

## Ekspresi Protein FoxO1 dan Gen Glukosa 6 Fosfatase pada Tikus dengan Diet Restriksi Vitamin B12

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

<sup>1</sup>Departemen Fisiologi Medik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Fisiologi Medik, Fakultas Kedokteran, Universitas Prof.Dr.Hamka

<sup>3</sup>Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia

Alamat Korespondensi: marcel.antoni@ukrida.ac.id

### Abstrak

Pada penelitian awal didapatkan diet restriksi vitamin B12 menyebabkan hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin, yang ditandai oleh hiperglikemia dan meningkatnya nilai *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR). Dengan menggunakan sampel jaringan biologik tersimpan, hati tikus *Sprague-Dawley* dari penelitian tersebut, penelitian lanjutan ini bertujuan mengetahui penyebab hiperglikemia, dalam hubungannya dengan proses glukoneogenesis, dengan melihat ekspresi *forkhead box protein-O1* (FoxO1) dan gen glukosa 6 fosfatase (G6Pc). Adapun sampel terdiri dari 4 kelompok: kelompok kontrol dan tiga kelompok dengan diet restriksi vitamin B12 masing-masing selama 4, 8, dan 12 minggu. Ekspresi FoxO1 diperiksa dengan metode kuantitatif *Western-Blot*, sedangkan gen G6Pc diperiksa dengan metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (rt-PCR). Hasil yang diperoleh, tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi FoxO1 ( $P > 0,05$ ) dan gen G6Pc ( $P > 0,05$ ) antara kelompok tikus kontrol dan kelompok diet restriksi vitamin B12. Hal ini menunjukkan, hiperglikemia pada diet restriksi vitamin B12 tidak terkait dengan glukoneogenesis. Pada kondisi resistensi insulin, insulin masih dapat meneruskan efek metaboliknya melalui jalur lain, seperti melalui reseptor yang memiliki kemiripan struktur dan fungsi dengan reseptor insulin. Penyebab-penyebab lain terjadinya hiperglikemia seperti gangguan utilisasi glukosa oleh sel dan gangguan proses glikogenesis perlu diteliti lebih lanjut.

**Kata Kunci:** FoxO1, G6Pc, hiperhomosisteinemia, resistensi insulin, vitamin B12.

### *Expression of FoxO1 Protein and The Glucose-6-Phosphatase Gene Expression in Rats with Vitamin B12 Restricted Diet*

#### Abstract

*In the initial study, vitamin B12 restriction causes hyperhomocysteinemia and insulin resistance, characterized by hyperglycemia and increased of the Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR). By using stored liver tissue of Sprague-Dawley, the present study aimed to determine the cause of hyperglycemia, in relation to gluconeogenesis process, by observing the expression of forkhead box protein-O1 (FoxO1) and glucose 6 phosphatase (G6Pc) gene. There are 4 groups: a control group and three groups with a vitamin B12 restriction diet for 4, 8, and 12 weeks. Expression of FoxO1 was examined by quantitative Western-Blot, while G6Pc gene was examined by real-time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR) method. The results showed, there were no significant difference in the expression of FoxO1 ( $P > 0,05$ ) and G6Pc genes ( $P > 0,05$ ) between the control and the restriction' group. These results indicate that hyperglycemia in vitamin B12 restriction diet is not related to the process of gluconeogenesis. Insulin may still continue its metabolic effects through other pathways, such as through receptors that have similar structure and function to insulin receptors. Other condition, such as impaired glucose utilization and glycogenesis need to be investigated further.*

**Keywords:** FoxO1, G6Pc, hyperhomocysteinemia, insulin resistance, vitamin B12.

#### How to Cite :

Sianipar I. R., Andraini T., Santoso D. I. S., Ujjianti, I., Antoni M. Ekspresi Protein FoxO1 dan Gen Glukosa 6 Fosfatase pada Tikus dengan Diet Restriksi Vitamin B12. *J Kdokt Meditek*, 2022; 28(2), 133–140. Available from: <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/2351/version/2342> DOI: <https://doi.org/10.36452/jkdoktmeditek.v28i2.2351>

