

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Salam terhadap Kadar Gula Darah Sewaktu (GDS)

Hasil uji fitokimia ekstrak daun salam menunjukkan bahwa zat yang terkandung dalam daun salam berupa alkaloid, saponin, fenolik, triterpenoid, steroid dan flavonoid yang dapat dijadikan sebagai zat anti oksidatif, yang dapat berfungsi menurunkan gula darah. Hasil uji antioksidan dengan metode difenilpikril hidrasil (DPPH) pada ekstrak etanol daun salam yaitu $IC_{50} = 89.627$, konsentrasi senyawa antioksidan yang terkandung dalam daun salam menyebabkan lebih dari 50% DPPH mengalami penurunan karakter radikal bebas lebih besar dari vitamin C yaitu $IC_{50} = 7.587$.

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 yaitu aglikon. Flavonoid menstabilkan ROS melalui reaktivitas

ikatan radikal bebas, karena reaktivitas yang tinggi dari kelompok *hydroxyl* flavonoid membuat *inactive* radikal bebas³³.

Stres oksidatif pada diabetes melitus hasil dari oksigen dan nitrogen spesies reaktif berlebih (ROS / RNS), berasal dari jalur poliol, oksidasi glukosa, AGEs, dan mitokondria rantai transfer elektron, yang tidak dibersihkan oleh antioksidan (*SOD, katalase, glutathione peroxidase*). Peningkatan stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi VEGF pada diabetes melitus¹⁹. Hasil studi lain menunjukkan ekstrak daun salam berpotensi dalam penghambatan aktivitas *alpha glucosidase* pada diabetes melitus pada dosis 100 mg/ kg BB dalam 21 hari, ekstrak daun salam dapat menurunkan gula darah puasa¹⁹.

Pada penelitian awal menggunakan dosis ekstrak daun salam dengan rujukan dosis 2,62 mg/ 20 gram BB ekstrak¹¹, sehingga ditetapkan dosis EEDS pada masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :Perlakuan 1 : EEDS 18,1 mg/ 200 gr berat badan, Perlakuan 2 : EEDS 36,2 mg/ 200 gr berat badan, Perlakuan 3 : EEDS 72,4 mg/ 200 gr berat badan. Hasil penelitian menggunakan dosis awal tersebut menunjukkan bahwa rata – rata GDS pre EEDS $506,74 \pm 76,98$ dan post EEDS $530,37 \pm 112,53$, hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun salam pada awal penelitian tidak dapat meregulasi gula darah.

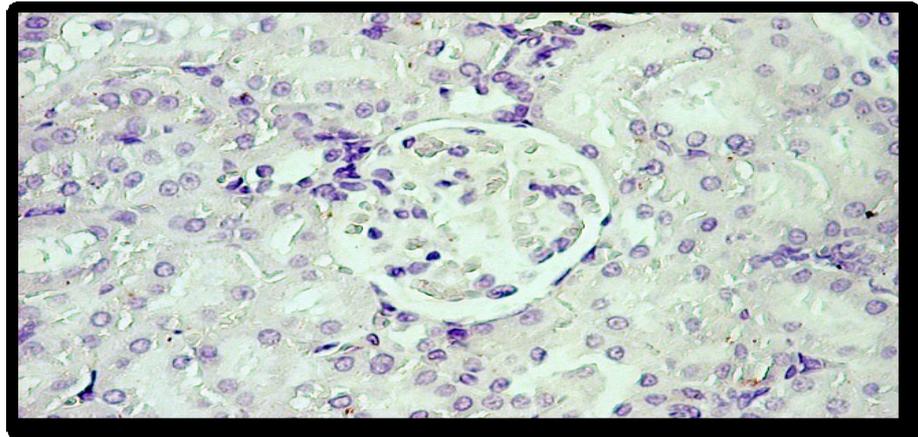
Dosis pada awal penelitian tidak dapat menurunkan gula darah secara signifikan, sehingga dilakukan ekstraksi maserasi ulang daun salam dengan berat serbuk 700gr, dan berat ekstrak daun salam 45,12 gr yang dilarutkan dalam etanol

