

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. VEGF pada Diabetes Melitus

Pada diabetes melitus semua sel dalam jaringan berada dalam lingkungan hiperglikemia, tetapi sebagian sel mampu mengurangi transport glukosa dalam sel, ketika mengalami hiperglikemia, sehingga konsentrasi glukosa internal mereka tetap konstan, sebaliknya sel-sel yang rusak akibat hiperglikemia adalah mereka yang tidak dapat melakukan hal tersebut secara efisien. Tipe sel yang mudah dirusak oleh hiperglikemia adalah sel-sel endotel kapiler di retina, sel-sel mesangial dalam glomerulus ginjal dan neuron serta sel schwan disaraf perifer.^{15,16}

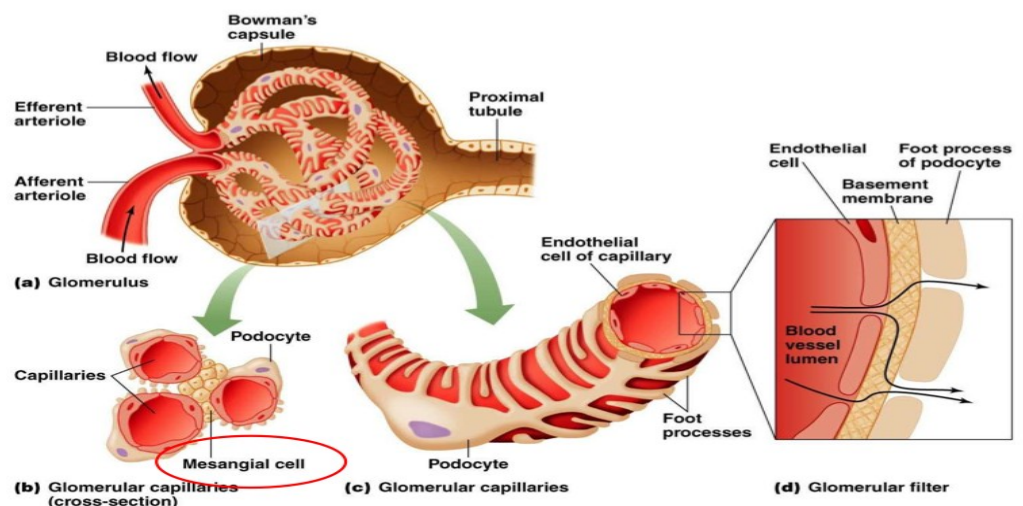
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan faktor pertumbuhan endotel spesifik yang menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel endotel, meningkatkan permeabilitas vaskuler, memediasi vasodilatasi endotelium, dan berpartisipasi dalam remodeling matriks interstitial. Pada ginjal, ekspresi VEGF yang paling menonjol dalam podosit glomerulus (sel epitel visceral glomerulus) dan sel epitel tubular, sedangkan reseptor VEGF terutama ditemukan pada preglomerular, glomerulus, dan sel endotel peritubular.^{17, 18}

Overekspresi VEGF menyebabkan angiogenesis patologis pada tumor dan diabetes melitus.¹⁹ Peningkatan ekspresi VEGF berpotensi merugikan

fungsi ginjal, menginduksi ekspresi VEGF di podosit dan sel mesangial. Peningkatan ekspresi VEGF awalnya menginduksi proliferasi sel endotel dan sel mesangial yang menyebabkan hipertropi podosit. Mekanisme VEGF menginduksi hipertrofi podosit tidak diketahui, tetapi mungkin dapat dimediasi secara autokrin karena podosit tidak hanya memproduksi VEGF tetapi juga mengekspresikan reseptor VEGF¹⁷. Podosit memainkan peran penting dalam menjaga *barrier* filtrasi glomerulus karena podosit berkontribusi struktural dengan penyediaan celah diafragma dan membran basal glomerulus. VEGF glomerular juga berfungsi dalam pemeliharaan endotelium glomerulus (termasuk menjaga *fenestration*) dan / atau permeabilitas selektif makromolekul.

