

**PERBANDINGAN EFEK VITAMIN E DAN ASAM ROSMARINAT  
TERHADAP KADAR CYSTATIN C SERUM (SEBAGAI PENANDA  
FUNGSI GINJAL) PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**Yurike Putri**

**NIM 155070101111078**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

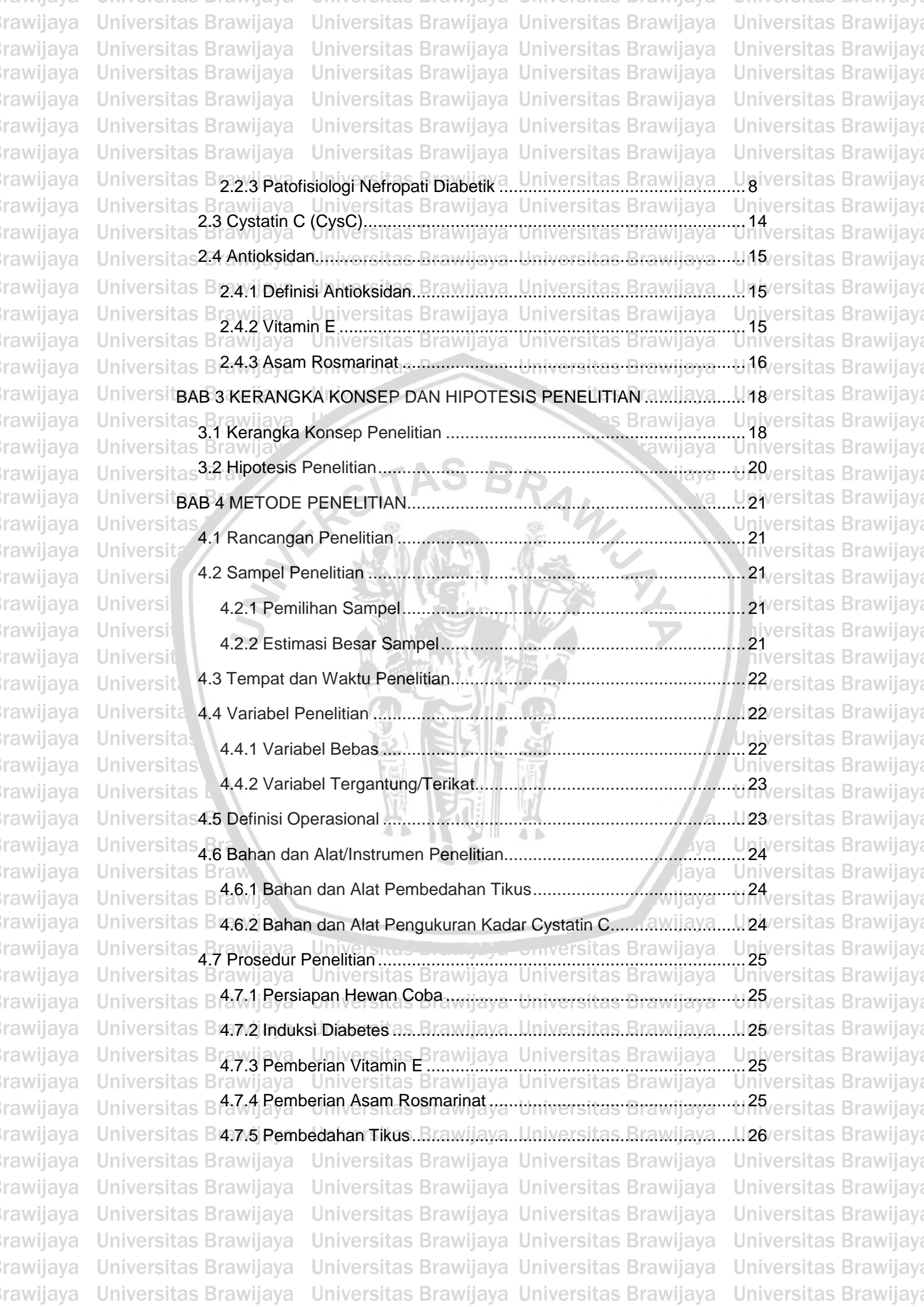
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## DAFTAR ISI

Halaman Sampul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iii
Kata Pengantar .....	iv
Abstrak .....	vi
Abstract .....	vii
Daftar isi .....	viii
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Tabel .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
Daftar Singkatan .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Akademik .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Diabetes Melitus .....	5
2.1.1 Epidemiologi Diabetes Melitus .....	5
2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus .....	6
2.2 Kerusakan Fungsi Ginjal pada Diabetes Melitus .....	8
2.2.1 Definisi Nefropati Diabetik .....	8
2.2.2 Epidemiologi Nefropati Diabetik .....	8



2.2.3 Patofisiologi Nefropati Diabetik .....	8
2.3 Cystatin C (CysC).....	14
2.4 Antioksidan.....	15
2.4.1 Definisi Antioksidan.....	15
2.4.2 Vitamin E .....	15
2.4.3 Asam Rosmarinat .....	16
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	18
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	21
4.2 Sampel Penelitian .....	21
4.2.1 Pemilihan Sampel.....	21
4.2.2 Estimasi Besar Sampel.....	21
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
4.4 Variabel Penelitian .....	22
4.4.1 Variabel Bebas .....	22
4.4.2 Variabel Tergantung/Terikat.....	23
4.5 Definisi Operasional .....	23
4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	24
4.6.1 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus.....	24
4.6.2 Bahan dan Alat Pengukuran Kadar Cystatin C.....	24
4.7 Prosedur Penelitian .....	25
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	25
4.7.2 Induksi Diabetes .....	25
4.7.3 Pemberian Vitamin E .....	25
4.7.4 Pemberian Asam Rosmarinat.....	25
4.7.5 Pembedahan Tikus.....	26

4.7.6 Evaluasi Nefropati Diabetik.....	26
4.8 Pengolahan Data.....	27
4.9 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	27
4.10 Alur Penelitian.....	28
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>29</b>
5.1 Karakteristik Sampel.....	29
5.2 Kadar Cystatin C Serum.....	30
5.3 Analisis Data.....	31
5.3.1 Uji Normalitas Data.....	32
5.3.2 Uji Homogenitas Varian.....	32
5.3.3 Uji <i>One Way</i> Anova.....	32
5.3.4 Uji <i>Post Hoc</i> LSD.....	32
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>34</b>
6.1 Kadar Cystatin C pada Tikus Diabetes Melitus.....	34
6.2 Efek Vitamin E terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus.....	35
6.3 Efek Asam Rosmarinat terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus.....	36
6.4 Perbandingan Efek Vitamin E dan Asam Rosmarinat Terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus.....	38
6.5 Keterbatasan Penelitian.....	39
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>40</b>
7.1 Kesimpulan.....	40
7.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>45</b>

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yurike Putri  
NIM : 155070101111078  
Program Studi : Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 November 2018  
Saya membuat pernyataan,



(Yurike Putri)  
NIM. 155070101111078

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

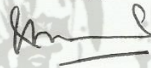
PERBANDINGAN EFEK VITAMIN E DAN ASAM ROSMARINAT  
TERHADAP KADAR CYSTATIN C SERUM (SEBAGAI PENANDA  
FUNGSI GINJAL) PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Oleh:


YURIKE PUTRI  
NIM 155070101111078

Telah diuji pada  
Hari: Rabu  
Tanggal: 28 November 2018  
dan dinyatakan lulus oleh:


Penguji-I

  
Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes  
NIP. 195909261984032003


Pembimbing-I/Penguji-II

  
dr. Nur Samsu, Sp.PD-KGH  
NIP. 196808132003121001

Pembimbing-II/Penguji-III

  
Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes  
NIP. 197511252005012001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Kedokteran,

  
dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)  
NIP. 196310221996012001

## ABSTRAK

Putri, Yurike. 2018. *Perbandingan Efek Vitamin E dan Asam Rosmarinat Terhadap Kadar Cystatin C Serum (sebagai Penanda Fungsi Ginjal) pada Tikus Model Diabetes Melitus*, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Nur Samsu, Sp.PD-KGH. (2) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes.

Peningkatan kadar cystatin C serum pada pasien diabetes dapat terjadi karena adanya stress oksidatif dalam tubuh. Stress oksidatif dapat menstimulasi sintesis dari mRNA dan protein cystatin C sebagai respon pertahanan sel dan juga menyebabkan kerusakan pada *Glomerular Filtration Barrier* pada ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum pada tikus diabetes. Vitamin E dan asam rosmarinat memiliki efek antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas menimbulkan komplikasi pada diabetes. Penelitian eksperimental ini menggunakan tikus Wistar jantan sebagai hewan coba yang terbagi dalam kelompok perlakuan tikus kontrol (K), tikus diabetes melitus (DM), tikus diabetes dengan pemberian vitamin E 400 mg/kgBB/hari (DM+Vit.E) dan tikus diabetes dengan pemberian asam rosmarinat 75 mg/kgBB/hari (DM+AR). Kadar cystatin C serum diukur setelah 7 minggu perlakuan dengan menggunakan ELISA. Analisis statistik *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc LSD* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara DM dengan DM+Vit.E dan DM+AR ( $p < 0,05$ ) dengan hasil Vitamin E dapat menurunkan kadar cystatin C sebanyak 20,55% pada tikus diabetes melitus, sedangkan asam rosmarinat dapat menurunkan kadar cystatin C sebanyak 40,37% pada tikus diabetes melitus. Sehingga dapat disimpulkan bahwa asam rosmarinat dapat menurunkan kadar cystatin C serum lebih baik dibandingkan vitamin E dengan hasil statistik adanya perbedaan yang signifikan antara keduanya.

Kata Kunci: Diabetes Melitus, Cystatin C, Vitamin E, Asam Rosmarinat.

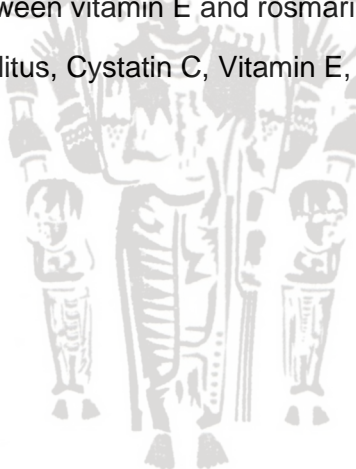


## ABSTRACT

Putri, Yurike. 2018. *Comparison of the Effects of Vitamin E and Rosmarinic Acid on Serum Cystatin C Levels (as Markers of Kidney Function) in Mice with Diabetes Mellitus*, Medical Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Advisors: (1) dr. Nur Samsu, Sp.PD-KGH. (2) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes.

Elevated serum cystatin C levels in diabetic patients can occur due to oxidative stress in the body. Oxidative stress can stimulate the synthesis of mRNA and cystatin C proteins as cell defense responses and also cause damage to the Glomerular Filtration Barrier in the kidneys. This study aims to compare the effects of vitamin E and rosmarinic acid on serum cystatin C levels in diabetic rats. Vitamin E and rosmarinic acid have antioxidant effects that can inhibit free radicals causing complications in diabetes. This experimental study used male Wistar rats as experimental animals which were divided into treatment groups of control rats (K), diabetic mellitus rats (DM), diabetic rats with administration of vitamin E 400 mg / kgBB / day (DM + Vit.E) and diabetic rats with the administration of rosmarinic acid 75 mg / kgBB / day (DM + AR). Serum cystatin C levels were measured after 7 weeks of treatment using ELISA. One Way ANOVA statistical analysis and Post Hoc LSD test showed a significant difference between DM with DM + Vit.E and DM + AR ( $p < 0.05$ ) with the results of Vitamin E can reduce cystatin C levels by as much as 20.55% in mice diabetes mellitus, while rosmarinic acid can reduce cystatin C levels by 40.37% in diabetic mellitus rats. So it can be concluded that rosmarinic acid can reduce serum cystatin C levels better than vitamin E with statistical results of a significant difference between vitamin E and rosmarinic acid.

