

**PENGARUH PEMBERIAN FOLAT TERHADAP
KADAR HOMOSISTEIN SERUM DAN
MALONDIALDEHID PLASMA
STUDI EKSPERIMENTAL PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN**

*EFFECT OF FOLATE SUPPLEMENTATION ON SERUM HOMOCYSTEIN
AND PLASMA MALONDIALDEHYDE LEVELS
EXSPERIMENTAL STUDY ON STREPTOZOTOCIN INDUCED SPRAGUE DAWLEY RATS*



Tesis

**untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat sarjana S-2
dan memperoleh keahlian dalam bidang Patologi Klinik**

**Emmy Wahyuni
NIM : G4A007020**

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1
PATOLOGI KLINIK
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2011**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN FOLAT TERHADAP
KADAR HOMOSISTEIN SERUM DAN MALONDIALDEHID PLASMA
STUDI EKSPERIMENTAL PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN

Disusun oleh
Emmy Wahyuni

Telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji
pada hari Rabu, 4 Mei 2011
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama



dr. Banundari Rachmawati, SpPK (K)
NIP. 19600606 198810 2 001

Pembimbing Kedua



dr. Imam Budiyatyo, SpPK(K)
NIP.19500321 198203 1 001

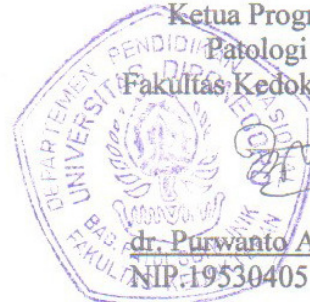
Mengetahui

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana UNDIP



DR. dr. Winarto, SpMK, SpM(K), DMM
NIP. 19490617 197802 1 001

Ketua Program Studi
Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran UNDIP



dr. Purwanto AP, SpPK(K)
NIP.19530405 198301 1 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa penelitian tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang , Mei 2011

Penulis

ABSTRAK

Latar belakang : Diabetes mellitus (DM) dihubungkan dengan peningkatan homosistein (Hcy) dan aktifitas oksidatif Hcy yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Malondialdehid (MDA) plasma merupakan suatu marker stres oksidatif. Folat diperlukan untuk menurunkan Hcy. Folat berperan sebagai donor metil pada metabolisme Hcy menjadi metionin sehingga tidak terjadi stres oksidatif.

Tujuan : Membuktikan pengaruh pemberian folat dosis bertingkat selama 30 hari terhadap penurunan kadar Hcy dan MDA plasma pada tikus SD yang diinduksi STZ.

Metode dan disain penelitian : Metode penelitian eksperimental laboratorik dengan metode *randomized controlled group pretest posttest design*. Populasi penelitian adalah tikus SD yang diinduksi STZ dosis 40 mg/kgbb i.p. Jumlah sampel 30 ekor tikus SD yang terbagi dalam 5 kelompok (C,X0,X1,X2,X3). Hcy serum diukur dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), MDA plasma diukur dengan metode TBARS. Data dianalisis dengan uji *Wilcoxon* dan *Kruskal Wallis*.

Hasil : Kadar Hcy serum sebelum dan setelah perlakuan pada kelompok C : 22,5 $\mu\text{mol/L}$ dan 21 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X0 : 29 $\mu\text{mol/L}$ dan 23 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X1 : 24 $\mu\text{mol/L}$ dan 18 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X2 : 29 $\mu\text{mol/L}$ dan 18 $\mu\text{mol/L}$ kelompok X3: 21 $\mu\text{mol/L}$ dan 15 $\mu\text{mol/L}$. Terdapat perbedaan yang bermakna kadar Hcy serum pada kelompok X3 yang mendapatkan folat 8 ppm ($p=0,043$). Selisih kadar Hcy serum kelompok perlakuan dan kontrol tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,50$). Kadar MDA plasma sebelum dan setelah perlakuan kelompok C : 24,32 $\mu\text{mol/L}$ dan 26,58 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X0 : 30,77 $\mu\text{mol/L}$ dan 32,69 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X1 : 33,65 $\mu\text{mol/L}$ dan 32,05 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X2 : 30,13 $\mu\text{mol/L}$ dan 40,39 $\mu\text{mol/L}$, kelompok X3: 29,49 $\mu\text{mol/L}$ dan 38,84 $\mu\text{mol/L}$. Selisih MDA plasma pada kelompok perlakuan dan kontrol tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,45$).

