



Korelasi antara Kadar Glukosa Darah dengan Kadar Kalsium Tulang pada Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperqlikemia

The Correlation of Blood Glucose and Bone Calcium Levels on Hyperglycemia Model of Rattus norvegicus

Devi Olivia Sari¹, Eko Suhartono^{2,3}, Izaak Zoelkarnain Akbar⁴

¹Graduate of School of Medicine Lambung Mangkurat University Banjarbaru

²Medical Chemistry/Biochemistry Department of Medicine Lambung Mangkurat University Banjarbaru

³Free Radical and Natural Product Groups

⁴Surgery and Orthopedi Department Ulin Hospital Banjarmasin-of Medicine Lambung Mangkurat University Banjarbaru

KATA KUNCI *hiperqlikemia; kalsium tulang; tikus putih*
KEYWORDS *hyperglycemia; bone calcium content; Rattus norvegicus*

ABSTRAK *Hiperqlikemia merupakan suatu keadaan meningkatnya kadar glukosa darah melebihi normal. Keadaan hiperqlikemia ini memiliki peran terhadap komplikasi diabetes mellitus. Meskipun secara umum osteoporosis tidak digolongkan sebagai komplikasi diabetes, pada pasien diabetes tipe 1 dan 2 terjadi peningkatan resiko terjadinya osteoporosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara kadar glukosa darah terhadap kadar kalsium tulang pada tikus putih. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan posttest-only with control group design, menggunakan Rancangan Acak Sederhana, terdiri atas 10 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*), yaitu 1 kelompok kontrol dan 9 kelompok perlakuan yang diinduksi streptozotocin dengan dosis 50 mg/kgBB, yang setiap kelompok dilakukan pengukuran kadar glukosa dan kalsium setiap 3 hari sekali. Kadar kalsium tulang diukur dengan metode permanganometri. Data yang diperoleh diuji korelasi Pearson dengan tingkat kepercayaan 99%. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa keadaan peningkatan kadar glukosa darah dapat menyebabkan penurunan kadar kalsium tulang.*

ABSTRACT *Hyperglycemia or high blood glucose is a major cause of complication in diabetes mellitus. In general, osteoporosis is not classified as complication of diabetes mellitus however, increasing risk of osteoporosis development might be observed in type 1 and 2 diabetes patients. This study was aimed to examine the correlation between blood glucose and bone calcium levels in Rattus norvegicus. A true experimental with posttest-only control group design was performed, applying randomized sampling, consisted of 10 groups of five Rattus norvegicus each. One group was assigned as a control group and the rest of nine groups were experimental groups induced by 50 mg/kgBB streptozotocin. Blood glucose and bone calcium were measured every 3 days employing Easy Touch commercial kit and permanganometry respectively. The data obtained were later*

analyzed using Pearson correlation test with 99% confidence limit. Based on the observation, it was concluded that hyperglycemia might cause the decrease of bone calcium content.

Hiperglikemia adalah keadaan meningkatnya kadar glukosa darah melebihi normal. Keadaan hiperglikemia ini terjadi pada penyakit diabetes melitus yang mekanismenya disebabkan oleh defisiensi insulin dan defek pada reseptor insulin pada sel. Keadaan hiperglikemia yang tidak terkontrol ini ternyata memiliki peran sebagai penyebab komplikasi pada diabetes melitus (Grugliuci, 2000).

Peran hiperglikemia pada komplikasi diabetes, merupakan fokus utama yang menjadi satu mekanisme kunci biokimia berdasarkan proses patologis: efek langsung glukosa dan gula lainnya pada protein (dikenal dengan glikasi atau glikosilasi nonenzimatik). Glikosilasi adalah reaksi yang terjadi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi, reaksi ini disebut juga reaksi Maillard. Reaksi glikosilasi diawali oleh kondensasi gugus amino dengan senyawa kimia yang mengandung karbonil hingga akhirnya akan terbentuk berbagai senyawa AGEs (*Advanced Glycation End Products*). AGEs meningkat pada diabetes memicu pembentukan variasi modifikasi kimia protein (Hein, 2003).

