

EFEK METFORMIN TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS MODEL OBESITAS

Gusti Ngurah Andika Bhaskara Pinatih¹, David Pakaya^{2*}, Wira Amaz Gahari³

¹Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

²Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

³Bagian Bedah, Rumah Sakit Umum Daerah Undata

*Corresponding author: Telp: +6281356377422, email: davidpakaya09@gmail.com

ABSTRAK

Peradangan pada obesitas dapat menyebabkan peningkatan sitokin pro-inflamasi sehingga memicu hipertrofi kerusakan pada tubulus ginjal. Pemberian metformin pada penderita obesitas dapat menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi dan mencegah terjadinya kerusakan ginjal. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek metformin terhadap berat badan dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus model obesitas. Penelitian eksperimental dengan rancangan *posttest only controlled group design* dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif, menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, usia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200-250 gram, berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model obesitas); K3: model obesitas + terapi metformin 250 mg/kgBB. Tikus dimodifikasi menjadi model obesitas dengan pemberian *high fat diet* (HFD). Dilakukan pengukuran BB secara berkala. Gambaran histopatologi ginjal didapatkan dari blok parafin dengan pewarnaan *Hematoxilin eosin* (HE) dan dianalisis secara kualitatif dengan menilai tingkat kerusakan tubulus ginjal dan analisis kuantitatif dilakukan dengan *Grapphad Prsima 8.0.0* menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Walis*. Hasil terapi metformin menurunkan berat badan pada K3 mulai hari ke-42 ($p=0,0049$). Skor cedera tubulus ginjal lebih rendah dibandingkan K2, namun tidak berbeda secara statistik ($p=0,9$). Metformin mampu menurunkan berat badan dan mencegah kerusakan tubulus ginjal tikus model obesitas.

Kata Kunci: Cedera tubulus, Inflamasi, Metformin, Obesitas

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease resulting from the accumulation of excess body fat. Obesity can lead to an increase in pro-inflammatory cytokines that can cause injury of kidney tubule. Giving metformin to obese can reduce the production of pro-inflammatory cytokines and prevent the occurrence of tubule injury. The aim of this study to determine the effect of metformin on body weight and kidney histopathological of obese rat model. This is a experimental research with posttest only controlled group design with qualitative and quantitative approaches. This study used 15 male Wistar strain white rats, aged 10-12 weeks, body weight (BB) 200-250 grams. The rats were divided into 3 groups; K1: normal control; K2: negative control (obesity model); K3: obesity model + metformin therapy 250 mg/kgBB. The rats were modified into models of obesity with high fat diet (HFD) administration. Periodic BB measurements are carried out. The histopathological kidney is obtained from the paraffin bloc and Hematoxylin eosin (HE) staining. The data were analyzed qualitatively by assessing the degree of renal tubules injury and quantitative analysis was carried out by assessing the level of kidney damage using Grapphad Prsima 8.0.0 with nonparametric Kruskal-Wallis test. Metformin therapy decrease weight on K3 starting on day 42, ($p=0.0049$). The renal tubule injury score was lower than K2,

but there was not statistically different ($p=0,9$). Metformin were able to decrease weight and prevent kidney tubule injury in obese rats model.

Keywords: Inflammation, Metformin, Obesity, Tubule injury,

PENDAHULUAN

Obesitas adalah suatu keadaan terjadinya penimbunan lemak tubuh secara berlebihan.¹ Kondisi obesitas dapat menyebabkan gangguan medis yang serius dan menjadi salah satu pemicu penyakit ginjal termasuk *chronic kidney disease* (CKD).² Kondisi obesitas menyebabkan vasodilatasi renal dan hiperfiltrasi glomerulus, yang merupakan mekanisme kompensasi untuk mempertahankan keseimbangan natrium akibat meningkatnya reabsorpsi natrium. Meningkatnya reabsorpsi natrium akan merangsang korteks adrenal untuk aktivasi sistem renin angiotensi aldosteron yang akan menyebabkan meningkatnya aliran darah ke ginjal. Peningkatan aliran darah ke ginjal akan menyebabkan hiperfiltrasi di ginjal. Hiperfiltrasi tersebut memicu terjadinya hipertrofi glomerulus yang akan menyebabkan terjadinya proteinuria. Meningkatnya aliran darah di ginjal bersama proteinuria membentuk glomerulosklerosis dan pada akhirnya menurunkan laju filtrasi glomerulus dan memicu cedera tubulus.³

