

BAB VI

PEMBAHASAN

Diabetes melitus merupakan gangguan metabolik kronis yang dapat menyebabkan gangguan mikrovaskular, makrovaskular dan neuropati (Triplitt *et al.*, 2008). Pada diabetes melitus juga terjadi perubahan plastisitas neuron, pembentukan *AGEs product* dan disfungsi vaskular yang dikaitkan dengan gangguan depresi (Gispén and Biessels, 2000; Lu *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2014). Pada diabetes melitus dengan gangguan depresi terjadi peningkatan aktivitas HPA *axis* yang dikaitkan dengan gangguan stres (Ho *et al.*, 2014). Stres merupakan kondisi yang dianggap mengancam secara nyata fisik dan psikologi individu terhadap respon dari stimulus stres yang diterima (Levine, 2005).

Pada penelitian preklinik menggunakan hewan coba model diabetes melitus, hewan coba sehat diinjeksi dengan *alloxan* pada dosis 140 mg/kg dalam buffer sitrat pH 4,5 secara intraperitoneal. *Alloxan* merupakan analog glukosa yang terakumulasi dan selektif menyebabkan kerusakan pada sel beta pankreas. Tujuh puluh dua jam setelah pemberian induksi *alloxan* dilakukan pengukuran kadar glukosa darah mencit. Mencit dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl dinyatakan mengalami diabetes melitus (Syiem *et al.*, 2002; Lenzen, 2008).

Hewan coba model diabetes melitus kemudian diberikan induksi stres yaitu *footshock*. *Footshock* merupakan salah satu jenis induksi stres yang memberikan rangsangan berupa nyeri akibat kejutan listrik. Induksi stres diberikan sebesar 0,6 mA 60 volt setiap hari dengan durasi 10 detik *on*, 30 detik *off* selama 10 menit dalam 14 hari.

Evaluasi untuk mengetahui tingkat stres hewan coba yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan metode *light dark box* dan *elevated plus maze*. *Light dark box* merupakan salah satu metode pengujian derajat kecemasan pada hewan coba. Pengamatan LDB didasarkan pada perilaku hewan coba (mencit) yang lebih enggan terhadap tempat terang dan reaksi spontan hewan terhadap *stressor* ringan model perubahan lingkungan (Hascoet and Bourin, 1997). Pengukuran metode LDB harus dikondisikan yang sama antar setiap pengukuran dan antar kelompok agar menghasilkan variasi hasil yang tidak jauh berbeda. Sekecil apapun stimulus stres dapat menyebabkan gangguan dan bias pada penelitian. Perbedaan stimulus stres dari luar (kondisi kandang, penanganan selama perlakuan dan kondisi lingkungan sebelum pengukuran) dapat mempengaruhi respon perilaku yang berbeda (Bourin and Hascoet., 2003). Hasil pengukuran LDB juga bergantung pada kondisi awal individu sebelum diberikan perlakuan. Sehingga pada penelitian ini dilakukan pengukuran *baseline* (pengukuran hari ke-0).

Pengamatan perilaku cemas metode LDB dilakukan dengan mengukur waktu yang dihabiskan mencit dalam ruang terang dengan intensitas cahaya 350-400 lx selama 5 menit. Peningkatan kecemasan hewan ditunjukkan dengan adanya penurunan persen waktu yang dihabiskan mencit dalam ruang terang selama 5 menit (300 detik) (Misslin *et al.*, 1989; Hascoet and Bourin, 1998). Namun peningkatan waktu yang dihabiskan mencit dalam ruang terang tersebut harus tanpa diikuti dengan penurunan aktivitas lokomotor hewan (Bourin and Hascoet., 2003). Pada penelitian ini, aktivitas lokomotor hewan coba pada beberapa pengukuran dan pada masing-masing kelompok menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,9999$). Hal ini

menunjukkan bahwa perubahan persentase waktu yang dihabiskan mencit dalam ruang terang tidak disebabkan oleh perubahan aktivitas lokomotor hewan coba.

