

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan terjadinya hiperglikemi yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin dan atau kerja insulin, sehingga terjadi abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein.¹² Secara klinik Diabetes mellitus adalah sindroma yang merupakan gabungan kumpulan gejala-gejala klinik yang meliputi aspek metabolik dan vaskuler yaitu hiperglikemi puasa dan post prandial, aterosklerotik dan penyakit vaskuler mikroangiopati, serta hampir semua organ tubuh akan terkena dampaknya.^{12,13} Diagnosis DM menurut PERKENI atau yang dianjurkan ADA (American Diabetes Association) jika hasil pemeriksaan gula darah: 1) Kadar gula darah sewaktu lebih atau sama dengan 200mg/dl; 2) Kadar gula darah puasa lebih atau sama dengan 126 mg/dl; 3) Kadar gula darah lebih atau sama dengan 200mg/dl pada 2 jam setelah beban glukosa 75 gram pada tes toleransi glukosa.¹⁴

2.1.1. Komplikasi diabetes mellitus

Secara garis besar komplikasi diabetes mellitus dibagi 2 yaitu: 1) Komplikasi metabolik; 2) Komplikasi vascular jangka panjang. Komplikasi metabolik yang paling sering ditemui adalah pada DM tipe 1 yaitu ketoasidosis diabetik (DKA), yang ditandai dengan adanya hiperglikemi (gula darah > .300 mg/dl), asidosis metabolik akibat penimbunan benda keton dan diuresis osmotik. Sedang komplikasi vaskular

jangka panjang melibatkan pembuluh-pembuluh darah kecil (mikroangiopati) diantaranya retinopati diabetik, nefropati diabetik, neuropati diabetik, dan komplikasi pembuluh darah sedang maupun besar (makroangiopati) antara lain aterosklerosis, ganggren pada ekstremitas dan stroke akibat DM.¹⁵

Peningkatan glukosa yang menahun (glukotoksisitas) pada penderita yang mempunyai predisposisi genetik merupakan faktor utama sehingga menimbulkan komplikasi diabetes melalui 4 jalur yaitu :

2.1.1.1. Jalur pembentukan AGEs (advanced glycation end products)

Jalur pembentukan AGEs (advanced glycation end products) jalur non enzimatis, adalah proses perlekatan glukosa secara kimiawi ke gugus amino bebas pada protein tanpa bantuan enzim. Derajat glikosilasi non enzimatis tersebut berkaitan dengan kadar gula darah, karena dalam pemeriksaan ini menghasilkan indeks rerata kadar gula darah selama usia eritrosit 120 hari. Pembentukan AGEs (advanced glycosylation end products) pada protein seperti kolagen, membentuk ikatan silang di antara berbagai polipeptida yang dapat menyebabkan terperangkapnya protein interstisium dan plasma yang tidak terglykosilasi. AGEs juga dapat mempengaruhi struktur dan fungsi kapiler, termasuk glomerulus ginjal yang mengalami penebalan membran basal dan menjadi bocor. AGE's berkaitan dengan reseptor pada berbagai tipe sel seperti sel endotel, monosit, limfosit, makrofag dan sel mesangial. Pengikatan tersebut menyebabkan berbagai aktivitas biologi termasuk migrasi sel neutrofil, pengeluaran sitokin, peningkatan permeabilitas endotel, peningkatan proliferasi fibroblas serta sintesis matrik ekstraseluler.¹⁶

2.1.1.2. Jalur polioliol

Jalur polioliol, merupakan hiperglikemi intrasel dimana glukosa dimetabolisme oleh aldose reduktase menjadi sorbitol. Peningkatan sorbitol akan mengakibatkan berkurangnya kadar inositol yang menyebabkan gangguan osmolaritas membran basal.¹⁶ Jalur polioliol yang merupakan sitosolik monomerik oksidoreduktase yang mengkatalisa NADPH- dependent reduction dari senyawa karbon, termasuk glikosa. Aldose reduktase mereduksi aldehyd yang dihasilkan oleh ROS (reactive oxygen species) menjadi inaktif alkohol serta mengubah glukosa menjadi sorbitol dengan menggunakan NADPH sebagai kofaktor. Pada sel, aktivitas aldose reduktase cukup untuk mengurangi glutathione (GSH) yang merupakan tambahan stres oksidatif. Sorbitol dehydrogenase berfungsi untuk mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa menggunakan NAD sebagai kofaktor.¹⁷

2.1.1.3. Jalur Protein kinase C

Protein Kinase C, Hiperglikemi dalam sel akan meningkatkan sintesis molekul diasil gliserol yang merupakan kofaktor penting pada aktivasi PKC, yang akan menimbulkan berbagai efek ekspresi gen.¹⁸

Aktivasi protein kinase C (PKC), yang berefek terhadap:^{18,19,20}

1. Produksi molekul proangiogenik VEGF yang berimplikasi terhadap neovaskularisasi, karakteristik komplikasi diabetik.
2. Peningkatan aktivitas vasokonstriktor endotelin-1 dan penurunan aktivitas vasodilator endothelial nitrit oksida sintase (eNOS).