## Pendahuluan

Jumlah kasus defisiensi vitamin B12 di dunia diperkirakan lebih besar dari yang diketahui karena umumnya seseorang tidak menyadari bahwa dirinya mengalami defisiensi vitamin B12 sampai muncul gejala terkait defisiensi vitamin B12. Kekurangan vitamin B12 terjadi di seluruh dunia, dengan prevalensi tertinggi di Asia dan Afrika, terutama pada populasi ibu hamil dan anak-anak.<sup>1</sup> Defisiensi vitamin B12 juga diketahui berkaitan dengan peningkatan risiko gangguan kardiovaskular,<sup>2</sup> metabolisme,<sup>3,4</sup> gangguan darah dan saraf.<sup>5</sup> Defisiensi vitamin B12 dapat terjadi akibat kurangnya konsumsi vitamin B12, gangguan pada proses penyerapan vitamin B12, atau gangguan metabolisme dalam tubuh.<sup>1,6</sup>

Terhadap gangguan metabolisme, kekurangan vitamin B12 menyebabkan hiperhomosisteinemia, berkaitan dengan proses remetilasi homosistein menjadi metionin.<sup>3</sup> Vitamin B12 merupakan kofaktor enzim metionin sintase pada reaksi tersebut, sehingga defisiensi vitamin B12 dapat menyebabkan akumulasi homosistein.<sup>7,8</sup> Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, homosistein memicu stres oksidatif, menginduksi proses inflamasi dan menyebabkan resistensi insulin.<sup>9-11</sup>

Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas dan berperan penting dalam proses metabolisme glukosa, lemak, dan protein. Dalam proses metabolisme glukosa, insulin mencegah kondisi hiperglikemia setelah makan.<sup>12</sup> Dalam kondisi normal, setelah makan, insulin disekresikan dan berikatan dengan reseptornya pada sel target. Insulin meningkatkan ambilan dan pemanfaatan glukosa dalam jaringan, meningkatkan glikogenesis, dan menghambat proses glukoneogenesis. Sebaliknya, pada kondisi puasa, hormon kontra insulin (glukagon, epinefrin) berperan dalam meningkatkan kadar glukosa darah.<sup>13,14</sup> Ada dua jalur pensinyalan insulin utama melalui reseptornya, yaitu fosfoinositid-3-kinase (PI3K)-Akt dan Grb2/SOS/Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK).<sup>15</sup> Metabolisme glukosa, lemak, dan protein dipengaruhi insulin melalui jalur PI3K-Akt. Di bawah jalur PI3K-Akt, terdapat banyak protein hilir yang diatur aktivitasnya oleh insulin, baik yang diaktifkan maupun yang dihambat, untuk memenuhi fungsi insulin dalam mempertahankan kadar glukosa normal.<sup>14,16</sup> Salah satu protein hilir dalam pensinyalan insulin adalah *forkhead-box-protein-O1* (FoxO1).<sup>15,17</sup>

FoxO1 merupakan protein yang berperan dalam transkripsi enzim yang mendorong proses

glukoneogenesis. Dalam kondisi normal, setelah makan, insulin, melalui jalur PI3K-Akt, menghambat aktivitas transkripsi FoxO1 dengan memfosforilasi FoxO1 di situs Thr-24, Ser-256, dan Ser-319, menyebabkan FoxO1 keluar dari nukleus, dan dengan demikian menghambat proses transkripsi.<sup>18,19</sup> Dalam kondisi puasa, di mana kadar glukosa darah rendah dan insulin tidak disekresikan, FoxO1 tetap berada di nukleus, sehingga aktivitas transkripsi FoxO1 akan berlanjut. Gen yang menjadi target transkripsi FoxO1 dalam proses glukoneogenesis adalah gen enzim fosfoenolpiruvat karboksikinase (PEPCK) dan glukosa 6 fosfatase (G6Pc). PEPCK merupakan enzim yang berperan dalam dekarboksilasi oksaloasetat menjadi fosfoenolpiruvat,<sup>20</sup> sedangkan G6Pc berperan melalui transportasi dan hidrolisis glukosa 6 fosfat menjadi glukosa bebas dan fosfat anorganik. Defisiensi enzim G6Pc menghambat pelepasan glukosa bebas ke dalam darah dan menyebabkan hipoglikemia.<sup>21</sup>

