

Efek Suplemen L-Arginin Subakut Peroral pada Kontraksi Aorta Tikus Diabetes

Sjarif Ismail^{1*}, M. Mulyohadi Ali², Djoko W. Soeatmadji^{2,3}

¹ Laboratorium Farmakologi Program Pendidikan Dokter, Universitas Mulawarman, Samarinda

² Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

³ Divisi Endokrin, Lab/UPF Ilmu Penyakit Dalam RSSA

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplemen L-arginin subakut peroral pada tikus diabetes-streptozototin terhadap respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif. L-arginine diberikan selama 8 minggu pada tikus diabetes dengan dosis 10, 100 dan 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹. Parameter yang diukur adalah MDA-plasma untuk menilai oksidatif stress dan teknik *bioassay* dengan isolasi organ terpisah aorta ring untuk menilai respons reseptor adrenergik- α_1 di otot polos aorta terhadap fenilefrin (PE). Dari respons kontraksi aorta dapat diketahui nilai Emaks dan pD₂ PE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian L-arginin 100, 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma ($p < 0.001$). Pemberian L-arginin dosis 100, 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE melalui pencegahan peningkatan Emaks ($p < 0.000$) dan menurunkan pD₂ pada dosis 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ ($p < 0.001$). Hasil Jalur Hubungan menunjukkan pencegahan peningkatan Emaks melalui jalur pencegahan peningkatan MDA ($p < 0.012$) dan penurunan pD₂ melalui jalur langsung ($p < 0.016$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian suplemen L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE dengan cara: (1) mencegah peningkatan Emaks melalui pencegahan peningkatan MDA (jalur tidak langsung); dan (2) secara langsung menurunkan afinitas reseptor adrenergik- α_1 .

Kata kunci: diabetes, L-arginin, reseptor adrenergik- α_1 , stress oksidatif

Abstract

This research was aimed to assess the effect of subacute peroral L-arginine supplement on diabetes-streptozototin rat towards the response of aorta contraction through the mechanism of prevention on the increasing oxidative stress. L-arginine was administrated for eight weeks on diabetic rats with doses 10, 100 and 1000 mg.kg⁻¹ BW.day⁻¹. Measured parameters are MDA-plasma to assess the oxidative stress and bioassay technique by isolate the separated organ of aorta ring. We measure the response of adrenergic- α_1 receptor in aorta smooth muscle towards phenylephrine (PE). From the contraction response of aorta, we obtained the value of E_{max} and pD₂ PE. The results showed that the administration of L-arginine 100, 1000 mg.kg⁻¹ BW.day⁻¹ on diabetic rat prevent the increasing of MDA-plasma ($p < 0.001$). Administration of L-arginine doses 100, 1000 mg.kg⁻¹ BW.day⁻¹ prevent the response of aorta constraction towards PE through the increasing of E_{max} ($p < 0.000$) and decreasing pD₂ on dose 1000 mg.kg⁻¹ BW.day⁻¹ ($p < 0.001$). Pathway analysis showed the prevention of E_{max} increasing through the path of increased MDA prevention ($p < 0.012$) and decreased pD₂ through direct path ($p < 0.016$). We conclude that the administration of L-arginine supplement on diabetic to prevent the responses of aorta contraction towards PE is available in two ways: (1) prevent the increasing of E_{max} by prevent the increasing of MDA (indirect path); and (2) directly decrease the affinity of adrenergic- α_1 receptor.

Kata kunci: diabetes, L-arginine, oxidative stress, receptor of adrenergic- α_1

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian telah membuktikan respons pembuluh darah tikus diabetes yang diperantarai oleh reseptor adrenergik- α meningkat [1-3]. Perubahan reaktifitas ini bisa

merupakan efek terpisah dari kelainan fungsi endotel [4-5]. Peningkatan respons kontraksi tersebut dapat terjadi di tingkat reseptor yaitu melalui peningkatan afinitas reseptor adrenergik [3]. Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan respons kontraksi pembuluh darah melalui mekanisme perubahan sinyal transduksi, yaitu meningkatkan ion kalsium sitosol otot polos pembuluh darah [2,6]. Jadi, pada diabetes terjadi perubahan pada sistem

* Alamat korespondensi:

Sjarif Ismail

Alamat : Laboratorium Farmakologi Program Pendidikan Dokter, Universitas Mulawarman, Samarinda

regulasi reseptor adrenergik dan sinyal transduksi untuk mempertahankan keadaan homeostasis sehingga menyebabkan perubahan pada respons kontraksi pembuluh darah.

Berbagai bukti menunjukkan peningkatan stress oksidatif pada diabetes [7-16]. Salah satu penyebab peningkatan stress oksidatif adalah penurunan L-arginin. Pada keadaan ini eNOS dapat menghasilkan superoksida selain pembentukan NO menurun [17-19]. Beberapa penelitian telah membuktikan penurunan konsentrasi arginin plasma dan jaringan vaskular pada model hewan diabetes [21-23] dan penderita diabetes [24,25]. Keberadaan L-arginin yang mencukupi sangat dibutuhkan untuk mempertahankan suatu keadaan homeostasis pada diabetes. Masih belum ada penelitian efek pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes terhadap perubahan respons kontraksi melalui perubahan stress oksidatif. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplemen L-arginin subakut peroral pada tikus diabetes-streptozotocin terhadap respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif.

METODE PENELITIAN

Tikus wistar jantan dari induk *inbred* umur 3-4 bulan dari Laboratorium Farmakologi FK Unibraw. Tikus dibuat diabetes dengan suntikan streptozotocin 55 mg/kgBB dalam buffer sitrat. Satu minggu setelah pemberian streptozotocin darah dari ekor tikus diperiksa dengan glukometer. Tikus dinyatakan diabetes jika gula darahnya >300 mg% [26]. Tiap kelompok terdiri dari lima ekor tikus, yaitu tikus kontrol, diabetes, diabetes dengan perlakuan L-arginin peroral dosis 10, 100, 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ semua diperlakukan selama 8 minggu dengan kondisi yang sama.

Metode Pemeriksaan MDA-plasma.