Metformin merupakan obat antidiabetes yang paling banyak digunakan dan dilaporkan memiliki efek anti peradangan melalui pengaktifan *Adenosine Monophosphate Protein Kinase* (AMPK). Pemberian metformin menunjukkan adanya penurunan berat badan. Hal ini, karena metformin bekerja menurunkan produksi glukosa oleh hati dan meningkatkan sensitivitas reseptor perifer, sehingga penggunaan glukosa darah menjadi lebih efektif.^{4,5} Metformin terbukti meningkatkan kembali fungsi ginjal dengan cara mengurangi produksi sitokin proinflamasi dan infiltrasi makrofag pada cedera ginjal.⁶ Tujuan penelitian ini untuk menilai efek metformin terhadap cedera

tubulus ginjal tikus obesitas melalui pemberian *high fat diet* (HFD).

METODE

Sampel Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200 - 250 gram, dan berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok Perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model obesitas); K3: model obesitas + terapi metformin 250 mg/kgBB. Tikus dimodifikasi menjadi hewan model obesitas dengan pemberian HFD sebanyak 20 gram perhari selama 63 hari. Dilakukan pengukuran BB secara berkala pada setiap minggu sampai hari ke-63. Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako dengan nomor: 7657/UN 28.1.30/KL/2021

Pewarnaan Histologi

Tikus diterminasi dan dinekropsi ginjal pada hari ke-63. Ginjal dibuat dalam blok paraffin dan dipotong dengan ketebalan 4 μ m. Pewarnaan jaringan menggunakan *Hematoxilin eosin*. Pengamatan pada 5 lapang pandang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX23* perbesaran 400 $\times$ dan *numerical aperture* (NA):1,25 dan perangkat lunak *optilab*. Hasil gambar dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif

Analisis Statistik

Data histologis ginjal dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif cedera tubulus serta dilanjutkan menilai skor cedera tubulus. Analisis kuantitatif dilakukan

dengan *Graphpad Prisma 8.0.0* menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis*.

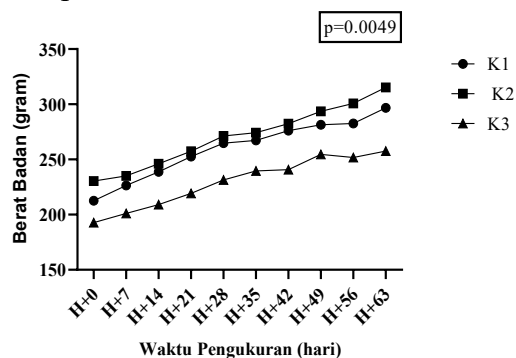
HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Berat Badan Tikus Model Obesitas

Data yang ditampilkan disini merupakan data pada kelompok tikus yang dirawat sampai hari ke-63 pasca pemberian HFD yang terbagi dalam 3 kelompok perlakuan. Data BB dapat pada gambar 1.

Berdasarkan gambar 1, terjadinya peningkatan BB setiap kelompok perlakuan. Kelompok K1 yang diberikan pakan standar mengalami peningkatan berat badan sejak awal hingga akhir penelitian. Sedangkan Kelompok K2 dan K3 yang merupakan kelompok tikus model obesitas yang diberikan pakan HFD mengalami peningkatan berat badan pada H+14 setelah pemberian HFD. Kelompok K3 yang diberikan HFD dan mendapatkan terapi metformin memiliki berat badan yang cenderung stabil pada H+49 atau satu minggu setelah pemberian metformin.