Ketika dibentuk, AGEs akan dibuang dari jaringan hanya ketika protein yang terlibat mengalami degradasi. Akibatnya, akumulasi AGEs yang paling luas akan terjadi di jaringan yang memiliki *turnover* yang rendah dan mengandung *long-live protein* seperti kolagen pada matriks ekstraseluler jaringan ikat (contoh kartilago, tulang, tendo dan kulit) (Santana, 2003).

Tulang disusun oleh mineral tulang yang mengandung kalsium (Ca) & fosfor (P), dan protein yang disebut kolagen. Komponen kalsium dan fosfor membuat tulang keras dan kaku mirip semen, sedang serat-serat

kolagen membuat tulang mirip kawat baja pada tembok. Kalsium dan fosfat di tulang terdapat dalam bentuk kristal hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Kristal hidroksiapatit ini terdapat di setiap serat kolagen. Kolagen terbanyak yang terdapat di tulang adalah kolagen tipe I (Junqueira, 1998).

Akumulasi AGEs pada kolagen tipe I pada matriks tulang, dapat memainkan peranan pada proses *remodelling* matriks tulang. Menurut Miyata *et al.*, (2000) bahwa AGEs meningkatkan aktivitas osteoklast sehingga terjadi peningkatan jumlah resorpsi oleh osteoklast pada tikus diabetes. Namun AGEs tidak memiliki efek terhadap pembentukan osteoklast baru. Ini berarti modifikasi protein matriks tulang dengan AGEs, memainkan peranan terhadap *remodelling* jaringan matriks tulang. Akumulasi AGEs juga mengganggu proliferasi dan diferensiasi osteoblast pada stadium perkembangannya. Hal ini akan mempengaruhi kalsium yang ada di tulang (Miyata, 2000).

Meskipun secara umum osteoporosis tidak digolongkan sebagai komplikasi diabetes, pada pasien diabetes tipe 1 dan 2 terjadi peningkatan risiko terjadinya osteoporosis. Osteoporosis merupakan masalah kesehatan umum yang utama karena hubungannya dengan kejadian fraktur. Osteoporosis adalah hasil dari menurunnya massa tulang dan kerusakan mikroarsitektur tulang, sehingga kekuatan tulang menurun dan risiko fraktur meningkat (Chau, 2003).

Correspondence:

Drs. Eko Suhartono, M.Si, Medical Chemistry/Biochemistry
Department of Medicine Lambung Mangkurat University
Banjarbaru/Free Radical and Natural Product Groups, d/a Jl. A.
Yani Km 36 Banjarbaru (70712), Telephone: 0511-4773470, E-
mail: ekoantioksidan@yahoo.com, Hp: +6281251126368

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menyelidiki hubungan diabetes melitus dan osteoporosis, namun peran diabetes melitus sebagai faktor risiko terjadinya osteoporosis dan fraktur tulang masih belum jelas. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dikaji korelasi kadar glukosa darah terhadap penurunan kadar kalsium tulang pada tikus hiperglikemia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar patomekanisme osteoporosis akibat hiperglikemia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *postest-only with control group design*. Penelitian ini menggunakan 50 ekor tikus putih yang terbagi dalam 10 kelompok dengan masing-masing kelompok 5 ekor tikus. Kelompok tersebut antara lain Po = kelompok kontrol (tikus tanpa induksi streptozotocin), P1 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 3 hari, P2 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 6 hari, P3 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 9 hari, P4 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 12 hari, P5 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 15 hari, P6 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 18 hari, P7 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 21 hari, P8 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 24 hari, dan P9 = kelompok tikus yang diinduksi streptozotocin selama 27 hari

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas streptozotocin 50 mg/kgBB, NH₄OH, indikator metil orange, 0,5 N HCl, aquadest, larutan ammonium-oksalat, larutan Na-asetat 20%, H₂SO₄ dan 0,1 N KMnO₄.

Hewan percobaan

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan sekitar 200-300 gram dan berumur sekitar 3-4 bulan.

Cara kerja

1. Perlakuan hewan coba

Sebelum diberikan perlakuan, tikus diadaptasikan selama 1 bulan dengan memisahkan ke dalam 10 kandang kecil. Setiap kandang berisi 5 ekor tikus. Dalam masa adaptasi tikus putih diberi makanan pakan Br-2 setiap hari.

