

Perbandingan Metode Pemeriksaan Glukosa Darah Metode Heksokinase dan Peroksidase pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Comparison of Blood Glucosa Examination Methods Hexokinase and Peroxidase Methods in Wistar Rats (*Rattus norvegicus*)

Widiastuti*, Slamet Riyanto

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*E-mail: widiastuti.fk@ub.ac.id

ABSTRAK

Kenaikan prevalensi Diabetes Melitus (DM) di dunia setiap tahunnya menjadikan DM menjadi salah satu penyakit yang membutuhkan perhatian secara lebih, baik pencegahan maupun penanganannya. Salah satu bentuk usaha dalam mengatasi DM adalah dengan pengembangan metode pemeriksaan nilai glukosa darah yang optimal, efektif, dan efisien. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan metode pemeriksaan glukosa darah antara metode heksokinase (HK) dan peroksidase (PAP). Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8 minggu dengan berat rata-rata 200g dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan: 1) Kelompok diabetes dengan induksi *streptozotocin* (STZ) secara interperitoneal; 2) Kelompok non-diabetes dengan induksi metformin secara peroral; dan 3) Kelompok normal tanpa perlakuan apapun. Setelah tikus diinduksi sesuai dengan kelompoknya, sampel darah kemudian diambil dan dianalisis dengan metode HK dan PAP menggunakan spektrofotometer. Hasil analisis menunjukkan metode HK dan PAP diperoleh nilai p sebesar 1,000; 1,000; dan 0,896 dimana menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dalam pengukuran kadar glukosa darah, sehingga baik metode HK maupun PAP dapat digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah dengan baik.

Kata Kunci: Diabetes melitus, glukosa darah, heksokinase, perbandingan metode, peroksidase

ABSTRACT

The escalating global incidence of Diabetes Mellitus (DM) necessitates heightened focus on both prevention and treatment of this illness. An area of focus in managing DM is the creation of optimum, effective, and efficient techniques for monitoring blood glucose levels. This study aimed to compare blood glucose assessment methods using the hexokinase (HK) and peroxidase (PAP) procedures. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) that were 8 weeks old and had an average weight of 200 g were separated into three treatment groups: 1) the diabetes group, induced with intraperitoneal streptozotocin (STZ); 2) the non-diabetic group, induced with oral metformin; and 3) the normal group, which received no therapy. Following the induction of the mice based on their respective groups, blood samples were collected and subjected to analysis using the HK and PAP procedures with the use of a spectrophotometer. The study findings indicate that there are no major disparities between the HK and PAP techniques in measuring blood glucose levels. Therefore, both the HK and PAP methods are equally effective for measuring blood glucose levels.

Keywords: Diabetes mellitus, blood glucose level, hexokinase, comparison of methods, peroxidase

Submitted: May 09th 2024 | 1st Revised : May 23th 2024 | Accepted: May 28th 2024 | Published: June 30th 2024

Pendahuluan

Menurut *World Health Organization* (WHO), prevalensi penyakit diabetes melitus (DM) di dunia mencapai 425 juta orang pada tahun 2017, dan meningkat menjadi 537 juta orang pada tahun 2021 [1], [2], [3]. Angka ini diperkirakan akan semakin meningkat menjadi 578 juta di tahun 2030 dan 700 juta orang di tahun 2045 [4], [5]. Kenaikan angka penderita DM berkaitan dengan perubahan gaya hidup masyarakat modern yang lebih sering mengonsumsi makanan dan minuman yang tidak sehat. Salah satu usaha menurunkan angka kejadian dan penanganan DM adalah dengan pengembangan metode pemeriksaan nilai glukosa darah yang optimal, efektif, dan efisien.

