

**ASTAXANTHIN MENURUNKAN KADAR *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR*,  
*TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA*, *INTERLEUKIN-6*, DAN *NITRIC OXIDE*  
 PADA *NONPROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY* RINGAN:  
 UJI KLINIS TERKENDALI**

**Ni Made Laksmi Utari, AA Mas Putrawati T,  
 Ida Ayu Pertami Dewi, Ni Wayan Sedani**

*Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Udayana / RSUP Sanglah Denpasar*

**ABSTRAK**

*Diabetic Retinopathy* (DR) merupakan komplikasi mikrovaskular pada *Diabetes Mellitus* (DM) dan penyebab kebutaan paling sering pada usia produktif. Hiperglikemia menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi dan stres oksidatif dalam patogenesis DR dipaparkan oleh beberapa peneliti, namun peran antioksidan dalam mengurangi progresifitas DR masih menjadi perdebatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian astaxanthin 8 mg dapat menurunkan kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Nitric Oxide* (NO) pada penderita *Non Proliferative Diabetic Retinopathy* (NPDR) ringan. Penelitian *clinical trial* dengan perluasan *Randomized, Double Blinded, Placebo-Control, Pre and Posttest Group Design* ini dilaksanakan pada bulan Juli 2013 - Desember 2013 di Poliklinik Mata RSUP Sanglah Denpasar Bali. Jumlah sampel yang memenuhi kriteria eligibilitas sebanyak 40 pasien NPDR ringan terbagi menjadi 20 pasien sebagai kelompok perlakuan yang diberikan astaxanthin 8 mg dan 20 pasien NPDR ringan yang diberikan plasebo sebagai kelompok kontrol. Pengambilan sampel darah vena untuk pemeriksaan dilakukan sebelum dan setelah pemberian astaxanthin 8 mg serta plasebo selama 4 minggu. Perbedaan kadar rerata VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO dianalisis dengan uji-t jika distribusi data normal dan uji Mann-whitney jika distribusi data tidak normal. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai hubungan VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, dan NO dalam perkembangan NPDR ringan serta manfaat pemberian astaxanthin dalam perkembangan NPDR ringan. [MEDICINA 2014;45:31-37]

**Kata kunci :** *diabetes mellitus tipe II, non proliferative diabetic retinopathy ringan, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, nitric oxide, astaxanthin*

**ASTAXANTHIN DECREASE *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR*,  
*TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA*, *INTERLEUKIN-6*, AND *NITRIC OXIDE*  
 LEVEL ON MILD *NONPROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY*:  
 RANDOMIZED CLINICAL TRIAL**

**Ni Made Laksmi Utari, AA Mas Putrawati T,  
 Ida Ayu Pertami Dewi, Ni wayan Sedani**

*Department of Ophthalmology, Udayana University Medical School / Sanglah Hospital Denpasar*

**ABSTRACT**

*Diabetic Retinopathy* (DR) is a microvascular complication of *Diabetes Mellitus* (DM) and leading cause blindness in working age people. Hyperglycemia induces inflammation and oxidative stress in pathogenesis of DR has been described, but the role of antioxidants in reducing progression of DR is still being debated. This study aimed to determine whether plasma *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-6* (IL-6) and *Nitric Oxide* (NO) levels in mild *Non Proliferative Diabetic Retinopathy* (NPDR) with astaxanthin 8 mg lower than with placebo. This *clinical trial* study with *Randomized, Double Blinded, Placebo-Control, Pre and Posttest Group Design* was conducted on July-December 2013 at eye clinic of Sanglah Public General Hospital Denpasar, Bali. There were 40 patients collected as subjects, divided into 20 mild NPDR patients with astaxanthin 8 mg and 20 mild NPDR patients with placebo. Examination of plasma levels performed before and after give astaxanthin 8 mg and placebo for 4 weeks. Analysis was conducted with t-test if the data were normally distributed and Mann-whitney test if data distribution were not normal. The result of this study can provide information regarding the relationship VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, and NO in the progression of mild NPDR and benefits of astaxanthin in the development of mild NPDR. [MEDICINA 2014;45:31-37]

**Keywords :** *diabetes mellitus type II, mild non proliferative diabetic retinopathy, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, nitric oxide, astaxanthin*

**PENDAHULUAN**

**D**iabetic retinopathy (DR) merupakan kelainan retina akibat komplikasi penyakit diabetes mellitus (DM), berupa gangguan mikrovaskular karena hiperglikemia dalam jangka waktu yang lama. *Diabetic retinopathy* menjadi penyebab kebutaan yang paling sering setelah katarak di negara berkembang.

