

Korelasi Kadar Glukosa Darah dengan Kadar *Advanced Oxidation Protein Products* (AOPP) Tulang pada Tikus Putih Model Hiperglikemia

Nurlatifah Apriani¹, Eko Suhartono^{2,3}, Izaak Z. Akbar⁴

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat

²Bagian Kimia/Biokimia ³Kelompok Studi Radikal Bebas & Pemanfaatan Bahan Alam, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat

⁴SMF Bedah Ortopedi, RSUD Ulin Banjarmasin-Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru 70712 Indonesia

Abstrak

Hiperglikemia merupakan suatu keadaan meningkatnya kadar glukosa darah melebihi normal. Keadaan hiperglikemia dapat menyebabkan stres oksidatif melalui beberapa mekanisme salah satunya melalui reaksi glikasi non enzimatis yang dapat membentuk *advanced glycation end products* (AGEs) dan *advanced oxidation protein products* (AOPP). Terbentuknya senyawa tersebut menunjukkan terjadinya stres oksidatif yang dapat menyebabkan berbagai kerusakan molekuler, sel, dan jaringan, termasuk kerusakan protein kolagen tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan durasi hiperglikemia dengan kadar AOPP tulang pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia akibat induksi streptozotocin (STZ). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *posttest-only with control group design*, yang terdiri atas 10 kelompok perlakuan, yaitu 1 kelompok kontrol dan 9 kelompok perlakuan. Tikus dibuat hiperglikemia dengan diinduksi STZ dosis 50 mg/Kg BB intraperitoneal. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dan kadar AOPP tulang pada berbagai durasi hiperglikemia (kelompok kontrol pada hari ke-0 dan kelompok perlakuan pada hari ke-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, dan 27 pasca induksi STZ). Pengukuran kadar AOPP tulang dilakukan dengan metode pengukuran Witko-Sarsat. Data kemudian dianalisis dengan uji korelasi Pearson. Hasil uji statistik menunjukkan terdapat hubungan yang bermakna antara kadar glukosa darah dengan kadar AOPP tulang tikus putih ($p=0,000$) yang dinyatakan dengan persamaan linear $y = 5,3688x + 26,614$ ($R^2 = 0,9211$ dan $p < 0,05$).

Kata Kunci: hiperglikemia, glikasi, AOPP

Korespondensi:

Drs. Eko Suhartono, M.Si Bag. Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Jl. A. Yani Km 36 Banjarbaru 70712 Indonesia. Email: ekoantioksidan@yahoo.com.

Correlation Between Duration of Hyperglycemia and Advanced Oxidation Protein Product (AOPP) Level of Bone on Hyperglycemia White Rats (Rattus Norvegicus) Induced with Streptozotocin (STZ)

Abstract

Hyperglycemia happens when glucose level is increasing from normal. Hyperglycemia can increase the oxidative stress by several mechanisms, one of them is by nonenzymatic protein glycation. This mechanism forms advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP). This process shows the occurrence of oxidative stress, which is known to be a component of molecular and cellular tissue damage, including the damage of protein collagen of bone. The aim of this study was to find out the correlation between the duration of hyperglycemia with AOPP level of bone on hyperglycemia white rats (Rattus norvegicus) induced with streptozotocin (STZ). It was a pure experimental study with posttest-only with control group design, which consisted of ten groups of treatment, namely one control group and nine treatment groups. The white rats were made hyperglycemia by inducing them with STZ 50 mg/Kg BB intraperitoneal. Level of glucose and AOPP of bone were measured on the basis of the duration of hyperglycemia (control group on 0 day and treatment groups on 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 day after being induced by STZ). AOPP level of bone was measured by Witko-Sarsat method. The result was tested by correlation test of Pearson. Based on the test, $p < 0,05$, the study showed that there was significance correlation between glucose level with AOPP level of bone ($p=0,000$) with linear $y = 5.3688x + 26.614$ ($R^2 = 0.9211$ dan $p < 0.05$). It was concluded that there was highly significance correlation between glucose level and AOPP level of bone.

