in adipocytes culture with high glucose exposure (25 mM) as a model of insulin resistance in adipocytes. Retinol was given a dose of 0.1 μ m, 1 μ m, and 10 μ m. Insulin receptor and PI3K expression was measured by ELISA method. The result showed that high glucose exposure (25 mM) on adipocyte culture decrease the expression of insulin receptor and PI3K, compare with adipocyte culture exposed to normal glucose (5mM). Retinol therapy 0.1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M could increase insulin receptor and PI3K expression in adipocytes culture with high glucose exposure. This finding suggests that retinol therapy in high glucose conditions, can induce increasing of insulin receptor and PI3K, which in turn is expected to reduce insulin resistance in hyperglycemic conditions.

Kata kunci : retinol, adipocyte culture with high glucose exposure, insulin receptor, phosphatidilinositol-3 kinase

RINGKASAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia, suatu penyakit dengan berbagai komplikasi dan dapat menyebabkan kematian dini. Insiden penyakit ini di Indonesia terus meningkat. Terapi yang digunakan untuk pasien DM saat ini terbatas pada pemberian insulin dan empat jenis agen antidiabetik oral yang bekerja menstimulasi sekresi insulin pankreas, menurunkan produksi glukosa hepar, memperlambat pencernaan dan absorpsi karbohidrat di intestinal, serta meningkatkan sensitivitas reseptor insulin. Namun setiap obat tersebut masih mempunyai efikasi yang bervariasi, sehingga dibutuhkan terapi aditif untuk meningkatkan respons terapi yang adekuat pada kondisi resistensi insulin.

Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa vitamin A (retinol) diperlukan dalam proses sekresi insulin oleh kelenjar pankreas. Dari penelitian juga menunjukkan bahwa ternyata kadar serum retinol pada penderita diabetes mellitus sangat rendah, yang berkorelasi dengan peningkatan kadar glukosa penderita DM. Oleh karena itu perlu diteliti apakah pemberian terapi retinol efektif untuk mengatasi kondisi resistensi insulin pada DM, melalui penelitian secara *in vitro* pada kultur adiposit yang dipapar glukosa tinggi sebagai model kondisi DM. Kemudian dilakukan pengukuran insulin reseptor di sel adiposit serta phosphatidilinositol-3 kinase (PI3K) yang bertanggungjawab dalam sinyaling insulin intraseluler.

Resistensi reseptor insulin menyebabkan terjadinya toleransi glukosa di jaringan, sehingga glukosa tidak dapat memasuki sel, yang berakibat timbulnya hiperglikemia. Patogenesis terjadinya resistensi insulin dimulai dari reseptor insulin yang berada di membran sel, dan berlanjutnya pada sinyaling pasca reseptor, terjadi penurunan aktivasi PI3K sehingga menyebabkan gangguan pengambilan glukosa oleh sel. Melalui penelitian ini mempelajari resistensi insulin secara *in vitro*, serta penatalaksanaannya dengan terapi retinol, menggunakan kultur adiposit tikus yang dipapar glukosa tinggi (25mM) dan glukosa 5mM sebagai kontrol adiposit pada kondisi fisiologis.

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekspresi insulin reseptor pada kultur adiposit dengan glukosa normal (glukosa 5mM) berbeda signifikan ($p=0,03$) dengan kultur adiposit glukosa tinggi (glukosa 25mM), yang mana ekspresi insulin reseptor pada kultur adiposit dengan paparan glukosa 25mM lebih rendah daripada kultur adiposit dengan glukosa normal. Ekspresi insulin reseptor pada kultur adiposit dengan paparan glukosa 5mM tidak berbeda signifikan dengan ekspresi insulin reseptor pada paparan glukosa 25mM yang diterapi retinol 0,1 μM ($p=0,937$), 1 μM ($p=0,241$), dan 10 μM ($p=0,693$). Terapi retinol pada ketiga dosis

tersebut, yakni 0,1 μ M, 1 μ M, dan 10 μ M pada kultur adiposit yang mendapat paparan glukosa tinggi (25mM) menunjukkan ada peningkatan ekspresi insulin reseptor, sehingga ekspresi insulin reseptor pada kelompok adiposit ini tidak berbeda dengan ekspresi insulin reseptor pada kultur adiposit yang dipapar glukosa normal.

