

## Laporan Hasil Penelitian

**PENGARUH INSULIN, JAHE DAN KOMBINASI KEDUANYA TERHADAP JUMLAH SEL TROFOBLAS *RATTUS NORVEGICUS* MODEL DIABETES PRAGESTASIONAL****Alif Zahrotin<sup>1)</sup>, Hermanto TJ<sup>2)</sup>, Widjiati<sup>3)</sup>**

- 1) Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi jenjang Magister Universitas Airlangga Surabaya
- 2) Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi jenjang Magister Universitas Airlangga Surabaya
- 3) Departemen Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

***Submitted : Agustus 2017 / Accepted : November 2017 / Published : Januari 2018*****ABSTRAK**

*Diabetes mellitus* (DM) merupakan suatu penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang berefek meningkatkan morbiditas dan mortalitas perempuan saat hamil. Salah satu komplikasi DM pragestasional adalah preeklampsia (PE). Angka kematian perinatal meningkat 20x pada perempuan yang menderita DM pragestasional disertai komplikasi PE. Paparan hiperglikemia menyebabkan peningkatan stress oksidatif yang meningkatkan apoptosis sel trofoblas sehingga terjadi penurunan proliferasi dan jumlah sel trofoblas serta memicu terjadinya disfungsi endotel dan kondisi hipoksia. Tujuan penelitian ini adalah membedakan pengaruh pemberian insulin dan ekstrak *jahe* terhadap jumlah sel trofoblas *R. norvegicus*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Populasi yang digunakan adalah *R. norvegicus* hamil. Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling* dengan variabel independen insulin dan ekstrak *jahe* serta variabel dependen adalah jumlah sel trofoblas. Analisis data jumlah sel trofoblas menggunakan *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan signifikan jumlah sel trofoblas dengan  $p \text{ value} < 0,05$  ( $p=0,001$ ) pada kontrol positif dengan kelompok insulin. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak *jahe* dapat dijadikan terapi tunggal atau kombinasi dengan insulin untuk DM pragestasional.

**Kata kunci** : *diabetes mellitus pragestasional, insulin, jahe, jumlah sel trofoblas***Alamat koresponden** : alifzahro@gmail.com**ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease with characteristics of hyperglycemia that has an effect on increasing morbidity and mortality in the mother. One of the complications of pregestational DM (pGDM) is preeclampsia (PE). The perinatal mortality rate increases 20x in pGDM women with PE complication. Exposure to hyperglycemia causes an increase in oxidative stress that increases apoptosis of trophoblast cells which in turn causes the decrease of proliferation and the number of trophoblastic cell and leads to endothelial dysfunction and

hypoxia. The purpose of this study was to distinguish the effect of insulin administration and ginger extract on the number of trophoblast cells of *R. norvegicus*.

This research was an experimental research using post-test only control group design. The population used were pregnant *R. norvegicus*. The sampling technique was simple random sampling with independent variables are insulin and *Z. officinale* extract and dependent variable is the number of trophoblast cells. Data analysis of the number of trophoblast cells used were Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test.

The result showed that there was a significant difference on the trophoblast cell number with  $p$  value  $<0,05$  ( $p = 0,001$ ) on positive control with insulin treatment group. The conclusion of this study was the presence of ginger extract can be used as a single therapy or combination with insulin for pregestational diabetes.

**Keywords** : pregestational diabetes, insulin, ginger, trophoblast cell number

**Correspondence:** alifzahro@gmail.com

---

## PENDAHULUAN

*Diabetes mellitus* (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Prevalensi global DM diperkirakan akan mencapai 380 juta pada tahun 2025 (CDC, 2012).

Dampak terbesar pada kondisi DM selama kehamilan ini yaitu meningkatnya morbiditas dan mortalitas baik pada ibu maupun janin. Salah satu faktor resiko maternal adanya diabetes pragestasional adalah terjadinya hipertensi yang selanjutnya menjadi preeklampsia (Cunningham *et al.*, 2014). Cohen *et al.*, 2014 menyebutkan Angka kematian perinatal meningkat 20 kali lipat pada perempuan dengan DMpG dengan komplikasi preeklampsia berkaitan dengan hiperglikemia. Paparan kondisi hiperglikemia terlalu lama diketahui dapat menyebabkan peningkatan stress oksidatif yang akan berpengaruh pada peningkatan apoptosis sel trofoblas (Uddin *et al.*, 2013) sehingga proliferasi menurun dan jumlah

sel trofoblas menurun serta memicu terjadinya disfungsi endotel dan kondisi hipoksia (Bhatt *et al.*, 2016).