Keywords: hyperglycemia, glycation, AOPP

Pendahuluan

Hiperglikemia merupakan suatu keadaan meningkatnya kadar glukosa darah melebihi normal. Hal ini karena defisiensi insulin akibat kerusakan sel beta dan atau terjadi resistensi insulin pada hati dan otot. Hiperglikemia kronik pada penyakit diabetes melitus memiliki peranan penting terhadap kerusakan berbagai organ, termasuk jantung, mata, tulang, ginjal, saraf dan sistem vaskular, yang pada akhirnya menimbulkan komplikasi diabetes melitus. Semakin

lama seseorang menderita diabetes melitus maka risiko komplikasinya menjadi lebih berat.^{1,2}

Komplikasi diabetes melitus diduga berhubungan dengan adanya reaksi glikasi non enzimatik pada hiperglikemia yang disebut glikosilasi. Glikosilasi adalah reaksi yang terjadi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi, reaksi ini disebut juga reaksi Maillard. Reaksi Maillard membentuk *advanced glycation end products* (AGEs) dan *advanced oxidation*

protein products (AOPP). Terbentuknya senyawa tersebut menunjukkan terjadinya stres oksidatif yang mengganggu keseimbangan oksidan dan antioksidan dalam tubuh sehingga terjadi peningkatan radikal bebas. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan berbagai kerusakan, diantaranya kerusakan protein.^{3,4}

Protein rentan terhadap radikal bebas sehingga dapat terjadi modifikasi struktur dan fungsi protein, begitu juga halnya protein pada tulang, yaitu kolagen. Hal tersebut didukung oleh penelitian Viguet-Carrin *et al.* yang menyebutkan bahwa ikatan silang reaksi enzimatis dan non enzimatis terhadap komponen tulang menyebabkan terjadinya modifikasi matriks kolagen tulang. Modifikasi kolagen tulang dapat diketahui dengan melihat *marker* stres oksidatif pada protein tulang, yaitu AOPP.^{5,6,7}

AOPP dikemukakan pertama kali oleh Witko-Sarsat *et al.* AOPP dibentuk selama stres oksidatif dan merupakan salah satu produk akhir reaksi glikosilasi yang dapat dipercaya untuk memperkirakan pengaruh reaksi glikosilasi terhadap derajat kerusakan protein. AOPP telah digunakan dalam berbagai penelitian, diantaranya penelitian Atabek *et al.* yang mengungkapkan tentang oksidasi protein pada obesitas dan resistensi insulin dengan menggunakan AOPP sebagai *marker* stres oksidatif. Penelitian Kosova *et al.* juga menyebutkan bahwa AOPP adalah salah satu *marker* oksidasi protein dan hiperoksidasi lemak yang menginduksi perkembangan kanker.^{6,7,8}

Sampai saat ini penelitian mengenai kadar AOPP sebagai *marker* stres oksidatif protein tulang belum banyak dilakukan. Dengan demikian, pada penelitian ini akan dikaji kadar AOPP tulang akibat diabetes melitus yang dihubungkan dengan durasi tertentu hiperglikemia dengan menggunakan hewan coba sebagai model yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami hiperglikemia akibat induksi streptozotocin.

Bahan dan Cara

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat dengan menggunakan studi eksperimental murni dengan *posttest-only with control group design*. Hewan coba digunakan 50 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibuat menjadi hiperglikemia dengan menyuntikkan streptozotocin ke dalam tubuhnya.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas streptozotocin, tulang tikus putih (*Rattus norvegicus*), eter, PBS, KI 1,16 mM, H₂SO₄ pekat, dan asam asetat.

Penelitian terbagi dalam 10 kelompok perlakuan, dengan 5 pengulangan.