3. Produksi molekul profibrinogenik serupa TGF- β yang akan memicu deposisi matrik ekstraseluler dan material membran basal.
4. Produksi molekul prokoagulan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), memicu penurunan fibrinolisis dan kemungkinan terjadinya oklusi vaskuler.
5. Produksi sitokin pro-inflamasi oleh sel endotel vaskuler.

2.1.1.4. Pembentukan reactive oxygen species (ROS) atau stress oksidatif

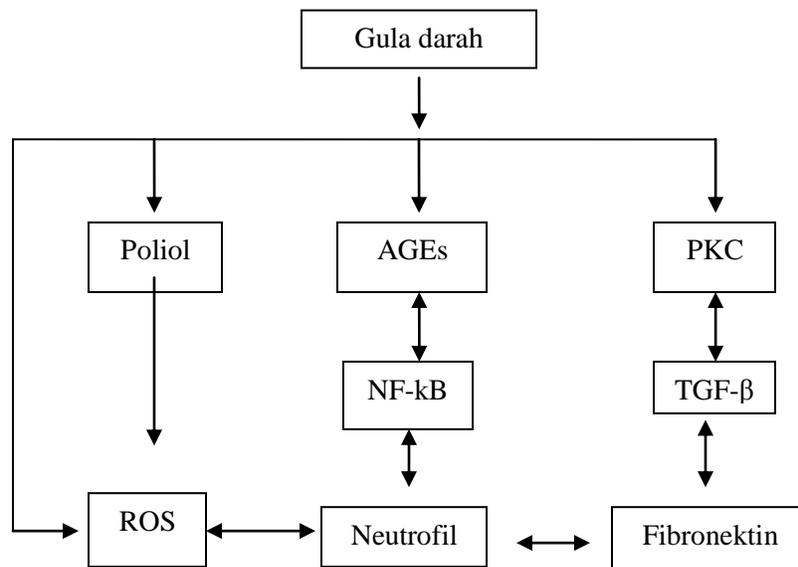
Stres oksidatif timbul bila pembentukan reactive oxygen species (ROS) melebihi kemampuan sel dalam mengatasi radikal bebas, yang melibatkan sejumlah enzim dan vitamin yang bersifat antioksidan. Stres oksidatif pada diabetes mellitus disebabkan karena ketidak seimbangan reaksi redoks akibat perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid, sehingga terjadi penurunan kapasitas antioksidan.^{21,22}

Stres oksidatif dapat meningkat jika terjadi glikasi yang labil, autooksidasi glukosa, aktivitas intrasel jalur poliol. Metabolisme karbohidrat pada hiperglikemi akan menghasilkan energi yang ekuivalen untuk mendorong sintesa ATP di mitokondria yang akan menghasilkan radikal bebas dan superoksida karena pengaruh kadar glukosa yang tinggi. Autooksidasi glukosa juga akan menaikkan radikal bebas menjadi stress oksidatif yang akan menurunkan kadar NO, merusak protein sel, meningkatkan adhesi sel leukosit pada endotel sedang fungsinya sebagai pertahanan terhambat.²³

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menurunkan kadar gula darah dengan menggunakan metode Uji Toleransi Glukosa Oral dan metode diabetes

imbasan aloksan hasil penelitian tersebut adalah ekstrak etanol 70% buah mengkudu mampu menurunkan kadar gula darah.⁸

Keterkaitan antara gula darah/hiperhgikemi, dengan pembentukan reactive oxygen species (ROS), aktivasi NF-kB terhadap sel target (endotel, mesangial dan makrofag) dan pembentukan TGF- β yang akan memicu deposisi matrik ekstraseluler dan membran basal dapat dijelaskan pada bagan:



Gambar 1 : Bagan hubungan gula darah, neutrofil, dan Fibronektin.

Sumber : Brownlee.¹⁸

2.1.2. Kadar gula darah

Glukosa dalam tubuh berfungsi sebagai sumber energi atau kalori. Glukosa dalam darah berasal dari penyerapan usus dari makanan yang mengandung zat tepung/ karbohidrat dari nasi, ubi, jagung, kentang dll, dan sebagian dari pemecahan simpanan energi dalam jaringan(glikogen).²⁴

Mekanisme gula darah masuk melalui dinding usus halus ke dalam aliran darah, glukosa merupakan hasil akhir dari pencernaan dan diabsorpsi secara keseluruhan sebagai karbohidrat. Kadar glukosa darah bervariasi dengan daya penyerapan, glukosa dalam darah menjadi lebih tinggi setelah makan dan akan terjadi penurunan jika tidak ada makanan yang masuk dalam beberapa jam. Glukosa dapat keluar masuk ke dalam sel dan digunakan sebagai sumber energi, glukosa disimpan sebagai glikogen dalam jaringan dan sel hati oleh insulin yaitu hormon yang disekresi oleh pankreas. Glikogen akan diubah kembali menjadi glukosa jika tubuh tidak ada makanan yang masuk sebagai energi oleh glukogen yaitu hormone lain yang dihasilkan oleh pankreas dan hormone adrenalin yang disekresi oleh kelenjar adrenalin.²⁵