Penggunaan injeksi insulin merupakan terapi yang diberikan pada ibu hamil dengan DM, namun masyarakat juga menggunakan tanaman sebagai terapi. WHO memperkirakan 80% dari penduduk di dunia, menggunakan tanaman obat untuk kesehatan termasuk pada DM (Sen *et al.*, 2016). Penelitian pemanfaatan herbal untuk mengobati diabetes salah satunya adalah menggunakan jahe. Jahe tidak menimbulkan toksisitas pada janin dan aman bagi ibu. Penggunaan jahe pada ibu hamil hingga 1000mg/kg/BB/hari bersifat aman. Jahe telah dibuktikan sebagai agen antidiabetes dan membantu dalam mengurangi kondisi hiperglikemia (Li *et al.*, 2012). Jahe merupakan bahan yang bersifat antidiabetik, antiinflamasi serta antioksidan. Senyawa aktif pada jahe yaitu (6)-gingerol dapat meningkatkan kadar insulin dan menurunkan kadar glukosa puasa (Ojewole, 2006).

## METODE PENELITIAN

### Bahan

#### Kimia

Streptozotocin (STZ) produk Sigma-Aldrich chemical Co., St. Louis. Mo, USA dalam bentuk bubuk kering (1 gr) disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan dilarutkan dalam dapar sitrat 0,05 M dengan pH 4,5.

#### Ekstrak Jahe

Serbuk jahe kering diekstraksi dengan teknik maserasi bertingkat pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

#### Hewan Penelitian

Sampel pada penelitian ini berjumlah 30 ekor *Rattus norvegicus* dengan BB 150-200 yang dibagi menjadi 5 kelompok:

- K0 adalah kelompok kontrol negatif yang mendapat aquadest 1 cc sebagai plasebo
- K1 adalah kontrol positif (tikus DMpG), yang mendapat aquadest 1 cc
- K2 adalah kelompok tikus DMpG yang diberi insulin
- K3 adalah kelompok tikus DMpG yang diberi ekstrak jahe
- K4 adalah kelompok tikus DMpG yang diberi insulin dan ekstrak jahe

### Metode Penelitian

#### Persiapan hewan coba

Tikus yang menjadi sampel diadaptasikan selama 1 minggu di tempat penelitian dengan pemberian makan dan minum secara teratur dan memperhatikan kebersihan kandang.

#### Pembuatan model DMpG

Tikus K1-K4 setelah adaptasi dilakukan pengukuran kadar gula darah dengan *glucometer* untuk memastikan kadar gula darah normal, pembuatan model DM tipe 1

dengan injeksi *streptozotocin* (STZ). Tikus diinjeksi dengan STZ dengan dosis 50mg/kgBB intraperitoneal, dan diperiksa gula darahnya setelah 48 jam pemberian STZ. Tikus dikatakan telah mengalami diabetes bila kadar glukosa darah acak  $>220\text{mg/dL}$ . Tikus yang dikatakan hiperglikemia selanjutnya dilakukan injeksi hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dengan dosis 10 IU untuk sinkronisasi birahi dan HCG yang diberikan 10 IU 48 jam setelahnya dan dikawinkan dengan tikus jantan, 17 jam berikutnya dilakukan pemeriksaan vaginal plug, tikus positif vaginal plug dikatakan tikus DMpG bunting hari ke-0.

