# EFEK ASAM ALFA LIPOAT TERHADAP STRES OKSIDATIF PADA LAMBUNG TIKUS WISTAR JANTAN MODEL DIABETES MELLITUS TIPE 1 INDUKSI STREPTOZOTOCIN

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**
**Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**


**Oleh:**

**Rizqi Nur Mufiedah S.**
**NIM: 105070501111004**


**PROGRAM STUDI FARMASI**
**FAKULTAS KEDOKTERAN**
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
**MALANG**
**2014**


repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id


## ABSTRAK

Mufiedah, Rizqi Nur. 2014. Efek Asam Alfa Lipoat terhadap Stres Oksidatif pada Lambung Tikus Wistar Jantan Model Diabetes Mellitus Tipe 1 Induksi Streptozotocin. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.S., Ph.D. (2) dr. Imam Sarwono, Sp.Pa.

Kondisi diabetes mellitus kronis menyebabkan peningkatan ROS dan penurunan antioksidan. Peningkatan radikal bebas tersebut dapat merusak beberapa organ, salah satunya lambung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek Asam Alfa Lipoat (ALA) terhadap stres oksidatif pada lambung tikus Wistar jantan yang diinduksi streptozotocin sebagai model diabetes mellitus tipe 1. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Design* dan *Posttest Only Control Group*. Tigapuluh ekor tikus dibagi secara acak ke dalam lima kelompok yaitu: kelompok normal tanpa pemberian ALA (NTA), kelompok diabetes tanpa pemberian ALA (DTA), kelompok diabetes yang mendapatkan ALA 80 mg/kg BB/hari (DA80), 200 mg/kg berat badanBB/hari (DA200), dan 500 mg/kg BB/hari (DA500) yang diberikan peroral selama empat minggu. Pengukuran kadar MDA dengan reaksi *Thiobarbituric Acid* (TBA) secara spektrofotometri. Pengamatan histologi dilakukan pada preparat hematoksilin dan eosin. Rasio bobot lambung dari masing-masing kelompok tidak berbeda secara signifikan ($p = 0,188$). Kelompok DA200 menunjukkan kadar MDA terendah dibandingkan kelompok lain namun tidak signifikan ($p = 0,110$). Tidak ada perbedaan struktur mikroskopik lambung dari semua kelompok. Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak ada efek stres oksidatif pada lambung tikus diabetes dengan atau tanpa ALA peroral selama empat minggu.


Kata kunci: diabetes mellitus tipe 1, asam alfa lipoat, malondialdehida, lambung, peroral



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

## ABSTRACT

Mufiedah, Rizqi Nur. 2014. Effect of Alpha Lipoic Acid on Oxidative Stress in Gastric of Male Wistar Rats with Type 1 Diabetes Mellitus Model Induced by Streptozotocin. Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.S., Ph.D. (2) dr. Imam Sarwono, Sp.Pa.

Chronic diabetes conditions led to an increase of ROS and decrease of antioxidant. Increasing of free radicals can damage multiple organs, one of them is gaster. This study aims to determine the effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) on oxidative stress in male Wistar rats gaster induced by streptozotocin as a model for diabetes mellitus type 1. Study using True Experimental Design and Posttest Only Control Group. Thirty rats were randomly divided into five groups: normal group without ALA (NTA), diabetic group without ALA (DTA), diabetic group who received ALA 80 mg/kg BW/day (DA80), 200 mg/kg BW/day (DA200), and 500 mg/kg BW/day (DA500). MDA was determined by reaction with thiobarbituric acid (TBA) and measured with a spectrophotometry. Histological study were conducted on hematoxylin and eosin preparat. The gaster to body weight ratio of each group did not differ significantly ($p = 0.188$). DA200 group showed the lowest MDA levels than other groups but not significant ($p = 0.110$). There is no difference in the histology of structure of gaster in all groups. The conclusion is no effect of oxidative stress in gaster of diabetic rat with or without ALA orally for four weeks.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, alpha lipoic acid, malondialdehide, gastric histology



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

## DAFTAR ISI

Halaman


Halaman Judul ..... i
Halaman Pengesahan ..... ii
Kata Pengantar ..... iii
Abstrak ..... v
Abstract ..... vi
Daftar Isi ..... vii
Daftar Gambar ..... x
Daftar Tabel ..... xi
Daftar Lampiran ..... xii
Daftar Singkatan ..... xiii

**BAB I PENDAHULUAN**
1.1 Latar Belakang Masalah ..... 1
1.2 Rumusan Masalah ..... 4
1.3 Tujuan Penelitian ..... 4
1.4 Manfaat Penelitian ..... 5

**BAB II TINJAUAN PUSTAKA**
2.1 Diabetes mellitus ..... 6
2.2 Stres Oksidatif pada Diabetes Mellitus tipe 1 ..... 8
2.2.1 Jalur Poliol ..... 9
2.2.2 Pebentukan AGE ..... 10
2.2.3 Aktivasi Protein Kinase C ..... 13
2.2.4 Peningkatan Heksoamin ..... 14
2.2.5 Autooksidasi Gliseraldehid ..... 14
2.2.6 Jalur Mitokondria ..... 15
2.2.7 Gangguan Aktivitas Antioksidan Enzimatis ..... 16
2.3 Peroksidasi Lipid ..... 17
2.3.1 Proses peroksidasi lipid ..... 18
2.3.2 Efek Malondialdehid dalam tubuh ..... 19
2.3.3 Pembentukan Malondialdehid dalam tubuh ..... 20
2.3.4 Struktur Kimia Malondialdehid ..... 22
2.3.5 Penentuan Kadar Malondialdehid ..... 22
2.4.Stres Oksidatif pada Jantung ..... 23
2.5 Asam Alfa Lipoat ..... 24
2.5.1 Sumber Asam Alfa Lipoat ..... 24
2.5.2 Struktur Kimia Asam Alfa Lipoat ..... 25
2.5.3 Aktivitas Antioksidan Asam Alfa Lipoat ..... 26
2.5.3.1 Aktivitas Menangkap Radikal Bebas ..... 26
2.5.3.2 Regenerasi Antioksidan lain ..... 27
2.5.3.3 Khelatasi Logam ..... 28
2.5.3.4 Memperbaiki Protein yang Teroksidasi ..... 28
2.5.3.4 Regulasi Transkripsi Gen ..... 29
2.5.3.4 Hambatan Aktivasi NF-ƙB ..... 30

2.5.5 Dosis Suplemen Asam Alfa Lipoat ..... 30
2.5.6 Farmakokinetik Suplemen Asam Alfa Lipoat ..... 31
2.5.7 Keamanan dan Toksisitas ..... 32

**BAB III KERANGKA KONSEP**
3.1 Kerangka Konsep ..... 33
3.2 Hipotesis ..... 35

**BAB IV METODE PENELITIAN**
4.1 Rancangan Penelitian ..... 36
4.1.1 Rancangan Postest dengan Kelompok Kontrol ..... 36
4.1.2 Rancangan Sampel Acak Sederhana ..... 37
4.2 Subjek Penelitian ..... 38
4.2.1 Kriteria Inklusi dan Ekslusi ..... 38
4.2.1.1 Kriteria Inklusi ..... 39
4.2.1.2 Kriteria Ekslusi ..... 40
4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian ..... 40
4.3 Variabel Penelitian ..... 41
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian ..... 41
4.4.1 Lokasi Penelitian ..... 42
4.4.2 Waktu Penelitian ..... 42
4.5 Bahan dan Alat Penelitian ..... 42
4.5.1 Bahan Penelitian ..... 42
4.5.1.1 Makanan Tikus ..... 42
4.5.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1 ..... 43
4.5.1.3 Pemberian Suplemen ALA ..... 44
4.5.1.4 Pembuatan Slide Histologi ..... 44
4.5.1.5 Pengukuran MDA ..... 44
4.5.2 Alat Penelitian ..... 45
4.6 Definisi Operasional ..... 46
4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data ..... 46
4.7.1 Prosedur Penelitian ..... 47
4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba ..... 47
4.7.1.2 Induksi Diabetes Mellitus Tipe 1 ..... 47
4.7.1.3 Pemberian Suplemen ALA ..... 49
4.7.1.4 Pembedahan Hewan Coba ..... 50
4.7.1.5 Penimbangan Organ ..... 51
4.7.1.6 Pemeriksaan Histologi ..... 51
4.7.1.7 Pemeriksaan Kadar MDA ..... 52
4.7.2 Pengumpulan Data ..... 53
4.8 Kerangka Operasional ..... 55
4.9 Analisis Data ..... 56

**BAB V HASIL PENGAMATAN**
5.1 Rasio Bobot Lambung terhadap Berat Badan ..... 57
5.2 Kadar Malondialdehide (MDA) pada Lambung Tikus ..... 58
5.3 Pengamatan Struktur Lambung ..... 59

**BAB VI PEMBAHASAN**
6.1 Rasio Bobot Lambung terhadap Berat Badan ..... 63
6.2 Kadar Malondialdehide (MDA) pada Lambung Tikus..... 65
6.3 Pengamatan Struktur Lambung..... 66

**BAB VII PENUTUP**
7.1 Kesimpulan ..... 69
7.2 Saran ..... 69
**Daftar Pustaka** ..... 71
**Lampiran** ..... 76

# BAB I

# PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolik yang ditandai tingginya kadar glukosa darah akibat dari gangguan sekresi insulin, resistensi insulin, atau keduanya (American Diabetes Association, 2012). Diabetes tipe 1 adalah penyakit autoimun multi-faktorial yang ditandai oleh kerusakan sel β pankreas yang dimediasi oleh sel T. Kerusakan ini mengakibatkan penurunan produksi insulin oleh sel β pankreas (Al-Mutairi, 2007). Sedangkan pada diabetes tipe 2 terjadi kondisi hiperinsulinemia karena penurunan kerja insulin akibat berkurangnya sensitivitas insulin dalam mengaktivkan transport glukosa ke dalam otot rangka dengan atau tanpa penurunan sekresi insulin (Henriksen, 2011).

Onset diabetes mellitus tipe 1 dapat muncul pada usia berapapun biasanya pada usia kurang dari 30 tahun (Van Belle, 2011). Diabetes mellitus tipe 1 terjadi pada sekitar 5% dari keseluruhan kejadian diabetes mellitus, dengan 95% penyebabnya adalah autoimun dan 5% lainnya adalah non-imun (Khardori, 2003). Kecepatan kerusakan sel beta bervariasi pada masing-masing individu. Pada bayi dan anak-anak biasanya lebih cepat dibandingkan pada orang dewasa. Manifestasi awal pada beberapa pasien adalah ketoasidosis dan hiperglikemi pada kondisi puasa yang dapat berubah menjadi hiperglikemi parah dalam keadaan infeksi atau stres lain (American Diabetes Association, 2012).

Pada kondisi diabetes mellitus kronis terjadi peningkatan ROS dan penurunan antioksidan. Beberapa jalur yang dapat meningkatkan ROS antara lain *glucose autoxidation,* pembentukan A*dvance Glication End-product* (AGE), jalur poliol, serta peningkatan sirkulasi asam lemak bebas dan leptin (Jay et al, 2006). Antioksidan merupakan senyawa yang mengikat radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen. Molekul antioksidan yang ada dalam lambung antara lain GSH, SOD, katalase. Menurut Lorenzi (2007) penurunan aktivitas antioksidan ini diinduksi oleh kondisi hiperglikemi antara lain peningkatan jalur poliol dimana reduktase aldosa menggunakan NADPH yang berperan untuk regenerasi GSH dari GSSG (Pazdro, 2010).

Beberapa radikal bebas diproduksi secara normal oleh tubuh dalam kondisi fisiologis. Namun dalam kondisi sakit radikal bebas tersebut dapat mempercepat penuaan dan memediasi degradasi seluler (Vincent, 2004). Peningkatan produksi radikal bebas tanpa diimbangi aktivitas antioksidan akan menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif mempercepat progresifitas komplikasi diabetes mellitus. Radikal bebas dapat menyerang lipoprotein yang mengandung asam lemak takjenuh. Reaksi ini disebut dengan peroksidasi lipid (Ahmed, 2005). ROS dapat menginduksi pembentukan lipid peroksida yang dapat merusak sel karena *polyunsaturated fatty acids* didegradasi oleh peroksidasi lipid sehingga menyebabkan disrupsi dari integritas membrane (Yoshikawa, 1993). Kerusakan sel ini dapat dilihat dari gambaran histologi lambung. Beberapa marker dapat digunakan untuk memonitor pembentukan lipid peroksida antara lain MDA. *Malondialdehyde* (MDA) produk dari peroksidasi *Polyunsaturated Fatty Acid* utama yang mengindikasi peningkatan stres oksidatif (Wei, 2010).

Gejala gastrointestinal merupakan gejala yang cukup umum ditemukan pada pasien diabetes berkaitan dengan komplikasi neuropati. Gejala gastrointestinal yang muncul biasanya pada bagian atas dari gastrointestinal seperti mual, muntah. Gejala ini lebih sering muncul pada pasien dengan kadar glukosa darah yang tidak terkontrol (Bytzer, 2001). Peningkatan stres oksidatif dapat menyebabkan hilang atau rusaknya ICC (Interstitial Cells of Cajal) dan penundaan pengosongan lambung. ROS yang merupakan *second messenger* untuk mengaktifkan transkripsi faktor-faktor seperti faktor nuklear kappa B (NF-kB). ROS yang dihasilkan dalam jaringan lambung dapat memicu aktivasi NF-kB *signalling cascade,* sedangkan penundaan pengosongan lambung pada tikus diabetes mellitus terkait dengan inflamasi yang dimediasi aktivasi NF-kB (Qi-Hui Jin, 2013).

Pembentukan senyawa AGE pada diabetes menyebabkan penutupan kapiler dan penurunan GMBF yang pada akhirnya menyebabkan penurunan produksi mukosa lambung. Selain itu PKC, yang diaktifkan pada kondisi diabetes, mengatur biosintesis sitokin proinflamasi, Nitrit Oksida (NO), dan ROS serta mengaktifkan fosfolipase AE (PLPA2) yang kemudian menghidrolisa rantai asil di posisi kedua dari bagian gliserol fosfolipid dan mengganggu lapisan fosfolipid lendir lambung. Sitokin proinflamasi seperti TNF-α menginduksi reaksi inflamasi yang mengarah ke ulcer lambung. Peningkatan TNF-α dan kadar MDA menyebabkan adanya infiltrasi berat neutrofil. Selain itu ROS berperan pada kerusakan mukosa lambung melalui PARP *pathway* yang diaktivasi oleh kondisi stres oksidatif (Vador, 2012).

Beberapa penelitian telah menunjukkan efekstivitas antioksidan eksogen untuk terapi diabetes mellitus dan komplikasinya. ALA merupakan salah satu

antioksidan eksogen yang telah digunakan untuk pencegahan komplikasi diabetes mellitus. Berdasarkan Hoffman (1998), ALA dengan dosis 600 mg/hari secara peroral pada pasien diabetes tipe 1 dapat menghambat aktivasi NF-kB. Mekanisme ALA tersebut berhubungan dengan komplikasi diabetes pada lambung yaitu penundaan pengosongan lambung yang diaktivasi oleh NF-kB. Namun, tidak banyak penelitian yang menunjukkan efek ALA pada stres oksidatif pada lambung.

Penelitian ini menggunakan tikus diabetes mellitus tipe 1 dengan pemberian suplemen ALA dosis 80 mg/kg, 200 mg/kg, dan 500 mg/kg berat badan per hari. Pemilihan ketiga dosis tersebut berdasarkan tiga penelitian berbeda yang menilai efek ALA terhadap stres oksidatif pada jantung tikus diabetes mellitus. Pada penelitian terhadap jantung tikus dengan ketiga dosis tersebut tidak terlihat adanya perbaikan kondisi jantung. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah ada pengaruh dari ketiga dosis tersebut terhadap kadar MDA dan gambaran histologi lambung.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah timbul efek terhadap stres oksidatif pada lambung tikus diabetes mellitus tipe 1 setelah diberikan suplemen ALA pada masing-masing dosis?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek suplemen ALA terhadap stres oksidatif lambung tikus diabetes mellitus tipe 1 pada masing-masing dosis.

### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui efek ALA terhadap stres oksidatif pada lambung tikus diabetes mellitus tipe 1 setelah diberikan ALA dalam jangka waktu singkat.
2. Mengetahui efek masing-masing dosis ALA terhadap stres oksidatif pada lambung tikus diabetes mellitus tipe 1.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat mengetahui efek ALA terhadap parameter stres oksidatif pada lambung tikus diabetes mellitus tipe 1 dan pengaruh dosis terhadap efek yang ditimbulkan setelah diberikan dalam jangka waktu yang singkat.
2. Sebagai syarat untuk mendapatkan gelar sarjana farmasi.

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus gangguan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia kronis karena gangguan kerja insulin. Gangguan kerja insulin tersebut menyebabkan gangguan seluruh sistem metabolisme. Termasuk metabolism karbohidrat, lemak, dan protein. Gangguan kerja insulin disebabkan oleh penurunan sekresi insulit (absolut maupun relatif) dan penurunan sensitivitas insulin di sel organ target (Seino dkk, 2010). Diabetes mellitus (tipe 1 dan 2) dapat menyebabkan komplikasi kesehatan yang serius termasuk ketoasidosis, gagal ginjal, penyakit jantung, stroke, dan kebutaan (Van Belle dkk, 2011). Komplikasi mikrovaskular seperti retinopati, neuropati, dan nefropati merupakan salah satu penyebab utama kematian pada pasien (Jay et al, 2006). Peningkatan ROS pada komplikasi microvaskular merupakan akibat dari hiperglikemia intrasel sedangkan pada komplikasi macrovaskular ini disebabkan oleh peningkatan oksidasi asam lemak (Giacco, 2010).

