



## Suplementasi Folate, Kadar *Homocysteine*, *Nitric Oxide* dan Petanda Retinopati Diabetik Studi pada Tikus Sprague Dawley Diabetes

Banundari Rachmawati \*

### ABSTRACT

*Folate supplementation homocysteine, nitric oxide levels and marker for diabetic retinopathy: Study on Sprague Dawley diabetic rats*

**Introduction:** Diabetic retinopathy (DR) is the leading cause of blindness among diabetes mellitus (DM) patients. Hyperhomocysteinemia (HHcy) is reported to increase the risk for DM complications, however, the underlying mechanism is still unclear. Retina is particularly vulnerable to oxidative stress due to a high demand for oxygen. Hyperglycemia stimulates retinal oxidative stress and increases Nitric Oxide (NO). NO contributes to the regulation of retinal blood vessel function and the occurrence of retinopathy. The administration of folic acid (FA) 0.65 mg/day on HHcy subject, decrease serum Hcy by 42%. This study was aimed to analyze the effect of folate administration on Hcy, NO levels and markers of DR (VEGF serum).

**Methods:** An experimental study using a randomized controlled group pretest posttest design was conducted in UGM Yogyakarta. The total of 40 male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups: negative control and the other four group were induced with Streptozotocin 40 mg/kgBW intraperitoneal. Intervention group were given FA 2, 4, 8 ppm through a nasogastric tube for 30 days. Before and after intervention, serum Hcy, NO and VEGF were assessed, and Wilcoxon tests were used to measure the difference of it.

**Result:** Administration of 8 ppm FA significantly decreased serum Hcy ( $p=0.043$ ), NO levels ( $p=0.043$ ) but not for markers of DR.

**Conclusion:** Folic acid supplementation of 8 ppm gives benefits to diabetic rats.

**Keywords:** Diabetic retinopathy, homocysteine, NO, VEGF

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Retinopati diabetik (RD) merupakan komplikasi diabetes mellitus yang dapat menjadi salah satu penyebab kebutaan. Hyperhomocysteinemia (HHcy) meningkatkan risiko komplikasi diabetes, namun bagaimana interaksinya masih belum jelas. Retina sangat peka terhadap stres oksidatif karena kebutuhan  $O_2$  yang tinggi sedangkan hiperglikemi akan memacu retinal oxidative stress dan peningkatan nitric oxide (NO). NO berperan pada regulasi fungsi pembuluh darah retina dan terjadinya retinopati. Pemberian folic acid (FA) 0,65 mg/hr pada subyek HHcy menurunkan Hcy serum 42%. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis pengaruh pemberian folate terhadap kadar Hcy, NO dan petanda RD (VEGF serum)

**Metode:** Penelitian ini bersifat eksperimental dengan rancangan randomized controlled group pretest posttest design. Penelitian dilakukan di LPPT unit IV UGM Yogyakarta. Sampel 40 tikus Sprague Dawley jantan, umur 2-3 bulan, BB 190-275 g dibagi 5 kelompok: kelompok kontrol negatif dan 4 kelompok lain diinduksi dengan STZ 40mg/kgBB intra peritoneal. Kelompok intervensi diberi FA 2, 4, 8 ppm (sonde) selama 30 hari. Kemudian diperiksa kadar Hcy, VEGF, NO serum. Perbedaan parameter sebelum dan sesudah intervensi dianalisis dengan uji Wilcoxon.

**Hasil:** Pemberian FA 8 ppm menurunkan secara bermakna kadar Hcy ( $p=0,043$ ), NO serum ( $p=0,043$ ) dan tidak menurunkan petanda RD (VEGF serum) secara bermakna.

**Simpulan:** Pemberian FA 8 ppm bermanfaat pada tikus diabetes.

\* Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr. Sutomo 14 Semarang

## PENDAHULUAN

Retinopati diabetik (RD) adalah kelainan retina, ditandai dengan hilangnya kapiler retina karena iskemia progresif dan merupakan komplikasi diabetes mellitus (DM).<sup>1</sup> Tahun 2004 dilaporkan 4,8% penduduk di dunia menjadi buta akibat RD.<sup>2</sup> Tahun 2005-2008 estimasi *crude prevalence* RD usia >40 tahun di Amerika Serikat yang terancam kebutaan adalah 28,5%.<sup>3,4</sup> Insiden RD di Jepang adalah 38,3/1000 orang,<sup>5</sup> di Indonesia sampai saat ini belum ada data (skala besar) mengenai kebutaan akibat DM.<sup>2</sup>

Menurut Da Silva faktor risiko RD adalah lama menderita DM, kontrol glikemik, hipertensi, dislipidemia, BMI yang tinggi, mikroalbuminuria dan *hyperhomocysteinemia/HHcy*.<sup>6</sup> HHcy berhubungan dengan kenaikan insiden dan progresivitas penyakit oklusi arteri termasuk RD, oklusi vena okuler, *neovascular age related macula degeneration*.<sup>7,8</sup> HHcy dihubungkan dengan berbagai penyakit pembuluh darah (PD) akibat stres oksidatif. Retina sangat peka terhadap stres oksidatif karena kebutuhan oksigen yang tinggi, kadar asam lemak jenuh ganda rantai panjang dan paparan *photon* energi tinggi pada *visible light* yang menetap.<sup>7</sup> Peneliti lain menduga Hcy dan VEGF serum yang tinggi, merupakan *marker* untuk PDR.<sup>9</sup>