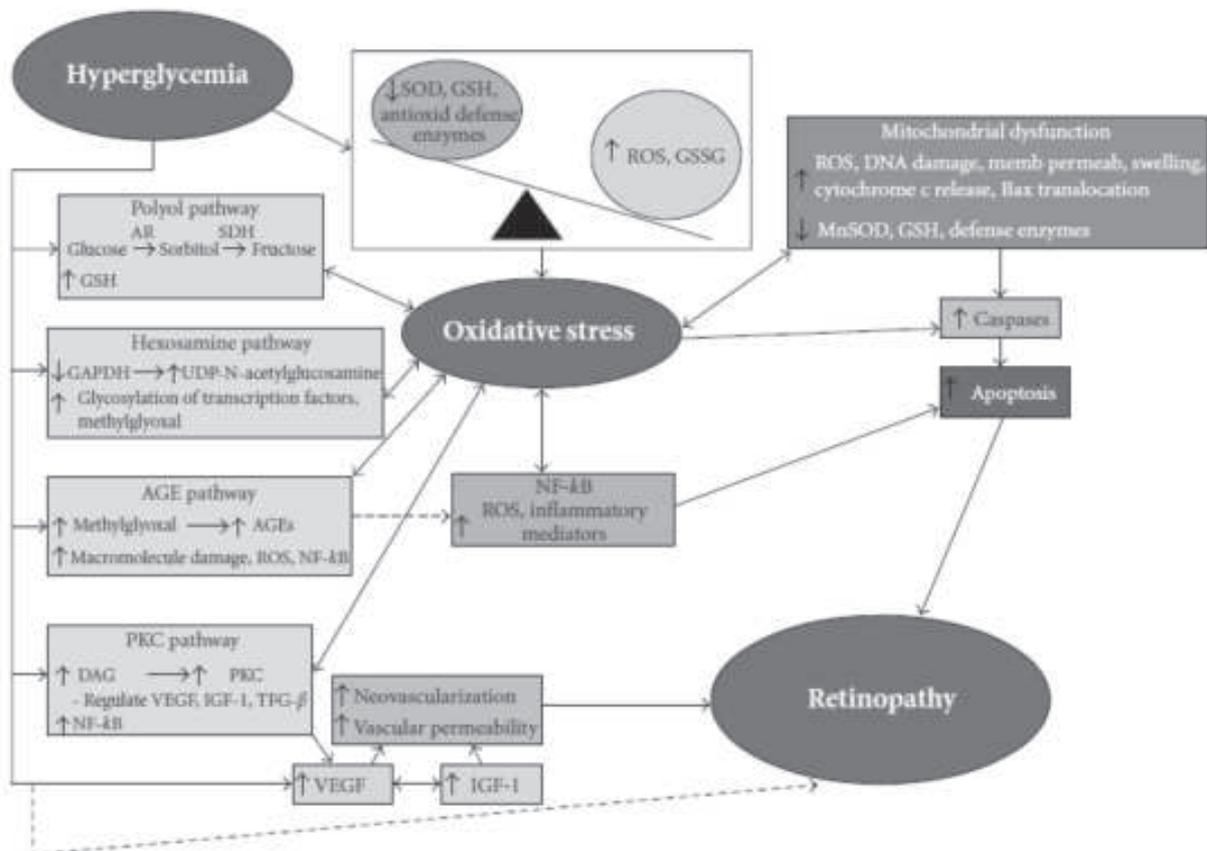
Jumlah penderita DM di seluruh dunia saat ini diperkirakan lebih dari 360 juta orang dan diperkirakan meningkat lebih dari dua kali lipat pada tahun 2030<sup>1</sup>. Di Indonesia pada tahun 2000 terdapat 8 juta lebih pasien DM dan pada tahun 2030 diperkirakan menjadi lebih dari 21 juta orang. Komplikasi DM yang paling banyak ditemukan adalah DR. Menurut the *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy* (WESDR) setelah 25

tahun menderita DM, angka kejadian DR mencapai 97% pada DM tipe 1 dan 60% pada DM tipe 2. Data DR di Indonesia dan di Bali sampai saat ini belum banyak dilaporkan.<sup>1,2</sup>

