

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Dalam studi ini diukur gula darah puasa tikus untuk menentukan apakah tikus sukses terinduksi diabetes melitus. Terdapat perbedaan bermakna pada kadar gula darah puasa tikus ($p < 0.05$). Yaitu 210mg/dl pada kontrol negatif dan 375.75mg/dl pada kontrol positif. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut pada hasil uji Mann-Whitney ($p < 0.05$). Kelompok kontrol negatif dinyatakan tidak mengalami diabetes melitus sedangkan kontrol positif terbukti terinduksi diabetes melitus karena setelah tiga hari setelah diinjeksi streptozotocin 30mg/kgBB sebanyak dua kali interval 24 jam secara intraperitoneal mengalami kenaikan gula darah puasa > 300 mg/dl (Deeds, et al, 2011; Hussain, 2002). Pemberian STZ pada dosis tersebut menyebabkan hewan coba akan mengalami insulinitis autoimun (*T-lymphocyte dependent*) (Deeds et al., 2011).

Kenaikan gula darah diinduksi STZ yang menyebabkan kerusakan sel β pankreas melalui GLUT-2 (Khan dan Ola, 2012). STZ juga menjadi donor NO yang berkontribusi terhadap kerusakan sel melalui aktivitas guanilil siklase dan ROS serta pembentukan cGMP. Pembentukan anion superoksida dalam mitokondria melalui penghambatan siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen sehingga produksi ATP dan jumlah nukleotida β pankreas berkurang. Kerusakan DNA akibat alkalisasi DNA melewati gugus nitrosirea menjadi

penghambat sekresi dan sintesis insulin sehingga jatuh pada keadaan hiperglikemia(Nugroho, 2006). Setelah tikus diinduksi STZ dalam tiga hari akan terjadi kerusakan sel β pankreas (Akbarzadeh *et al.*, 2007)

Pengukuran pada kontrol positif dan D10 memperlihatkan perbedaan hasil gula darah puasa antara kedua kelompok tersebut melalui uji Mann-Whitney tidak nyata($p>0.05$). Pada D10 tikus diberi diet tinggi lemak dan induksi antosianin 10mg/kgBB memiliki rata-rata 447.5mg/dl. Hal ini menunjukkan bahwa tikus DM dengan antosianin masih mengalami kenaikan gula darah. Antosianin mampu memperbaiki intoleran glukosa pada tikus diet tinggi lemak dan efek antihiperglikemik dengan menghambat dengan sangat lemah pencernaan karbohidrat melalui inhibisi α -glucosidase (Lucioli, 2012)

Hal serupa terjadi pada kelompok D20 dan D80 yang memiliki kadar gula darah puasa 425.5 mg/dl dan 435.5 mg/dl. Antara D10 dan D20 terlihat bahwa D20 memiliki nilai GDP lebih rendah daripada D10. Kemungkinan hal ini dikarenakan antosianin dosis 20mg/kgBB lebih efektif dalam menurunkan GDP. Pada riset yang dilakukan Maharani *et al.*, (2014), ekstrak antosianin Ipomea batatas kultivar gunung kawi, yang digunakan pula pada penelitian ini menunjukkan dosis optimal terapi yang digunakan pada tikus dengan diet aterogenik adalah 20mg/kgBB.

Sebaliknya, terjadi peningkatan kembali GDP pada tikus kelompok D80. Pada kelompok ini, dosis antosianin yang diberikan adalah 80mg/kgBB. Kadar tersebut kemungkinan sudah mencapai kadar toksik. Disebutkan bahwa, dosis suatu zat berpotensi toksik tanpa menimbulkan kematian maupun sakit berat

apabila diberikan sebanyak empat kali lipat lebih besar dari dosis optimal terapi (OECD,1998).