Hcy adalah asam amino (AA) dengan gugus sulfhidril, derivat AA esensial *methionine*, sumber protein hewani, sangat penting untuk fungsi berbagai biomolekul termasuk DNA, protein, fosfolipid dan *neuro-transmitter*.<sup>10</sup>

Interaksi antara DM dan HHcy pada komplikasi PD masih belum jelas, diduga karena stres oksidatif, kerusakan endotel, dan penurunan *bioavailability nitric oxide (NO)*.<sup>10,11</sup> Sudah dibuktikan pada hewan coba Hcy mencetuskan disfungsi endotel lebih nyata pada DM dibandingkan non DM.<sup>10</sup> HHcy pada DM akan memacu perubahan mikrovaskuler retina dan mempunyai kontribusi memperberat RD. Prevalensi kadar Hcy serum pada penderita RD lebih tinggi dibandingkan kontrol.<sup>12</sup> Hiperglikemi memacu keadaan biokimiawi abnormal, *retinal oxidative stress*, NO meningkat, PKC teraktivasi. NO dilaporkan berperan pada regulasi fungsi pembuluh darah (PD) retina dan terjadinya retinopati.<sup>13</sup>

Metabolisme Hcy membutuhkan *folate*, vitamin B12 dan B6. Jalur metilasi Hcy membutuhkan gugus metil dari *betaine*, jalur transsulfurasi membutuhkan vitamin B6, hal ini menjadi dasar pemberian terapi.<sup>10</sup> Belum ada konsensus dosis optimal, *folate* 1-5 mg/hari (tunggal/kombinasi dengan vitamin B6, B12) efektif untuk menurunkan Hcy secara cepat dan normal kembali 4-6 minggu setelah terapi.<sup>14</sup>

Mekanisme disfungsi endotel pada DM tipe I sangat kompleks dan belum sepenuhnya dipahami, hipertensi dan hiperlipidemia berperan langsung. Salah satu teori, hiperglikemi memacu disfungsi endotel melalui radikal bebas yang diproduksi pada peningkatan metabolisme *arachidonic acid*. *Preliminary study* menyebutkan hubungan terbalik antara sintesis NO dengan aktivitas radikal bebas, sehingga hiperglikemi dapat meningkatkan atau menurunkan produksi NO tergantung inaktivasi yang dimediasi radikal bebas.<sup>15</sup> Teori lain menyebutkan hiperglikemi kronik meningkatkan aktivitas *aldose reductase* dan metabolisme glukosa lewat *polyol pathway* dan membutuhkan NADPH yang merupakan kofaktor esensial NOS untuk sintesis NO, maka penurunan NADPH menyebabkan penurunan produksi NO.<sup>15</sup>

NO mempunyai *half life* yang pendek, secara cepat dikonversikan ke bentuk yang kurang reaktif seperti nitrit dan nitrat. Pada lingkungan selular NO bereaksi dengan oksigen radikal bebas termasuk *superoxide anion* ( $O_2^-$ ) yang diproduksi *NADPH-dependent oxidase* membentuk peroksinitrit yang sangat reaktif dan berbahaya. Pada keadaan fisiologis kadar  $O_2^-$  dibatasi dengan diubah menjadi *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ) oleh enzim *superoxide dismutase* (SOD).

Disfungsi endotel adalah keadaan yang ditandai dengan gangguan *endothelium-dependent vasorelaxation* karena hilangnya bioaktivitas NO pada dinding PD. Peningkatan stres oksidatif, penurunan aktivitas eNOS, ketidakseimbangan produksi dan *release vasoconstrictor mediators* adalah mekanisme yang bertanggung jawab terhadap availabilitas NO. Pada keadaan normal eNOS memelihara *quiescent state* endotel, bila terjadi *uncoupling* akan menurunkan bioavailabilitas NO dan berperan pada disfungsi endotel dengan peningkatan ROS.<sup>16</sup>

Disebutkan kadar NO serum penderita DM baik RD maupun tidak lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kontrol. Studi lain menyebutkan kadar NO serum lebih tinggi pada penderita PDR dibanding RD tahap sebelumnya atau kontrol. Studi saat ini menyebutkan NO tidak hanya berperan pada progresivitas tetapi juga onset diabetes.<sup>17</sup>