Glukosa darah merupakan parameter penting dalam studi metabolisme DM. Parameter ini secara umum digunakan dalam pemeriksaan DM. Kadar glukosa darah merupakan konsentrasi gula darah atau tingkat glukosa dalam serum. Glukosa merupakan prekursor dalam sintesis glikogen, ribose, deoksiribosa dalam asam nukleat, galaktosa dalam laktosa susu, glikolipid, glikoprotein dan proteoglikan. Kadar glukosa darah akan mengalami peningkatan dan penurunan bervariasi sepanjang hari. Kadar glukosa plasma puasa atau pada kondisi tidak ada asupan kalori minimal 8 jam normal adalah berada pada rentang 70-99 mg/dL. Pada pemeriksaan glukosa plasma sewaktu, kadar normal adalah 70-139 mg/dL. Hasil pemeriksaan yang tidak memenuhi kriteria normal digolongkan

dalam kelompok prediabetes apabila kadar glukosa darah puasa berada pada rentang 100-125 mg/dL dan kadar glukosa plasma 2 jam setelah puasa (TTGO) berada pada rentang 140-199 mg/dL. Kemudian, pasien didiagnosis menderita DM apabila dalam pemeriksaan kadar glukosa darah puasa menunjukkan hasil ≥ 126 mg/dL dan kadar glukosa plasma 2 jam setelah puasa menunjukkan hasil ≥ 200 mg/dL [6], [7].

Glukosa darah dalam serum, plasma, maupun urin dapat dianalisa secara kuantitatif dengan menggunakan metode heksokinase (HK) dan peroksidase (PAP). Kedua metode tersebut merupakan metode yang seringkali digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah, hal tersebut dilakukan dikarenakan keduanya dianggap sebagai metode yang tepat dan akurat. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menemukan metode pemeriksaan glukosa darah yang optimal antara HK dan PAP dengan menggunakan alat spektrofotometri [8].

Pada metode HK, glukosa dalam darah akan bereaksi dengan adenosin trifosfat (ATP), kemudian dengan bantuan enzim HK akan membentuk glukosa-6-fosfat dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Zat ini yang kemudian akan bereaksi dengan nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADP⁺) atau nikotinamida adenin dinukleotida (NAD⁺) membentuk dihidronikotinamida-adenin dinukleotida fosfat (NADPH) atau nikotinamida adenin dinukleotida (NADH) dan 6-fosfoglukonat. Jumlah NADPH atau NADH yang dihasilkan dapat menunjukkan kadar glukosa darah [9], [10]. Pada metode PAP atau dapat disebut juga metode glukosa oksidase (GOD), glukosa yang ada dalam darah akan dioksidasi oleh enzim GOD yang mengarah pada proses pembentukan hidrogen peroksida (H₂O₂) dimana selanjutnya akan bereaksi dengan substrat kromogen yang tidak berwarna, dan dengan adanya POD akan didapatkan hasil produk berwarna. Intensitas warna yang dihasilkan dapat dikatakan sebanding dengan konsentrasi glukosa dalam sampel [11], [12].

Bahan dan Metode

Bahan

Tikus jantan berusia 8 minggu dengan berat 200 gram sejumlah 15 ekor diaklimatisasi selama 7 hari dan ditempatkan di kandang individu dengan kondisi suhu, kelembaban, dan kebisingan lingkungan yang terkontrol, tikus diberi pakan *pellet* komersial dan minum secara *ad libitum*. Penelitian sudah memenuhi kelayakan etik melalui Sertifikat Etik No. 153-KEP-UB-2023 oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

Metode

Penelitian ini menggunakan metode *experimental* dengan pola rancangan acak lengkap (RAL), hal ini dilakukan karena kondisi percobaan adalah homogen dan dilakukan di laboratorium dengan kondisi terkontrol. RAL merupakan rancangan yang paling sederhana dengan pengacakan lengkap atau pengacakan yang tidak memiliki pembatasan [13]. Penelitian ini dibagi dalam dua tahapan percobaan. Pertama persiapan hewan coba dan yang kedua adalah pengukuran kadar glukosa darah.

1. Persiapan Hewan Coba

Tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu: 1) Kelompok tikus DM dengan induksi *streptozotocin* (STZ), 2) Kelompok tikus non diabetes dengan induksi metformin; dan 3) Kelompok

tikus non diabetes yang tidak diberi perlakuan khusus dan dianggap sebagai tikus dengan kadar glukosa normal.

