

PENGARUH DIABETES MELLITUS YANG DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOSIN TERHADAP KEMUNGKINAN BERKEMBANGNYA "DIABETIC NEPHROPATHY" PADA TIKUS HIPERTENSI

By: Armenia

Jurusan Farmasi FMIPA Unand Padang

Abstract

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kepekaan ginjal tikus hipertensi diabetes yang diinduksi dengan STZ terhadap berkembangnya "diabetic nephropathy" (DN). Tikus hipertensi spontan (SHR) diinjeksi dengan streptozotosin (55 mg/kg) secara intraperitoneal. Berat badan (BB) pengambilan air minum (PAM), pengeluaran urin (PU), glukosa plasma (PG), natrium plasma (PNa), kreatinin plasma (PKr), pengeluaran natrium urin (UNa) dan pengeluaran kreatinin urin 24 jam (UKr) pada hari ke 4, 5, 6 and 7 ditentukan dan laju filtrasi glomerulus dihitung. Data dibandingkan dengan kelompok tikus SHR yang tidak diabetes. Hasil menunjukkan bahwa PG, PAM, PU, tikus SHR diabetes lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang tidak diabetes ($p < 0.05$ untuk semua data). Walaupun PNa dan PKr tikus diabetes tidak berbeda nyata dibandingkan dengan PNa dan PKr tikus kontrol ($p > 0.1$ untuk keduanya), akan tetapi laju filtrasi glomerulus tikus SHR diabetes jauh lebih tinggi dibandingkan dengan tikus SHR yang tidak diabetes. Ini berarti bahwa ginjal tikus hipertensi diabetes yang diinduksi dengan STZ jangka pendek berpeluang untuk mengalami "diabetic nephropathy".

Pendahuluan

Ginjal berfungsi mengatur volume dan konsentrasi cairan tubuh, mempertahankan keseimbangan asam-basa cairan tubuh, mengekskresikan kelebihan asam dan basa tubuh. Ia mempertahankan konsentrasi zat-zat terlarut tertentu seperti kalium, fosfat, magnesium dalam batas yang sangat kecil dan membuang sisa-sisa metabolisme dan zat-zat beracun lainnya. Ginjal juga menghasilkan eritropoietin yang terlibat dalam mengatur tekanan darah (Leaf and Cotran, 1976).

Hiperglikemia dapat mencetus perkembangan penyakit pembuluh kaliber kecil dan besar serta penyakit saraf perifer sehingga meningkatkan resiko serangan, strok, kebutaan, amputasi and gagal ginjal (Porte and Schwartz, 1996). Hipertensi yang sangat umum terjadi sebagai komplikasi diabetes, prevalensinya

pada penderita diabetes ini dua kali lebih besar dibandingkan dengan kebanyakan populasi (Fuller, 1985; Teuscher *et al.*, 1989). Komplikasi pembuluh dalam keadaan ini penyebab tingginya keparahan penyakit seperti dipercepatnya penyakit kardiovaskuler, penyakit pembuluh perifer, strok, retinopati dan kerusakan ginjal (nefropati) serta kematian (Epstein, 1997; and Parving, 1999).

Diabetes yang diinduksi dengan streptozotosin dalam jangka waktu pendek pada hewan beresiko untuk perkembangan polineuropati dan disfungsi saraf otonom (Maeda *et al.*, 1995). Pada penderita diabetes, sering dijumpai gangguan saraf ginjal (diabetic neuropathy) dan kerusakan ginjal (diabetic nephropathy-DN). Dilaporkan, 30 – 40% penderita diabetes menderita DN yang ditandai dengan tingginya angka nitrogen urea darah dan kreatinin serum (Lingappa, 1995). Secara morfologi, hewan yang diabetes memperlihatkan peningkatan berat ginjal dan albuminuria yang bersifat progresif (Landau *et al.*, 1998). Perubahan hemodinamik yang juga terjadi pada keadaan diabetes mengakibatkan meningkatnya laju filtrasi glomerulus (Magensen, 1994; and Komers, 1996). Sebagai konsekwensinya adalah terjadinya penyakit ginjal tahap akhir (Ritz *et al.*, 1999).