Kehilangan fungsi fisiologis glomerulus dalam mempertahankan selektivitas makromolekul dari *barrier* filtrasi glomerulus sebagai salah satu mekanisme yang bertanggung jawab pada proteinuria. VEGF berasal dari podosit dapat mengikat sel-sel endotel kapiler melalui reseptor VEGF yang mengakibatkan peningkatan hiperfiltrasi glomerulus. Penelitian terhadap hewan coba kelinci yang mengalami hipertrofi podosit, dimungkinkan terjadi permeabilitas atau hiperfiltrasi glomerulus dengan mengubah *fenetration* kapiler atau komponen membran basement. Mekanisme lainnya melalui induksi oksida nitrat prostasiklin, VEGF dengan merangsang peningkatan sintesis kolagenase oleh sel endotel yang mengakibatkan gangguan proteolitik dari membran sel.²⁰

Pada hewan diabetes, Nyengaard dan Rasch mengidentifikasi kapiler glomerulus yang abnormal dalam model hewan tikus, diinduksi oleh streptozotocin. Pada hari ke- 10 dan 50 hari setelah injeksi, total rata-rata luas permukaan, panjang dan jumlah kapiler glomerulus yang meningkat dibandingkan pada kelompok kontrol. Pada pemeriksaan imuhistokimia menunjukkan pembentukan pembuluh darah yang berlebihan pada diabetes. Pembuluh yang abnormal ditemukan pada diabetes memiliki dinding tipis di membran basal, sementara sel-sel endotel bengkak, menunjukkan bahwa secara struktural belum matang dan mampu, sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Peningkatan permeabilitas kapiler sering mengakibatkan ekstrasvasi protein plasma serta pembentukan lesi pada nefropati diabetes.¹⁴

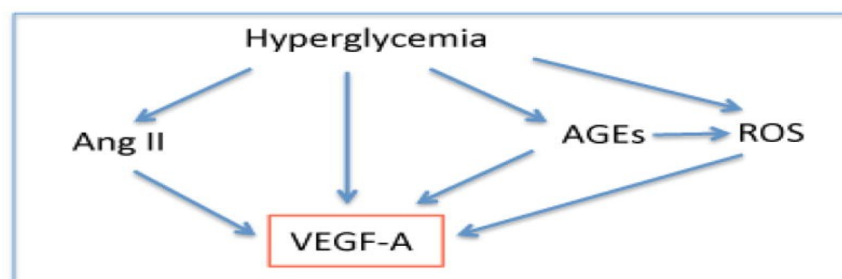


Gambar 1. Dinding kapiler glomerulus sebagai filter biologis kompleks.
Sumber: Christopher C, 2012

2.2. Faktor-Faktor yang mempengaruhi Ekpresi VEGF

Beberapa mediator mengatur ekspresi VEGF pada ginjal diabetes. Sekresi VEGF terutama disebabkan oleh hipoksia.²¹ Model hewan diabetes melitus tipe I, pada tikus diabetes yang diinduksi *streptozotosin* (STZ) mengalami hipoksia ginjal⁴

Hiperglikemia juga mengatur Angiotensin II (Ang II) dalam sel tubulus proksimal tikus, yang menginduksi ekspresi VEGF melalui *spesies oksigen reaktif* (ROS) dan jalur ERK. *Advanced glycation end products* (AGEs) mengatur tingkat VEGF mRNA melalui faktor transkripsi seperti nuclear factor-kB (NF-kB) dan aktivator protein-1 (AP-1). Selain itu, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), yang diekspresikan dalam sel endotel glomerulus diabetes, meningkatkan konsentrasi protein VEGF pada sel epitel tubular tikus.⁴ Stres oksidatif pada diabetes mellitus hasil dari oksigen dan nitrogen spesies reaktif berlebih (ROS / RNS) yang berasal dari angiotensin II⁷, oksidasi glukosa, dan AGEs, yang tidak dibersihkan oleh antioksidan (SOD, *katalase*, *glutathione peroxidase*). ROS / RNS meningkatkan VEGF dengan menstabilkan HIF-1 α .⁸