*Diabetic retinopathy* secara umum dipertimbangkan sebagai suatu proses inflamasi, dan pada awalnya seringkali tidak mempunyai gejala yang mengkhawatirkan. Berdasarkan stadiumnya, DR dapat diklasifikasikan menjadi stadium *Non Proliferative Diabetic Retinopathy* (NPDR) dan *Proliferative Diabetic Retinopathy* (PDR). Stadium NPDR diklasifikasikan menjadi stadium ringan, sedang dan berat. Gambaran klinis NPDR stadium ringan adalah ditemukan adanya mikroaneurisma pada daerah *inner nuclear layer* dan tanda ini merupakan tanda klinis awal adanya suatu lesi retina pada penderita DM.<sup>2</sup>

Mekanisme terjadinya DR

hingga saat ini belum dapat dijelaskan secara pasti. Beberapa teori menyebutkan, kondisi hiperglikemia dalam jangka waktu lama menyebabkan perubahan biokimia dan fisiologi pada pembuluh darah. Kondisi hiperglikemia ini memicu terjadinya reaksi inflamasi dan stres oksidatif terutama pada pembuluh darah retina, ditandai dengan peningkatan sitokin pro-inflamasi dan *nitric oxide* dalam darah (**Gambar 1**). Mekanisme lebih spesifik pada kapiler retina berupa hilangnya perisit, proliferasi endotel dan penebalan membran basalis yang mengakibatkan terjadi oklusi kapiler dan nonperfusi pada retina.<sup>3,4</sup> Penurunan perfusi kapiler menyebabkan iskemia dan hipoksia retina, yang merupakan suatu stimulator terbentuknya neovaskularisasi retina dan memegang peran penting dalam transisi dari NPDR menjadi PDR, karena merangsang pembentukan



**Gambar 1.** Mekanisme terjadinya retinopati diabetika.<sup>3</sup>

bermacam molekul yang membantu angiogenesis, termasuk faktor pertumbuhan pro-angiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF).<sup>5,6</sup>

Pemberian terapi yang dapat mencegah progresifitas DR menjadi tujuan dasar penelitian pada pasien DR. Penderita NPDR ringan hingga saat ini belum banyak diberikan intervensi pengobatan untuk mencegah progresifitas DR, biasanya hanya dianjurkan untuk melakukan kontrol gula darah dan tekanan darah serta pemeriksaan mata rutin setiap 9 bulan atau setiap 1 tahun untuk menilai progresifitas derajat DR.<sup>2</sup> Penelitian-penelitian telah dilakukan pada hewan coba yang dikondisikan mengalami DR dan diberikan antioksidan, namun hal ini masih kontroversial mengenai efektifitasnya dalam mencegah progresifitas DR.<sup>7,8</sup> Penanganan pasien DR terutama stadium NPDR dengan pemberian antioksidan juga masih merupakan kontroversi dikalangan para dokter mata.<sup>9</sup>

Astaxanthin (3,3'-*dihydroxy- $\beta$ , $\beta$ -carotene-4,4'-dione*) sebagai antioksidan carotenoid, memiliki aktifitas antioksidan 40 kali lipat lebih tinggi dari beta carotene dan 550 kali lipat lebih efektif dari vitamin E.<sup>10</sup> Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa astaxanthin memperlihatkan variasi aktivitas biologis yang luas, antara lain antioksidatif, anti-*Helicobacter pylori*, anti kanker, dan efek anti inflamasi.<sup>11</sup> Efek anti inflamasi dari astaxanthin tampak dari kemampuannya menghambat sitokin dan chemokin, seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), prostaglandin E-2 (PGE-2), IL-6 dan NO.<sup>12</sup> Beberapa penelitian juga menunjukkan astaxanthin memiliki efek anti-angiogenik, namun mekanismenya masih belum diketahui secara pasti.<sup>11,13-</sup>

15

Dosis harian yang direkomendasikan antara 4-8 mg

per hari. Penelitian menunjukkan pemberian astaxanthin 4 mg per hari dapat meningkatkan sistem imunitas akibat efek antioksidan yang dimilikinya. Penelitian lainnya menunjukkan pemberian astaxanthin 6-8 mg per hari dapat menurunkan oksidasi kolesterol LDL. Penelitian yang dilakukan Satoh, dkk. terhadap toksisitas dan efikasi astaxanthin dengan memberikan astaxanthin dosis tunggal 4, 8 dan 12 mg selama 4 minggu terhadap 127 individu sehat, menemukan tidak terdapat efek samping pada semua kelompok subyek.<sup>16,17</sup>