**Keywords:** Diabetes Melitus, Cystatin C, Vitamin E, Rosmarinic Acid.





## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Pada tahun 2017 data *International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas 8<sup>th</sup> Edition* menyatakan bahwa penderita diabetes mencapai 425 juta jiwa di dunia dengan rentang usia 20 – 79 tahun. Sedangkan data penderita diabetes di dunia dengan rentang usia 18 – 99 tahun mencapai 451 juta jiwa (IDF, 2017).

Berdasarkan data di United State, 40% penderita diabetes akan mengalami *chronic kidney disease (CKD)* yang biasanya disebut dengan *diabetic kidney disease (DKD)* / nefropati diabetik (Dean, 2012 **dalam** IDF, 2017). Nefropati diabetik merupakan suatu komplikasi *microvascular* pada penderita diabetes selain *diabetic eye disease (DED)* dan *nerve damage (neuropathy) and diabetic foot* (IDF, 2017).

Berdasarkan *National Kidney Foundation (NFK/KDOQI)* tahun 2002 dan *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)* tahun 2004, pada penderita *diabetic kidney disease (DKD)* biasanya mengalami *chronic kidney disease (CKD)* yang diisyaratkan dengan adanya penurunan fungsi ginjal yang ditandai dengan *glomerular filtration rate (GFR)* kurang dari 60 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup> atau penurunan fungsi ginjal selama lebih dari 3 bulan. GFR merupakan penanda paling penting pada fungsi ginjal. Pengukuran GFR dapat dilakukan dengan mudah menggunakan kadar cystatin C (CysC) sebagai *marker* filtrasi ginjal (Lopez-Giacoman & Madero, 2015).

Peran utama pada *diabetic kidney disease* (DKD) / nefropati diabetik ditentukan oleh stress oksidatif (Miranda-Diaz *et al.*, 2016). Apabila kandungan radikal bebas terlalu tinggi, maka antioksidan endogen tidak mampu mengatasi efek radikal bebas, sehingga dapat memicu terjadinya stress oksidatif (Swastika *et al.*, 2013). Hiperglikemia yang berlangsung secara terus-menerus dan peningkatan *advanced glycation end products* (AGEs) menyebabkan *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan peningkatan inflamasi kronis dan hipertrofi glomerulus dan tubulus ginjal pada akhirnya terjadi penurunan fungsi ginjal (Bolignano *et al.*, 2017). ROS dapat menyebabkan penurunan jaringan pada proses degenarasi dan pada beberapa penyakit seperti diabetes (Sotnikova *et al.*, 2015). Akumulasi data terbaru mengindikasikan bahwa antioksidan dapat memberikan manfaat yang berarti pada pasien DKD, mencakup mereduksi albumin dalam urin, ekskresi protein total dan menormalkan nilai GFR (Bhattacharjee *et al.*, 2016).

Vitamin E mempunyai peran protektif terhadap *arteriolar hyalinisation* pada ginjal yang bisa menjadi suatu indikator terhadap nefropati diabetik (Burchfiel *et al.*, 1997 **dalam** Rashid *et al.*, 2015). Pada tikus yang mengalami diabetes, vitamin E dapat menghambat hipertrofi glomerulus pada ginjal (Kim *et al.*, 2000). Vitamin E sebagai antioksidan larut lemak, menjadi antioksidan utama dalam membran sel dengan cara melindungi komponen membran sel dari oksidasi radikal bebas (Uboh *et al.*, 2009). Vitamin E dapat mengekspresikan dua fungsi penting dalam membran yaitu sebagai antioksidan larut lemak untuk mencegah penurunan *reactive oxygen species* (ROS) pada asam lemak tak jenuh ganda dan bertindak sebagai agen penstabil membran. Vitamin E juga

berperan dalam pemecahan rantai antioksidan, dengan cara mencegah ROS merusak membran sel (Uboh *et al.*, 2012).

Asam rosmarinat merupakan suatu senyawa ester pada *caffeic acid* dengan 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid (Sotnikova *et al.*, 2015). Asam rosmarinat merupakan komponen phenol yang selektif untuk menghambat nefropati diabetik karena memiliki manfaat sebagai antioksidan, anti inflamasi, mereduksi NFKB dan meningkatkan glutathion transferase (Tavafi *et al.*, 2010). Pada tikus yang mengalami nefropati diabetik setelah diinjeksi dengan streptozotocin (STZ), penggunaan asam rosmarinat sebagai agen yang memiliki efek protektif terhadap ginjal dapat memperbaiki penurunan fungsi ginjal (Jiang *et al.*, 2012).

Selain itu, asam rosmarinat juga dapat menghambat hipertrofi glomerulus ginjal, mereduksi glomerulosklerosis secara signifikan dan mencegah peningkatan serum urea serum kreatinin pada tikus diabetes (Tavafi *et al.*, 2011).

Saat ini belum ada penelitian yang membandingkan antara efek vitamin E dan asam rosmarinat sebagai terapi terhadap penurunan fungsi ginjal pada penderita Diabetes Melitus. Meningkatnya kejadian Diabetes Melitus yang diiringi dengan komplikasi berupa *diabetic kidney disease* (DKD) serta masih belum adanya terapi yang tepat mendorong penulis untuk melakukan penelitian mengenai perbandingan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap penurunan fungsi ginjal yang diukur dengan cystatin C pada tikus model Diabetes Melitus.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah asam rosmarinat memiliki efek lebih baik dibandingkan vitamin E terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengidentifikasi asam rosmarinat memiliki efek lebih baik dibandingkan vitamin E terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui efek vitamin E terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus.
2. Mengetahui efek asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus.
3. Mengetahui perbandingan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus untuk pengembangan ilmu dan penelitian dalam bidang kesehatan terkait efek pemberian vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus dengan Diabetes Melitus.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Diketuinya perbandingan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) diharapkan dapat dijadikan landasan teori sebagai alternatif pilihan untuk terapi maupun pencegahan terhadap Diabetes Melitus.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Melitus

##### 2.1.1 Epidemiologi Diabetes Melitus

International Diabetes Federation dalam IDF Diabetes Atlas 8<sup>th</sup> Edition menyatakan bahwa penderita diabetes melitus di dunia pada tahun 2017 sebanyak 425 juta jiwa dengan rentang usia 20 – 79 tahun, sedangkan jumlah penderita diabetes melitus dengan rentang usia 18 – 99 tahun meningkat menjadi 451 juta jiwa. Berdasarkan data tersebut, sebanyak 212,4 juta jiwa dengan rentang usia 20 - 79 tahun di dunia yang terkena diabetes tidak peduli dengan keadaannya (IDF, 2017). Apabila tidak ada tindakan pencegahan terhadap diabetes melitus, maka pada tahun 2045 diperkirakan jumlah penderitanya meningkat menjadi 693 juta jiwa dengan rentang usia 18 – 99 tahun dan 629 juta jiwa dengan rentang usia 20 – 79 tahun (IDF, 2017).

Indonesia dengan jumlah penderita diabetes melitus sebanyak 10,3 juta jiwa pada tahun 2017 menempati posisi ke-6 penderita diabetes melitus terbanyak di dunia (IDF, 2017). Jumlah penderita diabetes di Indonesia yang mencapai angka 10,3 juta jiwa tersebut terdapat 0,5 juta atau 500 ribu jiwa yang menderita diabetes tapi tidak terdiagnosis / *undiagnosed diabetes* (IDF, 2017).

Pada tahun 2045, penderita diabetes melitus di Indonesia diperkirakan akan meningkat menjadi 16,7 juta jiwa apabila tidak ada tindakan pencegahan yang dilakukan (IDF, 2017).

## 2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus

### 2.1.2.1 Diabetes Melitus Tipe 1

Diabetes melitus tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun yang menyebabkan gangguan pada sistem imun tubuh sehingga menimbulkan kerusakan pada produksi sel  $\beta$  (beta) pankreas (IDF, 2017). Diabetes melitus tipe 1 dapat ditentukan dengan adanya satu atau lebih *marker* autoimun pada tubuh yang meliputi sel autoantibodi pankreas dan autoantibodies to GAD (GAD65), insulin, the tyrosine phosphatases IA-2 and IA-2b, dan ZnT8 (ADA, 2017). Proses kerusakan sel  $\beta$  pankreas diperkirakan karena kombinasi dari kerusakan genetik dan pengaruh lingkungan seperti infeksi virus, toksin atau faktor diet yang juga terlibat (You & Henneberg, 2016). Tingkat kerusakan sel  $\beta$  pankreas sangat bervariasi, kerusakan sel  $\beta$  yang cepat pada umumnya dialami oleh bayi dan anak-anak, sedangkan kerusakan sel  $\beta$  yang lambat pada umumnya dialami oleh orang dewasa (ADA, 2017).

Diabetes melitus tipe 1 biasanya disebut *insulin-dependent diabetes* atau *juvenile-onset diabetes* karena penderitanya membutuhkan injeksi insulin secara rutin untuk mempertahankan kadar gula darah dalam kondisi normal dan penderita tersebut tidak akan bisa bertahan apabila tanpa insulin (ADA, 2017; IDF, 2017). Penderita diabetes melitus tipe 1 dapat hidup sehat dan dapat mencegah beberapa komplikasi dari diabetes apabila menerapkan terapi insulin secara rutin, keadaan kadar gula darah selalu terkontrol serta selalu mempertahankan pola diet dan pola hidup yang sehat (IDF, 2017).

### 2.1.2.2 Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes melitus tipe 2 merupakan kasus yang sering terjadi pada diabetes dengan persentase 90% pada seluruh penderita diabetes (Holman *et al.*,

2015). Diabetes melitus tipe 2 umumnya terjadi pada orang dewasa, namun saat ini kejadiannya sangat meningkat pada usia anak-anak dan remaja (IDF, 2017).

Pada diabetes melitus tipe 2, hiperglikemia terjadi karena produksi insulin yang tidak adekuat dan ketidakmampuan tubuh untuk merespon insulin / resistensi insulin (IDF, 2017). Gejala yang dialami oleh penderita diabetes melitus tipe 2 seperti gejala pada diabetes melitus tipe 1 yaitu polifagi, polidipsi, poliuri, luka yang sembuhnya lama, keadaan tubuh yang mudah lelah dan sering mengalami mati rasa pada tangan atau kaki. Namun, gejala pada penderita diabetes melitus tipe 2 biasanya jarang terdeteksi pada awal waktu perjalanan penyakit, sehingga penderita mengetahui penyakit tersebut setelah adanya komplikasi hiperglikemia seperti ulkus pada kaki, gangguan penglihatan, infeksi dan kerusakan ginjal (IDF, 2017).

Penyebab diabetes melitus tipe 2 berhubungan erat dengan *overweight* dan obesitas, usia, sedikitnya aktivitas fisik dan riwayat keluarga. Selain dari itu, sering mengonsumsi makanan yang manis atau makanan yang mengandung gula tinggi dapat meningkatkan resiko terkena diabetes melitus tipe 2 (Imamura *et al.*, 2015). Pada diabetes melitus tipe 2, selain mengontrol kadar glukosa darah diperlukan juga untuk mengontrol tekanan darah dan melakukan screening secara rutin agar dapat mengurangi resiko seperti retinopati, ulkus pada kaki dan kerusakan ginjal / nefropati diabetik (IDF, 2017).

### **2.1.2.3 Gestational Diabetes Melitus**

*Gestational diabetes melitus* merupakan keadaan hiperglikemia yang terdeteksi pertama kali pada masa kehamilan (IDF, 2017). Sebanyak 75 – 90% kasus tingginya glukosa darah pada masa kehamilan merupakan diabetes gestasional (Guariguata *et al.*, 2014). Wanita yang mengalami hiperglikemia

selama masa kehamilan dapat mengontrol kadar gula darahnya dengan cara selalu mempertahankan kadar gula darah normal, melakukan diet sehat dan sering melakukan aktivitas fisik agar dapat mencegah komplikasi terhadap ibu maupun janinnya (IDF, 2017).