Kadar glukosa dalam darah dapat melonjak atau berlebihan/ hiperglikemi keadaan ini akan menjadi penyakit diabetes mellitus (DM), yang merupakan suatu kelainan yang terjadi karena tubuh kekurangan atau kerusakan hormone insulin, yang mengakibatkan glukosa tetap beredar dalam darah dan sukar menembus dinding sel. Kondisi ini disebabkan oleh faktor keturunan, pola makan, stress, infeksi, konsumsi obat-obatan tertentu. Gejala hiperglikemi ditandai dengan poliuri, polidipsi, poliphagia serta cepat lelah.²⁴ . Pengukuran kadar gula darah terdapat beberapa pemeriksaan, menurut jenis pemeriksaan kadar gula darah ada beberapa jenis :²⁶

a. Gula darah puasa, pemeriksaan gula darah dimana pasien sebelum pengambilan darah dipuasakan selama 10-14 jam

b. Gula darah sewaktu, pemeriksaan gula darah yang dilakukan tanpa memperhatikan waktu terakhir pasien makan

c. Gula darah 2 jam, pemeriksaan gula darah yang tidak dapat distandarkan, karena makanan yang dimakan baik jenis maupun jumlahnya sulit diawasi dalam jangka waktu 2 jam, sebelum pengambilan darah pasien perlu duduk istirahat tenang tidak melakukan kegiatan yang berat dan tidak merokok. Menurut metode pemeriksaan kadar gula darah terdapat beberapa metode yaitu ²⁶

a. Metode kimia atau gula reduksi

Prinsip dari metode kimia adalah proses kondensasi dengan akromatik amin dan asam asetat glacial pada suasana panas, sehingga terbentuk senyawa berwarna hijau yang kemudian diukur secara fotometris.

b. Metode enzimatik

b.1. Metode glukosa oksidase

Prinsip dari metode enzimatik adalah enzim glukosa oksidase mengkatalis reaksi glukosa menjadi glukonolakton dan hydrogen peroksida. Enzim glukosa oksidase yang digunakan pada reaksi pertama menyebabkan reaksi spesifik untuk glukosa, sedangkan reaksi kedua tidak spesifik karena zat yang bisa teroksidase menyebabkan hasil pemeriksaan rendah. Asam urat, asam askorbat, bilirubin, dan glutathion akan menghambat reaksi karena zat-zat ini akan berkompetisi dengan kromogen bereaksi dengan hidrogen peroksida sehingga hasil pemeriksaan akan lebih rendah

b.2. Metode heksokinase

Prinsip dari metode ini adalah enzim heksokinase akan mengkatalis reaksi fosforilasi glukosa dengan ATP membentuk glukosa 6- fosfat dan ADP. Enzim kedua yaitu glukosa 6-fosfat dehidrogenase akan mengkatalis oksidasi glukosa 6-fosfat dengan nikotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+).

c. Reagen kering (Glucodr)

Prinsip dari metode ini tes strip menggunakan enzim glukosa oksidase dan didasarkan pada teknologi biosensor yang spesifik untuk pengukuran glukosa, tes strip mempunyai bagian yang dapat menarik darah utuh dari lokasi pengambilan/ tetesan darah ke dalam zona reaksi. Glukosa oksidase dalam zona reaksi akan mengoksidasi glukosa di dalam darah. Intensitas arus elektron akan terukur oleh alat dan terbaca sebagai konsentrasi glukosa dalam darah

2.2. Jumlah neutrofil pada DM

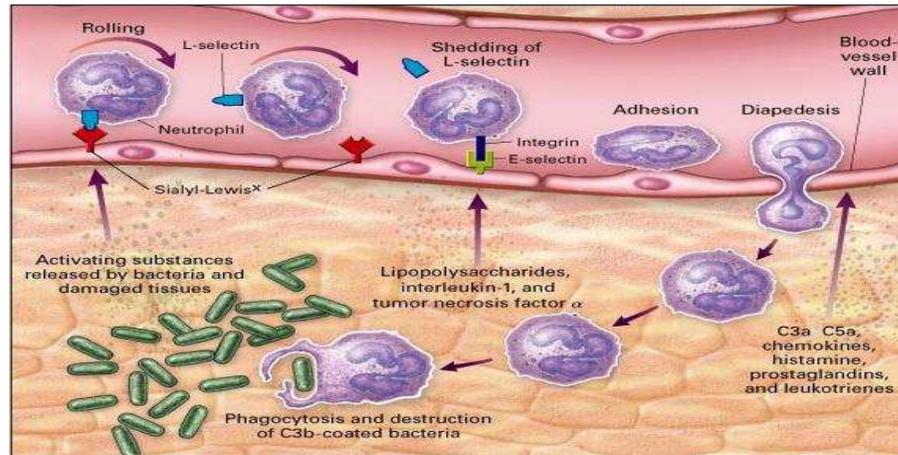
Pemeriksaan laboratorium darah rutin, merupakan pemeriksaan darah yang dilakukan untuk membantu menegakkan diagnose suatu penyakit, selain itu dapat juga digunakan untuk mencari suatu kelainan penyakit yang tidak dapat dideteksi dengan gejala klinis. Pemeriksaan darah rutin dilakukan jika gejala suatu penyakit tidak muncul dan untuk memonitor atau memantau keadaan fisik seseorang yang menderita penyakit menahun. Pemeriksaan darah rutin paling sederhana masih sering dilakukan, dapat dikerjakan secara manual atau dengan alat hitung sel darah otomatis. Pemeriksaan darah rutin terdiri dari :²⁷