Kasus DM yang diperkirakan semakin meningkat menyebabkan kemungkinan untuk terjadinya peningkatan komplikasi DR. Patogenesis DR sampai saat ini belum jelas, dimana terjadi suatu jalur patologis yang saling mempengaruhi satu sama lain. Peningkatan sitokin pro-inflamasi, stres oksidasi yang menghasilkan radikal bebas (NO) yang berlebihan serta peningkatan kadar faktor pro-angiogenik berperan penting pada patogenesis DR.<sup>18,19</sup> Pemberian antioksidan untuk menurunkan kadar radikal bebas dapat menghambat kemungkinan terjadinya progresifitas DR ke stadium yang lebih lanjut. Astaxanthin sebagai salah satu antioksidan dan anti-inflamasi dapat sebagai pilihan terapi NPDR, tetapi hal ini masih kontroversial mengenai pemberian dan dosisnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO plasma penderita NPDR ringan setelah diberikan astaxanthin, dan tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah pemberian astaxanthin 8 mg selama 4 minggu dapat menurunkan kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO plasma pada penderita NPDR ringan lebih besar dibandingkan dengan plasebo.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan suatu penelitian dua lengan dengan perluasan desain *Randomized, Double Blinded, Placebo-Controlled, Pre and Posttest Group*, dengan jumlah sampel sekitar 40 subyek yang akan diacak 1:1 untuk menerima astaxanthin atau plasebo. Untuk mencegah kemungkinan terjadi bias, maka dilakukan randomisasi blok permutasi dengan komputer dan dilakukan *blinding* dimana peneliti maupun subyek tidak mengetahui perlakuan yang diterima subyek penelitian. Hasil rerata perbedaan kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO sebelum dan sesudah perlakuan antar kedua lengan kemudian dibandingkan (**Gambar 2**).

Subyek penelitian diseleksi di poliklinik Mata dan poliklinik Ilmu Penyakit Dalam divisi Endokrin Metabolik RS Sanglah Denpasar. Wawancara dan pemeriksaan mata dilakukan oleh peneliti. Setelah diperoleh sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian, selanjutnya dijelaskan tentang maksud dan tujuan penelitian serta menandatangani *informed consent*. Sampel dibagi secara acak berdasarkan randomisasi blok permutasi dengan komputer terdiri atas dua kelompok, yaitu kelompok dengan pemberian placebo dan kelompok dengan pemberian astaxanthin 8 mg

Persetujuan tertulis didapatkan dari komite etik sebelum penelitian dimulai. *Informed consent* tertulis harus didapatkan dari setiap pasien sebelum dilakukan setiap prosedur penelitian. Partisipasi dalam penelitian dan tanggal *informed consent* didokumentasikan dalam setiap catatan medis pasien.

Populasi target penelitian ini adalah semua pasien DM tipe II dengan komplikasi NPDR. Populasi terjangkau penelitian ini adalah semua pasien DM tipe II dengan komplikasi NPDR yang

datang ke poliklinik Mata dan poliklinik Ilmu Penyakit Dalam divisi Endokrin Metabolik RSUP Sanglah Denpasar mulai Juli 2013 sampai dengan Desember 2013.

Sampel penelitian adalah semua pasien DM tipe II dengan komplikasi NPDR yang datang ke poliklinik Mata dan poliklinik Ilmu Penyakit Dalam divisi Endokrin Metabolik RSUP Sanglah Denpasar mulai Juli 2013 sampai dengan Desember 2013 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel dipilih dengan tehnik konsekutif sampling dari populasi terjangkau. Sampel yang dipilih adalah pasien DM tipe II dengan komplikasi NPDR ringan pada satu atau kedua mata, namun bila salah satu mata ternyata sudah termasuk NPDR sedang atau berat, maka pasien tidak dimasukkan dalam sampel.

#### Kriteria inklusi

Pasien DM tipe II dengan NPDR ringan pada satu dan atau kedua mata berusia antara 40-75 tahun, bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani *informed consent*.