Pada penelitian Sianipar dkk. (2019), ditemukan bahwa restriksi vitamin B12 menyebabkan hiperhomosisteinemia dan resistensi insulin yang ditandai dengan hiperglikemia dan peningkatan indeks *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR). Dengan menggunakan jaringan tersimpan hati tikus dari penelitian Sianipar dkk. (2019) penelitian ini bertujuan mengetahui penyebab hiperglikemia pada tikus dengan restriksi vitamin B12, apakah berkaitan dengan proses glukoneogenesis dengan mengamati ekspresi protein yang terlibat dalam proses glukoneogenesis, yaitu FoxO1 dan gen enzim glukoneogenesis G6Pc yang dipengaruhi oleh FoxO1.

## Metodologi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan biologis tersimpan hati tikus *Sprague-Dawley* jantan berusia 36-40 minggu, yang berasal dari penelitian Sianipar dkk. (2019). Berat badan tikus berkisar antara 300-350 gram (dibeli dari Badan Penelitian dan Kesehatan RI, Jakarta, Indonesia). Berdasarkan rumus Federer, total sampel yang digunakan adalah 24 ekor tikus. Tikus ditempatkan di kandang masing-masing dengan ventilasi yang baik. Suhu ruangan dijaga pada 18-26°C. Kelembaban dijaga pada 30-70%. Tikus dipelihara dalam siklus terang dan gelap selama 12 jam. Kandang tikus dibersihkan setiap hari. Setelah aklimatisasi selama 1 minggu, tikus

dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok pertama diberi pakan AIN-93M (*Research Diets Inc., New Jersey, USA*) *ad libitum* sebagai kelompok kontrol (Grup 1, n = 6, K). Kelompok kedua diberi pakan AIN-93M *ad libitum* yang sudah dimodifikasi (tidak mengandung vitamin B12 dan mengandung pektin 5% per kg pakan) selama 4 minggu (Grup 2, n = 6, R-4). Kelompok ketiga diberi makan dengan diet AIN-93M *ad libitum* yang dimodifikasi (tidak mengandung vitamin B12 dan mengandung pektin 5% per kg pakan) selama 8 minggu (Kelompok 3, n = 6, R-8). Dan terakhir, kelompok keempat, diberi pakan modifikasi *ad libitum* AIN-93M (tidak mengandung vitamin B12 dan mengandung pektin 5% per kg pakan) selama 12 minggu (Kelompok 4, n = 6, R-12). Tujuan penambahan pektin adalah agar pektin berikatan dengan faktor intrinsik di usus, sehingga mengganggu pengikatan faktor intrinsik dengan vitamin B12 yang masuk dengan tidak disengaja.<sup>22</sup> Asupan makanan diamati setiap hari, dan berat badan diukur setiap minggu. Setelah 4, 8, dan 12 minggu pemberian pakan, dilakukan pengambilan jaringan hati tikus. Semua prosedur uji hewan didasarkan pada Deklarasi Helsinki. Persetujuan etik diperoleh dari Komite Etik Kedokteran Universitas Indonesia (No.184/UN2.F1/ETIK/2017).

### Pemeriksaan Ekspresi Protein FoxO1

Dari sampel jaringan hati masing-masing kelompok, dilakukan isolasi protein dengan *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) *buffer* 10x dan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Kurva standar untuk mengukur konsentrasi protein dibuat menggunakan *bovine serum albumin* (BSA). Selanjutnya dilakukan elektroforesis dan proses transfer ke membran *polyvinylidene flouride* (PVDF). Pelabelan antibodi dilakukan dengan menggunakan anti-GAPDH tikus (#97166, MW: 37 kDa; *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA) dengan konsentrasi 1:2.000 dan anti-FoxO1 kelinci (Ab-256) (SAB4300410, MW: 78–82 kDa; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Jerman) dengan konsentrasi 1:500. Sinyal normalisasi diperoleh dengan membagi sinyal pita target dengan faktor normalisasi lajur. Faktor normalisasi lajur diperoleh dengan membagi sinyal protein

*housekeeping* untuk tiap lajur dengan sinyal *housekeeping* dari lajur dengan sinyal terkuat.