Gambar 2. Pathways peningkatan VEGF pada diabetes Melitus
Sumber : Alda Tufro & Delma Veron, 2012

2.2.1.Hipoksia

Hipoksia berperan dalam penyakit ginjal stadium awal dan terjadi sebelum ditemukan jejas pada struktur tubulo interstisial. Gangguan pada kapiler glomerulus, seperti glomerulosklerosis, mengakibatkan penurunan perfusi peritubular dan asupan oksigen tubulus. Peningkatan kebutuhan metabolisme, sel mungkin mengalami keadaan hipoksia relatif walaupun aliran darah normal. Pada penelitian menggunakan teknik *blood oxygen level-dependent* (BLOD), *magnetic resonance imaging* (MRI) menunjukkan induksi streptozotosin pada ginjal penderita diabetes terjadi hipoksia jaringan pada fase awal, sebelum terjadi perubahan struktur.²²

Penurunan pO₂ di medula ginjal menimbulkan hipoksia yang diinduksi oleh *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF). Faktor ini mengatur transkripsi VEGF mRNA. Kadar glukosa tinggi (HG) merangsang produksi VEGF di podosit, melalui aktivasi protein kinase C (PKC) dan *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK).⁴ Ekskresi NO₂ dan NO₃ urin, menunjukkan adanya peningkatan metabolisme NO pada diabetes, hal ini berhubungan dengan peningkatan ekspresi sintesis gen NO dan peningkatan produksi NO. Selain itu, peningkatan keduanya pada sintesis ekspresi gen NO dan produksi NO dapat dihambat oleh PKC inhibitors pada saat terjadi hiperglikemi, hal ini menunjukkan produksi NO meningkat pada diabetes melalui induksi PKC yang menyebabkan sintesis NO. Hasil studi melaporkan NO dan *cyclic guanosine monophosphate* mengalami penurunan pada glomerulus tikus

diabetes, PKC inhibitor mengembalikan produksi *cyclic guanosine monophosphate*. Berdasarkan hal tersebut, terdapat kemungkinan bahwa glukosa yang tinggi dapat menyebabkan aktivasi PKC yang dapat mengatur hemodinamika ginjal dengan peningkatan atau penurunan kadar NO tergantung pada jenis sel dan durasi hiperglikemia . Peningkatan permeabilitas vaskuler merupakan karakteristik kelainan vaskuler lain pada hewan coba diabetes melitus yang menunjukkan disfungsi sel endotel.

Aktivasi PKC secara langsung meningkatkan permeabilitas albumin dan makromolekul lainnya melalui barrier yang dibentuk oleh sel endotel dengan phosphorylating cytoskeletal protein membentuk persimpangan intraseluler. Selain itu, aktivasi PKC juga dapat mengatur permeabilitas pembuluh darah dan neovaskularisasi melalui ekspresi faktor pertumbuhan seperti VEGF yang telah dibuktikan sebagai faktor utama patogenesis diabetes retinopathy. Tidak menutup kemungkinan bahwa peningkatan VEGF bertanggungjawab terhadap peningkatan permeabilitas vaskuler. Pada ginjal, peran aktivasi PKC dalam genesis albuminuria tidak dijelaskan secara jelas, mengingat bahwa barrier glomerulus filtrasi terdiri dari tiga bagian, yaitu sel endotel glomerulus, membran basal dan podosit.⁸

2.2.2. Sistem Renin Angiotensin

Diabetes dikaitkan dengan peningkatan plasma aktivitas renin, peningkatan kadar *angiotensin converting enzyme* (ACE) dan angiotensin II (Ang II). Ang II-AT1 dimediasi hipertensi glomerulus dan albuminuria. Ang