70%. Dosis ekstrak daun salam ditingkatkan sebagai berikut : Perlakuan 1 : EEDS 150 mg/ 200 gr berat badan, perlakuan 2 : EEDS 300 mg/ 200 gr berat badan dan dosis perlakuan 3 : EEDS 450 mg/ 200 gr berat badan. Pada studi Lelono dan Tachibana telah menggunakan ekstrak daun salam dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB dalam 21 hari. Pada dosis 100 mg/kg BB dapat meregulasi gula darah¹⁰. Pada dosis yang telah ditingkatkan rata-rata GDS pre EEDS adalah $356,5 \pm 121,47$ dan GDS post EEDS $332,5 \pm 149,15$.

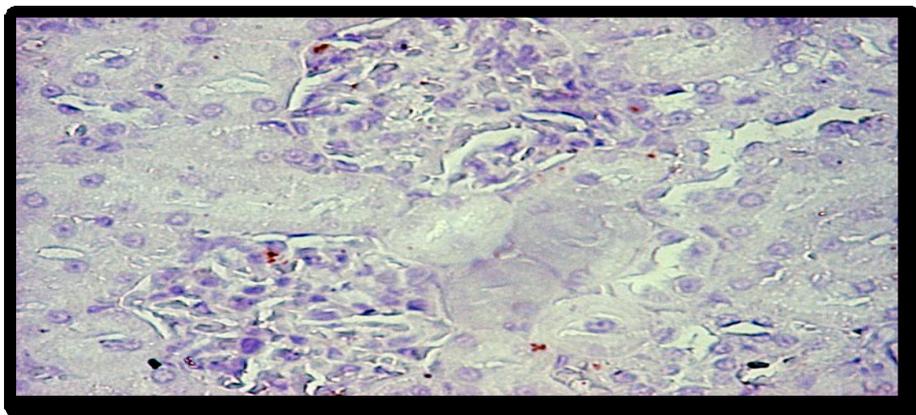
6.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Salam terhadap Ekspresi VEGF podosit glomerulus ginjal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai allred score (proporsi dan intensitas) pada podosit glomerulus ginjal menunjukkan sangat lemah, baik pada kelompok kontrol ataupun kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak daun salam pasca induksi *streptozotocin* hari ke-15 berdampak pada ekspresi VEGF di podosit glomerulus pada kelompok perlakuan tiga dengan rata-rata allred score nol. Secara statistik, tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada score ekspresi VEGF di podosit glomerulus ginjal ($p > 0,05$). Pada allred score ekspresi VEGF masing – masing kelompok sampel menunjukkan semakin tinggi dosis EEDS yang diberikan semakin rendah nilai *p value*. Nilai *p value* masing- masing kelompok dibandingkan kelompok kontrol sebagai berikut : kontrol vs dosis 1 (150 mg/200 gr BB) *p value* = 0,86 sedangkan kontrol vs dosis 2 (300 mg/200 gr BB) *p value* = 0,32 dan kontrol vs dosis 3 (450 mg/200 gr BB) *p value* = 0,07. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis EEDS yang diberikan, ekspresi VEGF podosit glomerulus dapat dihambat sehingga tidak

muncul. Allred score ekspresi VEGF podosit glomerulus pada kelompok penelitian dominan dengan nilai nol dan dua (dengan proporsi nol dan intensitas satu), ditampilkan pada gambar 10 dan 11.



Gambar 10 : Ekspresi VEGF podosit glomerulus ginjal tikus SD (K-2) dengan proportion score (PS) :0 dan intensity score (IS) : 0 , pada pembesaran gambar 200x.



Gambar 11 : Ekspresi VEGF podosit glomerulus ginjal tikus SD (P1-5) hari ke- 15 post EEDS dengan proportion score (PS) :1 dan intensity score (IS) : 1, pada pembesaran gambar 200x.