Stres oksidatif di sistem seluler terjadi ketika produksi radikal bebas melebihi kapasitas antioksioksidan pada sistem tersebut (Vincent dkk, 2004). Mekanisme stres oksidatif dalam patogenesis diabetes mellitus tidak hanya melalui radikal bebas oksigen, tetapi juga melalui glikosilasi protein nonenzimatik, auto-oksidasi glukosa, gangguan metabolisme glutation, gangguan enzim

antioksidan, pembentukan lipid peroksida, dan penurunan kadar asam askorbat (Moussa, 2008).

Diabetes mellitus tipe 1 adalah penyakit autoimun multifaktorial yang ditandai dengan defisiensi insulin, sebagai akibat dari kerusakan sel beta pankreas yang dimediasi oleh sel T. Kebanyakan kasus diabetes mellitus tipe 1 terbukti adanya kerusakan sel beta akibat mediasi sistem imun (tipe 1a), sedangkan sekitar 10-20% tidak terdeteksi adanya antibodi dan dikenal dengan idiopatik (tipe 1b). Terdapat dua mekanisme dari onset diabetes tipe 1. Pertama, adanya faktor lingkungan yang memicu proses autoimun, kebanyakan pada anak sebelum usia sepuluh tahun. Mekanisme kedua memperkirakan bahwa reaksi superantigen menghasilkan kerusakan sel beta pankreas secara cepat mengarah ke penyakit klinis (Al-Mutairi, 2007).

Terapi dengan insulin pengganti dari luar tubuh telah digunakan untuk mengontrol kadar gula pada pasien diabetes. Namun terapi insulin biasanya hanya memperpanjang usia hidup sekitar sepuluh tahun (Belle, 2010). Adanya fenomena *glycemic memory* pada diabetes mellitus menyebabkan komplikasi dapat tetap berkembang setelah kadar gula darah terkoreksi dan mendekati normal. *Glycemic memory* dikarenakan adanya perubahan epigenetic persisten yang disebabkan oleh produksi superoksida mitokondria diinduksi oleh hiperglikemi. Perubahan epigenetic dan peningkatan ekspresi p65 yang diinduksi hiperglikemi dicegah oleh normalisasi produksi superoksida mitokondria atau superoksida yang menginduksi metilglyoksal (Giacco dan Brownlee, 2011).

Terapi diabetes intensif dilakukan untuk mencapai kadar glukosa yang mendekati normal sehingga menurunkan resiko komplikasi mikrovaskuler dan neurologis pada diabetes tipe 1. Terapi diabetes intensif memiliki efek jangka

panjang yang menguntungkan, antara lain penurunan resiko komplikasi kardiovaskuler pada pasien diabetes tipe 1. Terapi intensif terdiri dari tiga atau lebih injeksi insulin perhari atau dengan pompa insulin eksternal, dengan penyesuaian dosis berdasarkan setidaknya empat hasil monitoring kadar glukosa individual perhari. Target kadar glukosa harian adalah glukosa sebelum makan 70-120 mg/dL (3,9 – 6,7 mmol/L) dan kadar puncak postprandial kurang dari 180 mg/dL (10,0 mmol/L). Sedangkan target $HbA_{1C}$ adalah kurang dari 6,05% (DCCT Study Control Group, 2005).

**2.2. Stres Oksidatif pada Diabetes Mellitus tipe 1**

Stres oksidatif merupakan faktor resiko utama dalam onset dan perkembangan komplikasi diabetes. Stres oksidatif disebabkan produksi berlebihan dari *Reactive Oxigen Spesies* (ROS) akibat dari kondisi hiperglikemi. Implikasi dari stres oksidatif pada perkembangan komplikasi diabetes tidak hanya oleh ROS, namun juga dikarenakan glikosilasi protein nonenzymatik, auto-oksidasi glukosa, gangguan metabolism glutation, gangguan enzim antioksidan, dan pembentukan peroksidasi lipid (Samarghandian, 2013).

Terdapat beberapa sumber dari stres oksidatif pada diabetes mellitus antara lain enzimatis, nonenzimatis, dan jalur mitokondria (Tabak et al, 2011). Hal ini diduga terjadi melalui beberapa mekanisme, termasuk peningkatan *polyol pathway flux*, peningkatan pembentukan intraselular *advanced glycation end-products*, aktivasi protein kinase C, atau produksi berlebih superoksida oleh rantai transpor elektron mitokondria (Jay et al, 2006).

### 2.2.1 Jalur Poliol

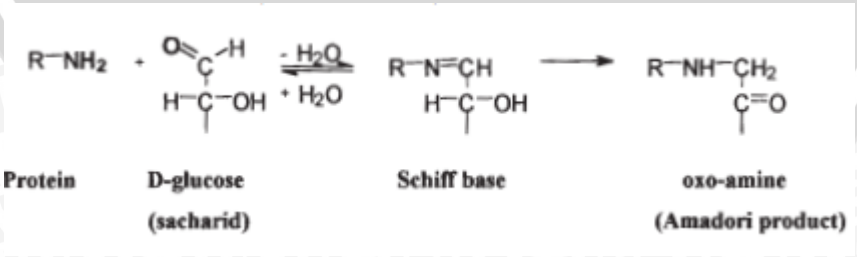
Pada kondisi normal, sebagian besar glukosa difosforilasi menjadi *glucose-6-phosphate* oleh heksokinase dan hanya 3% dari glukosa yang diubah menjadi sorbitol melalui jalur poliol. Reaksi ini dikatalis oleh enzim *aldose reducatse*. Sorbitol kemudian diubah menjadi fruktosa oleh enzim *sorbitol dehydrogenase* dan membutuhkan NAD+ sebagai kofaktor. Namun pada kondisi hiperglikemi, *hexosamine* tersaturasi dan kelebihan glukosa akan dimetabolisme melalui jalur poliol (30%) sehingga menyebabkan produksi sorbitol dan fruktosa berlebihan yang menyebabkan gangguan metabolik dan kerusakan jaringan (Negi, 2011). Peningkatan kadar sorbitol disertai dengan penurunan *myoinositol* intrasel yang berperan dalam transduksi sinya intrasel dan meregulasi aktivitas Na+/K+ ATPase (Otto-Buczkowska, 2010).

Fungsi utama dari aldose reductase adalah untuk mengurangi jumlah aldehid toksik yang dibentuk oleh ROS atau substrat lain menjadi alkohol inaktif (Rains dan Sushil, 2011). Enzim *aldose reductase* pada jalur poliol, menggunakan NADPH untuk mereduksi glukosa menjadi sorbitol sehingga menurunkan kadar NADPH (Jay et al, 2006). NADPH merupakan kofaktor penting untuk pembentukan GSH (Rains dan Sushil, 2011). Penurunan kadar GSH kemudian berdampak terhadap penurunan kadar NO dengan penurunan GSNO. Sehingga terjadi kondisi *redox stress* (ketidakseimbangan redoks dalam sel) yang menyebabkan stres oksidatif (Giacco dan Brownlee, 2010). Enzim lain pada jalur poliol adalah *sorbitol dehydrogenase*. Enzim ini mengubah sorbitol menjadi fruktosa dengan produk sampingan NADH. Peningkatan NADH ini kemudian digunakan oleh NAD(P)H oksidase untuk memproduksi superoksida dan dapat menginduksi produksi superoksida di mitokondria (Jay dkk, 2006).

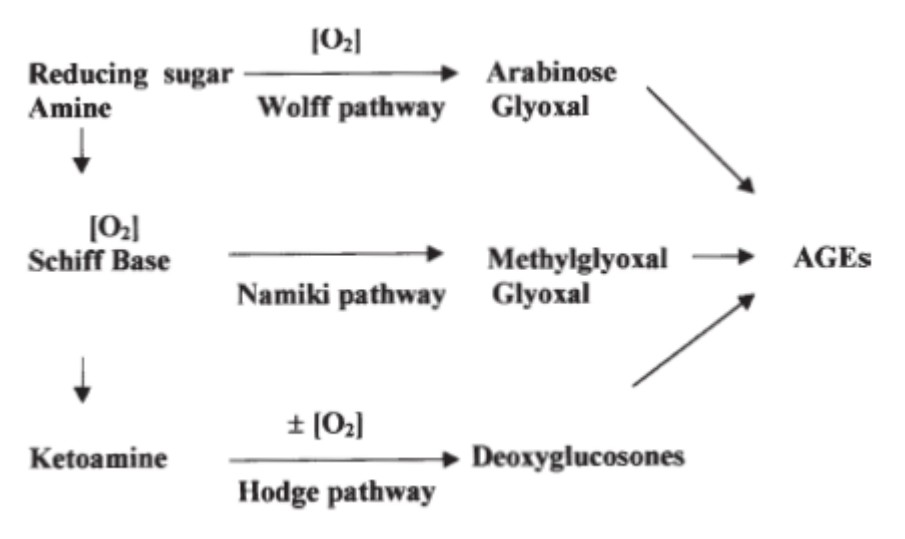
Peningkatan sorbitol dan konversinya menjadi fruktosa meningkatkan rasio NADH:NAD+, yang menyebabkan aktivasi PKC dan hambatan terhadap enzim G*lyceraldehyde-3-Phospate Dehidrogenasi* (GADPH) (Rains dan Sushil, 2011).

### 2.2.2 Pembentukan AGE

AGE dibentuk melalui ikatan kovalen antara aldehid atau keton dari gula tereduksi dengan protein kelompok asam amino bebas, membentuk sebuah *Schiff's base*. *Schiff's base* kemudian secara spontan membentuk menjadi produk amadori, yang merupakan ketoamin yang lebih stabil. Produk amadori kemudian dapat diubah secara langsung menjadi AGEs atau melalui auto-oksidasi membentuk *carbonil intermediate* yang reaktif. Glukosa sendiri juga dapat secara langsung megalami auto-oksidasi untuk membentuk *carbonil intermediate* yang reaktif, yang mana *glyoxal* dan *methyl-glyoxal* adalah dua produk antara utama. *Carbonil intermediate* yang reaktiv ini kemudian melengkapi rekasi kimia kompleks membentuk AGE yang irreversible (Rains dan Sushil dkk, 2011). Adanya beberapa jalur pembentukan AGE memiliki beberapa struktur kimia yang berbeda. *Carboxymethyl-lysine* (CML), *pentosidine*, *pyrraline,* serta *methylglyoxal* (sebuah *α-oxaldehyde*) digunakan sebagai biomarker pembentukan AGE *in vivo* (Luevano-Contreras, 2010).




Gambar 2.1. Pembentukan Produk Amadori
Keterangan: gugus amino bebas dari protein bereaksi secara perlahan dengan gugus karbonil dari gula tereduksi, misalnya glukosa, menghasilkan *Schiff base*, yang kemudia mengalami penataan ulang Amadori menjadi derivatif ketoamin yang lebih stabil.

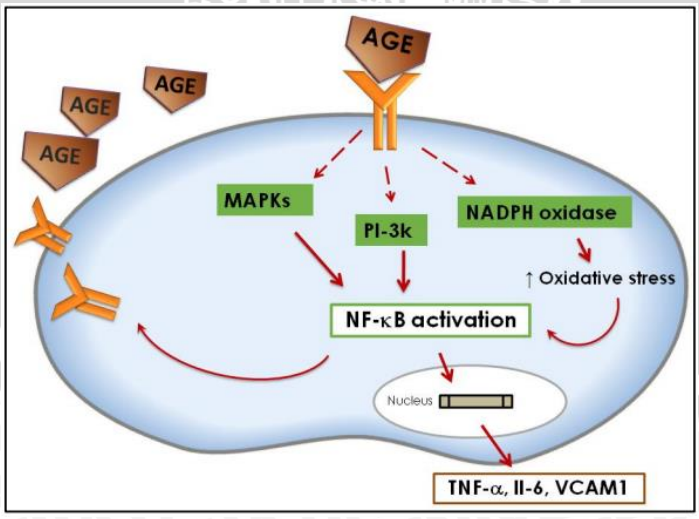



Gambar 2.2. Pembentukan AGE
Keterangan: melalui jalur *Wolff* glukosa mengalami autoxidasi dengan katalis logam menghasilkan precursor karbonil reaktif dari AGE seperti *Arabinose* dan *Glyoxal. Schiff base* melalui jalur *Namiki* juga dapat difragmentasi menjadi *Methylglyoxal* dan *Glyoxal.* Produk Amadori terdegradasi melalui penataan ulang dan autooksidasi (jalur *Hodge*) menjadi senyawa α-dikarbonil.yang kemudian membentuk AGE.

Pada diabetes, jumlah AGEs di matriks ekstra sel meningkat. Produksi prekursor AGE di intrasel dapat merusak sel melaului tiga mekanisme umum. Pertama, AGEs memodifikasi protein intrasel sehingga mengganggu fungsinya. Kedua, prekursor AGE memodifikasi komponen matriks ekstrasel sehingga berinteraksi secara abnormal dengan komponen matriks lainnya dan dengen matriks reseptor (integrins) yang diekspresikan di permukaan sel. Akhirnya, protein plasma yang telah dimodifikasi oleh prekursor AGE berikatan dengan reseptor AGE di sel seperti makrofag, sel endotel pembuluh darah, dan otot polos pembuluh darah. Ikatan antara AGE dengan reseptornya menginduksi produksi ROS, yang kemudian mengaktivasi faktor transkripsi pleiotropik (NF)-ƙB, menyebabkan beberapa perubahan patologis pada ekspresi gen (Giacco dan Brownlee, 2010). Stimulasi dari RAGE terhadap produkfi ROS kemungkinan

melalui NAD(P)H oksidase, aktivasi *subsequent redox-sensitive transcription factors* dan ekspresi dari mediator inflamasi (Jay dkk, 2006).

AGE dapat memberikan efek biologis melalui dua mekanisme, yaitu tidak bergantung pada reseptor, dengan merusak struktur protein dan metabolism ekstraseluler, dan dengan berikatan dengan reseptornya (RAGE) (Gambar 2.3). interaksi AGE dengan reseptor RAGE memicu aktivasi *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) dan jalur *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3-K) yang akan mengaktivasi faktor transkripsi NF-ƘB (*Nuclear Factor Kappa B*). Setelah aktivasi, NF-ƘB bertranslokasi ke nukleus sehingga mengaktivasi transkripsi gen untuk sitokin, *growth factor*, dan molekul adesif, seperti TNFα, interleukin 6, dan VCAM 1. Aktivasi NF-ƘB meningkatkan ekspresi RAGE, membuat siklus *feedback* positif yang meningkatkan promotor inflamasi. Selain itu, interaksi AGE-RAGE mengaktifkan NAD(P)H oksidase sehingga meningkatkan stres oksidatif. Sedangkan stres oksidatif tersebut juga mengaktifkan NF-ƘB (Luevano-Contreras, 2010).




Gambar 2.3. Mekanisme Kerja AGE di Sel (Luevano-Contreras, 2010).

### 2.2.3 Aktivasi Protein Kinase C

PKC terdiri dari setidaknya sebelah isoform yang tersebar secara luas di jaringan tubuh mamalia. Aktivitas PKC bergantung pada ion $Ca^{2+}$ dan *phosphatidylserine* (Giacco dan Brownlee, 2010). PKC diaktifkan oleh *lipid second messenger di-acyl glycerol* (DAG). Aktivasi PKC memodulasi berbagai faktor transkripsi, misalnya NF-ƘB *signaling* menyebabkan inflamasi (Negi, 2011). Aktivasi beberapa isoform PKC yang persisten dan berlebihan merupakan jalur utama ketiga dalam mediasi kerusakan jaringan akibat diabetes yang diinduksi ROS. Kerusakan jaringan ini merupakan hasil utama dari peningkatan sintesis de novo DAG dari glukosa melalui fosfat triose, yang ketersediaannya meningkat karena peningkatan ROS menghambat aktivitas enzim glikolitik GAPDH, meningkatkan jumlah DAG prekursor triose fosfat intraselular. Selain itu, ikatan antara AGE dengan reseptornya di permukaan sel juga dapat meningkatkan aktivasi isoform PKC (Giacco, 2010). Aktivasi PKC juga dapat terjadi akibat influx dari jalur poliol (Rains dan Sushil, 2011).

Pada kondisi hiperglikemi, PKC-α merupakan aktivator kuat dari NADPH oksidase, yang dapat dihambat oleh α-tokoferol. PKC- α dan PKC-δ dapat mengaktifkan NADPH oksidase yang kemudian bertanggung jawab untuk menginduksi ekspresi TLR-2 dan TLR-4 dalam kondisi glukosa tinggi. Perubahan ini meningkatkan stres oksidatif dengan produksi ROS secara langsung maupun tidak langsung dengan mengkatifkan jalur lain. PKC aktif meningkatkan stres oksidatif dengan mengaktifkan NF-ƘB dan berbagai membran terkait NADPH oksidase (Rains dan Sushil, 2011).

### 2.5.4 Peningkatan Heksosamin

Hiperglikemia dan resistensi insulin yang disebabkan kelebihan oksidasi asam lemak berkontribusi dalam patogenesis komplikasi diabetes dengan meningkatkan aliran *fructose 6-phophate* ke jalur heksosamin. *Fructose 6-phophate* diubah oleh *Glutamine:Fructose 6-Phosphate Amidotransferase (GFAT)* menjadi glukosamin 6-fosfat yang kemudian diubah menjadi *UDP-NAcetylglucosamine* (Giacco dan Brownlee, 2010). Selanjutnya *UDP-NAcetylglucosamine* membantu sintesis proteoglikan dan pembentukan *O-linked glycoproteins*. Jalur ini mengakibatkan peningkatan transkripsi dari *Transforming Growth Factor* (TGF-α dan TGF-β1) dan *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) serta resistensi insulin. Hambatan terhadap GFAT memblok transkripsi dari TGF-α, TGF-β1, dan PAI-1. Glukosamin meningkatkan kadar $H_2O_2$ dan antioksidan menghambat efek ini. Ekspresi dari TGF-β1 dan PAI-1 berperan dalam perkembangan komplikasi diabetes. Kedua faktor tersebut dipengaruhi oleh peningkatan heksosamin *shunt* maupun oleh aktivasi PKC (Negi, 2011).