Penelitian terdahulu menggunakan tikus normotensif Sprague Dawley diabetes 7 hari yang diinduksi dengan streptozotosin menunjukkan kecenderungan terjadinya diabetic nephropathy (Armenia, 2001). Penelitian ini akan melihat sejauh mana pula peluang berkembangnya "diabetic nephropathy" pada ginjal tikus hipertensi diabetes yang diinduksi dengan streptozotosin.

Materi dan Metoda

Dua kelompok tikus hipertensi spontan (SHR) dengan berat badan 270 - 320 gram digunakan dalam penelitian ini, terdiri dari kelompok tikus SHR tidak diabetes (10 ekor) dan kelompok tikus SHR yang diinduksi dengan streptozotosin (STZ, 55 mg/kg i.p dalam larutan NaCl normal, 10 ekor). Sebelum diperlakukan, tikus-tikus diaklimatisasi di dalam kandang hewan dan dipuasakan selama 16 jam (Tomlinson *et al.*, 1992). Hewan kontrol hanya diberi air suling i.p. Semua tikus dikandangkan dalam kelompok yang terdiri dari 3 atau 4 tikus selama 2 hari setelah injeksi STZ. Tikus-tikus diberi makan dengan makanan hewan normal dan larutan glukosa 10% untuk minum. Empat puluh delapan jam setelah pemberian STZ, larutan 10% glukosa diganti dengan air ledeng. Pada hari ke 3, tikus-tikus dikandangkan sendiri-sendiri dalam kandang metabolisme. Berat badan (BB) ditimbang sakali 2 hari, pengambilan air minum (PAM) dan pengeluaran urin (PU) diukur setiap hari pada hari ke 4 s/d hari ke 10. Pada hari ke 10, sampel darah diambil untuk menentukan kadar glukosa, (Na^+) dan kreatinin darah. Selain itu ditentukan juga kadar (Na^+) dan kreatinin urin.

Penentuan Na⁺ Urin dan Plasma (UNa⁺ dan PNa⁺)

Na⁺ urine dan plasma yang diencerkan 200 kali ditentukan dengan menggunakan fotometer nyala (Corning Model 410C, Gallenkamp). Sebagai standar digunakan larutan NaCl 100 mmol yang juga telah diencerkan 200 kali. Dengan air suling.

Penentuan Kreatinin Urin dan Plasma (UKr and PKr)

Kadar kreatinin urine dan plasma ditentukan dengan menggunakan metoda yang dirancang oleh Seeling and Wust (1969). Sampel urin dan plasma dicampurkan dengan larutan kit "Crea-Kit" (Boehringer Mannheim) dengan perbandingan tertentu sehingga menghasilkan warna. Absorbans kemudian diukur dengan spektrofotometer (U-2000 Model, Hitachi) pada λ 520 nm dalam kuvet yang panjangnya 1 cm. Protokol penentuan kreatinin urin dan plasma lebih lanjut dapat dirujuk publikasi kami terdahulu (Armenia *et al.*, 2001). Setelah diperoleh kadar kreatinin plasma dan urin, lalu dihitung bersihan ginjal kreatinin dengan persamaan :

$$BKr = \frac{Ukr \times V}{PKr}$$

BKr adalah bersihan ginjal kreatinin, Ukr dan PK berturut-turut sama dengan kadar kreatinin urin dan plasma.