#### Pemberian terapi hewan model

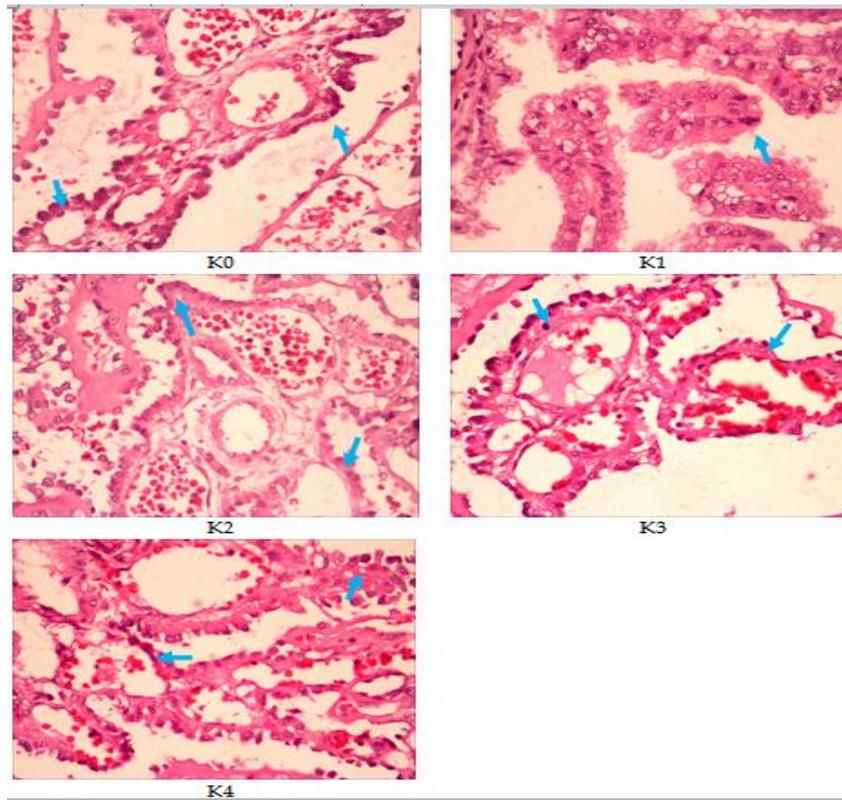
Perlakuan diberikan hari ke 0-16 kehamilan. K0 dan K1 mendapat aquadest 1 cc sebagai plasebo. K2 adalah tikus DMpG yang mendapatkan insulin 1 IU/IM. K3 adalah tikus DMpG yang mendapatkan ekstrak jahe 500mg/kgBB melalui sonde lambung. K4 adalah tikus DMpG yang mendapatkan insulin 1 IU/IM dan 4 jam kemudian diberikan ekstrak jahe 500mg/kgBB. Pada hari ke-17 tikus dianastesi kemudian dibedah untuk diambil serum dan plasentanya untuk diperiksa.

#### Pemeriksaan

Perhitungan jumlah sel trofoblas menggunakan Mikroskop Olympus CX-21 dengan kamera mikroskop *OptiLab Viewer* 12.5MP pada 5x lapang pandang dengan pewarnaan *Hematoksin-eosin* dengan perbesaran 400x.

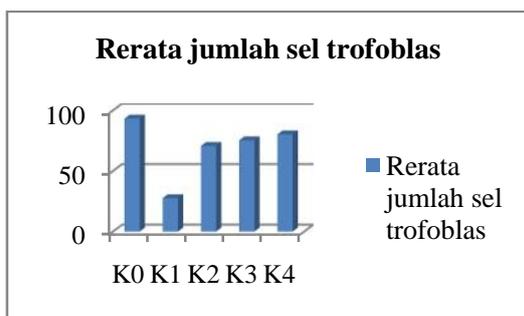
#### Analisis Data

Analisis data deskriptif menggunakan rerata dan SD, jumlah sel trofoblas menggunakan uji *kruskal-wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.  $p>0,05 \rightarrow$  tidak signifikan,  $p \leq 0,05 \rightarrow$  signifikan



**Gambar 1.** K0:Tampak sel trofoblas normal (panah biru),K1:Tampak jumlah sel sito trofoblas mengalami penurunan karena banyak ditemukan sel trofoblas yang mengalami degenerasi dan nekrotik. K2,K3,K4: tampak adanya perbaikan jumlah sel trofoblas

### HASIL PENELITIAN



**Grafik1.** Perbedaan rerata jumlah sel trofoblas

Hasil uji statistika jumlah sel trofoblas menggunakan uji Mann-Whitney ada perbedaan signifikan jumlah sel trofoblas pada kontrol positif dengan kelompok perlakuan insulin ( $p=0,001$ ).