### 2.5.5 Autoksidasi Gliserahdehid

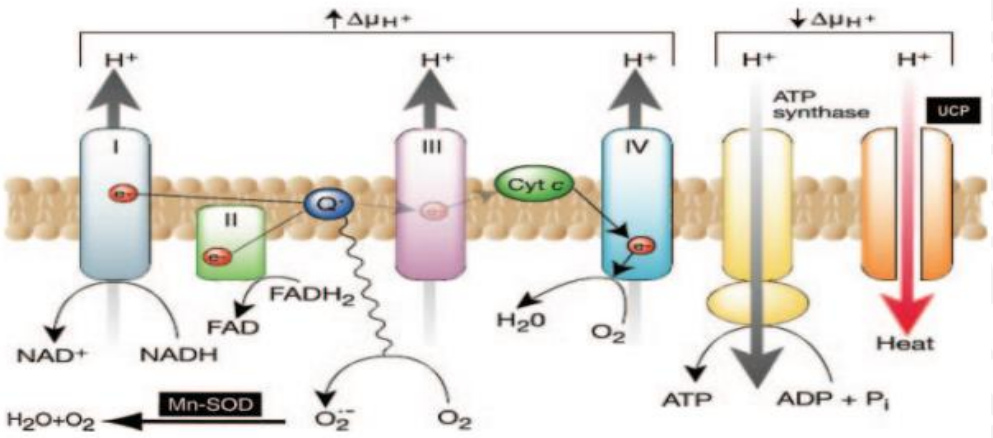
Gliseraldehid 3-fosfat merupakan produk fosforilasi glukosa melalui proses glikolisis aerob. Dihidroksiaseton fosfat juga berkontribusi dalam peningkatan konsentrasi gliseraldehid melalui konversi enzimatis oleh trios-fosfat isomerase. Gliseraldehid 3-fosfat dioksidasi oleh *Gliseraldehida-Fosfat Dehydrogenase* (GAPDH). Kelanjutan glikolisis ini menghasilkan piruvat, yang masuk ke mitokondria lalu teroksidasi menjadi asetil-CoA, dan proses siklus asam trikarboksilat dan fosforilasi oksidatif dimulai (Robertson, 2004).

Pada kondisi hiperglikemi, jalur glikolisis dari glukosa mengambil jalur alternatif melalui autooksidasi gliseradehid 3-fosfat. Autooksidasi dari α-

hidroksialdehid menghasilkan dua senyawa yang berpotensi toksik yaitu Hidrogen Peroksida ($H_2O_2$), yang membentuk ROS, dan α-ketoaldehid, yang berperan dalam glikosilasi protein. Gliseraldehid dalam jumlah berlebihan dapat menghambat sekresi insulin (Shubha dan Souza, 2012).

### 2.5.6 Jalur Mitokondria

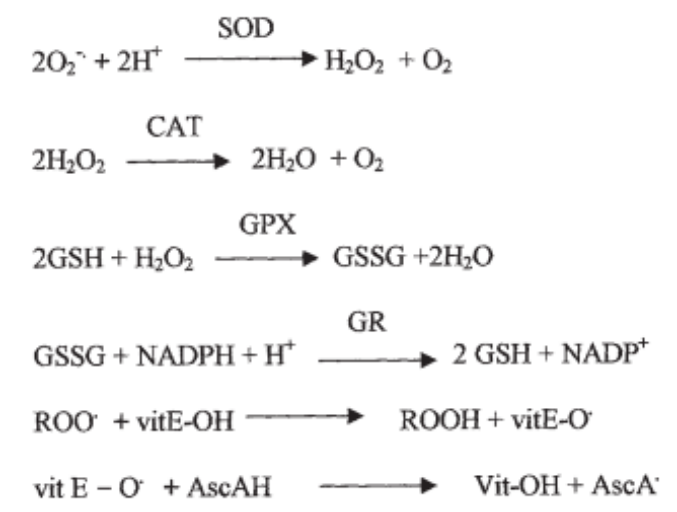
Superoksida adalah awal dari radikal bebas oksigen yang dibentuk oleh mitokondria, yang kemudian dikonversi menjadi bentuk yang lebih reaktif yang dapat merusak sel-sel dengan berbagai cara. Produksi superoksida berlebih oleh mitokondria terjadi pada kondisi diabetes. Pada kondisi normal, transfer elektron melalui kompleks I, III, dan IV mengeluarkan proton ke ruang intermembran, menghasilkan gradien proton yang mendorong ATP sintase (kompleks V) mengembalikan proton ke dalam matriks. Sebaliknya, dalam sel diabetes dengan konsentrasi glukosa intraseluler tinggi, terdapat lebih banyak piruvat turunan glukosa yang teroksidasi dalam siklus TCA, meningkatkan aliran donor elektron (NADH dan $FADH_2$) ke rantai transpor elektron. Akibatnya, terjadi peningkatan gradien tegangan melintasi membran mitokondria meningkat sampai ambang batas kritis. Pada titik ini, transfer elektron dalam kompleks III diblokir, menyebabkan electron kembali ke koenzim Q, yang kemudian mendonorkan electron tersebut ke molekul oksigen, sehingga menghasilkan superoksida (Giacco dan Brownlee, 2010).




Gambar 2.4 Produksi ROS melalui Jalur Mitokondria
Keterangan: donor elektron terbentuk melalui oksidasi piruvat. Aliran elektron melalui ETC di membran dalam mitokondria memompa ion $H^+$ ke ruang intermembran. Ketika gradient tegangan tinggi akibat peningkatan aliran elektron, lebih banyak superoksida yang diproduksi. Ion $H^+$ dapat kembali melewati membran dalam melalui ATP sintetase (menghasilkan ATP) atau melalui UCPs yang mengubah energy dari gradien proton menjadi panas (Giacco dan Brownlee, 2010).

### 2.5.7 Gangguan Antioksidan Enzimatis

Sel dan jaringan mengandung mekanisme pertahanan antioksidan, yang membantu dalam mencegah penumpukan ROS dan menjaga keseimbangan redoks dari sel atau jaringan. Glikasi enzim antioksidan selama hiperglikemia dapat mengganggu mekanisme pertahanan seluler, yang mengarah ke pengembangan stres oksidatif dan perkembangan komplikasi diabetes (Rains dan Sushil, 2011). Berikut proses penangkapan ROS oleh antioksidan (Jakus, 2000).




Gambar 2.5. Proses Penangkapan Radikal Bebas oleh Antioksidan (Jakus, 2000).

Kondisi diabetes terjadi penurunan kadar antioksidan seperti GSH, vitamin C, dan vitamin E. Glikasi enzim antioksidatif saat kondisi hiperglikemia dapat merusak mekanisme pertahanan seluler, menyebabkan pengembangan stres oksidatif dan keparahan komplikasi diabetes. Glikasi protein tidak hanya menurunkan aktivititas antioksidan tapi juga mempengaruhi fungsi normal dari protein lainnya, mengakibatkan gangguan fungsi seluler pada diabetes (Rains dan Sushil, 2011).

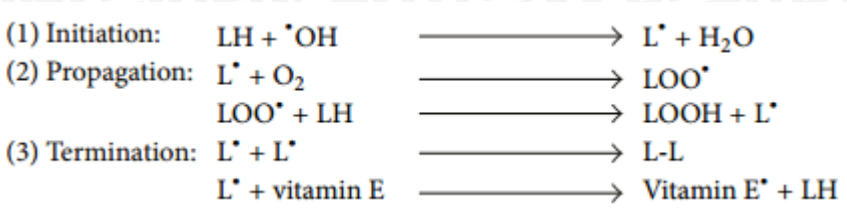
**2.3. Peroksidasi Lipid**

Peningkatan kadar stres oksidatif secara abnormal dan penurunan mekanisme pertahanan antioksidan menyebabkan kerusakan seluler, peningkatan peroksidasi lipid, serta pengembangan komplikasi diabetes (Moussa, 2008). Peroksidasi lipid dari *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA), adalah salah satu reaksi radikal *in vivo*, yang dapat mencerminkan peningkatan stres oksidatif pada diabetes (Jakus, 2000). ROS menyebabkan peroksidasi lipid di membran sel dan mengaktivasi oksidasi LDL yang toksik terhadap endotelium

(Otto-Buczkowska, 2010). Peroksidasi lipid meningkatkan permeabilitas membran, dengan mengganggu penyusunan protein, sehingga menyebabkan kematian sel. Peroksidasi lipid di membran sel menyebabkan hilangnya integritas dan viabilitas sel, dan juga mengganggu sinyal sel, dan akhirnya terjadi disfungsi jaringan (Ilie dan Denisa, 2012).

### 2.3.1 Proses Peroksidasi Lipid

Proses peroksidasi lipid terdiri dari tiga langkah, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Langkah pertama, inisiasi, penarikan atom hidrogen oleh radikal bebas seperti hidroksil ($^{\cdot}OH$), alkoksil ($RO^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), dan $H_2O^{\cdot}$. Reaksi awal antara $^{\cdot}OH$ dengan *Polyunsaturated Fatty Acids* menghasilkan radikal lipid ($L^{\cdot}$). Senyawa ini kemudian bereaksi dengan oksigen molekular membentuk peroksiradikal lipid ($LOO^{\cdot}$) di tahap propagasi. $LOO^{\cdot}$ kemudian menarik sebuah atom hidrogen dari molekul asam lemak terdekat dan menghasilkan lipid hidroksiperoksida (LOOH) dan secara bersamaan membentuk radikal lipid kedua. LOOH selanjutnya dapat dipecah oleh logam tereduksi, misalnya $Fe^{2+}$, membentuk radikal lipid alkoksil ($LO^{\cdot}$). Selain itu, LOOH juga dapat dipecah menjadi produk aldehid yang reaktif atau LDAs termasuk MDA, HNE, ONE, 4-HHE, dan akrolein dengan adanya logam tereduksi atau askorbat. Langkah ketiga adalah terminasi yang berhubungan dengan pembentukan hidroksiperoksida melalui reaksi antara radikal peroksil dengan α-tokoferol. Terminasi juga dapat terjadi ketika radikal lipid ($L^{\cdot}$) bereaksi dengan peroksida lipid atau ketika dua molekul peroksida bergabung dan menghasilkan spesies LOOL yang tidak reaktif atau turunan hidroksilat (LOH), yang relatif stabil (Yadav dan Kota, 2013).




Gambar 2.6. Proses Peroksidasi Lipid
Keterangan: Tiga langkah reaksi radikal bebas menginisiasi peroksidasi lipid (LH) mengakibatkan pembentukan molekul lipid reaktif ($LOO^{\cdot}$) yang membentuk aldehid (berasal dari lipid) seperti HNE, *acrolein*, MDA, dan HHE (Yadav dan Kota, 2013).

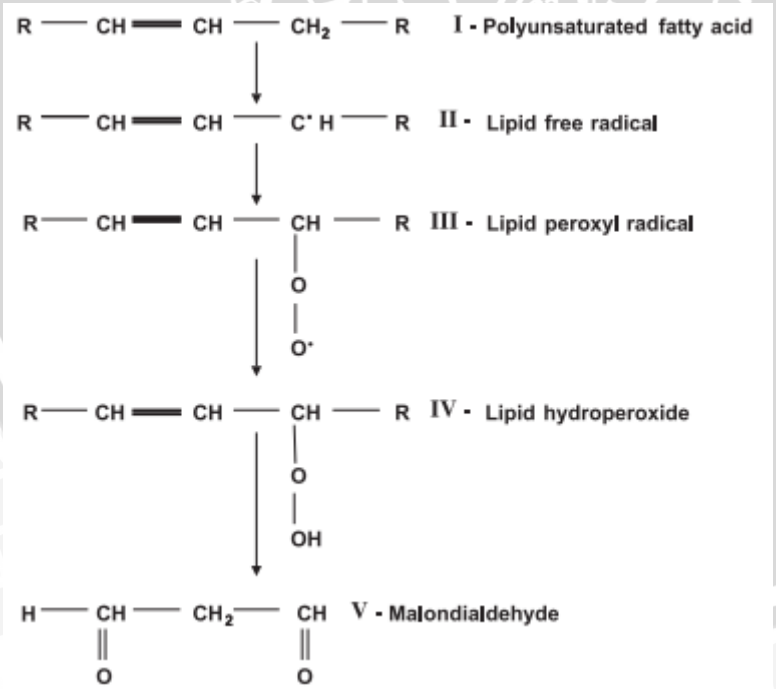
Produk dari peroksidasi lipid antara lain MDA, 4-HNE, hidroksiperoksida, *conjugated dienes*, F2-isoprotana, dan asam dikarboksilat. Malondialdehid (MDA) adalah produk yang sangat beracun. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa konsentrasi MDA meningkat pada diabetes mellitus, berhubungan dengan kegagalan mengontrol kadar glukosa. 4-HNE bereaksi dengan lisin dari protein membentuk *pirroles*. F2-isoprotana sebagai marker *in vivo* peroksidasi lipid. Menurut penelitian Davi dkk, terjadi peningkatan kadar F2-isoprotana di plasma dan di urin pada baik pada diabetes tipe 1 maupun diabetes tipe 2 (Jakus, 2000).

### 2.3.2 Efek Malondialdehid dalam Tubuh

MDA merupakan kontributor penting dalam kerusakan DNA dan mutasi. MDA memiliki sifat mutagenik dan genotoksik yang dapat menyebabkan kanker. MDA bereaksi dengan asam nukleat *base* pada pH fisiologis dan membentuk *adduct* dengan *deoxyguanosine* (dG), *deoxyadenosine* (dA) and *deoxycytidine* (dC), seperti *pyrimido [1,2α]purin-10(3H)-one* ($M_1G$), $N^6$*-(3-oxopropenyl) deoxyadenosine* ($M_1A$) dan $N^4$*-(3-oxopropenyl-deoxycytidine* (M1C). Efek toksik lain dari MDA yaitu *cross-linking* dengan kolagen, yang dapat mengakibatkan kekakuan jaringan kardiovaskular (Grotto dkk, 2009).

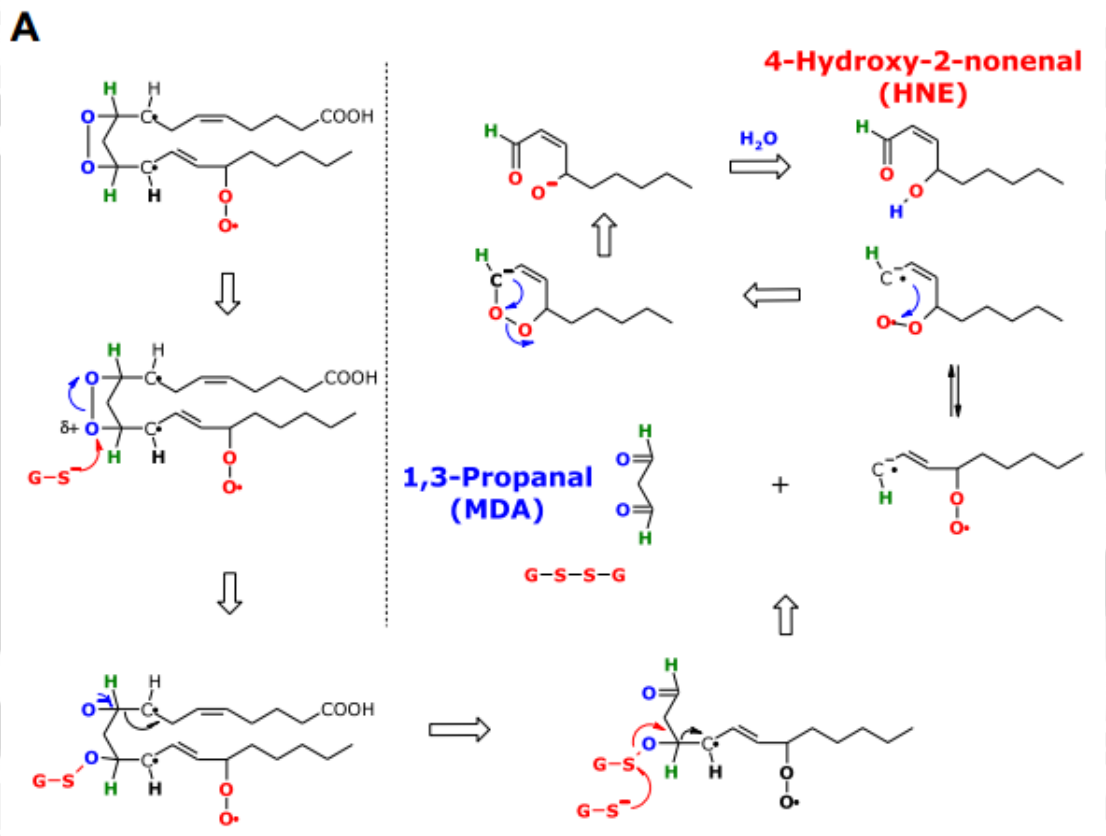
### 2.3.3 Pembentukan Malondialdehid dalam Tubuh

Proses pembentukan MDA dalam tubuh ditunjukkan oleh gambar 2.7. Ikatan rangkap antara karbon-karbon pada *Polyunsaturated Fatty Acid* merupakan target dari spesies reaktif (I). Ikatan rangkat tersebut melemahkan ikatan antara karbon-hidrogen, sehingga mempermudah pemisahan hidrogen oleh radikal bebas dan membentuk radikal bebas lipid (II). Radikal bebas lipid melalui oksidasi membentuk sebuah radikal peroksil (III). Radikal peroksil dapat bereaksi dengan *polyunsaturated fatty acid lain*, memecah satu elektron dan menghasilkan sebuah hidroperoksida lipid (IV) dan radikal bebas lipid lain. Proses ini dapat diperbanyak secara terus menerus dalam reaksi berantai. Hidroperoksida lipid tidak stabil dan terfragmentasi menghasilkan produk seperti malondialdehid (V) dan 4-hidroksi-2-nonenal (Grotto dkk, 2009).




