

B/FEH  
2004  
0090

**STUDI IMUNOHISTOKIMIA ANTIOKSIDAN  
COPPER,ZINC-SUPEROXIDE DISMUTASE (Cu,Zn-SOD)  
PADA HATI MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)  
DIABETIK EKSPERIMENTAL**

SKRIPSI

**KHALIDA NOOR**

**B01497069**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**2001**



*"Dan seandainya pohon-pohon di bumi menjadi pena dan laut menjadi tinta, ditambahkan kepadanya tujuh laut (lagi) sesudah (kering)nya, niscaya tidak akan habis-habisnya (dituliskan) kalimat (ilmu) Allah. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Bijaksana"*  
(QS. Lukman ayat 27)

*"...dan kami bersyukur kepada Tuhan  
Yang melebarkan gerbang tua kami  
Dan kami bersyukur pada Ibu Bapak  
Yang sepanjang malam selalu berdo'a  
Dan terbungkuk membiayai kami..."*  
(Taufik Ismail)

Dengan penuh kasih, karya kecil ini dipersembahkan  
untuk yang istimewa dalam hidupku :  
Mamah-Bapak, Teh Ophie-A Rudhi, A Tsani,  
Teh Alis-A Jenny, Fiera-sayang dan seluruh keluarga tercinta  
Serta untuk seseorang yang selalu kusayang, kemarin, hari ini, dan esok

## RINGKASAN

**KHALIDA NOOR.** Studi Imunohistokimia Antioksidan *Copper, Zinc-Superoxide Dismutase* (Cu,Zn-SOD) pada Hati Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Diabetik Eksperimental. Di bawah bimbingan **TUTIK WRESDIYATI ASTAWAN** sebagai Pembimbing I dan **R.P. AGUS LELANA** sebagai Pembimbing II.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas pertahanan antioksidan seluler, terutama sel hati, pada satwa primata sebagai hewan model dalam riset diabetes mellitus. Pengamatan dilakukan secara imunohistokimia terhadap organ hati monyet ekor panjang (n=5) yang hiperglikemia akibat kerusakan pulau Langerhans oleh induksi Alloxan (IV 20-70 mg/kg BB).

Hewan percobaan terdiri atas tiga kelompok, yaitu (1) kelompok kontrol negatif/monyet normal (kadar gula darah <120 mg%), (2) kelompok hiperglikemik tergantung insulin/monyet diabetes tergantung insulin (kadar gula darah >350 mg%) dan (3) kelompok hiperglikemik tidak tergantung insulin/monyet diabetes tidak tergantung insulin (kadar gula darah 120-350 mg%).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terjadi penurunan kandungan enzim antioksidan Cu,Zn-SOD pada hati kelompok diabetes (kelompok tergantung insulin dan kelompok tidak tergantung insulin) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Keadaan ini lebih jelas terlihat pada kelompok tergantung insulin dibandingkan kelompok tidak tergantung insulin.

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa : (1) Pewarnaan imunohistokimia metode *Polymer Peroxidase* telah berhasil memperlihatkan keberadaan enzim antioksidan Cu,Zn-SOD pada hati monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), (2) Kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada monyet diabetes mellitus (kelompok tergantung insulin dan kelompok tidak tergantung insulin) menurun dibandingkan monyet kontrol (normal), terutama pada kelompok tergantung insulin, (3) Perubahan patologis pada hati monyet diabetes tidak bersifat khas, yaitu berupa perlemakan, infiltrasi glikogen, degenerasi berbutir, infiltrasi sel fagosit, dan nekrosa sel.

**STUDI IMUNOHISTOKIMIA ANTIOKSIDAN  
COPPER,ZINC-SUPEROXIDE DISMUTASE (Cu,Zn-SOD)  
PADA HATI MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)  
DIABETIK EKSPERIMENTAL**

Oleh  
Khalida Noor  
B01497069

Skripsi ini diajukan sebagai syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada  
Fakultas Kedokteran Hewan-Institut Pertanian Bogor

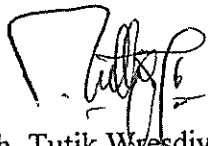
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
2001**

Judul Skripsi : Studi Imunohistokimia Antioksidan *Copper, Zinc-Superoxide Dismutase* (Cu,Zn-SOD) pada Hati Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Diabetik Eksperimental

Nama Mahasiswa : Khalida Noor

Nomor Pokok : B01497069

Telah diperiksa dan disetujui  
Oleh

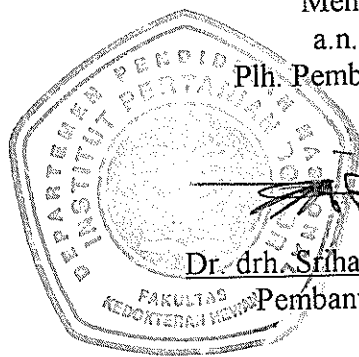



Dr. drh. Tutik Wresdiyati Astawan  
Pembimbing I



drh. R.P. Agus Lelana, SpMP, M.Si  
Pembimbing II

Mengetahui,  
a.n. Dekan  
Plh. Pembantu Dekan I



  
Dr. drh. Srihadi Agungpriyono  
Pembantu Dekan III

Tanggal lulus :

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tasikmalaya pada tanggal 5 Maret 1979 sebagai anak keempat dari empat bersaudara dari pasangan Djadja Sutedja dan Yetty Sumaryati.

Pada tahun 1984-1985 penulis mengikuti pendidikan sekunder di Taman Kanak-Kanak Aisyah Tasikmalaya, kemudian melanjutkan ke Sekolah Dasar Negeri Citapen I Tasikmalaya dan lulus pada tahun 1991. Pendidikan lanjutan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 2 Tasikmalaya, lulus pada tahun 1994 dan di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Tasikmalaya, lulus pada tahun 1997. Pada tahun yang sama penulis diterima di Fakultas Kedokteran Hewan-Institut Pertanian Bogor melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI).

Selama menempuh kuliah di IPB, penulis aktif dalam organisasi dan berbagai kegiatan kemahasiswaan baik di dalam maupun di luar kampus.

## UCAPAN TERIMA KASIH

*Bismillahirrahmaanirrahiim,*

Hanya dengan kemampuan dari-Nya penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Untuk itu, segala puji syukur yang tulus penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas kodrat dan iradat-Nya.

Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. drh. Tutik Wresdiyati Astawan dan Drh. R.P. Agus Lelana, SpMP, MSi. yang telah banyak memberikan ilmu, arahan dan bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Dr. drh. Srihadi Agungpriyono, drh. I Ketut Mudite Adnyane dan drh. Dwi Kesuma Sari yang telah banyak memberikan bantuan dan bimbingan berbagai keterampilan laboratorium.
3. Dr. M. B. M. Malole sebagai pembimbing akademik yang telah banyak memberikan dorongan semangat, bantuan dan nasihat-nasihatnya.
4. dr. Barita Sitompul yang mengizinkan penggunaan hewan modelnya untuk bahan penelitian penulis.
5. Dr. drh. Ekowati Handharyani sebagai ketua penguji pada sidang penulis.
6. Mamah dan Bapak, kakak-kakak tersayang (Teh Sofie, A Rudhi, A Tsani, Teh Alis, A Jenny) Fiera, Arief dan keluarga, serta kerabat dekat yang senantiasa memberikan dorongan semangat, doa, cinta dan kasih yang penuh arti bagi penulis.



7. Keluarga besar MP, Pak Tri, Ibu Ema, Pak Catur, Ibu Anis, Oma, Pak Zarmi, Pak Eka, Ustadz Haris, juga adik-adik tersayang, Ditha dan Dimas.
8. Umi, Dini, Ipis, Esthi, Ulfa, Tina, Dikdik, Vivi, Vera, Sofie dan Lusi yang telah bersama-sama menjalani penelitian dengan penuh ketabahan dan keriaan di Laboratorium Histologi Bagian Anatomi FKH-IPB.
9. Kak Pebi, Guswandi dan Teh Erni atas bantuan dan masukannya dalam penulisan skripsi ini.
10. Meiti, Pipit, Yoan, Nesy, Mimin, Kak Sam, Mbak Dina, Yuli, Rini, Putu, Firman, Anita, Andi, Ude, Huda, Arief Cahyo, Kamil, Gatot-Rik, Kemaz, teman-teman di Genetika 21 dan Himpro Satwa Liar, terima kasih atas kebersamaan dalam keindahan persahabatan yang terjalin. Semoga semua yang telah kita lalui menjadi cerita indah kelak.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, namun penulis tetap berharap semoga karya kecil ini dapat bermanfaat.

Bogor, Agustus 2001

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN .....	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan .....	3
1.3 Hipotesa .....	3 ✓
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	
2.1 Monyet Ekor Panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) .....	4
2.2 Alloxan .....	6
2.3 Hati .....	8
2.4 Diabetes Mellitus .....	11
2.5 Radikal Bebas dan <i>Scavenger</i> Radikal Bebas.....	14
2.6 Teknik Imunohistokimia.....	17
III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN .....	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	20
3.2 Materi Penelitian .....	20
3.3 Metode Penelitian .....	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	

4.1 Hasil Pengamatan .....	24
4.2 Pembahasan.....	30
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	
5.1 Kesimpulan .....	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA .....	35
LAMPIRAN .....	38

## DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
1.	Kandungan Cu,Zn-SOD pada sel hati monyet kelompok kontrol dan kelompok diabetes mellitus eksperimental .....	25
2.	Pengaruh diabetik eksperimental terhadap kandungan Cu,Zn-SOD pada hati monyet ekor panjang.....	26

## DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
1.	Struktur Alloxan .....	6
2.	Kompleks antigen-antibodi pada teknik <i>Polymer Peroxidase</i> .....	19
3.	Reaksi pembentukan produk berwarna .....	19
4.	Jumlah sel yang bereaksi pada berbagai tingkat kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada setiap kelompok perlakuan.....	26
5.	Gambaran kandungan Cu,Zn-SOD pada monyet kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....	28
6.	Gambaran histopatologi hati monyet kontrol dan kelompok perlakuan ....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

No	Teks	Halaman
1.	Prosedur pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE) .....	39
2.	Prosedur pewarnaan imunohistokimia .....	40
3.	Sidik ragam pengaruh diabetes mellitus terhadap kandungan Cu,Zn-SOD	41

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Oksigen sangat diperlukan tubuh karena berperanan penting dalam proses metabolisme. Berbagai proses metabolisme normal dalam tubuh menghasilkan radikal bebas dalam jumlah kecil sebagai produk antara (Bulkey, 1983 dan Park *et al.*, 1986 dalam Gitawati, 1995). Pada proses tersebut, oksigen tereduksi menjadi air, namun 2-5% oksigen yang dikonsumsi tereduksi secara parsial membentuk senyawa reaktif yang dikenal sebagai *reactive oxygen species* (ROS) (Asikin, 2001). Sifat reaktif oksigen tersebut dapat berakibat toksik bagi sel-sel tubuh karena molekul tersebut dapat hadir bebas dalam keadaan tidak stabil akibat kehilangan sebuah elektron pada gugus atomnya (Widjajanto dan Wiyana, 2001).