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 cara anastesi yang menggunakan kloroform. Kemudian, tikus dibedah dan diambil darahnya yang berasal dari jantung sedangkan tulang diambil dari tulang ekstremitas bawah tikus. Dengan cara yang sama, begitu pula untuk kelompok yang lain.

2. Pengukuran kadar glukosa darah

Kadar glukosa diukur dengan menggunakan alat pengukur kadar glukosa darah kit komersial (Easy Touch®). Sampel darah diambil dari ekstremitas tikus lalu diteteskan ke bagian yang telah disediakan pada strip glukosa. Selanjutnya strip, dengan mengikuti prosedur penggunaan alat dimasukkan pada tempatnya dan hasil kadar glukosa dapat dilihat pada layar Easy Touch®.

3. Pengukuran Kalsium

Tulang yang diperoleh dibersihkan dan dicuci, kemudian dikeringkan di dalam oven. Setelah kering, bahan dihaluskan lalu

diayak dengan ayakan 40 mesh. Selanjutnya hasil ayakan tulang dilarutkan dalam HCl (1:4) dan dipindahkan semua abu yang terlarut ke dalam gelas piala. Airnya diuapkan sampai menjadi pekat, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 1 jam. Residu kering dibasahi dengan 5-10 ml HCl pekat dan 50 ml aquadest dan dipanasi lagi dalam penangas air selama beberapa menit, kemudian saring dengan kertas saring Whatman no.52.

Filtrat ditampung dengan labu ukur 200 ml. Kemudian endapan yang tertinggal dicuci dengan aquades dan air cucian dicampur dengan filtrat yang tertampung lewat kertas saring yang sama. Filtrat dan hasil cucian tersebut diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pengenceran. Larutan ini diberi kode aliquot A.

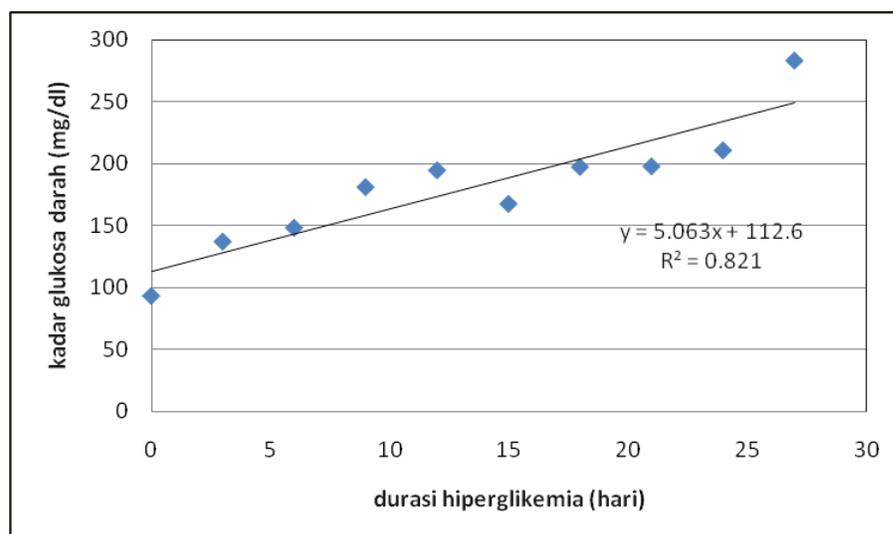
Aliquot A dipipet sebanyak ekuivalen dengan 0,5-2,0 gr abu ke dalam gelas piala 300 ml dan diencerkan dengan aquades sampai 200 ml. Larutan dibuat menjadi sedikit basa dengan NH_4OH (1:4) dengan indikator metil orange. Larutan HCl (1:4) ditambahkan sampai menjadi sedikit asam, lalu tambah 10 ml 0,5 N HCl dan 10 ml asam oksalat 2,5 %, dididihkan dan sambil diaduk