Penentuan Glukosa Plasma (PG)

Kadar glukosa plasma ditentukan dengan menggunakan Peridochrom glucose kit (Boehringer Mannheim) berdasarkan metoda colorimetric enzimatik sebagai berikut (Trinder, 1969). Absorbans diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 510$ nm, 25 °C (Selanjutnya baca Armenia *et al.*, 2001).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan student 'T' tes untuk kadar glukosa darah, natrium dan kreatinin darah. Data parameter berat badan, pengambilan air minum, pengeluaran urine, kadar natrium dan kreatinin urin dianalisa menggunakan ANOVA dua arah (Supernanova, Abacus, 1995) dilanjutkan dengan Duncan posthoc test. Kebermaknaan diambil pada tingkat kepercayaan (P) 5%.

Hasil

Secara umum, keadaan diabetes terlihat sebagai meningkatnya volume urin (polyuria), dan meningkatnya rasa haus (polydipsia) tikus dalam tempo 10 hari setelah penyuntikan STZ. Terlihat juga peningkatan kadar glukosa serta penurunan berat badan hewan-hewan percobaan.

PG, PNa and plasma creatinine (PCr)

Kadar PG, PNa dan PKr tikus terlihat pada Table 1. Disini terlihat bahwa kadar glukosa plasma tikus diabetes lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kadar glukosa plasma tikus yang bukan diabetes ($p < 0.0001$) PNa dalam tikus SHR diabetes tidak berbeda nyata dibandingkan dengan tikus kontrol ($p > 0.1$) demikian pula dengan kadar kreatinin plasma (PKr) ($p > 0.1$). Hasil perhitungan bersihan ginjal kreatinin memperlihatkan bahwa BKr tikus hipertensi diabetes lebih besar dari tikus hipertensi non-diabetes. Angka bersihan ginjal kreatinin yang identik dengan laju filtrasi glomerulus tikus diabetes dan non-diabetes berturut-turut adalah 7.02 ± 0.03 dan 0.24 ± 0.01 ml/min.

Berat Badan (BB), Pengambilan Air Minum (PAM) dan Pengeluaran Air Kencing (PAK)

Tikus yang diinjeksi dengan STZ memperlihatkan berat badan yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus normal ($p < 0.001$) (Tabel 2) dengan pengambilan air minum (PAM) yang sangat banyak ($p < 0.0001$) (Table 3) dan pengeluaran urin yang sangat tinggi ($p < 0.0001$). Akan tetapi tidak terlihat perbedaan yang nyata dalam pengambilan air minum dan pengeluaran urin dari hari ke hari ($p > 0.1$ untuk keduanya) (Table 3).

Table 1: Kadar glukosa, natrium dan kreatinin plasma tikus SHR diabetes dan kontrol ($= P < 0.05$)

n	Kondisi	PG (mg/dl)	PNa (mmol/l)	PKr (mg/dl)
10	Diabetes	$316.2 \pm 110.5^*$	187.2 ± 8.1	0.91 ± 0.05
15	Non-diab.	112.3 ± 4.7	184.2 ± 6.0	0.80 ± 0.07

Table 2. Pengaruh STZ terhadap berat badan (BB) tikus diabetes SHR dan kontrol (* = P<0,05)

Kondisi	N	BB (g)				Rata-rata
		Hari ke 1	Hari 3	Hari ke 5	Hari ke 7	
Non-diab.	10	268.6 ± 2.0	279.0 ± 3.4	285.8 ± 3.2	291.8 ± 2.4	281.3 ± 2.5
Diabetes	15	282.4 ± 2.1	261.2 ± 2.8	258.7 ± 3.3	250.4 ± 3.2	262.8 ± 1.8*

Table 3. Pengaruh STZ terhadap pengambilan air minum (PAM) pengeluaran urin selama 24 jam, (PU) of kadar Na urin (UNa) dan kadar kreatinin urin (UKr) (* = P<0.05)