Jadi untuk induksi diabetes melitus pada tikus dinyatakan berhasil dengan adanya peningkatan gula darah melalui diet tinggi lemak dan injeksi STZ. Diet tinggi lemak terbukti dapat menurunkan sensitivitas insulin yang ditandai dengan meningkatnya jumlah insulin serum (Sridhar *et al.*, 2008). Pada studi Srinivasan *et al.*, (2005) juga menyebutkan bahwa diet tinggi lemak dapat menginduksi resistensi insulin yang ditandai dengan hiperglikemia, hipertrigliserida, hiperkolesterolemia dan kompensasi hiperinsulinemia . Resistensi insulin terjadi akibat perubahan berat badan pada tikus dengan adanya induksi diet tinggi lemak.. Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa semua kelompok perlakuan tikus mengalami penambahan berat badan (lihat Lampiran 2, halaman 56). Hal ini dapat diakibatkan aktivitas fisik yang kurang karena tikus berada dalam kandang. Namun pada kelompok kontrol positif mengalami peningkatan paling tinggi, disusul kontrol negatif di urutan kedua. Pemberian antosianin memberikan efek peningkatan berat badan dalam jumlah yang lebih kecil dibanding kelompok kontrol meskipun secara statistik tidak signifikan.

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran gula darah puasa di akhir penelitian (*post-test group design*) untuk melihat kondisi diabetes pada hewan coba. Dengan membandingkan kadar grup kontrol negatif dan grup induksi STZ dan diet tinggi lemak. Metode ini digunakan sebagai metode alternatif dari standar yakni multiple-comparation testing (Huck dan McLean, 1975). Selain itu, HbA1c juga dapat dipilih sebagai metode untuk memonitor kadar gula darah puasa tikus selama penelitian. HbA1c dapat merefleksikan keadaan glikemik selama 2-3 bulan terakhir sebelum pemeriksaan (Khan, *et al.*, 2007).

6.2 Efek Antosianin terhadap Kadar Serum Kreatinin Tikus Model

Diabetes Melitus

Pada penelitian ini, diukur kadar serum kreatinin untuk mengkaji adanya kerusakan ginjal akibat diabetes. Hasil pengukuran menggunakan metode Jaffe didapatkan 0.6 mg/dl untuk kontrol negatif, 0.58 mg/dl untuk kontrol positif, 0.65 mg/dl untuk diet tinggi lemak ditambah antosianin dosis 10mg/kgBB, 0.63 mg/dl untuk diet tinggi lemak ditambah antosianin dosis 20mg/kgBB, dan 0.6 mg/dl diet tinggi lemak ditambah antosianin dosis 80mg/kgBB. Dari hasil tersebut terlihat bahwa nilai serum kreatinin semua kelompok perlakuan adalah normal, yaitu dalam kisaran 0.2-0.8mg/dl. Dan perbedaan nilai antar kelompok tidak signifikan ($p>0.05$)

Nilai serum kreatinin pada kontrol positif(KP) lebih rendah dari kontrol negatif(KN) meskipun tidak signifikan. Umumnya, peningkatan serum kreatinin menjadi penanda terjadinya kerusakan ginjal (Laksmi *et al.*, 2014). Namun, pada kondisi hiperglikemi akut, akan terjadi *tubuloglomerular feedback* akibat kompensasi vaskuler glomerulus yang rusak sehingga terjadi kenaikan GFR akibat hiperfiltrasi glomerulus. Sehingga bahan metabolisme akan cepat keluar tubuh (Hendromartono, 2009). Kondisi ini diimplikasikan dengan keadaan prediabetes atau diabetes subklinis. Dapat juga diakibatkan penurunan massa otot tikus yang membentuk kreatinin sebagai target utama dari insulin. Keadaan resistensi insulin ini dapat diakibatkan akibat volume otot yang menurun. Induksi STZ juga secara signifikan menurunkan glikogen di hepar dan massa otot skelet (Harita *et al.*, 2009). Terlihat pada penelitian ini bahwa tikus mengalami penurunan berat badan setelah injeksi STZ. Dilaporkan bahwa kadar serum

kreatinin yang rendah adalah faktor resiko terjadinya diabetes (Harita *et al.*, 2009).

Pada kelompok D10 dengan perlakuan diet tinggi lemak dan antosianin dosis 10mg/kgBB memiliki nilai serum kreatinin yang lebih tinggi(0.65 mg/dl) dari kontrol positif(0,58 mg/dl). Keadaan ini kemungkinan disebabkan oleh kadar GDP kelompok D10 lebih tinggi dari kontrol positif meskipun secara statistik tidak nyata.