tambahkan 15 ml larutan ammonium-oksalat jenuh. Larutan dipanaskan terus sampai terbentuk endapan granuler, didinginkan dan sambil diaduk tambahkan 8 ml larutan Na-asetat 20%, lalu didiamkan selama 12 jam. Selanjutnya, larutan disaring dan dicuci dengan air panas sampai bebas klorida (cuci dengan air panas kemudian dengan sedikit HCl (1:4) akhirnya dengan air panas sampai bebas klorida, pindahkan residu pada kertas saring ke dalam gelas piala dengan jalan melobangi ujung bawah kertas saring dengan gelas pengaduk, lalu siram dengan air panas seperlunya hingga seluruh endapan telah dipindahkan ke dalam gelas piala. Selanjutnya, ditambah 10 ml H_2SO_4 (1:4) dan dipanaskan sampai hampir mendidih dan setelah dingin dititrasi dengan 0,1 N KMnO_4 .

$$\text{Ca}/100 \text{ mg sampel} = \frac{\text{ml titrasi} \times 2 \times \text{volume total larutan abu}}{\text{Volume larutan abu} \times \text{berat sampel}} \times 100$$

HASIL

Berdasarkan hasil pengukuran glukosa darah tikus putih, didapatkan grafik fluktuasi kadar glukosa darah tikus putih yang dapat dilihat pada Gambar 1.

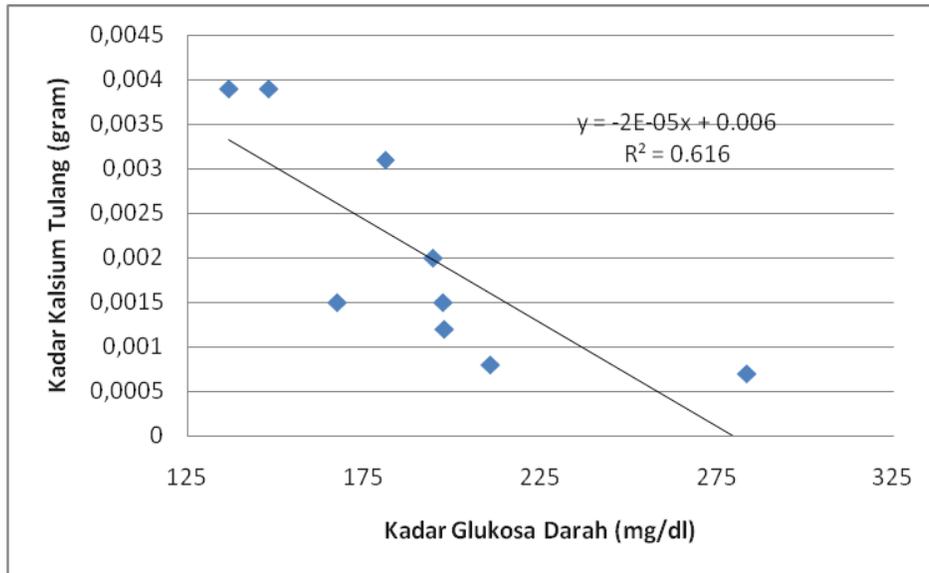


Gambar 1. Perubahan kadar glukosa darah tikus putih berdasarkan waktu

Nilai kadar glukosa tersebut terdistribusi normal dan secara statistik sangat bermakna yaitu memiliki korelasi positif dengan nilai $r_{hitung} = 0,907$ dengan tingkat kepercayaan 99%. Nilai ini dibandingkan dengan besarnya $r_{tabel} = 0,576$, sehingga $r_{hitung} > r_{tabel}$ artinya terdapat korelasi yang bermakna antara kadar glukosa darah pada tikus putih terhadap waktu. Nilai r_{hitung} positif berarti semakin lama waktu setelah diinduksi streptozotocin maka semakin tinggi kadar glukosa darah tikus.

Kemudian kadar glukosa darah dihubungkan dengan kalsium tulang tikus dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan uji korelasi yang dilakukan tampak adanya korelasi yang sangat bermakna antara kadar glukosa darah dengan kalsium tulang pada tikus putih. Hal ini dapat dilihat dari r_{hitung} yang nilainya sebesar $-0,870$ dengan tingkat kepercayaan 99%, lebih besar dibandingkan nilai $r_{tabel} = 0,576$. Nilai r_{hitung} yang negatif berarti semakin tinggi kadar glukosa darah, semakin rendah kadar kalsium tulang pada tikus putih.