## **2.2 Kerusakan Fungsi Ginjal pada Diabetes Melitus**

### **2.2.1 Definisi Nefropati Diabetik**

Nefropati diabetik merupakan kondisi penderita diabetes yang mengalami komplikasi *microvascular* pada ginjal berupa *chronic kidney disease* (CKD) atau *end-stage renal disease* (ESRD) (IDF, 2017).

### **2.2.2 Epidemiologi Nefropati Diabetik**

Berdasarkan data dari United Kingdom, satu dari lima orang menderita diabetes dan data dari United States menyatakan bahwa 40% dari orang yang menderita diabetes akan mengalami *chronic kidney disease* (CKD) dengan 19% penderita pada stadium 3 atau lebih (Dean, 2012). Pengumpulan data dari 54 negara menyatakan lebih dari 80% kasus *end-stage renal disease* (ESRD) disebabkan oleh diabetes, hipertensi atau kombinasi diabetes dan hipertensi. Proporsi diabetes terhadap kejadian ESRD bervariasi antara 12 – 55 %. Prevalensi ESRD tersebut pada penderita diabetes meningkat 10 kali lipat lebih tinggi (USRDS, 2014).

### **2.2.3 Patofisiologi Nefropati Diabetik**

Diabetes merupakan suatu sindrom hiperglikemia / kelebihan glukosa darah. Pada diabetes melitus tipe 2 yang merupakan diabetes tipe *insulin resistance* ini produksi insulin dalam tubuh tidak adekuat sehingga tubuh tidak dapat merespon keadaan hiperglikemia (IDF, 2017). Pada saat tubuh dalam kondisi hiperglikemia, terjadi peningkatan reactive oxygen species (ROS) secara



signifikan yang berperan penting terhadap patogenesis munculnya stres oksidatif dan komplikasi diabetes. ROS merupakan suatu molekul radikal bebas yang termasuk dalam molekular oksigen dan terbagi menjadi superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $HO^\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), peroxyxynitrite ( $ONOO^-$ ), hypochlorous acid (HOCl), nitric oxide (NO) dan lipid radicals. Jumlah ROS yang berlebihan dalam tubuh, dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai mekanisme pertahanan antioksidan endogen, mengoksidasi berbagai biomolekul jaringan seperti DNA, protein, karbohidrat dan lipid (Forbes *et al.*, 2008).

Keadaan tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif dalam tubuh. Stres oksidatif dianggap sebagai faktor umum dan utama yang menyebabkan hiperglikemia dengan komplikasi vaskular melalui dua mekanisme, yaitu modifikasi metabolik dari molekul jaringan target dan perubahan hemodinamik ginjal. Adanya hipertrofi glomerulus, penebalan pada *basement membrane*, ekspansi mesangial, artrofi tubulus ginjal, interstitial fibrosis dan penebelan pembuluh darah yang secara umum merupakan kerusakan fungsi ginjal dan termasuk dalam komplikasi microvascular dari diabetes yang disebut dengan nefropati diabetik (Kashihara *et al.*, 2013).

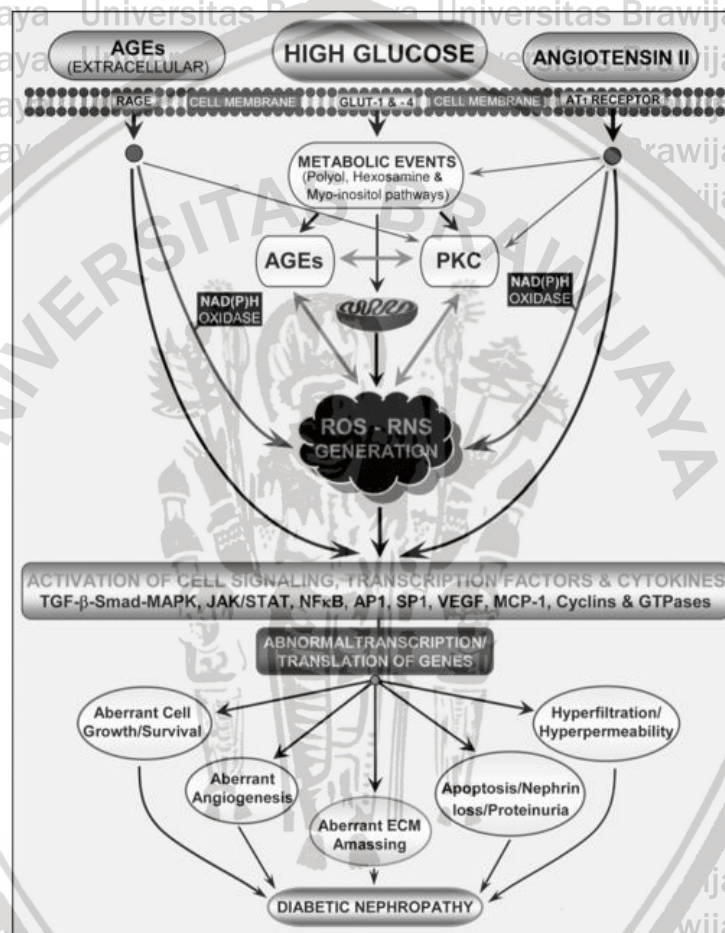
Hiperfiltrasi glomerulus merupakan penanda awal dari nefropati diabetik. *Glomerular filtration rate* (GFR) terjaga dengan baik bahkan selama fluktuasi tekanan darah sistemik oleh mekanisme autoregulasi yang beroperasi pada tingkat arterioler aferen glomerulus, yang membuat penyesuaian pada tekanan transmural intraglomerular. Menggunakan teknik mikropuncture untuk mengukur tekanan intra-glomerulus, Brenner *et al* menjelaskan bahwa mekanisme autoregulator terganggu dan tekanan kapiler glomerulus meningkat dalam berbagai model penyakit termasuk pada diabetes. Hiperglikemia merusak

penyesuaian autoregulator di arteriol aferen melalui banyak mekanisme, sehingga renal plasma flow (RPF) dan GFR meningkat drastis. Pertama, efek ini dihapuskan dengan pengobatan furosemid sehingga perubahan hemodinamik yang disebabkan oleh hiperglikemia dimediasi melalui umpan balik tubuloglomerular. Kedua, gangguan pada voltage-gated L-type  $Ca^{2+}$  channels dan sintesis eikosanoid dapat mengganggu respon myogenik arteriol aferen pada diabetes. Ketiga, hiperglikemia mengaktifkan *renin-angiotensin system* (RAAS), khususnya pada jaringan yang mengakibatkan vasokonstriksi arteriol eferen. Oleh karena yang terakhir lebih sensitif terhadap efek vasokonstriksi Ang II daripada arteriol aferen, pada akhirnya hal ini akan menyebabkan hipertensi intraglomerular dan peningkatan tekanan kapiler. Perubahan ini diperbaiki oleh inhibitor enzim *angiotensin converting enzyme* (ACE) sebagai agen penghambat RAAS dan *Ang II receptor blocker* (ARB). Efek protektif ginjal dari inhibitor ini telah didokumentasikan dengan baik oleh micropuncture studies pada hewan dengan mengamati penurunan tekanan intraglomerular (Kashihara *et al.*, 2013). Efek protektif ginjal dari inhibitor ACE telah dijelaskan dalam berbagai studi klinis, yang mengamati penurunan proteinuria tanpa perubahan signifikan pada tekanan darah sistemik (Kashihara *et al.*, 2013). Demikian juga dengan ARB yang mengurangi peningkatan kreatinin dan tingkat proteinuria, menghambat penurunan GFR dan proses *end-stage renal disease* (ESRD) pada pasien dengan diabetes melitus tipe 2 (Kashihara *et al.*, 2013). Adanya pengurangan ekskresi angiotensinogen urin setelah pemberian ARB sebagai penanda stres oksidatif dan sitokin inflamasi pada pasien dengan nefropati diabetik tipe 2 (Ogawa *et al.*, 2009). Walaupun penghambatan RAAS menggunakan efek protektif ginjal, *plasma renin activity* (PRA) tetap rendah pada

pasien diabetes. Meskipun demikian RAAS jaringan ginjal lokal telah terbukti tidak proporsional diaktifkan pada diabetes (Kashihara *et al.*, 2013).

Penyebab utama dan mekanisme yang tepat untuk aktivasi RAAS secara lokal pada diabetes belum sepenuhnya dijelaskan, namun RAAS lokal diatur secara independen dari RAAS sistemik. Dalam hal ini, sel intrinsik glomerulus seperti sel mesangial dan podosit dapat mengekspresikan reseptor Ang II dan AT1. Reseptor ini dapat menyebabkan aktivasi RAAS lokal dengan adanya kerusakan akibat tekanan mekanis dengan penekanan dan pelepasan hiperglikemia memediasi stres oksidatif atau glikolisis pada ginjal (Kashihara *et al.*, 2013). Sehubungan dengan sel mesangial, penelitian oleh Kagami *et al.* yang dilakukan lebih dari dekade yang lalu menunjukkan bahwa sel-sel ini merespons stimulasi Ang II dengan produksi berbagai protein ECM yang berlebihan melalui induksi TGF- $\beta$ , sitokin fibrogenik poten yang memperberat genesis pada lesi glomerulus yang terlihat pada penderita diabetes nefropati (Kagami *et al.*, 1994 **dalam** Kashihara *et al.*, 2013). Liebau *et al.* melaporkan bahwa podosit manusia mengekspresikan semua komponen RAAS untuk menghasilkan Ang II (Liebau *et al.*, 2006). Mereka juga menunjukkan bahwa Ang II menginduksi peningkatan konsentrasi pada sitratolik  $Ca^{2+}$  melalui reseptor AT1 pada podosit, namun Ang II oleh podosit ini tidak dipengaruhi oleh stres mekanis atau inhibitor ACE, renin ataupun dari signal kinase lainnya. Meskipun telah dinyatakan bahwa tingkat aktivitas renin plasma (PRA) rendah pada pasien diabetes, namun secara mengejutkan tingkat prorenin teridentifikasi tinggi, menunjukkan prorenin: interaksi reseptor (pro)renin dapat memainkan peran penting dalam patofisiologi berbagai komplikasi pada diabetes (Ichihara *et al.*, 2008). Interaksi reseptor merangsang jalur sinyal intraselular, termasuk fosforilasi

dan pengaktifan extracellular signal-regulated kinases 1 dan 2 (ERK1 / 2) dapat meningkatkan stres oksidatif. RAAS telah terbukti terlibat dalam mencetuskan stres oksidatif serta perubahan hemodinamik (beban tekanan kapiler) dan stres oksidatif berpengaruh terhadap perkembangan nefropati diabetik (Kashihara *et al.*, 2013).



**Gambar 2.1 Skematik Patofisiologis Nefropati Diabetik (Tavafi, 2013)**

Pada diabetes, stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada *Glomerular Filtration Barrier* (GFB) yang terdiri dari sel endothelial glomerular, *basement membrane* dari glomerular dan podosit. Semua komponen tersebut akan mengalami perubahan pada diabetes yang menyebabkan perubahan pada

struktur maupun fungsi filtrasi dari ginjal dan menyebabkan perubahan permeabilitas terhadap makro molekul. GFB berfungsi untuk memfiltrasi molekul-molekul protein pada ginjal seperti albumin dan cystatin C. Pada keadaan fisiologi normal, GFB dapat memfiltrasi secara bebas molekul kecil ( $\leq 40$  kDa) dan akan merestriksikan molekul yang besar ( $\geq 100$  kDa) (Vallon dan Komers, 2011).

Cystatin C termasuk suatu protein yang bebas terfiltrasi dan dapat menentukan keadaan fungsi ginjal terutama dapat dilihat dari GFR seseorang.

