



**PENGARUH GLIBENKLAMID KOMBINASI MINYAK BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lam.) TERHADAP INDEKS ATEROGENIK TIKUS JANTAN GALUR WISTAR DIABETES**

a. Dr. Lutfan Hakim  
b. Hendra Perkasa

Jenis Penelitian

a. Pengaruh Glibenklamid Kombinasi Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Tingkat Kerusakan Kolesterol, Madung Madu Tikus Jantan Galur Wistar Diabetis

b. Pengaruh Glibenklamid Kombinasi Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Indeks Aterogenik Tikus Jantan Galur Wistar Diabetis

c. Pengaruh Glibenklamid Kombinasi Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Kadar Asam Urat Tikus Jantan Galur Wistar Diabetis

Jangka Waktu Penelitian

Jumlah Dana

Sumber Dana

OLEH  
Winarto  
Hendra Perkasa

Dibiayai Oleh :

DANA DIPA Universitas Riau  
Nomor :

LEMBAGA PENELITIAN  
UNIVERSITAS RIAU  
PEKANBARU  
2012

# PENGARUH GLIBENKLAMID KOMBINASI MINYAK BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lam.) TERHADAP TINGKAT KERUSAKAN KORPUSKULUM MALPHIGI RENALIS TIKUS JANTAN GALUR WISTAR DIABETES

Winarto, Hendra Perkasa

## ABSTRACT

*Diabetes mellitus is one of a metabolism disorder with characteristic of the hyperglycemia caused by abnormal insulin secretion resistance, insulin metabolism, or both. Diabetes mellitus complications in kidney is related with hyperglycemia cause increasing oxidative stress and disturbance antioxidant defence. Pandanus conoideus Lam. oil containing  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\alpha$ -tocopherol can reduce oxidative stress. This study aimed to determine the effect of glibenclamide combination P. conoideus Lam. oil on histochemical changes corpusculum malphigi diabetes. Wistar rats were divided into four groups; normal group, DM group, diabetic group given glibenclamide and diabetic groups were given glibenclamide combination Pandanus conoideus Lam. oil. The results showed significant differences ( $p < 0.05$ ) on histological glomerulosclerosis, capillary dilatation, mesangial matrix expansion and mesangiolysis. Based on this study; it can be concluded that administration of glibenclamide combination Pandanus conoideus Lam. oil can prevent the progression of Corpusculum malphigi damage in diabetic rats.*

**Key words:** *Pandanus conoideus Lam. oil, diabetes mellitus, hyperglycemia, antioxidant, corpusculum malphigi*

## PENDAHULUAN

Diabetes melitus adalah suatu gangguan metabolik dengan karakteristik terjadinya hiperglikemia yang disebabkan oleh kelainan sekresi insulin, resistensi kerja insulin ataupun keduanya.<sup>1,2</sup> Hiperglikemia kronik pada DM dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas khususnya seperti *reactive oxygen species* (ROS) melalui mekanisme peningkatan jalur poliol, peningkatan *advanced glycation end-product* (AGEs), aktivasi protein kinase C (PKC) dan peningkatan jalur heksosamin.<sup>3,4</sup>

Produksi berlebihan dari *reactive oxygen species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan dari makromolekul seluler seperti DNA, lipid, protein dan molekul antioksidan yang akhirnya menyebabkan apoptosis dan kerusakan berbagai organ termasuk ginjal.<sup>3,5,6</sup> Kerusakan ginjal pada diabetes ditandai dengan perubahan yang khas pada korpuskulum malphigi renalis. Perubahan histologi pada korpuskulum malphigi berupa hipertropi glomerulus, glomerulosklerosis, proliferasi sel mesangial, ekspansi matrik mesangial, mesangiolisis, penebalan kapsula Bowman dan hialinosis arteriolar.<sup>6,7,8</sup>

Penatalaksanaan DM masih merupakan masalah global dan keberhasilan pengobatan masih belum memuaskan.<sup>9</sup> Berdasarkan penelitian, glibenklamid adalah salah satu obat yang penting dalam penatalaksanaan hiperglikemia pada DM. Pada penelitian *in vivo* dan *in vitro* diketahui bahwa glibenklamid yang merupakan generasi kedua sulfonilurea memiliki peran penting dalam menstimulus sekresi insulin dan menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan uptake glukosa, oksidasi glukosa, aktivasi sintesis glikogen pada hati dan jaringan adiposa. Akan tetapi penggunaan glibenklamid terbatas karena dapat menyebabkan hipoglikemia pada pemakaian jangka panjang.<sup>10,11</sup>

Pada penderita DM terjadi penurunan aktivitas dari antioksidan endogen akibat peningkatan produksi radikal bebas sehingga diperlukan pemberian antioksidan eksogen untuk mencegah terjadinya stres oksidatif.<sup>12</sup> Pada saat ini sedang berkembang penelitian untuk mengidentifikasi antioksidan alami untuk menggantikan yang endogen.<sup>9</sup> Minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam) diketahui memiliki kandungan zat-zat gizi lengkap dan senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan tersebut diantaranya  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -tokoferol dan sejumlah asam lemak esensial seperti asam oleat, asam linoleat dan asam dekanat.<sup>13,14</sup> Winarto<sup>14</sup> membuktikan bahwa pemberian minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam) dapat menurunkan stres oksidatif dan meningkatkan aktivitas hipoglikemik dari glibenklamid.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi glibenklamid dan minyak buah merah (*P. conoideus* Lam) terhadap gambaran korpuskulum malphigi renalis tikus DM.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan pendekatan *post test-only control group design*. Penelitian ini menggunakan sampel berupa 20 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat badan antara 175-200 gram, yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam), *streptozotocin* (MP) dan glibenklamid (Kimia Farma).