Tampaknya, ketika tikus diinduksi antosianin, kadar serum kreatinin semakin mengecil seiring dengan pemberian antosianin dengan dosis yang semakin tinggi walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Penurunan nilai ini berbeda mekanismenya dengan kontrol positif. Antosianin memiliki efek neuroprotektif, yakni antiinflamasi dan antioksidan sehingga mencegah kerusakan glomerulus akibat peningkatan aktivitas platelet untuk melepas nitrogen sebagai antitrombotik. Sehingga proses filtrasi berjalan lebih baik (Mohaghegni, *et al.*, 2011). Sedangkan pada kontrol positif, penurunan kreatinin dapat diakibatkan oleh kondisi hiperfiltrasi maupun penurunan massa otot (Hjelmsaeth *et al.*, 2010).

Keakuratan nilai kreatinin yang muncul bergantung pada beberapa hal, salah satunya metode pemeriksaan. Metode Jaffe, yang digunakan pada penelitian ini, adalah metode yang sering dipakai dalam pemeriksaan. Namun metode ini memiliki bias, salah satunya akibat kondisi serum yang lipemik dan hemolisis dapat memengaruhi hasil pemeriksaan kreatinin. Maka, pada kondisi seperti ini dapat dipilih metode lain, seperti ELISA yang menggunakan reaksi enzimatik (Ou, *et al.*, 2015). Namun pada studi de Castro, *et al.*, 2013

menyatakan tidak ada perbedaan nyata antara pembacaan nilai serum kreatinin menggunakan spektrofotometri maupun ELISA.

Induksi diabetes pada penelitian ini dilakukan selama 45 hari dan injeksi pada hari ke 41. Dan pada setiap kelompok, memiliki rerata nilai serum kreatinin yang masih dalam range normal. Hal ini dapat menunjukkan bahwa hewan coba kemungkinan belum mengalami komplikasi nefropati masif. Hal ini dapat diakibatkan induksi diabetes pada studi kali ini belum cukup lama untuk meningkatkan kadar serum kreatinin tikus. Waktu injeksi STZ sebagai destruktur sel β pankreas sebelum pembedahan mungkin juga kurang jauh jaraknya sehingga kondisi hiperglikemi yang menyebabkan kerusakan ginjal belum memenuhi untuk terjadi peningkatan kadar kreatinin

Pada studi yang dilakukan oleh Khan dan Ola, (2012) menunjukkan peningkatan serum kreatinin 1,15 kali lebih besar setelah 60 hari perlakuan diabetes. Hasil riset lain menunjukkan pemberian STZ setelah hari ke 14 dan 18 meningkatkan serum kreatinin 2,66 dan 18,87 kali lebih besar. Hal ini terjadi karena pada hari ke 14 dan 18 tikus diabetes mengalami penurunan *renal blood flow* sehingga terjadi peningkatan serum kreatinin (Kang *et al.*, 2006). Pada kajian Yokozawa *et al.*, (2005) peningkatan serum kreatinin, terjadi pada tikus perlakuan diabetes selama 50 hari yang menunjukkan adanya disfungsi ginjal. Kemudian pada penelitian Eidi *et al.*,(2006) setelah 7 hari tikus diinjeksi STZ kemudian diberi perlakuan diabetes selama 14 hari menunjukkan penurunan kadar serum kreatinin.

Begitu pula dengan hasil uji statistik menunjukkan bahwa perbedaan nilai serum kreatinin antar kelompok tersebut tidak signifikan. Kenaikan kreatinin menjadi signifikan jika GFR mengalami penurunan 40-60% (McClatchey, 2002). Sebelum terjadi penurunan GFR dan masuk fase ESRD, kerusakan ginjal dapat dideteksi dengan marker lain yang lebih dini, seperti *Cystatin-C* yang bekerja pada fungsi filtrasi glomerulus. Sedangkan *NGAL*, *KIM-1* merupakan biomarker yang bekerja pada fungsi reabsorpsi tubulusnya. Kreatinin urin juga diperlukan untuk menghitung klirens kreatinin sehingga lebih spesifik (Adiyanti dan Loho, 2012).