II meningkatkan VEGF, TGF β , dan stres oksidatif.²³ Peningkatan ACE diinduksi oleh diabetes, meningkatkan degradasi bradikinin, menurunkan ketersediaan NO.¹⁹ Peningkatan aktifitas angiotensin II dan produksi prostaglandin akibat hiperglikemi menyebabkan penurunan resistensi arteriol, sehingga menyebabkan peningkatan tekanan filtrasi glomerulus. Vasokonstriksi meningkatkan kontak antara elemen darah yang beredar dan dinding pembuluh, yang mengarah ke generasi superoksida ion oleh endotelium. *Transactivation* bradikinin reseptor 2 dan VEGFR2 menginduksi aktivasi eNOS.^{22, 1} Peningkatan ang II berperan penting dalam patogenesis diabetes nefropati, hal ini disebabkan penyempitan arteri preferensial eferan glomerulus sehingga terjadi peningkatan permeabilitas kapiler.²⁴

2.2.3. Reactive Oxygen Spesies and Nitric oxide

Stres oksidatif berperan penting dalam diabetes melitus serta komplikasinya²⁵. ROS / RNS meningkatkan VEGF dengan mengaktifkan dan menstabilkan HIF-1 α serta takik sinyal VEGF mengaktifkan eNOS melalui PI3K/Akt yang merangsang nitric oxide (NO). Adanya superoksida (O₂⁻), NO⁻ cepat membentuk peroxynitrite (ONOO⁻), efektif meningkatkan ROS daripada NO.¹⁹ Didalam ginjal, menunjukkan bahwa hiperglikemi dapat meningkatkan aktivitas PKC yang menyebabkan aktivasi dari beberapa isoform dari nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (bentuk turunan; NADPH) oksidase, sehingga menghasilkan oksidan yang berlebihan. Peningkatan kadar oksidan yang berkombinasi dengan PKC menyebabkan

aktivasi mitogen-activated kinase menyebabkan produksi berlebihan *fibrotic growth factor*.⁸

2.2.4. Advanced Glycation end Products (AGEs)

Advanced glycation end products (AGEs) menginduksi peningkatan VEGF-A in vitro dan in vivo. AGEs mengikat beberapa reseptor (RAGE dan AGE-R1-3) yang terletak di beberapa jenis sel ginjal, termasuk podosit. Interaksi AGE-RAGE mengaktifkan NADPH oksidase, sehingga meningkatkan sitosol ROS, dan mengaktifkan PKC dan jalur NF yang mengarah untuk melepaskan VEGF, TGF β dan CTGF. Serta menyebabkan produksi sitokin inflamasi dan generasi mitokondria ROS yang lebih lanjut menyebabkan stres oksidatif yang menyebabkan gangguan atau kerusakan pada ginjal^{29,26}. Penghambatan NADPH oksidase atau PKC α pada tikus diabetes menurun VEGF-A, superoksida, kolagen IV dan akumulasi fibronektin, albuminuria dan glomerulosklerosis.¹⁹

2.3. Mediator yang menghambat Ekspresi VEGF

Beberapa terapi yang telah dikembangkan sebagai antidiabetik yang dapat menurunkan ekspresi VEGF, seperti *Morinda citrifolia L*, dan pada *Phaleria macrocarpa* dapat menurunkan hingga 25% ekspresi VEGF pada glomerulus melalui antioksidan yang terkandung didalamnya^{12,13}. Inhibitor VEGF yang dikembangkan antara lain : Iressa, Tarceva, *sequestration of VEGF*: bivacizumab, ranibizumab dan pengabtanib. Memblokir ikatan VEGF

dan VEGFR: DC101, menghambat reseptor tyrosine kinase seperti pada obat sunitinib dan sorafenib.¹⁴

2.4. Daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp.)

2.4.1. Morfologi Daun Salam

Daun salam adalah daun *Syzygium polyanthum* (wight.) Walp²⁷. Daun tunggal, letak berhadapan, bertangkai yang panjangnya $\frac{1}{2}$ - 2 cm. Helaian daun berbentuk lonjong sampai elips atau bundar telur sungsang, ujung meruncing, pangkal runcing, tepi rata, panjang 5-15 cm, lebar 3-8 cm, pertulangan menyirip, permukaan atas licin berwarna hijau tua, permukaan bawah warnanya hijau muda. Daun bila diremas berbau aromatik lemah; rasa kelat atau sepat; harum adstringen.²⁸