Kesimpulan : Pemberian folat pada tikus SD yang diinduksi STZ berbagai dosis dapat menurunkan kadar Hcy serum namun tidak berpengaruh pada penurunan kadar MDA plasma, hal ini kemungkinan disebabkan karena stres oksidatif lain selain dari peroksidasi lipid yang ditimbulkan akibat HHcy.

Kata kunci : folat, homosistein, MDA, tikus, DM.

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus (DM) associated with increased level and oxidative activity of homocystein (Hcy) that cause oxidative stress. Plasma malondialdehyde (MDA) known as a marker of oxidative stress. Folate is required to decrease Hcy level. Folate acting as methyl donor in metabolism of Hcy to be metionin, and prevent oxidative stress.

Objective: to demonstrate the effect of 30-days gradual dose folate supplementation on the decrease of plasma Hcy and MDA levels in SD rats induced by STZ.

Method: an experimental study with a randomized controlled group pretest posttest design. Subject population was SD rats induced by 40 mg/kg weight i.p of STZ. Thirty samples divided into 5 groups (C,X0,X1,X2,X3). Serum Hcy was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and plasma MDA by TBARS method. Data was analyzed by Wilcoxon and Kruskal Wallis test.

Result : serum level of Hcy before and after supplementation in group C: 22,5 $\mu\text{mol/L}$, 21 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X0: 29 $\mu\text{mol/L}$, 23 $\mu\text{mol/L}$ repectively; group X1: 24 $\mu\text{mol/L}$, 18 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X2: 29 $\mu\text{mol/L}$, 18 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X3 : 21 $\mu\text{mol/L}$, 15 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Serum Hcy levels was significantly different in group X3 before and after 8 ppm of folate supplementation ($p=0,043$). Serum Hcy level decrease in treatment and control group not significantly different ($p=0,50$). Plasma MDA levels before and after treatment in group C: 24,32 $\mu\text{mol/L}$, 26,58 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X0: 30,77 $\mu\text{mol/L}$, 32,69 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X1: 33,65 $\mu\text{mol/L}$, 32,05 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X2: 30,13 $\mu\text{mol/L}$, 40,39 $\mu\text{mol/L}$ respectively; group X3: 29,49 $\mu\text{mol/L}$, 38,84 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Increase of plasma MDA level not significantly different between treatment and control group ($p=0,45$)

Conclusion: folate supplementation in SD rats induced by several dose of STZ can reduce serum Hcy level, but has no effect on plasma MDA level, this might be concern with other source of oxidative stress beside lipid peroxide caused by HHcy.

Keywords: folate, homocystein, MDA, rats, DM.

DAFTAR ISI

JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
<i>ABSTRAC</i>	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang masalah	1
1.2. Perumusan masalah	5
1.3. Tujuan penelitian	6
1.3.1. Tujuan umum	6
1.3.2. Tujuan khusus	6
1.4. Manfaat penelitian	6
1.5. Orisinalitas penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Diabetes Melitus (DM)	9
2.1.1. Definisi	9
2.1.2. Patofisiologi	9
2.1.3. DM pada tikus SD yang diinduksi STZ	10
2.2. Homosistein (Hcy)	13
2.2.1. Metabolisme Hcy	13
2.2.2. Patogenesis hiperhomosisteinemia (HHcy)	15

2.2.3. Metabolisme Hcy pada DM	16
2.2.4. Hubungan antara Hcy dan stres oksidatif	17
2.3. Malondialdehid (MDA)	18
2.3.1. Biokimia MDA	18
2.3.2. Pengukuran MDA	19
2.3.3. Hubungan MDA dengan komplikasi DM	20
2.4. Folat.	23
2.4.1. Absorpsi, transportasi, metabolisme dan ekskresi	23
2.4.2. Fungsi	24
2.4.3. Asam folat, metabolisme Hcy dan ROS	24
2.4.4. Hubungan antara folat dengan DM	25
2.5. Kerangka teori	26
2.6. Kerangka konsep	27
2.7. Hipotesis	27
BAB III METODE PENELITIAN	29
3.1. Ruang lingkup penelitian	29
3.2. Tempat dan waktu penelitian	29
3.3. Jenis dan rancangan penelitian	29
3.4. Populasi/subjek penelitian	32
3.5. Sampel	32
3.6. Variabel penelitian	32
3.7. Definisi operasional variabel	33
3.8. Alat dan bahan/reagensia	33
3.8.1. Alat/instrument penelitian	33
3.8.2. Bahan/reagensia	34
3.9. Prosedur pengumpulan data	34
3.10. Alur penelitian	36
3.11. Prosedur pemeriksaan	36