RD pada tikus dapat dinilai dengan kenaikan VEGF plasma dan ekspresi VEGF retina.<sup>18</sup> Hiperglikemi memacu ekspresi VEGF karena stres oksidatif, diinduksi HHcy, menyebabkan aktivasi PKC, peningkatan NO, *uncoupling* VEGF dan NO, regulasi fungsi PD retina dan RD.<sup>7,13</sup> VEGF terdiri dari VEGF A, B, C, D dan E. VEGF A sering disebut sebagai VEGF merupakan *potent vascular permeabilizing factor* dan *endothelial cell mitogen*. VEGF A dijumpai pada sistem

hemopoisis, pada diferensiasi sumsum tulang dan merupakan prekursor sel endotel.<sup>19</sup> VEGF dihasilkan oleh berbagai sel di mata, sel peradangan (misal sel pmm dan sel mirip makrofag), sel dilapisan retina yang iskemia dan hipoksia serta neuron *pasca* mitotik, hal ini menyebabkan banyaknya *receptor* VEGF yang ditempati. Endotel retina memiliki *receptor* VEGF yang berlimpah yang merupakan penginduksi permeabilitas PD, oleh sebab itu retina sejak awal sudah rentan terhadap kebocoran PD.<sup>7</sup>

Masih diperdebatkan antara kadar VEGF plasma atau serum mana yang lebih tepat karena trombosit mengaburkan kadar VEGF dan karena ikatan  $\alpha 2$  makroglobulin menyebabkannya tidak mungkin berikatan dengan beberapa antibodi. Di samping itu megakariosit dan lekosit juga mensintesis VEGF, sehingga menyebabkan kesulitan menentukan nilai normal.<sup>19</sup>

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis pengaruh pemberian *folate* berbagai dosis terhadap penurunan kadar *homocysteine*, *nitric oxide* dan petanda retinopati diabetik pada tikus *Sprague Dawley* diabetes yang diinduksi dengan *streptozotocin*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan untuk penelitian yang terkait dengan penatalaksanaan diabetes untuk mencegah komplikasi retinopati diabetik.

## METODE

Rancangan penelitian eksperimental, desain *randomized controlled group pretest posttest design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit IV Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Populasi penelitian adalah tikus *Sprague Dawley* jantan umur 3-4 bulan, diperoleh dari LPPT Unit IV UGM dengan pertimbangan tikus merupakan *animal models* untuk studi perubahan fungsi, struktur dan perubahan biokimia retina. Tikus diinduksi dengan *Streptozotocin*/STZ yang merupakan *protein alkylating agent* m dan dibuat menjadi diabetes<sup>20</sup> dengan dosis 40 mg/kgBB intraperitoneal/IP.<sup>21</sup> Perhitungan jumlah sampel mengacu pada rumus *Federer*<sup>22</sup> dan pedoman WHO tentang penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental diperoleh 5 ekor tiap kelompok.<sup>23</sup>

Kriteria inklusi: berat badan 190-275 gram, sehat aktif bergerak, kadar glukosa darah puasa/GDP awal <110 mg/dl, setelah diinduksi  $\geq 200$  mg/dl. Kriteria eksklusi: diare, perubahan BB <10% atau >10% selama adaptasi, terlihat sakit selama proses perlakuan. Penelitian ini menggunakan 6 tikus per kelompok terdiri dari: kontrol negatif (tidak induksi), kontrol positif (induksi STZ), X1 (induksi STZ+*foliac acid*/FA 2 ppm lewat sonde), X2 (induksi STZ+FA 4 ppm), X3 (induksi STZ+FA 8 ppm) selama 30 hari.

Lama perlakuan 30 hari didasarkan atas penelitian Feit-Leichman: perubahan fisiologi dan biokimia retina tikus diabetik terjadi 1-2 bulan setelah hiperglikemia.<sup>24</sup> Penentuan dosis *folate* berdasarkan penelitian Nieman, dkk dan Diaz, dkk. Nieman memakai dosis larutan FA 0 ppm (defisiensi), 2 ppm (adekuat) dan 8 ppm (berlebihan) melalui sonde (30 hari) untuk membuktikan status *folate* akan menginduksi hepatic glycine N-methyltransferase dan metabolisme *homo-cysteine* pada tikus diabetes.<sup>25,26</sup> Diaz dkk memakai dosis FA 0 dan 8 mg/kgBB (8 minggu) untuk membuktikan pembatasan asupan *folate* akan menyebabkan HHcy dan stres oksidatif pada ginjal tikus SD.<sup>26</sup> Tikus ditempatkan dalam kandang individual, terpapar 12 jam siklus gelap/terang, berventilasi cukup suhu 28-32°C setiap hari dilakukan pembersihan kandang.<sup>27</sup>

BB tikus ditimbang setiap minggu. Spesimen darah diambil dari vena orbita pra dan pasca perlakuan. GDP diperiksa dengan *acucheck*, Hcy, VEGF plasma diperiksa dengan cara ELISA, NO dengan fluorometri di Laboratorium GAKY FK UNDIP. Lar FA dibuat di LPPT unit 1 UGM. 3 ekor tikus mati, masing-masing 1 dari kelompok C+, X2 dan X3 setelah diinduksi STZ sebelum perlakuan, karena kadar GDP >500 mg/dl.