Gambar 2. Perubahan kadar kalsium tulang terhadap kadar glukosa darah tikus

PEMBAHASAN

Secara umum, peningkatan kadar glukosa terhadap waktu disebabkan oleh streptozotocin yang merusak sel β pankreas sehingga produksi insulin menurun dan mengakibatkan kadar glukosa darah meningkat (Szkudelski, 2001). Pada hari ke 15, kadar glukosa menurun menjadi 167,4 mg/dl, yang diduga disebabkan oleh adanya enzim heksokinase dan glukokinase. Kadar glukosa darah dipengaruhi oleh proses

metabolik dan hormonal. Heksokinase mempunyai K_m yang rendah terhadap glukosa, berfungsi pada kecepatan konstan pada keadaan normal, namun aktivitasnya dapat dihambat oleh produknya yaitu glukosa-6-fosfat. Glukokinase merupakan enzim yang berperan dalam glikolisis di hati dan reaksinya tidak dihambat oleh produknya, glukosa-6-fosfat. Enzim ini bekerja pada level glukosa yang tinggi. Namun enzim ini berkurang pada keadaan diabetes mellitus.

Pada hari ke 18, 21, dan 24 kadar glukosa tidak menunjukkan peningkatan yang berarti. Hal ini dapat disebabkan kompensasi dari proses glikolisis oleh enzim heksokinase. Namun pada hari ke 27, kadar glukosa meningkat dengan tajam. Hal ini dapat disebabkan aktivitas enzim heksokinase sudah mencapai maksimal sedangkan substratnya yaitu glukosa terus bertambah sehingga enzim heksokinase tidak dapat mentoleransi kadar glukosa di dalam darah. Selanjutnya kadar glukosa yang tinggi tersebut dapat menyebabkan terjadinya ikatan kovalen dengan gugus amina protein. Hal ini mendasari terjadinya reaksi Maillard yang mengakibatkan pembentukan AGEs akan meningkat.

Akumulasi AGEs pada kolagen tipe I mencegah proliferasi dan diferensiasi sel osteoblast, pada berbagai tingkat perkembangannya. AGE yang memodifikasi kolagen juga mencegah perlekatan osteoblast. RAGE (reseptor AGE) diekspresikan di dalam osteoblast dan dapat memodulasi sinyal ketergantungan AGE pada osteoblast. Dengan demikian, hal ini dapat menjelaskan penurunan ekspresi faktor yang bertanggung jawab pada proliferasi dan diferensiasi osteoblast pada model tikus diabetes tipe I. Selanjutnya, hal ini dapat mempengaruhi fungsi osteoblast yang berperan dalam proses pembentukan tulang (Hongbing, 2004). AGEs juga meningkatkan aktivitas osteoklast sehingga terjadi peningkatan jumlah resorpsi oleh osteoklast pada tikus diabetes (Valcourt, 2007). Hal tersebut dapat mengakibatkan ketidakseimbangan pembentukan dan penyerapan kalsium pada tulang sehingga kadar kalsium pada tulang turun.

Santana *et al.*, (2003) mengungkapkan N-(carboxymethyl)lysine (CML)-protein termodifikasi adalah AGEs yang terakumulasi *in vivo* pada diabetes. Pada penelitian *in vitro* pada sel osteoblast memiliki reseptor yang mengikat AGEs, meskipun reseptor AGEs

(RAGE)-nya sendiri tidak teridentifikasi. Osteoblast juga mengekspresikan mRNA dan protein RAGE. Hal ini dapat menjadi bukti peran AGEs terhadap perbaikan tulang. Penemuan terbaru menyebutkan AGEs menghambat diferensiasi osteoblast, AGEs juga mendukung penyakit tulang dengan mengubah respon hormon paratiroid.

Penjelasan tersebut dikuatkan oleh Galluzi *et al.*, (2005) yang mengungkapkan bahwa pada diabetes mellitus terjadi perubahan pada faktor ligan kappa B inti (RANK-L)/sistem osteoprotegerin (OPG). Faktor ini terlibat dalam beberapa penyakit metabolik tulang yang dicirikan dengan meningkatnya diferensiasi osteoklast dan aktivasi dan peningkatan resorpsi tulang. Hal ini menyebabkan penyerapan kalsium tulang semakin besar.