Parameter	Kondisi	n	Hari ke				Rata-rata
			Hari ke 4	Hari ke 5	Hari ke 6	Hari ke 7	
PAM (ml)	Non-diab.	5	29.0 ± 0.6	28.5 ± 1.6	27.2 ± 2.2	28.7 ± 1.0	28.4 ± 1.0
	Diabetes	28	96.2 ± 5.0	104.5 ± 6.6	102.9 ± 5.7	109.5 ± 6.0	103.4 ± 2.9*
PU (ml)	Non-diab.	5	6.5 ± 1.1	8.7 ± 1.6	7.2 ± 0.6	6.7 ± 0.2	7.2 ± 0.5
	Diabetes	28	73.2 ± 5.3	78.2 ± 6.5	81.1 ± 6.0	85.5 ± 5.4	79.7 ± 2.9*
UNa (mmol/dl)	Non-diab.		146.0 ± 5.4	116.2 ± 6.7	137.7 ± 6.3	139.0 ± 6.2	134.7 ± 4.9
	Diabetes		11.3 ± 1.6	12.9 ± 1.6	12.5 ± 1.5	12.2 ± 1.7	25.2 ± 0.8*
UKr (mg/dl)	Non-diab.		113.7 ± 4.3	117.5 ± 2.1	117.5 ± 4.1	116.7 ± 5.2	116.2 ± 2.2
	Diabetes		41.0 ± 2.6	37.5 ± 3.3	37.0 ± 2.0	39.2 ± 2.0	38.7 ± 1.8*

Pembahasan

Model tikus diabetes yang diinduksi dengan STZ sangat lazim digunakan dalam penelitian diabetes mellitus dan komplikasinya (Rodrigues *et al.*, 1986; Shah *et al.*, 1995; Bangaru *et al.*, 1996; and Lakkad *et al.*, 1996), akan tetapi hipertensi yang sering menyertai diabetes tidak selalu muncul pada model diabetes ini (Rosch, 1980). Oleh sebab itu digunakan tikus hipertensi spontan yang diinduksi dengan STZ untuk mendapatkan keadaan diabetes hipertensi (Rosch, 1980). Model ini akan mempercepat kerusakan ginjal (Cooper *et al.*, 1986).

Hanya tikus dengan kadar glukosa plasma sebesar 250 mg/dl atau lebih yang digunakan dalam penelitian ini. Pemberian larutan glukosa 10% dalam air minum setelah penyuntikan STZ selama 3 hari adalah untuk mencegah hipoglikemia yang dapat menyebabkan kematian (Junod *et al.*, 1969).

Berat Badan tikus diabetes yang diinduksi dengan STZ

Penurunan berat badan tikus diabetesi disebabkan oleh gagalnya pemasukan glukosa dan asam amino, terutama ke dalam sel hati dan otot. (Funk and Feingold, 1995) yang pada gilirannya akan mengakibatkan penurunan substrat-substrat untuk metabolisme sel. Bila ini terjadi berkepanjangan akan menurunkan ketersediaan nutrisi dan akan mengakibatkan penurunan berat badan (Wong and Tzeng, 1993). Selain itu kehilangan kalori, dehidrasi dan perombakan otot juga akan mengakibatkan penurunan berat badan (Funk and Feingold, 1995).

PG, PNa dan PKr

Seperti halnya penelitian terdahulu (Junod *et al.*, 1969; Ferre *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992; Ozturk, 1994; and Gando *et al.*, 1997 dan Armenia *et al.*, 2001), pada tikus SHR yang diinduksi dengan STZ ini juga terjadi peningkatan glukosa darah yang berarti. Sebagaimana diketahui, hormon insulin berfungsi mentransport gula ke dalam jaringan (Ganong, 1999). Kerusakan sel-sel β -pankreas oleh STZ akan menyebabkan berkurang atau tidak tersedianya hormon insulin (Junod, *et al.*, 1969). Akibatnya transportasi energi ke dalam jaringan tersebut tidak terjadi, maka kadar gula darah akan meningkat.