Digunakan plasma darah sebanyak 200 µl. Teknik pemeriksaan MDA-plasma disesuaikan dengan protokol yang terdapat di Laboratorium Biomedik FK Universitas Brawijaya dengan sedikit modifikasi. Pemeriksaan MDA-plasma dilakukan setelah semua sampel terkumpul semuanya, disimpan dalam lemari es -70 °C.

Percobaan Organ Terpisah Aorta Ring

Aorta yang digunakan dengan endotel intak karena dikerjakan bersama-sama dengan penelitian lain. Teknik preparasi organ terpisah

aorta mengacu Pieper dan Dondlinger [23], dengan modifikasi. Aorta ring lalu potong pada cincinnya dengan panjang sekitar 3 mm, lalu dimasukkan dalam *organ bath* 20 ml larutan Krebs-Henseleit pH 7,4 suhu 37°C yang dialiri gas carbogen. Salah satu ujung aorta ring dihubungkan dengan *tissue holder* dan ujung lainnya dipasang pada *transducer* isometrik (Ugo Basile No. 7004) dengan tonus 2 g dihubungkan pada komputer *Macintosh LC 575, Mac Lab./8e AD Instrument, Program Chard versi 3.5* buatan Michael Macknight. Setelah percobaan selesai, dihitung *cross sectional area* (CSA) [27]. Selanjutnya tegangan aorta diekspresikan per CSA.

Respons kontraksi aorta

Setelah ekuilibrasi tercapai, respons kontraksi aorta dengan pemberian kumulatif dosis PE. Setelah respons maksimal PE tercapai, cairan di *organ bath* diganti secara serial sampai kembali ke *base line*.

HASIL

MDA-plasma terhadap pemberian L-arginin

Hasil rerata kadar MDA akibat pemberian L-arginin pada tiap kelompok tikus dapat dilihat pada tabel 1. Hasil Uji Anova didapatkan hasil yang signifikan ($p=0.000$). Untuk mengetahui seberapa besar perbedaan rerata MDA pada tiap kelompok, dilanjutkan dengan uji Tukey.

Hasil Uji Tukey, didapatkan hasil MDA yang berbeda bermakna jika kelompok tikus A dibandingkan dengan kelompok K (0.803 ± 0.126) $p=0.000$, tikus S (0.628 ± 0.126) $p=0.001$, dan kelompok D (0.807 ± 0.126) $p=0.000$; tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok L (0.180 ± 0.126) $p=0.169$.

Hasil yang berbeda signifikan juga didapatkan jika kelompok K dibandingkan dengan kelompok L (-0.623 ± 0.126) $p=0.001$, tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok (-0.175 $\pm$ 0.126) $p=0.641$ dan kelompok D ($4.200.10^{-3} \pm 0.126$) $p=1.000$. Kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok L akan didapatkan hasil yang berbeda signifikan (-0.627 ± 0.126) $p=0.001$, tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok S (-0.179 ± 0.126) $p=0.621$. MDA kelompok S jika dibandingkan dengan kelompok L didapatkan hasil yang berbeda signifikan, yaitu (-0.448 ± 0.126) $p=0.015$. Dari hasil uji regresi menunjukkan bahwa peningkatan dosis peroral L-arginin pada

tikus diabetes dapat mempengaruhi pencegahan peningkatan MDA-plasma ($r^2=0.442$, $p=0.001$).

Tabel 1. MDA-plasma terhadap pemberian L-arginin

Kelompok	Rerata MDA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
K	0.194 ± 0.039
A	$0.997 \pm 0.128^{\#}$
L	$0.817 \pm 0.116^{\#}$
S	0.369 ± 0.069
D	0.190 ± 0.060

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine $10 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

S= tikus diabetes + L-arginine $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

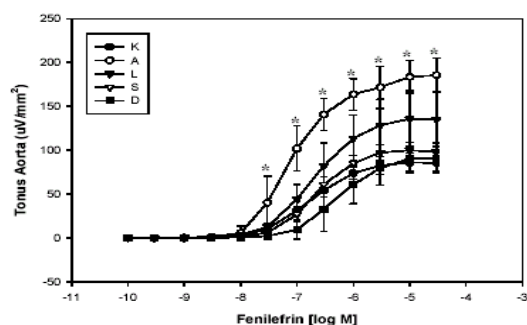
D= tikus diabetes + L-arginine $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

Data dinyatakan dalam mean $\pm$ SE, n=5 ekor tikus tiap kelompok. Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika $p<0.05$.

[#] Berbeda sangat nyata terhadap kelompok K, S, dan D.

Respons Reseptor Adrenergik- α_1 terhadap Pemberian L-arginin.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes terhadap respons kontraksi aorta pada reseptor adrenergik- α_1 maka dilakukan percobaan dengan menggunakan organ terpisah aorta. Hasil gambar rekaman kekuatan tonus kontraksi aorta terhadap pemberian fenilefrin pada tiap kelompok hewan coba di komputer McLab dalam μV seperti yang terlihat pada gambar 1.



Gambar 2. Kurva dosis respons PE terhadap besarnya tonus kontraksi aorta

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine $10 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

S= tikus diabetes + L-arginine $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

D= tikus diabetes + L-arginine $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika $p<0.05$.

*Berbeda sangat nyata, jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes.

Pada penambahan dosis PE di organ terpisah aorta terlihat peningkatan tonus kontraksi aorta

yang tergantung pada konsentrasi PE di *organ bath* pada semua kelompok, seperti terlihat pada gambar 2 pada bentuk kurva dosis respons PE terhadap besarnya tonus kontraksi aorta. Dari hasil Uji Anova, terlihat peningkatan kekuatan tonus kontraksi aorta pada kelompok diabetes secara bermakna jika dibandingkan kelompok lainnya, mulai bermakna pada dosis PE $[3.10^{-8}]$ M ($p=0.003$). Dengan semakin meningkatnya dosis PE akan semakin meningkat tonus kontraksinya.

Dari tabel 2 dapat dilihat nilai E_{maks} PE dan hasil uji Anova bermakna ($p=0.000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dan berapa besar perbedaan reratanya, maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasilnya, nilai E_{maks} PE pada kelompok A mendapatkan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K (99.350 ± 11.908) dengan $p=0.000$, kelompok tikus L (49.932 ± 11.908) dengan $p=0.004$, kelompok S (85.962 ± 11.908) dengan $p=0.000$, kelompok D (92.978 ± 11.908) dengan $p=0.000$.