Hasil pengukuran ekspresi enzim PI3K pada kultur adiposit dengan glukosa normal (glukosa 5mM) berbeda signifikan ($p=0,031$) dengan kultur adiposit glukosa tinggi (glukosa 25mM) yang mana ekspresi enzim PI3K pada kultur adiposit dengan paparan glukosa 25mM lebih rendah daripada kultur adiposit dengan glukosa normal. PI3K merupakan salah satu enzim yang bertanggung jawab dalam sinyaling insulin. Kondisi glukosa tinggi dapat menyebabkan resistensi insulin. Pada kondisi resistensi insulin terjadi penurunan aktivasi PI3K yang dapat menyebabkan gangguan pengambilan glukosa oleh sel. Ekspresi enzim PI3K pada kultur adiposit dengan paparan glukosa 5mM tidak berbeda signifikan dengan ekspresi enzim PI3K pada paparan glukosa 25mM yang diterapi retinol 0,1 μ M ($p=0,863$), 1 μ M ($p=0,595$), dan 10 μ M ($p=0,494$). Terapi retinol pada ketiga dosis tersebut, yakni 0,1 μ M, 1 μ M, dan 10 μ M pada kultur adiposit yang mendapat paparan glukosa tinggi (25mM) juga menunjukkan ada peningkatan ekspresi enzim PI3K, sehingga ekspresi enzim PI3K pada kelompok adiposit ini tidak berbeda dengan ekspresi enzim PI3K pada kultur adiposit yang dipapar glukosa normal. Hal ini menunjukkan bahwa terapi retinol pada kondisi glukosa tinggi, dapat menginduksi peningkatan ekspresi enzim PI3K, yang selanjutnya diharapkan dapat menurunkan resistensi insulin. Namun peranan retinol dalam mengatasi resistensi insulin masih perlu dibuktikan lebih jauh secara in vivo, dengan menggunakan hewan coba model diabetes mellitus tipe 2 yang mengalami resistensi insulin.

SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is one of the health problems in Indonesia, a disease with many complications and can cause premature death. The incidence of this disease in Indonesia continues to increase. Therapy used for patients with diabetes is currently limited to insulin and four types of oral antidiabetic agents that work to stimulate pancreatic insulin secretion, decrease hepatic glucose production, slows digestion and absorption of carbohydrates in the intestinal tract, as well as increasing the sensitivity of insulin receptors. However, these drugs still have very efficacy variable, so it takes an additive therapy to improve adequate response therapy on insulin resistance.

Previous studies have shown that vitamin A (retinol) is required in the process of insulin secretion by the pancreas gland. From the research also reveals that serum retinol levels in people with diabetes mellitus is very low, which correlated with an increase in glucose levels in diabetic patient. Therefore, it is necessary to study whether retinol therapy effective to overcome insulin resistance in diabetes, through in vitro studies in adipocytes culture exposed to high glucose as a model of diabetes condition. The insulin receptors in adipocytes cells and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) which is responsible for the intracellular insulin signaling are measured in this study.

The resistance of insulin receptors leads to impaired glucose tolerance in the network, so that glucose can not enter cells, resulting in the onset of hyperglycemia. The pathogenesis of insulin resistance is starting from insulin receptors located on the cell membrane, and continued in the post-receptor signaling, decrease in activation of the PI3K, thus causing disruption glucose uptake by cells. This research will study the insulin resistance in vitro and its management with retinol therapy, using rat adipocytes culture exposed to high glucose (25mM) and 5mM as control adipocyte glucose at physiological conditions.

In this research showed that the expression of the insulin receptor in adipocytes culture with normal glucose (glucose 5mM) were significantly different ($p = 0.03$) with high glucose (glucose 25mM) adipocytes culture, which the expression of the insulin receptor in adipocytes culture with glucose exposure 25mM is lower than adipocytes culture with normal glucose. The expression of insulin receptors in adipocytes culture with 5mM glucose exposure did not differ significantly with the expression of insulin receptor in high glucose adipocyte culture which treated with retinol 0.1 μ M ($p = 0.937$), 1 μ M ($p = 0.241$), 10 μ M ($p = 0.693$).

The results of measurements the PI3K enzyme expression in adipocytes culture with normal glucose (glucose 5mM) were significantly different ($p=0.031$) with high glucose cultured adipocytes (glucose 25mM), which PI3K enzyme expression in cultured adipocytes with glucose exposure is also lower than cultured adipocytes with normal glucose. PI3K is one of the enzymes that are responsible for insulin signaling. High glucose conditions can lead to insulin resistance. With insulin resistance, decreased PI3K activation, and than can lead to impaired glucose uptake by cells. PI3K enzyme expression in cultured adipocytes with 5mM glucose exposure did not differ significantly with the expression of PI3K enzyme in glucose exposure 25mM treated with retinol 0,1 μ M ($p = 0.863$), 1 μ M ($p = 0.595$), and 10 μ M ($p = 0.494$).

Retinol therapy in three doses, 0,1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M in adipocytes culture that gets exposure to high glucose (25mM) also show increased expression of PI3K enzyme, so that the PI3K enzyme expression in adipocytes groups with high glucose exposure were not different from the expression of the enzyme PI3K in cultured adipocytes exposed to normal glucose. This finding suggests that retinol therapy in high glucose conditions can induce increased expression of PI3K enzyme, which in turn is expected to reduce insulin resistance. However, the role of retinol in overcoming insulin resistance remains to be seen further in vivo, using animal models of type 2 diabetes mellitus who have insulin resistance.