ROS dan berbagai radikal bebas lain berpotensi menimbulkan kerusakan oksidatif yang dikaitkan dengan proses penuaan dan beberapa penyakit seperti penyakit jantung, kanker dan diabetes mellitus (Freisleben, 2001). Menurut Tejasari (2000), besarnya kerusakan oksidatif bergantung pada kecepatan pembentukan radikal bebas oksigen dan kapasitas pertahanan antioksidan dalam tubuh.

Pada diabetes terjadi percepatan dan peningkatan kerusakan oksidatif karena tingginya kadar glukosa darah dan glukosa darah tersebut tidak dapat disimpan dan dipakai sempurna sehingga pemenuhan energi oleh penderita diabetes dilakukan dengan proses oksidasi. Peningkatan radikal bebas yang terjadi cenderung akan meningkatkan komplikasi diabetes seperti nefropati (gangguan ginjal) yang bisa

menyebabkan gagal ginjal, juga mikro dan makroangiopati yang menyebabkan *stroke*, serta jantung koroner (Soeatmadji, 2001).

Pada keadaan fisiologis, tubuh memiliki mekanisme proteksi yang dapat menetralkan pembentukan dan/atau efek radikal bebas, antara lain dengan adanya *scavenger* radikal bebas berupa enzim-enzim seperti *catalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx) dan tiga isoform *superoxide dismutase* (SOD) ; *copper, zinc* (Cu,Zn)-SOD, *manganese* (Mn)-SOD dan *extracellular* (EC)-SOD. Namun pada kondisi pertahanan antioksidan seluler lemah, pembentukan radikal bebas yang berlebihan tidak bisa dinetralkan sehingga dapat memperparah keadaan patofisiologis yang telah terjadi (Bulkey, 1983 dan Park *et al.*; 1986 dalam Gitawati, 1995).

Penggunaan hewan model untuk mempelajari diabetes mellitus akan memberikan hasil analisis yang lebih baik mengenai proses biokimia serta organ-organ yang sulit dipelajari pada manusia. Menurut O' Brien *et al.* (1996) dan Yasuda *et al.* (1998), monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) merupakan subjek yang berharga bagi penelitian tentang etiologi dan komplikasi dari diabetes mellitus. Secara fisiologi dan patologis *M. fascicularis* hampir memiliki kesamaan dengan manusia, sehingga hewan ini merupakan hewan penelitian biomedis (Sajuthi, 1984 dalam Mustikasari, 1994).

Moerdowo (1989) menyatakan bahwa diabetes mellitus dapat mengakibatkan perubahan pada semua organ tubuh dan menimbulkan berbagai macam keluhan dan kelainan. Hati merupakan organ tubuh parenkimatis yang paling sering mengalami kerusakan (Darmawan, 1996). Kerusakan akibat molekul radikal akan terjadi bila



kemampuan mekanisme pertahanan tubuh sudah dilampaui atau menurun (Slater, 1984 *dalam* Gitawati, 1995).

Telah dilaporkan bahwa pada diabetes terjadi peningkatan kecepatan pembentukan radikal bebas. Sehubungan dengan itu, untuk mengetahui kapasitas pertahanan antioksidan pada penderita diabetes mellitus, perlu dilakukan pengamatan status enzim Cu,Zn-SOD pada hati hewan model.

## 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada organ hati *Macaca fascicularis* diabetik eksperimental dengan menggunakan pewarnaan khusus imunohistokimia antioksidan Cu,Zn-SOD dan pewarnaan umum *Haematoxylin Eosin* (HE) untuk melihat struktur umum jaringan.

## 1.3 Hipotesa

1. Monyet yang menderita diabetes mellitus akan mengalami perubahan kandungan enzim SOD, khususnya pada organ hati.
2. Induksi Alloxan sebagai zat diabetogenik akan merubah gambaran histopatologi hati.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)

Monyet ekor panjang merupakan jenis monyet yang mempunyai panjang ekor lebih kurang sama dengan panjang tubuh, yang diukur dari kepala hingga ujung tubuhnya. Panjang tubuh berkisar antara 385-648 mm, dan panjang ekornya baik yang jantan maupun betina adalah antara 400-655 mm. Berat tubuh jantan dewasa berkisar antara 3.5 – 8.0 kg, sedangkan betina dewasa berkisar antara 3 kg. Warna tubuhnya bervariasi, mulai dari abu-abu sampai kecoklatan, dengan bagian ventral berwarna putih (Supriatna dan Wahyono, 2000).

Menurut Whitney *et al.* (1978) dalam Nugroho (1994), klasifikasi monyet ekor panjang adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Primata
Subordo	: Anthropoidea
Infraordo	: Catharrhini
Superfamili	: Cercopithecoidea
Famili	: Cercopithecinae
Genus	: <i>Macaca</i>
Spesies	: <i>Macaca fascicularis</i>

Di Indonesia penyebarannya cukup luas, meliputi Sumatera, Kalimantan, Jawa, Bali, Lombok, Sumbawa, Pulau Komodo dan Flores (Sajuthi, 1981;

Whitney *et al.*, 1973; dan Strien, 1983; *dalam* Anindyarini, 1990). Karenanya monyet ini memiliki nama atau sebutan yang berbeda-beda di setiap daerah, seperti Kunyuk (Sunda), Bedes (Tengger), Cigaq (Minangkabau), Ambuk (Dayak), Motak (Madura) dan Belo (Timor). Monyet ini hidup dalam kelompok dan biasanya dijumpai di daerah perkebunan penduduk, seringkali ditemukan di hutan bakau atau di pesisir sampai ke dekat perkampungan (Supriatna dan Wahyono, 2000).

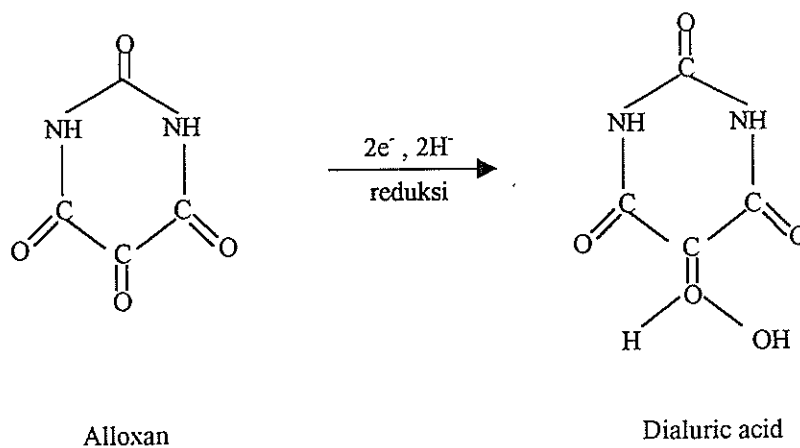
Monyet ekor panjang termasuk kelompok hewan pemakan segala atau omnivora (Roonwal dan Mahnot, 1977 *dalam* Mustikasari, 1994), dengan komposisi yang mengandung lebih banyak buah-buahan (60%), selebihnya berupa bunga, daun muda, biji-bijian, serangga dan moluska (Supriatna dan Wahyono, 2000).

*M. fascicularis* adalah spesies kedua terbanyak setelah Rhesus (*M. mullata*) yang digunakan sebagai hewan percobaan, hal ini dikarenakan kedekatannya dengan manusia dari segi fisiologis dan patologis (Sajuthi, 1984 *dalam* Mustikasari, 1994). Adapun alasan penggunaan *M. fascicularis* sebagai hewan model diabetes mellitus adalah karena penampakan gejala klinis monyet ekor panjang yang menderita diabetes mellitus hampir sama dengan yang terjadi pada *non insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM) pada manusia (O'Brien *et al.*, 1996).

Selain secara spontan, diabetes mellitus pada *M. fascicularis* dapat terjadi secara buatan, yaitu dengan cara penyuntikan zat yang bersifat diabetogenik seperti Alloxan dan Streptozotosin (Yasuda *et al.*, 1988) sebagaimana yang dilakukan oleh Sitompul (1999) dengan induksi Alloxan sebesar 20 mg/kg BB terhadap 28 ekor *M. fascicularis*.

## 2.2 Alloxan

Alloxan adalah reagen ikatan hidrogen sulfida (SH) yang tidak stabil dan bereaksi dengan thiol tetapi tidak dengan sebagian protein atau enzim SH. Alloxan dalam bentuk padat berupa anhidrat atau dalam bentuk monohidrat dan polihidrat (Bruckman and Wertheimer, 1947; Patteron *et al.*, 1949; Resnik and Wolff, 1956 *dalam* Webb, 1966). Struktur Alloxan dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 1. Struktur Alloxan

Alloxan tereduksi menjadi dialurat setelah terjadinya pemindahan atom O dari monohidrat. Dialurat sendiri akan teroksidasi menjadi Alloxan oleh  $O_2$  dan beberapa oksidator lain. Reduksi Alloxan sering disertai dengan perubahan kelarutan dan reaktivitas Alloxantin yang tidak larut yang terjadi dari konjugasi Alloxan dan asam dialurat (Richardson and Cannan, 1929 *dalam* Webb, 1966).