Tabel 2. E_{maks} dan pD_2 PE akibat pemberian L-arginin

Kelompok	E_{maks} ($\mu\text{V.mm}^{-2}$)	pD_2
K	$86.45 \pm 5.07^{\#}$	6.83 ± 0.10
A	185.80 ± 8.45	7.13 ± 0.08
L	135.87 ± 14.23	6.78 ± 0.12
S	$99.84 \pm 4.20^{\#}$	6.37 ± 0.03
D	$92.82 \pm 6.15^{\#}$	$6.36 \pm 0.13^*$

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine $10 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

S= tikus diabetes + L-arginine $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

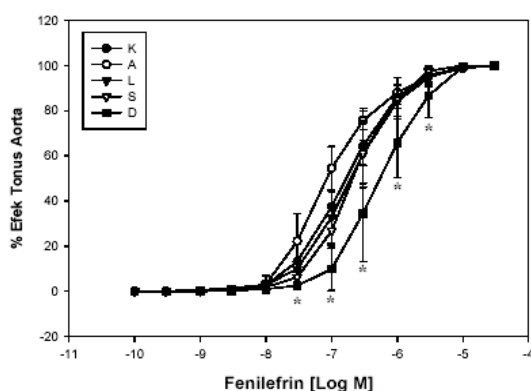
D= tikus diabetes + L-arginine $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$.

Data dinyatakan dalam mean $\pm$ SE, n=5 ekor tikus tiap kelompok. Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika $p<0.05$.

[#] Berbeda sangat nyata terhadap kelompok K, S, dan D.

Nilai E_{maks} PE pada kelompok L akan mendapatkan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K (49.422 ± 11.908) dengan $p=0.004$, kelompok S (36.030 ± 11.908) dengan $p=0.047$, kelompok D (43.046 ± 11.908) dengan $p=0.013$. Nilai E_{maks} PE pada kelompok S jika dibandingkan dengan kelompok K dan D didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu (13.392 ± 11.908) dengan $p=0.792$ dan (7.016 ± 11.908) dengan $p=0.975$; sedangkan kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok K akan didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu (6.376 ± 11.908) dengan $p=0.982$. Hasil Uji regresi menunjukkan peningkatan dosis peroral L-arginine pada tikus diabetes mencegah terjadinya peningkatan E_{maks} PE ($r^2=0.314$, $p=0.010$).

Pada gambar 3 terlihat adanya pergeseran kurva persen efek pada tikus diabetes yang diberi L-arginin. Hal ini menandakan adanya perubahan afinitas reseptor adrenergik- α_1 terhadap PE. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat dari nilai pD_2 PE pada tabel 2. Dari hasil uji Anova berbeda signifikan ($p=0.000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dan berapa besar perbedaan reratanya nilai pD_2 PE, maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasilnya, nilai pD_2 PE kelompok A jika dibandingkan dengan kelompok D didapatkan hasil yang signifikan, yaitu (0.763 ± 0.136) dengan $p=0.000$; sedangkan kelompok A jika dibandingkan dengan kelompok K, L, S didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu (0.294 ± 0.136) $p=0.237$, (0.345 ± 0.136) $p=0.123$, (0.396 ± 0.136) $p=0.006$; kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok K dan L didapatkan hasil yang signifikan, yaitu (-0.470 ± 0.136) $p=0.019$ dan (-0.418 ± 0.136) $p=0.042$. Hasil uji regresi menunjukkan bahwa peningkatan dosis peroral L-arginine pada tikus diabetes dapat menurunkan pD_2 PE ($r^2=0.492$, $p=0.001$).



Gambar 3. Kurva dosis respons fenilefrin terhadap persen efek

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine 10 mg.kg⁻¹BB.hari⁻¹.

S= tikus diabetes + L-arginine 100 mg.kg⁻¹BB.hari⁻¹.

D= tikus diabetes + L-arginine 1 g.kg⁻¹BB.hari⁻¹.

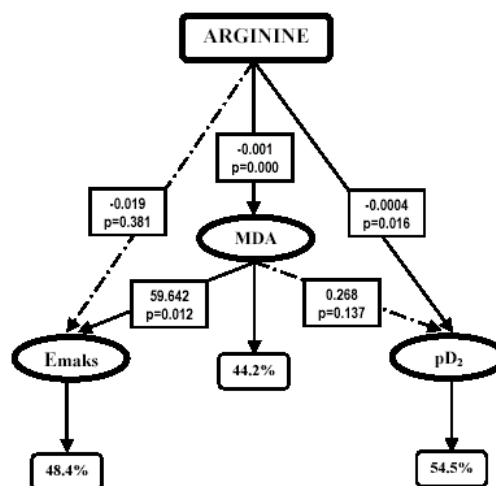
Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika $p<0.05$.

* Berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes.

Model Pengaruh Dosis L-arginin terhadap E_{maks} dan pD_2 Fenilefrin melalui MDA.

Untuk menelusuri model pengaruh pemberian berbagai dosis arginin pada tikus diabetes terhadap E_{maks} dan pD_2 , aorta tikus pada sediaan organ terpisah melalui MDA, dilakukan analisis jalur (*Path Analysis*). Jadi Analisis jalur dilakukan terhadap nilai yang telah distandarkan.

Jadi analisis jalur digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian dosis arginine pada tikus diabetes terhadap E_{maks} dan pD_2 , serta untuk mengetahui peran variable antara (MDA) terhadap perubahan E_{maks} dan pD_2 aorta tikus seperti yang terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Model pengaruh dosis L-arginin terhadap E_{maks} dan pD_2 fenilefrin melalui MDA

Keterangan:

→ : Jalur dominan, jika $p<0.05$.