- Kadar Hb
- Hematokrit (Hct) atau packed cell volume (PCV)
- Hitung Eritrosit (RBC), lekosit(WBC), trombosit (Plt)
- Indeks Eritrosit (MCV, MCH, MCHC)
- Hitung jenis leukosit
- Evaluasi hapusan darah tepi
- Hitung retikulosit
- Laju endap darah (LED)

Neutrofil (leukosit polimorfonuklear/PMN) adalah granulosit dalam sirkulasi yang berperan dalam inflamasi terhadap infeksi. Jumlah leukosit dalam sirkulasi 70% merupakan neutrofil dengan fungsi utama adalah fagositosis. Neutrofil dari sirkulasi darah menuju jaringan sasaran untuk menghancurkan mikroba. Neutrofil dengan proses kemotaksis berfungsi sebagai fagosit dan bakterisid, dan dengan melepaskan kolagenase yang dapat memperbaiki kerusakan sel merubah matrik ekstraseluler dan membersihkan luka dari sel yang rusak.²⁸

Selama respon inflamasi, pada proses marginasi neutrofil berakumulasi mendekati sel endotel dinding venula, hal ini terjadi karena adanya molekul adhesi yang dilepaskan oleh endotel akibat pengaruh IL-1 yang dihasilkan neutrofil, molekul adhesi tersebut antara lain P-selektin, intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1). Selanjutnya neutrofil bergulir pada permukaan endotel akibat daya dorong aliran plasma, dan penempelan neutrofil pada endotel makin kuat dan bergerak aktif secara diapedesis, kemudian berhenti dan mengeluarkan pseudopodia mengerutkan diri

menyusup melewati celah antara membran sel endotel dan bermigrasi meninggalkan kapiler menuju jaringan target infeksi.²⁸



Gambar 2: Aktivasi neutrofil pada inflamasi. Sumber : Robbin.²⁸

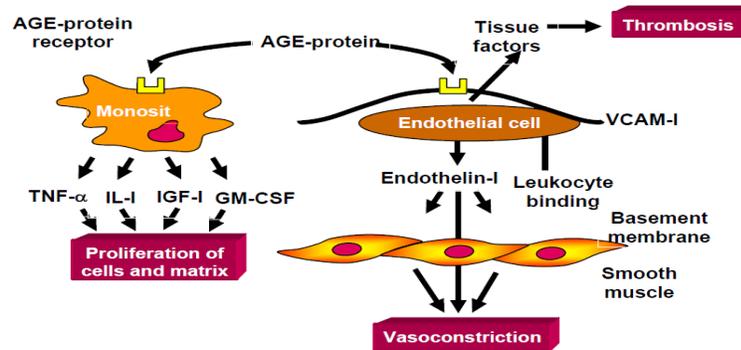
Neutrofil pada kondisi hiperglikemi, akan teraktifasi oleh advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress, angiotensin II dan sitokin.²⁹ Jumlah neutrofil yang tinggi dan mikroalbuminuria pada hiperglikemi menunjukkan adanya resistensi terhadap insulin. Sirkulasi neutrofil berperan dalam perkembangan dan progresi diabetes.²

Neutrofil yang bertindak sebagai pertahanan pertama sel dan pengurangan aktivitas fungsional neutrofil mengakibatkan kerentanan yang tinggi dan tingkat keparahan infeksi pada diabetes mellitus. Penelitian klinis pada penderita diabetes maupun pada tikus diabetes menunjukkan defek yang konsisten pada aktivitas kemotaktis, fagositik dan mikrobioside dari neutrofil. Perubahan lain yang terjadi selama inflamasi pada hewan diabetes antara lain: respon mikrovaskuler menurun terhadap mediator inflamasi seperti histamine dan bradikinin, mengurangi kebocoran

protein dan pembentukan edema, degranulasi sel mast berkurang, gangguan adhesi neutrofil ke endothelium dan migrasi ke situs inflamasi, produksi spesies oksigen reaktif dan berkurangnya pelepasan sitokin dan prostaglandin oleh neutrofil, meningkatkan apoptosis leukosit dan pengurangan dalam kapasitas retensi kelenjar getah bening. Dalam menjalankan fungsinya neutrofil membutuhkan energi, perubahan metabolik (yaitu, jalur glikolitik dan glutaminolitik) mungkin terlibat dalam pengurangan fungsi neutrofil yang diamati pada keadaan diabetes. Jalur metabolik dimana hiperglikemia terkait dengan disfungsi neutrofil termasuk reaksi glikosilasi protein, jalur poliol, pembentukan radikal bebas oksigen, jalur nitric oxide-cyclic guanosine-3'-5'*monophosphate*, dan jalur glikolitik dan glutaminolysis. Glutamin adalah asam amino yang paling banyak dalam plasma dan otot rangka, yang dimanfaatkan oleh neutrofil dan diubah menjadi glutamate, aspartat, asam laktat dan CO₂. Oksidasi parsial glukosa menjadi laktat dan jalur glutaminolitik adalah sumber utama ATP dan produksi metabolit perantara untuk sintesa makromolekul seperti asam lemak dan fosfolipid. Tingginya kadar glukosa dan benda keton mempengaruhi fungsi neutrofil oleh produksi poliol.³⁰