Gambar 2.7. Pembentukan MDA (Grotto dkk, 2009)

Pembentukan MDA *in vivo* juga dapat terjadi melalui proses enzimatis yang melibatkan prostaglandin (Ilie dan Denisa, 2012). Pembentukan MDA melalui jalur tersebut diinduksi oleh GSH. Serangan nukleofilik dari GSH tiolat pada elektropositif atom O pada C-11 dari gugus 9,11-peroksida dari asam amino intermediet menghasilkan MDA dan HNE secara bersamaan dalam jumlah stokiometrik (Tsikas dkk, 2012).




Gambar 2.8 Pembentukan MDA diinduksi oleh GSH (Tsikas dkk, 2012)

Berikut reaksi stokiometri pembentukan MDA (reaksi 1 dan 3) dengan GSH berfungsi sebagai reduktor (reaksi 1-3) dan sebagai katalisator (reaksi 4) (Tsikas dkk, 2012):

AA-Triradical + 2GSH → MDA + HNE + GSSG (1)

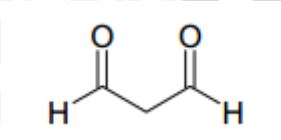
AA-Triradical + 6GSH → 15(S)-8-iso-$PGF_{2\alpha}$ + 3 GSSG (2)

AA-Monoradical + 2GSH → MDA + HHTrE + GSSG (3)

$PGH_2$ + [GSH] → $TxA_2$ + [GSH] (4)

### 2.3.4 Struktur Kimia Malondialdehid

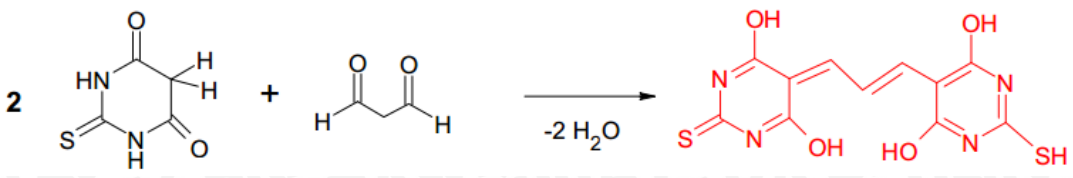
MDA memiliki rumus kimia $C_3H_4O_2$, merupakan senyawa dengan tiga karbon dan memiliki berat molekul kecil (Grotto dkk, 2009).



Gambar 2.9. Struktur Malondialdehid (Ilie dan Denisa, 2012).

### 2.3.5 Penentuan Kadar Malondialdehid

Penentuan kadar Malondialdehid salah satunya melalui kondensasi dengan *Thiobarbituric Acid* (TBA) membentuk kompleks berwarna merah yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer atau spektrofotometer florosense (Ilie dan Denisa, 2012). Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran menggunakan spektrofotometer uv adalah 532-535 nm. Permasalahan dari pemeriksaan menggunakan metode ini adalah kurangnya sensitivitas. Hal ini karena TBA juga bereaksi dengan aldehid lain dari hasil peroksidasi lipid (Karatas, 2002). Kekurangan tersebut dapat diminimalisir dengan pengaturan kondisi reaksi, misalnya pemanasan, yang menyebabkan degradasi molekul sampel yang lain, sehingga meningkatkan jumlah MDA yang dapat berinteraksi dengan TBA (Ilie dan Denisa, 2012). Berikut mekanisme reaksi pembentukan TBARS:




Gambar 2.10. Mekanisme Pengukuran TBARS (Ilie Dan Denisa, 2012).

## 2.4. Stres Oksidatif pada Lambung

Komplikasi mikrovaskular seperti retinopati, neuropati, dan nefropati merupakan salah satu penyebab utama kematian pada pasien (Jay et al, 2006). Peningkatan ROS pada komplikasi microvaskular merupakan akibat dari hiperglikemia intrasel sedangkan pada komplikasi macrovaskular ini disebabkan oleh peningkatan oksidasi asam lemak (Giacco, 2010). Diabetes mellitus berhubungan dengan peningkatan kejadian gejala gastrointestinal bagian atas maupun bawah. Efek ini kemungkinan berkaitan dengan rendahnya control kadar glukosa darah pada kondisi diabetes (Bytzer dkk, 2001). Paparan stres oksidatif pada mukosa lambung, yang diinduksi oleh oklusi dari *celiac artery*, menyebabkan pembentukan peroksida lipid, yang ditunjukkan oleh peningkatan kadar MDA di jaringan serta gangguan system pertahanan antioksidatif, seperti penurunan aktivitas SOD (Kwiecien dkk, 2002). Berdasarkan penelitian De Block dkk (2002), lebih dari separuh pasien diabetes mellitus mengalami perlambatan pengosongan lambung. Kadar $HbA_{1C}$ merupakan faktor resiko terjadinya perlambatan pengosongan lambung.

Diabetik gastroparesis berhubungan dengan hilangnya *Interstitial Cells of Cajal* (ICCs). ROS dapat merusak secara langsung pada kandungan penting dari sel seperti lemak, protein, atau DNA. Selain itu ROS juga dapat memodulasi ekspresi gen melalui gangguan fungsi faktor transkripsi seperti NF-ĸB. ROS dapat mengaktivasi inflamasi di sel dengan meningkatkan produksi TNF-α, IL-1, IL-6, dan IL-18 yang merusak ICCs. ROS juga dapat mengaktifkan NF-ĸB melalui degradasi atau modifikasi I-ĸB pada komplek NF-ĸB- I-ĸB di sitoplasma. NF-ĸB yang aktif kemudian bermigrasi ke nukleus dan menyebabkan aktifasi

sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi tersebut memediasi apoptosis ICCs (Jin dkk, 2013).

### 2.5. Asam Alfa Lipoat

Diet antioksidan telah populer digunakan sebagai terapi dan pencegahan diabetes dan komplikasinya. Akhir-akhir ini penggunaan antioksidan terbukti berguna untuk menurunkan stres oksidatif dan menghambat perkembangan komplikasi diabetes di pembuluh darah (Budin dkk, 2009). Asam alfa lipoat adalah kofaktor yang diperlukan untuk *α-ketoasidosis dehydrogenase* di mitokondria. ALA mengaktivkan jalur sinyal P-I-3-kinase dan melindungi sel neuronal dari apoptosis ketika terjadi peningkatan kadar glukosa. Berdasarkan penelitian, asam alfa lipoat memperbaiki aliran darah di serabut saraf, mengurangi stres oksidatif, dan memperbaiki konduksi serabut saraf distal, serta memiliki potensi terapi untuk diabetik neuropati enteral (Kashyap dan Farrugia, 2011).

Berbeda dengan vitamin C yang larut dalam air dan vitamin E yang larut dalam lemak, ALA dapat larut dalam air dan minyak, sehingga distribusinya lebih merata ke seluruh bagian tubuh. Selain itu, vitamin E akan kehilangan aktivitas antioksidannya setelah menetralisir radikal bebas. Sedangkan pemberian vitamin C dosis tinggi dapat meningkatkan resiko komplikasi *cardivascular* pada wanita posmenopouse (Golbidi, 2011). Selain memiliki aktivitas antioksidan, ALA juga meningkatkan regenerasi antioksidan lain, seperti GSH dan SOD.

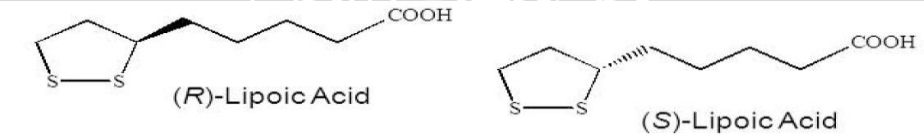
#### 2.5.1 Sumber Asam Alfa Lipoat

Asam alfa lipoat secara natural disintesis secara enzimatis oleh mitokondria dari asam oktanoat. ALA juga dapat diperoleh dari diet yaitu daging

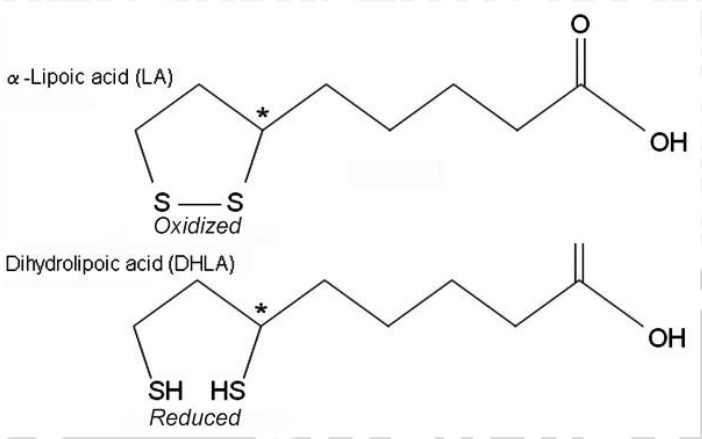
otot, jantung, ginjal, hati, serta buah dan sayuran yang memiliki kandungan ALA lebih sedikit. Sayuran yang mengandung ALA antara lain bayam, kentang, tomat, brokoli (Goraca dkk, 2011). ALA juga dapat diperoleh dari suplemen diet sebagai sumber primer dari ALA yang mengandung ALA sekitar 50-600 mg. Kebanyakan suplemen ALA komersial yang tersedia adalah campuran antara enantiomer R dan S (Shay, 2010).

### 2.5.2 Struktur Kimia Asam Alfa Lipoat

Asam α-lipoat, $C_8H_{14}O_2S_2$, (R)-5-(1,2-*dithiolan*-3-yl)*pentanoic acid* adalah turunan disulfida dari asam oktanoat, yang membentuk ikatan disulfida intramolekuler dalam bentuk oksidasinya. Memiliki densitas elektron tinggi dikarenakan posisi special dari dua atom sulfur di cincin 1,2-*dithiolane*, sehingga asam α-lipoat memiliki kecenderungan tinggi untuk mereduksi molekul redoks-sensitif lainnya sesuai dengan kondisi lingkungan. Asam α-lipoat merupakan asam lemah, dengan kelarutan dalam air rendah, serta bioavailabilitasnya rendah (Kacso dkk, 2012).




Gambar 2.11 Struktur Asam A-Lipoat Dengan Enantiomer R Dan S (Shay Dkk, 2009).




Gambar 2.12 Struktur ALA dan DHLA

### 2.5.3 Aktivitas Antioksidan Asam Alfa Lipoat

ALA merupakan kofaktor dari komplek *α-ketoacid dehydrogenase* dan memiliki peran mendasar dalam metabolisme (Budin dkk, 2009). ALA dalam bentuk oksidasi maupun reduksi merupakan antioksidan kuat yang fungsinya antara lain: (1) menangkap ROS, (2) meregenerasi antioksidan eksogen dan endogen seperti vitamin C dan E, dan GSH, (3) khelatasi ion logam, (4) mereparasi protein yang teroksidasi, (5) meregulasi transkripsi gen (6) menghambat aktivasi NF-kB (Golbidi dkk, 2011).

#### 2.5.3.1 Aktivitas Menangkap ROS

Reaktivitas kimia asam alfa lipoat diberikan oleh cincin dtiolennya. Bentuk ALA dan DHLA membentuk pasangan redoks potensial yang memiliki potensial reduksi standar -0,32 V. Hal inilah yang membuat DHLA menjadi salah satu antioksidan alami yang paling kuat. ALA dan DHLA dapat mengikat radikal hidroksil dan asam hipoklorit, sementara ALA berakhir menjadi oksigen tunggal. DHLA meregenerasi antioksidan endogen lainnya (misalnya vitamin C dan E) dan menetralisir radikal bebas tanpa ikut menjadi bagian dari proses (Shay dkk, 2009). Tabel 1 menunjukkan ROS yang diikat oleh ALA dan DHLA.

Tabel 2.1 ROS yang Diikat oleh ALA dan DHLA.

| Oksidan | ALA | DHLA |
|---|---|---|
| Hydrogen peroksida | √ | √ |
| *Singlet* oksigen | √ | - |
| Radikal hidroksil | √ | √ |
| Radikal NO | √ | √ |
| Radikal superoksida | - | √ |
| Asam hipoklorit | √ | √ |
| Peroksinitrit | √ | √ |
| Radikal peroksil | - | √ |

(Packer, 2001)

### 2.5.3.2 Regenerasi Antioksidan Lain

Ketika suatu molekul antioksidan bereaksi dengan molekul radikal bebas yang tidak stabil, molekul antioksidan itu sendiri menjadi teroksidasi dan kehilangan manfaatnya sampai berkurang lagi. DHLA memiliki kemampuan untuk mengurangi bentuk teroksidasi antioksidan lainnya seperti vitamin C dan E, dan GSH (Golbidi dkk, 2011). ALA dapat secara langsung mengatur kadar antioksidan dengan menginduksi pengambilan atau meningkatkan sintesis antioksidan endogen atau enzim antioksidan (Shay dkk, 2009).

Glutation adalah salah satu antioksidan seluler dengan berat molekul rendah yang paling penting menyangga kondisi redoks thiol. Kadar GSH secara ketat dikontrol oleh ketersediaan substrat atau regulasi transkripsi gen spesifik. ALA adalah salah satu inducer NRF-2 yang memediasi ekspresi gen antioksidan dan dengan demikian mampu secara signifikan meningkatkan kapasitas seluler sintesis GSH. Selanjutnya ALA juga meningkatkan GSH melalui kemampuannya untuk meningkatkan penyerapan sistein. DHLA juga meningkatkan sintesis GSH dengan mengurangi rasio sistin menjadi sistein, sistein merupakan substrat

dengan kecepatan terbatas untuk reaksi ini. Asam Dihydrolipoic juga meregenerasi vitamin E sebagai akibat dari reaksi langsung dengan radikal tokoferoksil atau secara tidak langsung dengan mengurangi dehydroascorbate, yang ke

mudian menurunkan *alpha tocopherol.* DHLA juga mampu mengurangi *ubiquinone* (CoQ10) menjadi *ubiquinol*, yang merupakan komponen penting dari rantai transpor elektron mitokondria. DHLA juga mengurangi bentuk teroksidasi dari CoQ10, yang dapat meningkatkan pengurangan radikal alfa-tokoferoksil (Golbidi dkk, 2011).

#### 2.5.3.3 Khelatasi Ion Logam

Kemampuan ALA dan DHLA untuk mengkhelat logam berasal dari adanya dua kelompok tiol. DHLA juga meregenerasi askorbat, yang kemudian mengurangi besi (Golbidi dkk, 2011). ALA dan DHLA mengikat sejumlah ion logam, tetapi dengan sifat yang berbeda tergantung logam yang dikhelat. Pada penelitian *in vitro* terlihat bahwa ALA lebih cenderung mengikat $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$ dan $Pb^{2+,}$ tetapi tidak dapat mengkhelat $Fe^{3+}$. Sementara DHLA membentuk kompleks dengan $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Pb^{2+}$, $Hg^{2+}$, dan $Fe^{3+}$. ALA dan DHLA mungkin dapat memodulasi *labile pool* dari logam transisi aktif redoks, tanpa menyebabkan deplesi logam (Shay dkk, 2009).

#### 2.5.3.4 Memperbaiki Protein yang Teroksidasi

Akumulasi protein yang teroksidasi dianggap sebagai tanda dari penuaan sel. Akumulasi tersebut dapat disebabkan oleh peningkatan kecepatan oksidasi protein atau penurunan kecepatan perbaikan protein teroksidasi, atau kombinasi keduanya. Sistein dan metionin, keduanya asam amino yang

mengandung sulfur, keduanya termasuk protein yang paling sensitif terhadap oksidasi, namun juga asam amino yang produk oksidasinya dapat diperbaiki melalui proses enzimatis yang spesifik (Golboidi dkk, 2011).

Glutation sebagai antioksidan serbaguna yang memiliki peran penting dalam mengatur protein tiol dalam bentuk tereduksi dan dalam mengatur siklus sel. Penurunan GSH terkait usia di jaringan dan/atau penurunan rasio GSH/GSSG terjadi di beberapa jaringan yang berbeda seperti otak, jantung. ALA membalikkan perubahan terkait usia dan meningkatkan sistem antioksidan. Keuntungan dari penggunaan ALA dalam menurunkan gangguan terkait umur terhadap GSH dapat dijelaskan dalam cara yang berbeda. Pertama, pengiriman GSH eksogen ke jaringan seperti jantung dan otak tidak memungkinkan karena tidak diangkut ke jaringan tersebut. Kedua, agen penghantar sistein konvensional memiliki bioavailabilitas rendah ke otak. Bagaimanapun ALA dengan mudah dimasukkan ke jaringan saraf dan dapat memodulasi gangguan terkait umur terhadap kadar GSH (Golbidi dkk, 2011).

**2.5.3.5 Regulasi Transkripsi Gen**

ALA juga memiliki efek terhadap ekspresi gen antioksidan yang memediasi Nrf-2. ALA juga mengatur gen yang meregulasi *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPARs). PPARs merupakan kelompok protein reseptor nuklear yang berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen, dan memiliki peran penting dalam regulasi diferensiasi selular, pengembangan dan metabolisme (karbohidrat, lipid, protein), dan tumorigenesis organisme yang lebih tinggi. ALA mengaktifkan PPAR-α dan PPAR-γ. PPAR-α meregulasi ekspresi *carnitin palmitoyltransferase* 1A dan sintesis asetil-CoA. Sedangkan PPAR-γ meningkatkan ekspresi asam lemak translokase/CD36,

asam lemak adiposit mengikat protein, dan lipoprotein lipase. Enzim ini merupakan regulator kunci dari metabolisme glukosa dan lipid (Golbidi dkk, 2011).