Dari hasil analisa jalur menunjukkan bahwa pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap pencegahan peningkatan MDA besarnya 44.2%, dengan koefisien jalur -0.001 dan $p=0.000$. Pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dan MDA terhadap pencegahan peningkatan nilai E_{maks} PE besarnya 48.4%. Hubungan pemberian peroral dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap nilai E_{maks} PE mempunyai koefisien jalur sebesar -0.019 dan $p=0.381$, sedangkan hubungan MDA terhadap nilai E_{maks} PE mempunyai koefisien jalur sebesar 59.642 dan $p=0.012$. Jadi perubahan pada nilai E_{maks} PE lebih dominan melalui MDA dibandingkan jalur langsung. Pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dan MDA terhadap penurunan nilai pD_2 PE besarnya 54.4%. Hubungan pemberian peroral dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap nilai pD_2 PE mempunyai koefisien jalur sebesar -0.0004 dan $p=0.016$, sedangkan hubungan MDA terhadap nilai pD_2 PE mempunyai koefisien jalur sebesar 0.268 dan $p=0.137$. Jadi perubahan pada nilai pD_2 PE lebih dominan melalui jalur langsung.

PEMBAHASAN

MDA-plasma

Pemeriksaan MDA-plasma merupakan salah satu parameter untuk membuktikan peningkatan stress oksidatif pada diabetes. Penelitian ini telah membuktikan pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma, dimana besarnya efek pencegahan peningkatan MDA-plasma tergantung pada dosis L-arginin yang diberikan. Semakin besar dosis L-arginin yang diberikan pada tikus diabetes akan semakin besar pula mencegah terjadinya peningkatan MDA-plasma, dimana pemberian L-arginin 100 mg.kg⁻¹BB.hari⁻¹ pada tikus diabetes sudah terjadi keadaan MDA-plasma yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kontrol.

Stress Oksidatif

Hasil Uji regresi menunjukkan besarnya efek pencegahan peningkatan stress oksidatif pengaruh yang signifikan dengan besarnya dosis L-arginin yang diberikan ($r^2=0.442$; $p=0.001$). Hal ini dapat terjadi karena salah satu mekanisme peningkatan stress oksidatif pada diabetes adalah berkurangnya substrat L-arginin di endotel sehingga terjadi keadaan yang disebut '*uncoupled eNOS*', maka superoksid dihasilkan melimpah [17-20]. Berbagai bukti menunjukkan penurunan L-arginin di dalam plasma dan vaskular tikus diabetes dan penderita diabetes [21-25].

Penurunan arginin bisa disebabkan oleh: (1) kebutuhan arginin yang meningkat karena peningkatan ekspresi eNOS yang berhubungan dengan peningkatan *moderate* oksidasi LDL dan lisofosfatidilkolin. Peningkatan ekspresi eNOS berfungsi sebagai mekanisme pertahanan anti atero-sklerosis pada stadium awal pembentukan lesi aterosklerosis [20]; (2) penghancuran arginin yang meningkat karena: (a) pembentukan arginin-imidazolon *adduct*, arginin-dehidroimidazolon *adduct* dan arginin-lisin *crosslink* karena glikosilasi non-enzimatik meningkat [13], (b) katabolisme arginin yang meningkat karena overekspresi arginase [28-30]; (3) gangguan sistem transport arginin yang afinitas tinggi untuk *uptake* arginin ke dalam sel endotel akibat peningkatan radikal bebas [19,31-34]. Maka diperlukan upaya peningkatan L-arginin yang lebih besar dari biasanya untuk mempertahankan *uptake* arginin ke dalam sel endotel. Berbagai bukti telah menunjukkan bahwa pemberian L-arginin peroral akan meningkatkan konsentrasi arginin dalam plasma [35]. Maka pemberian L-

arginin pada tikus diabetes dapat diasumsikan meningkatkan arginin di plasma, peningkatan arginin di plasma akan meningkatkan arginin di endotel sehingga keadaan '*uncoupled eNOS*' dapat diperbaiki, hasilnya pembentukan anion superoksid berkurang. Penurunan pembentukan superoksid menyebabkan penurunan peroksidasi lipid, maka pengukuran peroksidasi lipid dengan menggunakan metoda TBA akan menghasilkan penurunan MDA-plasma. Jadi pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah terjadinya peningkatan MDA-plasma.

Hasil Uji Regresi memperlihatkan dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap pencegahan peningkatan MDA-plasma pengaruhnya sebesar 44.2%. Hal ini dapat diartikan sebesar 65.8% tidak dapat mencegah peningkatan MDA-plasma pada diabetes dengan pemberian L-arginin. Hal ini wajar saja dapat terjadi karena '*uncoupled eNOS*' tidak saja disebabkan oleh arginin yang menurun, tetapi bisa juga karena penurunan kofaktor tetrahidrobiopterin [36,37].

Selain itu, '*uncoupled eNOS*' bukan satu-satunya penyebab peningkatan stress oksidatif pada diabetes, masih banyak mekanisme peningkatan stress oksidatif pada diabetes yaitu: (1) meningkatnya jalur sorbitol; (2) glikosilasi non-enzimatik; (3) auto-oksidasi; (4) peningkatan PKC; (5) peningkatan siklooksigenase; (6) peningkatan angiotensin II [8-12,14-16]. Keadaan ini semua dapat menyebabkan peningkatan MDA-plasma, tetapi pengaruh arginin tampaknya cukup besar dalam mencegah peningkatan MDA-plasma jika dilihat dari hasil Uji Regresi.

Respon Kontraksi Aorta

Untuk mengetahui respons kontraksi aorta maka agonis yang digunakan adalah fenilefrin sebagai agonis selektif yang bekerja pada adrenergik- α_1 di otot polos pembuluh darah, menyebabkan kontraksi pada otot polos pembuluh darah [38], dan menjadi pertimbangan untuk digunakan karena pada aorta tikus reseptor adrenergiknya lebih dominan adrenergik- α_1 [39,40].

Berdasarkan pengamatan hasil, tampak peningkatan respons kontraksi aorta tergantung pada dosis fenilefrin di *organ bath* pada semua kelompok tikus. Secara umum dapat diketahui peningkatan respons kontraksi aorta diabetes dibandingkan dengan kontrol terhadap pemberian fenilefrin seperti yang terlihat pada kurva dosis respons fenilefrin terhadap besarnya tonus kontraksi aorta (gambar 2). Pada kelompok tikus

diabetes respons kontraksi aorta lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, dimana mulai bermakna pada dosis fenilefrin $[3.10^{-8}]$ M ($p=0.003$). Semakin tinggi dosis fenilefrin yang diberikan akan semakin tinggi respons kontraksi aortanya dan semakin bermakna perbedaannya ($p=0.000$). Tampak juga pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta dan semakin besar dosis L-arginin yang diberikan akan semakin besar juga efek pencegahan peningkatan respons tersebut. Jadi pada penelitian ini terbukti pemberian L-arginin subakut secara oral dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta tikus diabetes.