Penginduksian STZ dilakukan dengan tahapan sebagai berikut [14]. Tikus dipuasakan selama 20 jam namun masih mendapatkan minum sebelum proses induksi. Dosis STZ yang digunakan sebesar 11 mg/200 g BB tikus. Larutan STZ diberikan dengan volume 0,2 mL/tikus secara intraperitoneal menggunakan jarum 25 x 6 di kuadran perut kanan bawah. Tikus kemudian dikembalikan ke kandang dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

Penginduksian metformin dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: Tikus dipuasakan selama 8 jam namun masih mendapatkan minum sebelum pemberian metformin. Dosis metformin yang digunakan sebesar 40 mg/200 g BB tikus. Larutan metformin diberikan dengan volume 1 mL/tikus secara peroral. Tikus kemudian dikembalikan ke kandang dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

2. Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan 3 hari setelah penginduksian STZ dan metformin. Tikus dipuasakan selama 6 jam sebelum pengambilan darah kemudian dilakukan pengukuran metode HK dan PAP menggunakan spektrofotometer *Clinical Chemistri Pentra C200*. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada seluruh kelompok di waktu dan tempat yang sama. Hasil pengukuran dinyatakan dalam mg/dL.

Metode HK dan PAP memiliki prosedur yang sama yaitu sebagai berikut [11], [12]: Aquadestilata sebanyak 10 μ L ditambahkan pada 1000 μ L reagen dan digunakan sebagai blanko. Sebagai standar digunakan 10 μ L glukosa ditambah 1000 μ L reagen. Untuk sampel digunakan darah tikus sebanyak 10 μ L ditambah 1000 μ L reagen. Blanko, standar, dan sampel diinkubasi 10 menit pada suhu 37°C. Absorbansi kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer *Clinical Chemistri Pentra C200* pada panjang gelombang 500 nm. Hal yang membedakan kedua uji adalah reagen yang digunakan. Reagen pada metode HK menggunakan *ABX Pentra Glucose HK CP* (Horiba, Japan), sedangkan reagen metode PAP menggunakan *ABX Pentra Glukosa PAP CP* (Horiba, Japan). Hasil absorbansi kemudian dimasukkan dalam rumus perhitungan kadar glukosa darah yang tertulis pada persamaan (1):

$$\text{Kadar (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{kadar glukosa standar (mg/dL)} \quad (1)$$

Analisis Data

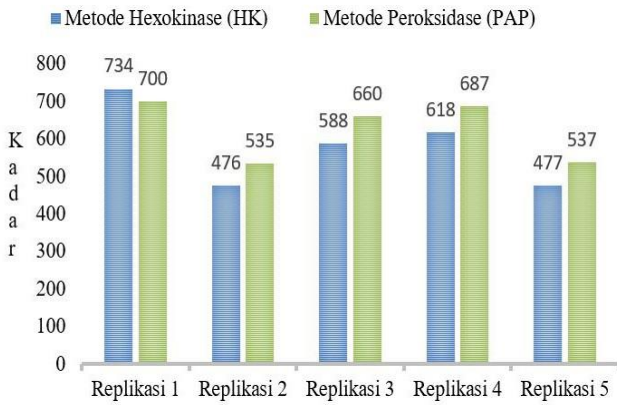
Analisis data yang didapat dari pengukuran kadar glukosa darah ditabulasi secara manual. Kedua dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel dalam penelitian ini berjumlah ≤ 50 [12]. Ketiga dilakukan uji *Chi Square* yang merupakan salah satu jenis uji komparatif non parametrik yang dilakukan pada dua variabel, dimana skala data kedua variabel adalah nominal [14].