Kadar natrium plasma tikus hipertensi diabetes dalam penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan kadar natrium plasma tikus hipertensi yang tidak diabetes. Hal ini berbeda bila dibandingkan dengan hasil percobaan sebelumnya menggunakan tikus SD (Armenia *et al.*, 2001), yang menggambarkan tingginya kadar natrium plasma tikus diabetes dibandingkan

dengan tikus yang tidak diabetes, walaupun data untuk kedua model diabetes ini memperlihatkan bahwa kadar natrium tersebut masih dalam batas kadar fisiologis (145 – 200 mmol/L)(Powers, 1995). Ini berarti bahwa ginjal tikus diabetes yang sudah hipertensi sebelumnya lebih resiten terhadap perubahan patologis lanjutan akibat diabetes.

Kadar kreatinin plasma pada kedua kelompok tikus masih dalam batas kadar fisiologi yakni 0.7 – 1.05 mg/dl (Powers, 1995), meskipun menurut Voss (1988), kadar kreatinin plasma pada tikus yang diinduksi dengan STZ selama 10 hari lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hal ini berarti belum terjadinya diabetic nephropathy DN.

Pengambilan Air Minum (PAM), Pengeluaran Urin (PU), Pengeluaran Na⁺ dan kreatinin Urin

PAM dan PU tikus yang diinjeksi dengan STZ lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, tetapi kadar Na⁺ dan kreatinin urin lebih rendah. Peningkatan gula darah pada tikus diabetes atas ambang reabsorpsi ginjal akan membawa pada peningkatan ekskresi gula di urin. Tingginya glukosa dalam urin akan meningkatkan tekanan osmosa dan akan mengakibatkan peningkatan pengeluaran urin. Peningkatan pengeluaran urin, akan menimbulkan peningkatan pengambilan minum untuk mengganti kehilangan cairan tubuh (Wong and Tzeng, 1993; dan Androque & Wesson, 1995).

Banyak faktor lain yang dapat menimbulkan gejala diuretik pada keadaan diabetes, seperti menurunnya kadar norepinephrine, supersensitivitas pos-synaps terhadap pengaturan saraf sympathetic bagi penyimpanan kandung kencing, menurunnya respons pengosongan terhadap pengaturan saraf parasympathetic, dan meningkatnya kontraksi kandung kencing yang diinduksi oleh prostaglandin F_{2α}-akibat gangguan metabolisme yang berhubungan dengan diabetes (Androque & Wesson, 1995) hyper-reactivitas α₁-adrenoceptors terhadap efferen glomerulus atau resistensi arteriol-arteriol systemik terhadap kadar noradrenalin yang beredar dari pembuluh-pembuluh yang mengalami disfungsi, yang mengakibatkan hipertensi glomerulus dan selanjutnya mengakibatkan hyperfiltration (Bodmer *et al.*, 1999) dan sebagainya.

Menurut Caramori dkk. (1999), Peningkatan laju filtrasi glomerulus merupakan faktor utama untuk berkembangnya diabetic nephropathy. Pada penelitian ini, laju filtrasi glomerulus yang sangat tinggi (terlihat dari tingginya volume urin dan bersihan kreatinin ginjal) terjadi pada tikus diabetes. Hal ini dapat disebabkan oleh rusaknya membran basalis, pemekaran sel mesangium, sklerosis kapiler, akumulasi sel-sel gabus, akumulasi dan penumpukan matriks ekstrasel dan benda-benda amorf berupa saph pada glomerulus ginjal akibat hiperfiltrasi (Adroque & Wesson, 1995; Sowers & Lester, 1999; dan Caramori & Gross, 1999). Pada tikus hipertensi yang diinduksi dengan STZ, gangguan saraf

simpatis sudah terjadi sebelum dia disuntik dengan STZ, terlihat dari tingginya kadar natrium plasma. Data lain menunjukkan bahwa tekanan darah rata-rata tikus-tikus SHR ini tinggi, demikian juga dengan tekanan darah tikus diabetes hipertensi (data tidak diperlihatkan disini). Bila DN sudah terjadi sekali, maka laju filtrasi glomerulus akan menurun dan ini akhirnya akan membawa kepada penyakit ginjal tahap akhir (ESRD) (ADA, 1999). Hipertensi mempercepat timbulnya DN ini karena menyebabkan hiperfiltrasi (Azevedo, 1999).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tikus hipertensi diabetes 7 hari yang diinduksi dengan STZ memperlihatkan tingginya laju filtrasi glomerulus, sehingga berpeluang tinggi untuk mengalami "diabetic nephropathy".