Peralatan yang digunakan adalah kandang tikus, timbangan manual Sartorius, timbangan analitik Sartorius, glibenklamid, kanula pencekok tikus, tabung reaksi, satu set alat bedah minor, satu set reagen untuk pemeriksaan glukosa darah, satu set alat untuk pemeriksaan preparat dengan pewarnaan *periodic acid schiff* (PAS).

Hewan percobaan dibagi secara acak menjadi 4 grup yang masing-masing berjumlah 5 ekor. Grup tikus normal terdiri dari grup 1 dan grup tikus diabetes terdiri dari grup 2, 3 dan 4. Tikus pada grup 2,3 dan 4 diinjeksikan dengan *streptozotocin* dosis 60 mg/KgBB dalam buffer sitrat pH 4,5 secara intraperitoneal sebanyak satu kali. Kadar glukosa darah puasa  $\geq 240$  mg/dl yang dipilih sebagai subjek penelitian. Tikus normal diinjeksi dengan buffer sitrat dengan dosis yang sama.<sup>15</sup> Grup 1 sebagai grup kontrol normal, grup 2 sebagai kontrol DM, grup 3 Grup 3 diberikan glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan Grup 4 diberikan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari dan glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Kadar glukosa darah puasa diukur secara periodik pada hari ke-1, 7 dan 14.

Ginjal tikus diperoleh setelah dilakukan anestesi dengan menggunakan eter. Ginjal yang sudah diambil difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% untuk dilakukan pewarnaan *Periodic acid Schiff* (PAS). Penilaian mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Pengamatan dilakukan terhadap ekspansi matrik mesangial, glomerulosklerosis, mesangiolisis, dilatasi kapiler.<sup>16</sup>

Ekspansi matrik mesangial dinilai secara subjektif dengan skala 0-4. 0 = tidak ada ekspansi matrik mesangial, 1 = ekspansi matrik mesangial 25% dari luas area glomerulus, 2 = ekspansi matrik mesangial 25-50% dari luas area glomerulus, 3 = ekspansi matrik mesangial 50-75% dari luas area glomerulus, 4 = ekspansi matrik mesangial 75-100% dari luas area glomerulus.<sup>16</sup> Glomerulosklerosis yaitu area yang solid dan homogen yang dinilai secara subjektif dengan skala 0-4. 0= normal, 1= area sklerosis <25% (minimal), 2= area sklerotik 25%-50% (sedang), 3= area sklerotik 50%-75% dan 4=area sklerotik >75%-100% (berat).<sup>17</sup> Mesangiolisis yaitu sebuah penipisan atau terputusnya matrik mesangial yang dikenali sebagai

perluasan dengan pewarnaan yang tidak lengkap dari area mesangial dan degenerasi dari sel mesangial. Mesangiolisis dinilai secara subjektif 0 = tidak ada, 1 = ada. Dilatasi kapiler diukur dengan menggunakan micrometer ( $\mu\text{m}$ ).<sup>16</sup> Data diolah secara komputerisasi, kemudian disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi.<sup>18</sup>

## HASIL PENELITIAN

### 1. Glomerulosklerosis

Pada penelitian ini didapatkan data gambaran histologis glomerulosklerosis yang dipulas dengan *Periodic Acid Schiff* (PAS) seperti tercantum pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1 Rata-rata gambaran histologis glomerulosklerosis pada berbagai perlakuan

Nomor sampel	Glomerulosklerosis			
	Perlakuan			
	I	II	III	IV
1	0,15	1,45	0,3	0
2	0,15	1,9	0,4	0,25
3	0,2	1,15	0,45	0,35
4	0	2,0	0,95	0,3
5	0,05	1,7	0,95	1,7
Total	0,55	8,20	3,05	2,60
Rata-rata	0,11±0,82	1,65±0,35	0,61±0,32	0,48±0,67

#### Keterangan:

- I : Kelompok normal
- II : Kelompok DM
- III : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari
- IV : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

Tabel 1 menunjukkan skor total glomerulus yang mengalami sklerosis dari yang terbesar sampai yang terkecil secara berturut-turut adalah kelompok diabetes, kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari.

Untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan tersebut dilakukan uji varians (ANOVA), namun karena didapatkan sebaran data tidak normal ( $p < 0,05$ ) maka dilakukan transformasi data. Setelah dilakukan transformasi data didapatkan sebaran data normal dan uji varians sama. Pada uji Anova diperoleh nilai  $p = 0,00$  ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda makna. Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan antara glomerulosklerosis pada tiap kelompok perlakuan. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini:

Tabel 2 Perbandingan glomerulosklerosis pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Signifikasi
Normal vs DM	p=0,00*
Normal vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0,017*
Normal vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,108
DM vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0,010*
DM vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,001*
DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,344

Keterangan:

\*(*significant*): terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik

Hasil uji statistik memperlihatkan bahwa kelompok normal berbeda makna terhadap kelompok DM. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM memiliki skor glomerulosklerosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal.

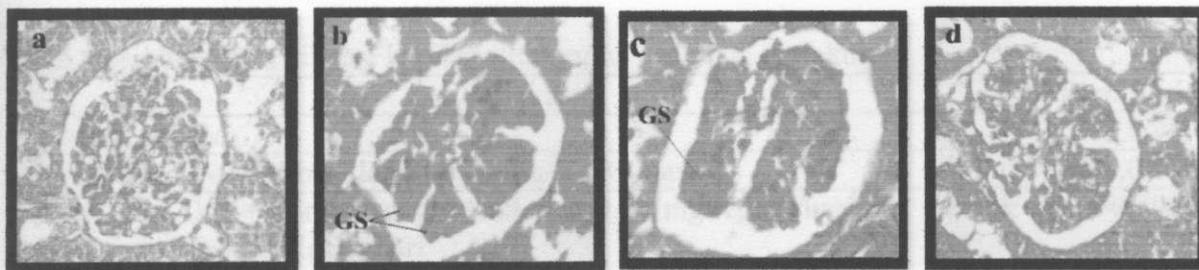
Perbedaan derajat glomerulosklerosis yang bermakna juga terdapat antara kelompok normal dengan kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari memiliki skor glomerulosklerosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal.

Perbedaan derajat glomerulosklerosis yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari mampu mencegah terjadinya glomerulosklerosis.

Perbedaan derajat glomerulosklerosis yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mencegah terjadinya glomerulosklerosis.

Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dibandingkan dengan kelompok DM yang diberikan kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari tidak terdapat perbedaan makna. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok diabetes yang glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok diabetes yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mencegah terjadinya glomerulosklerosis. Namun, antara kelompok perlakuan normal dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari tidak ditemukan adanya perbedaan skor glomerulosklerosis yang bermakna secara statistik. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mendekati normal. Gambaran histologis glomerulosklerosis berbagai perlakuan terlihat pada Gambar 1.

dan kelompok yang berbeda makna. Perbedaannya dilakukan uji Mann-Whitney untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan tersebut dengan kelompok normal. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1 Gambaran histologis glomerulosklerosis berbagai perlakuan. Perbesaran x 400. Pewarnaan PAS. Keterangan: GS (Glomerulosklerosis). (a) kelompok normal; (b) kelompok DM; (c) kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari; (d) kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

## 2. Dilatasi kapiler glomerulus

Pada penelitian ini didapatkan data gambaran histologis dilatasi kapiler glomerulus yang dipulas dengan *Periodic Acid Schiff* (PAS) seperti yang tercantum pada Tabel 3 berikut ini:

Tabel 3 Rata-rata gambaran histologis dilatasi kapiler glomerulus pada berbagai perlakuan

Nomor sampel	Dilatasi kapiler glomerulus			
	Perlakuan			
	I	II	III	IV
1	2,4	3,7	3,95	3,65
2	2,7	5,7	3,95	2,4
3	2,4	4,3	3,9	2,65
4	2,8	3,6	3,65	2,75
5	3,05	3,65	3,5	3,0
Total	13,35	20,95	18,95	14,45
Rata-rata	2,66±0,28	4,14±0,89	3,8±0,20	2,88±0,48

Keterangan:

I : Kelompok normal

II : Kelompok DM

III : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari

IV : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

Tabel 3 menunjukkan hasil kapiler glomerulus yang mengalami dilatasi dari yang terbesar sampai yang terkecil adalah kelompok diabetes, kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan kelompok diabetes yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hasil penelitian didapatkan sebaran data tidak normal ( $p < 0,05$ ) meskipun telah dilakukan transformasi data, akhirnya digunakan uji *Kruskal Wallis* yang memberikan hasil perhitungan nilai  $p = 0,005$  ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda makna. Selanjutnya, dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan dilatasi kapiler pada tiap kelompok. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Gambar 2 Gambaran histologis dilatasi kapiler glomerulus berbagai perlakuan. Perbesaran x 400. Pewarnaan PAS. Keterangan: N (Normal), CAP DIL (Dilatasi kapiler). (a) kelompok normal; (b)

Tabel 4 perbandingan dilatasi kapiler glomerulus pada tiap perlakuan

Perlakuan	Signifikasi
Normal vs DM	p=0,009*
Normal vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0.009*
Normal vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,597
DM vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0,674
DM vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,021*
DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,021*