Kristal Alloxan tidak stabil di temperatur ruangan terbuka, dan akan terurai secara perlahan sehingga membentuk Alloxantin, Oksalat, Urea dan  $CO_2$  (Archibald, 1945 *dalam* Webb, 1966). Menurut Hartman dan Shepard (1955) *dalam* Webb (1966), untuk hasil yang akurat, penggunaan Alloxan sebaiknya dalam bentuk segar

dari pabrik dan disimpan dalam suhu 0°C serta dalam keadaan gelap, karena Alloxan stabil pada pH dibawah 3.5 (larutan asam) maka dapat dibuat dan dinetralkan secepatnya sebelum digunakan, namun untuk hewan kerja dapat diberikan tanpa netralisasi untuk mengoptimalkan daya diabetogeniknya.

Alloxan akan memberikan reaksi terhadap metabolisme karbohidrat, lemak, asam nukleat dan sintesa protein. Pemberian Alloxan akan menghasilkan variasi perubahan kadar gula darah pada mammalia, burung, reptil dan beberapa jenis ikan. Hiperglikemia terjadi secara cepat dan bertahan selama 3-4 jam dan diikuti oleh gejala hipoglikemia selama 6-12 jam dan pada akhirnya akan meningkat kembali menjadi hiperglikemia diabetes yang permanen (Webb, 1966). Terjadinya hiperglikemia pada awal pemberian Alloxan kemungkinan disebabkan oleh adanya pelepasan glukosa dari jaringan dan glukosa yang dilepas oleh hati (Wrenshall *et al.*, 1950 *dalam* Webb, 1966).

Induksi Alloxan dengan dosis yang tepat pada hewan dapat menyebabkan kerusakan yang spesifik pada sel  $\beta$  pankreas. Kerusakan tersebut terjadi dalam waktu singkat yang kemudian akan diteruskan dengan terjadinya diabetes mellitus yang permanen sejalan dengan kegagalan sekresi insulin. Dengan dosis yang lebih tinggi, kerusakan oleh Alloxan dapat menyebar ke jaringan lain, terutama hati dan ginjal (Webb, 1966). Menurut Halliwell dan Gutteridge (1985) Alloxan dapat direduksi oleh enzim SOD, CAT dan GPx yang kemudian akan menjadi komponen yang tidak membahayakan. Enzim-enzim tersebut paling banyak terdapat di hati kemudian ginjal dan sedikit sekali pada organ-organ lain (Makita, 1993).

Terdapat banyak zat yang dapat memperlambat, menurunkan dan menghilangkan aksi Alloxan terhadap sel  $\beta$  ketika diinduksikan sebelum atau setelah induksi Alloxan, diantaranya adalah dimekaprol, propanol, isopropanol, o-fenilendiamin, bisulfit, tioglikolat, nukleotida pentosa cendawan, metionin, norepinefrin, fenilefrin, 3,4-diamino toluen dan 1,2-dimetil-4-amino-5-(ribitilamin) benzen (Webb, 1966). Berbagai teori tentang bagaimana proteksi terhadap kerja Alloxan telah dikembangkan, diantaranya proteksi langsung dari heksokinase, metabolisme glukosa yang menghasilkan substansi yang berenergi tinggi (Villar-Palasi *et al.*, 1957 *dalam* Webb, 1966) dan adanya pelepasan epinefrin oleh glukosa (Vollmer, 1960 *dalam* Webb, 1966).

Penggunaan Alloxan sebagai zat diabetogenik telah banyak dilaporkan oleh para peneliti, diantaranya adalah Haider *et al.* (1981) yang menggunakan Alloxan untuk membuat hewan model diabetes mellitus pada *Macaca mullata*, Ganda *et al.* (1976) pada tikus, Matsuhita *et al.* (1997) pada anjing, dan Sitompul (1999) pada *M. fascicularis*.

### 2.3 Hati

Hati merupakan organ parenkimatis sekaligus kelenjar terbesar di dalam tubuh. Pada manusia dewasa beratnya sekitar 1200-1600 gram dan menempati hampir seluruh bagian atas kanan abdomen, mulai dari sela interkostal kelima sampai pada lengkung iga (Darmawan, 1996).

Hati manusia terdiri atas empat lobus, yaitu lobus kanan, lobus kiri, lobus caudatus dan lobus quadratus. Lobus kanan adalah yang terbesar, besarnya sekitar 3/5 hati, lobus kiri 3/10 hati, dan sisanya 1/10 adalah lobus caudatus dan lobus quadratus. Suplai darah ke organ hati melalui *arteri hepatica* dan *vena portae*, dan darah disalurkan ke luar hati melalui *vena hepatica* yang kemudian ke dalam *vena cava caudalis* (Darmawan, 1996).

Secara histologi hati mempunyai beberapa jenis jaringan yang penting, yaitu sel-sel hati (hepatosit) dan kanal empedu kecil-kecil, kapiler sinusoid yang berlapis sel endotel, sel Kupfer, ruang Disse, interstitium segitiga Kiernan, dan *vena sentralis*. Terjadi hubungan yang sangat erat diantara jaringan-jaringan tersebut, sehingga kerusakan salah satu jaringan dapat mengakibatkan kerusakan jaringan lain. Histologis hati terdiri atas dua lobulus, yaitu lobulus anatomik dan lobulus fungsional. Lobulus anatomik terdiri atas *vena sentralis* sebagai titik tengah yang mengalirkan darah ke *vena sublobularis* dan kemudian ke *vena hepatica*, parenkim hati yang terdiri atas ruang Disse yang terletak antara sel hati dan sinusoid, dan segitiga Kiernan atau daerah portal sebagai batas luar lobulus. Sedangkan lobulus fungsional terdiri atas segitiga Kiernan sebagai titik tengah dan *vena sentralis* sebagai batas luar. Dalam mempelajari patologi, lobulus yang lebih penting adalah lobulus anatomik (Darmawan, 1996).

Menurut Ressay (1984), hati mempunyai fungsi fisiologis banyak sekali, dan beberapa fungsi penting diantaranya adalah :

1. Metabolisme karbohidrat, protein dan lemak

2. Sebagai alat detoksikasi bahan-bahan seperti toksin, kuman, obat-obatan, mineral dan kelebihan hormon
3. Memproduksi getah empedu dan protein plasma (albumin dan globulin)
4. Berperan dalam pembentukan darah merah dan penggumpalan darah
5. Metabolisme dan penyimpanan vitamin

Hati adalah organ tubuh yang paling sering mengalami kerusakan, namun organ ini mempunyai cadangan fungsional yang luar biasa. Pada hewan percobaan telah dibuktikan bahwa 10% parenkim hati saja sudah cukup untuk mempertahankan fungsi hati normal. Pada manusia kerusakan hati haruslah luas sekali untuk menimbulkan gejala klinik insufisiensi hepatic (Darmawan, 1996). Daya regenerasi sel-sel hati besar sekali. Pada hati normal diketahui bahwa lobektomi sebanyak 70% pada hati mengakibatkan proliferasi sel-sel hati yang sangat giat, sehingga dalam 2-3 minggu bagian hati yang hilang dapat diganti kembali (Ressang, 1984).

Kerusakan sel oleh radikal bebas reaktif didahului oleh kerusakan membran sel (Slater, 1984 *dalam* Gitawati, 1995) dan secara langsung mempengaruhi pengaturan metabolisme. Proses patofisiologi yang melibatkan pembentukan radikal bebas dengan adanya kerusakan jaringan banyak dipelajari, terutama mengenai penyakit-penyakit degeneratif, proses penuaan dan kanker (Hess dan Manson, 1984 *dalam* Gitawati, 1995). Berkaitan dengan hal tersebut, hati sebagai kelenjar terbesar dalam tubuh berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh dengan kandungan *scavenger* endogen berupa enzim-enzim seperti CAT, GPx, dan SOD. Secara fisiologik enzim-enzim tersebut menetralkan radikal bebas selama proses metabolisme normal, namun jika produksi radikal bebas melebihi kandungan enzim



antioksidan tubuh maka akan terjadi kerusakan sel akibat stres oksidatif (Bulkley, 1983 *dalam* Gitawati, 1995).

## 2.4 Diabetes Mellitus

Diabetes merupakan abnormalitas metabolisme sekaligus defisiensi dari sekresi pulau-pulau Langerhans dan kurangnya hormon insulin, sehingga jaringan tubuh mengalami gangguan fisiologis, terutama kegagalan metabolisme karbohidrat pada tingkat normal (Wells, 1990). Sejak penemuan insulin, penelitian tentang diabetes baik secara seluler maupun secara klinis semakin berkembang secepat teknik diagnosa dan laboratorium yang menampungnya (Krall *et al.*, 1994).

Sampai sekarang, pendapat yang mendasari pengertian diabetes mellitus pada umumnya adalah karena kekurangan insulin secara absolut atau secara relatif. Kekurangan insulin ini dikarenakan sel  $\beta$  mengalami kelainan yang disebabkan oleh beberapa faktor yang berupa gangguan mutasi struktural gen untuk insulin, gangguan melipatnya proinsulin di daerah retikulum endoplasmik sehingga ikatan disulfida tidak sempurna, gangguan atau kelainan penguraian proinsulin menjadi insulin pada peptida-C dalam granula, gangguan pada glukoseptor sel  $\beta$  dengan respon normal terhadap gula darah dan perubahan jumlah sel  $\beta$  dengan meningkatnya usia (Moerdowo, 1989).

Pada tahun 1674, Thomas Willis seorang dokter ahli anatomi dan profesor di Oxford menemukan bahwa urin penderita diabetes ternyata manis, akan tetapi baru

pada tahun 1776, Mathew Dobson dari Manchester yang membuktikan bahwa diabetes mensekresikan gula dalam urin (Krall *et al.*, 1994).

Menurut Sukaton (1987) diabetes mellitus diketahui dengan tanda-tanda haus yang hebat, kencing yang banyak, penurunan berat badan dan kadang-kadang koma. Selain kadar gula darah yang tinggi juga ditemukan adanya glukosuria. Untuk mendiagnosanya hanya perlu dilakukan pemeriksaan kadar gula darah tanpa disertai uji tertentu. Apabila tanpa tanda-tanda yang jelas dan diketahui kadar gula darah tidak terlalu tinggi, maka perlu dilakukan pemeriksaan kadar gula darah puasa atau setelah diberi diet karbohidrat tertentu dalam keadaan standar tertentu.