Disfungsi dari ginjal ditandai dengan rendahnya nilai GFR berhubungan dengan diabetes nefropati yang disebabkan oleh resistensi insulin, peningkatan glukoneogenesis pada ginjal, disfungsi endothelial atau inflamasi kronis, aktivasi sistem renin-angiotensin dan adanya stress oksidatif (Sahakyan *et al.*, 2011).

Cystatin C lebih bermuatan positif sewaktu berada diglomerulus, sehingga mudah melewati membran basalis yang bermuatan negatif, serta berat molekulnya yang rendah dapat difiltrasi secara bebas oleh glomerulus. Cystatin C direabsorpsi oleh tubulus proximal dan tidak disekresi, tetapi mengalami katabolisme hampir lengkap (99%) oleh sel tubulus proksimal sehingga tidak ada yang kembali ke darah. Apabila kadar cystatin C terdapat dalam darah, maka dapat menggambarkan nilai abnormal GFR dan dapat dikatakan mendekati penanda GFR endogen yang ideal (Yaswir & Maiyesi, 2012).

Stress oksidatif dapat menstimulasi sintesis dari mRNA dan protein cystatin C sebagai respon pertahanan sel. Tingginya kadar serum cystatin C berhubungan dengan keadaan inflamasi kronis dan disfungsi endothelial dapat menyebabkan kerusakan pada ginjal pasien diabetes yang dapat berkembang menjadi nefropati diabetik. Pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi nefropati diabetik, terdapat penurunan dari fungsi ginjal pasien yang dapat dilihat

dari meningkatnya kadar serum cystatin C. Adanya peningkatan kadar serum cystatin C dikarenakan GFR menurun yang mengindikasikan terjadinya penurunan fungsi filtrasi glomerulus (Sahakyan *et al.*, 2011).

### 2.3 Cystatin C (CysC)

*Glomerular filtration rate* (GFR) merupakan volume total cairan yang tersaring dari kapiler glomerulus hingga ke kapsula Bowman dalam per unit waktu. Mengestimasi nilai GFR diperlukan cystatin C (CysC) sebagai *marker* filtrasi pada ginjal. Pada beberapa penelitian terbaru, nilai timbal balik yang dihasilkan oleh cystatin C memiliki relasi yang lebih baik terhadap GFR daripada serum kreatinin (SCr) (Lopez-Giacoman & Madero, 2015).

Cystatin C adalah suatu protein non-glycosylated dengan berat molekul rendah (13kD) yang diproduksi oleh seluruh sel yang berinti dan ditemukan pada berbagai cairan tubuh manusia (Lopez-Giacoman & Madero, 2015). Cystatin C berfungsi sebagai pengatur aktivitas proteolitik dari protease sistein yang disekresikan atau bocor dari lisosom sel yang mati atau sel yang rusak. Keseimbangan antara protease sistein dan inhibitorynya sangat penting dalam pengaturan aktivitas proteolitik pada kondisi fisiologis normal, maupun dalam degradasi protein patologis dan penyakit keganasan (Yaswir & Maiyesi, 2012).

Cystatin C difiltrasi bebas oleh glomerulus dan tidak disekresi, kemudian direabsorpsi tetapi mengalami katabolisme hampir lengkap oleh sel epitel tubulus proksimal ginjal, sehingga tidak ada yang kembali ke darah (Shlipak *et al.*, 2013).

Menurut Shlipak *et al* pada tahun 2013, nilai cystatin C sangat penting terhadap mortalitas yang berhubungan dengan rentangan GFR, termasuk menentukan seseorang terkena *preclinic kidney disease* yang memiliki rentangan nilai GFR antara 60 sampai 90 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup>. Cystatin C tidak dipengaruhi oleh masa

otot dan lebih baik dalam memperhitungkan nilai GFR secara konsisten yang berhubungan dengan hasil lebih akurat daripada perhitungan menggunakan SCr eGFR (Shlipak *et al.*, 2013).

## 2.4 Antioksidan

### 2.4.1 Definisi Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa, sedangkan secara biologis pengertian antioksidan adalah semua senyawa yang dapat menghilangkan dampak negatif oksidan termasuk dalam penghambatan dan penghentian kerusakan oksidatif terhadap suatu molekul target (Simanjuntak & Sudaryati, 1998 *dalam* Setiawan & Suhartono, 2005).

Definisi antioksidan menurut *Panel on Dietary Antioxidant and Related Compounds of The Food and Nutrition Board* adalah suatu bahan yang secara bermakna mampu mengurangi dampak buruk senyawa oksigen reaktif, senyawa nitrogen reaktif atau keduanya atau keduanya dalam kondisi fungsi fisiologis normal manusia (Carr & Frei, 1999 *dalam* Setiawan & Suhartono, 2005).

Penderita diabetes membutuhkan asupan antioksidan dalam jumlah besar karena peningkatan radikal bebas akibat hiperglikemia (Baynes & Thorpe, 1999 *dalam* Setiawan & Suhartono, 2005).

### 2.4.2 Vitamin E

Vitamin E terdiri dari 4 molekul tokoferol yaitu  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol, dan  $\gamma$ -tokoferol. Banyak penelitian fokus kepada  $\alpha$ -tokoferol karena molekul utama dari vitamin E yang banyak terdapat pada jaringan adalah  $\alpha$ -tokoferol (Jiang, 2014).

Vitamin E sebagai antioksidan larut lemak, menjadi antioksidan utama dalam membran sel dengan cara melindungi komponen membran sel dari

oksidasi radikal bebas (Uboh *et al.*, 2009). Reaktivitas hidrogen phenolik pada C-6 kelompok hidroksil  $\alpha$ -tokoferol akan menstabilkan elektron tidak berpasangan pada radikal bebas (Combs, 2008). Vitamin E dapat mengekspresikan dua fungsi penting dalam membran yaitu sebagai antioksidan larut lemak untuk mencegah kerusakan *reactive oxygen species* (ROS) pada asam lemak tak jenuh ganda dan bertindak sebagai agen penstabil membran. Vitamin E juga berperan dalam pemecahan rantai antioksidan, dengan cara mencegah ROS merusak membran sel (Uboh *et al.*, 2012). Vitamin E dapat menghambat dan mengurangi pembentukan radikal bebas dengan menyumbangkan hidrogen dari gugus hidroksil (OH-) ke radikal bebas sehingga membuat radikal bebas menjadi tidak aktif (Roziana *et al.*, 2015). Vitamin E mempunyai peran protektif terhadap *arteriolar hyalinisation* pada ginjal yang bisa menjadi suatu indikator terhadap nefropati diabetik (Burchfiel *et al.*, 1997 **dalam** Rashid *et al.*, 2015). Pada tikus yang mengalami diabetes, vitamin E dapat menghambat hipertrofi glomerulus pada ginjal (Kim *et al.*, 2000).

#### **2.4.3 Asam Rosmarinat**

Asam rosmarinat merupakan suatu senyawa ester pada *caffeic acid* dengan 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid (Sotnikova *et al.*, 2015). Terdapat empat hidrogen fenolik yang memiliki kemampuan untuk memodulasi *scavenging* radikal bebas, dalam kombinasi dengan dua catechol moieties yang memberikan polaritas sesuai untuk asam rosmarinat dalam menembus lapisan ganda lipid dan melindunginya terhadap oksidasi tanpa mengganggu strukturnya.

Investigasi elektrokimia telah mengungkapkan bahwa langkah oksidasi pertama dikaitkan dengan bagian asam caffeic, sedangkan langkah oksidasi kedua sesuai dengan oksidasi residu asam laktat 3,4-dihydroxyphenyl. Adanya kombinasi dari

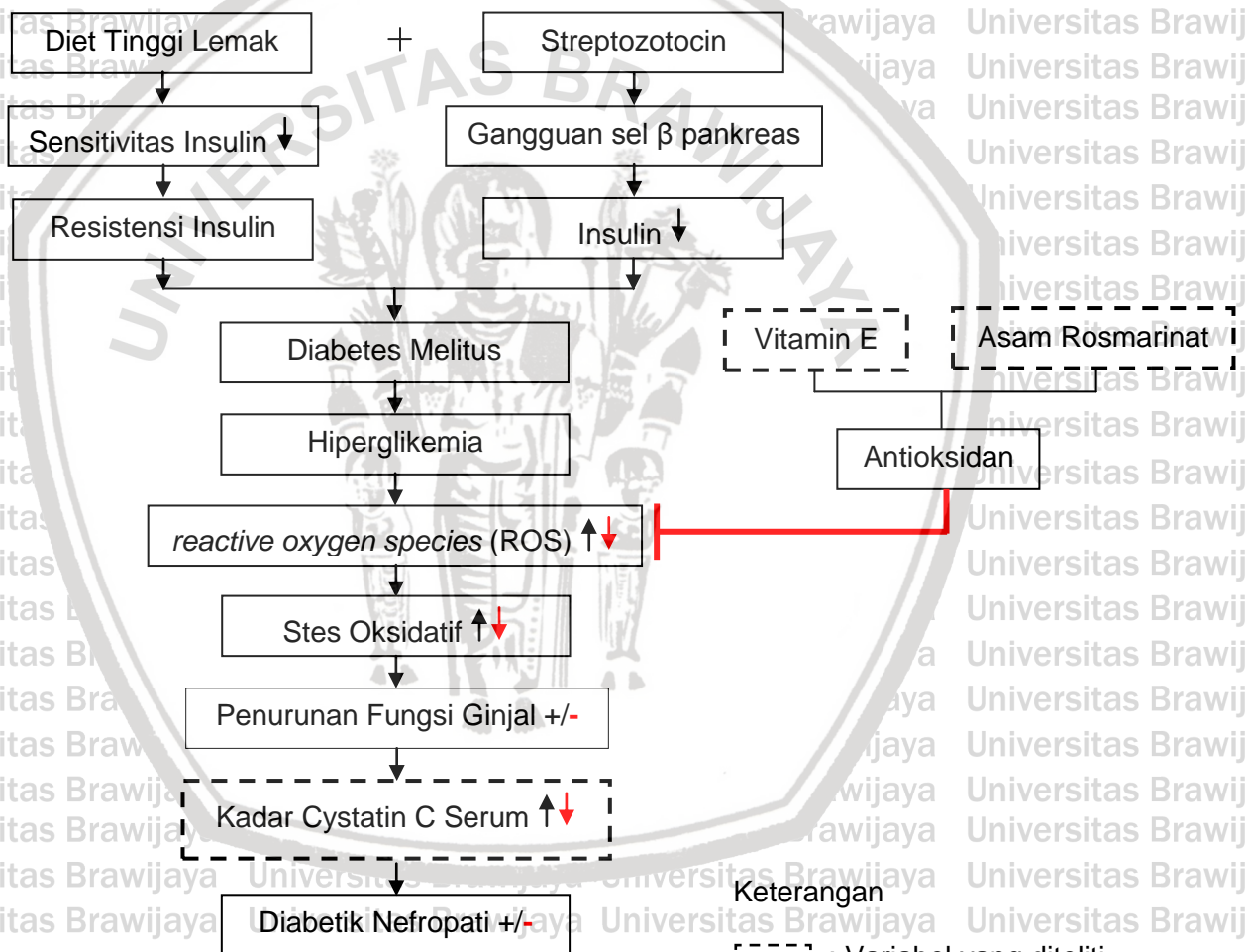


struktural tersebut, maka potensi antioksidan dalam asam rosmarinat lebih tinggi daripada turunan asam hydroxycinnamic lainnya (Amoah *et al.*, 2016). Asam rosmarinat merupakan komponen phenol yang selektif untuk menghambat nefropati diabetik karena memiliki manfaat sebagai antioksidan, anti inflamasi, mereduksi NFKB dan meningkatkan glutathion transferase (Tavafi *et al.*, 2010). Pada tikus yang mengalami nefropati diabetik setelah diinjeksi dengan streptozotocin (STZ), penggunaan asam rosmarinat sebagai agen yang memiliki efek protektif terhadap ginjal dapat memperbaiki kerusakan fungsi ginjal (Jiang *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian Jiang *et al.* pada tahun 2011 didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap tingkatan glikemia antara kelompok tikus perlakuan asam rosmarinat dan tikus STZ-treated. Hal tersebut membuktikan bahwa asam rosmarinat memperbaiki fungsi ginjal bukan dengan cara mereduksi kadar glikemia, namun memperbaiki dengan cara memberikan efek protektif secara langsung terhadap ginjal. Selain itu, asam rosmarinat juga dapat menghambat hipertrofi glomerulus ginjal, mereduksi glomerulosklerosis secara signifikan dan mencegah peningkatan serum urea serum kreatinin pada tikus diabetes (Tavafi *et al.*, 2010). Penelitian Tavafi *et al.* pada tahun 2010 menyatakan bahwa asam rosmarinat sebagai *polyphenolic antioxidant* yang memiliki banyak manfaat dapat digunakan terhadap pasien diabetes untuk mencegah atau memperlambat proses komplikasi nefropati diabetik.