Keterangan:

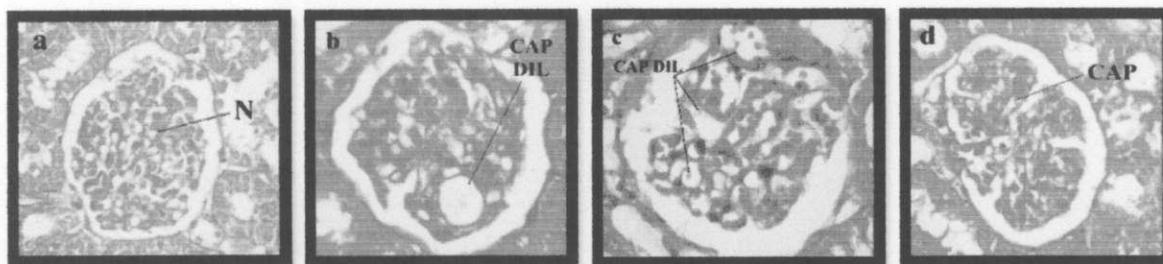
\*(*significant*): terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kelompok normal berbeda makna terhadap kelompok DM. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM terdapat kapiler glomerulus yang mengalami dilatasi dibandingkan kelompok normal. Perbedaan yang bermakna juga terdapat antara kelompok normal dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kapiler glomerulus yang mengalami dilatasi dibandingkan dengan kelompok normal.

Perbedaan yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mengurangi terjadinya dilatasi kapiler pada kapiler glomerulus.

Perbedaan yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mengurangi terjadinya dilatasi pada kapiler glomerulus.

Perbandingan antara kelompok normal dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari tidak ditemukannya perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mendekati normal. Gambaran histologis dilatasi kapiler glomerulus berbagai perlakuan terlihat pada Gambar 2



Gambar 2 Gambaran histologis dilatasi kapiler glomerulus berbagai perlakuan. Perbesaran x 400. Pewarnaan PAS. Keterangan: N (Normal), CAP DIL (Dilatasi kapiler). (a) kelompok normal; (b)

kelompok DM; (c) kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari; (d) kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari.

### 3. Ekspansi matrik mesangial

Pada penelitian ini didapatkan data gambaran histologis ekspansi matrik mesangial yang dipulas dengan *Periodic Acid Schiff* (PAS) seperti tercantum pada Tabel 5 berikut ini:

Tabel 5 Rata-rata gambaran histologis ekspansi matrik mesangial pada berbagai perlakuan

Nomor sampel	Ekspansi matrik mesangial			
	Perlakuan			
	I	II	III	IV
1	0,75	2,65	1,90	1,05
2	1	2,65	1,45	1,50
3	1,2	2,10	1,80	1,70
4	0,85	2,80	1,75	1,55
5	0,7	2,60	2,10	1,75
Total	4,5	12,8	9	7,55
Rata-rata	0,89±0,20	2,6±0,27	1,8±0,24	1,52±0,28

Keterangan:

- I : Kelompok normal
- II : Kelompok DM
- III : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari
- IV : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

Tabel 5 menunjukkan skor total ekspansi matrik mesangial dari yang terbesar sampai yang terkecil secara berturut-turut adalah kelompok DM, kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hasil penelitian didapatkan sebaran data normal dan uji varians sama. Pada uji Anova diperoleh nilai  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ) yang menunjukkan bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda makna. Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* untuk mengetahui lebih lanjut ekspansi matrik mesangial pada tiap kelompok. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 6 berikut ini:

Gambar 3 Gambaran histologis ekspansi matrik mesangial berbagai perlakuan. (a) kelompok normal; (b) kelompok DM; (c) kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari; (d)

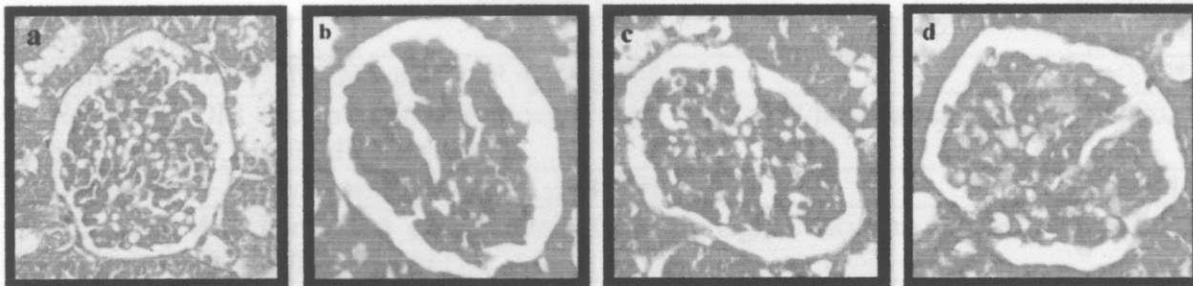
Tabel 6 Perbandingan ekspansi matrik mesangial pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Signifikasi
Normal vs DM	p=0,00*
Normal vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0,00*
Normal vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,001*
DM vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	p=0,00*
DM vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,00*
DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	p=0,083