P1 : kelompok kontrol, diberi 0,1M buffer sitrat pH 4,5

P2 : kelompok perlakuan 3 hari pasca induksi streptozotocin

P3 : kelompok perlakuan 6 hari pasca induksi streptozotocin

P4 : kelompok perlakuan 9 hari pasca induksi streptozotocin

P5 : kelompok perlakuan 12 hari pasca induksi streptozotocin

P6 : kelompok perlakuan 15 hari pasca induksi streptozotocin

P7 : kelompok perlakuan 18 hari pasca induksi streptozotocin

P8 : kelompok perlakuan 21 hari pasca induksi streptozotocin

P9 : kelompok perlakuan 24 hari pasca induksi streptozotocin

P10: kelompok perlakuan 27 hari pasca induksi streptozotocin

Perlakuan hewan coba

Sebelum diberikan perlakuan, tikus diadaptasikan selama 1 bulan dengan memisahkan ke dalam 10 kandang kecil. Setiap kandang berisi 5 ekor tikus. Setelah masa adaptasi, semua tikus kelompok perlakuan diinduksi STZ 50 mg/kgBB secara intraperitoneal. STZ yang masih baru dilarutkan dalam buffer sitrat (0,1 M) dengan pH 4,5. Volume injeksi yang telah disiapkan mengandung STZ 50 mg/kgBB/ml. Setelah 3 hari (kelompok P1), tikus dimatikan dengan anastesi menggunakan kloroform. Kemudian tikus dibedah dan diambil darahnya dari jantung, sedangkan tulang diambil dari tulang ekstremitas bawah tikus. Darah dan tulang tikus kelompok lain juga diambil dengan cara yang sama. Keseluruhan penelitian telah mendapatkan persetujuan dari komite etik penelitian di Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat.

Pengukuran kadar glukosa darah

Kadar glukosa diukur dengan menggunakan alat pengukur kadar glukosa darah (*Easy Touch*[®]). Pengukuran glukosa dilakukan dengan cara mencocokkan kode PIN dan label nomor pada wadah yang berisi strip untuk pemeriksaan glukosa, kemudian memasukkan kode PIN tersebut ke dalam *Easy Touch*[®]. Strip glukosa dimasukkan ke dalam *Easy Touch*[®]. Sampel darah diambil dari ekstremitas tikus lalu diteteskan ke bagian yang telah disediakan pada strip glukosa. Darah tersebut akan mengalami reaksi secara otomatis. Setelah 30 detik, akan didapatkan hasil kadar glukosa yang dapat dilihat pada layar *Easy Touch*[®].

Pengukuran kadar advanced oxidation protein products (AOPP) (metode Witko-Sarsat)

Tulang dibersihkan dan dicuci, kemudian dikeringkan di dalam oven. Setelah kering, bahan dihaluskan lalu diayak dengan ayakan 40 mesh. Kemudian ditimbang sebanyak 1 gr lalu dilarutkan dalam air setengah botol untuk didestilasi lalu ditambah H₂SO₄ pekat sebanyak 15 ml, kemudian didestilasi dan ditampung dalam erlenmeyer.

Kadar AOPP diukur dengan cara dibuat dua jenis larutan terlebih dahulu, yakni larutan blanko dan larutan uji. Larutan blanko terdiri atas campuran 800 ml PBS dan ditambahkan KI 1,16

mM hingga homogen, dibiarkan hingga 2 menit. Kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Genesys 20). Larutan uji dibuat dengan menambahkan 200 mL sejumlah larutan yang akan diuji (destilat tulang tikus), 600 mL PBS dan 100 mL KI 1,16 mM hingga homogen, kemudian dibiarkan hingga 2 menit. Lalu ditambahkan 200 mL asam asetat, dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Genesys 20). Perhitungan: C (konsentrasi) = A/ϵ , dengan A = Absorbansi; $\epsilon = 2,6 \text{ mm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Analisis data

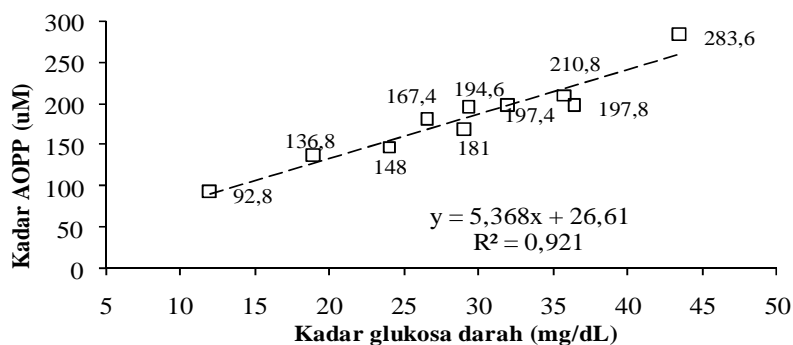
Data dianalisis menggunakan uji korelasi regresi linear dan tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