### Pemeriksaan Ekspresi Gen G6Pc

Dari sampel jaringan hati masing-masing kelompok, dilakukan isolasi dan ekstraksi total RNA menggunakan *Quick-RNA™ Miniprep Plus* (*Zymo Research, California, USA*). Kemudian dilanjutkan ke tahap sintesis cDNA menggunakan *ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix dengan gDNA remover* (Toyobo, Osaka, Jepang). *Real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) dilakukan menggunakan *Applied Biosystem™ StepOne™ Real-Time PCR System* dan *SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit* (Bioline, Tennessee, USA). Gen  $\beta$ -aktin digunakan sebagai kontrol internal. Sebagai primer  $\beta$ -aktin: *forward* 5'-CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG-3', *reverse* 5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'<sup>23</sup> dan sebagai primer G6Pc: *forward* 5'-ACT CCC AGG ACT GGT TTG TC-3', *reverse* 5'-CCA GAT GGG AAA GAG GAC AT-3'.<sup>24</sup> Ekspresi gen kelompok kontrol dan kelompok restriksi diperoleh melalui rumus  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

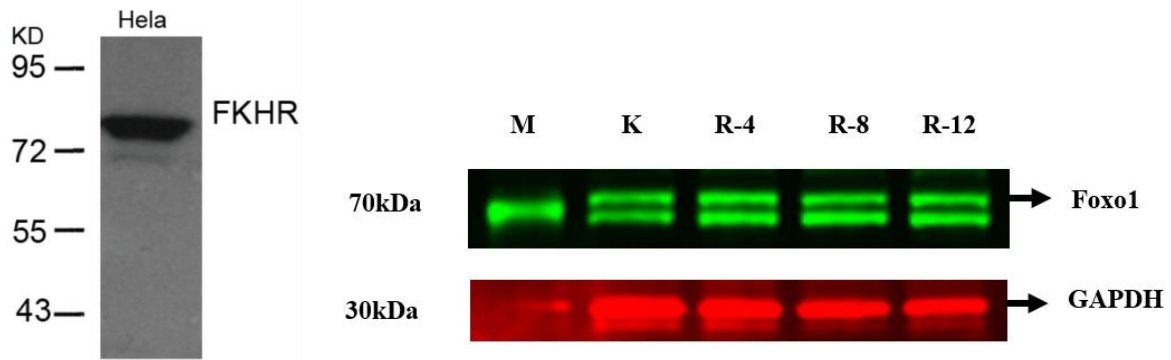
### Analisis statistik

Analisis statistik nilai sinyal normalisasi FoxO1 hasil pemeriksaan metode kuantitatif *western-blot* dan nilai  $2^{-\Delta\Delta CT}$  gen G6Pc dilakukan dengan menggunakan analisis varians satu arah (ANOVA). Semua pemrosesan data dilakukan menggunakan IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

### Hasil

#### Ekspresi Protein FoxO1

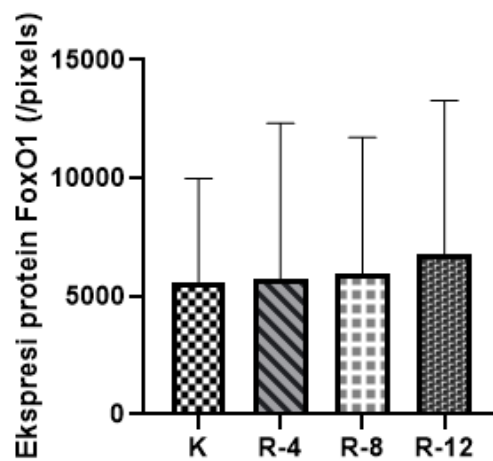
Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1a, FoxO1 dengan berat molekul 78-82 kDa terdeteksi di semua kelompok. Tabel 1 merupakan hasil perhitungan uji statistik ANOVA satu arah terhadap nilai sinyal normalisasi protein FoxO1. Gambar 1b menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ekspresi FoxO1 antara kelompok restriksi vitamin B12 4-, 8-, dan 12 minggu terhadap kelompok kontrol ( $P > 0,05$ ).