Mekanisme lain yang meningkatkan transfer protein mikrovaskuler oleh neutrofil pada penderita diabetes, khusus perubahan redoks state pada sel endotel akibat metabolisme glukosa melalui polyol pathway, aktivasi protein kinase C dan quenching of nitric oxide oleh advanced glycosylation end products.¹⁸ Keterkaitan antara jumlah neutrofil, C-reaktif protein, AGEs dan berbagai sitokin dengan mikroalbuminuria menunjukkan bahwa kemungkinan neutrofil dan monosit

merupakan prediktor terjadinya mikroangiopati pada penderita DM tipe 2.^{31,32} Sekresi berbagai sitokin proinflamasi dari sel leukosit oleh rangsangan AGE-protein dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 3 : AGE-protein sebagai pemicu terhadap peningkatan sekresi berbagai sitokin proinflamasi oleh sel leukosit. Sumber : Jones.³³

2.3. Fibronektin glomerulus pada DM

Fibronektin adalah suatu matrik ekstra seluler berupa glikoprotein yang terdapat disekitar serat-serat kolagen, berbagai jaringan ikat, dan juga darah mengandung fibronektin sebagai protein plasma. Fibronektin tersusun atas dua rantai polipeptida dengan ukuran 60-70 nm, rantai ini bergabung pada satu ujung melalui beberapa ikatan disulfida.³⁴ Fibronektin merupakan protein ekstraseluler yang membantu sel melekat dengan matriks dan merupakan glikoprotein besar yang ditemukan dalam semua vertebrata. Fibronektin adalah dimer yang tersusun atas 2 subunit yang sangat besar yang terhubung dengan ikatan disulfida pada satu ujungnya. Tipe utamanya disebut ulangan fibronektin tipe III, berikatan dengan

integrin. Tipe ini memiliki panjang sekitar 90 asam amino. Fibronektin muncul dalam bentuk yang dapat larut dan fibrillar. Ada banyak isoform fibronektin yaitu fibronektin plasma dan fibril fibronektin. Fibronektin tidak hanya penting untuk pelekatan sel ke matriks tapi juga untuk menuntun migrasi sel. Fibronektin berfungsi dalam matrik ekstraseluler sebagai protein antara atau jembatan perekat yang menghubungkan sel ke komponen matrik ekstraseluler seperti pada kolagen dan glikosaminoglikan tertentu (heparin) dan dengan reseptor membran yang spesifik pada sel yang responsif.³⁴

Secara histologi pada penyakit ginjal dengan proteinuria progresif, menyebabkan perubahan glomerulus, yang ditandai oleh proliferasi reaktif sel mesangial, infiltrasi makrofag teraktifasi dan deposisi matriks ekstrasel yang berisi fibronektin diantara lamina densa dan lamina rara mesangial dan membrana basalis glomerulus, sehingga menimbulkan hialinosis serta sklerosis fokal dan segmental pada glomerulus.³⁵

Beberapa keadaan yang memegang peranan penting yaitu kelainan pada endotel, membrana basalis glomerulus dan mesangial serta meningkatnya kompleks imun pada diabetes mellitus.³⁶

- a. Endotel, hiperglikemi pada diabetes mellitus akan menyebabkan endotel membengkak akibat timbunan sorbitol dan fruktosa, sehingga faal endotel terganggu yang mengakibatkan celah endotel bertambah luas dan timbulnya proteinuria, kerentanan terjadinya agregasi trombosit akibat sintesis Faktor

VIII meningkat, phosphoglucoisomerase (PGI) sebagai anti agregan menurun dan aktivator plasminogen juga menurun.³⁶