Hasil

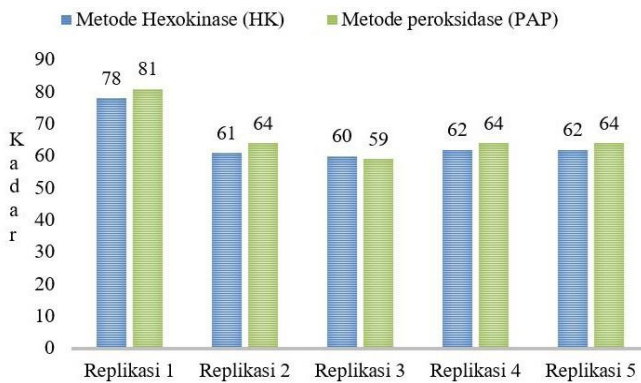
Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Hasil penelitian merupakan data yang diperoleh dari hasil pengukuran kadar glukosa darah dengan metode HK dan PAP pada 3 kelompok. Sebaran data kadar glukosa darah pada

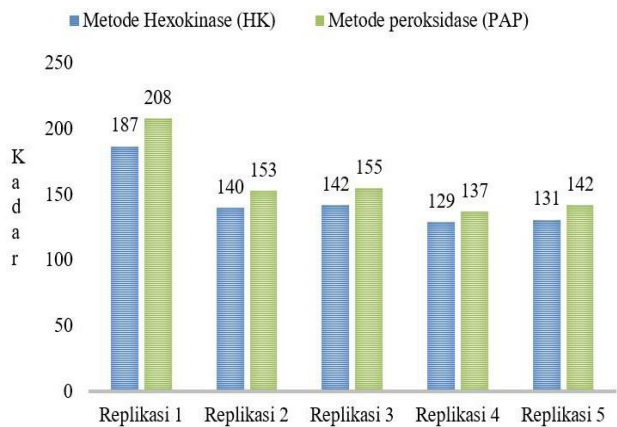
ketiga kelompok dapat dilihat pada **Gambar 1, 2, dan 3.**



Gambar 1. Hasil pengukuran glukosa darah tikus diabetes



Gambar 2. Hasil pengukuran glukosa darah tikus non diabetes



Gambar 3. Hasil pengukuran glukosa darah tikus normal

1. Analisis Data

Uji Normalitas

Hasil uji normalitas terhadap glukosa darah menggunakan *Saphiro-Wilk* dapat dilihat pada **Tabel 1** dengan hasil nilai *p* (*Asymp. Sig.*) 0,030, yang menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi dengan normal.

Tabel 1. Uji Normalitas dan Signifikansi Perubahan Skor Pretest Posttest

Uji Statistik	Hasil	Intepretasi
<i>Saphiro-Wilk</i>	<i>p</i> (0,030)	Tidak normal (<i>p</i> <0,05)

Uji Beda

Hasil uji *Pearson Chi-Square* dapat dilihat pada **Tabel 2** diperoleh nilai *p* sebesar 1,000; 1,000; dan 0,896, yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara menggunakan metode HK dan PAP pada pengukuran glukosa darah kelompok diabetes, non diabetes, dan normal.

Tabel 2. Hubungan Perbedaan Metode Pemeriksaan Glukosa Darah

Uji Statistik	Hasil	Intepretasi
<i>Chi Square</i>	K1 (<i>p</i> = 1,000) K2 (<i>p</i> = 0,896) K3 (<i>p</i> = 1,000)	Tidak signifikan (<i>p</i> > 0,05)

Berdasarkan **Gambar 1, 2, dan 3** dapat dilihat hasil pengukuran glukosa darah tikus pada setiap kelompok menggunakan metode HK dan PAP tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga dapat dikatakan kedua metode menunjukkan hasil yang akurat dan tidak bias.

Pembahasan

Pemilihan subjek penelitian diabetes dan non diabetes dilakukan untuk memastikan bahwa pengukuran yang dilakukan tidak bersifat bias. Tikus dengan glukosa darah normal atau tidak diberi perlakuan pada penelitian dibuktikan dengan teknik kimia basah dan kering untuk mengetahui apakah kadar glukosa darah tikus berada dalam rentang normal sebagai antisipasi untuk mengungkapkan apakah konsentrasi glukosa pada ketiga kelompok dipengaruhi oleh jenis teknik yang diterapkan di laboratorium klinis.