### PEMBAHASAN

Hasil perhitungan statistika jumlah sel trofoblas menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan insulin. Hal ini menunjukkan bahwa dosis insulin 1 IU mampu meningkatkan jumlah sel trofoblas pada *Rattus norvegicus* yang mengalami hiperglikemia. Hiperglikemia yang terjadi pada penelitian ini karena defisiensi insulin sebagai akibat kerusakan sel beta ( $\beta$ ) pankreas oleh adanya induksi STZ yang diberikan. Adanya kerusakan sel $\beta$  membuat hiperglikemia menguat sehingga menyebabkan perkembangan diabetes. *American Diabetes Assosiation* mendefinisikan kontrol glukosa yang

optimal dengan menggunakan insulin eksogen (ADA, 2010).

*The American College of Obstetricians and Gynecologist* tidak menganjurkan pemberian obat antidiabetes oral pada DMpG dan DMG karena dapat melewati plasenta dan dapat merangsang pankreas janin. Rekomendasi dari *American College of Obstetricians dan Gynecologists* menunjukkan bahwa terapi farmakologis yang dapat diberikan pada DMpG adalah terapi insulin (Cunningham, *et al.*, 2014). Mekanisme yang tepat efek menguntungkan pengobatan insulin yang dilaporkan dalam beberapa penelitian belum sepenuhnya dipahami, namun beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pengobatan insulin dikaitkan dengan hasil yang lebih baik dalam hal kontrol metabolik, sekresi insulin, dan respons autoimun terhadap sel pankreas (Cerf, 2013).

Insulin adalah hormon peptida yang penting untuk mengatur tingkat glukosa intrasel dan plasma dalam berbagai jaringan, seperti jaringan adiposa, otot rangka, atau hati. Hormon ini menginduksi berbagai respons seluler, seperti pengambilan glukosa melalui GLUT4 (pada jaringan perifer tapi tidak pada plasenta), dan sintesis glikogen, protein, dan lipida; Hal ini juga dapat menurunkan lipolisis pada jaringan adiposa. Meskipun insulin tidak dapat melewati plasenta atau mengaktifkan pembawa glukosa plasenta GLUT-1, ia dapat mengikat reseptor spesifiknya (IR) yang ada di membran trofoblas, yang mengaktifkan jalur pensinyalan hormon ini, sehingga berkontribusi pada metabolisme plasenta (Palacios *et al.*, 2017).

Penelitian terbaru menunjukkan sensitivitas plasenta terhadap insulin ibu selama kehamilan masih kontroversial. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa plasenta

paling peka terhadap insulin ibu pada awal kehamilan, sementara pada akhir trimester ketiga, sensitivitasnya hilang, mungkin karena adanya perubahan pada distribusi reseptor antara kompartemen ibu dan janin. Pada trimester pertama kehamilan, IR lebih banyak terjadi di sinsitiotrofoblas, sementara mereka terutama ditemukan di sel endotel janin pada akhir kehamilan. Meskipun demikian, insulin ibu juga dapat mempengaruhi fungsi plasenta pada akhir kehamilan. Beberapa penelitian melaporkan ekspresi IR yang tinggi pada membran mikrovilik (MVM) dari sinsitiotrofoblas pada waktu akhir kehamilan, menunjukkan bahwa insulin ibu mempengaruhi fungsi trofoblastik secara *in vivo* pada akhir kehamilan (Palacios *et al.*, 2017).

Terapi insulin dapat memperbaiki kondisi sel trofoblas dengan meningkatkan jumlah sel trofoblas karena adanya penurunan keadaan hiperglikemia ini. Kontrol glukosa menjadi lebih baik sehingga fungsi sel trofoblas juga membaik karena stress oksidatif yang menurun, yang pada akhirnya berpengaruh pada jumlah sel trofoblas. Studi *in vitro* pada sel trofoblas menunjukkan bahwa hiperglikemia menurunkan tingkat proliferasi sel (Weiss *et al.*, 2001). Dengan demikian pada kondisi hiperglikemik, angiogenesis menurun sebagai konsekuensi dari rendahnya proliferasi sel dan meningkatnya tingkat apoptosis pada sel endotel (Larger *et al.*, 2004). Menurut Varma *et al.* (2005), hiperglikemia mengurangi jumlah sel dengan mempengaruhi proliferasi sel pada apoptosis (Zorn *et al.*, 2011).