Keterangan:

\* (*significant*): terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik

Hasil uji statistik memperlihatkan bahwa kelompok normal berbeda makna terhadap kelompok DM, kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM, kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari memiliki skor ekspansi matrik mesangial yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal. Perbedaan yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mengurangi terjadinya ekspansi matrik mesangial. Namun, antara kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari tidak ditemukan perbedaan skor ekspansi matrik mesangial yang bermakna secara statistik. Hal ini berarti bahwa secara statistik kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari belum mendekati normal. Gambaran histologis ekspansi matrik mesangial berbagai perlakuan terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Gambaran histologis ekspansi matrik mesangial berbagai perlakuan. (a) kelompok normal; (b) kelompok DM; (c) kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari; (d)

kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

#### 4. Mesangiolisis

Pada penelitian ini didapatkan data gambaran histologis mesangiolisis yang dipulas dengan *Periodic Acid Schiff* (PAS) seperti tercantum pada Tabel 7 berikut ini:

Tabel 7 Rata-rata gambaran histologis mesangiolisis pada berbagai perlakuan

Nomor Sampel	Mesangiolisis Perlakuan			
	I	II	III	IV
1	0	0,75	0,4	0,5
2	0,2	0,75	0,5	0,35
3	0,1	0,9	0,85	0,5
4	0,1	1	0,6	0,2
5	0,05	1	0,6	0,95
Total	0,45	4,40	2,95	2,5
Rata-rata	0,89±0,07	0,88±0,13	0,59±0,17	0,49±0,28

Keterangan:

I : Kelompok normal

II : Kelompok DM

III : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari

IV : Kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

Tabel 7 menunjukkan skor total sel mesangial yang mengalami lisis dari yang terbesar sampai yang terkecil secara berturut-turut adalah kelompok diabetes, kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan kelompok diabetes yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hasil penelitian didapatkan sebaran data normal dan uji varians sama. Pada uji Anova diperoleh nilai  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ) yang menunjukkan bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda makna. Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* untuk mengetahui lebih lanjut mesangiolisis pada tiap kelompok. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 8 berikut ini:

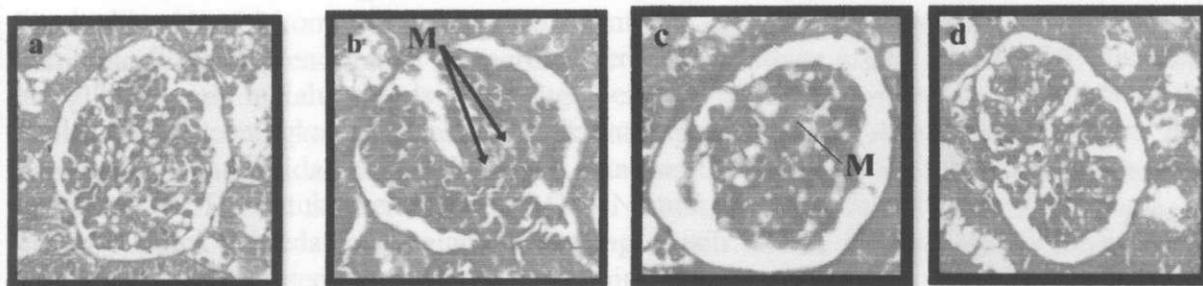
Tabel 8 Perbandingan mesangiolisis pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Signifikasi
Normal vs DM	$p=0,00^*$
Normal vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	$p=0,00^*$
Normal vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	$p=0,002^*$
DM vs DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari	$p=0,021^*$
DM vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	$p=0,004^*$
DM + glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari vs DM + kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari	$p=0,438$

Keterangan:

\* (*significant*): terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik

Hasil uji statistik memperlihatkan bahwa kelompok normal berbeda makna terhadap kelompok DM, kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM, kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari kombinasi minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari memiliki skor mesangiolisis yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal. Perbedaan yang bermakna juga terdapat antara kelompok DM dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari mampu mengurangi terjadinya mesangiolisis. Namun, antara kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dengan kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari tidak ditemukan perbedaan skor mesangiolisis yang bermakna secara statistik. Hal ini berarti bahwa secara statistik kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari maupun kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari belum mendekati normal. Gambaran histologis mesangiolisis berbagai perlakuan terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4 Gambaran histologi mesangiolisis berbagai perlakuan. Perbesaran x 400. Pewarnaan PAS. Keterangan: M (Mesangiolisis). (a) kelompok normal; (b) kelompok DM; (c) kelompok DM yang diberi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari; (d) kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid 0,09 mg/KgBB/hari dan minyak buah merah 0,3 ml/KgBB/hari

## PEMBAHASAN

### 1. Pengaruh pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam) terhadap gambaran histologis glomerulus ginjal tikus DM