**Gambar 1a: Anti-FoxO1 SAB4300410, MW: 78–82 kDa, Sigma-Aldrich & Ekspresi Protein FoxO1 pada Diet Restriksi Vitamin B12.** Keterangan: M= penanda; K = kelompok kontrol; R-4 = kelompok diet restriksi B12 4 minggu; R-8 = kelompok diet restriksi B12 8 minggu; R-12 = kelompok diet restriksi B12 12 minggu.

**Tabel 1. Hasil SPSS uji ANOVA Satu Arah Nilai Sinyal Normalisasi Protein FoxO1 (P >0,05)**

ANOVA					
Sumber Varian	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Rerata Kuadrat	F hitung	Taraf Signifikan
Antar Grup	5714355.762	3	1904785.254	0.055	0.982
Dalam Grup	826971000.753	24	34457125.031		
Total	832685356.515	27			



**Gambar 1b: Ekspresi Protein FoxO1 pada Defisiensi Vitamin B12 (N = 24, P > 0,05).**

Keterangan: K = kelompok kontrol; R-4 = kelompok diet restriksi B12 4 minggu; R-8 = kelompok diet restriksi B12 8 minggu; R-12 = kelompok diet restriksi B12 12 minggu. Tidak terdapat perbedaan bermakna sinyal FoxO1 antara kelompok restriksi vitamin B12, 4-, 8-, dan 12 minggu dengan kelompok kontrol (P > 0,05).

Data diberikan sebagai mean ± SD (n = 5).

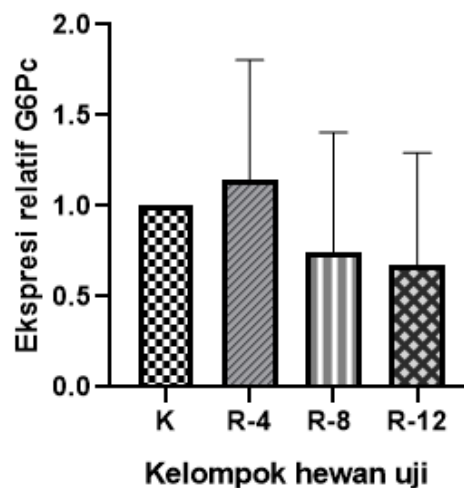
## Ekspresi gen G6Pc

Pada Tabel 2 disajikan hasil perhitungan uji statistik ANOVA satu arah terhadap nilai  $2-\Delta\Delta CT$

(ekspresi) gen G6Pc. Gambar 2 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ekspresi G6Pc antara kelompok restriksi vitamin B12 4-, 8-, dan 12 minggu dengan kelompok kontrol ( $P > 0,05$ ).

**Tabel 2. Hasil SPSS uji ANOVA Satu Arah Nilai  $2-\Delta\Delta CT$  (ekspresi) gen G6Pc ( $P > 0,05$ )**

ANOVA					
Sumber Varian	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Rerata kuadrat	F hitung	Taraf Signifikan
Antar Grup	0.575	3	0.192	0.609	0.622
Dalam Grup	3.781	12	0.315		
Total	4.357	15			



**Gambar 2: Ekspresi Relatif G6Pc pada Kelompok Restriksi Vitamin B12 ( $N = 24$ ,  $P > 0,05$ ).**

Keterangan: K = kelompok kontrol; R-4 = kelompok diet restriksi B12 4 minggu; R-8 = kelompok diet pembatasan B12 8 minggu; dan R-12 = kelompok diet restriksi B12 12 minggu. Tidak terdapat perbedaan ekspresi G6Pc yang bermakna antara kelompok restriksi vitamin B12 4-, 8-, dan 12 minggu dengan kelompok kontrol ( $P > 0,05$ ).