Data disajikan secara diskriptif, dilakukan uji normalitas data dengan Saphiro Wilks, kemudian dilakukan uji Wilcoxon untuk menganalisis perbedaan pra dan pasca perlakuan. Untuk melihat homogenitas subyek penelitian dilakukan randomisasi dan menganalisis perbedaan GDP skrining dan pra perlakuan antar kelompok dengan uji Kruskal Wallis. diperoleh GDP skrining ( $p=0,108$ ), dan pra perlakuan ( $p=0,067$ ) tidak berbeda bermakna, artinya subyek penelitian homogen.

## HASIL

### Berat badan

Pada tulisan ini hanya ditampilkan awal, pra dan pasca perlakuan (Tabel 1).

BB tikus kontrol negatif terus meningkat, BB tikus diabetes terus menurun. Pada Tabel 2 dapat dilihat delta penurunan BB, tertinggi terdapat pada kelompok kontrol positif, sementara peningkatan tertinggi pada kelompok kontrol negatif.

### Kadar glukosa darah puasa (GDP)

Kadar GDP skrining, pra dan pasca perlakuan dapat dilihat ada Tabel 3. Rerata kadar GDP tertinggi pasca perlakuan dijumpai pada kelompok yang diberi FA 2 ppm.

**Kadar homocysteine serum pra dan pasca perlakuan**

Dengan uji *Wilcoxon* diperoleh: tidak terdapat perbedaan bermakna pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, FA 2 ppm dan 4 ppm. Penurunan bermakna dijumpai dijumpai pada kelompok FA 8 ppm/dosis tinggi ( $p=0,043$ ) (Tabel 4).

**Kadar nitric oxide pra dan pasca perlakuan**

Rerata kadar NO serum pra dan pasca perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5. Uji *Wilcoxon* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna kadar NO serum antara pra dan pasca perlakuan pada kelompok kontrol negatif,

kontrol positif, FA 2 ppm dan 4 ppm. Penurunan bermakna kadar NO pasca perlakuan dijumpai pada kelompok FA 8 ppm ( $p=0,043$ ).

**Kadar VEGF serum pra dan pasca perlakuan**

Perubahan kadar VEGF serum pra dan pasca perlakuan dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil uji statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar VEGF serum pra dengan pasca perlakuan pada semua kelompok. Artinya pemberian FA dalam dosis 2, 4 dan 8 ppm selama 30 hari tidak mempengaruhi kadar VEGF serum.

Tabel 1. Rerata berat badan

Kelompok	Rerata berat badan		
	Awal	Pra perlakuan	Pasca perlakuan
Kontrol negatif	201,8 ± 4,76	246,8 ± 9,78	293,5 ± 17,51
Kontrol positif	209,5 ± 16,06	206,9 ± 30,49	168,6 ± 44,68
FA 2 ppm	232,6 ± 5,85	216,1 ± 19,73	203,5 ± 69,06
FA 4 ppm	240,6 ± 4,20	235,6 ± 10,15	195,1 ± 18,46
FA 8 ppm	264,7 ± 5,53	248,8 ± 12,21	216,5 ± 18,73

Tabel 2. Delta berat badan awal, pra dan pasca perlakuan

Kelompok	Delta berat badan			
	Awal & pra perlakuan		Pra dan pasca perlakuan	
	Gr	%	Gr	%
Kontrol negatif	45	22,3%	46,7	18,9%
Kontrol positif	-2,6	-1,2%	-38,3	-18,5%
FA 2 ppm	-16,5	-7,1%	-12,6	-5,8%
FA 4 ppm	-5,0	-2,0%	-40,5	-17,2%
FA 8 ppm	-15,9	-6,0%	-32,3	-13,0%

Tabel 3. Rerata kadar glukosa darah puasa awal dan pra perlakuan (untuk memastikan tikus menjadi DM)

Kelompok	Rerata kadar glukosa puasa		
	Penepisan	Pra perlakuan	Pasca perlakuan
Kontrol negatif	71,2 ± 8,47	70,5 ± 5,24	84,5 ± 9,69
Kontrol positif	79,2 ± 6,53	287,4 ± 42,37	443,0 ± 122,56
FA 2 ppm	75,8 ± 9,78	256,0 ± 83,69	463,8 ± 116,77
FA 4 ppm	73,0 ± 3,87	357,0 ± 55,07	362,8 ± 76,93
FA 8 ppm	81,4 ± 5,63	264,0 ± 29,25	373,0 ± 126,74

Tabel 4. Perbedaan rerata kadar homocysteine pra dan pasca perlakuan

Kelompok	Pra perlakuan		Pasca perlakuan		p
	Rerata	SB	Rerata	SB	
Kontrol negatif	20,5	4,37	21,2	2,78	0,459
Kontrol positif	27,4	5,32	27,2	12,1	0,785
FA 2 ppm	24,2	3,43	22,3	14,06	0,344
FA 4 ppm	28,6	4,83	17,8	4,66	0,080
FA 8 ppm	25,8	8,93	15,0	1,58	0,043