3.11.1. Prosedur pemeriksaan Hcy	36
3.11.2. Prosedur pemeriksaan MDA	37
3.12. Analisis statistik	38
3.13. <i>Ethical clearance</i>	38
BAB IV HASIL PENELITIAN	39
4.1. Gambaran umum binatang percobaan	39
4.2. Glukosa darah puasa	40
4.3. Kreatinin serum	41
4.4. Hcy serum	42
4.5. MDA plasma	44
4.6. Selisih kadar Hcy serum dan MDA plasma	45
BAB V PEMBAHASAN	48
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN	53
6.1. Simpulan	53
6.2. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1. Tabel 1	Orisinalitas penelitian	7
2. Tabel 2	Data dasar binatang percobaan pada awal penelitian	39
3. Tabel 3	Rerata glukosa darah puasa sebelum dan setelah pemberian folat	40
4. Tabel 4	Rerata \pm SD kadar kreatinin serum sebelum dan setelah perlakuan	41
5. Tabel 5	Kadar Hcy serum sebelum dan setelah perlakuan	42
6. Tabel 6	Kadar MDA plasma sebelum dan setelah perlakuan	44
7. Tabel 7	Tabel selisih kadar Hcy serum dan MDA plasma	46
8. Tabel 8	Analisis <i>Kruskal-Wallis</i> pengaruh folat terhadap selisih Hcy serum dan MDA plasma	47

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Gambar 1. Struktur kimia streptozotocin	12
2.	Gambar 2. Metabolisme homosistein	15
3.	Gambar 3. Pengaruh homosistein pada vaskuler	16
4.	Gambar 4. Proses hiperglikemia pada DM dan komplikasinya	22
5.	Gambar 5. Kerangka teori penelitian	26
6.	Gambar 6. Kerangka konsep penelitian	27
7.	Gambar 7. Rancangan penelitian	30
8.	Gambar 8. Alur penelitian	36
9.	Gambar 9. <i>Box-plot</i> kadar Hcy sebelum perlakuan	42
10.	Gambar 10. <i>Box-plot</i> kadar Hcy setelah perlakuan	43
11.	Gambar 11. <i>Box-plot</i> kadar MDA plasma sebelum perlakuan	44
12.	Gambar 12. <i>Box-plot</i> kadar MDA plasma setelah perlakuan	45
13.	Gambar 13. <i>Box-plot</i> selisih kadar Hcy serum	46
14.	Gambar 14. <i>Box-plot</i> selisih kadar MDA plasma	47

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Kepanjangan
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolate
ADA	American Diabetes Association
AGEs	Advanced glycosilation product
ALE	Advanced lipoxidation end product
ATP	Adenosine triphosphate
BHMT	Betaine homocysteine methyltransferase
CBS	Cystationine β synthase
CGL	Cystathionine γ -lyase
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DFE	Dietary folate equivalent
DM	Diabetes melitus
GAD65	Autoantobody glutamic acid decarboxylase
GAMT	Guanidoacetate methyltransferase
GNMT	Glycine N-methyltransferase
Hcy	Homosistein
HHcy	Hiperhomosisteinemia
HLTC	Homocysteine Lowering Trialist Collaboration
i.p.	intraperitoneal
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
LDL	Low-density lipoprotein
LPPT	Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdehid
MetRS	Methionyl-tRNA synthase
MS	Methionine synthase
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase

NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NF- κ B	Nuclear factor kappa B cells
NIDDM	Non insulin dependent diabetes mellitus
NO	Nitric oxide
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEMT	PE N-methyltransferase
PKC	Protein kinase C
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RDAs	Recommended Dietary Allowances
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SAM	S-adenosilmethyonine
SD	Sprague Dawley
STZ	Streptozotocin
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance
TCA	Trichloroacetic acid
THF	Tetrahydrofolate