#### Kriteria eksklusi

Subyek sedang menderita penyakit sistemik yang kronis, Subyek sedang mendapat pengobatan anti-inflamasi non steroid, kortikosteroid atau obat imunosupresan lainnya dalam satu bulan terakhir, Subyek sedang mengkonsumsi vitamin antioksidan (vitamin A dan E) dalam satu bulan terakhir, Subyek yang merokok, Subyek dengan infeksi dan atau inflamasi intraokular, Subyek dengan kelainan pada segmen anterior dan posterior mata yang dapat mengganggu visualisasi saat pemeriksaan retina, Subyek dengan tekanan intraokular >21 mmHg atau dengan glaukoma sekunder, Subyek yang alergi terhadap obat astaxanthin, Subyek dengan kadar *Haemoglobin Adult*

*1c (HbA1c) e" 8%.*

Penelitian dilakukan di Poliklinik Mata dan Poliklinik Ilmu Penyakit Dalam divisi Endokrin Metabolik Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah Denpasar mulai Juli 2013 sampai dengan Desember 2013. Durasi penelitian diharapkan selama enam bulan. Penelitian dihentikan ketika data yang diperlukan telah mencukupi. Setiap pasien yang merasakan keuntungan dari pengobatan yang diberikan selama penelitian diperbolehkan melanjutkan pengobatan.

Pengumpulan data dilakukan dengan wawancara, pemeriksaan fisik, pemeriksaan oftalmologi, dan pengambilan sampel darah. Untuk menegakkan diagnosis NPDR ringan digunakan lembar pemeriksaan status oftalmologis dan lembar kuisioner penelitian, *E chart* atau *snellen chart*, tonometri schiotz, funduskopi atau lensa 78, slit lamp, anestesi topikal (pantocain 0,5%), dan sikloplegik (mydriatil 0,5%). Peralatan yang digunakan dalam pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar VEGF adalah sarung tangan steril, kapas alkohol, tourniket, spuit 3 cc disposable, reagen *RayBioâ Human IL-6 ELISA Kit* (RayBiotech, Inc.), *RayBioâ Human VEGF ELISA Kit* (RayBiotech, Inc.), *Human TNF-â Quantikine Elisa Kit* produksi R&D system dan reagen *Griess I dan II (Assay Design) Total Nitric Oxide Assay Kit*, kemudian diukur dengan metode *Elisa*.

Subyek penelitian diseleksi di poliklinik Mata dan poliklinik Ilmu Penyakit Dalam divisi Endokrin Metabolik RS Sanglah Denpasar. Wawancara dan pemeriksaan mata dilakukan oleh peneliti. Setelah diperoleh sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian, selanjutnya dijelaskan tentang maksud dan tujuan penelitian serta menandatangani *informed consent*. Sampel dibagi secara acak berdasarkan randomisasi

blok permutasi dengan komputer terdiri atas dua kelompok, yaitu kelompok dengan pemberian placebo dan kelompok dengan pemberian astaxanthin 8 mg. Peneliti maupun subyek tidak mengetahui obat yang diberikan. Sediaan obat dibuat sama dalam bentuk, ukuran, warna maupun rasa dan dikemas dalam kemasan botol yang sama. Obat dipesan dipabrik obat yang digunakan oleh peneliti (Interbat). Paket obat diberi label menggunakan etiket yang bertuliskan A atau B, yang isinya hanya diketahui oleh pabrik obat. Pemberian paket obat diberikan kepada masing-masing sampel sesuai dengan urutan blok permutasi komputer. Semua sampel dari kedua kelompok mengkonsumsi obat penelitian dengan aturan yang sama. Obat A maupun obat B dikonsumsi satu kali sehari selama 4 minggu.

Pengambilan sampel darah dilakukan dua kali yaitu sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan. Darah diambil melalui vena cubiti yaitu sebanyak 3 cc dengan menggunakan spuit 3 cc setelah sebelumnya dilakukan desinfeksi pada tempat pengambilan. Masing-masing sampel darah vena yang diambil ditampung dalam tabung yang berisi Lithium Heparin dan dibalik beberapa kali untuk mengulang pencampuran darah. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 2-3 x 10<sup>3</sup> rpm selama 15 menit. Sampel darah akan diberikan label sesuai dengan nomor randomisasi blok masing-masing dari kedua kelompok yaitu kelompok placebo, dan kelompok dengan pemberian astaxanthin 8 mg. Pengambilan sampel darah dilakukan oleh petugas laboratorium, kemudian sampel darah yang telah berisi plasma dimasukkan ke dalam kotak *styrofoam* yang berisi es kering (*dry ice*) untuk segera dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah dan disimpan pada suhu -80 °C hingga dilakukan pemeriksaan.