Tabel 5. Perbedaan rerata kadar *nitric oxide* pra dan pasca perlakuan

Kelompok	Pra perlakuan		Pasca perlakuan		p
	Rerata	SB	Rerata	SB	
Kontrol negatif	27,8	1,70	28,7	2,20	0,600
Kontrol positif	73,3	21,08	82,5	65,86	0,893
FA 2 ppm	54,5	25,99	47,3	13,92	0,463
FA 4 ppm	50,4	31,90	41,6	30,95	0,893
FA 8 ppm	44,5	25,47	27,0	16,28	0,043

Tabel 6. Perbedaan rerata kadar *VEGF* serum pra dan pasca perlakuan

Kelompok	Pra perlakuan		Pasca perlakuan		p
	Rerata	SB	Rerata	SB	
Kontrol negatif	6,27	2,46	6,36	5,18	0,917
Kontrol positif	13,86	8,16	14,78	11,09	0,893
FA 2 ppm	15,56	9,55	17,27	20,45	0,686
FA 4 ppm	8,60	8,50	7,96	6,78	1,000
FA 8 ppm	9,85	4,40	12,77	2,26	0,345

## PEMBAHASAN

### Berat badan

Pasca perlakuan BB tikus kelompok kontrol negatif terus meningkat, hal ini menunjukkan tikus mendapatkan pemeliharaan yang baik, pakan yang adekuat dan tidak sakit. Semua tikus DM mengalami penurunan BB dan penurunan terbesar (-18,5%) pada kontrol positif, hal ini menunjukkan bahwa *uncontrolled DM* menyebabkan BB menurun. Hasil *Hoorn study*, prevalensi RD berkorelasi positif dengan BMI dan hiperglikemia, namun BMI tidak secara langsung berhubungan dengan derajat RD.<sup>28</sup>

### Kadar glukosa darah puasa

Pemberian FA tidak dapat mencegah peningkatan kadar GDP, hal ini karena FA secara medis tidak diindikasikan untuk terapi DM tetapi berperan pada metabolisme Hcy. Hiperglikemi kronik mempunyai peran penting pada perkembangan RD, paparan terus-menerus terhadap kadar glukosa yang tinggi pada sel akan menyebabkan perubahan metabolisme selular.<sup>29</sup> Probabilitas perkembangan RD berkorelasi positif dengan peningkatan HbA1c maupun *fruktosamine*.<sup>30</sup> Hiperglikemia memacu retinopati, penelitian menunjukkan perbaikan kontrol glikemik akan menurunkan progresivitas RD. Meskipun begitu pengembalian ke kontrol glikemik normal setelah periode kontrol glikemik yang buruk tidak dengan segera menghasilkan penurunan progresivitas RD.<sup>31</sup> *The diabetes control and complication (DCCT) study* menyimpulkan kontrol glukosa ketat selama dilakukan *follow up* 9<sup>th</sup> pada DM tipe I akan menurunkan progresivitas RD sampai 76%.<sup>32</sup> Pada penelitian ini didapatkan peningkatan kadar GDP

pada semua kelompok, tertinggi pada kontrol positif, dapat disimpulkan tikus DM yang *uncontrolled* mengalami peningkatan GDP tertinggi.

### Kadar *homocysteine* serum

Penurunan kadar Hcy terkecil dijumpai pada pemberian FA 2 ppm dan bila dilihat GDP pasca perlakuan kelompok ini adalah yang tertinggi. Penurunan bermakna dijumpai pada pemberian FA 8 ppm (p=0,043), Niemen menyebutkan, pemberian FA 2 ppm dianggap adekuat dan pemberian 8 ppm dianggap berlebihan.<sup>33</sup> Ubink meneliti peran vitamin sebagai *determinant* kadar Hcy serum melibatkan 100 subyek dengan kadar Hcy puasa tinggi, pemberian *folate* menurunkan Hcy serum sebesar 42%.<sup>34</sup> Satyanarayana menyimpulkan dalam penelitiannya: didapat korelasi negatif antara kadar Hcy dengan FA.<sup>35</sup> Penelitian Atta: pemberian FA menurunkan kadar Hcy dan VEGF.<sup>36,37</sup> Studi terkini menyebutkan manfaat FA tidak terbatas hanya pada metabolisme Hcy, FA tampaknya berinteraksi dengan NO meningkatkan availabilitas *tetrahydrobiopterin* (H4B), menurunkan pembentukan *superoxide anion* dan memperbaiki disfungsi endotel.<sup>38</sup>

Penelitian ini memperkuat penelitian Diez memakai tikus Wistar albino yang diberi FA dosis 8 ppm (dosis tinggi) selama 8 minggu didapat penurunan bermakna *folate* plasma, peningkatan bermakna kadar Hcy pada kontrol dan korelasi negatif (r=-0,86) antara keduanya.<sup>26</sup> Penelitian ini juga memperkuat penelitian Brouwer, dimana penelitian Brouwer: pemberian FA dosis 250 µg dan 500 µg pada wanita sehat usia 18-40 tahun selama 4 minggu menurunkan kadar Hcy 11 dan 22%, setelah 4 minggu, dosis 500 µg lebih nyata menurunkan kadar Hcy.<sup>39</sup> *The homocysteine lowering trialist's*