Osteoprotegerin adalah glikoprotein yang disekresi ke dalam sirkulasi tanpa transmembran dan bekerja sebagai reseptor umpan untuk mengaktifasi reseptor faktor ligan kappa B inti (RANK-L). RANK-L dan OPG adalah suatu kunci agonist/antagonist sistem sitokin, mengatur aspek penting dari biologi osteoklast, seperti diferensiasi, penggabungan, daya tahan, apoptosis dan aktivasi. RANK-L meningkatkan osteoklast aktif dengan mengaktifasi reseptor RANK-L spesifik yang terletak pada sel osteoklast sehingga meningkatkan resorpsi tulang, dan OPG yang menetralisasi RANK-L (Galluzi, 2005).

Wittrant *et al.*, (2008) mengungkapkan bahwa tingginya D(+)-Glukosa menghambat pembentukan osteoklast, pembentukan ROS, aktivitas caspase 3, dan migrasi dalam respon RANK-L melalui jalur metabolik. Kadar D(+)-Glukosa yang tinggi bertindak melalui jalur metabolik untuk menghambat RANK-L yang memperantarai diferensiasi dan fungsi osteoklast. Akhir-akhir ini, AGEs yang berakumulasi pada penderita diabetes diidentifikasi sebagai penghambat pembentukan

dan resorpsi osteoklast. Hal ini dapat memungkinkan bahwa glukosa yang tinggi dan AGEs dapat bertindak terhadap kelebihan kehilangan kepadatan tulang yang diperantai osteoklast.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi yang sangat bermakna antara kadar glukosa darah dengan kalsium tulang pada tikus putih setelah diinduksi streptozotocin.

Saran

Disarankan pada penelitian selanjutnya perlu diteliti mekanisme kerusakan tulang sehingga dapat diketahui patobiologis osteoporosis akibat hiperglikemia.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih disampaikan kepada Dirjen Dikti yang telah membantu dana penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa.

KEPUSTAKAAN

Chau DL, Jordi Goldstein, Steven V, Edelman 2003. Osteoporosis Among Patients With Diabetes: An Overlooked Disease, *Diabetes Spectrum*; 16(3):176-82.

- Gugliucci A 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications, *JAOA*; 100(10):621-34.
- Galluzi F, Stefano S, Roberto S, *et al* 2005. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *European Journal of Endocrinology*; 153:879-85.
- Hein GG, Wiegand Lehmann R, Stein G, Franke S 2003. Advanced glycation end-products pentosidine and N^ε-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology*; 42:1242-46.
- Hongbing He, Rongkun Liu, Tesfahun Desta *et al* 2004. Diabetes Causes Decreased Osteoclastogenesis, Reduced Bone Formation, and Enhanced Apoptosis of Osteoblastic Cells in Bacteria Stimulated Bone Loss. *Endocrinology*; 145(1):447-52.
- Junqueira LC, Jose Carniero Robert O, Kelly 1998. *Histologi Dasar*. Jakarta:EGC.
- Miyata T, Kohei Notoya, Keji Yoshida, *et al* 2000. Advanced Glycation End Products Enhance Osteoclast-Induced Bone Resorption in Cultured Mouse Unfractionated Bone Cells and in Rats Implanted Subcutaneously with Devitalized Bone Particles. *J Am Soc Nephrol*; 11: 1744-52.
- Santana RB, Lei Xu, Hermik Babakhanlou Chase *et al* 2003. A Role for Advanced Glycation End Products in Diminished Bone Healing in Type 1 Diabetes. *Diabetes*; 52:1502-10.
- Szkudelski T 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*; 50(6):537-46.
- Valcourt U, Blandine Merle, Evelyne Gineyt *et al* 2007. Non-enzymatic Glycation of Bone Collagen Modifies Osteoclastic Activity and Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*; 282(8): 5691-703.
- Wittrant Y, Gorin, Woodruff, *et al* 2008. High D(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone*; 42(6):1122-30.