Pemeriksaan VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 plasma dan NO serum: VEGF, TNF- $\alpha$  dan IL-6 yang terkandung dalam plasma akan terikat pada antibodi monoklonal *anti-human VEGF*, TNF- $\alpha$  dan IL-6 yang telah dilapisi pada fase padat (sumuran). Sumuran kemudian dicuci dan ditambahkan *biotinylated anti-human VEGF*, TNF- $\alpha$  dan IL-6 *antibody*. Sumuran kembali dicuci untuk membuang *biotinylated antibody* yang tidak terikat. Konjugat *streptavidin-horse radish peroxidase* (HRP) kemudian ditambahkan. Sumuran kembali dicuci dan ditambahkan larutan substrat *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine* (TMB), menghasilkan warna biru yang sebanding dengan kadar VEGF, TNF- $\alpha$  dan IL-6 dalam plasma. *Stop solution* mengubah warna biru menjadi kuning, dan intensitas warna diukur pada panjang gelombang 450 nm. yang dipakai adalah *RayBioâ Human IL-6 ELISA Kit* (RayBiotech, Inc.) untuk mengukur secara kuantitatif kadar IL-6 dalam plasma dan *RayBioâ Human VEGF ELISA Kit* (RayBiotech, Inc.) untuk mengukur kadar VEGF dalam plasma. *Human TNF- $\alpha$  Quantikine ELISA Kit* produksi R&D System untuk mengukur kadar TNF- $\alpha$  dalam plasma.

Kadar NO serum: Reaksi Griess melibatkan interaksi dari ion nitrit dengan 2 molekul organik dan melibatkan reaksi oksidasi dan nukleopilik. Buffer atau komponen sampel yang bereaksi dengan reaksi oksidasi dan nukleopilik menjadi bereaksi dengan pembentukan warna. Perubahan nitrat menjadi nitrit melibatkan enzim *Nitrate Reductase*. Reagensia yang dipakai adalah reagen Griess I dan II (Assay Design) *Total Nitric Oxide Assay Kit* untuk mengukur kadar NO manusia secara kuantitatif di dalam serum dan pembacaan *absorbance* 520-560 nm dengan menggunakan *Elisa reader*.

Reagensia ini dipakai hanya untuk penelitian, tidak untuk keperluan diagnostik maupun terapi. Hasil pemeriksaan yang didapat kemudian akan dikumpulkan oleh peneliti, selanjutnya dianalisis untuk mengetahui perbedaan rerata kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 plasma dan NO serum pada saat awal dengan kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO serum 4 minggu kemudian antara pasien NPDR ringan yang diberikan plasebo dengan pasien NPDR ringan yang diberikan astaxanthin 8 mg setiap hari selama 4 minggu.

Semua subyek di *follow up* pada minggu kedua dan keempat pemberian obat untuk meyakinkan kepatuhan subyek dalam mengkonsumsi obat dan bila subyek tidak datang saat *follow up*, subyek akan diingatkan melalui telpon atau dikunjungi ke rumahnya. Semua peristiwa yang terjadi selama *follow up* pada kedua kelompok dicatat dan dibandingkan satu sama lain. Apabila terdapat subyek yang mengalami reaksi alergi selama penelitian, subyek akan dikeluarkan dari penelitian. Pada minggu keempat (akhir penelitian) dilakukan pengambilan darah, penghitungan jumlah sisa obat dan pencatatan reaksi alergi atau efek samping bila ada. Setelah penelitian selesai pabrik obat akan menyampaikan kepada peneliti komposisi obat A dan B.