Sel epitel viseral glomerulus atau disebut podosit merupakan sumber utama VEGF dalam ginjal. Secara fisiologis peran VEGF pada ginjal tidak diketahui. . VEGF mungkin merupakan mediator penting dari pemulihan glomerulus di

glomerulonefritis proliferasi. VEGF diperlukan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel endotel glomerulus dan peritubular. Di ginjal, ekspresi VEGF yang paling menonjol dalam podosit glomerulus dan sel epitel tubular, sedangkan reseptor VEGF terutama ditemukan pada preglomerular, glomerulus, dan sel-sel endotel peritubular. Pada stase awal diabetes ekspresi VEGF pada glomerulus meningkat^{5,4,19, 40}. Pada ginjal manusia VEGF dapat dilihat pada podosit, sel tubular distal dan sel tubular proksimal^{4, 2, 17}. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi VEGF pada diabetes melitus tidak hanya diamati pada glomerulus ginjal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi VEGF podosit glomerulus terdapat pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan satu dan dua. Namun pada tubulus ginjal ekspresi VEGF banyak ditemukan disemua kelompok.

Secara klinik bahwa neogenesis pada diabetes ditandai pada retina, yaitu hasil dari perdarahan vitreal dan fibrosis. Proliferasi vaskuler yang ada pada mata juga ditemukan pada ginjal. Pada biopsi ginjal diabetes menunjukkan bahwa terjadi perubahan pembuluh darah berupa peningkatan diameter, panjang pembuluh darah dan proliferasi pembuluh darah baru di vascular pole, kapsul bowman yang mengelilingi kandung kemih. Selama fase angiogenik awal nefropati diabetik, VEGF meningkat pada podosit ginjal seperti peningkatan VEGF yang ditemukan dalam sel-sel retina⁵.

Pada model hewan diabetes, Studi Nyengaard dan Rasch telah mengidentifikasi kapiler glomerulus abnormal yang disebabkan oleh streptozotocin menunjukkan bahwa baru hari ke-10 dan 50 hari setelah induksi, total rata-rata luas permukaan, panjang, dan jumlah kapiler glomerulus yang

meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol¹⁴. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, pasca induksi STZ hari ke-15 dilakukan pemeriksaan IHC menunjukkan adanya ekspresi VEGF podosit glomerulus, yaitu 3 sampel (60%) .

Faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) merupakan regulator penting angiogenesis. VEGF menstimulasi proliferasi sel endotel dan diferensiasi, meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, memediasi vasodilatasi endotel, dan mendukung kelangsungan hidup vaskular dengan mencegah apoptosis endotel. Dalam studi Enqi Liu, dkk. menyebutkan pada pemeriksaan histologi bahwa ginjal kelinci transgenik usia 8-55 minggu, yang mengalami hipertrofi glomerulus sebagai akibat dari peningkatan proliferasi kapiler glomerulus dan sel mesangial. Pada usia 20 minggu, ginjal kelinci transgenik menunjukkan pembentukan mikroaneurisma dan proliferasi kapiler di daerah kutub vaskular. Pada tahap selanjutnya (55 minggu), banyak glomerulus yang menunjukkan sklerosis. Studi ini memberikan bukti bahwa peningkatan ekspresi VEGF pada glomerulus langsung menyebabkan hipertrofi glomerulus yang berhubungan dengan proteinuria¹⁷. Penelitian ini menguatkan penelitian Nyengaard dan Rasch.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan, setelah diberikan EEDS selama 15 hari ekspresi VEGF muncul yaitu : hanya satu (33,3%) pada kelompok perlakuan satu dan kelompok perlakuan dua terdapat satu (25%) dan pada kelompok perlakuan tiga ekspresi VEGF podosit glomerulus, tidak muncul dengan allred score nol. Hal ini dijelaskan pada penelitian sebelumnya bahwa ekspresi VEGF muncul dimulai pada 10 hari pasca induksi, namun pada