#### 2.5.3.6 Hambatan Aktivasi NF-ĸB

Faktor nuklear kappa B adalah kompleks protein yang mengontrol transkripsi DNA. NF-ĸB ditemukan di hampir semua jenis sel hewan dan terlibat dalam respon seluler terhadap rangsangan seperti stres, sitokin, radikal bebas, radiasi ultraviolet, *low density lipoprotein* teroksidasi (LDL), dan antigen bakteri atau virus. Kompleks protein NF-kB biasanya terletak di sitoplasma dalam bentuk tidak aktif dengan mengikat protein inhibitor NF-kB (IκB). Setelah stimulasi sel dengan berbagai macam rangsangan, sinyal respon IKK α dan β (TNF-α-menginduksi kompleks kinase IκB yang juga dikenal sebagai IKK1 dan IKK2) diaktifkan,

mengakibatkan fosforilasi IκB dan degradasi proteasomalnya. Degradasi IκB membebaskan NF-kB, yang memungkinkan untuk bertranslokasi ke inti dan menginduksi ekspresi gen. ALA menghambat degradasi IκB dan NF-κB bergantung ekspresi gen dengan menghambat IKK2, menunjukkan bahwa ALA menghambat aktivasi NF-kB tanpa pengaruh fungsi antioksidan (Golbidi dkk, 2011).

### 2.5.4 Dosis Suplemen Asam Alfa Lipoat

Beberapa penelitian menggunakan ALA ddalam berbagai dosis telah dilakukan. Dalam penelitian Jun (2009), ALA dengan dosis 100 mg efektif menurunkan apoptosis sel jantung bergantung mitokondria serta melindungi dari *cardiac myopathy* dibandingkan dengan tanpa ALA. ALA dengan dosis 100

mg/kg berat badan juga juga menunjukkan efek proteksi terhadap sumsum tulang dari stres oksidatif dibandingkan dengan dosis 25 dan 50 mg/kg berat badan (Haleagrahara dkk, 2011).

Penelitian Ziegler dkk (2006) terapi menggunakan ALA dosis 600 mg peroral selama lima minggu menunjukkan perbaikan gejala neuropati dan defisit neuropati pada pasien diabetes dengan *distal symmetric polyneuropathy*. Berdasarkan meta analisis dari *Randomized Controlled Trials* pemberian ALA dengan dosis 600 mg/hari selama tiga minggu dapat menurunkan nyeri neuropati pada pasien diabetes (Mijnhout dkk, 2012).

### 2.5.5 Farmakokinetika Asam Alfa Lipoat

Sedangkan suplemen ALA biasanya mengandung campuran dari enantiomer R dan S. R-ALA merupakan bentuk yang tepat digunakan sebagai suplemen oral. Sedangkan campuran S-ALA mencegah polimerisasi dari R-ALA sehingga meningkatkan availabilitasnya (Shay dkk, 2009). Adanya makanan dapat menurunkan bioavailabilitas ALA. Sehingga sebaiknya dikonsumsi 30 menit sebelum atau dua jam sesudah makan (Goraca dkk, 2011). Konsumsi tablet ALA dosis tunggal (50 – 600 mg) diabsorpsi sepenuhnya setelah 30 menit hingga satu jam. Waktu paruh 30 menit dan kadar plasma endogen dari ALA dan DHLA masing-masing adalah 1-25 x $10^9$ dan 30-40 x $10^9$ g/mL.

ALA dimetabolisme di liver melalui oksidasi β-mitokondria. Setelah konsumsi 1 g suplemen ALA, ditemukan 3-ketolipoic acid and produk dimetilat 2,4-*bismethylmercapto-butanoic acid* dan 4,6-*bismethylmercapto-hexanoic acid* (Shay dkk, 2009). Kecepatan absorpsi ALA diimbangi dengan kecepatan klirensnya, menunjukkan transport ke jaringan sebaik filtrasi glomerulus dan

ekskresi renal. ALA terakumulasi terutama di hepar, jantung, dan otot skelet, sedangkan konsentrasi ALA di jaringan lain lebih sedikit (Goraca dkk, 2011).

### 2.5.6 Keamanan dan Toksisitas

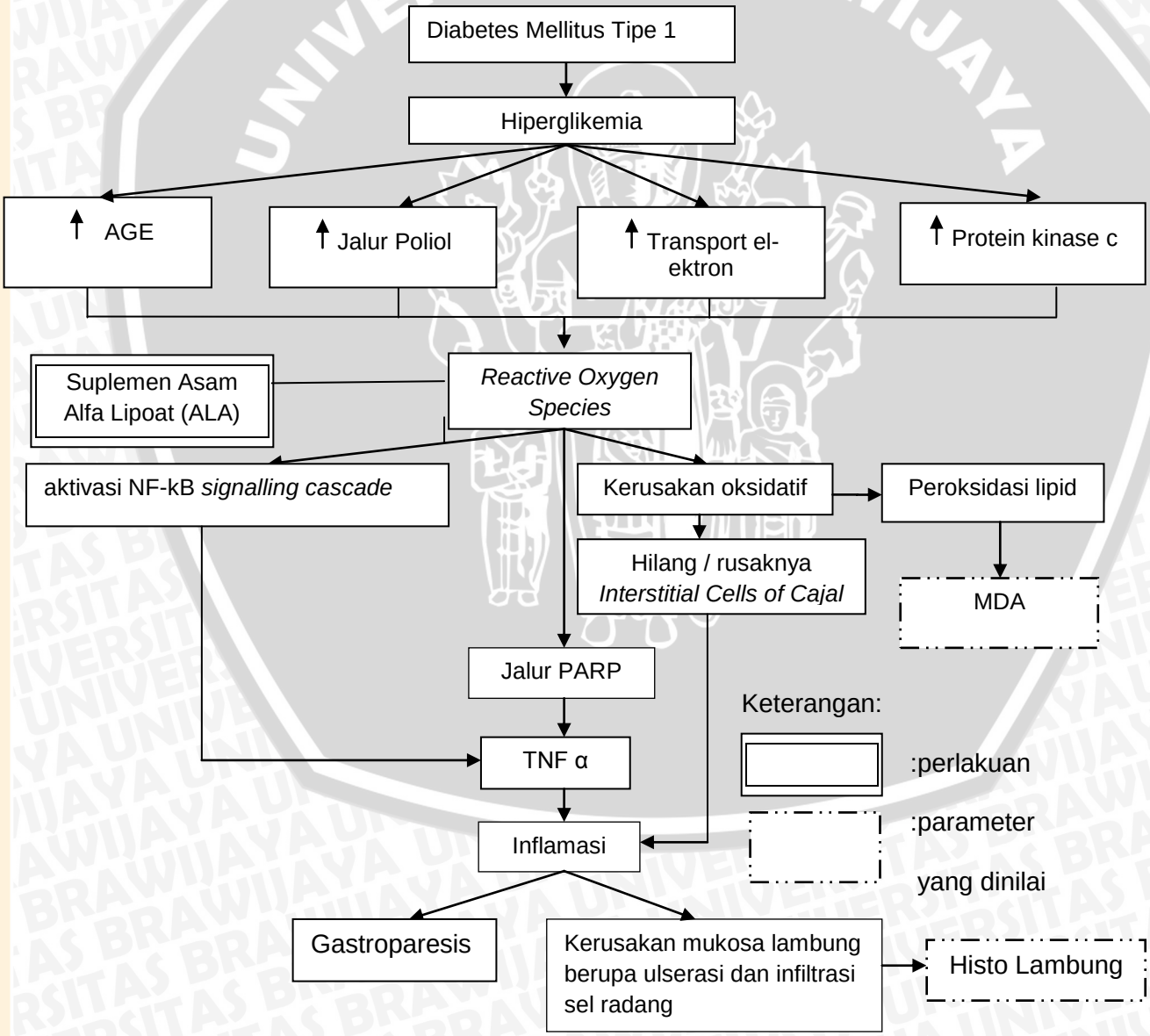
Beberapa *clinical trial* telah dilakukan menggunakan ALA. *Clinical trial* ALADIN (I, II, dan III), SYDNEY (I dan II), dan ORPIL menggunakan suplemen ALA hingga 2400 mg/hari tidak ditemukan efek samping dibandingkan dengan placebo. ALA juga telah diberikan secara iv dengan dosis 600 mg/hari tanpa adanya efek samping yang serius. ALA oral dengan dosis 1800 mg (600 mg tiga kali sehari) selama 6 bulan tidak menunjukkan efek samping yang signifikan dibandingkan placebo (Shay dkk, 2009).

Berdasarkan penilitian pada tikus, $LD_{50}$ yang terukur adalah 2000 mg/kg berat badan menunjukkan bahwa ALA memiliki toksisitas akut yang sangat rendah. Dosis 2000 mg/kg berat badan memberikan efek sedasi, lesu, piloereksi, postur duduk membungkuk, dan/atau penutupan mata pada tikus (Goraca dkk, 2011).

# BAB III

# KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

## 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Diabetes mellitus tipe 1 merupakan kondisi penurunan insulin yang ditandai dengan hiperglikemia yang persisten. Hiperglikemia menyebabkan stres oksidatif melalui pembentukan radikal bebas terutama spesies oksigen reaktif (ROS). Hiperglikemia menimbulkan perubahan proses biokimia seperti peningkatan AGE (*Advanced Glycation End Product*), aktivasi protein kinase C, peningkatan jalur poliol, dan peningkatan transport elektron pada mitokondria. Perubahan-perubahan tersebut meningkatkan produksi ROS.

Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan kerusakan oksidatif, termasuk peroksidasi lipid, menyebabkan kematian sel. Kematian sel pada lambung akibat ROS ini mengakibatkan hilangnya *Interstitial Cell of Cajal (ICC)* yang menyebabkan terjadinya gastroparesis. ROS yang dihasilkan dalam jaringan lambung dapat memicu aktivasi NF-kB *signalling cascade* yang menginduksi produksi TNF-α menyebabkan inflamasi sehingga menyebabkan penundaan waktu pengosongan lambung. Hal ini menyebabkan terjadinya gastroparesis. Selain itu, ROS dengan kondisi stres oksidatif juga mengaktifkan jalur PARP yang meregulasi ekspresi gen yang berperan dalam inflamasi, salah satunya adalah TNF-α yang menyebabkan kerusakan mukosa lambung. Tingkat kerusakkan sel pada stres oksidatif tergantung derajat peroksidasi lipid yang ditentukan dari kadar *malondialdeyde* (MDA). MDA merupakan indikator peroksidasi lipid yang terbentuk setelah putusnya rantai karbon asam lemak yang kemudian terikat oksigen. Sedangkan pemeriksaan histologi lambung dilakukan untuk membandingkan histologi lambung antara tikus kontrol dan perlakuan.

Tingginya produksi ROS pada diabetes mellitus dapat diturunkan dengan pemberian antioksidan ALA sehingga dapat menurunkan kerusakan oksidatif, aktivasi NF-kB, serta kerusakan mukosa. ALA dapat terlarut dalam air maupun

lipid sehingga terdistribusi luas di seluruh bagian tubuh. Dari sifat-sifat tersebut, ALA efektif menangkap ROS. Efektivitas ALA dalam menurunkan ROS salah satunya dapat dilihat dari produk peroksidasi lipid yaitu MDA. Melalui penurunan peroksidasi lipid, akan terjadi penurunan kerusakan oksidatif dan kerusakkan sel-sel lambung dapat dihindari.

**3.2 Hipotesis Penelitian**

Efek ALA menurunkan kadar MDA pada lambung tikus diabetes mellitus induksi streptozotocin tergantung dosis yang digunakan.

# BAB IV

# METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan dari penelitian ini adalah rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Designs*) jenis *post-test* dengan kelompok kontrol (*Post-test Only, Control Group*). Pengelompokan subjek untuk pemberian perlakuan dipilih secara acak. Hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan, dan bahan yang digunakan bisa dikatakan homogen sehingga setiap anggota populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel. Metode pemilihan subjek dilakukan secara acak sederhana (*Simple Random Sampling*) dengan angka acak (*Random Number*).

### 4.1.1 Rancangan *Post-test* dengan Kelompok Kontrol

Rancangan penelitian menggunakan *post-test* dengan kelompok kontrol. Dalam rancangan ini dilakukan randomisasi, penentuan anggota-anggota kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan secara acak. Sehingga kedua kelompok mempunyai sifat yang sama sebelum intervensi. Kelompok eksperimen menerima perlakuan (X) yang diikuti dengan pengukuran kedua. Hasil pengukuran dibandingkan dengan nilai pengukuran kedua pada kelompok kontrol yang tidak menerima intervensi. Dengan demikian, perbedaan hasil *post-test* disebabkan adanya pengaruh intervensi.

### 4.1.2 Rancangan Sampel Acak Sederhana (Simple Random Sampling)

Rancangan pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana karena setiap bagian dari populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana dengan menggunakan angka acak (*random number*). Dengan menggunakan *random number*, masing-masing subjek dimasukkan ke dalam lima kelompok yang terdiri dari:

Kelompok I : tikus tanpa induksi streptozotocin dan tidak diberikan suplemen ALA sebagai kontrol negatif

Kelompok II : tikus induksi streptozotocin tanpa diberikan suplemen ALA sebagai kontrol positif

Kelompok III : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 80 mg/kg berat badan/hari selama empat minggu

Kelompok IV : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 200 mg/kg berat badan/hari selama empat minggu

Kelompok V : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 500 mg/kg berat badan/hari selama empat minggu

Penetapan dosis ALA 80 mg/kg berat badan/hari, 200 mg/kg berat badan/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari berdasarkan tiga penelitian yang menilai efek asam lipoat terhadap stres oksidatif di jantung. Dosis ALA 80 mg/kg per hari diberikan pada tikus wistar jantan diabetes dalam penelitian Shotton dkk. (2003) selama 8 minggu dapat mencegah penurunan norepinefrin pada atrium kanan dibandingkan tikus wistar diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Dosis 200 mg/kg per hari diberikan pada tikus *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF) diabetes dalam penelitian Eun Lee dkk. (2012) selama 16 minggu

menunjukkan berat jantung tikus secara signifikan lebih ringan dibandingkan tikus OLETF diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Selain itu, OLETF + ALA juga secara signifikan menurunkan ekspresi RAGE, meningkatkan ekspresi liver kinase B1 jantung, meningkatkan ekspresi antioksidan superoksid dismutase, dan menurunkan jumlah kolagen dibandingkan OLETF tanpa ALA. Dosis 500 mg/kg berat badan/hari diberikan pada tikus Sprague-Dawley diabetes dalam penelitian Midaoui dan Champlain (2002) selama tiga minggu yang secara signifikan mencegah peningkatan tekanan darah dan produksi $O_2^-$ pada aorta dibandingkan dengan tikus Sprague-Dawley diabetes tanpa diberikan ALA. Pemberian ALA ditentukan dalam jangka waktu empat minggu berdasarkan penelitian Midaoui dan Champlain (2002) karena penelitian ini bertujuan menilai efek asam alfa lipoat ketika digunakan dalam jangka waktu singkat.

### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar. Pemilihan tikus sebagai subjek penelitian dengan model diabetes mellitus tipe 1 ini tepat dalam menggambarkan kondisi diabetes mellitus pada manusia karena pada induksi penyakit kronis, perubahan-perubahan fisiologis pada tikus menyerupai perubahan pada manusia. Selain itu, dalam penelitian sindrom metabolik, tikus juga menunjukkan tanda dan gejala yang sama ketika sindroma tersebut dialami oleh manusia.