### BAB 3

## KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan

--- : Variabel yang diteliti

☐ : Pokok Bahasan

— : menghambat

↓ : Efek mengakibatkan

Pemberian diet tinggi lemak bertujuan untuk membuat tikus dalam kondisi resistensi terhadap insulin melalui perkembangan menjadi obesitas dan *Streptozotocin* (STZ) akan menyebabkan kerusakan pada sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi gangguan dalam produksi insulin dan menyebabkan penurunan produksi insulin. Pemberian diet tinggi lemak dan STZ akan mengembangkan model tikus dengan Diabetes Melitus.

Diabetes melitus dikenal dengan sindroma hiperglikemia / kelebihan glukosa darah dalam tubuh. Hiperglikemia memicu peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh. Apabila kadar radikal bebas dalam tubuh sangat tinggi, maka antioksidan dalam tubuh tidak mampu menangkal radikal bebas tersebut dan terjadi stres oksidatif.

Stres oksidatif berperan utama dalam berbagai komplikasi diabetes berupa *macrovascular* dan *microvascular*. Pada ginjal terjadi komplikasi *microvascular* dari diabetes yang biasa disebut *diabetic kidney disease* (DKD) / nefropati diabetik. Nefropati diabetik diawali dengan penurunan fungsi ginjal akibat hipertrofi glomerulus, penebalan pada *basement membrane*, ekspansi mesangial, artrofi tubulus ginjal, interstitial fibrosis dan penebalan pembuluh darah. Selain itu, kerusakan fungsi ginjal ini ditandai dengan nilai GFR < 60 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup> yang biasanya dialami oleh penderita diabetes dengan *chronic kidney disease* (CKD). Penurunan fungsi ginjal pada penelitian ini akan dinilai menggunakan kadar Cystatin C serum. Cystatin C tidak dipengaruhi oleh masa otot dan lebih baik dalam memperhitungkan nilai GFR secara konsisten yang berhubungan dengan hasil lebih akurat daripada perhitungan menggunakan SCr eGFR (Shlipak *et al.*, 2013)

Vitamin E merupakan antioksidan yang bekerja menghambat ROS pada kejadian diabetes. Vitamin E dapat dijadikan sebagai terapi maupun tindakan pencegahan terhadap komplikasi pada diabetes karena mempunyai peran protektif terhadap *arteriolar hyalinisation* yang merupakan suatu indikator terhadap kejadian nefropati diabetik.

Asam rosmarinat secara selektif dapat menghambat terjadinya nefropati diabetik karena memiliki manfaat sebagai antioksidan, anti inflamasi, antifibrosis dan dapat mereduksi NFkB. Asam rosmarinat bekerja dalam tubuh dengan cara berperan langsung sebagai agen protektif terhadap ginjal agar tidak terjadi komplikasi dari diabetes. Banyaknya manfaat yang dimiliki oleh asam rosmarinat dapat dijadikan sebagai terapi maupun pencegahan terhadap komplikasi diabetes terutama pada kerusakan fungsi ginjal.

### **3.2 Hipotesis Penelitian**

Asam rosmarinat memiliki efek lebih baik dibandingkan vitamin E terhadap kadar Cystatin C serum (sebagai penanda fungsi ginjal) pada tikus model Diabetes Melitus.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *true experimental laboratory* dan metode *randomized posttest only controlled group design* untuk membandingkan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C sebagai penanda fungsi ginjal pada tikus model diabetes melitus.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 7-9 minggu, berat badan 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.
2. Kriteria eksklusi: tikus kelompok diabetes yang tidak mencapai kondisi hiperglikemia dan mati selama perlakuan.

##### 4.2.2 Estimasi Besar Sampel → Pakai rumus dan Hitung yang benar

Jumlah sampel dihitung dengan rumus:

$$p(n-1) \geq 12$$

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel tiap perlakuan

Pada penelitian ini diketahui perlakuan ( $p$ ) = 4, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 2 kelompok perlakuan:

$$4(n-1) \geq 12$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, pengulangan sampel untuk tiap perlakuan adalah minimal 4. Total tikus yang digunakan adalah 4 ekor untuk tiap kelompok. Pada masing-masing kelompok diberikan 1 tikus sebagai cadangan karena angka keberhasilan terjadinya diabetes dengan metode yang digunakan pada penelitian ini adalah lebih 80% ditambah kemungkinan tikus mati maka sampel keseluruhan yang digunakan  $5 \times 4$  kelompok = 20 ekor hewan coba.

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB untuk pemeliharaan hewan coba serta pembedahannya dan di Laboratorium Biomedik FK UB untuk pemeriksaan variabel penelitian. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2017 sampai Juni 2018.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

1. Kelompok K : tikus kontrol (tikus normal, tidak diabetes)
2. Kelompok DM : tikus diabetes melitus tanpa pemberian vitamin E atau asam rosmarinat
3. Kelompok DM+Vit.E : tikus diabetes melitus dengan pemberian vitamin E

4. Kelompok DM+AR : tikus diabetes melitus dengan pemberian asam rosmarinat

#### 4.4.2 Variabel Tergantung / Terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

Kadar Cystatin C (ng/mL) dalam serum

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Streptozotocin (STZ): adalah zat yang digunakan untuk menginduksi diabetes (hiperglikemia) dan selanjutnya menginduksi nefropati diabetik dari efek hiperglikemia yang ditimbulkan pada tikus. Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dari bioWORLD SKU: 41910012-3 dengan dosis tunggal 40 mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) (Furman, 2015).
2. Vitamin E terdiri atas berbagai macam kandungan diantaranya  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol, dan  $\gamma$ -tokoferol. Bentuk yang paling banyak dijumpai adalah  $\alpha$ -tokoferol yang memiliki rantai isoprenoid sebagai rantai samping dan cincin aromatik tersubstitusi. Efek vitamin E sebagai antioksidan adalah dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel oleh peroksidasi lipid (Bolignano, 2017). Merek vitamin E yang digunakan adalah D- $\alpha$ -Tocopherol T2309 dari TCI dengan dosis 400mg/kgBB/hari.
3. Asam rosmarinat (AR) merupakan asam fenolik, yaitu kandungan aktif yang berasal dari beberapa macam tumbuhan obat, terutama dari famili Lamiaceae (Bhattacharjee *et al*, 2016). Mempunyai fungsi sebagai antioksidan yang multiproperti, serta sebagai anti peradangan dan antifibrotik. Dosis sebagai antioksidan yang direkomendasikan 50 sampai 100 mg/kg/hari dosis tunggal dan yang digunakan pada penelitian ini

adalah asam rosmarinat dari ChemCruz SC-202796 dengan dosis 75mg/kgBB/hari.

4. Cystatin C adalah suatu protein spesifik berukuran kecil yang disekresi oleh semua sel berinti. Cystatin C dikeluarkan hanya melalui urine, difiltrasi bebas oleh glomerulus ginjal, tidak disekresi oleh tubulus ginjal dan tidak diserap kembali ke dalam tubuh, sehingga sangat baik untuk menentukan laju filtrasi glomerulus ginjal. Sekresi Cystatin C selalu konstan dalam darah, sehingga apabila terjadi peningkatan maka menunjukkan adanya gangguan filtrasi ginjal maupun fungsi ginjal. Kadar cystatin C diukur dari serum menggunakan metode *immunonephelometric* dengan satuan mg/dL. Pada penelitian ini digunakan Cystatin C dari Bioassay Technology Laboratory yaitu Rat Cys-C ELISA Kit Cat.No E0145Ra.

#### **4.6 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian**

##### **4.6.1 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus**

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa darah yang diambil langsung dari jantung tikus sesuai perlakuan dan alat yang digunakan gunting bedah, sterofom, pinset, kapas, jarum pentul, ketamin 0,2 mL, spuit 5cc, vacutainer tutup merah.

##### **4.6.2 Bahan dan Alat Pengukuran Kadar Cystatin C**

Mengukur kadar Cystatin C diperlukan serum tikus sesuai perlakuan untuk dianalisis menggunakan Rat Cystatin C ELISA kit. Metode pengukuran mengacu pada protokol yang ada pada Cystatin C ELISA kit dan pembacaan menggunakan ELISA reader.



## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Persiapan Hewan Coba**

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat pakan, pakan tinggi lemak, alcohol 70%, hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*), dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus dikandangkan individual, mendapatkan pakan dengan komposisi kalori 60% lemak, dan akses minum bebas. Tikus diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi FKUB selama tujuh hari sebelum eksperimen.

### **4.7.2 Induksi Diabetes**

Tikus diberikan diet tinggi lemak selama 3 minggu. Pada hari ke 22, tikus dipuaskan selama 6 sampai 8 jam (mulai jam 07.00 sampai 13.00 – 15.00) sebelum pemberian STZ. Air minum tetap diberikan. Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dosis tunggal 40 mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) (Furman, 2015). Setelah injeksi STZ tikus mendapatkan diet yang tetap. Gula darah diukur pada 3 hari setelah injeksi STZ. Tikus berkembang menjadi diabetes bila gula darah lebih 280 mg/dl (Wu & Huan, 2008).

### **4.7.3 Pemberian Vitamin E**

Vitamin E yang telah diencerkan dalam olive oil dengan dosis 400mg/kgBB yang telah dihitung sesuai dengan berat badan masing-masing tikus diberikan secara oral dengan sonde selama 7 minggu, kemudian setelah itu dilakukan euthanasia dan pembedahan

### **4.7.4 Pemberian Asam Rosmarinat**

Asam Rosmarinat yang telah diencerkan dalam air dengan dosis 75mg/kgBB yang telah dihitung sesuai dengan berat badan masing-masing tikus

diberikan secara oral dengan sonde selama 7 minggu, kemudian setelah itu dilakukan euthanasia dan pembedahan.