Perhitungan statistika juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan yang diberikan insulin dengan kelompok perlakuan yang diberikan jahe pada jumlah sel trofoblas. Hal ini berarti bahwa penggunaan jahe 500 mg/kgBB bila

dibandingkan dengan pemberian insulin lebih meningkatkan jumlah sel trofoblas dan menunjukkan perbaikan sel pada gambaran histopatologi sel trofoblas.

Studi sebelumnya melaporkan adanya penurunan glukosa darah secara signifikan dari pemberian jus jahe pada kelompok diabetes dan non-diabetes. Aktivitas antidiabetes jus segar dari *Z. officinale* berkorelasi melalui 5-HT antagonisme yang merupakan reseptor kimia 6-gingerol dan zat penanda biologis yang ada di *Z. Officinale*. Hasil temuan menunjukkan aktivitas antagonis 5-HT saat ini untuk efek metanol dan fraksinya pada tikus NIDDM yang diinduksi oleh STZ dan berkorelasi dengan konsentrasi 6-gingerol yang ada di dalamnya. Studi menunjukkan komponen utama 6-gingerol menyebabkan hipoglikemi saat diberikan pada tikus diabetes.

Jahe selain sebagai agen antidiabetik dan bersifat insulinotropik, juga merupakan agen antioksidan yang baik. Studi tentang jahe yang bersifat antioksidan yaitu penelitian pada tikus yang diinduksi STZ membuat antioksidan menjadi menurun, kemudian diberikan diet jahe dan didapatkan bahwa kadar antioksidan meningkat secara signifikan (Akash *et al.*, 2015). Keadaan hiperglikemia yang memicu adanya ROS yang meningkat dapat dikendalikan dengan antioksidan ini sehingga berpengaruh pada jumlah sel trofoblas sel.

Ada penelitian lain yang menggambarkan aktivitas anti-angiogenik secara *in vitro* dan *in vivo*. Secara *in vitro*, 6-gingerol menghambat proliferasi sel-sel endothelial VEGF dan bFGF dan menyebabkan aktivitas sel pada siklus sel berhenti pada fase G<sub>1</sub>. Selama G<sub>1</sub>, sel secara metabolik aktif dan terus tumbuh namun tidak meniru DNA-nya. Sel yang berada pada fase

G<sub>1</sub> terlalu lama, dikatakan berada pada fase G<sub>0</sub> atau “*quiescent*”. Pada fase ini, sel tetap menjalankan fungsi metabolisnya dengan aktif, tetapi tidak lagi melakukan proliferasi secara aktif. Sebuah sel yang berada pada fase G<sub>0</sub> dapat memasuki siklus sel kembali, atau tetap pada fase tersebut hingga terjadi apoptosis (Shibuya, 2012).

Hasil perhitungan statistika juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan yang diberikan insulin dengan kelompok perlakuan yang diberikan insulin dan jahe pada jumlah sel trofoblas. Hal ini berarti bahwa penggunaan kombinasi insulin 1 IU dan jahe 500 mg/kgBB lebih meningkatkan jumlah sel trofoblas dan menunjukkan perbaikan sel pada penampakan histopatologi sel trofoblas dibandingkan dengan yang mendapatkan hanya insulin atau hanya jahe saja. Kombinasi keduanya mampu memperbaiki sel yang rusak dan meningkatkan jumlah sel trofoblas.

Jumlah sel trofoblas yang meningkat memang lebih baik bila dibandingkan dengan yang terjadi penurunan jumlah sel trofoblas. Jumlah sel yang semakin meningkat juga bukan selalu menjadi tanda bahwa sel itu sehat, bila peningkatan jumlah sel yang terus menerus akan menjadi suatu tanda keganasan. Namun bila dibandingkan dengan kontrol negatif perbaikan sel dan peningkatan jumlah sel trofoblas tidak melebihi kontrol negatif maka penggunaan insulin dan jahe dikatakan bersifat aman. Efek insulin dan jahe yang menurunkan glukosa darah menjadi penentu perbaikan keadaan plasenta sehingga oksigenasi plasenta menjadi lebih baik dan menyebabkan menurunnya stress oksidatif sehingga sel juga menunjukkan perbaikan.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan jumlah sel trofoblas antara yang diberi ekstrak jahe dengan yang diberi insulin pada *Rattus norvegicus* model DMpG. Ekstrak jahe juga dapat dijadikan terapi tunggal atau kombinasi dengan insulin untuk DM pragestasional.