Nilai E_{maks} dan pD_2 Fenilefrin

Salah satu cara untuk mengetahui mekanisme pencegahan peningkatan respons kontraksi aorta tikus diabetes setelah diberi L-arginin subakut secara oral adalah dengan mengukur nilai E_{maks} dan pD_2 fenilefrin. Nilai E_{maks} dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah maksimal reseptor yang ditempati oleh agonis untuk menimbulkan efek maksimum (respons maksimum) dan juga menggambarkan mekanisme sinyal transduksinya. Besarnya efek agonis adalah proporsional dengan fraksi reseptor yang ditempati oleh agonis dan efek maksimal dihasilkan jika semua reseptor telah ditempati. Artinya efek suatu agonis berbanding lurus dengan jumlah reseptor yang ditempati dan efek suatu agonis akan mencapai maksimal jika seluruh reseptornya ditempati oleh agonis [41]. Secara fungsional reseptor terdiri dari domain *ligand-binding* dan domain efektor [41]. Domain *ligand-binding* adalah tempat interaksi antara agonis dengan reseptor, sedangkan domain efektor berinteraksi dengan berbagai molekul seluler lainnya dalam sistem sinyal transduksi.

Nilai pD_2 menggambarkan afinitas agonis terhadap reseptornya atau kemampuan agonis untuk menempati 50% reseptornya [42-43]. Bila nilai ini besar berarti afinitas reseptor terhadap agonis meningkat, artinya konsentrasi agonis yang diperlukan untuk menimbulkan respons lebih kecil sehingga dapat juga disebut sensitifitas reseptor meningkat atau dengan perkataan lain kepekaan reseptor meningkat.

Pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respon kontraksi aorta terhadap fenilefrin melalui pencegahan nilai E_{maks} fenilefrin. Semakin tinggi dosis L-arginin yang diberikan pada tikus diabetes akan semakin signifikan pence-

gahan peningkatan nilai E_{maks} fenilefrin. Pada pemberian L-arginin dosis $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$ sudah mencapai suatu kondisi yang tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol ($p=0.792$) dan diabetes + L-arginin dosis $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$ ($p=0.975$).

Regulasi Reseptor Adrenergik- α_1

Fenomena diatas secara umum bisa diasumsikan bahwa pada diabetes terjadi perubahan regulasi reseptor adrenergik- α_1 kearah *upregulasi* reseptor adrenergik- α_1 (peningkatan jumlah reseptor adrenergik- α_1) yang diketahui dari peningkatan nilai E_{maks} fenilefrin. Pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes dapat diasumsikan mencegah terjadinya *upregulasi*/peningkatan jumlah reseptor tersebut. Mekanisme perubahan tersebut karena terjadinya regulasi reseptor untuk mempertahankan keadaan homeostasis. Jadi tidak tertutup kemungkinan *upregulasi* reseptor tersebut karena neuropathi pada tikus diabetes dan pemberian L-arginin dapat mencegah terjadinya neuropati. Penurunan kecepatan konduksi saraf motorik dan sensorik berhubungan dengan neuropathi pada tikus diabetes delapan minggu [44]. Adapun penelitian lain menemukan penurunan transmisi saraf neuron di *prejunctional sympathetic* pada tikus diabetes 12 minggu [45].

Terjadinya neuropathi pada diabetes dapat menyebabkan perubahan keseimbangan sistem saraf otonom, salah satu mekanisme tubuh untuk memperbaiki keseimbangan tersebut bisa melalui peningkatan jumlah reseptor. Hal ini dapat menjadi pertimbangan jika melihat besarnya nilai E_{maks} fenilefrin. Sedangkan pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes diasumsikan dapat mencegah terjadinya neuropathi pada tikus diabetes, sehingga didapatkan nilai E_{maks} fenilefrin yang tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol yang dapat diartikan relatif tidak terjadi *upregulasi* reseptor adrenergik- α_1 tetapi perlu dibuktikan lebih lanjut. Jadi tidak tertutup kemungkinan peningkatan E_{maks} PE pada diabetes karena *upregulation* reseptornya, sedangkan pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah *upregulation* pada reseptornya.

Perubahan dalam sinyal transduksi juga perlu dipikirkan karena nilai E_{maks} juga menggambarkan mekanisme sinyal transduksinya. Beberapa mekanisme yang sudah diketahui adalah perubahan Ca^{2+} yang masuk melalui *voltage-*

dependent Ca²⁺ channel [46] dan perubahan konsentrasi Ca²⁺ ekstraseluler [1]. Pada percobaan ini, peningkatan nilai E_{maks} fenilefrin kemungkinan besar karena peningkatan radikal bebas. Hasil ini dipertegas dari Analisis *Pathway* yang menunjukkan jalur dominan pencegahan peningkatan nilai E_{maks} fenilefrin melalui pencegahan peningkatan MDA-plasma (gambar 4). Karena pemberian dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma secara signifikan, sehingga berpengaruh terhadap nilai E_{maks} fenilefrin secara bermakna pula.

Telah kita ketahui bahwa peningkatan radikal bebas dapat mengurangi fluiditas membran karena terjadinya peroksidasi lipid di membrannya sehingga dapat mengganggu berbagai kanal ion yang terdapat di membran. Karenanya mempengaruhi keseimbangan ion kalsium di sitosol otot polos pembuluh darah. Pemberian xanthine oksidase / hypoxanthine (menghasilkan anion superoksida) pada otot polos arteri uterine manusia kontrol akan lebih meningkatkan ion kalsium sitosol setelah pemberian noradrenalin [6]. Hal ini juga meningkatkan kekuatan kontraksinya sebesar 81% seperti pada penderita diabetes dibandingkan dengan tanpa pemaparan xanthine oksidase/hypoxanthine. Sebaliknya, pemberian SOD akan meniadakan peningkatan ion kalsium dan perubahan dalam kontraksinya.