Gambar 3 : Daun salam (*Syzygium polyanthum*)
Sumber : Raden Arthur Ario Lelono and Sanro Tachibana, 2013

2.4.2. Taxonomy daun salam

Secara ilmiah, daun salam bernama *Eugenia polyantha* Wight dan sinonim adalah *Eugenia lucidula* Miq dan *Syzygium polyanthum* Wight.²⁹

Tanaman ini pada divisi *Spermatophyte*, sub-divisi *Pinophyta*, kelas *Coniferopsida*, pada keluarga *Eugenia*, suku atau genus *Myrtaceae* dan merupakan spesies *Eugenia polyanthum* (Wight) walp. Di beberapa wilayah atau provinsi di Indonesia, daun salam dikenal sebagai meselangan (Sumatera), Ubar serai (Melayu), salam (Jawa, Sunda, Madura), Gowok (Sunda), Manting (Jawa) atau kastam (Kangean).³⁰

2.4.3. Peran Daun Salam menurunkan VEGF Podosit Glomerulus DM

Daun Salam dapat dimanfaatkan dalam meningkatkan citarasa masakan, juga dikenal secara tradisional dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol tinggi, diare, hipertensi dan diabetes melitus. Tanaman obat adalah bagian terapeutik penting untuk berbagai penyakit karena mengandung banyak senyawa metabolit sekunder dengan nilai-nilai terapeutik³¹. Pada ekstrak etanolik daun dosis 2,62 mg/20 grBB dan 5,24 mg/20 grBB dapat menurunkan secara bermakna kadar glukosa darah mencit jantan yang diinduksi aloksan.¹⁹ Dugaan glikosida flavonoid yang terkandung dalam daun tersebut bertindak sebagai perangkap radikal hidroksil sehingga mencegah aksi diabetogenik dari aloksan. Skrining tanaman untuk efek penghambatan pada aktivitas alpha glukosidase in vitro: dari sebelas tanaman dipilih, *E. polyantha* Wight menunjukkan potensi aktivitas antidiabetes melalui penghambatan alpha glukosidase (95%) dengan menurunkan penyerapan glukosa dalam darah, ditunjukkan dalam glukosa plasma

postprandial. Selain itu daun salam juga berfungsi sebagai antioksidan (87%).³²

Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam mengandung alkaloid, karbohidrat, tanin, steroid, triterpenoid, dan flavonoid, serta saponin pada buah Salam³¹. Daun salam juga terdapat kandungan kimia berupa minyak atsiri, sitral dan eugenol.²⁸ Uji Fitokimia menunjukkan aktivitas obat dan aktivitas fisiologis. Saponin menunjukkan sifat hipokolesterolemik, steroid dan triterpenoid ditampilkan sifat analgesik. Flavonoid telah dilaporkan memiliki antibakteri, antioksidan, anti-inflamasi, anti alergi, antimutagenik, dan aktivitas vasodilatasi.³¹

Berdasarkan hasil penelitian, bahwa flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidatif serta berperan dalam mencegah kerusakan sel dan komponen selularnya oleh radikal bebas reaktif. Peran antioksidan flavonoid dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon. Bentuk senyawa flavonoid pada daun salam seperti gallic acid, eugenol, kaemferol dan quercetin yang berkontribusi dalam antioksidan.³³

Stres oksidatif pada diabetes melitus hasil dari oksigen dan nitrogen spesies reaktif berlebih (ROS / RNS) yang berasal dari jalur poliol, oksidasi glukosa, AGEs, dan mitokondria rantai transfer elektron, yang tidak dibersihkan oleh antioksidan (SOD, katalase, glutathione peroxidase). ROS /

RNS meningkatkan VEGF dengan mengaktifkan dan menstabilkan HIF-1 α serta sinyal VEGF mengaktifkan eNOS melalui PI3K/Akt, dan dengan demikian merangsang nitric oxide (NO). NO[•] cepat membentuk peroxynitrite (ONOO⁻) dengan adanya superoksida (O₂^{•-}), efektif meningkatkan ROS daripada NO. Flavonoid sebagai antioksidan yang terdapat pada daun salam dapat menghambat ekspresi VEGF, akibat peningkatan ROS.¹⁹

Daun salam yang digunakan sebagai antidiabetik ataupun antioksidan, hanya ditentukan berdasarkan satu tempat, pohon salam berusia 7 tahun dengan ketinggian 3-5 meter dengan diameter 20 cm. kemudian dipotong kecil-kecil dan dibuat ekstrak.³² dikeringkan dalam tiga hari dan di blender³¹.