Data diberikan sebagai mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

## Pembahasan

Dalam kondisi normal, insulin menekan ekspresi G6Pc dengan memfosforilasi FoxO1. Namun, dalam kondisi resistensi insulin, efek penghambatan insulin terhadap FoxO1 terganggu, sehingga ekspresi PEPCK dan G6Pc meningkat.<sup>15</sup> Beberapa penelitian mendukung hal ini, antara lain Valenti dkk. (2008) menunjukkan bahwa, pada pasien dengan steatohepatitis, steatosis tanpa hepatitis, pasien dengan histologi hati normal dan tidak ada kelainan metabolisme, juga pasien dengan hepatitis C kronis; ekspresi FoxO1, PEPCK, dan G6Pc berbanding lurus dengan indeks HOMA-IR, dan dengan hasil yang lebih tinggi pada pasien dengan steatohepatitis dibandingkan

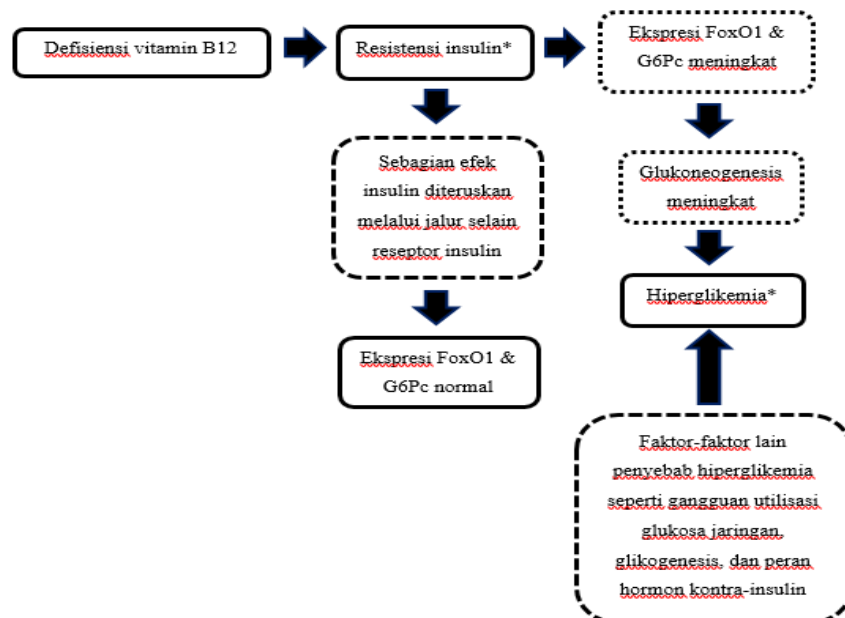
pada pasien dengan hanya steatosis atau pasien dengan hati normal. Kondisi inflamasi pada pasien dengan steatohepatitis menyebabkan resistensi insulin. Resistensi insulin menyebabkan efek penghambatan insulin terhadap FoxO1 menjadi terganggu, sehingga ekspresi gen glukoneogenesis PEPCK dan G6Pc meningkat.<sup>25</sup> Demikian juga penelitian Yu, dkk. (2009) menunjukkan bahwa hiperhomosisteinemia yang disebabkan oleh diet tinggi metionin menyebabkan resistensi insulin dan peningkatan ekspresi PEPCK.<sup>26</sup>

Namun hasil dari penelitian ini, ekspresi FoxO1 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok restriksi terhadap kelompok kontrol. Ini mungkin mengindikasikan masih adanya efek penghambatan insulin terhadap

protein FoxO1. Beberapa sumber menyebutkan, bahwa meskipun terjadi penurunan fungsi reseptor insulin, hal itu tidak menghilangkan sepenuhnya kemampuan insulin meneruskan efek metaboliknya terhadap protein-protein regulator yang terletak di hilir dari jalur pensinyalannya (termasuk FoxO1). Menurut Hatting dkk. (2018), hal ini mungkin disebabkan insulin meneruskan sinyalnya melalui jalur lain, seperti contohnya melalui reseptor faktor pertumbuhan insulin (IGF).<sup>27</sup> Reseptor insulin dan reseptor IGF memiliki kesamaan, karena keduanya merupakan reseptor tirosin kinase, sehingga meskipun insulin dan *insulin growth factor-1* (IGF-1) memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap reseptornya masing-masing; pada beberapa kondisi insulin masih dapat meneruskan efek metaboliknya melalui reseptor IGF-1, demikian juga IGF-1 melalui reseptor insulin.<sup>27,28</sup> Titchell dkk. (2015) juga mengemukakan, pada ketiadaan FoxO1, pensinyalan insulin masih dimungkinkan melalui jaringan ekstra-hepatik dalam mengatur produksi glukosa hepatik.<sup>28</sup>