kelompok perlakuan, pasca induksi hari kelima sudah mendapatkan terapi ekstrak daun salam sehingga ekspresi VEGF pada podosit kelompok perlakuan sangat lemah karena dihambat oleh EEDS. Secara statistik dapat dilihat bahwa perbedaan rata-rata allred score pada kelompok perlakuan disebabkan ekspresi VEGF podosit langsung dihambat pasca induksi STZ sedangkan pada kelompok kontrol lebih disebabkan karena jarak antara induksi STZ dengan pemeriksaan IHC terlalu dekat, sehingga allred score ekspresi VEGF podosit glomerulus pada kelompok kontrol sangat lemah. Hasil pemeriksaan HbA1c pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa hewan uji masih dalam kondisi diabetes dengan kontrol yang baik (2,5 %-5,9%) dalam waktu 15 hari.

Diabetes adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan gangguan sekresi insulin endogen dan aktivitas, mengurangi produksi NO dan peningkatan produksi radikal bebas, atau gangguan pertahanan antioksidan. Faktor utama dalam komplikasi diabetes yang diperantarai adalah disfungsi endotel. Beberapa faktor resiko yang dapat menyebabkan kerusakan sel endotel diabetes seperti hiperglikemia, resistensi insulin, dislipidemia, peningkatan stres oksidatif, inflamasi, dan hipertensi. Perawatan yang dapat meningkatkan fungsi endotel sistemik, seperti ACE inhibitor, statin, metformin, antioksidan, asam folat, PKC-inhibitor, dan suplemen seperti L-arginin, BH4, asam folat, dan polifenol juga muncul untuk memberikan perlindungan dari diabetes dimediasi kejadian vaskular. Peningkatan generasi radikal bebas merupakan disfungsi endotel vaskular pada diabetes tipe 1 dan tipe 2 .

Terapi antioksidan menjadi pilihan yang mudah dan terkenal untuk mengurangi kelainan pembuluh darah yang diperantarai diabetes. Penelitian menunjukkan pada EEDS dosis ketiga, bahwa ekspresi VEGF podosit glomerulus sangat ditekan atau dihambat sehingga tidak tampak ekspresi VEGF. Hal ini sejalan dengan penelitian bahwa terapi antioksidan seperti vitamin C dan E dapat menurunkan kadar *peroxynitrite*, bila dalam konsentrasi yang sangat tinggi⁵. Terapi tunggal mungkin tidak cukup meningkatkan fungsi endotel, sehingga perlu untuk menargetkan beberapa faktor untuk intervensi terapi disfungsi endotel. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ada peningkatan respon relaksasi endotelium dengan berbagai agen antioksidan, termasuk superoksida dismutase (SOD). Penelitian ini menguatkan paradigma baru bahwa terapi antioksidan saja tidak cukup. Terapi antioksidan adalah pilihan yang harus digunakan dalam kombinasi dengan terapi lain untuk mengurangi kelainan pembuluh darah. Terapi antioksidan hanya penundaan disfungsi endotel diabetes yang diinduksi, daripada memberikan pemulihan lengkap⁵.

6.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini antara lain, bahwa untuk mengobservasi ekspresi VEGF tidak hanya pada podosit glomerulus tetapi bisa pada tubulus ginjal karena sebagian besar kelompok kontrol dalam waktu 15 hari, rata-rata ekspresi VEGF podosit glomerulus sangat lemah. Waktu. Proses pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan GDS, HbA1c harus memperhatikan waktu dan jarak tempuh tempat pemeriksaan sampel untuk mencegah terjadinya lisis.

Pemeriksaan GDS sebaiknya dilakukan pra-diinduksi *streptozotocin* , untuk memastikan bahwa hewan coba sebelum diinduksi dalam kondisi tidak mengalami diabetes melitus. Pemeriksaan gula darah hanya dilakukan pada pemeriksaan gula darah sewaktu tidak dilakukan pemeriksaan gula darah puasa. Pada sampel yang mati saat perlakuan tidak dilakukan pembedahan dan autopsi sehingga tidak diketahui penyebab kematian.