Kalibrasi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh besar terhadap hasil yang diperoleh dari metode tertentu. Pada pengukuran kadar glukosa darah, prosedur kalibrasi didasarkan pada absorbansi molar menggunakan kalibrasi glukosa primer atau dapat menggunakan kalibrasi sekunder berbasis serum. Kalibrasi menggunakan absorbansi molar NADPH mungkin untuk metode HK dan tidak dapat digunakan untuk metode PAP, tetapi prosedur tersebut mengarah pada varians intra-laboratoium dan antar-laboratorium, baik secara umum maupun untuk metode HK sehingga metode kalibrasi tersebut tidak direkomendasikan. Kalibrasi yang banyak digunakan pada prosedur analisis manual dan diskrit adalah kalibrasi primer sedangkan kalibrasi yang paling populer untuk analisis aliran kontinu adalah kalibrasi berbasis serum [15].

Pada pengukuran kadar glukosa memerlukan reagen uji. Pemilihan *kit reagen* yang akan digunakan untuk pengukuran glukosa dapat dipilih sesuai kebutuhan karena pembebasan pasar *reagen* di Indonesia saat ini. Laboratorium Kimia Klinis Universitas Brawijaya memiliki kebebasan untuk memilih metode dengan mempertimbangkan bahwa *kit reagen* yang digunakan merupakan representasi dari metode konvensional yang banyak digunakan. Penelitian ini juga dilakukan dengan mempertimbangkan kemungkinan tenaga kesehatan yang meminta analisis glukosa dengan menggunakan plasma atau serum sebagai spesimen pilihan. Penelitian ini membuktikan bahwa ketika spesimen plasma digunakan untuk analisis kadar glukosa dengan menggunakan metode HK atau PAP menunjukkan hasil pengukuran yang serupa. Demikian juga, spesimen serum memberikan hasil yang serupa ketika

metode HK atau PAP digunakan untuk analisis kadar glukosa [16].

Estimasi glukosa plasma ditentukan dalam berbagai skenario klinis dan fisiologis. Skrining dan diagnosis diabetes melitus, gangguan toleransi glukosa, hiperglikemia puasa, dll., didasarkan pada kadar glukosa plasma dari spesimen darah acak, puasa, atau 2 jam *post-prandial*. Tes toleransi glukosa juga dilakukan untuk mendiagnosis dan memastikan diagnosis diabetes melitus. Diagnosis diabetes melitus gestasional dapat ditegakkan berdasarkan kadar glukosa plasma pada interval waktu tertentu yang berbeda setelah pembebanan glukosa. Glukosa plasma acak (RBG) sering diresepkan di unit gawat darurat dan unit perawatan intensif saat menangani pasien yang sakit kritis. Penilaian glukosa darah mempengaruhi manajemen dan keputusan klinis dalam mengambil langkah terapi. Akurasi yang baik dan pemilihan metode yang benar serta interpretasinya dapat membantu manajemen pasien dengan baik [17].

Hasil penelitian yang telah dilakukan dan pembahasan tersebut sehingga menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara pengukuran glukosa darah metode HK dan PAP pada tikus wistar. Temuan ini serupa dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Ayyanar dan Pichandi [15] yang menunjukkan bahwa ada korelasi yang baik antara metode HK dan PAP [18].

Kesimpulan

Metode HK dan PAP tidak memiliki perbedaan signifikan dalam pengukuran kadar glukosa darah yang dibuktikan dengan hasil analisis statistik, sehingga baik metode HK maupun PAP dapat digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah dengan baik.