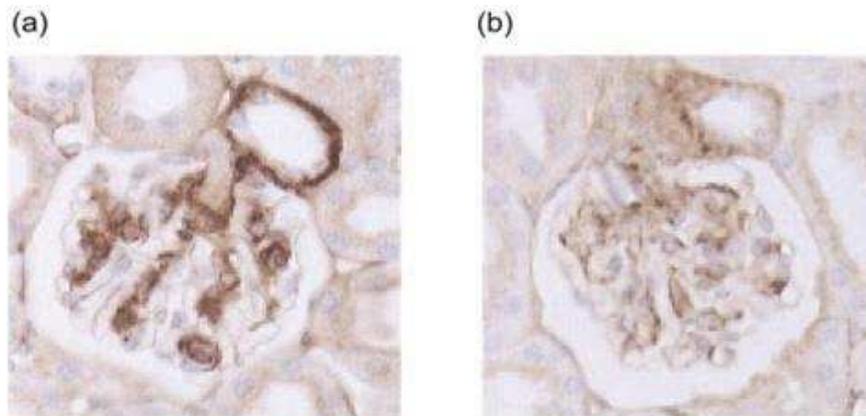
- b. Membrana basalis glomerulus, dengan pusat lapisan lamina densa yang lebih tebal terdiri dari kolagen tipe IV dan laminin sedangkan lapisan perifer yang lebih tipis yaitu lamina rara internal maupun lamina rara eksternal yang terdiri dari fibronektin dan campuran polianionik negatif termasuk heparan sulfat dan glikoprotein.³² Hiperglikemi juga menyebabkan terjadinya penebalan membrana basalis glomerulus sebagai akibat dari deposisi kolagen tipe I, III, IV dan glikoprotein serta menurunnya kadar glikoaminoglikan dan sistein, sehingga menyebabkan hilangnya sifat anionik dari membrana basalis glomerulus yang mengakibatkan permeabilitasnya meningkat dan protein yang ukurannya kecil dari albumin (70 kD) dapat lolos sehingga terjadi albuminuria.⁴³ Albuminuria akan meningkat jika tekanan intraglomerular meningkat. Setelah 2 tahun mengidap diabetes mellitus, membrana basalis glomerulus menebal kurang lebih 15 % dan sesudah 5 tahun menjadi 30%, setelah 20 tahun penebalan menjadi dua kali lipatnya.³⁶
- c. Mesangial, sel mesangial terletak diantara kapiler, matrik mesangial mirip membran basal yang berbentuk seperti jala tempat tersebar nya sel mesangial, sel ini mampu mengeluarkan matrik, kolagen dan sejumlah mediator aktif biologis.^{36,37} Fungsi sel mesangial antara lain : melakukan kontraksi sehingga aliran darah masuk ke glomerulus, mampu menfagosit dan membersihkan debris – debris kompleks imun. Sel mesangial juga mampu melepaskan faktor

pertumbuhan, memproduksi vasoaktif dan immunoregulator mediator radang seperti prostaglandin, dan interleukin. Sel mesangial mempunyai kemampuan untuk membelah. Hiperglikemi menyebabkan produksi matriks mesangial meningkat sehingga pelebaran mesangial terjadi dengan akibat permukaan filtrasi efektif mengecil, dan akhirnya glomerulus tidak berfungsi lagi.

- d. Kompleks imun, pada diabetes kompleks imun meningkat, dan endapan kompleks imun banyak terdapat di membrana basalis glomerulus dan mesangial fagosit RES dan sel mesangial kurang mampu membersihkan sehingga matriks mesangial bertambah lebar dan permukaan filtrasi berkurang.³⁶

Defisiensi insulin pada penderita diabetes mellitus akan menyebabkan ginjal bekerja hiperfungsi. Hiperfungsi ini menyebabkan ginjal menjadi hipertropi dan terjadi peningkatan tekanan intrakapiler glomerulus. Peningkatan tekanan intra kapiler menyebabkan kerusakan glomerulus sehingga terjadi glomerulosklerosis. Namun, ketika terjadi glomerulosklerosis arteriol afferen vasodilatasi dan kerusakan ini menginduksi vasokonstriksi pembuluh darah arteri sistemik sehingga terjadi peningkatan tekanan darah sistemik. Hal ini terjadi karena arteriol afferen yang secara patobiologi hipokontraktil memiliki sedikit autoregulasi. Peningkatan tekanan intraglomerulus menyebabkan peningkatan tekanan darah sistemik dan variasi ini menghasilkan gangguan hemodinamik, gambaran utama yang tampak adalah penebalan membran basalis, ekspansi mesangial (berupa akumulasi matriks

ekstraselular; penimbunan kolagen tipe IV, laminin dan fibronectin) yang kemudian akan menimbulkan glomerulosklerosis noduler (lesi Kimmelstiel-Wilson) dan atau difus, hyalinosis arteriolar aferen dan eferen, serta fibrosis tubulointerstitial.³⁸



Gambar 4 : Imunohistokimia Fibronectin glomerulus a). Fibronectin glomerulus dengan perlakuan minyak wijen b). Fibronectin glomerulus dengan perlakuan RLX. Sumber : Chin.³⁹

Peningkatan tekanan intraglomerulus menyebabkan stress mekanik. Stress mekanik menyebabkan stress fiber kemudian menyebabkan perlekatan matriks ekstraseluler hingga menimbulkan endapan matriks ekstraseluler. Endapan matriks ekstraseluler ini menstimulasi ekspresi growth factor. Growth factor berperan penting dalam perubahan glomerulus menjadi sklerosis karena mediator ini menginduksi pemecahan sementara aktin sitoskeleton dalam sel mesangial, produksi yang tinggi dari fibronectin, kolagen tipe I and IV, hipertropi sel mesangial. Angiotensin II adalah growth factor tambahan yang menstimulasi sel ginjal untuk memproduksi TGF β 1 bersamaan dengan stress mekanik menginduksi vascular endothelial growth

factor (VEGF) dan connective tissue growth factor (CTGF).⁴⁰ Pada diabetes mellitus dengan gangguan faal ginjal yang lanjut, maka permukaan ginjal semakin mengecil dan akhirnya glomerulus tidak berfungsi lagi. Untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada sel mesangial ginjal dapat dilakukan pemeriksaan histopatologi ginjal melalui pengecatan imunohistokimia dengan menggunakan antibody spesifik. Pemeriksaan fibronektin secara imunohistokimia dengan antibody anti fibronektin merupakan pengecatan yang tepat untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada struktur membrane basal glomerulus.³⁹