Peningkatan respons kontraksi arteri tikus diabetes disebabkan oleh peningkatan ion kalsium sitosol setelah pemberian noradrenalin dibandingkan dengan kontrol [47]. Peningkatan kontraksi arteri tikus diabetes juga dibuktikan terhadap noradrenalin karena meningkatnya influks ion kalsium ekstraseluler melalui ligan kanal kalsium [27]. Peningkatan respons kontraksi arteri mesenterika tikus diabetes terhadap noradrenalin juga dibuktikan karena peningkatan produksi inositol trifosfat [1]. Peningkatan nilai E_{maks} fenilefrin tidak merubah afinitasnya, melainkan pemberian pyrogallol (menghasilkan anion superoksida) akan meningkatkan respons kontraksi aorta pada tikus diabetes dan kontrol, dimana pemberian SOD dapat mencegah peningkatan respons kontraksinya akibat pyrogallol [2].

Peningkatan E_{maks} PE pada diabetes karena perubahan pada sinyal transduksi PKC perlu dipikirkan. Peningkatan PKC dapat meningkatkan sensitifitas protein kontraktil [48], sedangkan Kawasaki [49] membuktikan adanya peningkatan

PKC pada tikus diabetes menyebabkan peningkatan influks ion kalsium melalui kanal kalsium transmembran, selain itu harus diingat pula radikal bebas dapat juga meningkatkan PKC [50, 51].

Tetapi tertutup kemungkinan peningkatan E_{maks} fenilefrin karena penurunan E_{maks} asetilkolin, karena Dresner *et al.* [5] mendapatkan hasil pada tikus diabetes yang diberi L-NAME (suatu kompetitif inhibitor eNOS) dan diabetes tanpa diberi L-NAME juga mendapatkan hasil respons kontraksi arteri mesenterika yang sama peningkatannya.

Jadi pada penelitian ini telah dibuktikan pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan E_{maks} fenilefrin melalui mekanisme pencegahan peningkatan MDA, sehingga tidak terjadi perubahan dalam sinyal transduksinya. Tetapi tidak tertutup kemungkinan karena pencegahan *upregulation* reseptor adrenergik- α_1 .

Afinitas Reseptor Adrenergik- α_1

Pada kurva dosis respons fenilefrin terhadap persen efek, tampak adanya pergeseran kurva ke kiri pada tikus diabetes. Pergeseran kurva ke kiri menandakan peningkatan afinitas reseptor adrenergik- α_1 . Peningkatan afinitas reseptor adrenergik- α_1 pada tikus diabetes akan tampak lebih jelas jika kita membandingkannya dalam bentuk nilai pD₂ fenilefrin, karena nilai pD₂ menggambarkan afinitas reseptor adrenergik- α_1 terhadap fenilefrin.

Pada percobaan ini ditemukan peningkatan afinitas reseptor adrenergik- α_1 pada kelompok tikus diabetes tetapi tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol, karena tikus diabetes yang digunakan adalah delapan minggu. Sedangkan pada penelitian Murray *et al.* [3] menggunakan tikus diabetes 12-15 mg. Jadi lamanya waktu juga mempengaruhi terjadinya perubahan pada afinitas reseptornya. Hasil ini sama seperti yang diperoleh Dresner *et al.* [5] yang mendapatkan hasil afinitas reseptor adrenergik- α_1 meningkat pada kelompok tikus diabetes tapi tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Head *et al.* [52] juga mendapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan pada peningkatan afinitas reseptor tikus diabetes jika dibandingkan dengan kontrol tapi untuk noradrenarine, dimana keduanya menggunakan tikus diabetes delapan minggu.

Pemberian peroral L-arginin pada tikus diabetes selama delapan minggu terbukti dapat

mencegah terjadinya peningkatan afinitas reseptor adrenergik- α_1 , semakin tinggi dosis L-arginin yang diberikan akan semakin menurunkan afinitas reseptor, tetapi penurunannya yang bermakna hanya pada pemberian L-arginin dosis 1 g.kg⁻¹BB.hari⁻¹ ($p=0.000$). Penurunan afinitas reseptor akibat pemberian L-arginin pada tikus diabetes dengan dosis 1 g.kg⁻¹BB.hari⁻¹ juga signifikan jika dibandingkan kontrol ($p=0.019$). Tetapi untuk dosis 10 dan 100 mg.kg⁻¹BB.hari⁻¹ penurunannya tidak berbeda signifikan yaitu ($p=0.995$) dan ($p=0.994$). Fenomena ini secara umum bisa diasumsikan bahwa pada diabetes terjadi perubahan dalam regulasi reseptor adrenergik- α_1 ke arah super-sensitif tetapi hasil penelitian menunjukkan peningkatan nilai pD_2 tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Pemberian L-arginin pada tikus diabetes akan menyebabkan perubahan regulasi reseptor ke arah desensitisasi dimana penurunan afinitas reseptor ini bermakna untuk pemberian L-arginin dosis 1 g.kg⁻¹BB.hari⁻¹ jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes ($p=0.000$) dan kontrol ($p=0.019$).

Terjadinya peningkatan afinitas reseptor pada tikus diabetes diduga juga berhubungan dengan terjadinya neuropathi, sehingga ada upaya tubuh untuk mempertahankan suatu keadaan homeostasis yang normal dengan cara meningkatkan afinitas *ligand binding* reseptor tersebut yang dapat dilihat pada meningkatnya nilai pD_2 walaupun tidak signifikan. Pengaruh pemberian L-arginin pada tikus diabetes diperkirakan dapat mencegah terjadinya neuropathi, bahkan dosis besar (1 g.kg⁻¹BB.hari⁻¹) dapat merubah regulasi reseptor tersebut ke arah desensitisasi untuk mempertahankan keadaan homeostasis.

Mekanisme molekular yang terjadi untuk menerangkan hal ini masih belum diketahui, mungkin berhubungan dengan pembentukan NO yang meningkat yang dipertegas oleh Analisis *Pathway*. Tampak ada jalur dominan secara langsung antara dosis L-arginin dengan penurunan nilai pD_2 fenilefrin. Hal ini dimungkinkan karena NO mempunyai efek biologis yang luas dalam vasoprotektif, salah satunya adalah memadamkan radikal superoksida yang banyak dihasilkan oleh tikus diabetes. Keadaan ini dimungkinkan karena interaksi antara NO dan anion superoksida sangat cepat yaitu tiga kali lebih cepat dari kecepatan reaksi superoksida dismutase (SOD) dengan anion superoksida [17, 53,54].