Referensi

- [1] Sagita P, Apriliana E, Mussabiq S, Soleha TU. Pengaruh Pemberian Daun Sirsak (*Annona muricata*) terhadap Penyakit Diabetes Melitus. *J Med Utama*. Oktober 2021;3(1):1266–72.
- [2] Yashin A, Yashin Y, Xia X, Nemzer B. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. *Antioxidants*. 15 September 2017;6(3):70. <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>
- [3] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. Januari 2022;183:109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- [4] Ong KL, Stafford LK, McLaughlin SA, Boyko EJ, Vollset SE, Smith AE, et al. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. Juli 2023;402(10397):203–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01301-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01301-6)
- [5] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. November 2019;157:107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- [6] Cahyaningrum N. Hubungan Pola Makan 3J (Jumlah, Jenis, Jadwal) dan Perilaku Sedentari dengan Pengendalian Gula Darah Pasien DM Tipe 2 (Studi Kasus di Puskesmas Mulyoharjo). *Nutr Res Dev J*. April 2023;3(1):12–22.
- [7] Perkeni. Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. 1 ed. PB Perkeni; 2021. 1–104 hal.
- [8] Putra DJ, Darmawan E, Prabowo MH. Efek Pemberian Neurovit E terhadap Aktivitas Hipoglikemik Glibenklamid pada Tikus Jantan Galur Sprague - Dawley. [DIYogyakarta]: Universitas Islam Indonesia; 2006.
- [9] Rahmawati AS, Erina R. Rancangan Acak Lengkap (RAL) Dengan Uji Anova Dua Jalur. *Opt J Pendidik Fis*. 20 Juni 2020;4(1):54–62. <https://doi.org/10.37478/optika.v4i1.333>
- [10] Kurniawati D, Sutrisna E, Wahyuni AS. Uji Penurunan Kadar Glukosa Darah Oleh Ekstrak Etanol 70% Daun Buncis (*Phaseolus vulgaris L*) Pada Kelinci Jantan Yang Dibebeani Glukosa. *Biomedika*. 1 Februari 2012;5(1). <https://doi.org/10.23917/biomedika.v4i1.257>
- [11] Subiyono, Martsiningsih MA, Gabrela D. Gambaran Kadar Glukosa Darah Metode GOD-PAP (Glucose Oxidase – Peroxidase Aminoantypirin) Sampel Serum dan Plasma EDTA (Ethylen Diamin Terta Acetat). *J Teknol Lab*. Maret 2016;5(1):45–8.
- [12] Quraisy A. Normalitas Data Menggunakan Uji Kolmogorov-Smirnov dan Saphiro-Wilk. *J-HEST J Heal Educ Econ Sci Technol*. 31 Juli 2022;3(1):7–11. <https://doi.org/10.36339/jhest.v3i1.42>
- [13] Pradana GW, Ma'ruf MF, Eprilianto DF. Penerapan Student T-Test Untuk Menilai Efektivitas Pengembangan Buku Ajar Mata Kuliah Desentralisasi Fiskal di Jurusan Administrasi Publik Unesa. *J Dimens Pendidik dan Pembelajaran*. 19 Juli 2022;10(2):182–90. <https://doi.org/10.24269/dpp.v10i2.5096>
- [14] Guo Q, Wang W, Abboud R, Guo Z. Impairment of maturation of BMP-6 (35 kDa) correlates with delayed fracture healing in experimental diabetes. *J Orthop Surg Res*. 24 Desember 2020;15(1):186. <https://doi.org/10.1186/s13018-020-01705-7>
- [15] Ayyanar K, Pichandi S. Evaluation of Glucose Oxidase and Hexokinase Methods [Internet]. Vol. 14, *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2018. Tersedia pada: <http://www.ripublication.com>
- [16] Twomey PJ. Plasma glucose measurement with the Yellow Springs Glucose 2300 STAT and the Olympus AU640. *J Clin Pathol*. Juli 2004;57(7):752–4. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013417>
- [17] Bilen H, Kilicaslan A, Akcay G, Albayrak F. Performance of glucose dehydrogenase (GDH) based and glucose oxidase (GOX) based blood glucose meter systems at moderately high altitude. *J Med Eng Technol*. 9 Januari 2007;31(2):152–6. <https://doi.org/10.1080/03091900600861590>
- [18] Dickson LM, Buchmann EJ, Janse Van Rensburg C, Norris SA. The impact of differences in plasma glucose between glucose oxidase and hexokinase methods on estimated gestational diabetes mellitus prevalence. *Sci Rep*. 10 Mei 2019;9(1):7238. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43665-x>