2.4. Sprague Dawley yang diinduksi STZ

Sprague-Dawley (SD) merupakan tikus hewan coba yang mempunyai kemiripan secara fisiologi dan klinik dengan manusia.⁴¹ Penelitian awal tikus diabetes karena induksi STZ, bahwa jalur poliol berhubungan dengan penurunan renal aktifitas ATPase ginjal. Hiperglikemi menyebabkan pengaturan intraseluler pool dan mioinositol, suatu prekursor diasilgliserol (DAG), kofaktor pada aktivasi ATPase pada protein kinase C(PKC). Mioinositol deplesi berkorelasi path kompetisi glukosa untuk masuk kedalam sel. Pada beberapa jaringan tikus diabetis, termasuk preparasi glomerular, penurunan aktifitas ATPase dilaporkan, berhubungan dengan tingkat mioinositol jaringan.⁴²

Pada tikus, telah dilaporkan bahwa STZ dosis antara 25-100 mg/kg yang disuntikkan melalui intravena mengakibatkan hiperglikemia. Injeksi streptozotocin mengarah pada degenerasi dari sel beta pulau Langerhans. Secara klinis, gejala

diabetes jelas terlihat pada tikus dalam waktu 2-4 hari setelah injeksi intravena atau intraperitoneal 60mg/kg STZ.⁴³ Glukosa darah Tikus SD lebih tinggi secara signifikan paska injeksi STZ, menderita kematian lebih banyak secara signifikan dalam periode waktu yang lebih singkat, diperlukan pengobatan insulin lebih sering selama periode observasi dan tidak memerlukan suntikan STZ kedua.⁴³

Penemuan yang sama dilaporkan bahwa induksi sukrose, insulin resisten pada tikus diabetes disimpulkan, bahwa nefropati disebabkan oleh hiperglikemi dimediasi oleh mekanisme turunya mioinositol dan rendahnya aktifitas ATPase. Hiperglikemi terkait lesi adalah akhir dari poliol pathway disebabkan glikasi glomerulus dan komponen tubulus. Hal ini akan mempengaruhi stress oksidatif yang diakibatkan produksi glikooksidasi dan produksi radikal reaktif oksigen selama hiperglikemi yang persisten yang mengakibatkan interaksi komponen glomerulus dengan AGEs.⁴⁴

Ekspansi mesangial dan GBM thickening timbul pada human diabetes maupun binatang. Sintesis berbagai mesangial dan komponen glomerulus meningkat. Beberapa gangguan metabolik ikut menjadi penyebab. Tingginya tingkat kadar glukosa saja menghambat degradasi dari komponen mesangial pada sel kultur, pada aktifitas PKC dan menurunkan kandungan heparan sulfat proteoglikan. Peningkatan sulfat glomerulus glikosaminoglikan ditemukan pada STZ-tikus diabetes dan berkaitan dengan peningkatan sintesis derivat asam hialuronik. Selain itu tingginya konsentrasi glukosa pada kultur sel glomerulus meningkatkan sintesis fibronectin, laminin dan kolagen lain. Sintesis kolagen mempercepat GBM polipeptid sintesis dan prolin hidroksilasi.²⁸

2.5. Streptozotocin dan Diabetes mellitus

Streptozotocin disebut juga N asetil glukosamin (GlcNAc) masuk ke dalam sel beta pankreas melalui GLUT2 dan mengganggu sel beta dan mengakibatkan penurunan sekresi insulin. Streptozotocin secara selektif menghambat aktivitas sel beta O-GlcNA yang bertanggung jawab terhadap pemindahan O-GlcNAc dari protein. Hal ini menyebabkan O-glikosilasi protein intraselular dan sel beta apoptosis, sehingga menyebabkan toksik pada sel beta pankreas, merupakan sel yang secara normal meregulasi kadar gula darah dengan memproduksi hormon insulin.⁴⁵

Streptozotocin merupakan analog dari glukosa toksis yang terakumulasi dalam sel beta pankreas melalui transporter glukosa GLUT2. Streptozotocin menghambat sekresi insulin, streptozotocin merupakan nitrosourea di mana N-metil-N-nitrosourea (MNU) bagian terkait pada karbon-2 dari heksosa. Kerja streptozotocin dan senyawa kimia yang berkaitan alkilasi membutuhkan serapan ke dalam sel. Nitrosoureas biasanya lipofilik dan diserap jaringan melalui membran plasma berlangsung cepat. Namun sebagai akibat dari substitusi heksosa, streptozotocin kurang lipofilik. Streptozotocin secara selektif terakumulasi dalam sel beta pankreas melalui afinitas rendah GLUT2 glukosa transporter di membran plasma. Dengan demikian, sel yang memproduksi insulin tidak mengekspresikan transporter glukosa bersifat tahan terhadap streptozotocin. Pentingnya transporter glukosa GLUT2 dalam proses ini juga ditunjukkan oleh pengamatan bahwa streptozotocin merusak organ lain yang mengekspresikan transporter ini, khususnya ginjal dan hati. Meskipun streptozotocin juga protein termetilasi, metilasi DNA bertanggung jawab atas kematian sel beta,

tetapi kemungkinan bahwa metilasi protein memberikan kontribusi terhadap cacat fungsional dari sel beta setelah terpapar streptozotocin.⁴⁶