Selanjutnya, hasil pemeriksaan ekspresi gen G6Pc pada penelitian ini sejalan dengan hasil ekspresi protein FoxO1, yang menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok restriksi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan teori bahwa ekspresi G6Pc dipengaruhi oleh FoxO1.<sup>15</sup> Dari hasil-hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan hiperglikemia pada

tikus dengan diet restriksi vitamin B12 (Sianipar dkk., 2019), tidak terkait dengan ekspresi G6Pc. Selanjutnya, karena G6Pc merupakan enzim yang berperan penting pada tahap akhir proses glukoneogenesis, maka hiperglikemia yang terjadi mungkin bukan disebabkan proses glukoneogenesis. Produksi glukosa hepatik menyumbang ± 90% produksi glukosa tubuh, dan glukoneogenesis menyumbang ± 50% produksi glukosa hati,<sup>29</sup> yang berarti bahwa glukoneogenesis menyumbang sebagian besar produksi glukosa dalam tubuh. Insulin dalam regulasi glukosa tubuh selain menghambat glukoneogenesis, juga meningkatkan pemanfaatan glukosa di jaringan dan sintesis glikogen.<sup>13</sup> Pada kondisi resistensi insulin, fungsi-fungsi tersebut terganggu. Oleh karena kondisi hiperglikemia pada diet restriksi vitamin B12 tidak berkaitan dengan proses glukoneogenesis, maka penyebab lain terjadinya hiperglikemia seperti gangguan penggunaan glukosa oleh jaringan dan peningkatan glikogenolisis perlu diteliti lebih lanjut. Hal ini juga sesuai dengan temuan Samuel, dkk. (2009) yang menunjukkan pada pasien dengan diabetes melitus tipe 2 tidak terlihat peningkatan ekspresi PEPCK1 dan G6Pc, meskipun terjadi hiperglikemia; sehingga ia menyimpulkan bahwa ekspresi PEPCK1 dan G6Pc tidak terkait dengan peningkatan glukoneogenesis pada pasien diabetes tipe 2.<sup>30</sup>



**Gambar 3. Skema Pengaruh Defisiensi Vitamin B12 terhadap Ekspresi FoxO1, G6Pc dan Kadar Glukosa Darah.** Keterangan : kotak dengan bingkai utuh ( □ ) menunjukkan hasil temuan penelitian, tanda bintang (\*) menunjukkan hasil temuan penelitian Sianipar, dkk. (2019), kotak dengan bingkai putus-putus halus ( □ ) menunjukkan hipotesis penelitian, kotak dengan bingkai putus-putus kasar ( □ ) menunjukkan faktor-faktor yang diduga memengaruhi hasil penelitian.

Akhirnya, proses glukoneogenesis tidak hanya dipengaruhi oleh insulin, tetapi juga oleh hormon-hormon lainnya selain insulin, seperti glukagon,<sup>31</sup> epinefrin,<sup>32</sup> dan kortisol.<sup>33</sup> Dengan demikian, untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap tentang proses glukoneogenesis, penting juga untuk meneliti peran hormon lain pada proses glukoneogenesis pada kondisi resistensi insulin akibat defisiensi vitamin B12. Penjelasan secara skematik ditampilkan pada gambar 3. Sebagai penutup, disadari ada beberapa keterbatasan dalam penelitian ini, antara lain ekspresi FoxO1 tidak selalu sesuai dengan ekspresi G6Pc dikarenakan adanya modifikasi paska-translasi yang dapat mempengaruhi proses tersebut.<sup>19</sup> Untuk penelitian selanjutnya mungkin dapat dipertimbangkan dilakukan pemeriksaan aktivitas enzim G6Pc sehingga diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih baik.

### Simpulan

Berdasarkan tiadanya perbedaan ekspresi protein FoxO1 dan gen G6Pc, maka dapat disimpulkan bahwa hiperglikemia pada diet restriksi vitamin B12 tidak terkait dengan glukoneogenesis. Faktor-faktor lainnya yang dapat menyebabkan hiperglikemia pada kondisi resistensi insulin terkait dengan defisiensi vitamin B12, seperti gangguan pemanfaatan glukosa oleh jaringan dan gangguan proses glikogenesis juga perlu diteliti lebih lanjut.

### Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada staf laboratorium *Oral Biology* FKG UI dan MBPCF UI atas bantuannya selama penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, *et al.* Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17040.
- Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *Journal of Cardiology*. 2013;61(4):289–94.
- Sianipar IR, Ujjanti I, Yolanda S, Murthi AK, Amani P, Santoso DIS. Developing vitamin B12 deficient rat model based on duration of restriction diet: Assessment of plasma vitamin B12, homocysteine (Hcy), and blood glucose levels. *AIP Conference Proceedings*. 2019;2092(020004).
- Sianipar IR, Ujjanti I, Yolanda S, Jusuf AA, Kartinah NT, Amani P, *et al.* Low vitamin B12 diet increases liver homocysteine levels and leads to liver steatosis in rats. *Universa Medicina*. 2019;38(3):194–201.
- Dubaj C, Czyż K, Furmaga-Jabłońska W. Vitamin B12 deficiency as a cause of severe neurological symptoms in breast fed infant – a case report. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020;46(1):40.
- Ankar, Kumar A. Vitamin B12 Deficiency. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1999;19:217-46.
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, *et al.* The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(10):1733.
- Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2001;27(1): 85-91.
- Li Y, Zhang H, Jiang C, Xu M, Pang Y, Feng J, *et al.* Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(14):9583-92.
- Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(5):567-75.
- Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of medical physiology* 12th ed. Singapore: Elsevier; 2016. p.892-909.
- Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems* 8th ed. Jakarta: EGC; 2013. p. 748-64.
- Oh KJ, Han HS, Kim MJ. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Reports*. 2013;46(12):567–74.
- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(1).
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, *et al.* Insulin-regulated

- hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550–5.
17. Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell Death & Disease*. 2015;6(12): 2037.
  18. Peng S, Li W, Hou N, Huang N. A review of FoxO1-regulated metabolic diseases and related drug discoveries. *Cells*. 2020;9(1):184.
  19. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*. 2014; 925350.
  20. Bender DA. Gluconeogenesis and the control of blood glucose. Dalam: Robert K, Murray DAB, Botam KM, et al, editor. *Harper's Biochemistry* 28th ed. United States: McGraw Hill; 2009. p.165-73.
  21. Hutton JC, O'Brien RM. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *Journal Biological Chemistry*. 2009;284(43):29241-5.
  22. Cullen RW, Oace SM. Dietary pectin shortens the biologic half-life of vitamin B-12 in rats by increasing fecal and urinary losses. *The Journal of Nutrition*. 1989;119(8):1121–7.
  23. Sangüesa G, Shaligram S, Akther F, Roglans N, Laguna JC, Rahimian R, et al. Type of supplemented simple sugar, not merely calorie intake, determines adverse effects on metabolism and aortic function in female rats. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2017;312(2): H289–304.
  24. Zhang H, Li Y, Hu J, Shen W-J, Singh M, Hou X, et al. Effect of creosote bush-derived NDGA on expression of genes involved in lipid metabolism in liver of high-fructose fed rats: relevance to NDGA amelioration of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. *PloS One*. 2015;10(9):e0138203-e.
  25. Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, et al. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*. 2008;57(5): 1355-62.
  26. Yu X, Huang Y, Hu Q, Ma L. Hyperhomocysteinemia stimulates hepatic glucose output and PEPCK expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(12):1027-32.
  27. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1411(1):21-35.
  28. Titchenell PM, Chu Q, Monks BR, Birnbaum MJ. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nature Communications*. 2015;6(1):1-9.
  29. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(10):572-87.
  30. Samuel VT, Beddow SA, Iwasaki T, Zhang XM, Chu X, Still CD, et al. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29): 12121-6.
  31. Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, et al. Glucagon receptor signaling and glucagon resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13): 3314.
  32. Sherwin RS, Sacca L. Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *The American Physiological Society*. 1984;247(2 Pt 1):E157-65.
  33. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015;872:99-126.