#### 4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dan eksklusi ditetapkan agar karakteristik sampel tidak menyimpang dari populasi. Selain itu, penetapan kriteria inklusi dan eksklusi

dilakukan agar anggota populasi memenuhi syarat untuk diambil sebagai sampel. Berikut kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan:

#### 4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri berikut:

- Tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar
- Jenis kelamin jantan

  Tikus jantan lebih sensitif terhadap streptozotocin dibandingkan tikus betina sehingga mempengaruhi perkembangan diabetes pada induksi streptozotocin karena (Tian dkk., 2010).
- Umur 75-90 hari

  Berdasarkan penelitian (Sihombing dan Tuminah, 2011) umur berkorelasi dengan berat badan tikus. Oleh sebab itu, umur tikus 75-90 hari dianggap dewasa dan berat badan pada tikus tersebut besar sehingga tingkat kelangsungan hidup setelah diinduksi streptozotozin juga tinggi.
- Berat badan 180-300 gram

  Berat badan berkorelasi dengan tingkat kelangsungan hidup tikus setelah diinduksi streptozotocin yaitu semakin berat bobot tikus maka semakin tinggi kelangsungan hidupnya (Tian dkk., 2010). Dalam penelitian ini, bobot 180-300 g merupakan berat badan normal untuk tikus dewasa sehingga tingkat kelangsungan hidupnya juga akan tinggi.
- Tikus aktif dan mau makan

#### 4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang tidak dapat diambil sebagai sampel memiliki karakteristik berikut:

- Tikus dengan perubahan kondisi seperti sakit yang ditunjukkan dengan kurang aktif, perubahan asupan makanan dan minuman
- Tikus dengan kelainan anatomi
- Tikus mati sebelum mendapatkan perlakuan

### 4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan tiga macam perlakuan dengan dua kelompok sebagai kontrol, jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer (Arifiyah, 2007):

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

*n* = jumlah sampel tiap kelompok
*t* = jumlah kelompok
15 = nilai deviasi

Nilai deviasi sebesar ≥ 15 merupakan deviasi standar yang digunakan untuk estimasi jumlah sampel penelitian model diabetes mellitus menggunakan injeksi streptozotocin di Laboratorium Farmakologi FKUB. Dari rumus tersebut, berikut penghitungan jumlah sampel penelitian:

$\{(n-1)\ (t-1)\} \geq 15$

$\{(n-1)\ 4 \geq 15$

$4n - 4 \geq 15$

$4n \geq 19$

$p = 4{,}75 \approx 5$

Hasil penghitungan sampel menunjukkan jumlah hewan coba bagi masing-masing kelompok lebih besar sama dengan lima. Kemudian, tingkat keberhasilan induksi diabetes mellitus tipe 1 dengan menggunakan injeksi streptozotocin di Laboratorium Farmakologi FKUB sebesar 90%. Perhitungan estimasi sampel menunjukkan jumlah sampel tiap kelompok adalah lima sehingga tikus yang diabetes berjumlah dua puluh ekor. Jika dua puluh ekor tikus setara dengan tingkat keberhasilan 90% induksi diabetes, maka diperlukan 22 ekor tikus untuk mencapai tingkat keberhasilan 100%. Namun, 22 ekor tikus bukan jumlah proporsional jika dimasukkan ke dalam empat kelompok. Oleh karena itu, agar jumlah setiap kelompok proporsional digunakan 24 ekor tikus yang diinduksi diabetes mellitus. Dari 24 kelompok tersebut, setiap kelompok akan terdiri dari enam ekor tikus. Kelompok yang tidak diinduksi diabetes juga akan terdiri dari enam ekor sehingga secara keseluruhan jumlah hewan coba yang dibutuhkan sebanyak tiga puluh ekor.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah suplemen asam alfa lipoat yang diberikan dalam dosis 80 mg/kg berat badan/hari, 200 mg/kg berat badan/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari yang diberikan selama tiga minggu dengan sonde. Variabel terikat pada penelitian ini adalah stres oksidatif.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut lokasi dan waktu penelitian yang ditetapkan:

### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Berikut tempat penelitian yang digunakan:

- Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Biosains UB
- Induksi diabetes mellitus dilakuan di Laboratorium Farmakologi FKUB
- Pengambilan dan penimbangan lambung dilakukan di Laboratorium Faal FKUB
- Pembuatan homogenat sampel dilakukan di Laboratorium Faal FKUB
- Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Faal FKUB
- Pemeriksaan histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB

### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung antara bulan Maret hingga Juni 2013.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan dan alat digunakan untuk pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus, pemberian suplemen ALA, pengambilan lambung, penimbangan lambung, pembuatan homogenat, pemeriksaan kadar MDA, dan pemeriksaan histologi lambung.

### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan.

#### 4.5.1.1 Makanan Tikus

Kebutuhan makanan tikus dewasa per ekor setiap hari adalah 15 g/100 g berat badan. Makanan tikus berupa pelet dengan merek comfeed susu PAP

dengan komposisi terdiri dari air 2%, protein kasar 10%, lemak kasar 7%, serat kasar 8%, abu 10%, kalsium 0,9 - 1,2 %, fosfor 0,6 - 1 %. Pelet ditambahkan air secukupnya, dihancurkan hingga halus dan dibuat kepalan, kemudian ditimbang sesuai berat pakan tiap tikus.

**4.5.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1**

Induksi diabetes mellitus tipe 1 menggunakan bahan utama streptozotocin. Sebelum diinjeksikan, streptozotocin memerlukan preparasi dengan bahan dan prosedur tertentu. Berikut bahan yang diperlukan dan tahap preparasi streptozotocin untuk induksi diabetes mellitus tipe 1:

**4.5.1.2.1 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam induksi diabetes mellitus tipe 1 diantaranya:

- Streptozotocin
- Asam sitrat
- *Water for Injection*

**4.5.1.2.2 Perhitungan Bahan**

Total streptozotocin yang digunakan: 332 mg

Buffer sitrat yang digunakan: 16 ml

Perhitungan asam sitrat yang dibutuhkan untuk membuat buffer sitrat pH 4,5 dengan konsentrasi 0,1 M

0,1 M = 1000/50 ml x massa/Mr

0,1 M = 20 x massa/192,43

Massa asam sitrat yang dibutuhkan adalah 962 mg.

**4.5.1.2.3 Preparasi Buffer Sitrat**

Buffer sitrat ditimbang sebanyak 962 mg kemudian dilarutkan dalam 50 ml *water for injection*. Diukur pH buffer sitrat dengan pH meter. Buffer sitrat digunakan sebagai pelarut jika nilai pH 4,5.

**4.5.1.2.3 Preparasi Streptozotocin**

Streptozotocin ditimbang sebanyak 332 mg lalu dilarutkan dalam 16 ml buffer sitrat. Larutan streptozotocin kemudian disaring dengan milipore untuk sterilisasi. Larutan streptozotocin dimasukkan ke dalam disposable spuit 1 mL dengan konsentrasi 11 mg/0,5 ml.

**4.5.1.3 Pemberian Suplemen ALA**

Bahan yang digunakan diantaranya suplemen ALA dan *olive oil* dengan dosis 80 mg/kg berat badan per hari, 200 mg/kg berat badan per hari, dan 500 mg/kg berat badan per hari.

**4.5.1.4 Pembuatan *Slide* Histologi**

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan slide histologi antara lain jaringan lambung, larutan formalin 10% untuk proses pembuatan jaringan makros. Larutan xylol untuk proses deparafinasi. Alkohol 90%, hematoksilin, alkohol asam 1%, amonia, dan eosin 1% untuk pewarnaan jaringan. Alkohol 80% dan 96% untuk proses dehidrasi. Serta larutan xylol untuk proses penjernihan.

**4.5.1.5 Pengukuran MDA**

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pengukuran MDA diantaranya:

- Jaringan lambung
- Larutan TCA 100%

- Na Tiobarbiturat
- HCl 1 N
- Aquades

### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standart peralatan laboratorium. Berikut alat-alat yang digunakan selama proses penelitian:

Tabel 4.1 Peralatan Penelitian

| Tahap Penelitian | Alat |
|---|---|
| Pemeliharaan hewan coba | Kandang plastik yang dilengkapi dengan ventilasi, botol air, rak tempat kandang, serbuk kayu, timbangan merk *KERN* 440-33N (ketelitian 0,01 g) |
| Induksi diabetes mellitus | pH meter, gelas beker, bunsen, alumunium foil, *syringe filter*, label, termometer, disposable spuit 1 ml, kapas. |
| Pengukuran Gula darah puasa | Glucosemeter merk Gluco Dr, stik gula darah merk Gluco Dr, Betadin, pipet tetes, jarum 18 G. |
| Pemberian suplemen ALA | Gelas ukur, timbangan merk KERN (ketelitian 0,0001 g) batang pengaduk, vortex, sonde |
| Pengambilan dan penimbangan berat lambung | Timbangan merk *KERN* 440-33N (ketelitian 0,01 g), pot untuk organ + label, gunting bedah, pinset, gelas arloji, cawan petri, papan bedah, pin, beaker glass, kertas saring, kamera digital |
| Pembuatan *slide* histologi | Pisau pemotong jaringan makros, kaset, mesin *tissue text processor*, Microtome, gelas beker, gelas objek |
| Pengukuran MDA | Spektrofotometer uv-vis, kuvet, tissue, vortex,sentrifugator, tabung eppendorf, inkubator, mikropipet, pipet tetes, mortir, stamper |

### 4.6 Definisi Operasional

- Diabetes tipe 1: gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah akibat gangguan sekresi insulin karena kerusakan sel beta pankreas.
- Asam alfa lipoat (ALA): antioksidan yang telah digunakan sebagai pencegahan dan terapi komplikasi diabetes. Suplemen ALA yang digunakan dalam penelitian ini dalam bentuk serbuk berwarna kuning yang digunakan dalam tiga dosis untuk tiga kelompok masing-masing 80 mg/kg, 200 mg/kg, dan 500 mg/kg berat badan/hari.
- Streptozotocin : antibiotik spektrum luas dan sitotoksik terutama pada pankreas. Dosis 60 mg/kg menyebabkan toksisitas pada sel beta pankreas dan diabetes terjadi dua hingga empat hari setelah injeksi.
- Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang menunjukkan tanda dan gejala yang sama dengan manusia ketika menderita sindroma metabolik.
- Stres oksidatif : kondisi peningkatan radikal bebas tanpa diimbangi aktivitas antioksidan sehingga terjadi kerusakan sel dan jaringan. Penelitian ini menilai stres oksidatif pada lambung diabetes mellitus tipe 1 dengan mengukur kadar MDA, menimbang berat lambung, dan melakukan pemeriksaan histologi.

### 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Penelitian terdiri dari beberapa tahap yaitu meliputi pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus, pemberian suplemen ALA, pengambilan lambung, penimbangan lambung, pembuatan dan pemeriksaan *slide* histologi,

dan pengukuran kadar lambung. Kemudian, pengumpulan data meliputi berat badan tikus, glukosa darah, bobot lambung, dan kadar MDA.

### 4.7.1 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari berbagai prosedur dimulai sejak pemeliharaan hewan coba hingga pemeriksaan kadar MDA, penimbangan lambung, dan pemeriksaan histologi.

#### 4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama tujuh hari dengan tujuan untuk menyesuaikan diri dengan kondisi laboratorium. Pemeliharaan tikus sesuai standar laboratorium yaitu:

a. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik tertutup yang terdapat penyaring udara serta lubang untuk botol minuman dan beralas serbuk kayu.
b. Setiap kandang berisi satu ekor tikus yang ditempatkan pada suhu 28 hingga 32 °C dan kelembaban ruangan 50-70%.
c. Lingkungan dikondisikan 12 jam terang dan 12 jam gelap dan kondisi terang antara pukul 07.00 hingga 19.00.
d. Pakan dan minum ditempatkan dalam kondisi mudah diakses oleh tikus.
e. Jumlah pakan 15 gram/100 gram berat badan dan volum air minum sekitar 200 ml yang selalu dipantau setiap hari.

#### 4.7.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1

Induksi diabetes mellitus menggunakan injeksi streptozotocin karena efek sitotoksik yang selektif terhadap sel β pankreas. Streptozotocin masuk ke dalam sel melalui *glucose transporter* (GLUT2) dan dipecah menjadi glukosa

dan *methylnitrosourea*. Karena sifatnya alkilasi, streptozotocin memodifikasi makromolekul biologis, fragmen DNA dan menghancurkan sel-sel beta, menyebabkan keadaan *insulin-dependent diabetes*. Streptozotocin berpengaruh pada DNA mitokondria dengan merusak fungsi signaling metabolisme mitokondria sel beta, sehingga mampu menghambat sekresi insulin yang diinduksi glukosa (Lenzen, 2008). Dosis streptozotocin digunakan 60 mg/kg karena pada dosis tersebut dapat menyebabkan reaksi autoimun yang merusak sel beta pankreas. Pada dosis tersebut, streptozotocin menyebabkan toksisitas pada sel beta pankreas dan diabetes terjadi dua hingga empat hari setelah injeksi (Akbarzadeh, 2007). Namun, dosis 60 mg/kg berat badan tidak menimbulkan ketosis dan tingkat kematian tikus rendah meskipun tidak diberikan insulin selama percobaan (Wei dkk., 2003). Prosedur induksi diabetes mellitus menggunakan metode yang digunakan di Laboratorium Farmakologi FKUB. Berikut langkah-langkah induksi diabetes mellitus:

a. Tikus dipuasakan selama ± 20 jam.
b. Tikus diinjeksi streptozotocin 60 mg/kg secara intraperitonial dengan cara menyuntik pada bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.
c. Tikus dikembalikan ke dalam kandang dan kandang diberi label (pada tikus yang diinduksi diabetes mellitus).
d. Kandang didekontaminasi dengan larutan KOH 0,5% tiga hari setelah injeksi streptozotocin.
e. Glukosa darah puasa diukur setelah lima hari injeksi.
f. Penetapan diabetes mellitus jika glukosa darah > 200 mg/dl.

g. Nyeri yang timbul setelah efek anestesi hilang diatasi dengan terapi nonfarmakologi sesuai *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits* yaitu dengan mengurangi stres pada tikus melalui pemeliharaan hewan sesuai standar laboratorium seperti suhu ruangan yang sesuai, makanan dan air tercukupi dan mudah diakses oleh hewan coba.

**4.7.1.3 Pemberian Suplemen ALA**

Suplemen ALA diberikan pada kelompok III, IV, dan V selama empat minggu yang dimulai tiga hari sejak tikus positif diabetes. Pemilihan durasi selama empat minggu berdasarkan penelitian Jun dkk. (2009) yang menggunakan tikus Wistar yang diinduksi diabetes melalui streptozotocin tanpa terapi setelah empat minggu menunjukkan peningkatan glukosa darah, pembentukan kolagen interstitial, apoptosis sel jantung, penurunan GSH, dan peningkatan kadar MDA. Sediaan asam alfa lipoat yang digunakan dalam bentuk serbuk. Pemilihan bentuk tersebut karena bentuk tersebut merupakan asam alfa lipoat tanpa campuran zat aktif lain maupun eksipien. Belum ada penelitian yang membandingkan potensi masing-masing sediaan di Indonesia. Preparasi asam alfa lipoat dilakukan sesuai metode yang dilakukan oleh Sahin dkk. (2012) menggunakan ALA yang dilarutkan dalam *olive oil*. ALA dapat larut dalam *olive oil.* Volum pelarut yang digunakan adalah 2 mL karena asam alfa lipoat sejumlah ketiga dosis yang dipakai sudah dapat terlarut dengan volume tersebut serta untuk meminimalisir volume yang disondekan ke tikus. Binatang dikembalikan ke kandang setelah penyondean dan diamati 5 hingga 10 menit untuk mengetahui tanda-tanda distres atau kesulitan bernafas.

#### 4.7.1.4 Pembedahan Hewan Coba

Tikus dieutanasia setelah diberikan suplemen ALA selama empat minggu. Binatang dimatikan berdasarkan salah satu metode euthanasia yang dicantumkan dalam *AVMA Guidelines on Euthanasia* (2007) yaitu dengan inhalasi inhalasi eter. Inhalasi eter dapat mendepresi langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang kemudian menyebabkan hipoksia. Tikus yang telah dieutanasia dibedah berdasarkan prosedur Laboratorium Faal FKUB sebagai berikut:

a. Tikus yang sudah mati diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
b. Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
c. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok Bila perlu, bulu tikus dicukur pada bagian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air.
d. Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus.
e. Lambung diambil untuk pengukuran MDA dan pemeriksaan histologi.
f. Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan.
g. Organ dicuci dengan PBS 1 x berulang-ulang hingga bersih dari darah
h. Organ ditiriskan di atas kertas saring.
j. Setelah air berkurang, organ ditempatkan di atas alumunium foil kemudian ditimbang.
k. Masing-masing berat organ dicatat.

l. Organ yang telah ditimbang kemudian dipisahkan untuk pemeriksaan histologi dan MDA.

m. Bagian yang digunakan untuk pemeriksaan histologi dimasukkan ke dalam formalin 10%.

**4.7.1.5 Penimbangan Organ**

Lambung diambil dan dicuci dengan PBS 1x dan diletakkan di atas kertas saring. Setelah kering, lambung ditimbang dengan timbangan merk *KERN* 440-33N (ketelitian 0,01 g) dan hasilnya dicatat.

**4.7.1.6 Pemeriksaan Histologi**

**4.7.1.6.1 Pembuatan Jaringan Makros**

a. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang diteliti.
b. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter.
c. Jaringan dimasukkan kaset sesuai kode gross.
d. Jaringan dimasukkan larutan formalin 10%.
e. Jaringan diproses dengan mesin *tissue tex processor*.

**4.7.1.6.2 Pengeblokan dan Pematangan Jaringan**

a. Jaringan diangkat dari mesin *tissue text processor.*
b. Jaringan diblok sesuai kode jaringan.
c. Jaringan dipotong dengan Mikrotome ketebalan 3-5 mikron.

**4.7.1.6.3 Proses Deparafinasi**

Jaringan yang disayat dipotong sesuai ketebalan pelelehan kemudian ditaruh oven selama 1-2 jam pada suhu 60-70 $^{0}$C kemudian dimasukkan larutan xylol masing-masing 15 menit selama dua kali.

#### 4.7.1.6.4 Pewarnaan Jaringan

a. Jaringan dimasukkan ke dalam empat tabung alkohol 96% masing-masing selama kurang lebih tiga menit.
b. Jaringan dicuci dengan air selama sepuluh menit.
c. Jaringan dicat dengan hematoksilin selama lima belas menit.
d. Jaringan dicuci dengan air mengalir selama lima belas menit.
e. Jaringan dicuci dengan alkohol asam 1% sebanyak 3-5 kali celup.
f. Jaringan dicuci dengan amonia sebanyak 3-5 kali celup.
g. Jaringan dicat eosin 1% selama lima belas menit.

#### 4.7.1.6.5 Proses Dehidrasi

a. Jaringan yang dicat dicuci alkohol 80% selama tiga menit.
b. Jaringan dicuci alkohol 96% selama tiga menit.
c. Jaringan dicuci alkohol 96% selama tiga menit.

#### 4.7.1.6.6 Proses Penjernihan

a. Jaringan direndam larutan xylol selama lima belas menit.
b. Jaringan direndam larutan xylol selama lima belas menit.