*collaboration meta analysis* didapatkan pemberian *FA* 0,5-5 mg/hari dapat menurunkan Hcy sebesar 25%.<sup>10</sup>

Interaksi antara DM dan peningkatan Hcy pada komplikasi PD masih tetap belum jelas, diduga karena stres oksidatif, kerusakan endotel, dan penurunan bioavailabilitas *nitric oxide (NO)*. Hipotesis kenaikan kadar Hcy, adalah akselerasi *glucose induced stres oksidatif* pada sel endotel dan sudah dicobakan pada hewan coba dan dibuktikan Hcy lebih nyata menyebabkan disfungsi endotel pada diabetes dibandingkan non diabetes.<sup>11</sup>

Penelitian ini berbeda hasilnya dengan penelitian Nieman yang memakai tikus SD jantan (diinduksi STZ 60 mg/kgBB) didapatkan tikus yang tidak diberi *FA*, Hcy total plasma meningkat 4-5 kali dibandingkan yang diberi *FA* 2 atau 8 ppm. Kadar Hcy tikus diabetes yang diberi *FA* 2 dan 8 ppm normal dan tidak berbeda bermakna.<sup>33</sup>

Pengobatan pasien DM tipe II harus waspada terhadap risiko HHcy khususnya pada tahap awal nefropati. Terapi HHcy relatif mudah dengan *folate* tunggal atau kombinasi dengan *cyanocobalamin* atau *piridoxin*.<sup>40</sup> *FA* dapat mencegah disfungsi endotel pada keadaan normo Hcy dan memperbaiki disfungsi endotel pada pasien HHcy, hiperkolesterolemia, diabetes dan kardiovaskuler. Mekanisme bagaimana efek *folate* terhadap endotel masih belum jelas, diduga menurunkan Hcy, berefek sebagai antioksidan, berperan sebagai kofaktor atau berinteraksi langsung dengan enzim endothelial NOS.<sup>10</sup>

#### Kadar *nitric oxide* serum

Hasil penelitian ini pemberian *FA* menurunkan kadar NO dan secara statistik bermakna ( $p=0,043$ ) pada pemberian 8 ppm. Hasil penelitian Izumi: kadar NO serum penderita DM (dengan dan tanpa RD) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kontrol. Studi terdahulu menyebutkan kadar NO serum lebih tinggi pada penderita PDR dibanding RD tahap sebelumnya atau kontrol. Peneliti lain melaporkan kadar NO sudah meningkat pada penderita DM tanpa RD dibandingkan kontrol. NO tidak hanya berperan pada progresivitas tetapi juga onset diabetes.<sup>17</sup>

*Half life* NO sangat pendek dan secara cepat di-konversikan ke bentuk yang kurang reaktif (nitrat dan nitrit). Di lingkungan selular, NO juga bereaksi dengan oksigen radikal bebas termasuk  $O_2^-$  (diproduksi oleh *NADPH-dependent oxidases*), membentuk *peroxy-nitrite* (lebih reaktif dan berbahaya). Pada keadaan fisiologis, kadar  $O_2^-$  dibatasi oleh enzim SOD, dengan cara diubah menjadi  $H_2O_2$ . Dengan mengontrol pembentukan ROS, mekanisme redox menjamin bioavailabilitas produksi NO di sel.<sup>16</sup>

Menurut Van Etten dkk: pemberian 5 *methyl tetrahydrofolate* (bentuk aktif dari *perin FA*) dapat memperbaiki gangguan vasodilatasi karena NO pada pasien DM tipe 2 walaupun ada faktor risiko diabetes lain seperti hiperglikemi, dislipidemia dan hipertensi. Gangguan availabilitas NO pada diabetes dapat menyebabkan peningkatan degradasi NO oleh oksigen radikal bebas atau penurunan produksi NO. Pada level molekuler, pemberian 5-MTHF memperbaiki fungsi *uncoupled* eNOS pada BH4. Mekanisme pasti masih belum jelas diduga *folate* berperan sebagai fasilitator efek BH4 pada *electron flux* dari NOS. Efek perbaikan 5-MTHF tampaknya spesifik pada *endothelium derived NO*.<sup>41</sup>

Title dkk meneliti, subyek DM tipe 2 diberi *FA* dosis tinggi 10 mg/kgBB per oral (2 minggu), dibandingkan dengan placebo, diperoleh *FA* dapat memperbaiki disfungsi endotel pada subyek DM tipe 2 tanpa gangguan vaskuler secara independen tidak tergantung penurunan Hcy.<sup>42</sup> Bagaimana suplementasi *FA* dapat memperbaiki *endothelium dependent vasodilatation* pada DM tipe 2 masih dalam perdebatan, apakah melalui efek penurunan Hcy atau tidak.<sup>42</sup> Pada penelitian ini *FA* 8 ppm menurunkan kadar NO serum secara bermakna, hasil ini sesuai dengan penelitian Title.