Pemberian *streptozotocin* (STZ) akan menginduksi terjadinya diabetes melitus pada tikus. Hal ini terjadi karena alkilasi DNA pada sel  $\beta$  pankreas akibat masuknya STZ ke dalam sel melalui protein transport GLUT2. *Streptozotocin* akan memicu terbentuknya radikal superoksida, sehingga DNA akan rusak. Sel akan mati melalui proses nekrosis dan produksi insulin pun berkurang.<sup>19</sup>

Hiperglikemia kronik pada DM menyebabkan peningkatan radikal bebas khususnya *reactive oxygen spesies* (ROS).<sup>3,4</sup> Peningkatan ROS yang berlebihan akan dinetralkan oleh antioksidan yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen.<sup>20</sup> Minyak buah merah (*P.conoideus* Lam) diketahui mempunyai kandungan zat-zat gizi dan senyawa antioksidan yang

sangat tinggi. Senyawa tersebut diantaranya  $\beta$ -karoten, tokofrol, asam lemak seperti asam olcat, asam linoleat dan asam dekanat.<sup>14</sup>

Produksi radikal bebas juga dapat diturunkan dengan cara menurunkan kadar glukosa darah. Glibenklamid merupakan salah satu obat golongan sulfonilurea generasi kedua yang memiliki efek menurunkan kadar glukosa darah. Sulfonilurea berikatan dengan subunit *sulfonilurea receptor-1* (SUR1) pada sel  $\beta$ -pankreas yang akan menstimulasi pelepasan insulin dari vesikel-vesikel sel  $\beta$ -pankreas. Efek hipoglikemia pada glibenklamid membantu mengendalikan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi *streptozotocin*, sehingga efek hiperglikemia kronik pada berbagai organ salah satunya ginjal dapat berkurang.<sup>21,22</sup>

Pada penelitian ini didapatkan bahwa pemberian glibenklamid pada tikus DM terbukti dapat mencegah terjadinya glomerulosklerosis. Hal ini diduga karena pada keadaan DM terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang menyebabkan terbentuknya *reactive oxygen species*.<sup>23</sup> Produksi ROS yang berlebihan akan menstimulasi pelepasan sitokin proinflamasi seperti angiotensin II yang akan mensintesis TGF- $\beta$ , kolagen tipe IV dan fibronektin yang berkontribusi untuk terjadinya progresivitas glomerulosklerosis.<sup>24,25</sup> Efek hipoglikemia dari glibenklamid diketahui berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah sehingga menghambat terjadinya proses stres oksidatif di atas dan menghambat terjadinya progresivitas glomerulosklerosis. Hal ini berbeda dengan kelompok DM yang tidak diberikan perlakuan yang menunjukkan terjadinya progresivitas dari glomerulosklerosis.

Hampir serupa dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid, kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah juga diketahui dapat mencegah terjadinya glomerulosklerosis. Pencegahan glomerulosklerosis ini diduga selain karena efek hipoglikemia dari glibenklamid melalui proses di atas juga berperan efek dari pemberian minyak buah merah. Ketika terjadi peningkatan kadar ROS akibat hiperglikemia, tubuh akan merespon dengan memproduksi antioksidan enzimatis seperti catalase (CAT), hidroperoksidase (HPx), superoksida dismutase (SOD) untuk menetralkan ROS. Namun, masih ada sebagian ROS yang masih tersisa.<sup>26</sup> Untuk meredakan sebagian ROS yang masih tersisa tersebut, perlu dibantu dengan antioksidan eksogen seperti vitamin C, vitamin E, asam urat dan polifenol (flavonoid) untuk meminimalisir efek ROS tersebut.<sup>26</sup> Berdasarkan penelitian Koya *et al*, didapatkan bahwa pemberian vitamin E sebagai antioksidan dapat menormalkan ROS pada glomerulus tikus diabetes.<sup>27</sup> Vitamin E merupakan antioksidan salah satu antioksidan utama yang terkandung di dalam minyak buah merah.<sup>28</sup>

Hal ini membuktikan bahwa pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah dapat mencegah progresivitas glomerulosklerosis pada tikus DM karena tidak ditemukan adanya perbedaan skor glomerulosklerosis yang bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kelompok normal. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid dan minyak buah merah mendekati normal.

Pada penelitian ini juga didapatkan bahwa pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah pada tikus DM dapat mengurangi terjadinya dilatasi kapiler. Hal ini diduga karena peningkatan kadar glukosa darah pada DM menyebabkan terjadinya glikosilasi protein dan fosfolipid sehingga meningkatkan stres oksidatif intra seluler. Produk reaktif non enzimatis atau yang dikenal dengan Maillard dan produk Amadori akan membentuk produk yang lebih stabil dan irreversible yaitu *advance glycation end product* (AGEs). *Advance glycation end product* akan menghasilkan ROS yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kerusakan pembuluh darah. Molekul ROS terdiri dari anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ), asam hipoklorit ( $HOCl$ ), NO dan peroksinitrit ( $ONOO^\cdot$ ).<sup>29,30</sup>