Hasil dan Pembahasan

Streptozotocin bersifat sebagai zat diabetogenik yang mampu merusak sel beta pankreas tikus putih sehingga

terjadi penurunan insulin. Hal ini berakibat pada terjadinya peningkatan glukosa darah atau hiperglikemia. Hubungan antara perubahan kadar glukosa darah dengan perubahan kadar AOPP tulang disajikan pada gambar. Korelasi antara kadar glukosa darah dan kadar AOPP tulang tikus putih dinyatakan dalam persamaan linier $y = 5,3688x + 26,614$ ($R^2 = 0,9211$ dan $p < 0,05$). Artinya terdapat korelasi positif yang bermakna antara kadar AOPP tulang dengan kadar glukosa darah tikus putih. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar glukosa darah dapat mengakibatkan kadar AOPP tulang juga meningkat.

Pembentukan AOPP diawali melalui reaksi glikosilasi yaitu reaksi yang terjadi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi. Reaksi ini disebut juga reaksi glikasi non enzimatis atau reaksi Maillard. Reaksi glikosilasi diawali oleh kondensasi gugus amino dengan senyawa kimia yang mengandung karbonil hingga akhirnya akan terbentuk berbagai senyawa



Gambar Korelasi Kadar Glukosa Darah dengan Kadar AOPP Tulang Tikus Hiperglikemia

Advanced Glycation End Products (AGEs).^{9,10}

Pada glikasi non enzimatis umumnya terjadi modifikasi *post translational* protein yang diinduksi secara spontan oleh kondensasi turunan glukosa dan senyawa metabolik intermediet dengan kelompok amin bebas pada residu lisin atau arginin. Langkah pertama reaksi Maillard adalah pembentukan kompleks inklusi basa *schiff* menjadi protein. Produk awal glikasi ini mengalami penyusunan kembali yang reversibel menjadi bentuk produk kompleks inklusi Amadori. Basa *schiff* dan produk Amadori kemudian mengalami penyusunan kembali, oksidasi, dan atau pengeringan melalui jalur kimia untuk memproduksi kompleks inklusi yang ireversibel menjadi protein yaitu *Advanced Glycation End Products* (AGEs). Akibat langsung dari banyaknya jenis jalur reaksi yang membawa kepada terbentuknya AGEs sangat luas dan bermacam-macam jenis AGEs-nya dengan perbedaan struktur kimia yang dibentuk. Beberapa AGEs adalah kompleks inklusi yang akan berubah menjadi protein.^{10,11}

Sejalan dengan hal tersebut, gugus karbonil yang terbentuk pada protein tulang yaitu kolagen tipe I semakin banyak sehingga semakin banyak kemungkinan terjadinya *cross linking* antara jembatan disulfida dan gugus karbonil kolagen. Pada akhirnya senyawa ditirosin yang terbentuk yaitu AOPP juga akan semakin meningkat.¹²

Terbentuknya senyawa ditirosin pada kolagen tulang mengakibatkan terbentuknya kolagen yang

termodifikasi. Pada tulang, kolagen tipe I adalah komponen organik utama dari matriks tulang. Modifikasi matriks kolagen tulang akan mengubah struktur tulang yang mengakibatkan menurunnya kekuatan tulang dan dapat memicu kerapuhan tulang.^{11,13}

Pada *in vitro*, akumulasi AGEs pada kolagen tipe I mencegah proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas pada berbagai tingkat perkembangannya. AGEs yang memodifikasi kolagen juga mencegah perlekatan osteoblas. RAGE (reseptor AGE) diekspresikan di dalam osteoblas dan dapat memodulasi sinyal ketergantungan AGE pada osteoblas. Dengan demikian, hal ini dapat menjelaskan penurunan ekspresi faktor yang bertanggung jawab pada transkripsi diferensiasi osteoblas pada model tikus diabetes tipe I. Selanjutnya, hal ini dapat mempengaruhi fungsi dari osteoblas yang berperan dalam proses pembentukan tulang.¹²