Pada penelitian ini, persentase waktu mencit dalam ruang terang pada pengukuran hari ke-0 (baseline) kelompok normal yang tidak diinduksi stres dibandingkan pada pengukuran hari ke-7 tidak berbeda signifikan ($p=0,1714$). Sedangkan pada kelompok normal yang diinduksi stres pada hari ke-7 setelah pengukuran mengalami penurunan persentase waktu mencit dalam ruang terang dibandingkan pada pengukuran hari ke-0 (baseline) sebelum pemberian induksi stres ($p=0,0483$). Hal tersebut menunjukkan bahwa induksi *footshock* berhasil untuk model stres hewan coba pada pengukuran metode LDB. Penelitian yang dilakukan Belzung *and* Le Pape (1994) menyatakan bahwa *footshock* merupakan *stressor* yang sesuai untuk menekan aktivitas pada ruang terang sehingga meningkatkan efek *anxiogenic* (peningkatan perilaku cemas) pada hewan coba.

Pengukuran perilaku cemas metode LDB pada kelompok diabetes melitus yang diinduksi stres terjadi peningkatan perilaku cemas yang signifikan pada hari ke-7 dan hari ke-14 dibandingkan pengukuran hari ke-0 (*baseline*). Hal ini menunjukkan bahwa induksi stres *footshock* dapat memberikan efek *anxiogenic* pada hewan model diabetes melitus. Namun bila dibandingkan antara kelompok diabetes melitus yang diinduksi stres dengan kelompok normal (non-diabetes melitus) yang diinduksi stres menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada pengukuran hari ke-0, hari ke-7 dan hari ke-14. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penurunan perilaku cemas pada kelompok diabetes melitus hanya dipengaruhi oleh induksi stres yang diberikan. Sedangkan induksi diabetes melitus tidak mempengaruhi peningkatan perilaku

cemas pada penelitian ini. Meskipun pada pengukuran perilaku cemas kelompok diabetes melitus yang tidak diinduksi stres terjadi peningkatan perilaku cemas pada hari ke-7 dibandingkan hari ke-0. Hal ini mungkin disebabkan induksi stres yang digunakan yaitu *footshock* memberikan efek *anxiogenic* yang besar sehingga pada penelitian ini tidak dapat dibedakan efek peningkatan perilaku cemas yang disebabkan oleh induksi stres dan peningkatan perilaku cemas akibat induksi stres dan induksi diabetes melitus yang diberikan. Dilaporkan diabetes melitus menginduksi perubahan perilaku pada hewan meliputi peningkatan perilaku terkait cemas lain seperti *grooming*, *freezing behavior*, *immobility* dan defekasi (Sharon Pellow *et al.*, 1985). Perubahan perilaku tersebut dikaitkan dengan hiperglikemia dan kontrol glukosa darah pada diabetes melitus. Pada studi yang membandingkan perubahan perilaku terkait ketakutan dan cemas pada hewan coba menunjukkan terjadi peningkatan aktivitas tersebut pada hewan model diabetes melitus dibandingkan hewan non diabetes melitus (Ramanathan *et al.*, 1998; Kamei, *et al* 2003; Miyata *et al.*, 2007). Sedangkan hewan model diabetes melitus yang diberikan terapi insulin terjadi penurunan aktivitas terkait cemas dan ketakutan dibandingkan kelompok diabetes melitus yang tidak diberi insulin (Miyata *et al.*, 2007). Perubahan perilaku hewan coba diabetes melitus juga dikaitkan dengan perubahan aktivitas HPA *axis*. Hewan model diabetes melitus yang diberi induksi stres mengalami peningkatan kortisol dalam darah lebih tinggi dibandingkan hewan model non diabetes melitus yang juga diberi induksi stres (Thorre *et al.*, 1997). Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut terkait pemberian induksi stres dengan menguji berbagai macam model dan tingkat kekuatan induksi stres pada hewan coba

model diabetes melitus dengan penggunaan metode LDB sebagai metode untuk pengukuran perilaku cemas.