Ketidakseimbangan antara peningkatan produksi anion  $O_2^-$  dan NO pada keadaan hiperglikemia menyebabkan pembentukan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) didalam dinding pembuluh darah. Peroksinitrit ini dapat mengoksidasi kofaktor NOS sehingga  $BH_4$  menurun dan menyebabkan *uncoupling phenomena* yang menghasilkan  $O_2^-$  lebih banyak lagi. Akibat banyaknya  $O_2^-$  yang terbentuk menyebabkan ketidakmampuan enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD) untuk mengubah  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  dan enzim glutation peroxidase (GPx) dalam mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ .<sup>29,30</sup> Berdasarkan penelitian Craven *et al* didapatkan bahwa pengobatan pada tikus diabetes dengan  $\alpha$ -tokoferol dapat mencegah peningkatan aktifitas PKC dalam memproduksi TGF- $\beta$  sehingga peningkatan produksi NO pada awal diabetes dapat dicegah.<sup>27,28</sup> Alpha tokoferol merupakan salah satu kandungan dari minyak buah merah.

Hal ini membuktikan bahwa pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah dapat menurunkan dilatasi kapiler glomerulus pada tikus DM karena tidak ditemukan adanya perbedaan ukuran kapiler glomerulus yang bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kelompok normal. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi kombinasi glibenklamid dan minyak buah merah mendekati normal.

Pada penelitian ini juga didapatkan bahwa pemberian glibenklamid pada kelompok DM memiliki perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok DM dalam mengurangi terjadinya ekspansi matrik mesangial. Perbedaan yang bermakna juga terlihat pada kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah bila dibandingkan dengan kelompok DM. Hal ini menunjukkan kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah juga mampu mengurangi terjadinya ekspansi matrik mesangial.

Hal ini diduga karena pada keadaan DM terjadi peningkatan glukosa ekstraseluler yang dapat menginduksi peningkatan ekspresi dari GLUT 1 dalam memasukkan glukosa ke sel. Peningkatan dari fluk glukosa tersebut akan mengaktifkan sejumlah jalur metabolisme yang berakibat meningkatnya *advanced glycation end product* (AGEs). Efek hipoglikemia yang terdapat pada glibenklamid terbukti dapat menghambat proses tersebut sehingga stres oksidatif dapat dicegah. Selain itu efek hipoglikemia dari glibenklamid juga terbukti dapat menghambat stimulasi ekspresi TGF- $\beta$  pada sel mesangial dalam menyebabkan terjadinya akumulasi matriks mesangial.<sup>26-35</sup>

Kandungan vitamin E yang terdapat pada minyak buah merah terbukti dapat mencegah peningkatan produksi AGEs yang dapat mengaktifkan sinyal peningkatan produksi ekstraseluler matrik mesangial.<sup>26,31</sup> Namun, pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok DM yang diberi glibenklamid dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara pemberian glibenklamid maupun pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah pada kelompok DM dalam mengurangi terjadinya ekspansi matrik mesangial secara statistik. Akan tetapi, secara histologis pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah terbukti dapat mengurangi terjadinya ekspansi matrik mesangial pada kelompok DM dibandingkan dengan kelompok DM yang diberi glibenklamid.

Pada penelitian ini juga didapatkan bahwa pemberian glibenklamid pada kelompok DM memiliki perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok DM dalam mengurangi terjadinya mesangiolisis. Perbedaan yang bermakna juga terlihat pada kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah bila dibandingkan dengan kelompok DM. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah juga mampu mengurangi terjadinya mesangiolisis. Namun, pada penelitian ini juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok DM yang diberi glibenklamid dibandingkan dengan

kelompok DM yang diberi glibenklamid kombinasi minyak buah merah. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara pemberian glibenklamid maupun pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah pada kelompok DM dalam mengurangi terjadinya mesangiolisis secara statistik. Akan tetapi, secara histologis pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah terbukti dapat mengurangi terjadinya mesangiolisis pada kelompok DM yang dinilai dari rata-rata skor mesangiolisisnya yang mendekati normal. Proses pencegahan terjadinya mesangiolisis pada kelompok DM tersebut diduga karena efek hipoglikemia pada glibenklamid yang akan menghambat ekspresi yang berlebihan dari *vascular endothelial growth factor* (Vegf)-164 yang menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis nodular dan mesangiolisis.<sup>36</sup>

## KESIMPULAN

Pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah menunjukkan terjadinya penurunan secara histologis dilatasi kapiler glomerulus, rata-rata skor glomerulosklerosis, ekspansi matrik mesangial dan mesangiolisis.