Klasifikasi diabetes mellitus dan gangguan toleransi glukosa menurut WHO (1985) *dalam* Bennet (1994), adalah sebagai berikut :

#### A. Penggolongan Klinis

##### 1. Diabetes Mellitus

- a. *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM)
- b. *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM)
  - tidak gemuk
  - gemuk
- c. Diabetes mellitus yang berkaitan dengan malnutrisi
- d. Tipe lain yang berhubungan dengan keadaan tertentu maupun sindrom tertentu : penyakit pankreas, penyakit hormonal, keadaan yang disebabkan oleh obat atau zat kimiawi.

gangguan reseptor insulin, sindrom genetik tertentu, dan lain-lain.

2. Gangguan toleransi glukosa

- a. tidak gemuk
- b. gemuk
- c. gangguan toleransi glukosa yang berhubungan dengan keadaan dan sindrom tertentu

3. Diabetes gestasional

B. Golongan dengan resiko statistik tinggi

(Penderita dengan toleransi glukosa normal tetapi mempunyai resiko untuk menjadi diabetes)

- a. gangguan toleransi glukosa abnormal sebelumnya
- b. potensial bertoleransi glukosa normal

Klasifikasi tersebut dapat dijadikan acuan dalam mendiagnosa diabetes mellitus, namun belum dapat menampung semua kasus, misalnya menurut Soekaton (1987) kasus diabetes sekunder dapat juga masuk dalam IDDM atau NIDDM. Untuk melengkapi data epidemiologis, maka WHO juga mencantumkan data tambahan seperti usia, jenis kelamin, kecenderungan ketosis dengan atau tanpa insulin, kegemukan serta riwayat diabetes dalam keluarga.

Pada diabetes, menurut Soeatmadji (2001), terjadi percepatan dan peningkatan kerusakan oksidatif karena tingginya kadar glukosa darah. Glukosa mengalami transformasi menjadi *advance glycation endproducts* (AGEs) yang dapat menjadi

perekat molekul dan menyebabkan penyempitan pembuluh darah. Pada diabetes, AGEs sulit dibersihkan ginjal sehingga makin merusak.

Peningkatan radikal bebas dalam tubuh akan meningkatkan kecenderungan komplikasi diabetes, seperti retinopati, nefropati, juga mikro atau makroangiopati yang menyebabkan *stroke*, serta jantung koroner. Untuk mencegahnya, penderita diabetes perlu mengendalikan kadar gula darah, baik dengan obat atau diet serta mengatur makanan yang seimbang yang kaya antioksidan alami, seperti sayuran dan buah segar sumber karoten, vitamin C dan vitamin E (Soeatmadji, 2001).

## 2.5 Radikal Bebas dan *Scavenger* Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar (Slater, 1984, Hess dan Manson, 1984 *dalam* Gitawati, 1995). Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan radikal bebas tersebut bersifat labil dan secara kimiawi sangat reaktif (Widjajanto dan Wiyana, 2001).

Karena kekurangan elektron, radikal bebas akan berusaha melengkapi jumlah elektronnya dengan mencurinya dari elektron makromolekul biologis disekitarnya seperti protein, asam lemak tak jenuh (ALTJ), lipopolisakarida dan asam nukleat. Akibatnya, makromolekul yang teroksidasi akan terdegradasi dan jika makromolekul tersebut merupakan pembentuk sel atau organelnya maka akan berakibat kerusakan sel (Halliwell dan Gutteridge, 1990). Reaksi serupa akan dilakukan oleh tuan rumah yang kecurian elektron tadi, sehingga muncul korban berikutnya yang membentuk radikal bebas lagi. Begitu seterusnya hingga terbentuk sebuah reaksi berantai.

Perusakan sel oleh radikal bebas reaktif tersebut didahului dengan kerusakan membran sel (Slater, 1984 *dalam* Gitawati, 1995) akibatnya muncul lubang pada dinding-dinding sel (Widjajanto dan Wiyana, 2001). Radikal bebas cukup berbahaya karena menyerang materi genetik yang vital, DNA (asam deoksiribonukleat), serta merusak struktur dan fungsi membran sel, sehingga memicu timbulnya beberapa penyakit degeneratif, misalnya jantung koroner dan kanker, atau proses penuaan (Widjajanto dan Wiyana, 2001).

Berbagai proses metabolisme normal dalam tubuh dapat menghasilkan radikal bebas dalam jumlah kecil sebagai produk antara. Sebagian besar molekul oksigen reaktif bersifat radikal seperti hidroksil ( $\text{OH}^*$ ), anion superoksida ( $\text{O}_2^*$ ), peroksil ( $\text{RO}_2^*$ ), triklorometil ( $\text{CCl}_3^*$ ), dan nitrogen oksida ( $\text{NO}^*$ ) (Halliwell dan Gutteridge, 1990 ; Langseth, 1995 ; Auroma, 1997 *dalam* Tejasari, 2000).

Di dalam sel hidup, radikal bebas terbentuk pada membran plasma dan organel-organel seperti mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasmik dan sitosol, melalui reaksi-reaksi enzimatik fisiologik yang berlangsung dalam proses metabolisme, proses fagositosis oleh sel-sel fagositik termasuk netrofil, monosit, makrofag dan eosinofil, juga menghasilkan radikal bebas yaitu anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) (Halliwell dan Gutteridge, 1984 *dalam* Gitawati, 1995).

Radikal superoksida merupakan jenis yang paling banyak diteliti dan terbentuk bila satu molekul  $\text{O}_2$  menerima satu elektron. Superoksida bersifat oksidan atau reduktan dan dapat bereaksi dengan berbagai substrat biologik. Reaktifitas  $\text{O}_2^-$  sangat terbatas karena adanya dismutasi spontan yang dapat terjadi pada pH fisiologik membentuk  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan  $\text{O}_2$ . Efek negatif atau toksik radikal bebas terjadi jika

jumlahnya melebihi kemampuan detoksifikasi oleh sistem pertahanan antioksidan tubuh sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif, yang berakibat pada kerusakan sel sehingga terjadi percepatan proses penuaan (*accelerated aging process*) termasuk diabetes mellitus (Tejasari, 2000).

*Scavenger* radikal bebas, atau biasa disebut dengan antioksidan, adalah suatu substansi atau molekul yang dapat bereaksi dengan radikal bebas, dan berfungsi menetralkan radikal bebas. Mekanisme pertahanan ini akan mempertahankan kadar radikal bebas terendah yang tidak dapat menyebabkan kerusakan komponen sel. Antioksidan dapat bersifat endogen maupun eksogen. Antioksidan endogen berupa enzim-enzim seperti CAT, GPx, dan SOD, sedangkan yang bersifat eksogen bisa didapat dari substansi/obat seperti alfatokoferol (Vitamin E), Vitamin C, betakaroten, allopurinol, dan sebagainya (Bulkley, 1983 dalam Gitawati, 1995).

SOD adalah salah satu enzim antioksidan yang berperan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif dan secara tidak langsung menjaga keseimbangan dari berbagai radikal bebas yang bersifat toksik bagi sel (Touati, 1992). Enzim ini bekerja sebagai katalisator pada proses dismutasi dari superoksida menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$ . Di dalam sel mammalia dikenal tiga jenis SOD, yaitu *cytosolic* (Cu,Zn)-SOD, *mitochondrial* (Mn)-SOD dan *extracellular* (EC)-SOD.

Cu,Zn-SOD merupakan salah satu SOD yang memegang peranan penting pada sistem pertahanan tubuh (Mates *et al.*, 1999). Enzim ini diisolasi dari berbagai tingkatan organisme seperti yeast/ragi, *Neurospora crassa*, bayam, benih gandum, hati ikan todak, hati ayam, dan darah sapi (Fridovich, 1972). Enzim ini pada umumnya memiliki berat molekul 32,000 dalton dan tersusun atas dua subunit identik

jumlahnya melebihi kemampuan detoksifikasi oleh sistem pertahanan antioksidan tubuh sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif, yang berakibat pada kerusakan sel sehingga terjadi percepatan proses penuaan (*accelerated aging process*) termasuk diabetes mellitus (Tejasari, 2000).

*Scavenger* radikal bebas, atau biasa disebut dengan antioksidan, adalah suatu substansi atau molekul yang dapat bereaksi dengan radikal bebas, dan berfungsi menetralkan radikal bebas. Mekanisme pertahanan ini akan mempertahankan kadar radikal bebas terendah yang tidak dapat menyebabkan kerusakan komponen sel. Antioksidan dapat bersifat endogen maupun eksogen. Antioksidan endogen berupa enzim-enzim seperti CAT, GPx, dan SOD, sedangkan yang bersifat eksogen bisa didapat dari substansi/obat seperti alfatokoferol (Vitamin E), Vitamin C, betakaroten, allopurinol, dan sebagainya (Bulkley, 1983 *dalam* Gitawati, 1995).

SOD adalah salah satu enzim antioksidan yang berperan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif dan secara tidak langsung menjaga keseimbangan dari berbagai radikal bebas yang bersifat toksik bagi sel (Touati, 1992). Enzim ini bekerja sebagai katalisator pada proses dismutasi dari superoksida menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$ . Di dalam sel mammalia dikenal tiga jenis SOD, yaitu *cytosolic* (Cu,Zn)-SOD, *mitochondrial* (Mn)-SOD dan *extracellular* (EC)-SOD.

Cu,Zn-SOD merupakan salah satu SOD yang memegang peranan penting pada sistem pertahanan tubuh (Mates *et al.*, 1999). Enzim ini diisolasi dari berbagai tingkatan organisme seperti yeast/ragi, *Neurospora crassa*, bayam, benih gandum, hati ikan todak, hati ayam, dan darah sapi (Fridovich, 1972). Enzim ini pada umumnya memiliki berat molekul 32,000 dalton dan tersusun atas dua subunit identik

terakhir ini, misalnya oleh Ehrlich dan Landsteiner sebagai pelopor-pelopor dalam pengembangan teknik ini (Kuhlman, 1984).