#### 4.7.5 Pembedahan Tikus

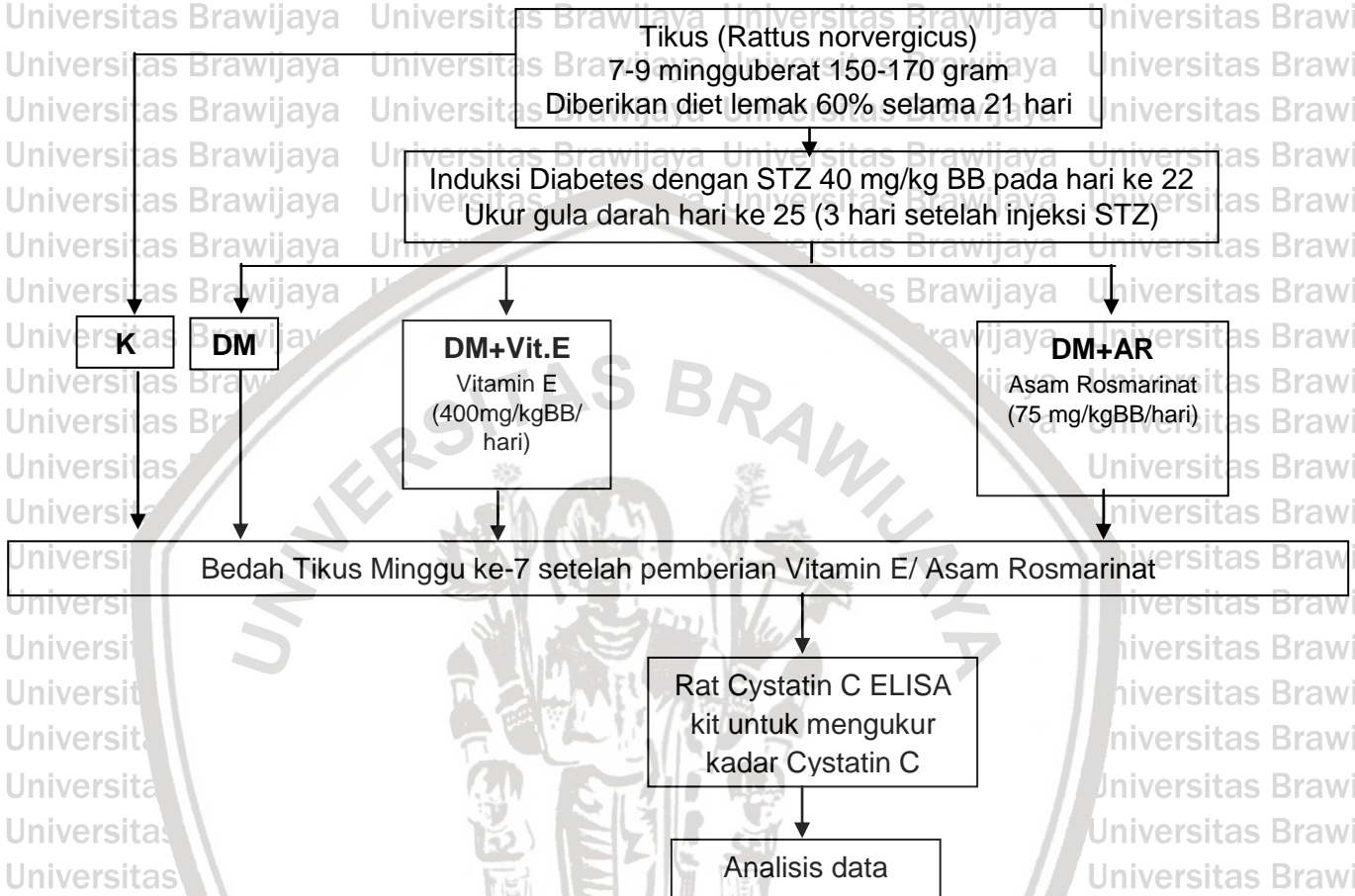
Disiapkan media transfer. Ditimbang berat badan tikus. Tikus dieuthanasia menggunakan anestesi berupa ketamin karena keperluan pengambilan darah jantung. Tikus diposisikan pada papan bedah dan difiksasi pada papan menggunakan pin. Dilakukan insisi lapisan terluar kulit tikus dengan gunting lurus dan pisau bedah. Dilakukan insisi lapisan peritoneal dari daerah abdominal hingga toraks. Dilakukan pengambilan darah pada jantung tikus sebagai spesimen dengan menggunakan spuit 5cc. Dipastikan bahwa lemak tidak ikut terambil. Spesimen berupa darah dimasukkan ke dalam tabung vacutainer tutup merah (Liu *et al.*, 2013).

#### 4.7.6 Evaluasi Nefropati Diabetik

Pada minggu ke-7 setelah injeksi STZ dilakukan pembedahan tikus. Evaluasi diukur dengan kadar Cystatin C (ng/mL) pada serum yang telah dipisahkan dari darah tikus. Untuk menentukan kadar Cystatin C, darah diambil secara langsung setelah dilakukan eutanasia dengan ketamin 0,2 mL pada tikus dan ditempatkan dalam vacutainer tutup merah. Kemudian diambil serum dalam darah setelah dilakukan sentrifuse untuk pengukuran kadar Cystatin C. Kadar Cystatin C diukur dengan menggunakan metode ELISA. Metode pengukuran mengacu pada protokol yang ada pada Cystatin C ELISA kit dan pembacaan menggunakan ELISA reader.



#### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

#### Keterangan:

K : Kelompok tikus kontrol (tikus normal, tidak didiabeteskan)

DM : Kelompok tikus diabetes melitus

DM+Vit.E : Kelompok tikus diabetes melitus dengan pemberian vitamin E

DM+AR : Kelompok tikus diabetes melitus dengan pemberian asam rosmrinat

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Karakteristik Sampel

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah tikus dengan karakteristik yang tertulis pada tabel 5.1

**Tabel 5.1 Berat Badan dan Gula Darah Puasa Post STZ Sampel Penelitian**

Kelompok Perlakuan	K	DM	DM+Vit.E	DM+AR
BB datang (Mean±SD)	193±36,04	188,25±11,32	166,33±6,66	202±23,74
GDP post injeksi STZ (Mean±SD)	95,67±9,29 (tanpa injeksi STZ)	352,5±61,57	364±32,14	388,75±37,18

Keterangan:

- K = Kelompok tikus kontrol
- DM = Kelompok tikus diabetes melitus
- DM+Vit.E = Kelompok tikus diabetes melitus dengan pemberian vitamin E
- DM+AR = Kelompok tikus diabetes melitus dengan pemberian asam rosmarinat

Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis *Rattus norvegicus* dengan usia 7 – 8 minggu dan berjenis kelamin jantan. Tikus yang digunakan dalam keadaan umum sehat ditandai dengan bergerak aktif, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun dan memiliki bulu putih yang tidak rontok.

Tikus yang digunakan berjumlah 3 ekor pada kelompok tikus kontrol dan 4 ekor tikus pada kelompok DM, DM+Vit.E dan DM+AR. Namun pada kelompok

DM+Vit.E terdapat 1 ekor tikus mati saat penelitian sedang berlangsung.

Berdasarkan tabel 5.1 dapat dilihat rerata berat badan tikus tertinggi terdapat pada kelompok DM+AR dan rerata berat badan tikus terendah terdapat pada kelompok DM+Vit.E. Gula darah puasa tikus setelah injeksi STZ pada tabel 5.1

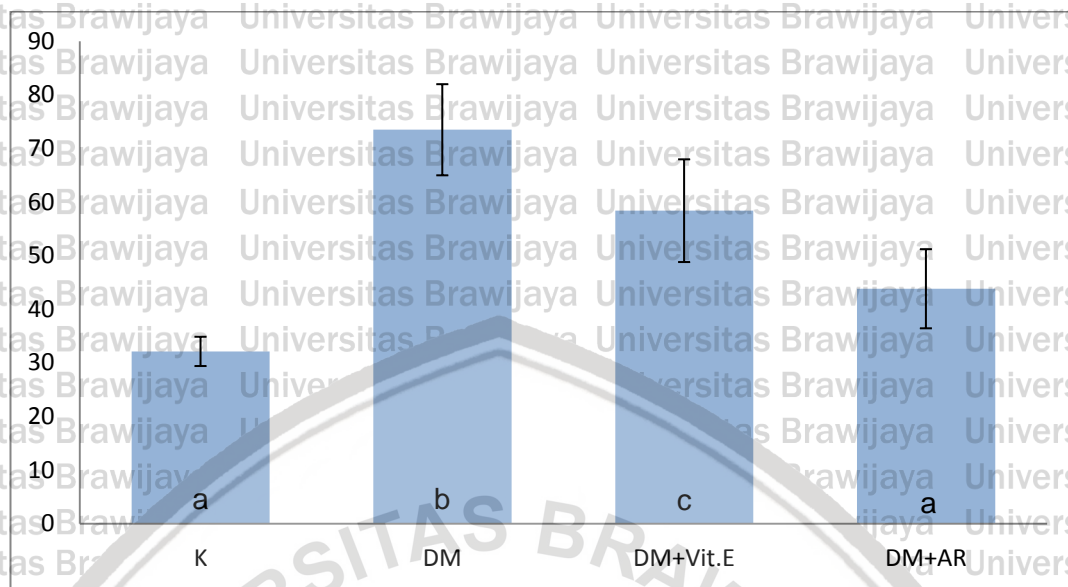
dapat dilihat bahwa tikus DM, DM+Vit.E dan DM+AR sudah mengalami kondisi diabetes komplikasi vaskular dengan rata-rata gula darah lebih dari 280 mg/dl.

### 5.2 Kadar Cystatin C Serum

Kadar cystatin C serum tikus diukur setelah 7 minggu perlakuan pada serum dan dievaluasi menggunakan Rat Cystatin C ELISA Kit. Kadar cystatin C serum pada tikus DM+AR paling rendah dibandingkan tikus DM dan DM+Vit.E, namun tidak rendah dari tikus kontrol. Tikus DM+Vit.E dapat menurunkan kadar cystatin C serum sebanyak 20,55% terhadap DM, sedangkan tikus DM+AR dapat menurunkan kadar cystatin C serum sebanyak 40,37% terhadap DM. Pada gambar 5.1 dapat dilihat bahwa tikus kontrol berbeda secara signifikan terhadap tikus DM disimbolkan dengan huruf a dan b, sedangkan simbol b menandakan bahwa DM+Vit.E dan DM+AR berbeda secara signifikan terhadap tikus DM.

**Tabel 5.2 Rerata Kadar Cystatin C Serum pada Semua Perlakuan (ng/ml)**

Kelompok Perlakuan	Mean±SD
K	32,12±2,73
DM	73,47±8,50
DM+Vit.E	58,37±9,58
DM+AR	43,81±7,38



Keterangan :

- a = K berbeda secara signifikan terhadap DM, DM+AR tidak berbeda secara signifikan terhadap K.
- b = DM berbeda secara signifikan terhadap DM+Vit.E dan DM+AR
- c = DM+Vit.E berbeda secara signifikan terhadap DM dan K

**Gambar 5.1 Grafik Rerata Kadar Cystatin C Serum pada Semua Perlakuan**

### 5.3 Analisis Data

Data profil kadar cystatin C serum dianalisis menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ( $p < 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Uji hipotesis komparatif diawali dengan uji normalitas data untuk melihat distribusi data menggunakan *Saphiro-Wilk Test*. Setelah itu dilakukan uji homogenitas varian untuk mengetahui data yang homogen menggunakan *Levene's Test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan antara kelompok.

Pengujian terakhir dilakukan uji *post hoc* menggunakan LSD untuk mengetahui signifikannya perbedaan antar kelompok.

### 5.3.1 Uji Normalitas Data

Hasil uji normalitas data didapatkan nilai sig. 0,514. Berdasarkan nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan telah memenuhi syarat  $p > 0,05$ .

### 5.3.2 Uji Homogenitas Varian

Hasil uji homogenitas data didapatkan nilai sig 0,281. Berdasarkan nilai sig. tersebut dapat disimpulkan bahwa varian data sama (homogen) atau tidak ada perbedaan varian antara kelompok data yang dibandingkan. Data tersebut dinyatakan homogen karena telah memenuhi syarat  $p > 0,05$ .

### 5.3.3 Uji One Way Anova

Uji *One Way Anova* dapat dilakukan apabila uji normalitas dan uji homogenitas telah terpenuhi dengan nilai  $p > 0,05$ . Pada uji *One Way Anova* didapatkan nilai sig. 0,000 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar cystatin C serum antar kelompok perlakuan sesuai dengan syarat nilai  $p < 0,05$ .