Pada studi preklinik, model hewan yang mengalami peningkatan perilaku cemas dan ketakutan memiliki kadar ekstrasel serotonin yang lebih kecil dibandingkan hewan normal. Penurunan kadar serotonin tersebut dikaitkan dengan terjadinya depresi dan cemas. Pada diabetes melitus juga terjadi perubahan aktivitas pada serotonin. Hewan coba model diabetes melitus yang diinduksi stres mengalami penurunan kadar ekstrasel serotonin pada *hypothalamus* dibandingkan hewan coba diabetes melitus tanpa induksi stres maupun hewan coba non diabetes yang diinduksi stres (Thorre *et al.*, 1997).

Meskipun serotonin dianggap sebagai bagian utama yang memainkan peran terkait depresi dan cemas, serotonin juga memodulasi aktivitas noradrenalin. Penurunan kadar serotonin dikaitkan dengan penyebab penurunan kadar noradrenalin. Noradrenalin memfasilitasi respon simpatik seperti adaptasi fisiologi dan perilaku terhadap stimulan stres, ancaman dan tanda bahaya (Moojen *et al*, 2006; Ikawati, 2012). Oleh karena itu, obat-obat yang bekerja meningkatkan kadar serotonin dan noradrenalin seperti milnacipran dapat digunakan untuk mengatasi gangguan terkait depresi dan kecemasan.

Obat yang memberikan efek peningkatan perilaku pada hewan untuk menghabiskan waktu lebih lama dalam ruang terang, menunjukkan adanya efek *anxiolytic* (penurunan perilaku cemas). Pada kelompok milnacipran hewan diinduksi dengan stres selama 14 hari dan pada hari ke-8 sampai hari ke-14 hewan diberikan milnacipran dengan dosis 10 mg/kg dan dosis 20 mg/kg. Pengukuran pada hari ke-7 setelah pemberian induksi *footshock* dan sebelum pemberian milnacipran dibandingkan pada hari ke-14 setelah pemberian milnacipran dosis 10

mg/kg ($p=0,7164$) dan dosis 20 mg/kg ($p= 0,3027$) menunjukkan tidak ada perbedaan makna pada persentase waktu mencit dalam ruang terang. Namun bila dibandingkan pengukuran hari ke-7 dan hari ke-14, kelompok milnacipran 10 mg/kg dan 20 mg/kg menunjukkan adanya peningkatan persentase waktu mencit dalam ruang terang namun tidak signifikan ($p=0,6274$). Pemberian milnacipran secara akut maupun kronis pada hewan coba non-diabetes melitus dapat memberikan efek *anxiolytic* pada pengujian derajat kecemasan (Moojen *et al.*, 2006). Pada pemberian subkronis (selama 7 hari) milnacipran dapat meningkatkan kadar ekstrasel serotonin dan noradrenalin pada otak (Kitaichi *et al.*, 2005). Namun pada penelitian ini, pemberian milnacipran selama 7 hari tidak memberikan efek yang signifikan terhadap kenaikan perilaku cemas akibat induksi stres pada hewan coba diabetes melitus. Hal ini mungkin disebabkan reseptor pada syaraf pasca sinaptik mengalami supersensitivitas. Supersensitivitas merupakan respon kompensasi syaraf pasca sinaptik saat menerima stimulasi neurotransmitter yang terlalu sedikit. Syaraf akan mengkompensasi dengan meningkatkan responsivitas syaraf. Syaraf juga akan meningkatkan sintesis reseptor tambahan (*up-regulasi*). Hal tersebut dapat dinormalkan kembali dengan pemberian antidepresan dalam jangka panjang. Antidepresan dapat meningkatkan jumlah neurotransmitter pada celah sinaptik. Peningkatan tersebut akan dikompensasi kembali oleh syaraf dengan menurunkan sensitivitas reseptor (desensitisasi) dan mengurangi jumlah reseptor (*down-regulasi*) (Ikawati, 2012). Pengukuran perilaku cemas dengan metode *anxiety-like behavior* pada hewan non-diabetes dengan pemberian milnacipran secara kronis (28 hari) menunjukkan adanya penurunan perilaku cemas yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol pada dosis 50 mg/kg (Moojen *et al.*, 2006). Oleh karena itu,

perlu penelitian lebih lanjut terkait efek milnacipran terhadap perilaku cemas (*anxiety-like behavior*) hewan coba akibat induksi *footshock* dengan dosis yang berbeda dan penggunaan yang lebih lama.