#### Kadar VEGF serum

Hasil penelitian ini pemberian *FA* tidak menyebabkan perbedaan yang bermakna kadar *VEGF* serum pra dengan pasca perlakuan pada semua kelompok, artinya tidak menurunkan kadar *VEGF* serum ( $p>0,05$ )

VEGF pada dasarnya terikat heparin, ada beberapa isoform, VEGF121 merupakan *soluble protein* bebas, VEGF165 terikat pada permukaan sel dan matriks ekstraseluler. Sebaliknya VEGF 189 dan 206 terdapat pada matriks ekstra seluler. Masih diperdebatkan antara kadar VEGF plasma atau serum mana yang lebih tepat karena trombosit mengaburkan kadar VEGF dan ikatan dengan  $\alpha_2$  makroglobulin menyebabkannya tidak mungkin berikatan dengan beberapa antibodi. Megakariosit dan lekosit juga mensintesis VEGF sehingga VEGF juga bisa berasal dari lekosit atau trombosit, sehingga menyebabkan kesulitan menentukan nilai normal.<sup>19</sup>

Penelitian Atta, dkk pemberian *FA* 0,5mg/hari dan vitamin B1, B6 dan B12 125mg/hari selama 6 minggu pada pasien *peripheral arterial disease* dan DM tipe 2 menurunkan kadar Hcy sebesar 21% dan 27%, dan VEGF sebesar 30% dan 40%. Penurunan Hcy tidak dapat mencapai angka normal karena pemakaian *FA* dosis kecil.<sup>36</sup> Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Atta, bahwa pemberian *FA* dosis kecil tidak menurunkan kadar VEGF ke nilai normal. Dosis 8 ppm

belum cukup untuk menurunkan kadar VEGF serum secara bermakna. Kemungkinan lain adalah VEGF terdiri banyak isoform sehingga mempengaruhi hasil. VEGF tidak hanya dihasilkan retina, VEGF juga dihasilkan oleh trombosit dan leukosit, oleh sebab itu peningkatan pada serum belum tentu akibat kelainan pada retina. Pemeriksaan VEGF serum dilakukan karena tidak invasif, mudah dan sangat mungkin dilakukan pada manusia, sementara pemeriksaan ekspresi VEGF pada retina dengan pengecatan tidak mungkin dilakukan pada manusia.

## SIMPULAN

Pemberian *folate* dengan berbagai dosis pada tikus *Sprague Dawley* diabetes yang diinduksi dengan *streptozotocin* 40 mg/kgBB menyebabkan penurunan bermakna kadar *homocysteine*, NO hanya pada dosis 8 ppm dan tidak menyebabkan penurunan bermakna petanda retinopati diabetika (kadar VEGF serum).

## SARAN

VEGF serum tidak direkomendasikan sebagai petanda retinopati diabetik. *Folic acid* merupakan sediaan murah dan mudah didapat dengan efek samping minimal, oleh sebab itu penelitian lanjutan serupa pada manusia akan sangat bermanfaat dan diharapkan dapat mencegah dan atau menurunkan kejadian retinopati diabetik.

## Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang memberikan dana hibah desertasi doktor tahun 2010, para promotor dan semua pihak yang terlibat dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Roybal. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *The J of Biol Chem*. 2004;279(15):14844-52.
- Victor AS. Retinopati diabetik penyebab kebutaan utama penderita diabetes rumah diabetes informasi dan panduan lengkap diabetes; 2008.
- Zhang X, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA*. 2010;304 No. 6.
- Nasution K. Deteksi dini retinopati diabetik di pelayanan primer Indonesia, Mungkinkah? *J Indon Med Assoc*. 2011;61 No. 8:307-9.
- Kawasaki R, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow up study on the Japan Diabetes Complication Study (JDACS). *Diabetologia*. 2011;54: 2288-94.
- Dasilva ZM, Frietas AM, Marcon IM. Risk factor related to the severity of diabetes retinopathy *Arc Bras Oftalmol*. 2003;66:739-43.
- Hernowo. Patogenesis molekular dan mikroskopik vasculopati korioritina. *Progress in Ophthalmology and Visual Science*; 2007 [updated 19 Oktober 2008].
- Brazionis, Harper CA, Rowley KO, 'Dea KI, Tsopoulos C. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2008;31(1):0-6.
- Chaudary GM. Retinopathy in diabetic patients. *Pakistan J Med Res* 2005;44(2).
- Hankey GJ, Eikelboom JW, Ho WK, Bockxmeer FM. Clinical usefulness of plasma homocysteine in vascular disease. *MJA*. 2004;181(6):314-8.
- Muthu S, et al. The eurodiab prospective complication study. Plasma homocysteine and microvascular and macrovascular complication in type 1 diabetes: A cross-sectional nested case-control study. *J of Internal Medicine*. 2005;258:450-9.
- Goldstein M, Leibovith I, Yefimov I, Gavendo S, Sela B, Loewsten A. Hyperhomocysteinemia in patients with and without diabetic retinopathy. *Eye*. 2004;18: 460-5.
- Kowluru RA. Diabetes induced elevation in retinal oxidative stress, protein kinase C dan nitric oxide are inter related. *Acta Diabetol*. 2001;38:179-85.
- Welch GN, Localso J. Homocysteine and atherothrombosis. *The NEJM*. 1998;338(15):1042-52.
- Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia*. 2000;43:137-47.
- Nacci C, Tarquino M, Montagnani M. Molecular and clinical aspect of endothelial dysfunction in diabetes. *Intern Emerg Med*. 2009;4:107-16.
- Izumi N, Nagaoka T, Mori F, Sato E, Takahashi A, Yoshida A. Clinical investigation: Relation between plasma oxide levels and diabetic. *Jpn J Ophthalmol*. 2006;50:465-68.
- Zhang D, Kaufman PL, Gao G, Saunders RAMa JX. Intravitreal injection of plasminogen kringle 5, an endogenous angiogenic inhibitor arrest retinal neovascularization in rat. *Diabetologia*. 2001;44:757-65.
- Dvorak HF. Microvascular research. In: Shepro D, editor. *Vascular permeability factor? Vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF, VEGF-A)*. Boston: Elsevier Academic Press; 2006;97-103.
- Srinivisan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*. 2007;125:451-72.
- Indranila KS, Judiono, Theopillus W. Effects of multidoses of streptozotocin diabetogenic induced Sprague Dawley rats on hyperglycemia and mycroalbuminuria. 2010;1-5.
- Smith JB MS. *Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Jakarta: UI Press; 1988.