Gambar 1. Grafik rerata berat badan tikus perkelompok perlakuan

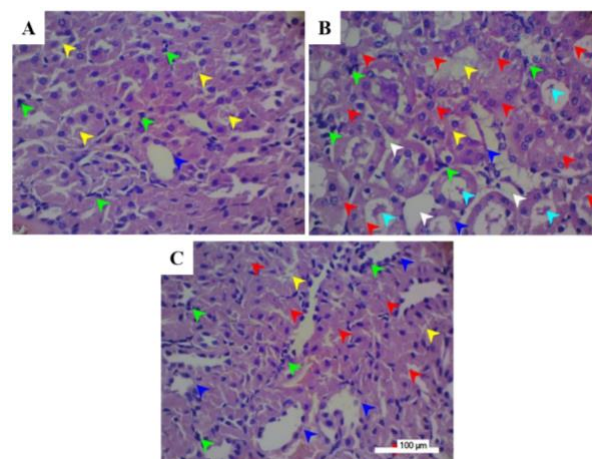
Keterangan:

K1: Kelompok Kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model obesitas; K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. H+0: Sebelum pemberian HFD; H+7: 7 hari pasca pemberian HFD; H+14: 14 hari pasca pemberian HFD; H+21: 21 hari pasca pemberian HFD; H+28: 28 hari pasca pemberian HFD; H+35: 35 hari pasca pemberian HFD; H+42: 42 hari pasca pemberian HFD; H+49: 49 hari pasca pemberian HFD; H+56: 56 hari pasca pemberian HFD; H+63: 63 hari pasca pemberian HFD.

Gambaran Histopatologi Ginjal

Pemeriksaan histopatologis ginjal pada penelitian ini diwarnai dengan hematoksinilin eosin, menunjukkan sitoplasma sel-sel epitel kuboid tubulus tampak merah muda dan nukleus tampak ungu. Penilaian secara kualitatif gambar histopatologi ginjal penelitian ini dapat dilihat pada gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan, pada kelompok K1 sebagai kontrol normal memperlihatkan struktur epitel kuboid pada tubulus ginjal baik tubulus proksimal dan tubulus distal tampak baik. Lumen tubulus juga tampak lebar dengan membran basalis yang baik. Pada lumen tubulus proksimal tampak brush border yang intact melekat pada permukaan tubulus dan tidak ditemukan adanya intraluminal cast. Pada beberapa lapangan pandang tampak adanya sebaran sel-sel radang namun jumlahnya sedikit.

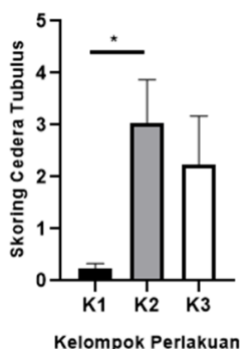


Gambar 2. Cedera tubulus ginjal dengan pewarnaan HE model tikus model obesitas. (A). Kelompok K1; (B). Kelompok K2; (C). Kelompok K3. Keterangan: Panah kuning menunjukkan *brush border*, panah hijau sebaran sel radang, panah biru menunjukkan pengerutan membran (atrofi) tubulus, panah biru muda menunjukkan intraluminal *cast*, panah merah menunjukkan dilatasi/destruksi tubulus, panah putih menunjukkan celah antar tubulus. (Pewarnaan: HE, Perbesaran 100 kali, skala 100 μ m).

Pada kelompok K2 sebagai kontrol negatif yang merupakan kelompok model obesitas; secara umum terdapat akumulasi sel-sel radang di area interstitial pada semua lapangan pandang. Terdapat pengerutan membran basalis pada epitel tubulus. Pada sebagian tubulus tampak brush border mulai terlepas dari permukaan epitel, menghilang bahkan memadat atau intraluminal cast namun tidak banyak. Beberapa tubulus juga mengalami atrofi, dan sebagian lagi mengalami dilatasi dan destruksi sel-sel epitel tubulus. Ruang intertubulus pada beberapa area tampak melebar. Sebagian area menunjukkan adanya jaringan fibrosis.

Kelompok K3 yang merupakan model obesitas yang diterapi dengan metformin, menunjukkan perbedaan tingkat kerusakan dengan kontrol negatif. Kelompok ini tampak lebih baik bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Secara umum menunjukkan sebagian brush border mengalami kerusakan, mengalami pepadatan membentuk intraluminal cast dengan jumlah sedikit. Sel-sel radang masih cukup banyak ditemukan. Adanya dilatasi dan destruksi dinding-dinding tubulus yang masih luas, sebagian tubulus juga mengalami atrofi akan tetapi dalam jumlah yang lebih kecil dari kelompok kontrol negatif, serta pelebaran ruang interstitial masih ditemukan.