### 4.7.1.7 Pemeriksaan Kadar MDA

Pemeriksaan MDA dilakukan berdasarkan prosedur tetap pemeriksaan MDA di Laboratorium Faal KKUB:

a. Jaringan lambung diambil 10 mg.
b. Jaringan digerus dengan mortir dan stamper hngga halus dan ditambahkan aquades 1 ml.
c. Homogenat ditampung dalam tabung eppendorf.

d. Homogenat ditambahkan 100 µL TCA 100%.
e. Campuran ditambahkan 100 µL Na tiobarbiturat 1%.
f. Campuran ditambahkan 250 µL HCl 1 N.
g. Campuran divortex hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu 100 $^{o}$C selama dua puluh menit.
h. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama sepuluh menit.
i. Supernatan diambil dan dimasukkan kuvet lalu ditambahkan 3500 µL aquades.
j. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 532 nm.
k. Hasil absorbansi dimasukkan persamaan y= 0,0004 x – 0,0126 untuk menghitung kadar MDA.

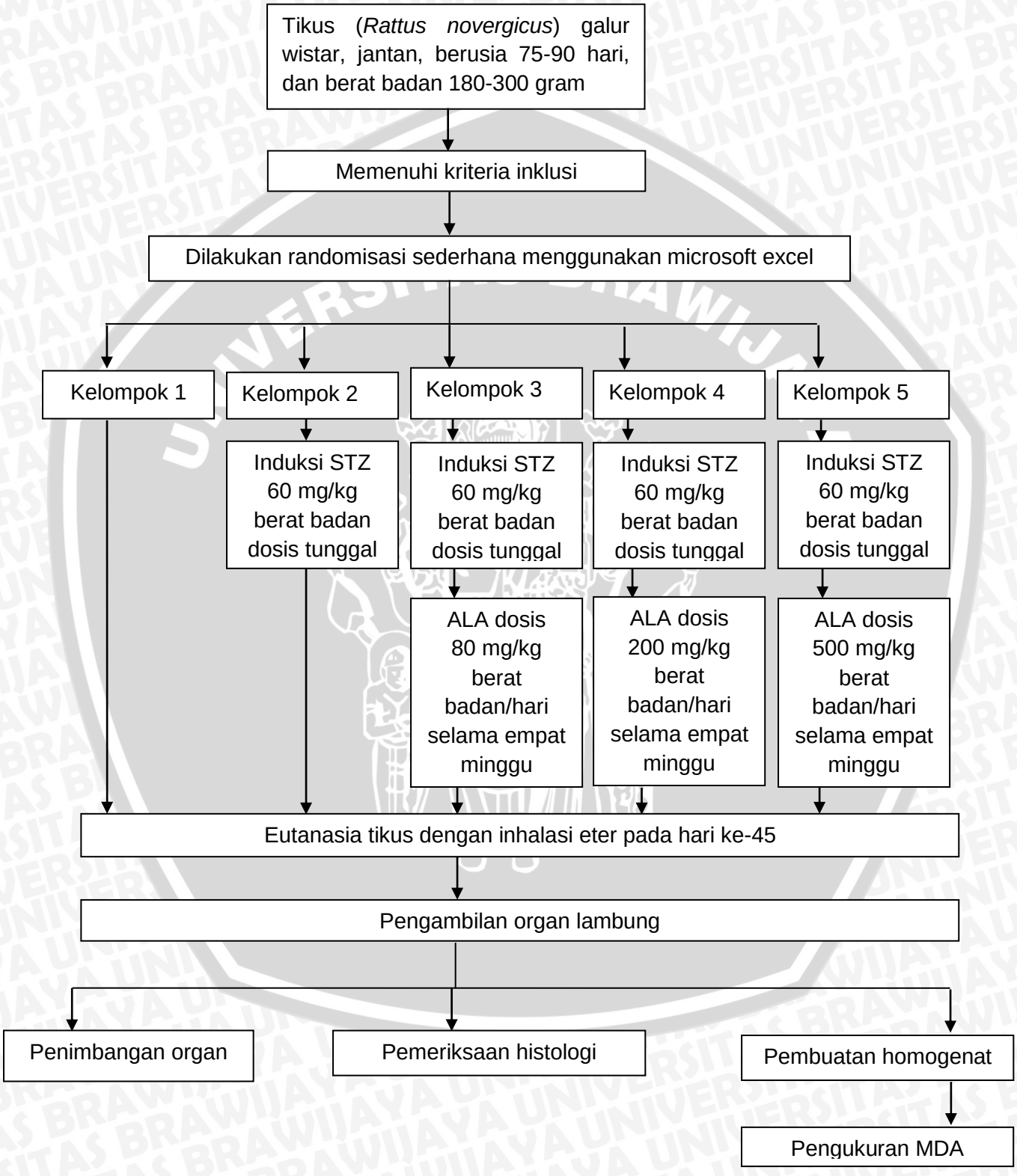
### 4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya:

- Berat badan masing-masing tikus diukur sebelum pemeliharaan. Pada kelompok II, berat badan ditimbang diawal dan sebelum injeksi streptozotocin. Berat badan kelompok III, IV, dan V diukur ketika awal penelitian, sebelum injeksi streptozotocin, dan setiap hari untuk penentuan dosis ALA. Berat badan tikus ditimbang dengan timbangan merk *KERN* 440-33N (ketelitian 0,01 g).
- Kadar glukosa darah diukur lima hari setelah injeksi streptozotocin dengan mengambil darah pada bagain ekor dengan menggunakan *glucose check test* untuk memastikan tikus telah mengalami diabetes mellitus. Untuk memastikan tikus tetap diabetes, pengukuran kadar glukosa darah diukur setiap minggu selama empat minggu.

- Pemeriksaan histologi lambung setelah pemberian ALA selama empat minggu dengan pembuatan *slide* sesuai metode yang digunakan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.
- Kadar MDA diukur setelah pemberian ALA selama empat minggu sesuai metode tetap pengukuran MDA di Laboratorium Faal FKUB.

### 4.8 Kerangka Operasional



### 4.9 Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 16.00. Data kadar MDA dan bobot lambung yang didapatkan lalu diekspresikan dalam mean $\pm$ standart deviation (SD). Analisa data dilakukan dengan uji statistik menggunakan *Anova One Way* untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar MDA dan bobot lambung terhadap perlakuan yang diberikan dan perbedaan dikatakan signifikan bila $p \leq 0,05$. Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

$H_0$ = ada penurunan stres oksidatif pada lambung tikus Wistar diabetes mellitus tipe 1 yang besarnya tergantung dosis ALA yang digunakan

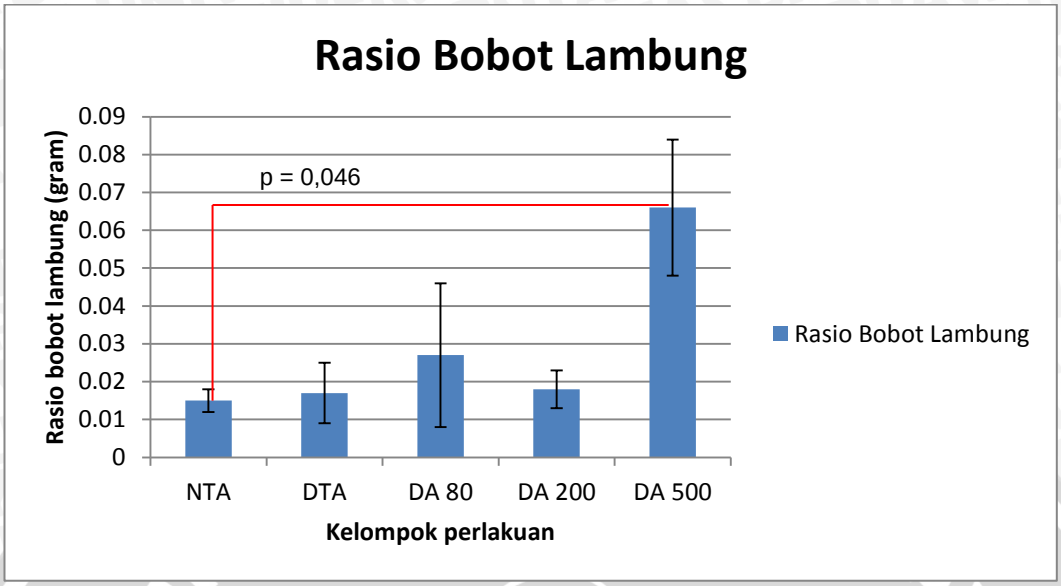
$H_A$ = tidak ada penurunan stres oksidatif pada lambung tikus Wistar diabetes mellitus tipe 1 pada masing-masing dosis ALA yang digunakan

# BAB V

# HASIL PENELITIAN

## 5.1. Rasio Bobot Lambung terhadap Berat Badan

Rasio bobot lambung terhadap berat badan menunjukkan nilai yang hampir sama pada kelompok NTA, DTA, dan DA200 (NTA: 0,015 ± 0,003; DTA: 0,017 ± 0,008; dan DA200: 0,018 ± 0,005). Rasio kelompok DA80 (0,027 ± 0,019) lebih besar dari ketiga kelompok tersebut, sedangkan kelompok DA500 menunjukkan nilai paling besar dibandingkan dengan empat kelompok lainnya (0,066 ± 0,018). Namun berdasarkan uji beda Kruskal Wallis tidak terdapat perbedaan signifikan rasio bobot lambung dari masing-masing kelompok (p = 0,188). Sedangkan berdasarkan uji korelasi *Pearson Product Moment* menunjukkan bahwa kelompok NTA, DTA, DA 80, DA 200, dan DA 500 dengan rasio bobot lambung terhadap berat badan memiliki hubungan positif yang kuat (r = 0,633), dan korelasi antara kedua variabel tersebut signifikan (p = 0,006). Uji *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara rata-rata rasio bobot lambung terhadap berat badan antara kelompok NTA dengan DA500 (p = 0,046). Data rasio bobot lambung terhadap berat badan dapat dilihat pada Gambar 5.1



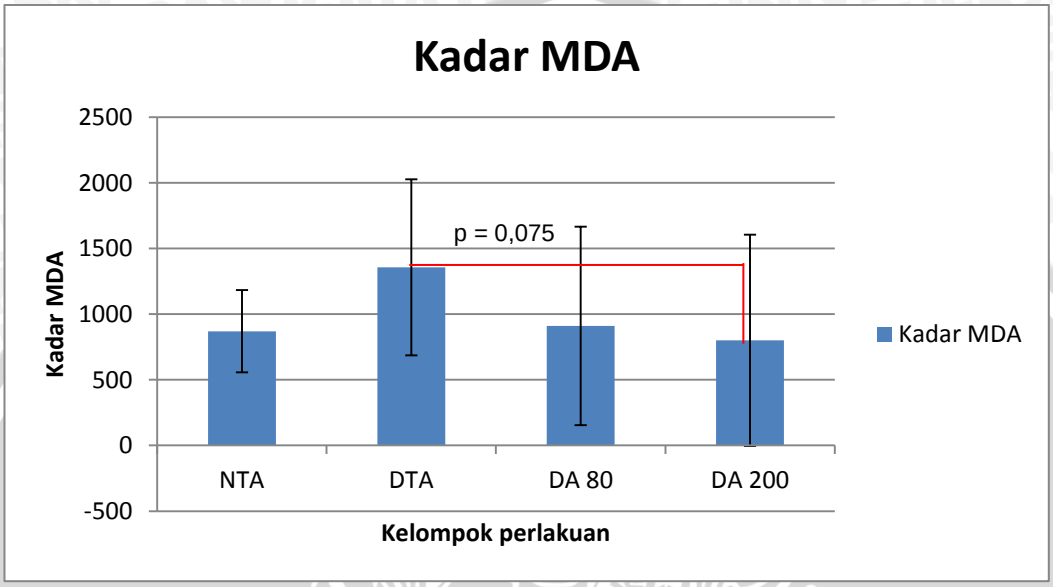

Gambar 5.1 Rasio Bobot Lambung terhadap Berat Badan Tikus.

Keterangan: Data ditampilkan dalam rata-rata ± standar deviasi. ALA dosis 500 mg/kg berat badan perhari menunjukkan rasio bobot lambung paling besar dibandingkan NTA, DTA, DA200, dan DA80. Rasio bobot lambung pada kelompok NTA, DTA, dan DA200 menunjukkan nilai yang hampir sama. Sedangkan, kelompok DA80 sedikit lebih besar dari kelompok NTA, DTA, dan DA200. Terdapat perbedaan rata-rata rasio bobot lambung yang bermakna antara kelompok NTA dengan DA500 (p = 0,046).

### 5.2. Kadar Malondialdehid (MDA) pada Lambung Tikus

Kadar MDA pada lambung tikus menunjukkan nilai paling tinggi terdapat pada kelompok DTA (DTA: 1356,5 ± 670,59). Nilai kadar MDA pada kelompok DA 80 lebih rendah dibandingkan kelompok DTA tetapi lebih tinggi dibanding kelompok NTA (NTA: 869,0 ± 312,9 dan DA 80: 909,5 ± 755,8). Sedangkan nilai terendah terdapat pada tikus kelompok perlakuan ALA dengan dosis 200 mg/kg berat badan pehari (DA 200: 800,5 ± 804,2). Namun berdasarkan uji beda Kruskal Wallis menunjukkan antara kadar mda dari masing-masing kelompok tidak terdapat perbedaan signifikan (p = 0,110). Uji korelasi *Pearson Product Moment* menunjukkan bahwa antara kelompok NTA, DTA, DA 80, dan DA 200 terdapat hubungan negatif yang sangat lemah dan tidak signifikan (r = -0,99; p = 0,670). Uji *Mann Whitney* antara kelompok DTA dan DA200 menunjukkan bahwa

tidak ada perbedaan yang bermakna dari rata-rata kadar MDA kedua kelompok tersebut (p = 0,075). Data kadar MDA pada lambung tikus dapat dilihat pada Gambar 5.2

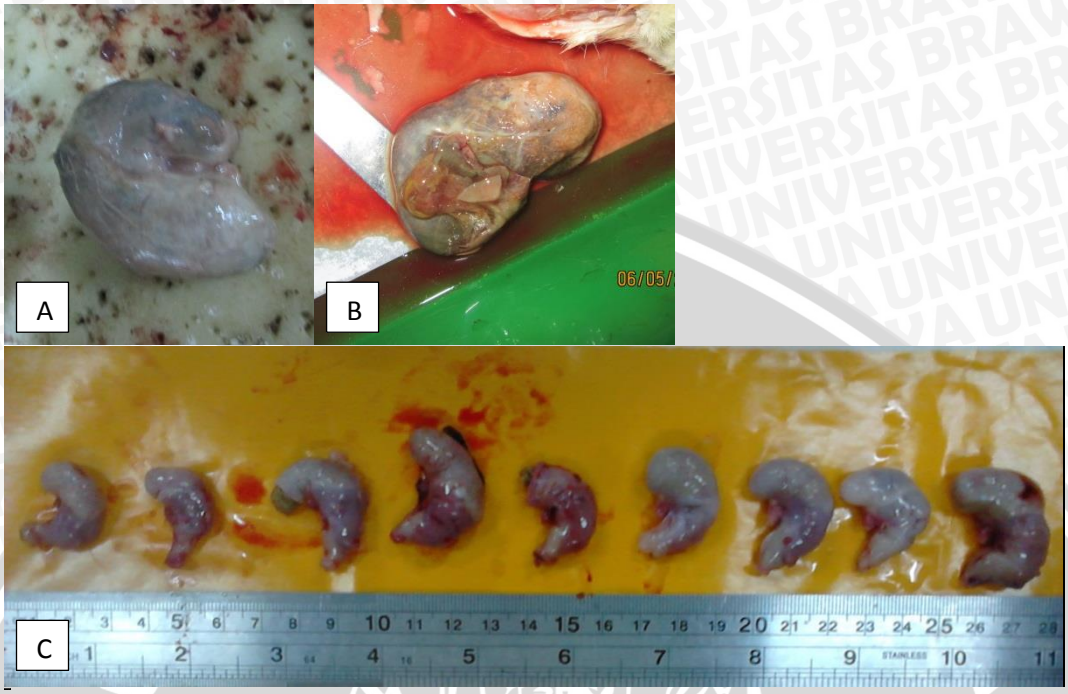



Gambar 5.2 Kadar MDA pada Lambung Tikus.

Keterangan: Data ditampilkan dalam rata-rata ± standar deviasi. Kadar MDA terendah pada kelompok DA200 dan tertinggi pada kelompok DTA. Kelompok DA80 memiliki kadar lebih tinggi dari kelompok NTA. Tidak ada perbedaan bermakna antara rata-rata kadar MDA pada kelompok DTA dan DA200 (p = 0,075).

### 5.3. Pengamatan Struktur Lambung

Pengamatan struktur lambung dilihat dari morfologi lambung dan pemeriksaan histologi. Pengamatan morfologi lambung dapat dilihat pada gambar 5.3. Tikus dari kelompok DTA (tikus no 23 dan 16), kelompok DA80 (tikus no 1, 3, 5, dan 26), kelompok DA200 (tikus no 4, 8, 13, dan 21), kelompok DA500 (tikus no 2 dan 10), yang mati sebelum empat minggu perlakuan, menunjukkan kondisi lambung yang mengalami pembengkakan dengan dinding yang terlihat lebih tipis dibandingkan dengan tikus yang dibedah setelah empat minggu perlakuan.