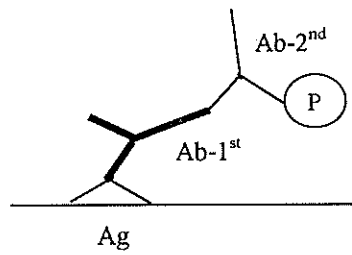
Teknik imunohistokimia adalah salah satu metode imunokimiawi yang sudah banyak dikembangkan. Adapun prinsip dari teknik ini adalah adanya ikatan antigen-antibodi yang digunakan untuk mendeteksi suatu molekul dalam jaringan. Reaksi yang ditimbulkan dapat diamati dengan mikroskop cahaya, dan pada umumnya memberikan gambaran kualitatif dari intensitas produk warna yang terbentuk. Bisa juga data ditampilkan secara kuantitatif, walaupun untuk produk reaksinya hanya dapat ditampilkan secara kualitatif, misalnya kuat (+++), sedang (++), lemah (+/-), dan negatif (-).

Telah dikembangkan beberapa teknik imunohistokimia, diantaranya adalah :

1. *Direct Method*
2. *Two Step Indirect Method*
3. *Protein A Method*
4. *Streptavidin-Biotin Method*
5. *Avidin-Biotin Complex (ABC) Method*
6. *Peroxidase-non Peroxidase*
7. *Alkaline Phosphatase-non Phosphatase Method*
8. *Polymer Peroxidase*

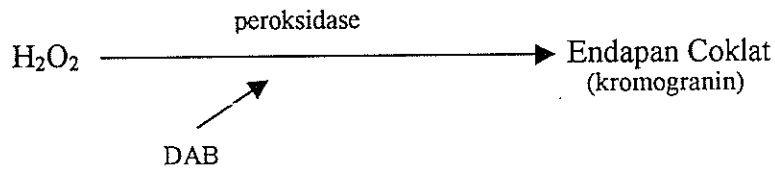
Teknik *Polymer Peroxidase* merupakan teknik yang banyak digunakan. Teknik ini menggunakan dua antibodi, yaitu antibodi primer ( $Ab-1^{st}$ ) dan antibodi sekunder ( $Ab-2^{nd}$ ) yang telah dikonjugasikan dengan peroksidase. Reaksi antigen-antibodi tersebut digambarkan seperti berikut :





Gambar 2. Kompleks antigen-antibodi pada teknik Polymer Peroxidase

Untuk mendeteksi peroksidase, ditambahkan suatu kromogen yang dapat menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) pada suatu reaksi sehingga produk dapat tervisualisasi. Kromogen yang biasa digunakan pada reaksi yang ber-peroksidase adalah diamino benzidin (DAB). Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Reaksi pembentukan produk berwarna

Penambahan DAB tidak akan menghasilkan kromogranin tanpa adanya  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan peroksidase. Di dalam jaringan, antibodi primer akan bereaksi/ berikatan dengan antigen (molekul) jaringan yang dideteksi, selanjutnya antibodi yang dilabel dengan peroksidase akan bereaksi dengan antibodi primer tersebut. Sehingga keberadaan enzim peroksidase ini melambangkan adanya kompleks antigen-antibodi.

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Histologi Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (FKH-IPB). Adapun pelaksanaannya dimulai pada bulan Desember 1999 sampai dengan bulan Desember 2000.

#### 3.2 Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan lima ekor monyet ekor panjang (*M. fascicularis*) jantan yang dipilih dari 28 ekor monyet diabetes eksperimental umur 6-7 tahun dengan berat badan 3-5 kg. Satu ekor monyet normal sebagai kontrol (gula darah <120 mg %), dua ekor monyet *non insulin dependent diabetes mellitus* / NIDDM (gula darah 120-350 mg %) dan dua ekor adalah monyet *insulin dependent diabetes mellitus* / IDDM (gula darah >350 mg %). Hewan-hewan tersebut diperoleh dari hasil penelitian pembuatan hewan model diabetes mellitus oleh Sitompul dan Lelana (1999) di Pusat Studi Satwa Primata Lembaga Penelitian IPB.

#### 3.3 Metode Penelitian

Proses pengambilan sampel organ dilakukan pada saat nekropsi dengan metode perfusi jantung. Monyet dibius dengan Ketamin (10 mg/kg BB) secara intramuskular dan Nembutal (20-30 mg/kg BB) secara intravena, kemudian monyet ditimbang. Setelah rongga dada dan rongga perut dibuka, NaCl fisiologis diperfusikan

melalui selang infus ke ventrikel kiri jantung. *Drainase* darah dilakukan dengan menyobek *vena abdominalis* selebar 2 cm. Setelah darah keluar seluruhnya, organ hati diambil dan sesegera mungkin jaringan dicuci dengan NaCl fisiologis.

Sampel jaringan kemudian difiksasi dalam larutan paraformaldehida 4% selama 3×24 jam. Selanjutnya sampel jaringan dipotong kecil dan dimasukkan ke dalam *tissue cassette* untuk dilakukan proses dehidrasi di dalam seri larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, dijernihkan di dalam xylol dan diembedding dalam parafin. Blok parafin dipotong serial pada ketebalan 4 µm dengan menggunakan mikrotom dan sayatan dilekatkan pada gelas objek (khusus untuk pewarnaan imunohistokimia gelas objek diberi perekat *neofren*).

Pewarnaan HE dilakukan untuk pengamatan terhadap struktur umum jaringan. Adapun tahapan yang dilakukan dalam pewarnaan ini dimulai dengan deparafinisasi, yaitu sediaan dimasukkan ke dalam serial larutan xylol III, II dan I, dengan maksud untuk melarutkan parafin dari jaringan. Pada tahap selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam serial larutan alkohol (alkohol absolut III, II, I, alkohol 100%, 95%, 90%, 80% dan 70%), proses ini dinamakan rehidrasi. Kemudian sediaan disimpan dalam air mengalir (*running water*), dan sesudahnya dimasukkan ke dalam *destilated water* (DW). Sediaan selanjutnya diwarnai dengan pewarna *haematoxylin*, dan kembali disimpan dalam air mengalir untuk menguatkan warna *haematoxylin*, dilanjutkan dengan memasukkannya ke dalam DW. Pewarna kedua adalah eosin alkohol, selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan mencelupkan sediaan ke dalam serial larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, alkohol absolut I, II, dan III. *Clearing*



atau penjernihan dengan xylol I (carboxylol), xylol II dan xylol III. Tahap akhir dari pewarnaan ini adalah *mounting*, yaitu penutupan sediaan dengan *cover glass*.

Pewarnaan khusus imunohistokimia terhadap SOD dilakukan untuk mengamati perubahan kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada jaringan yang diamati. Langkah awal dilakukan seperti pada pewarnaan HE, yaitu deparafinisasi, rehidrasi dan kemudian disimpan di dalam *running water*. Selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam DW. Sementara sediaan di dalam DW, dilakukan pembuatan larutan 1.5 cc H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam 150 cc metanol, dan sediaan kemudian dimasukkan ke dalam larutan tersebut. Kembali sediaan disimpan dalam air mengalir, kemudian dimasukkan ke dalam DW dan dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS). Langkah selanjutnya adalah pemberian *bovine serum albumin* (BSA) pada sediaan sebanyak 50-60 µl, setelah diinkubasikan pada suhu 37°C lalu dicuci kembali dengan larutan PBS. Antibodi yang diberikan pada pewarnaan imunohistokimia ini adalah antibodi monoklonal Cu,Zn-SOD dengan tingkat pengenceran 1:200 sebanyak 50-60 µl (tergantung besarnya preparat) dan sediaan disimpan dalam lemari es selama dua malam. Keluar dari lemari es, sediaan dicuci tiga kali dengan larutan PBS. Selanjutnya dilakukan pemberian antibodi yang kedua, yaitu *Dako Envision Peroxidase System* dalam jumlah yang sama dan kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan PBS, sediaan dimasukkan ke dalam larutan DAB dalam tris buffer (sambil diperiksa di bawah mikroskop). Untuk perbandingan dengan reaksi negatif, dilakukan *counter-stain* dengan *haematoxylin*. Langkah akhir pewarnaan ini seperti halnya pada pewarnaan HE, yaitu dehidrasi, *clearing* dan *mounting*.

Pengamatan perubahan morfologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan alat foto (Olympus Vanox). Parameter yang diamati meliputi perubahan morfologi dan perubahan kandungan Cu,Zn-SOD pada kondisi hiperglikemia kronis dan kemudian membandingkannya dengan kontrol.

Perhitungan terhadap sebaran enzim antioksidan Cu,Zn-SOD ditentukan berdasarkan pada reaksi enzim antioksidan tersebut dengan antibodi Cu,Zn-SOD pada pembesaran 460X. Tiap bagian sampel masing-masing diwakili oleh sediaan serial dan perhitungan dilakukan pada tiga lapang pandang yang diambil secara acak. Pada pengamatan dilakukan pembagian kelompok berdasarkan intensitas reaksi yang terjadi, yaitu : positif kuat (+++), positif sedang (++) , positif lemah (+/-) dan negatif (-). Adapun untuk membedakan hasil reaksi positif dan negatif dibuat pembandingan berupa sediaan yang tidak diberi antibodi primer sebagai kontrol negatif. Hasil perhitungan yang diperoleh selanjutnya diolah dengan uji statistika (Uji Anova dan Uji Duncan).

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Pengamatan

Pewarnaan imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD telah berhasil memperlihatkan gambaran perubahan kandungan enzim Cu,Zn-SOD yang terkandung dalam hati monyet ekor panjang diabetik eksperimental dibandingkan dengan monyet kelompok kontrol. Hasil reaksi memberikan gambaran kualitatif dari intensitas produk warna yang terbentuk pada sitoplasma, serta secara kuantitatif dengan menghitung inti sel yang bereaksi pada setiap tingkat intensitas kandungan Cu,Zn-SOD.