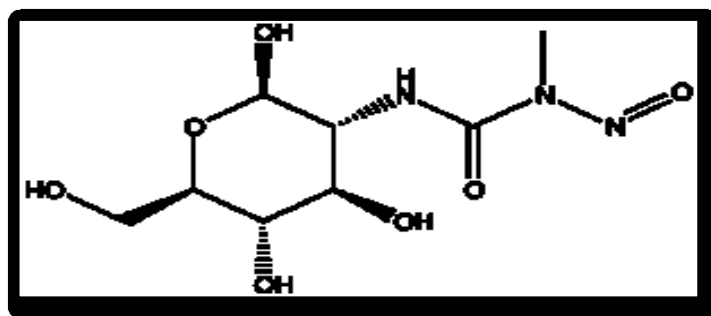
2.5. Streptozotocin (STZ)

Penelitian tentang diabetes melitus dilakukan menggunakan hewan percobaan didasarkan pada pathogenesis penyakit tersebut pada manusia. Menurut Cheta (1998) berdasarkan metoda pelaksanaannya hewan percobaan diabetes mellitus dibedakan menjadi dua yaitu:

- a. spontan (*spontaneous*), menggunakan tikus BB (*bio breeding*) atau mencit NOD (*non-obese diabetic*). *Spontaneous animal models* mempunyai karakteristik yang relatif sama dengan kondisi diabetes melitus pada manusia meliputi gejala penyakit, imunologi, genetik maupun karakteristik klinik lainnya.
- b. Terinduksi (*induced*), melalui pankreatomi, senyawa kimia (diabetogenik) dan virus.

Eksperimental laboratorium secara induksi dilakukan secara pankrektomi, induksi diabetes melitus dilakukan dengan mengambil 90-95% pankreas dari tubuh hewan uji. Sel Langerhans pankreas yang tersisa akan mengalami hipertrofi dan penurunan sekresi insulin yang diperlukan untuk metabolisme. Metode induksi lain adalah dengan membuat hewan coba menjadi diabetes mellitus dengan menyuntikkan senyawa diabetogenik seperti aloksan dan *streptozotocin*. Senyawa ini akan membuat degenerasi sel β -langerhans pankreas. Pemberian STZ dosis 60 mg/kg BB dapat menimbulkan proses autoimun yang mengakibatkan kerusakan sel β Langerhans dan akan memunculkan gejala klinik diabetes mellitus dalam waktu 2 sampai 4 hari.³⁴

Streptozotocin atau 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranosose) merupakan derivat nitrosuria yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* yang mempunyai aktivitas anti neoplasma dan antibiotik spektrum luas. Struktur kimia dari STZ dapat dilihat pada gambar 4