### 5.3.4 Uji Post Hoc LSD

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc* LSD Cystatin C

	K	DM	DM+Vit.E	DM+AR
K	-	0,000*	0,002*	0,072
DM	0,000*	-	0,027*	0,000*
DM+Vit.E	0,002*	0,027*	-	0,031*
DM+AR	0,072	0,000*	0,031*	-

Keterangan: (\*) merupakan kelompok yang berbeda secara signifikan



Berdasarkan hasil uji *Post Hoc* LSD pada tabel 5.3 dapat disimpulkan bahwa pada umumnya terdapat perbedaan bermakna atau signifikan ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan kecuali kelompok K dengan kelompok DM+AR.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Kadar Cystatin C pada Tikus Diabetes Melitus

Stress oksidatif pada diabetes dapat menyebabkan kerusakan pada *Glomerular Filtration Barrier* (GFB) yang terdiri dari sel endothelial glomerular, *basement membrane* dari glomerular dan podosit. GFB berfungsi untuk memfiltrasi molekul-molekul protein pada ginjal seperti albumin dan cystatin C (Vallon & Komers, 2011). Stress oksidatif dapat menstimulasi sintesis dari mRNA dan protein cystatin C sebagai respon pertahanan sel. Tingginya kadar serum cystatin C berhubungan dengan keadaan inflamasi kronis dan disfungsi endothelial dapat menyebabkan kerusakan pada ginjal pasien diabetes yang dapat berkembang menjadi nefropati diabetik. Pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi nefropati diabetik, terdapat penurunan dari fungsi ginjal pasien yang dapat dilihat dari meningkatnya kadar cystatin C serum. Adanya peningkatan kadar serum cystatin C dikarenakan GFR menurun yang mengindikasikan terjadinya penurunan fungsi filtrasi glomerulus (Sahakyan *et al.*, 2011).

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa tikus DM memiliki kadar cystatin C yang lebih tinggi daripada tikus kontrol. Secara statistik didapatkan bahwa tikus DM berbeda secara signifikan terhadap tikus kontrol dengan nilai  $p = 0,000$ . Hal tersebut dapat diartikan bahwa adanya peningkatan kadar cystatin C yang signifikan pada tikus model diabetes melitus terhadap tikus kontrol (tikus sehat).

## 6.2 Efek Vitamin E terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus

Stress oksidatif dapat menstimulasi sintesis dari mRNA dan protein cystatin C sebagai respon pertahanan sel. Tingginya kadar serum cystatin C berhubungan dengan keadaan inflamasi kronis dan disfungsi endothelial dapat menyebabkan kerusakan pada ginjal pasien diabetes yang dapat berkembang menjadi nefropati diabetik (Sahakyan *et al.*, 2011). Vitamin E merupakan suatu antioksidan yang memiliki 4 molekul tokoferol yaitu  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol, dan  $\gamma$ -tokoferol. Molekul  $\alpha$ -tokoferol merupakan molekul utama yang banyak terdapat dalam vitamin E.  $\alpha$ -tokoferol dapat mengurangi glikosidasi hemoglobin dan protein serum. Selain itu  $\alpha$ -tokoferol juga dapat menurunkan aktivitas protein kinase C yang berkaitan secara langsung terhadap peningkatan ROS. Reaktivitas hidrogen phenolik pada C-6 kelompok hidroksil  $\alpha$ -tokoferol akan menstabilkan elektron tidak berpasangan pada radikal bebas (Combs, 2008). Vitamin E berperan dalam pemecahan rantai antioksidan, dengan cara mencegah ROS merusak membran sel (Uboh *et al.*, 2012). Vitamin E juga mempunyai peran protektif terhadap *arteriolar hyalinisation* pada ginjal yang bisa menjadi suatu indikator terhadap nefropati diabetik (Burchfiel *et al.*, 1997 **dalam** Rashid *et al.*, 2015). Dosis terapi vitamin E yang dipakai dalam penelitian ini yaitu 400 mg/kgBB yang diberikan secara oral terhadap tikus. Dosis vitamin E yang tinggi atau lebih dari 400 mg/kgBB tidak direkomendasikan karena dapat meningkatkan mortalitas pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi kardiovaskular (Farid *et al.*, 2013).

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa tikus DM+Vit.E memiliki kadar cystatin C yang lebih rendah daripada tikus DM. Vitamin E dapat menurunkan kadar cystatin C sebanyak 20,55% terhadap tikus DM. Secara statistik

didapatkan bahwa DM+Vit.E berbeda secara signifikan terhadap DM dengan nilai  $p = 0,027$ . Hal tersebut dapat diartikan bahwa adanya penurunan kadar cystatin

C yang signifikan dalam terapi vitamin E pada tikus model diabetes melitus.

Penurunan kadar cystatin C pada tikus DM+Vit.E masih memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol. Secara statistik didapatkan bahwa DM+Vit.E berbeda secara signifikan terhadap tikus kontrol dengan nilai  $p =$

0,002. Berdasarkan data tersebut dapat diartikan bahwa adanya perbedaan yang bermakna antara tikus DM+Vit.E dengan tikus kontrol yang seharusnya didapatkan hasil tidak berbeda bermakna karena tujuan dari terapi yaitu mengembalikan kondisi sakit menjadi kondisi sehat. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti dosis yang digunakan kurang tepat karena tidak dilakukan uji dosis terlebih dahulu sebelum dilakukan penelitian ini atau waktu pemberian terapi yang kurang lama sehingga efek terapi yang di berikan oleh vitamin E belum maksimal (Farid *et al.*, 2013).

### **6.3 Efek Asam Rosmarinat terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus**

Pada penelitian ini digunakan asam rosmarinat sebagai antioksidan pembanding vitamin E. Asam rosmarinat merupakan komponen phenol yang selektif untuk menghambat nefropati diabetik karena memiliki manfaat sebagai antioksidan, anti inflamasi, mereduksi NFKB dan meningkatkan glutathion transferase. Asam rosmarinat sebagai antioksidan yang multiproperti pada diabetik nefropati terbukti dapat memberikan efek antioksidan yang tinggi, mempunyai *half-time* yang panjang, memiliki permeabilitas yang tinggi pada mitokondria dan dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dalam tubuh (Tavafi *et al.*, 2010).

Pada tikus yang mengalami nefropati diabetik setelah diinjeksi dengan streptozotocin (STZ), penggunaan asam rosmarinat sebagai agen yang memiliki efek protektif terhadap ginjal dapat memperbaiki kerusakan fungsi ginjal (Jiang *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian Jiang *et al.* pada tahun 2011 didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap tingkatan glikemia antara kelompok tikus perlakuan asam rosmarinat dan tikus STZ-treated. Hal tersebut membuktikan bahwa asam rosmarinat memperbaiki fungsi ginjal bukan dengan cara mereduksi kadar glikemia, namun memperbaiki dengan cara memberikan efek protektif secara langsung terhadap ginjal. Selain itu, asam rosmarinat juga dapat menghambat hipertrofi glomerulus ginjal, mereduksi glomerulosklerosis secara signifikan dan mencegah peningkatan serum urea kreatinin pada tikus diabetes (Tavafi *et al.*, 2011). Pada penelitian ini dosis terapi asam rosmarinat 75 mg/kgBB diberikan secara oral pada tikus DM+AR. Jumlah dosis asam rosmarinat efektif yang digunakan dalam penelitian dengan hewan coba tikus berkisar antara 50-200 mg/kgBB karena tidak mempengaruhi integritas kromosom. Dosis asam rosmarinat  $\geq 50$  mg/kgBB terbukti dapat mengurangi mediator inflamasi lokal maupun sistemik pada penelitian sepsis. Selain dari itu, penggunaan dosis asam rosmarinat  $\geq 50$  mg/kgBB secara oral dapat menghambat kerusakan ginjal karena diabetes atau menghambat *gentamicin sulphate-induced renal oxidative damage* pada tikus, menghambat kerusakan jaringan endothelial dan sebagai proteksi terhadap jantung (Amoah *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa tikus DM+AR memiliki kadar cystatin C yang lebih rendah daripada tikus DM. Asam rosmarinat dapat menurunkan kadar cystatin C sebanyak 40,37% terhadap tikus DM. Secara statistik didapatkan bahwa DM+AR berbeda secara signifikan terhadap DM

dengan nilai  $p = 0,000$ . Hal tersebut dapat diartikan bahwa adanya penurunan kadar cystatin C yang signifikan dalam terapi asam rosmarinat pada tikus model diabetes melitus.

Penurunan kadar cystatin C secara statistik pada tikus DM+AR terhadap tikus DM didapatkan hasil tidak signifikan dengan nilai  $p = 0,072$ . Hal tersebut dapat diartikan bahwa tidak adanya perbedaan yang bermakna antara tikus DM+AR dengan tikus kontrol. Namun, penurunan kadar cystatin C masih memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti dosis yang digunakan kurang maksimal karena tidak adanya uji dosis yang dilakukan sebelum penelitian ini untuk menentukan dosis efektif atau waktu pemberian terapi yang kurang lama sehingga efek terapi yang diberikan oleh asam rosmarinat belum maksimal (Amoah *et al.*, 2016).

#### **6.4 Perbandingan Efek Vitamin E dan Asam Rosmarinat terhadap Kadar Cystatin C Tikus Diabetes Melitus**

Pada penelitian ini didapatkan rerata kadar cystatin C pada tikus DM+AR lebih rendah dibandingkan kadar cystatin C pada tikus DM dan tikus DM+Vit.E yang dapat dilihat pada gambar 5.1. Kadar cystatin C yang rendah setelah pemberian terapi mengindikasikan bahwa adanya efek terapi antioksidan terhadap fungsi ginjal terutama fungsi filtrasi pada glomerulus. Namun kadar cystatin C pada tikus kontrol masih lebih rendah dibandingkan tikus DM+Vit.E dan DM+AR.

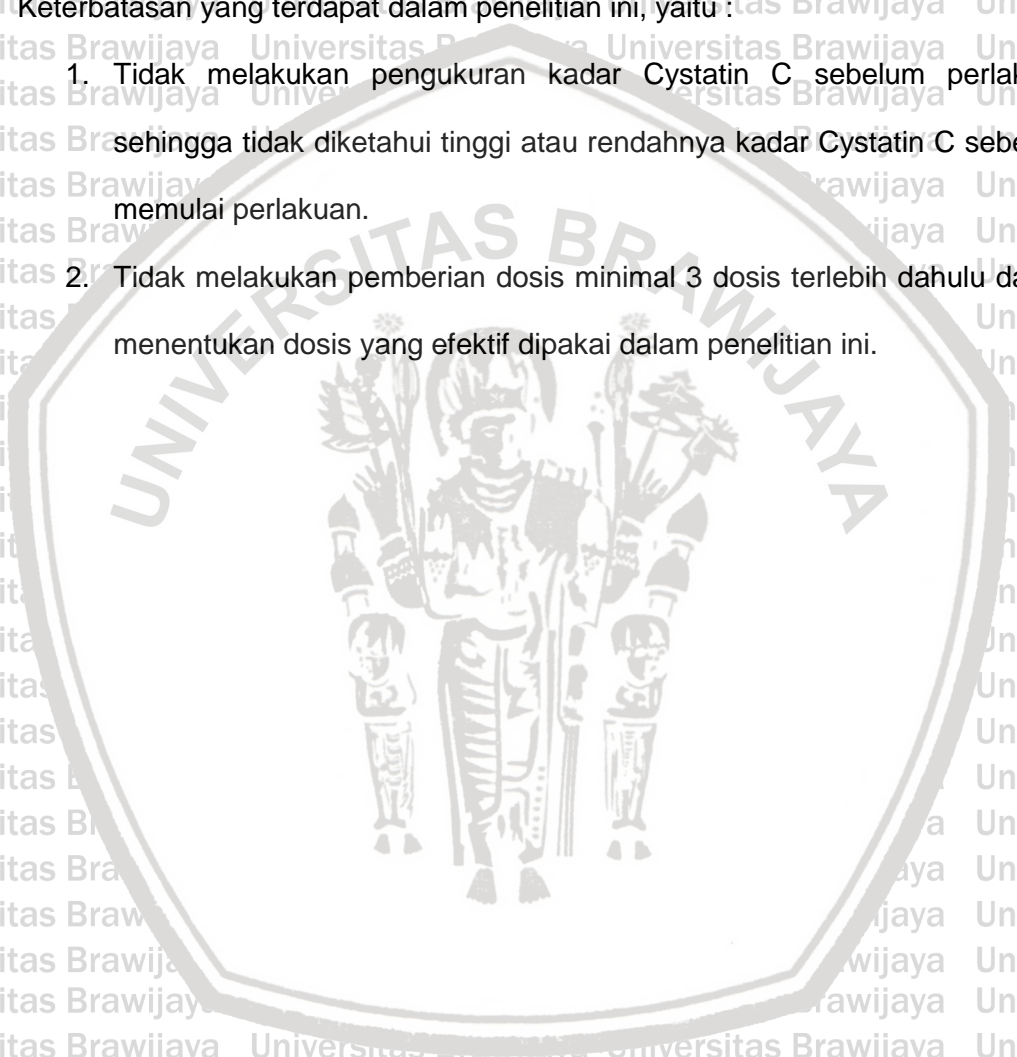
Hasil pemeriksaan gula darah yang dilakukan secara rutin setiap minggu juga menggambarkan penurunan rerata gula darah yang lebih baik pada DM+AR dibandingkan dengan DM+Vit.E. Selain itu secara statistik didapatkan juga nilai  $p = 0,031$  yang menyatakan bahwa adanya perbedaan signifikan antara DM+Vit.E

dan DM+AR. Berdasarkan hal tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa asam rosmarinat memiliki efek lebih baik dibandingkan vitamin E terhadap kadar cystatin C pada tikus model diabetes melitus.