Pengamatan perilaku cemas (*anxiety-like behavior*) lain yang digunakan pada penelitian ini adalah *elevated plus maze* (EPM). EPM *test* merupakan metode pengujian derajat kecemasan yang berkaitan dengan reaksi spontan dan perilaku ketakutan terhadap ketinggian dan ruang terbuka (Korte *and* De Boer, 2002). Pengamatan dilakukan dengan mengukur waktu yang dihabiskan mencit saat berada pada lengan terbuka selama 5 menit dengan perangkat EPM yang memiliki dua bagian lengan terbuka dan 2 bagian lengan tertutup dengan ketinggian 45 cm. Peningkatan kecemasan hewan coba ditunjukkan dengan penurunan persentase waktu yang dihabiskan dalam lengan terbuka selama 5 menit (300 detik) (Rodgers *and* Shepherd, 1993). Sedangkan frekuensi keluar masuk hewan dalam lengan terbuka maupun lengan tertutup menunjukkan pengukuran terhadap aktivitas lokomotor.

Walaupun EPM sering digunakan pada penelitian terkait kecemasan, namun hasil yang didapatkan sering tidak konsisten dan kontradiktif (Korte *et al.*, 1998). Perbedaan kondisi saat pengukuran dan perbedaan perangkat EPM menjadi faktor yang menyebabkan hasil yang didapatkan berbeda. Pada penelitian ini, kelompok normal yang tidak diinduksi stres maupun kelompok normal yang diinduksi stres pada pengukuran hari ke-0 dan hari ke-7 tidak menunjukkan adanya perubahan yang signifikan. Hal ini menunjukkan EPM *test* merupakan metode yang kurang tepat untuk menguji efek *anxiogenic* (peningkatan perilaku cemas) maupun efek *anxiolytic* (peningkatan perilaku cemas) pada penelitian ini. Hasil yang sama juga didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Grahn *et al* (1994), pemberian *footshock* pada

hewan coba 24 jam dan 48 jam sebelum pengukuran menunjukkan tidak ada perbedaan pada persentase waktu yang dihabiskan mencit dalam lengan terbuka. Oleh karena itu, perlu dilakukan validasi lebih lanjut dengan menguji beberapa model stres yang berbeda terkait penggunaan EPM sebagai metode untuk pengukuran perilaku cemas (*anxiety-like behavior*) pada hewan coba yang diinduksi stres.

Pada kelompok diabetes melitus yang tidak diinduksi stres pada pengukuran EPM hari ke-7 dan hari ke-14 menunjukkan terjadi penurunan yang signifikan persentase waktu mencit dalam lengan terbuka dibandingkan pada pengukuran hari ke-0. Hal ini menunjukkan kondisi diabetes melitus pada pengukuran EPM dapat meningkatkan perilaku cemas hewan coba. Penurunan persentase waktu mencit dalam lengan terbuka juga terjadi pada penelitian yang dilakukan pada hewan coba model diabetes melitus yang diinduksi streptozotocin (Thorre *et al.*, 1997; Ramanathan *et al.*, 1998).

Berdasarkan uraian diatas maka dapat disimpulkan induksi diabetes melitus pada penelitian ini tidak mempengaruhi tingkat perilaku cemas hewan coba yang diinduksi stres dan penggunaan antidepresan milnacipran (dosis 10 mg/kg dan 20 mg/kg) tidak mempengaruhi perilaku cemas hewan model diabetes melitus yang diinduksi stres.