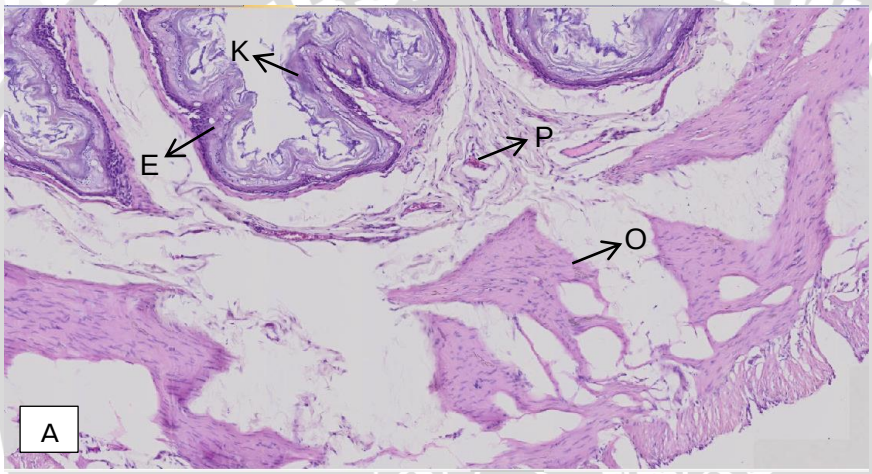


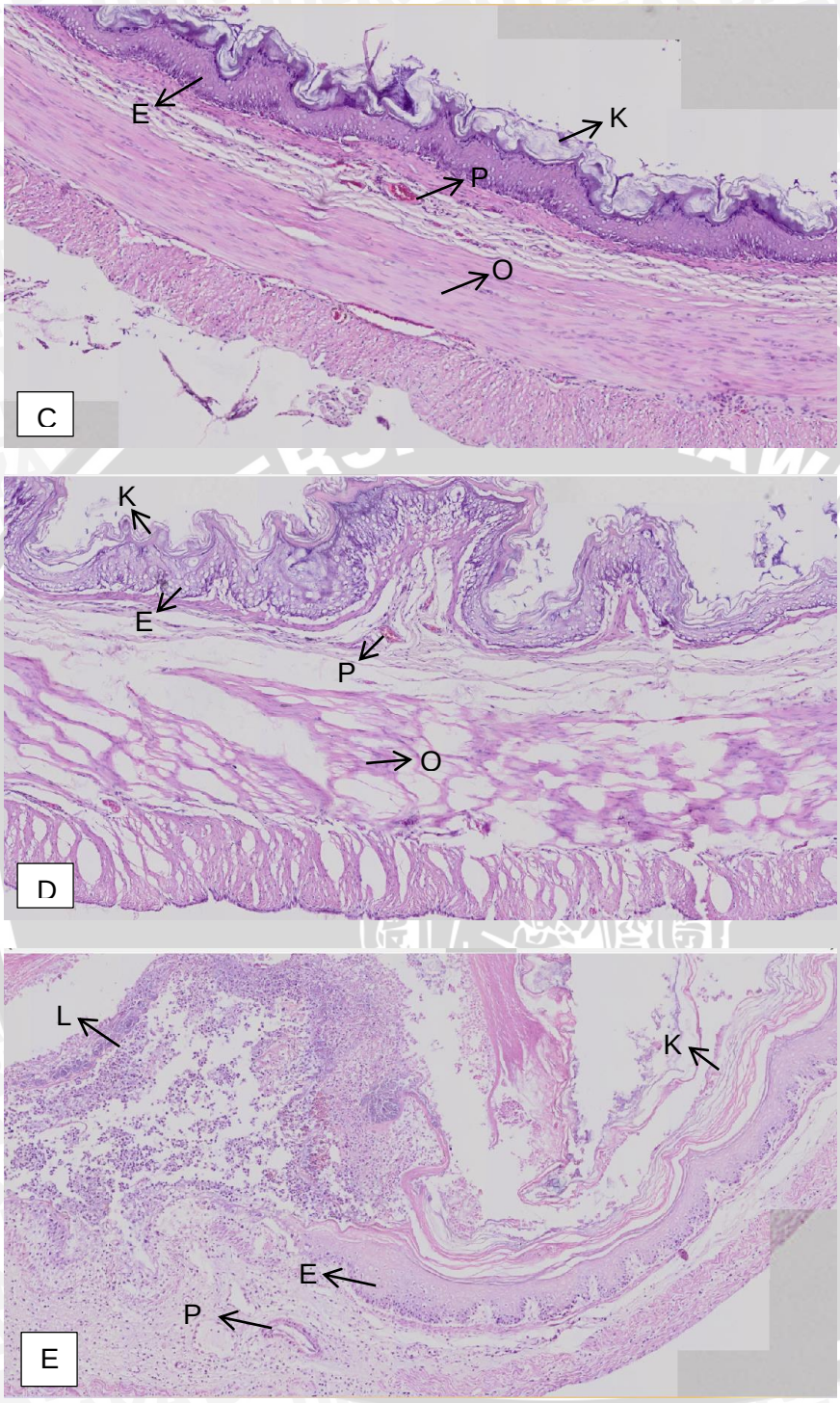

Gambar 5.3. Lambung tikus.

Keterangan: Lambung tikus yang mati sebelum empat minggu perlakuan terlihat membengkak dengan dinding lambung yang tampak lebih tipis (A dan B). Lambung tikus yang dibedah setelah empat minggu perlakuan terlihat memiliki ukuran yang hampir sama dengn dinding yang terlihat lebih tebal (B).

Pemeriksaan histologi dilakukan pada lambung cardia setelah diwarnai dengan hematoksilin eosin. Gambaran struktur lambung kelompok NTA, DTA, DA80, DA200, dan DA500 dapat dilihat pada gambar 5.4. Hasil pemeriksaan histologi pada bagian mukosa lambung dari kelompok NTA menunjukkan adanya lapisan keratin di dinding lambung, lapisan mukosa terdiri dari sel epitel berbentuk squamous, terdapat pelebaran pembuluh darah pada lapisan di bawah mukosa, gambaran dari lapisan muskularis mukosa dan muskularis eksterna tampak terputus-putus. Gambaran histologi kelompok DTA hampir sama dengan kelompok NTA, yaitu adanya lapisan keratin dan lapisan mukosa yang disusun oleh sel epidermis berbentuk squamous. Terdapat pelebaran pembuluh darah. Di beberapa tempat lapisan submukosa tidak teramati sehingga terlihat ruang kosong antara lapisan mukosa dengan lapisan otot.

Lapisan keratin dan sel epitel squamous juga terdapat pada gambaran histologi lambung tikus dari kelompok DA80, DA200, dan DA500. Semua tikus pada kelompok DA80, DA200, dan DA500 juga menunjukkan adanya pelebaran pembuluh darah. Tikus no 1 dari kelompok DA80 dan semua tikus kelompok DA500 menunjukkan ada kerusakan di daerah mukosa dan terdapat sel radang yang menunjukkan adanya luka pada dinding lambung yang diakibatkan oleh trauma fisik.






Gambar 5.4 Penampang Mikroskopik Lambung Tikus.

Pada semua kelompok terdapat lapisan keratin dan sel epitel berbentuk squamous. Kelompok NTA (A); kelompok DTA (B); Kelompok DA80 (C); Kelompok DA200 (D); kelompok DA500 (E). Pada kelompok DA500 ada perlukaan serta sel inflamasi. E: epitel; K: keratin; P: pelebaran pembuluh darah; O: otot; L: luka dan sel inflamasi.

# BAB VI

# PEMBAHASAN

## 6.1. Rasio Bobot Lambung terhadap Berat Badan

Kelompok DA500 menunjukkan rasio bobot lambung terbesar diantara kelompok yang lain. Rasio bobot lambung terendah pada kelompok NTA, namun nilai dari rasio bobot dari kelompok NTA tidak jauh berbeda dengan kelompok DTA dan DA200. Sedangkan rasio bobot lambung pada kelompok DA80 lebih besar daripada kelompok NTA, DTA, dan DA200. Rasio bobot lambung pada kelompok NTA dan DTA hampir sama menunjukkan bahwa kondisi diabetes tidak cukup berpengaruh terhadap rasio bobot lambung terhadap berat badan. Menurut Gibson et al (2003), tikus diabetes memiliki berat badan 18-30% lebih rendah dibandingkan tikus normal. Pemberian terapi ALA pada tikus diabetes tidak mempengaruhi berat badan tikus secara signifikan. Sedangkan menurut Shay et al (2009), pemberian ALA dengan dosis lebih dari 180 mg/kg berat badan dapat menurunkan berat badan tikus.

Peningkatan rasio bobot lambung terjadi pada tikus dengan terapi ALA dosis 80 mg/kg dan 200 mg/kg berat badan perhari. Peningkatan yang tidak signifikan tersebut kemungkinan terjadi akibat efek ALA terhadap penurunan berat badan tikus yang tidak signifikan. Belum diketahui secara pasti efek ALA terhadap bobot lambung tikus. Kelompok DA500 memiliki rasio bobot lambung terbesar dengan kondisi lambung semua tikus pada kelompok ini membengkak

saat dibedah. Selain itu, berat badan tikus juga menurun dibandingkan kelompok lain.

Pembengkakan kemungkinan akibat dilatasi lambung karena lapisan otot pada lambung yang mengalami pembengkakan tampak lebih tipis. Dilatasi lambung dapat terjadi akibat gangguan fungsi otot polos atau karena kondisi neuropati. Diabetes dapat menyebabkan *autovagatomy* di saluran pencernaan. Hiperglikemi menyebabkan gangguan seluler di seluruh saluran pencernaan terutam di lambung. Sel-sel saraf dapat membengkak dan kehilangan serat mielin, dan sel-sel otot polos menjadi bulat dan transparan. Juga dapat menurunkan motilitas antrum dan pilorus (Bernstein, 2000). Sedangkan ALA merupakan kofaktor dari komplek dehydrogenase serta agen modulasi redoks yang efektif dalam memperbaiki kondisi neuropati somatik maupun autonomik pada diabetes dengan dosis 600 mg iv selama 5 hari/minggu selama empat belas kali terapi (Bansal, 2006). Selain itu ALA juga memiliki *gastroprotective effect.* Mekanisme *gastroprotective* ALA belum diketahui secara jelas dan belum ada penelitian mengenai hubungan dosis dengan respon untuk efek *gastroprotective* dan efek antioksidan ALA.

Selain itu, tampaknya tidak ada hubungan negatif antara tingginya dosis ALA dengan penurunan fungsi otot polos. Pada kolon, pemberian ALA dapat mengurangi respon kontraktil dibandingkan dengan control diabetes (Kumar dan Harish, 2003). Sedangkan pada saluran urin, pemberian ALA dosis 50 mg dan 100 mg/kg BB/hari pada tikus diabetes dapat menurunkun degenerasi sel otot polos detrusor dibandingkan dengan tikus diabetes (Kang dkk, 2007). Hal tersebut menunjukkan pemberian ALA dapat memperbaiki fungsi otot polos pada tikus diabetes. Namun belum terdapat penelitian mengenai overdosis ALA

terhadap otot polos serta neuropati pada lambung tikus. Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang melihat efek ALA, baik pada dosis terapetik maupun dosis toksik, terhadap lambung.

**6.2. Kadar Malondialdehid (MDA) pada Lambung Tikus**

Diabetes mellitus meningkatkan produk peroksidasi lipid (MDA) dibandingkan pada kondisi normal. Paparan stress oksidatif pada mukosa lambung menyebabkan pembentukan lipid peroksida yang ditunjukkan oleh peningkatan kadar salah satu produk peroksidasi lipid yaitu MDA (Kwiecien et al, 2002). Berdasarkan hasil penelitian, kelompok DTA memiliki rata-rata kadar MDA paling tinggi diantara kelompok yang lain karena kelompok ini mendapatkan perlakuan diabetes dan tidak mendapat perlakuan ALA sebagai antioksidan yang digunakan untuk terapi pada penelitian ini. Tikus pada kelompok perlakuan DA80 memiliki rata-rata kadar MDA lebih rendah disbandingkan pada kelompok DTA namun lebih tinggi daripada kelompok NTA. Sedangkan rata-rata kadar MDA terendah adalah kelompok perlakuan DA200. Kadar MDA pada kelompok ALA rebih rendah dibandingkan DTA karena ALA merupakan khelator logam yang berperan sebagai penangkap radikal bebas. ALA juga menghambat ROS melalui proses katalisasi logam (Gibson et al, 2003). Berdasarkan hasil tersebut, pemberian terapi ALA pada dosis 80 mg/kg berat badan perhari dapat menurunkan kadar MDA dibandingkan tikus diabetes tanpa terapi ALA. Namun, penurunan kadar MDA lebih banyak pada kelompok tikus dengan terapi ALA 200 mg/kg berat badan perhari. Hal ini menunjukkan bahwa terapi ALA pada dosis 200 mg/kg berat badan perhari lebih baik dalam menurunkan stres oksidatif pada lambung tikus diabetes mellitus.

Kelompok perlakuan DA500 tidak diukur kadar MDAnya. Berdasarkan pembahasan oleh Fatmawati (2013), tikus pada kelompok perlakuan DA500 tidak diukur kadar MDAnya karena jarak kematian dan pembedahan cukup lama dan juga kematian terjadi pada awal terapi ALA. Pengukuran MDA memerlukan sampel organ yang segar untuk menghindari terjadinya positif palsu sehingga meningkatkan kadar MDA. Namun berdasarkan hasil analisis statistik, tidak ada perbedaan kadar MDA yang signifikan antar kelompok perlakuan.

### 6.3. Pengamatan Struktur Lambung

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi menunjukkan terjadinya pembengkakan pada saluran gastrointestinal (lambung dan usus) tikus yang mengalami kematian sebelum selesai perlakuan (empat minggu). Sedangkan tikus yang dibedah saat selesai perlakuan tidak menunjukkan adanya pembengkakan saluran gastrointestinal. Tikus yang mati sebelum empat minggu perlakuan menunjukkan kondisi tubuh yang membengkak pada bagian perut. Pengamatan morfologi lambung tikus yang dibedah setelah empat minggu perlakuan menunjukkan ukuran yang tidak terlalu jauh berbeda. Ukuran dari lambung tikus tersebut tampaknya tidak terpengaruh oleh perlakuan yang diberikan. Beberapa tikus yang tidak diinduksi diabetes (misalnya nomor 15) menunjukkan ukuran yang lebih besar dibandingkan tikus diabetes. Tikus diabetes tanpa ALA yaitu nomor 29 terlihat ukurannya sedikit lebih besar. Tikus diabetes dengan ALA 80 mg/kg berat badan perhari dengan nomor 20 yang dibedah setelah empat minggu perlakuan juga menunjukkan ukuran sedikit lebih besar dibandingkan yang lain. Namun besarnya ukuran lambung tidak menyerupai lambung tikus yang mati sebelum selesai perlakuan dan dengan

dinding lambung yang terlihat lebih tebal dibandingkan tikus yang telah mati sebelum selesai perlakuan.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik struktur lambung, sel epitel pada mukosa lambung berbentuk squamous berlapis. Terdapat keratin pada bagian luar mukosa lambung tikus pada semua kelompok. Sel epitel penyusun dinding lambung pada daerah cardia memang berbentuk squamous. Sedangkan keratin merupakan lapisan yang mati yang tidak jelas lagi batas selnya. Keratin secara normal terdapat pada daerah *non-glandular* atau cardia. Derajat keratin pada lambung dapat bervariasi dipengaruhi oleh asupan makanan tikus, pada tikus puasa lapisan keratin akan lebih tebal (Fox et al, 2006). Namun pada penelitian ini semua tikus mendapat asupan makanan yang sama, waktu pengondisian puasa pun sama. Sehingga kondisi ketersediaan makanan tidak mempengaruhi tebal lapisan keratin. Tikus no 1 (kelompok DA80) dan semua tikus kelompok DA500 menunjukkan ada luka dan sel inflamasi di daerah mukosa. Berdasarkan pengamatan, luka tersebut diakibatkan oleh trauma fisik, kemungkinan akibat terkena sonde. Terjadi pelebaran pembuluh darah pada lambung tikus semua kelompok perlakuan. Dilihat dari hasil pengamatan histologi, tidak terdapat perbedaan struktur histologi yang diakibatkan kondisi diabetes dengan atau tanpa ALA.

Hasil pembuatan *slide* histologi lambung pada beberapa tikus terdapat kerusakan sehingga tidak jelas bentuk dan susunan selnya. Terutama pada lapisan otot dan lapisan keratin dari beberapa sampel yang terlepas. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh fiksasi jaringan dalam formalin pada saat penyimpanan kurang baik, misalnya jaringan yang tidak terendam sempurna

dalam larutan formalin atau perbandingan antara ukuran jaringan dengan jumlah larutan formalin yang digunakan tidak seimbang.

# BAB VII

# PENUTUP

## 7.1 Kesimpulan

1. Stres oksidatif tidak meningkatkan rasio bobot lambung secara signifikan. Selain itu pemberian ALA pada dosis 80 mg/kg berat badan perhari dan 200 mg/kg berat badan perhari tidak berpenagruh signifikan terhadap rasio bobot ALA. Sedangkan pemberian ALA pada dosis 500 mg/kg berat badan perhari meningkatkan rasio bobot lambung secara signifikan.
2. Penurunan kadar MDA terjadi pada kelompok DA80 dan DA200 namun tidak signifikan.
3. Tidak terdapat perbedaan pada jaringan lambung akibat stres oksidatif dengan atau tanpa ALA pada dosis 80 mg/kg berat badan perhari, 200 mg/kg berat badan perhari, dan 500 mg/kg berat badan perhari.

## 7.2 Saran

1. Durasi perlakuan perlu ditingkatkan karena selama perlakuan empat minggu tidak menunjukkan perubahan yang signifikan pada rasio bobot, kadar MDA, dan struktur jaringan lambung.
2. Bagian lambung yang digunakan untuk pengamatan mikroskopik sebaiknya bagian *glandular* karena bagian *non-glandular* memiliki struktur yang sedikit berbeda dan lebih mirip dengan esophagus.

3. Diperlukan pengamatan waktu pengosongan lambung untuk mengetahui apakah dalam waktu perlakuan selama empat minggu tikus telah mengalami perlambatan pengosongan lambung yang berakibat terhadap penyerapan ALA yang diberikan peroral.