### **6.5 Keterbatasan Penelitian**

Keterbatasan yang terdapat dalam penelitian ini, yaitu :

1. Tidak melakukan pengukuran kadar Cystatin C sebelum perlakuan sehingga tidak diketahui tinggi atau rendahnya kadar Cystatin C sebelum memulai perlakuan.
2. Tidak melakukan pemberian dosis minimal 3 dosis terlebih dahulu dalam menentukan dosis yang efektif dipakai dalam penelitian ini.



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai perbandingan efek vitamin E dan asam rosmarinat terhadap kadar cystatin C serum tikus dengan diabetes melitus, maka didapatkan kesimpulan bahwa :

1. Rerata kadar cystatin C serum pada kelompok tikus DM secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok tikus kontrol.
2. Pemberian vitamin E menurunkan kadar cystatin C serum secara signifikan pada tikus diabetes melitus.
3. Pemberian asam rosmarinat menurunkan kadar cystatin C serum secara signifikan pada tikus diabetes melitus.
4. Asam rosmarinat menurunkan kadar cystatin C serum lebih baik (40,37%) dibandingkan dengan vitamin E (20,55%) pada tikus diabetes melitus.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengukuran kadar Cystatin C sebelum perlakuan sehingga dapat diketahui tinggi atau rendahnya kadar Cystatin C sebelum memulai perlakuan.
2. Perlu dilakukan pemberian dosis minimal 3 dosis terlebih dahulu dalam menentukan dosis yang efektif dipakai dalam penelitian.



## DAFTAR PUSTAKA

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education Diabetes Care*, 2017, 4(1).

Amoah S.K.S., Sandjo L.P., Kratz J.M., Biavatti M.W. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Thieme E-Journals-Planta Medica*, 2016, DOI: 10.1055/s-0035-1568274.

Baynes J.W., Thorpe S.R., 1999. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications: A New Perspective on an Old Paradigm in B.Setiawan, E.Suhartono, (Eds), Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus, *Maj Kedokt Indon*, 2005, 55(2).

Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, Dewanjee S, Manna P. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: An update. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 8–24. doi: [10.1016/j.ejphar.2016.08.022](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.08.022).

Bolignano D., Cernaro V., Gembillo G., Baggetta R., Buemi M., And D'Arrigo G. Antioxidant Agents for Delaying Diabetic Kidney Disease Progression: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178699.

Burchfiel CM, Tracy RE, Chyou P, Strong JP., 1997. Cardiovascular Risk Factors and Hyalinization of Renal Arterioles at Autopsy in S.Rashid, K.Qamar, I.Tassaduq, (Eds), Role of Vitamin E in Preventing Arteriohyalinization in Kidneys of Streptozotocin Induced Diabetic Mice, *J Park Med Assoc*, 2015, 65(10): 1085-1088.

Carr A.C., Frei B., 1999. Toward a New Recommended Dietary Allowance for Vitamin C based on Antioxidant and Health Effects in Humans in B.Setiawan, E.Suhartono, (Eds), Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus, *Maj Kedokt Indon*, 2005, 55(2).

Combs J.F. The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health. New York: Elsevier Academic Press, 2008.

Dean J, 2012. Organising Care for People with Diabetes and Renal Disease in International Diabetes Federation, (Ed), IDF Diabetes Atlas Eighth Edition, *Internasional Diabetes Federation*, 2017, p. 90-91.

Farid N., Inbal D., Nakhoul N., Evgeny F., Miller-Lotan R., Levy A.P., Rabea A. Vitamin E and diabetic nephropathy in mice model and humans. *World Journal of Nephrology*, 2013, doi: [10.5527/wjn.v2.i4.1111](https://doi.org/10.5527/wjn.v2.i4.1111).

Forbes J.M., Coughlan M.T., Cooper M.E. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes Journal*, 2008, 57: 1446–1454.

Furman, BL. 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocol in pharmacology* 5.47.1 – 5.47.20.

Guariguata L., Linnenkamp U., Beagley J., et al. Global Estimates of the Prevalence of Hyperglycaemia in Pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103: 176–85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.003>.

Holman N., Young B., Gadsby R. Current Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes in Adults and Children in the UK. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*, 2015, 32: 1119–20. DOI: <http://dx.doi.org/10.111/dme.12791>.

Ichihara A., Sakoda M., Mito-Kurauchi A., Itoh H. Activated Prorenin as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82(1): S63–66.

Imamura F., O'Connor L., Ye Z., et al. Consumption of Sugar Sweetened Beverages, Artificially Sweetened Beverages, and Fruit Juice and Incidence of type 2 Diabetes: Systematic Review, Meta-analysis, and Estimation of Population Attributable Fraction. *BMJ*, 2015, 351: h3576. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bisports-2016-h3576rep>.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition. *International Diabetes Federation*, 2017.

Jiang W., Xu Y., Zhang S., Hou J., and Zhu H. Effect of Rosmarinic Acid on Experimental Diabetic Nephropathy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012, 110: 390-395.

Kagami S., Border W.A., Miller D.E., Noble N.A., 1994. Angiotensin II Stimulates Extracellular Matrix Protein Synthesis through Induction of Transforming Growth Factor- $\beta$  Expression in Rat Glomerular Mesangial Cells in N.Kashihara, Y.Haruna, V.K.Kondeti, Y.S.Kanwar, (Eds), *Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy*. *HHS Public Access Author Manuscript*, 2013. PMID: PMC3708695.

Kashihara N., Haruna Y., Kondeti V.K., Kanwar Y.S. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *HHS Public Access Author Manuscript*, 2013. PMID: PMC3708695.

Kim S.S., Galaher D.D., Csallany A.S. Vitamin E and Probucol Reduce Urinary Lipophilic Aldehydes and Renal Enlargement in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Lipids*, 2003, 35(11): 37.

Liebau M.C., Lang D., Bohm J., Endlich N., Bek M.J., Witherden I., Mathieson P.W., Saleem M.A., Pavenstadt H., Fischer K.G. Functional Expression of The Renin-Angiotensin System in Human Podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290: F710–719.

Liu, X., Fan, Q., Yang, G., Liu, N.A.N., Chen, D., Jiang, Y.I., Wang, L. 2013. Isolating glomeruli from mice: A practical approach for beginners. *Experimental And Therapeutic Medicine* 5:1322-1326

Lopez-Giacoman S., Madero M. Biomarker in Chronic Kidney Disease, from Kidney Function to Kidney Damage. *World Journal of Nephrology*, 2015, 4(1): 57-73.

Miranda-Diaz A.G., Pazarin-Villasenor L, Yanowsky-Escatell F.G., Andrade-Sierra J. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:7047238 doi: [10.1155/2016/7047238](https://doi.org/10.1155/2016/7047238).

Ogawa S., Kobori H., Ohnashi N., Urushihara M., Nishiyama A., Mori T., Ishizuka T., Nako K., Ito S. Angiotensin II type 1 Receptor Blockers Reduce Urinary Angiotensinogen Excretion and Levels of Urinary Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Patients with type 2 Diabetic Nephropathy. *Biomark Insights*, 2009, 4: 97-102.

Roziana, Subagio H.W, Suhartono, Widyastiti N.S. Pengaruh Suplementasi Vitamin E (*α-tokoferol*) Terhadap Kadar Gamma Glutamil Transferase (GGT) dan Kadar Nitric Oxide (NO) pada Tikus (Studi pada Tikus Rattus Novergicus Strain Wistar Jantan Terpapar Inhalasi Uap Benzene). *Jurnal Gizi Indonesia*, 2015, 3(2): 73-79.

Sahakyan K., Lee K.E., Shankar A., Klein R. Serum Cystatin C and the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus. *HHS Author Manuscript*, 2011, DOI: [10.1007/s00125-011-2096-6](https://doi.org/10.1007/s00125-011-2096-6).

Shlipak M.G., Matsushita K., Ärnlöv J., Inker L.A., Katz R., Polkinghorne K.R., Rothenbacher D., *et al.* Cystatin C versus Creatinine in Determining Risk Based on Kidney Function. *N Engl J Med*, 2013, 369: 932-943.

Simanjuntak D., Sudaryati E., 1998. Aspek Pencegahan Radikal Bebas melalui Antioksidan in B.Setiawan, E.Suhartono, (Eds), Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus, *Maj Kedokt Indon*, 2005, 55(2).

Sotnikova R., Kaprinay B., and Navarova J. Rosmarinic Acid Mitigates Signs of Systemic Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Gen. Physiol. Biophys*, 2015, 34: 449-452.

Swastika, A., Mufrod dan Purwanto, 2013. Aktivitas Antioksidan Krim Ekstrak Sari Tomat (*Solanum Lycopersicum L*). *Traditional Medicine Journal*, 18(September), hal. 132-140.

Tavafi M. Diabetic nephropathy and antioxidant. *J Nephropathol*, 2013, DOI: [10.5812/nephropathol.90931](https://doi.org/10.5812/nephropathol.90931).

Tavafi M., Ahmadvand H., Khalatbari A., Tamjidipoor A. Rosmarinic Acid Ameliorates Diabetic Nephropathy in Uninephrectomized Diabetic Rats. *Iranian Journal of basic Medical Sciences*, 2010, 14(3): 275-283.

Uboh F.E., Akpanabiatu M., Alozie Y., Edet E.E., Ndem J.I., Ebong P.E. Comparative Effect of Vitamins A and E on Gasoline Vapours – Induced Haemototoxicity and Weight-Loss in Male Rats. *International Journal of Pharmacology*, 2009, 5(3): 215-21.

Uboh F.E., Eong P.E., Akpan H.D., Ushoh I.F. Hepatoprotective effect of vitamins C and E against gasoline vapor-induced liver injury in male rats. *Turk J Biol*, 2012; 36: 217-23.

United States Renal Data System. USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. Bethesda (MD): National Institutes of Health, *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, 2014, p.188–210.

Vallon V., Komers R. Pathophysiology of the Diabetic Kidney. *HHS Author Manuscript*, 2011, DOI: [10.1002/cphy.c100049].

Yaswir R., Maiyesi A. Pemeriksaan Laboratorium Cystatin C untuk Uji Fungsi Ginjal. *Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang*, 2012.

You W.P., Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. *BMJ Open Diabetes Res Amp Care*, 2016, 4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmjdr-2015-000161>.