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih ditujukan kepada Lembaga Penelitian Universitas Andalas yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek SPP/DPP Unand tahun 2001/2002.

Daftar Pustaka

- American Diabetes Association (ADA)(1999). Diabetic nephropathy, *Diabetes Care*, **22**, 566 – 569.
- Androque, H.L. and Wesson, D.E. (1995). Blackwell's Basics of Medicine, *Renal failure*, Blackwell Science Inc., USA.
- Armenia, A.S. Munavvar, H. Arifin, A.P.M. Yusof and E.J. Johns, (2001). Pengaruh diabetes mellitus yang diinduksi dengan streptozotosin terhadap kemungkinan berkembangnya "diabetic nephropathy" pada tikus, *J. Sains and Teknol. Farm.*, **6**(2), 97 – 102.
- Azevedo, P.M. dan Gross, M.J., (1999). Glomerular hyperfiltration is associated with blood pressure abnormality in normotensive normoalbumine IDDM patients, *Diabetes care*, **20**, 1329 – 1333.
- Bangaru, R.A., Lakkad, N.B., and Goyal, R.K. (1996). Effect of chronic atenolol treatment on diabetes diabetes induced cardiac dysfunction and other complications, *Ind. J. Physiol. Pharmac.*, **40**, 220 – 224.

- Bodmer, C.W. (1999). Hand vein responses to noradrenaline in normotensive patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria: Effects of α -adrenoceptor blockade with doxazosin, *Current Medical Research and Opinion; Newbury*,
- Boemi, M., Sirolla, C., Fumelli, P. & James, R.W. (1999). Renal disease as a determinant of increased lipoprotein(a) concentrations in diabetic patients, *Diabetes Care*, **22**(12), 2033-6.
- Caramori, M.L.A. and Gross, J.L. (1999). Glomerular filtration rate, urinary albumin excretion rate, and blood pressure change in normoalbuminuric normotensive Type I diabetic patients, *Diab. Care*, **22**, 1512 – 1516.
- Evan, A.P. and Mong, S.A. (1984). The effect of STZ induced diabetes on kidney, *Renal Physiol.*, **7**, 78 – 89.
- Epstein M. (1997). Diabetes and hypertension: the bad companions, *J. Hypertens.* **15**(2 Suppl.), S55-62.
- Ferre, P., Penicaud, L., Hitier, Y., Meier, M. & Girard, J. (1992). Hypoglycemic effects of a beta-agonist, Ro 16-8714, in streptozotocin-diabetic rats: decreased hepatic glucose production and increased glucose utilization in oxidative muscles, *Metabolism.*, **41**(2), 180-3.
- Fuller, J.H. (1985). Epidemiology of hypertension associated with diabetes mellitus, *Hypertens.*, **7** (Suppl II), II-3 - II-7.
- Funk, J.L. & Feingold, K.R., Disorder of Endocrine Pancreas, in McPhee, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F. & Lange, J.D., 1995. *Pathophysiology of Disease, An Introduction to Clinical Medicine*, Fifth edition, Appleton & Lange, San Francisco.
- Cooper, M.E., Allen, T.J., Jerums, G., Doyle, A.E., (1986). Accelerated progression of diabetic nephropathy in the spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rat, *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **13**(9), 655-62.
- Gando, S., Hattori, Y., Akaishi, Y., Nishihira, J. & Kanno, M. (1997). Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**(1), 475-84.
- Ganong, W.F. (1999). *Review of Medical physiology*. 19th Ed. A Lange Medical Book, Prentice –Hall International, Inc. San Francisco.