Streptozotocin menginduksi diabetes paling sering digunakan pada penelitian model binatang tikus, karena lebih awal menimbulkan lesi mikroangiopati, seperti penebalan membrana basalis. Fibrosis ginjal merupakan penyebab perkembangan DN. Makrofag mensekresi sitokin: interleukin (IL), PDGF, FGF-2, TGF- β yang berperan penting dalam induksi respon profibrotik dalam sel ginjal (proliferasi miofibroblas) dan produksi matriks ekstraselular. Diabetes dapat menstimulasi monosit untuk memproduksi IL-1, PDGF, FGF-2 dan TGF- β . Akumulasi makrofag berhubungan dengan progresifitas injury ginjal dan kerusakan glomerulus dan tubulus pada tikus diabetes tipe I maupun tipe II. Kerusakan glomerulus pada diabetes karena induksi STZ disebabkan makrofag dan menyebabkan kerusakan glomerulus dan tubulus.^{46,47}

Efek metabolik dari streptozotocin pada hiperglikemia, sedangkan keton dan plasma free fatty acid normal. Peneliti lain mengatakan keduanya menimbulkan destruksi sel beta dan tidak toksisitas ekstrapankreatik. Namun demikian, dibandingkan dengan aloxan, streptozotocin lebih efektif dalam induksi diabetes pada binatang percobaan^{48,49}

2.6. Ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L

Ekstrak etanol buah *Morinda citrifolia* L merupakan hasil ekstraksi buah *Morinda citrifolia* L dengan pelarut etanol 70%. Buah *Morinda citrifolia* L

mengandung berbagai senyawa yang penting bagi kesehatan, antrakuinon dan skopolektin merupakan zat aktif anti mikroba serta mengandung enzim proxeronine

2.6.1. Antioksidan pada *Morinda citrifolia* L

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi dari species oksigen reaktif dan radikal bebas.⁹ Antioksidan yang terdapat dalam ekstrak etanol *Morinda citrifolia* antara lain vitamin E dan flavonoid. Flavonoid berfungsi sebagai penangkap (scavenger) anion superoksida dan radikal hidroksi. Flavonoid juga mendonorkan atom hidrogen ke radikal peroksi membentuk radikal flavonoid yang mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga reaksi radikal rantai berhenti(terminasi)⁵⁰

Reaksi oksidasi yang terjadi pada diabetes mellitus adalah reaksi glikasi yaitu reaksi non enzimatis antara asam amino (protein) dengan gugus aldehid dari glukosa yang akan menghasilkan senyawa dikarbonil dan advanced glycation end products (AGEs). AGEs merupakan hasil reaksi yang bersifat ireversibel yang mendasari komplikasi diabetes.⁵¹

Buah *Morinda citrifolia* L dapat menghambat laju pembentukan senyawa dikarbonil dan AGEs karena kandungan vitamin C, yang dapat menghambat pembentukan radikal superoksida, radikal hidroksil, radikal peroksil, dan hidrogen peroksida. Kandungan vitamin C dapat mencegah terjadinya komplikasi diabetes dengan menurunkan kadar sorbitol dan glikosilasi protein.⁵³

2.6.2. Aktivitas imunologi *Morinda citrifolia* L

Sistem imun adalah mekanisme untuk melindungi dan mempertahankan tubuh dari bahaya yang menyerang (infeksi).⁵¹ Penderita diabetes mellitus mempunyai kerentanan terhadap infeksi. Xeronin yang terkandung dalam *Morinda citrifolia* dapat meningkatkan sistem kekebalan dan memperbaiki sel yang rusak. Xeronin merupakan imunomodulator senyawa yang mampu mempengaruhi sistem imun/kekebalan.dengan mengaktifkan kelenjar timus.⁵¹ Kelenjar timus merupakan organ penting dalam tubuh dengan membentuk sel T yang terlibat dalam sistem kekebalan dengan menstimulasi pertumbuhan kelenjar timus akan mempengaruhi aktivitas sel T.⁵¹

2.6. 3. Aspek keamanan ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L

Perkembangan hasil penelitian *Morinda citrifolia* L yang telah dilakukan bahwa dosis *Morinda citrifolia* L LD₅₀ intraperitoneal injeksi aqueous dan ekstrak etanol adalah 7500 mg/kg atau 3500 mg/kg berat badan.⁵² LD₅₀ pada methanol ekstrak ditemukan lebih besar dan 1000 mg/kg intraperitoneal injeksi pada mencit jantan usia 4 minggu. Hasil pengujian toksisitas jus *Morinda citrifolia* L pada tikus Sprague Dawley dengan dosis 80 ml/kg berat badan hewan uji tidak menunjukkan efek negatif.^{53,54}