Hepatosit yang positif mengandung Cu,Zn-SOD ditunjukkan dengan warna coklat, baik pada inti maupun sitoplasma, sedangkan yang bereaksi negatif berwarna biru pada intinya dan warna coklat yang pucat pada sitoplasma. Hasil reaksi positif dibedakan menjadi tiga tingkatan berdasarkan intensitasnya, yaitu warna coklat tua untuk inti sel yang bereaksi positif kuat (+++), coklat muda untuk positif sedang (++), dan inti sel yang bereaksi positif lemah (+/-) berwarna campuran coklat dan biru, sedangkan inti sel negatif (-) berwarna biru.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan kandungan Cu,Zn-SOD pada kelompok monyet diabetes. Hal ini terlihat dari hasil pengamatan baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Pengamatan secara kualitatif pada sitoplasma memberikan gambaran bahwa kandungan Cu,Zn-SOD pada monyet kelompok diabetes lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada sitoplasma kelompok NIDDM kandungan Cu,Zn-SOD lebih rendah dibandingkan

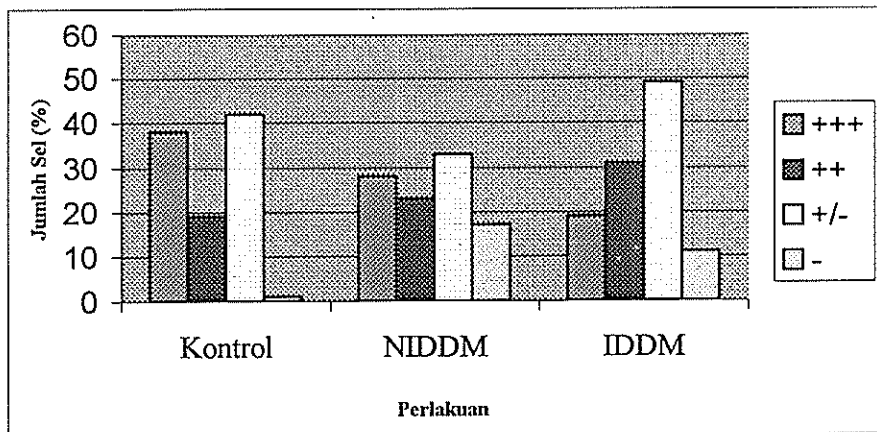
dengan kontrol karena warna coklat yang terbentuk tidak memenuhi seluruh ruang sitoplasma (sitoplasma bervakuol), meskipun intensitas warnanya relatif sama dengan kontrol. Warna positif coklat dengan intensitas kuat terlihat pada sitoplasma kelompok kontrol, sedangkan kelompok IDDM menunjukkan intensitas warna lebih lemah dibandingkan kontrol. Kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada hati monyet kelompok Kontrol (normal), IDDM dan NIDDM disajikan dalam Tabel 1 dalam bentuk persentase jumlah sel hati pada setiap tingkat intensitas reaksi dalam satu lapang pandang.

Tabel 1. Kandungan Cu,Zn-SOD pada sel hati monyet kelompok kontrol dan kelompok diabetes mellitus eksperimental

Perlakuan	Persentase jumlah sel yang bereaksi			
	+++	++	+/-	-
Kontrol	38.13	18.75	41.88	1.25
NIDDM	27.82	22.56	33.08	16.54
IDDM	18.62	31.38	48.96	11.03

Hasil penghitungan secara kuantitatif terhadap inti sel yang bereaksi pada berbagai tingkatan kandungan Cu,Zn-SOD menunjukkan terjadi penurunan jumlah inti sel yang bereaksi kuat (+++) pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol dijumpai sebanyak 38.13% yang bereaksi positif kuat, sedangkan pada kelompok NIDDM didapatkan hasil 27.82% dan pada kelompok IDDM hanya ditemukan sebanyak 18.62%. Sedangkan pada tingkat intensitas sedang pada kelompok kontrol ditemukan lebih banyak, yaitu 22.56% pada NIDDM dan 31.38% pada IDDM. Jumlah inti yang bereaksi positif lemah pada

kelompok kontrol adalah 41.88% dan yang bereaksi negatif sejumlah 1.25%. Pada kelompok NIDDM hasil yang didapat pada intensitas lemah lebih sedikit (33.08%) dibandingkan dengan IDDM (48.96%). Hal ini kemungkinan karena pada kelompok NIDDM inti sel lebih banyak yang bereaksi negatif (16.54%) dibandingkan dengan IDDM (11.03%). Penurunan kandungan Cu, Zn-SOD tersebut dapat terlihat lebih jelas pada gambar di bawah ini :



Gambar 4. Jumlah sel yang bereaksi pada berbagai tingkat kandungan enzim Cu,Zn-SOD pada setiap kelompok perlakuan

Tabel 2. Pengaruh diabetik eksperimental terhadap kandungan Cu,Zn-SOD pada hati monyet ekor panjang

Perlakuan	+++	++	+/-	-
Kontrol	60.667 <sup>a</sup>	30.333 <sup>a</sup>	69.670 <sup>a</sup>	1.667 <sup>b</sup>
NIDDM	37.333 <sup>ab</sup>	30.333 <sup>a</sup>	43.670 <sup>a</sup>	23.333 <sup>a</sup>
IDDM	27.667 <sup>b</sup>	31.000 <sup>a</sup>	70.670 <sup>a</sup>	16.000 <sup>a</sup>

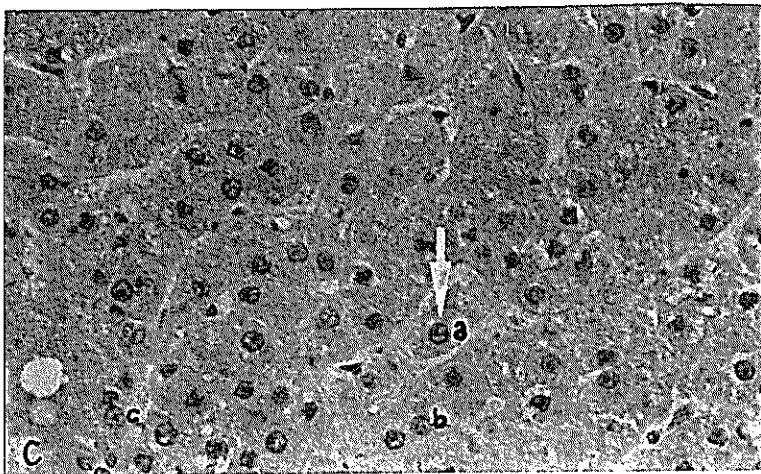
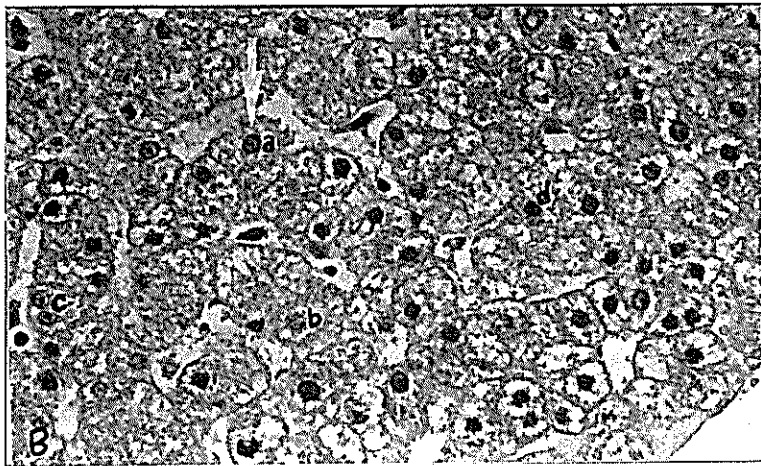
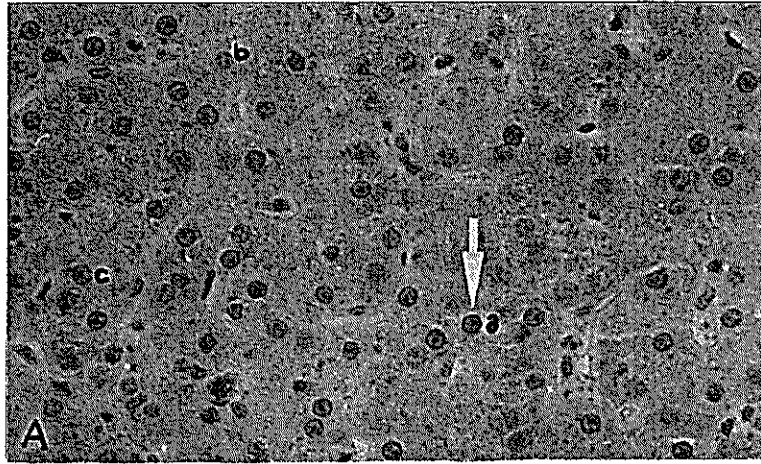
Keterangan : (+++) = positif kuat; (++) = positif sedang ; (+/-) = positif lemah ; (-) = negatif  
 angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada  $\alpha = 0.05$



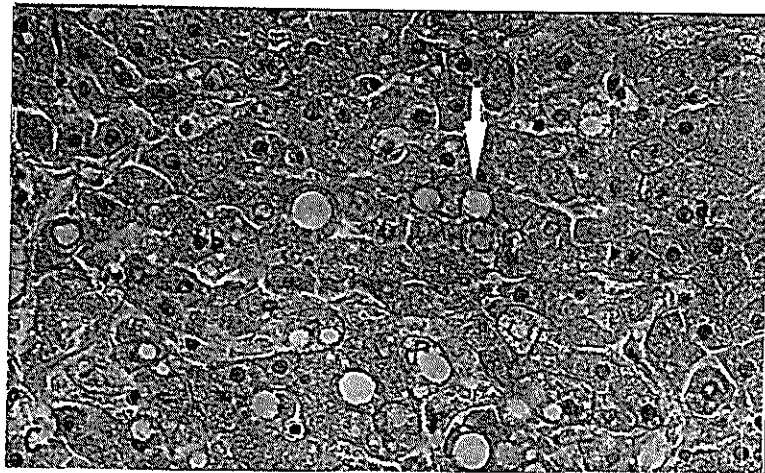
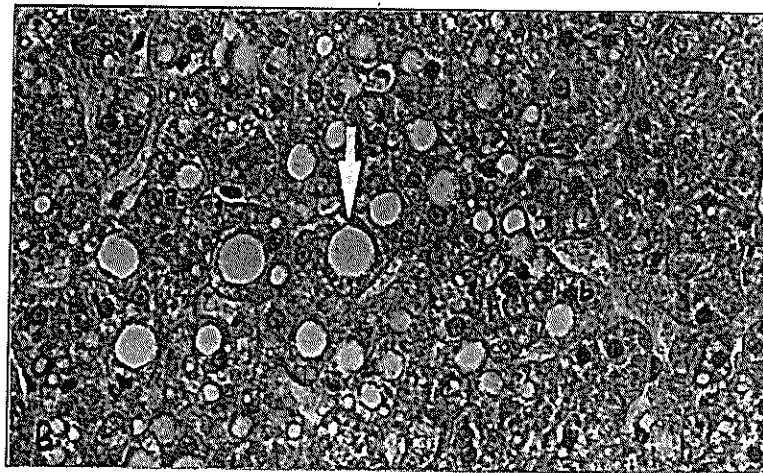
Hasil uji statistik terhadap jumlah inti sel pada berbagai tingkatan kandungan Cu,Zn-SOD menunjukkan adanya penurunan kandungan Cu,Zn-SOD. Hal ini terlihat pada inti sel yang bereaksi positif kuat menurun pada kelompok diabetes, terutama kelompok IDDM ( $p \leq 0.05$ ) dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan kandungan Cu,Zn-SOD tersebut juga terlihat pada inti sel yang bereaksi negatif meningkat secara nyata ( $p \leq 0.05$ ) pada kedua kelompok diabetes (NIDDM dan IDDM) dibandingkan kelompok kontrol.