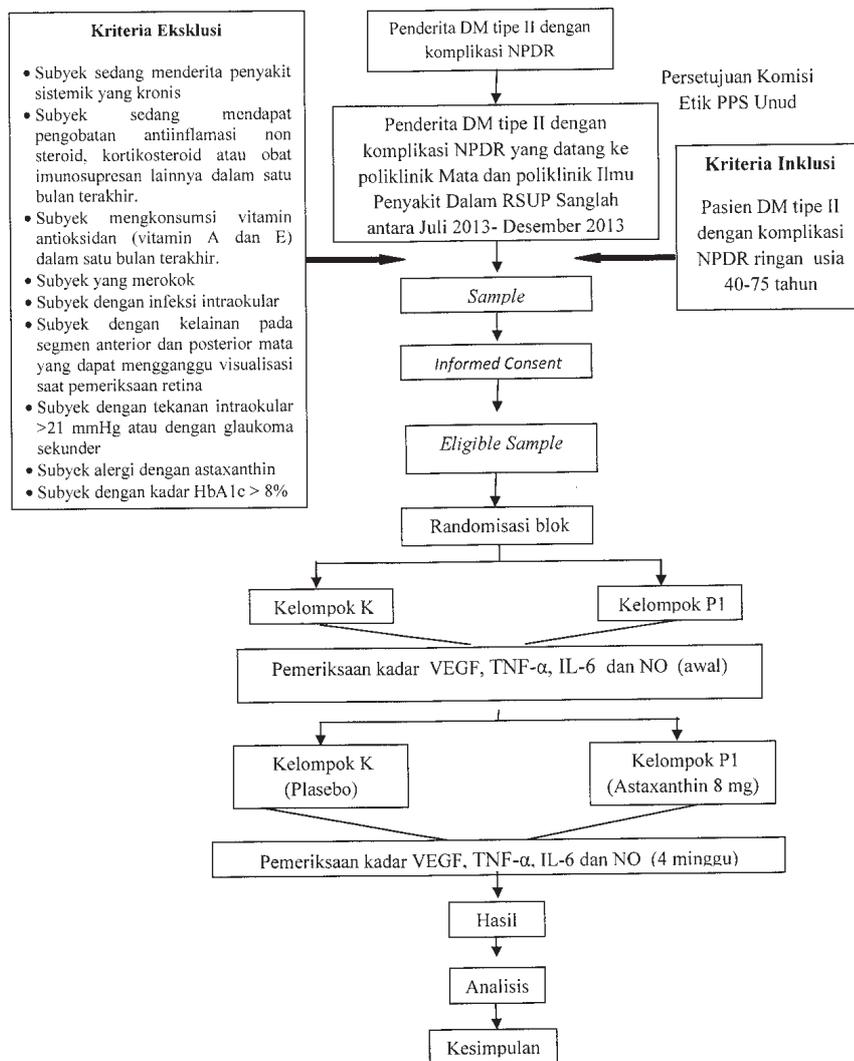
### Analisis Statistik

Data yang diperoleh dimasukkan ke dalam formulir penelitian kemudian direkam dalam tabel induk, kemudian dilakukan serangkaian tahapan analisis data untuk menjawab permasalahan penelitian. Adapun tahapan analisis data sebagai berikut: Seleksi data yaitu *editing*, *coding* dan tabulasi dimasukkan pada *file navigator* program *Statistical Package for The Social Sciences* (SPSS), untuk menggambarkan karakteristik umum dan distribusi berbagai

variabel. Data berskala kategorik dideskripsikan dalam bentuk frekuensi dan persentase sedangkan untuk data berskala numerik dalam bentuk rerata dan standar deviasi, uji Normalitas menggunakan Shapiro-Wilk, jumlah sampel  $< 50$  untuk menguji apakah data penelitian berdistribusi normal atau tidak, uji Homogenitas Varians antar Kelompok dengan Uji-Levene untuk menganalisis varians variabel antar kelompok pemberian placebo dan kelompok dengan pemberian astaxanthin 8 mg, apakah data penelitian homogen atau tidak, untuk menguji perbedaan kadar VEGF antara kelompok yang diberikan placebo dengan kelompok yang diberikan astaxanthin 8 mg, dianalisis dengan uji-t untuk 2 kelompok tidak berpasangan jika distribusi data normal, dan jika distribusi data tidak normal dapat dilakukan uji non parametrik atau dapat dilakukan transformasi data lebih dahulu (dengan logaritme, akar, atau teknik lain) sebelum dilakukan uji parametrik seperti uji-t. Batas kemaknaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 5% dengan ketentuan: bermakna bila  $p < 0,05$  dan tidak bermakna bila  $p \geq 0,05$ . Analisa akhir pada kedua kelompok berdasarkan alokasi awal (*intend-to-treat*)

### DISKUSI

Saat ini belum ada standar pengobatan untuk pasien DM dengan NPDR ringan. Dalam mendesain penelitian uji klinis terkendali, *placebo-controlled* ini, kami membuat hipotesis bahwa pemberian astaxanthin 8 mg selama 4 minggu dapat menurunkan kadar VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO plasma pada penderita NPDR ringan lebih besar dibandingkan dengan placebo. Penelitian ini, diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu: dapat diketahui hubungan antara VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan NO pada penderita DM terhadap