Bila ditinjau dari pemberian dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap efek pencegahan

peningkatan E_{maks} fenilefrin melalui MDA sebesar 48.4%. Ini dapat diartikan 51.6% tidak dipengaruhi oleh pemberian L-arginin. Hal ini wajar saja dapat terjadi karena mekanisme terjadinya peningkatan stress oksidatif tidak hanya disebabkan oleh penurunan L-arginin, masih banyak penyebab lainnya seperti: (1) peningkatan jalur sorbitol; (2) glikosilasi non-enzimatis; (3) auto-oksidasi; (4) peningkatan PKC; (5) peningkatan siklooksigenase; (6) peningkatan angiotensin II [8-16]. Dimana berbagai mekanisme tersebut mungkin berpengaruh pada regulasi reseptor terhadap terjadinya peningkatan E_{maks} fenilefrin. Hal yang sama juga berlaku untuk nilai pD_2 fenilefrin, tetapi mungkin juga berhubungan dengan terjadinya peningkatan pembentukan NO karena adanya jalur langsung yang dominan tidak melalui MDA, maka perlu penelitian lanjutan.

Jadi pada penelitian ini telah terbukti bahwa pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif, selain itu juga terlihat adanya jalur langsung pencegahan peningkatan respons kontraksi aorta terhadap penurunan afinitas reseptornya. Hal ini perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan apakah jalur langsung ini berhubungan dengan terjadinya peningkatan pembentukan NO sehingga dapat mempengaruhi regulasi reseptor ke arah desensitisasi melalui pemeriksaan isolasi organ terpisah aorta dengan endotel utuh. Selain itu juga diperlukan penelitian lanjutan pemeriksaan densitas reseptor dan sinyal transduksi lainnya karena E_{maks} mencerminkan jumlah reseptor yang ditempati oleh agonis dan sinyal transduksinya.

KESIMPULAN

Pemberian L-arginin 100, 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma ($p<0.001$). Pemberian L-arginin dosis 100, 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE melalui pencegahan peningkatan E_{maks} ($p<0.000$) dan menurunkan pD_2 pada dosis 1000 mg.kg⁻¹ BB.hari⁻¹ ($p<0.001$). Hasil Jalur Hubungan menunjukkan pencegahan peningkatan E_{maks} melalui jalur pencegahan peningkatan MDA ($p<0.012$) dan penurunan pD_2 melalui jalur langsung ($p<0.016$). Pemberian suplemen L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE dengan cara: (1) mencegah

peningkatan E_{maks} melalui pencegahan peningkatan MDA (jalur tidak langsung); dan (2) secara langsung menurunkan afinitas reseptor adrenergik- α_1 .

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Pemda TK I Kalimantan Timur dan Program Pendidikan Dokter Universitas Mulawarman. Ucapan terima kasih kepada Ka. Lab. Farmakologi DR. dr. Setyawati S Karyono, MKes atas penggunaan fasilitas Laboratoriumnya, dra. Husnul Khotimah yang membantu pelaksanaan perekaman dengan komputer McLab.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abebe, W., K. M. MacLeod. 1992. Augmented inositol phosphate production in mesenteric arteries from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 225. 29-36.
- [2] Chang, K. C., S. Y. Chung, W. S. Chong, J. S. Suh, S. H. Kim, H. K. Noh, B. W. Seong, H. J. Ko, K. W. Chun. 1993. Abstrak: Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 7. 992-1000.
- [3] Murray, P., B. Pitt, R. C. Webb. 1994. Abstrak: Ramipril prevents hypersensitivity to phenylephrine in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.* 37. 664-70.
- [4] Harris, K. H., K. M. MacLeod. 1988. Abstrak: Influence of the endothelium on contractile responses of arteries from diabetic rats. 153. 55-64.
- [5] Dresner, L. S., S. P. Wang, M. W. West, I. N. Ponomarenko, C. M. Mueller, R. B. Wait. 1997. Abstrak: Nitric oxide inhibition stimulates the enhancement of α_1 agonist-induced vasoconstriction in diabetes. *J. Surg. Res.* 70. 119-23.
- [6] Fleischhacker, E., V. E. Esenabhalu, M. Spitaler, S. Holzmann, F. Skrabal, B. Koidl, G. M. Kostner, W. F. Graier. 1999. Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular Ca^{2+} distribution. *Diabetes.* 48. 1323-30.
- [7] Tesfamarian, B., R. A. Cohen. 1992. Abstrak: Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.* 263. 321-6.
- [8] Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, R. W. Alexander. 1994. Abstrak: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74. 1141-1148.
- [9] Giugliano, D., G. Paulisso, A. Ceriello. 1996. An oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetic Care.* 19. 257-267.
- [10] Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka, K. K. Griendling. 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensinII-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271. 23317-23321.
- [11] Cohen, R. A. 1997. Endothelial dysfunction in diabetic vascular disease. *Medicographia.* 19. 157-161.
- [12] Pagano, P. J., S. J. Chanock, D. A. Siwik, W. S. Colucci, J. K. Clark. 1998. Angiotensin II induces p67^{phox} mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension.* 32. 331-7.
- [13] Baynes, J. W., S. R. Thorpe. 1999. Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in diabetic complications, a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48. 1-9.
- [14] Laight, D. W., M. J. Carrier, E. E. Anggard. 2000. Antioxidant, diabetes and endothelial dysfunction. *Elsevier Cardiovas. Res.* 47. 457-464.
- [15] Touyz, R. M., E. L. Schiffrin. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 52. 639-672.
- [16] Hink, U., H. Li, H. Mollnau, M. Oelze, E. Matheis, M. Hartmann, M. Skatchkov, F. Thaiss, R. A. K. Sthal, A. Warnholtz, T. Meinertz, K. Griendling, D. G. Harrison, U. Forstermann, T. Munzel. 2001. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 88. 14-22.
- [17] Cai, H., D. G. Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87. 840-844.
- [18] Mather, T. J. 2000. L-arginine. In: Continuing Education Module. New Hope Institute of Retailing.
- [19] Ogonowski, A. A., W. H. Kaesemeyer, L. Jin, V. Ganapathy, F. H. Leibach, R. W. Caldwell. 2000. Effects of NO donors and synthase agonist on endothelial cell uptake of L-arg