Gambaran status Cu,Zn-SOD pada hati monyet normal dan penderita diabetes (IDDM dan NIDDM) diperlihatkan pada Gambar 5A, 5B dan 5C. Gambar-gambar tersebut mewakili setiap kelompok perlakuan.

Dengan pewarnaan HE dapat terlihat adanya perubahan gambaran histologi hati. Pengaruh kondisi hiperglikemia terhadap sel-sel hati penderita diabetes menunjukkan kerusakan seperti nekrosa sel yang menyebar (*diffuse*), infiltrasi sel fagosit mononuklear, perlemakan, infiltrasi glikogen dalam inti dan sitoplasma hepatosit, dan degenerasi berbutir (*cloudy swelling*). Perubahan histopatologi pada hati hewan model ini telah diteliti oleh Guswandi (2001). Adapun gambaran histopatologinya dapat dilihat pada Gambar 6A, 6B dan 6C.



Gambar 5. Gambaran kandungan Cu,Zn-SOD pada monyet kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pewarnaan imunohistokimia; Pembesaran: 460x  
 A: kontrol, B: NIDDM, C: IDDM, a = (+++); b = (++) ; c = (+/-); d = (-)



Gambar 6. Gambaran histopatologi hati monyet kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pewarnaan HE ; Pembesaran: 460x  
 A: kontrol, B: NIDDM, C: IDDM,  
 → = perlemakan, a = sel normal, b = sel nekrosis

## 4.2 Pembahasan

Pada kondisi diabetes mellitus terjadi abnormalitas metabolisme karbohidrat akibat berkurangnya produksi insulin atau berkurangnya kemampuan dalam memanfaatkan insulin sehingga terjadi hiperglikemia. Walaupun kadar gula dalam darah tinggi, namun sel-sel tubuh tidak dapat menyerap gula dengan sempurna. Hal tersebut merangsang terjadinya glukoneogenesis, yaitu pembentukan glukosa dari bahan lain seperti asam lemak dan asam amino.

Hati merupakan organ yang bertanggung jawab dalam proses metabolisme lemak, terutama mitokondria dan peroksisom. Pada kondisi diabetes mellitus pemecahan asam lemak berlangsung di peroksisom melalui jalur  $\beta$ -oksidasi dan sitokrom P-450 oksidasi (Hawkins, 1987 ; Nilsson, 1987 ; Thomas, 1989 ; *dalam* Orellana, 1992). Jika kondisi tersebut terjadi berkepanjangan maka akan hadir radikal bebas dalam jumlah yang berlebihan sebagai hasil sampingannya. Jumlah radikal bebas yang melebihi kemampuan detoksifikasi sistem pertahanan antioksidan tubuh, akan menyebabkan stres oksidatif (Tejasari, 2000). Cu,Zn-SOD sebagai salah satu SOD yang memegang peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh (Mates *et al.*, 1999) akan bereaksi dengan anion superoksida untuk menstabilkan radikal bebas tersebut menjadi molekul yang tidak berbahaya. Namun pada kondisi stres oksidatif kandungan antioksidan tubuh tidak seimbang dengan produksi radikal bebas yang terbentuk sehingga enzim tersebut tidak mampu menetralkan radikal bebas tersebut. Hal inilah yang menyebabkan penurunan kandungan Cu,Zn-SOD yang terjadi pada kelompok diabetes.

Dari hasil penghitungan persentase dan uji statististik terhadap inti sel yang bereaksi positif kuat menunjukkan penurunan kandungan Cu,Zn-SOD terjadi lebih parah pada kelompok IDDM dibandingkan kelompok NIDDM. Penurunan persentase jumlah inti sel hati tersebut menurun sangat tajam (Gambar 3). Sedangkan penurunan jumlah inti sel hati tersebut pada kelompok IDDM secara statistik berbeda nyata terhadap kelompok kontrol, dibandingkan pada kelompok NIDDM yang memberikan hasil tidak berbeda nyata terhadap kelompok kontrol. Meskipun penurunan tersebut tidak berbeda nyata antara kedua kelompok tersebut secara statistik.

Penurunan kandungan enzim tersebut pada kelompok IDDM lebih parah karena kekurangan insulin bersifat absolut, sedangkan pada NIDDM insulin masih dihasilkan walaupun tidak optimum. Pemberian insulin secara eksternal pada kelompok IDDM menyebabkan terjadinya fluktuasi kadar insulin dalam darah yang mengakibatkan fluktuasi metabolisme. Sehingga kegagalan sel-sel tubuh dalam melakukan metabolisme glukosa pada kelompok IDDM lebih parah dan radikal bebas yang dihasilkan oleh proses oksidasi asam lemak yang terjadi lebih banyak. Di samping itu kandungan gula darah pada kelompok IDDM lebih tinggi (> 350 mg%) dibanding kelompok NIDDM (120-350 mg%) dan kelompok kontrol (<120 mg%). Tingginya kadar gula dalam darah menyebabkan peningkatan dan percepatan kerusakan oksidatif. Peningkatan kadar radikal bebas ini erat kaitannya dengan terjadinya komplikasi pembuluh darah karena glukosa mengalami transformasi menjadi *advance glycation endproducts* (AGEs) yang bisa menjadi perekat molekul. Hal ini menyebabkan pembuluh darah menjadi kaku sehingga terjadi tekanan darah

tinggi dan kebocoran pembuluh darah. AGEs juga mendorong berbagai molekul menempel di dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan penyempitan pembuluh darah (Soeatmadji, 2001). Keadaan tersebut menyebabkan pada kelompok IDDM terjadi penurunan kandungan Cu,Zn-SOD yang lebih nyata dibandingkan dengan kelompok NIDDM.

Nekrosa sel terjadi karena paparan radikal bebas yang menyerang biomakromolekul di sekitarnya seperti asam lemak tak jenuh, protein, asam nukleat, asam deoksiribonukleat, dan polisakarida untuk melengkapi kekurangan elektronnya. Akibatnya molekul-molekul yang terserang tersebut akan menjadi radikal bebas baru karena molekul tersebut kehilangan elektronnya juga. Reaksi berantai yang terjadi akan menimbulkan kerusakan sel jika makromolekul yang teroksidasi tersebut merupakan komponen pembentuk sel (Halliwell dan Guteridge, 1990 *dalam* Tejasari, 2000). Sel-sel yang rusak akan difagosit oleh sel-sel radang, hal inilah yang menyebabkan hadirnya sel-sel radang di sinusoid hati.

Perlemakan yang terjadi pada penderita diabetes mellitus terjadi karena terdapat defisiensi karbohidrat yang dimetabolisasi, sehingga tenaga didapat dari pembakaran lemak yang berlebihan. Mobilisasi lemak yang berlebihan ini mengakibatkan defisiensi faktor lipotropik sehingga lemak tidak dapat diangkut dari sel, akibatnya terjadi penimbunan lemak yang berlebihan (Saleh, 1996).

Infiltrasi glikogen pada penderita diabetes mellitus dapat dilihat dari penampakan inti hepatosit yang sangat jernih dan menggelembung seperti balon pada pewarnaan *periodic acid schiff* (PAS) (Guswandi, 2001). Pada keadaan normal

glikogen hanya terdapat pada sitoplasma (Darmawan, 1989). Sedangkan degenerasi berbutir kemungkinan disebabkan oleh pengendapan protein, sehingga dinamai juga *albuminous degeneration*, dimana sel hati terlihat bengkak dengan sitoplasma berbutir keruh dan tampak lebih gelap serta bervakuol. Pada kelompok NIDDM keadaan ini lebih hebat dibanding dengan kelompok IDDM.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Pewarnaan imunohistokimia metode *Polymer Peroxidase* telah berhasil memperlihatkan keberadaan enzim antioksidan Cu,Zn-SOD pada hati monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*). Kandungan enzim tersebut pada sel hati monyet diabetes mellitus (kelompok tergantung insulin dan kelompok tidak tergantung insulin) menurun dibandingkan dengan monyet kelompok kontrol (normal). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas pertahanan antioksidan seluler, Cu,Zn-SOD, menurun pada kondisi diabetes mellitus. Keadaan ini lebih jelas terlihat pada kelompok IDDM dibandingkan dengan NIDDM. Temuan ini diperkuat dengan adanya perubahan patologis berupa perlemakan, infiltrasi glikogen, degenerasi berbutir, infiltrasi sel fagosit, dan nekrosa sel.