Gambar 4 : Struktur kimia *Streptozotocin*

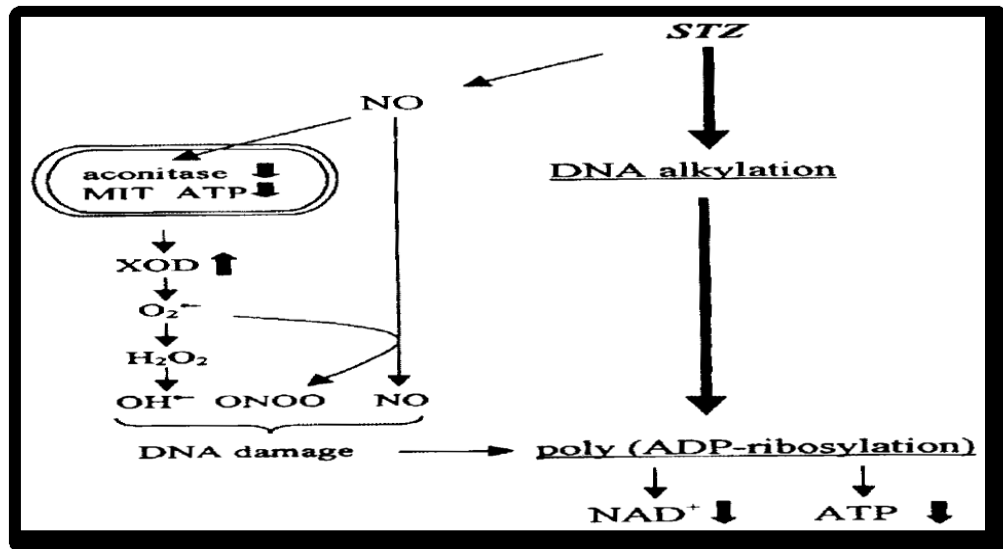
Binatang pengerat (Rodent) biasa digunakan sebagai hewan uji pada penelitian diabetes mellitus dengan induksi senyawa diabetogenik. STZ dapat menginduksi hewan coba menjadi diabetes mellitus tipe 1 atau diabetes

melitus tipe 2 apabila diberikan pada mencit atau tikus neonates yang berusia 1 sampai 2 hari. Streptozotocin menyebabkan diabetes ringan sampai berat tergantung pada dosis yang diberikan baik secara intravena maupun intraperitoneal. Perkembangan kondisi diabetes ditentukan oleh dosis, rute pemberian dan spesies hewan uji yang digunakan.³⁵

Dosis STZ yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 adalah 40-60 mg/kg BB secara intra vena, sedangkan untuk intra peritoneal dapat menggunakan dosis yang sama atau lebih besar. STZ dapat juga diberikan dengan dosis berulang, untuk menginduksi DM tipe 2 (NIDDM) , STZ diberikan secara intravena dosis 100 mg/kgBB pada tikus neonates (usia 2 hari). Pada usia 8-10 minggu tikus akan mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Sementara sel α dan γ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian STZ pada neonates sehingga tidak berdampak pada perubahan glucagon dan somastatin. Patofisiologi tersebut identik dengan NIDDM³⁶.

Jenis kelamin dan latar belakang genetik akan memengaruhi kerentanan hewan pengerat (Rodent) terhadap kerusakan pankreas akibat induksi STZ dan peningkatan kerusakan ginjal pada diabetes. Hewan pengerat jantan umumnya mempunyai kepekaan yang lebih tinggi terhadap induksi STZ dan lebih mudah menjadi hiperglikemi.³⁷ Penelitian Ragbetli et al (2010), pemberian STZ dosis 60 mg/kg BB secara i.p pada hewan uji tikus *Sprague dawley* jantan menunjukkan bahwa 1 jam setelah pemberian STZ terjadi peningkatan kadar glukosa serum darah dan penurunan ALT (*Alanin amino*

transferease) dan AST (*Aspartat amino transferease*). Menurut Szkudelski mekanisme induksi kerusakan sel β pancreas pada tikus oleh STZ dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5: Mekanisme induksi kerusakan sel β pankreas pada tikus oleh *streptozotocin*; MIT = mitokondria; XOD = *xanthine oksidase*

STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan sel β pankreas. STZ merupakan donor NO (*nitrit oksid*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanililsiklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan pada saat STZ mengalami metabolisme dalam sel. STZ juga membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida diakibatkan oleh aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan

menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan penurunan nukleotida sel β pancreas secara drastis.³⁶

Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase di mana sel β pancreas mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim ini, yang selanjutnya akan meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase mengkatalisis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Pembentukan anion superoksida, terbentuk hydrogen peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel β pancreas. Kerusakan DNA akibat STZ dapat mengaktifasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD⁺ seluler, selanjutnya penurunan jumlah ATP dan akhirnya terjadi penghambatan sekresi dan sintesis insulin. Kalsium yang berlebih tidak mempunyai peran yang signifikan pada nekrosis yang diinduksi STZ.³⁶