## SARAN

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap tikus yang nefropati diabetes. Selain itu juga diperlukan penelitian lebih lanjut dalam waktu yang lebih lama dan kadar glukosa yang lebih tinggi, sehingga dapat diamati pengaruh pemberian glibenklamid kombinasi minyak buah merah dalam mencegah kerusakan progresivitas korpuskulum malphigi renalis pada tikus DM. Serta diperlukan penelitian histologi lebih lanjut pada ginjal yang lebih spesifik dengan menggunakan mikroskop elektron.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Riau yang telah memberikan pendanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ahmed RG. The physiological and biochemical Effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 2005; 15(1): p1-12.
2. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO consultation. Geneva: WHO. 1999.
3. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl lek listy*. 2000; 101 (10): p541-51.
4. George L, King GL, Mary R, Loeken. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: p333-8.
5. Moussa SA. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian j Biophys* 2008; 18(3): p225-36.
6. Wagener, Dekker D, Berden JH, Scharstuh A, Van der Vlag J. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis*. 2009; 14; p1451-8.
7. Makino H, Mukoyama M, Nakao K, et al. Roles of connective tissue growth factor and prostanooids in early streptozotocin-induced diabetic rat kidney: the effect of aspirin treatment. *Clinical And Experimental Nephrology*. 2003; 7(1): p1-7.
8. Tesch GH, Allen TJ. Methods in the renal research: rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2007; 12: p261-66.

9. Xu HY, Sun JE, Lu ZM, Zhang XM, Dou WF, Xu ZH. Beneficial effects of the ethanol extract from the dry matter of a culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on the antioxidant defence system and regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells in experimental diabetes in mice. *Natural Product Research*. 2010 April 10; 24(6): p542-53.
10. Elmal'i E, Altan N, Bukan N. Effect of the Sulphonylurea Glibenclamide on Liver and Kidney Antioxidant Enzymes in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. *Drugs R D* 2004; 5 (4): p203-8.
11. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MS, Gurtu S. Effect of Glibenclamide alone versus Glibenclamide and Honey on Oxidative Stress in Pancreas of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2011; 4 (2): p1-10.
12. Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary Glutathione Protects Rats from Diabetic Nephropathy and Neuropathy. *American Society for Nutritional Sciences*. 2002: p897-900.
13. Wijaya H, Pohan HG. Kajian teknis standar minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam). *Prosiding PPI Standardisasi*; 2009 Nov 19; Jakarta: 2009.
14. Winarto. The effect of *Pandanus conoideus* L on  $\beta$ -cells Pancreas and Glibenclamide Hypoglycemic effect on diabetic rat. *BIK*. 2009 Vol. 41, No.1, Maret 2009 : 11-19.
15. Soon YY, Tan BKH. Evaluation of the Hypoglycemic and Anti-Oxidant Activities of *Morinda officinalis* in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Singapore Med J* 2002; 43(2): 077-085.
16. Appelhoff RJ, Hill JV, Findon G, Frampton CM, Perry E, Ponnampereuma D, Endre Z.H. Differential contribution of diabetes and the Ren2 gene to glomerular pathology in diabetic (mREN-2)27 rats. *Laboratory Investigation*. August 2010; 90: p1225-35.
17. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Thompson MC, et al. Diabetic Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice Develop Advanced Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*.2007;18:p539-50.
18. Sugiyono. *Statistika untuk Penelitian*. Bandung: PT. Alfa Beta; 2009.
19. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*. 2001;50:p536-46.
20. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*.2009;16:449-57.
21. Bruton LL, Parker Kl. *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutic*. Ed. 11<sup>th</sup>. New York: McGraw-Hill; 2007.
22. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral Antidiabetic Agents Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*: 2005; 65 (3): p385-441.
23. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: p813-20.
24. Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar A, Thomazelli F, Matos J, Canani L. Diabetic Nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2009;1(10):p1-17.
25. Qian Y., Feldman E., Pennathur S., Kretzler M., Brosius FC. Mechanisms of Glomerulosclerosis in Diabetic Nephropathy. *American Diabetes Association*. 2008;57:p1439-45.
26. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition Nutrition. 2002;18:p872- 79.

27. Widayati E. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. [laman di internet]. [diakses 17 oktober 2012]. Tersedia dalam <http://wwwjournal.unissula.ac.id/majalahilmiahsultanagung/article/.../174/13>.
28. Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of Antioxidants in Diabetes-Induced Oxidative Stress in the Glomeruli of Diabetic Rats. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14: S250-53.
29. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease. *Circ Journal*. 2009;73:p411-8
30. Esper RJ, Nordaby RA, Vilari.o JO, Pragano A, Cacharr.n JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular diabetology*.2006;5:p1-8.
31. Sego S. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Nephrology Nursing Journal*. 2007:1
32. Craven PA, Derubertis FR, Kagan FE, Melhem M, Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-  $\beta$ , and glomerular size in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1997:1405-14.
33. Smith AC, Hendry BM. The Regulation of Mesangial Cell Proliferation. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;108:e74-9.
34. Abrass C. Diabetic Nephropathy Mechanisms of Mesangial Matrix Expansion. *WJM*. April 1995.4(162).p318-321.
35. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor  $\beta$  contributes to progressive diabetic nephropathy. *PNAS*. 2000;97(14):7667-9.
36. Veron D, Bertuccio CA, Marlier A, Reidy K, Garcia AM, Jimenez J *et al*. Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf164) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*.2011;54:p1227-41.