Pemeriksaan histopatologi ginjal melalui pengamatan cedera tubulus ini dilanjutkan dengan penilaian kuantitatif. Penilaian dengan sistem skoring ini dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik skoring cedera tubulus ginjal.

Keterangan: K1: Kelompok kontrol normal; K2: Kelompok kontrol negatif (model Obesitas); K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji Kruskal Wallis $p=0,0006$. Uji post hoc Dunn's: K1 vs K2 ($p=0,0057$), K1 vs K3 ($p=0,0734$), K2 vs K3 ($p=0,9$). $*=p<0,05$.

Pada uji normalitas *Shapiro Wilk* antar kelompok perlakuan didapatkan hasil data tidak terdistribusi normal. Setelah itu dilakukan uji non-parametrik menggunakan Kruskal-Wallis dan didapatkan perbedaan skor cedera tubulus ginjal bermakna dari setiap kelompok ($p=0,0006$). Hasil ini kemudian dilakukan uji lanjut post hoc Dunn's dan didapatkan hasil yang berbeda signifikan antara kelompok K1 dan K2 ($p=0,0057$).

PEMBAHASAN

Pengukuran BB setiap minggu didapatkan peningkatan BB tikus kelompok K2 dan K3. Tikus kelompok K2 yang diberikan HFD mengalami peningkatan setiap minggu hingga akhir penelitian pada H+63. HFD dapat menyebabkan obesitas pada hewan coba dengan mengganggu metabolisme hewan coba tersebut.⁷ HFD dapat meningkatkan adiposit tubuh, sehingga akumulasi lemak pada tubuh meningkat. Pemberian HFD juga dapat menyebabkan penurunan keberagaman mikrobiota di usus yang menghasilkan *short chain fatty acids* (SCFAs), yang berperan dalam mengatur berat badan dan menjaga homeostasis usus.^{8,9}

Analisis *oneway anova* menunjukkan perbedaan rerata BB yang bermakna ($p=0,0049$). Uji lanjut rerata BB tikus dengan *Mann Whitney* menunjukkan perbedaan bermakna antara K1 dengan K3 ($p=0,0152$) dan K2 dengan K3 ($p=0,0024$). Adanya perbedaan bermakna antara BB tikus yang diberikan metformin dengan yang tidak. Hal ini karena metformin berefek menurunkan BB

dan berhubungan dengan regulasi makan berupa penekanan nafsu makan.^{10,11}

Analisis statistik hasil pengukuran skor cedera tubulus menggunakan *Kruskal-Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,0006$). Pada kelompok kontrol negatif (K2) memiliki skor cedera tubulus ginjal yang paling tinggi (Gambar 2). Pada kondisi obesitas dapat terjadi hipertensi yang menyebabkan cedera iskemia sehingga menimbulkan jaringan fibrosis.¹² Selain itu, pada kondisi obesitas juga dapat terjadi peningkatan hormon leptin akibat meningkatnya jaringan adiposa. Peningkatan hormon leptin menyebabkan terhambatnya aktivitas antioksidan, yang pada akhirnya menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan penyempitan pada arterioler eferen yang mengakibatkan peningkatan tekanan di ginjal. Peningkatan tekanan di ginjal dapat menyebabkan kerusakan pada *brush border*, sehingga mengalami pepadatan membentuk *intraluminal cast*. Peningkatan tekanan di ginjal juga dapat menyebabkan terbentuknya celah antar tubulus.^{13,14} Pada kelompok K3 dengan terapi metformin menunjukan kerusakan lebih sedikit. Hal ini menunjukan bahwa metformin memiliki efek perbaikan terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus model obesitas dibanding dengan K2. Metformin diketahui menghambat TGF- β 1 melalui aktivasi AMPK, sehingga menghambat perkembangan jaringan fibrosis di ginjal.¹⁵