Gambar 2. Skema alur penelitian.

perkembangan terjadinya NPDR ringan, dapat memberikan solusi penanganan yang optimal pada penderita NPDR ringan, memberikan informasi mengenai pilihan antioksidan yang dapat membantu menangani pasien NPDR stadium ringan sehingga dapat mencegah perkembangan menjadi stadium lanjut, memberikan informasi pilihan dosis antioksidan yang dapat diberikan untuk penderita NPDR ringan, sehingga dapat menjadi prosedur standar dan penanganan penderita NPDR ringan lebih optimal, tidak hanya observasi rutin setiap 9 bulan saja.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Zheng Y, He M, Congdon N. The Worldwide epidemic of Diabetic Retinopathy. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2012;60(5):428-31.
2. American Academy of Ophthalmology and staff. *Retina and Vitreus*. United State of America: American Academy of Ophthalmology, 2011-2012; h. 109-32.
3. Kowluru RA, Chan P. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:1-12.

4. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. *Pathophysiology of Diabetic Retinopathy*. *ISRN Ophthalmology*. 2013;2013:1-13.
5. Duh EJ. *Retinal Neovascularization and the role of VEGF*. Dalam: Duh EJ, penyunting. *Diabetic Retinopathy (Contemporary Diabetes)*. New Jersey: Humana Press; 2008. h. 353-73.
6. Willard AL, Herman IM. *Vascular complications and Diabetes: Current Therapies and Future Challenges*. *Journal of Ophthalmology*. 2012;2012:1-14.
7. Kowluru RA, Menon B, Giehart DL. Beneficial effect of zeaxanthin on retinal metabolic abnormalities in diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49:1645-50.
8. Subramaniam P, Jay WH. Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Frontiers in bioscience*. 2004;9:565-74.
9. Dutta LC. *Modern Ophthalmology*. 3<sup>rd</sup> edition. New Delhi: Jaypee Brothers; 2005.
10. Marcello S, Monica Z, Marco B, Donatella F, Giancarlo F. Lutein, Zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *Journal of photochemistry and photobiology*. 2007;88:1-10.
11. Izumi-Nagai K, Nagai N,

- Ohgami K, Satofuka S, Ozawa Y, Tsubota K. dkk. Inhibition of Choroidal Neovascularization with an Anti-Inflammatory Carotenoid Astaxanthin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008;49(4):1679-85.
12. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* 2006;69:443-9.
  13. Ishida S. Lifestyle-related disease and anti-aging ophthalmology: suppression of retinal and choroidal pathologies by inhibiting renin-angiotensin system and inflammation. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2009;113(3):403-22.
  14. Osterlie M, Bjerkeng B, Liaaen-Jensen S. Bioavailability and Deposition of Bent Z-Isomers of Astaxanthin. Dalam: Mosquera MI, Galan MJ, Mendez DH, penyunting. *Proceeding of the 1<sup>st</sup> International Congress Pigments in Food Technology*; 1999 24-26 Maret; Sevilla, Spanyol. Spanyol; 1999. h. 157-161.
  15. Nagaki Y, Mihara M, Takahashi J, Kitamura A, Horita Y, Sugiura Y, dkk. The effects of astaxanthin on retinal capillary blood flow in normal volunteers. *J. Clin. Therap. Med.* 2005;21(5):537-42.
  16. Satoh A, Tsuji S, Okada Y, Murakami N, Urami, Nakagawa K, dkk. Preliminary clinical evaluation of toxicity and efficacy of a new astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;44(3):280-4.
  17. Fasset RG, Coombes JS. Astaxanthin: A Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Marine Drugs.* 2011;9:447-65.
  18. Annal DM, Elvira A, Chi CC, George FR, Kiran A, Gordon B. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2005;46:4295-301.
  19. Doganay S, Evereklioglu C, Er H, Türköz, Sevinç A, Mehmet M, dkk. Comparison of serum NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patient with diabetes mellitus. *Eye Nature publishing group.* 2002;16:164-70.

**Footnote:**

- Obat dalam penelitian ini disponsori oleh perusahaan farmasi PT Interbat
- Terima kasih kepada dr. Putu Budhiastra, SpM (K) dan Prof. DR. dr. I Gde Raka Wadiana, Sp.PD-KGH atas supervisi dalam penelitian ini
- Protokol penelitian ini disusun bersama oleh keempat penulis. Urutan penulis disesuaikan dengan urutan abjad.