23. WHO Regional Office for the Western Pacific Manila. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993.
24. Feit-Leichman RA, et al. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial cell. *Invest Ophthalmol & vis sci* 2005;46(11): 4281-87.
25. Niemen KM, Hartz CS, Szegedi SS, Garrow TA, Spark JA, Schalinske KL. Folate status modulate the induction of hepatic glycine N methyltransferase and homocysteine metabolism in diabetic rat. *Am J Physiol Endocrinol, Metab.* 2006;291:E1235-E42.
26. Diez N, Perez R, Hurtado V, Santridian S. Hyperhomocysteinaemia induced by dietary folate restriction cause kidney oxidative stress in rat. *British Journal of Nutrition.* 2005;94:204-10.
27. Jacobs RL, House JD, Brosnan E, Brosnan JT. Effect of streptozotocin induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes.* 1998;47:1967-8.
28. Van Leyden HA, et al. Risk factor for incident retinopathy in a diabetic and non diabetic population. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:245-51.
29. Madsen-Bouters SA & Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanism and treatment perspective. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9:315-27.
30. Cohen RM, Smith EP, Le Caire TJ, D'Alessio DJ, Lindsell CJ. Relationship of prospective GHb to glycated serum protein in incident diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2008;31(1):151-3.
31. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes.* 2003;52(3):818-23.
32. Donaldson M, Dodson PM. Medical treatment of diabetic retinopathy. *Eye.* 2003;17:550-62.
33. Niemen KM, Hartz CS, Szegedi SS, Garrow TA, Spark JA, Schalinske KL. Folate status modulate the induction of hepatic glycine N methyltransferase and homocysteine metabolism in diabetic rat. *Am J Physiol Endocrinol, Metab.* 2006;291:E1235-E42.
34. Ubbink JB, Vermaak WJH, Van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in human. *J Nutr.* 1994;124:1927-33.
35. Satyanarayana A, Balakrishna N, et al. Status of B-vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: Association with vitamin -B12 deficiency and hyperhomocysteinemia. 2011;6(11).
36. Atta HM, El-Rehany MA, Raheim SRA, Moneim A, Galal F. Lowering homocysteine decreases levels and expression of VEGF and endostatin. *Journal of Surgical Research.* 2007;146:202-10.
37. Atta HM, El-Rehany MA, Raheim SRA. Hyperhomocysteinemia modulates VEGF plasma levels and its expression in leukocytes in healthy subjects and in patients with peripheral arterial disease and diabetes mellitus. *Egyptian Journal of Surgery.* 2005;24(2):66-72.
38. Undurti. Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition.* 2003;19:686-92.
39. Brouwer A, et al. Low dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:99-104.
40. Smulder YVO, et al. Fasting and post methionine homocysteine level in NIDDM. *Diabetes care.* 1999; 22 number 1 (January 1999):125-32.
41. Van Etten RW, deKoning EJP, Verhar MC, Gaillard CA JM, RabelinkTJ. Impaired NO dependent vasodilatation in patient with type II (non insulin dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia.* 2002;45:1004-10.
42. Title LM, Ur E, Giddens K, Mc Queen JM, Nassar BA. Folic acid improves endothelial dysfunction in type 2 diabetesan effect independent of homocysteine lowering. *Vascular Medicine.* 2006;11:101-9.