Uji lanjut *Dunn's* kelompok K2 dan K3 didapatkan hasil tidak bermakna ($p=0,9$). Meskipun demikian, pada kelompok K3 memiliki skor cedera tubulus ginjal lebih rendah dibandingkan kelompok K2. Pada kelompok K3 rerata skor cedera tubulus ginjal yaitu $2,08 \pm 0,87$, sedangkan pada kelompok K2 rerata skor cedera tubulus ginjal lebih tinggi yaitu $3,04 \pm 0,82$. Metformin dapat mengurangi kerusakan ginjal dengan mengaktivasi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang akan meningkatkan antioksidan endogen.¹⁶

KESIMPULAN

Metformin memiliki efek terhadap penurunan berat badan dengan perbedaan bermakna pada setiap kelompok ($p=0,0049$) dan mengurangi cedera tubulus ginjal tikus model obesitas namun tidak bermakna secara statistik ($p=0,9$).

DAFTAR PUSTAKA

1. Anggrawal B, Jain V. Obesity in Children: Definition, Etiology and Approach. *Indian J Pediatr*. 2017;85(6):463-471.
2. Junior GB, Bentes AC, Daher ED, Matos SM. Obesity and kidney disease. *J Bras Nefrol*. 2016;39(1) : 65-67.
3. Widiana IGK. Obesitas dan Penyakit Ginjal Kronik. Proceeding book: *Bali Uro-Nephrology Scientific Communication*. 2017;21-29.
4. Kosnayani AS, Dharmana E, Hadisaputro S, Riwato I. Pengaruh Kombinasi Metformin dan Ekstrak Air Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn.) Terhadap Perbaikan Status Obesitas Tikus *Sprague Dawley* Jantan. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*. 2021;5(1):54-56.
5. Salomo H. Potensi Penggunaan Metformin Sebagai Suplementasi Diet Pada Obesitas. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*. 2020;8(1):39-41.
6. Yi H, Huang C, Shi Y, Cao Q, Chen J, Chen XM., et al. Metformin Attenuates Renal Fibrosis in a Mouse Model of Adenine-Induced Renal Injury Through Inhibiting TGF- β 1 Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 4:9:603802.
7. Dias MM, Dos Reis SA, Da Conceição LL, Sediama CMN De O, Pereira SS., et al. Diet-Induced Obesity In Animal Models: Points To Consider And Influence On Metabolic Markers. *Diabetol Metab Syndr*. 2021; 13:32.
8. Poret JM, Smith FS, Marcell SJ, Gaudet SJ, Tzeng TH, Braymer HD., et al. High

- fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Int J Obes*. 2017; 42(3):535-541.
9. Li T, Gao J, Du, M, Mao X. Bovine α -lactalbumin Hydrolysates Ameliorate Obesity-associated Endotoxemia and Inflammation in high-fat diet-fed Mice Through Modulation of Gut Microbiota. *Food Funct*. 2019; 10(6):3368-3378.
 10. Yerevanian A, Soukas AA. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Curr Obes Rep*. 2019;8(2):156-164.
 11. Pu R, Shi D, Gan T, Ren X, Ba Y, Huo Y. *et al*. Effects of Metformin in Obesity Treatment in Different Populations: a meta-analysis. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020;21(11).
 12. Pardede SO, Christine A, Andriana J. Gangguan Ginjal terkait Obesitas pada Anak. *Seri Pediatri*. 2017;18(6):506-507.
 13. Zulfahmidah, Fajriansyah, Armanto M, Rasfahyana. Hubungan Obesitas dan Stress Oksidatif. *UMI Medical Journal*. 2021;6(1):65-66.
 14. Joni T, Dewi NP, Handayani KR, Wirawan RC, Megawati RS. Potensi Rumpun Laut (*Eucheuma cottonii* J.Agardh) Terhadap Nefropati Diabetik Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Farmasi Galenika*. 2020;2(6):291-292.
 15. Yi H, Huang C, Shi Y, Cao Q, Zhao Y, Zhang L. *et al*. Metformin attenuates folic-acid induced renal fibrosis in mice. *J Cell Physiol*. 2017;233(9):7045-7054.
 16. Simanjuntak EM. Pengaruh Ekstrak Air Daun Pairedot (*Saurauia vulcani* Korth.) Terhadap Kadar SOD, HbA1c, DAN sRAGE Pada Tikus Diabetes Yang Diinduksi Nikotinamida-Stresptozotosi. *Tesis*. Universitas Sumatera Utara; 2021.