### 5.2 Saran

Untuk melengkapi pengetahuan mengenai aktivitas enzim pertahanan antioksidan tubuh dalam kondisi diabetes mellitus, disarankan untuk melakukan studi imunohistokimia terhadap enzim antioksidan lain seperti CAT dan GPx pada hewan model yang sama. Penelitian terhadap monyet diabetes mellitus spontan perlu dilakukan untuk menghindari kemungkinan adanya pengaruh Alloxan terhadap sistem pertahanan tubuh terutama produksi enzim antioksidan Cu,Zn-SOD.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anindyarni, A. S. 1990. Satwa Primata Sebagai Hewan Model Untuk Pengembangan Vaksin Hepatitis A. Skripsi. FKH IPB. Bogor.
- Asikin, N. 2001. Antioksidan Endogen dan Penilaian Status Oksidan. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 1-6.
- Bennet, P. H. 1994. Definition, Diagnosis dan Clasification of Diabetes Mellitus and Impaired Glukose Tolerance. *In* : Kahn, C. R. and G. J. Wei, (Eds): Joslins' Diabetes Mellitus. Lea and Febiger, Philadelphia, Hongkong, London, Munich, Sydney, Tokyo. 193-200.
- Darmawan, S. 1996. Hati dan Saluran Empedu dalam Kumpulan Kuliah Patologi, Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 226-230.
- Freisleben, J. F. and Hans. 2001. Free Radicals and ROS (Reactive Oxygen Species) in Biological Systems. Kursus Penyegar dan Pelatihan 2001 Radikal Bebas dan Antioksidan: Dasar, Aplikasi dan pemanfaatan Bahan Alam. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI. Jakarta.
- Fridovich, I. 1986. Superoxide Dismutase. *Advances Enzimology*. 61-97.
- Ganda, O. P., A. A. Rossini and A. A. Like. 1976. Studies and Sterptozotocin Diabetes. 25: 595-308.
- Gitawati, R. 1995. Radikal Bebas – Sifat dan Peranan Dalam Menimbulkan Kerusakan atau Kematian Sel. *Cermin Dunia Kedokteran* no. 102.
- Guswandi. 2001. Gambaran Histopatologi Organ Hati pada Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Diabetik Eksperimental. Skripsi. FKH-IPB, Bogor.
- Haider, B., K. Y. Chen., Thomas., H. A. Oldewurtel., M. M. Lyons and T. J. Regan. 1981. Influence of Myocardium And Coronary Arteries of Rhesus Monkey Fedan Atherogenic Diet. *Circulation Research*. 49: 1279-1288.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1985. Free Radicalls in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford. England.
- Krall, L D., R. Levine. and D. Barnet. 1994. The History of Diabetes *In* : Kahn, C. R. and G. J. Weir (Eds.): Joslins Diabetes Mellitus. Lea and Febiger. Philadelphia, Baltimore, Hongkong, London, Munich, Sydney, Tokyo. 1-14.

- Kuhlman, W. D. 1984. *Immuno Enzyme Techniques in Cytochemistry*. Verlag Chemie. Weinheim; Deerfield Beach, Florida, Basel. 2-69.
- Makita, T. 1993. Electron Microscopic Cytochemistry and Immunocytochemistry of Superoxide Dismutase. *In* : Ogawa, K. and Barka, T. (Eds.): *Electron Microscopic Cytochemistry and Immunocytochemistry in Biomedicine*. CRC Press, Tokyo. 102-111.
- Mates, J. M., F. S. Jimenes. 1999. Antioksidant Enzymes and Their Implication in Pathophysiologic Processes. <http://www.Biosciences.Crg/1999/ra/d/Mates/Ful ltext. html>.
- Matsuhita, N., Z. Q. Shi., C. Wan., M. Lekas., D. D. Rodgers., A. Giacca., R. Kawamari and M. Vranic. 1997. The Effect of Pioglitazone on Hepatic Glucose Up take Measured with Indired ang Dired Methods in Alloxan Induced Diabetic Dogs. *Diabetes*.
- Moerdowo, R. M. 1989. *Spektrum Diabetes Mellitus*. Djambatan. Jakarta.
- Murray, R. K., D. K. Ganner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. 1995. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Mustikasari, E. 1994. Pengaruh Minyak Kelapa Sawit dan Kulit Kacang Kedelai dalam Pkaan Atherogenic Terhadap Artherosklerosis Aorta Kera Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*). Skripsi. FKH IPB. Bogor.
- Nugroho, R. H. 1994. Pengaruh Pemberian Minyak Kelapa Sawit dalam Ransum Terhadap Gambaran Darah Kera Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*). Skripsi. FKH IPB. Bogor.
- O'Brien, T D., J. D. Wagner, K. N. Litwak, C. S. Carlson, W. T. Cefalu, K. Jordan, K. H. Johnson, and P. C. Butler. 1996. "Islet Amyloid and Islet Amyloid Peptide in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*): An Animal Model of Human Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus ". *Vet. Pathol.* 33: 479-485.
- Orellana, M., O. Fuentes, H. Rosenbuth, M. Lara, E. Valdes. 1992. Modulation of Rat Liver Peroxisomal and Microsomal Fatty Acid Oxidation by Starvation. *Federation of European Biochem. Societies.* 30 (2) : 193-196.
- Ressang, A. A. 1984. *Patologi Khusus Veteriner*. N. V. Percetakan Bali. Denpasar. Indonesia. 45-57.
- Saleh, S. 1996. *Patologi Umum dalam Kumpulan Kuliah Patologi, Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UI*. Jakarta. 38-41.

- Sitompul, B. 1999. Model Hewan Eksperimental pada Diabetes Mellitus. Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia. Jakarta (tidak dipublikasikan).
- Slot, J. W. , H. J. Ceuze, B. A. Freeman, J. D. Crapo. 1986. Intracellular Localization of Cu,Zn-SOD in Rat Liver Parenchymal Cell. *Lab. Invest.* 55 : 363-371.
- Soeatmadji, D. W. 2001. Radikal Bebas Tubuh Perberat Komplikasi Diabetes. *Kompas (Selasa, 20/3/2001)*.
- Sukaton. 1987. Diabetes Mellitus *dalam* Ilmu Penyakit dalam I. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Supriatna, J. dan E. H. Wahyono. 2000. Primata Indonesia. *Panduan Lapangan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta. 69-76.
- Tejasari, 2000. Efek Proteksi Komponen Bioaktif Oleoresin Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) terhadap Fungsi Limfosit Secara *In Vitro*. Tesis. Program Pascasarjana IPB, Bogor. 9-35.
- Touati, T. 1992. Regulation and Protective Role of The Microbial Superoxide Dismutase. *In* : Molecular Biologi of Radical Scavenging System, ed. Scandalios JG. 231-261.
- Webb, J. L. 1966. Enzyme and Metabolic Inhibitor. Vol. III. Academic. Press. Newyork. London.
- Wanders, R. J. A., S. Denis. 1991. Identification of Superoxide Dismutases in Rat Liver Peroxisome. *Biochem. et Biophysical Acta.* 1115: 259-262
- Wells, B. B. 1990. Clinical Pathology Application and Interpretation. 3<sup>rd</sup> edition. W. B. Saunders Company, Inc. California.
- Widjajanto dan Wiyana, D. 2001. Radikal Bebas Dalam Tubuh Anda. <http://www.idola.net.id/>
- Wresdiyati, T. and T. Makita. 1995. Remarkable Increase of Peroxisomes in The Renal Tubules Cell of Japanese Monkey Under Fasting Stress. *Phatophysiology.* 2: 177-182
- Yasuda, M., M. Takaoka, T. Fujiwara. and M. Morri. 1988. "Occurrence of Spontaneous Diabetes Mellitus in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). and Impaired Glucose Tolerance in Its Decendent". *J. Med. Primatol.* 17:319-332.

# LAMPIRAN

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Prosedur Pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE)

1. Deparafinisasi @ 3-5 menit
2. Rehidrasi @ 3-5 menit
3. Air mengalir 15-30 menit
4. Aquades 5-10 menit
5. Haematoxylin 5-10 menit
6. Air mengalir 15-30 menit
7. Aquades 5 menit
8. Eosin alkohol 15-30 menit
9. Cuci dengan aquades
10. Dehidrasi, *clearing*, *mounting*.

## Lampiran 2. Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia

1. Deparafinisasi, rehidrasi, air mengalir sesuai dengan prosedur
2. Aquades 5-10 menit
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam Metanol (1:100) 15 menit
4. Air mengalir 10-15 menit
5. Aquades (2X) @ 5-10 menit
6. PBS (2X) @ 5-10 menit
7. Normal serum @ 50-60 µl 37 ° C 60 menit (inkubator)
8. PBS (3X) @ 5 menit
9. Anti SOD (1:200) 2 malam (lemari es)
10. PBS (3X) @ 10 menit
11. DAKO *Envision Peroksidase System*  
@ 50-60 µl 37 ° C 60 menit (inkubator)
12. PBS (3X) @ 5 menit
13. DAB 10-20 menit (gelap)  
5 menit sebelum larutan DAB dipakai ditambahkan 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
14. Cuci dengan aquades
15. *Counterstain (Mayer Haematoxylin) \**
16. Aquades
17. Dehidrasi, *clearing, mounting*.

\* Sambil dicek di bawah mikroskop.

Lampiran 3. Sidik ragam pengaruh diabetes mellitus terhadap kandungan Cu,Zn-SOD

Variabel Terikat : +++ (Positif kuat)

Sumber	DB	JK	KT	F hit	P
Perlakuan	2	1726.8888889	863.4444444	6.23	0.0344
Galat	6	832.0000000	138.6666667		
Total	8	2558.8888889			
	R <sup>2</sup>	KK	Akar KT	Rata rata	
	0.674859	28.11171	11.77568116	41.88888889	

Variabel Terikat : ++ (Positif sedang)

Sumber	DB	JK	KT	F hit	P
Perlakuan	2	0.8888889	0.4444444	0.01	0.9947
Galat	6	499.3333333	83.2222222		
Total	8	500.2222222			
	R <sup>2</sup>	KK	Akar KT	Rata rata	
	0.001777	29.85585	9.12262146	30.55555556	

Variabel Terikat : +/- (Positif lemah)

Sumber	DB	JK	KT	F hit	P
Perlakuan	2	1406.0000000	703.0000000	2.28	0.1834
Galat	6	1850.0000000	308.3333333		
Total	8	3256.0000000			
	R <sup>2</sup>	KK	Akar KT	Rata rata	
	0.431818	28.62949	17.55942292	61.33333333	

Variabel Terikat : - (Negatif)

Sumber	DB	JK	KT	F hit	P
Perlakuan	2	728.6666667	364.3333333	13.22	0.0063
Galat	6	165.3333333	27.5555556		
Total	8	894.0000000			
	R <sup>2</sup>	KK	Akar KT	Rata rata	
	0.815063	38.40979	5.24939858	13.66666667	

DB: Derajat bebas  
 JK: Jumlah kuadrat  
 KT: Kuadrat tengah  
 KK: Koefisien keragaman  
 P : Probabilitas