Penelitian oleh Wittrant *et al.* (2008) yang memeriksa pengaruh kadar D(+)-glukosa (D-Glc) dan L(-)-glukosa (L-Glc) yang tinggi terhadap RANKL-osteoklastogenesis, diketahui bahwa D-Glc yang tinggi memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap terganggunya proses osteoklastogenesis jika dibandingkan dengan L-Glc. D-Glc yang tinggi menghambat diferensiasi dan fungsi osteoklas dengan cara mencegah penggabungan sel pre-osteoklas menjadi osteoklas multinukleus. Proses tersebut terjadi melalui suatu mekanisme antioksidatif yang mana D-Glc menurunkan produksi SOR, kaspase-3 dan aktivitas *Nuclear Factor kappaB* (NF-

κB). Hal ini berarti kadar glukosa yang tinggi secara biologis berpengaruh terhadap osteoklastogenesis. Selain itu, AGEs yang berakumulasi di tulang pada penderita diabetes diketahui berperan sebagai inhibitor pembentukan dan absorpsi osteoklas.^{11,14}

Jika terjadi ketidakseimbangan antara aktivitas osteoblas dan osteoklas, maka proses *remodelling* tulang akan terganggu yang mana resorpsi tulang melebihi formasi tulang sehingga menyebabkan hilangnya massa tulang. Keadaan ini disebut dengan osteoporosis.¹¹

Hasil penelitian ini menggambarkan bahwa semakin lama seseorang berada dalam kondisi hiperglikemia atau hiperglikemia kronik maka kemungkinan seseorang akan mengalami kerusakan tulang semakin besar apalagi jika kadar glukosanya tidak terkontrol. Oleh sebab itu, penting bagi penderita hiperglikemia untuk selalu mengontrol kadar glukosa darah dan mengatur pola makan agar gizi yang diperoleh sesuai dengan kondisi penderita dan mampu mencukupi kebutuhan antioksidan dan perbaikan tulang.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi positif yang sangat kuat antara durasi hiperglikemia dengan kadar AOPP tulang pada tikus putih hiperglikemia. Semakin lama tikus berada dalam kondisi hiperglikemia, kadar AOPP tulang akan semakin meningkat.

Daftar Pustaka

1. Chau DL, Fuchs JG, Edelman SV. Osteoporosis among patients with diabetes: an overlooked disease. *Diabet Spect.* 2003;16(3):176-82.
2. Patel S, Hyer S, Tweed K, Kerry S, Allan K, Rodin A, et al. Risk factors for fractures and falls in older women with type 2 diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82:87-91.
3. Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG. Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *Br J Biomed Sci.* 2007;64(1):35-43.
4. Suhartono E, Setiawan B. Kapita selekta: radikal bebas, antioksidan dan penyakit. Ed.ke-1. Banjarmasin: Pustaka Banua, 2006.
5. Viguet-Carrin, Garnero P, Delmas P. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17: 319-36.
6. Kalousova M, Krha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002;51:597-604.
7. Atabek ME, Keskin M, Yazici C, Mustafa K, Nihal H, Esad K, et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr.* 2006;165:753-6.
8. Kosova F, Cetin B, Akinci M, Aslan A, Ari Z, Sepici A, et al. Advanced oxidation protein products, ferrous oxidation in xylenol orange, and malondialdehyde levels in thyroid cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(9):2616-20.
9. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation and-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-46.
10. Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Carrin SV, Delmas PD, Garnero P, et al. Non-enzymatic glycation of bone collagen

- modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem.* 2006;1:1-28.
11. Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporosis Int.* 2006;17:1514-23.
 12. Suhartono E, Setiawan B, Edyson, Mashuri. Modifikasi protein akibat reaksi maillard dan pengaruhnya terhadap kadar tirosin. *Profesi Medika* 2004;4(2):20-8.
 13. Moh A, Sakata N, Takebayashi S, Tateishi K, Nagai R, Horiuchi S, et al. Increased production of urea hydrogen peroxide from maillard reaction and a-UHP fenton pathway related to glycooxidation damage in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1077-85.
 14. Santana RB, Lei X, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC, et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1502-10.
 15. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K. High D(+)-glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone* 2008;42(6):1122-30.