## REFERENSI

- ADA (American Diabetes Association), (2010). 'Diagnosis and classification of Diabetes mellitus'. *J of Diabetes*, vol.33
- Akash, MSH., Rehman, K., Tariq, M., Chen, S., (2015). 'Zingiber officinale and type 2 diabetes mellitus:evidence from experimental study'. *Research gate*: [https://www.researchgate.net/publication/273507313\\_Zingiber\\_officinale\\_and\\_Type\\_2\\_Diabetes\\_Mellitus\\_Evidence\\_from\\_Experimental\\_Studies](https://www.researchgate.net/publication/273507313_Zingiber_officinale_and_Type_2_Diabetes_Mellitus_Evidence_from_Experimental_Studies) [diakses:1 Februari 2017]
- Al-Amin, ZM., Thomson, M., Khaled, Shalaby RP., Ali, M., (2006). 'Antidiabetic and hypolipidemic properties of ginger (zingiber officinale) in streptozotocin-induced diabetic rats', *British J of Nutrition*, vol.96, pp.660-6
- Bhatt, N., Mostafa, W., Essa, MM., Ali, A., (2016). 'Ginger:A functional herb'. *Reasearh gate*
- CDC. (2012), 'Diabetes cost-effectiveness group cost-effectiveness of intensive glycemic control, intensified hypertension control, and serum cholesterol level reduction for type 2 diabetes', *JAMA*, vol.287(19), pp.2542-51
- Cerf, ME., (2013). 'Beta cell dysfunction and insulin resistance'. *Frontiers in endicronology*
- Cohen, AL., Wenger, JB., Todd, TJ., Lamparello, BM., *et al*, (2014)., 'The association of circulating angiogenic factors and HbA1c with the risk of preeclampsia in women with pre-existing diabetes'., *Informa healthcare USA, hypertensive pregnancy*, vol.33(1), pp.81-92
- Cunningham, FG., Leveno, KJ., Bloom, SL, Hauth, JC., Roase, DJ., Spong, CY., (2014), *Williams obstetrics 24rd ed*, McGraw-Hill, New York,USA.
- Larger, O., (2015), *The diabetes in pregnancy dilemma: leading change with proven solutions*, 2e. USA: FMPH USA.
- Li, Y., Tran, VH., Duke, CC., Roufagalis, BD., (2012). 'Preventive and protective properties of zingiber officinale (ginger) in diabetes mellitus, diabetic complications, and associated lipid and other metabolic disorder: a brief review'. *Hindawi publishing corporation evidance-based complementaryand alternative medicine*, vol.2012, article ID516870, pp.1-10.
- Ojewole, JAO., (2006). 'Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of zingiber officinale (roscoe) rhizomes (zingiberaceae) in mice and rats', *Phytotherapy research*, vol. 20(9), pp. 764-72
- Palacios, R., Alcaraz, R., Campillo, S., Larque, E., (2017). 'Role of Insulin in Placental Transport of Nutrients in Gestational Diabetes Mellitus'. *Annals of Nutrition and metabolism*
- Sen, P., Sahu, K., Prasad, P., Chandkrakar, S., Sahu, RK., Roy, A., (2016). 'Approach to phytochemistry and mechanism of action having antidiabetic activity'. *UK J of pharmaceutical and bisciences*, vol. 4(1), pp.82-120
- Shibuya, M., (2012). 'Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in

- Angiogenesis. A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*', *Genes and Cancer*, pp.1097-105
- Uddin, MN., Horvat, D., Roth, AI., Pringle, KG., Allen, SR., *et al.*, (2013). 'Hyperglycemia induces an antiangiogenic milieu in first trimester cytotrophoblast cell', *FASEB J*, vol.27(5), pp. 835-45
- Weiss, U., Cerver, M., Peurstener, P., Schmut, O., *et al.*, (2001). 'Hyperglycemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast', *Diabetologia*, vol.44, pp.209-219.
- Zorn, TMT., Zuniga, M., Madrid, E., Tostes, R., Foertes, Z., Giachini, F., and Martin, S., (2011). 'Maternal diabetes affects cell proliferation in developing rat placenta'. *Histology and histopathology cellular and molecular biology*, vol.26(8), pp.1049-56.