- and superoxide production. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278. C136-143.
- [20] Govers, R., and T.J. Rabelink. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280. F193-206.
- [21] Mans, A. M., R. DeJoseph, D. W. Davis, R. A. Hawkins. 1987. Abstrak: Regional amino acid transport into brain during diabetes: effect of plasma amino acids. *Am. J. Physiol.* 253. 575-583.
- [22] Pierce, G. N., R. E. Beamish, N. S. Dhalla. 1988. Heart dysfunction in diabetes. In: Reaserch Models of Diabetes Mellitus. CRC Press Inc, Florida. 2. 23-50.
- [23] Pieper, G. M., L. A. Dondlinger. 1997. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acut arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283. 684-691.
- [24] Hagenfeldt, L., G. Dahlquest, B. Persson. 1989. Abstrak: Plasma amino acids in relation to metabolic control in insulin-dependent diabetic children. *Acta Pediatr. Scand.* 794. 278-282.
- [25] Grill, V., O. Björkman, M. Gutniak, M. Lindqvist. 1992. Abstrak: Brain uptake and release of amino acids in non diabetic and insulin-dependent diabetic subjects: important role of glutamine release for nitrogent balance. *Metabolism.* 41. 28-32.
- [26] Nurdiana. 1993. Efek asetilkolin pada kolon tikus dengan diabetes mellitus. Tesis. Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- [27] Abebe, W., Harris, K. H., Macleod, K. M., 1990. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to α_1 -adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16(2). 239-248.
- [28] Salimudin, K. C. Upadhyaya, N. Z. Baquer, 1999. Abstrak: Effect of vanadate on expression of liver arginase in experimental diabetic rats. *IUBMB Life.* 48(2).
- [29] Salimudin, K. C. Upadhyaya, J. Raju, N. Z. Baquer. 1999. Abstrak: Modulation of mRNA levels of liver arginase by insulin and vanadate in experimental diabetes. *Indian Biochem Biophys.* 36(2).
- [30] Bivalacqua, T. J., W. J. Hellstrm, P. J. Kadowitz, H. C. Champion. 2001. Abstrak: Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 283(4).
- [31] Graier, W. F., T. C. Wascher, L. Lackner, H. Toplak, G. J. Krejs, W. R. Kukovetz. 1993. Exposure to elevated D-glucose concentrations modulates vascular endothelial cell vasodilatory response. *Diabetes.* 42. 1497-1505.
- [32] Kikuta, K-I., T. Sawamura, S. Miwa, M. Hashimoto, M. Masaki. 1998. High-affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine. *Circ. Res.* 83. 1088-1096.
- [33] Posch, K., S. Simecek, T. C. Wascher, G. Jürgens, S. Baumgartner-Parzer, G. M. Kostner, W. F. Graier. 1999. Glycated low-density lipoprotein attenuates shear stress-induced nitric oxide synthesis by inhibition of shear stress-activated L-arginine uptake in endothelial cells. *Diabetes.* 48. 1331-1337.
- [34] Posch, K., W. F. Graier. 1999. Selective stimulation of L-arginine uptake contributes to shear stress-induced formation of nitric oxide. *Life Sci.* 64. 663-670.
- [35] Loscalzo, J. 2000. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation.* 101. 2126-2129.
- [36] Wever, R. M. F., T. VanDam, H. J. VanRijn, F. DeGroot, T. J. Rabelink. 1997. Abstrak: Tetrahydrobiopterine regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273. 340-344.
- [37] Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo, K.A. Pritchard. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95. 9220-9225.
- [38] Lefkowitz, R. J., S. Cotecchia, P. Samama, T. Costa. 1993. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14. 303-307.
- [39] Han, C., J. Li., K. P. Minneman. 1990. Subtypes of α_1 -adrenoreceptor in rat blood vessel. *Eur. J. Pharmacol.* 190. 97-104.
- [40] Aboud, R., M. Shafi, J. R. Docherty. 1993. Investigation of the subtypes of α_1 -adrenoreceptor mediating contraction of rat aorta, vas deferens and spleen. *Br. J. Pharmacol.* 109. 80-87.

- [41] Ross, E. M. 1996. Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Hardman, J. G., L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. G. Gilman (eds). Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutic, editors-in-chief by Ninth edition. International edition. McGraw-Hill. 2. 29-41.
- [42] Ghosh, M. N. 1971. Fundamental of experimental pharmacology. Scientific Book Agency, Calcuta. 4. 16-24.
- [43] Bowman, W. C., M. J. Rand. 1984. Textbook of pharmacology. Second edition. Blackwell Scientific Publication.
- [44] Zochodne, D. W., V. M. K. Verge, C. Cheng, Höke, C. Joley, K. Thomsen, I. Rubin, M. Lauritzen. 2000. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* 59. 798-807.
- [45] Ralevic, V., A. Belai, G. Burnstock. 1995. Abstrak: Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur. J. Pharmacol.* 14. 286. 193-199.
- [46] Zhu, B. H., Y. Y. Guan, J. Min, H. He. 2001. Abstrak: Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration. *Acta Pharmacol. Sin.* 22. 445-449.
- [47] Chow, W. L., L. Zhang, K. M. MacLeod. 2001. Noradrenalin-induced changes in intracellular Ca^{2+} and tension in mesenteric arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 134. 179-187.
- [48] Meier, M., G. L. King. 2000. Protein kinase C. In: LeRoith, D., S. I. Taylor, J. M. Olefsky (eds). Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Second edition. Lippincott Williams and Wilkins. 102. 1016-1027.
- [49] Kawasaki, H. 1997. Abstrak: Pharmacological studies on alterations in contractile reactivity in aortas isolated from experimental diabetic rats. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 72. 649-565.
- [50] Konishi, H., M. Tanaka, Y. Takemura, H. Matsumaki, Y. Ono, U. Kikkawa, Y. Nishizuka. 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H_2O_2 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94. 11233-11237.
- [51] Drödge, W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82. 47-95.
- [52] Head, R. J., P. A. Longhurst, R. L. Panek, R. E. Stizel. 1987. Abstrak: A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 91. 275-286.
- [53] Wolin, M.S. 2000. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20. 140-142.
- [54] Harrison, D. G. 1997. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20. 11-17.