

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ekspresi TGF- β Pada Diabetes Melitus

Transforming growth factor- β (TGF- β) adalah protein dengan berat molekul 25 kD, secara aktif terlibat dalam proses perkembangan dan diferensiasi berbagai jenis sel. Sitokin TGF- β disebut sebagai sitokin prosklerosis yang disekresi oleh berbagai jenis sel, seperti sel trombosit, monosit/ makrofag, sel endotel, sel otot polos vaskular, dan sel mesangial dan glomerulus¹⁴

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) disebut juga superfamili pengikat (*ligand*), reseptor, protein *binding* yang secara bersamaan memainkan peranan dalam menjaga stabilitas struktur pembuluh darah.¹⁵ TGF- β merupakan kunci regulasi dari sintesis protein *matriks ekstra sel* di ginjal. TGF- β I sampai III merupakan anggota superfamili yang juga mengandung aktin, *bone morphogenic protein* (BMPs), dan inhibin, TGF- β I adalah promotor yang paling mengakumulasi ECM. Ekspresi TGF- β terjadi pada pola yang berbeda dalam fibrosis ginjal.¹⁶

TGF- β disekresikan oleh laten, mengandung hemodimer dari *mature* TGF- β , sebuah laten terikat peptid serta sebuah laten terikat protein. Penurunan protein terkait, menyebabkan aktivasi TGF- β , dan trombositopendin juga berperan sebagai mediator penurunan protein.⁴⁹

TGF- β juga berfungsi sebagai faktor pertumbuhan multifungsi yang memiliki peran penting dalam modulasi perilaku sel pada jaringan. TGF- β

memiliki peran dalam modulasi migrasi sel, proliferasi, dan sintesis protein selama beberapa proses fisiologis dan patologis. TGF- β juga bertindak sebagai *chemoattractant* untuk berbagai jenis sel dan mampu menghasilkan beberapa faktor angiogenik seperti VEGF, PDGF, dan (TNF- α), yang mempercepat proses neovaskularisasi dalam kondisi hiperglikemia berkepanjangan.¹⁷

Penelitian dahulu dalam sistem kultur sel menunjukkan bahwa TGF- β memainkan peran penting dalam mengatur proliferasi sel dan produksi matriks ekstraseluler. Di ginjal, TGF- β mempromosikan hipertrofi sel epitelial tubulus dan mengatur glomerulus produksi hampir setiap molekul yang dikenal dari matriks ekstraseluler, termasuk kolagen, fibronectin, tenascin, dan proteoglikan.⁵

Secara *in vitro*, sel mesangial yang terpapar hiperglikemi menunjukkan peningkatan sintesis kolagen tipe IV, yang dapat dicegah melalui *neutralizing* antibodi TGF- β . Manfaat penting dari TGF- β dalam perkembangan dan eksaserbasi diabetes pada penelitian *in vivo* adalah terhentinya kerja TGF- β , terhentinya sistem renin-angiotensin dengan ACE inhibitor atau *angiotensin reseptor blocker* (ARBs) menghambat terjadinya ekspresi TGF- β pada diabetes seperti pada ekspresi reseptor TGF- β 1 dan II.

TGF- β dan reseptornya terdapat pada semua sel tubulus proksimal dan sel glomerulus. Hiperglikemia akan meningkatkan ekspresi TGF- β pada sel epitel dan mesangium glomerulus yang terpapar dengan TGF- β akan meningkatkan sintesis kolagen dan protein ECM lainnya sehingga terjadi

penumpukan matriks ECM yang selanjutnya akan menyebabkan ekspansi mesangial dan gangguan filtrasi glomerulus.¹⁸

Molekul TGF- β mempunyai peranan penting dalam menstimulasi proses penyembuhan pada inflamasi. Molekul ini desekresikan dalam keadaan tidak aktif, tetapi dapat diaktifasi oleh enzim protease. Sebagai molekul sinyal TGF- β diduga dapat pula berperans dalam angiogenesis. **49**

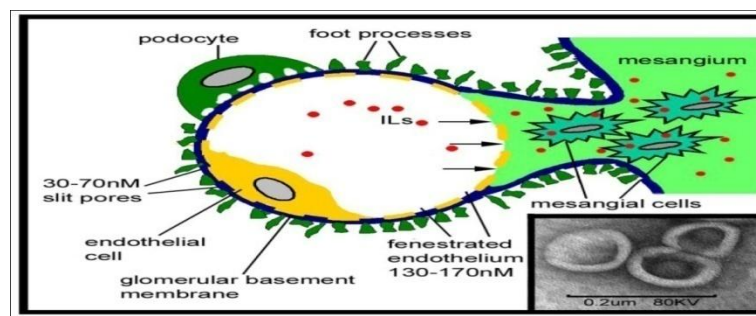
Peningkatan fibrosis ginjal berkorelasi dengan peningkatan ekspresi ligan TGF- β . Fibrosis ginjal diamati pada overekspresi TGF- β atau aplikasi dari rekombinan TGF- β pada tikus, sedangkan penghambatan jalur TGF - β dapat mengurangi keparahan fibrosis ginjal progresif.¹⁹ Peningkatan TGF- β dengan reseptornya menyebabkan fosforilasi Smad2 dan Smad3. Smad2/ 3 dimer translocates ke inti dengan Smad 4 yang mengatur transkripsi alpha kolagen yang menyebabkan peningkatan sintesis kolagen. Aktivasi oleh TGF- β menyebabkan peningkatan sintesis ECM, proliferasi mesangial dan fibrosis glomerulus.²⁰

Activated sinyal TGF- β melalui aktivasi berurutan dari dua reseptor permukaan sel kinase serin-treonin. Setelah TGF- β mengikat, TGF - β tipe II rekan reseptor konstitutif aktif dengan dan memfosforilasi jenis TGF - β I reseptor. Kemudian *Smad-2* dan protein *Smad-3* diaktifkan oleh reseptor kinase TGF- β tipe I terfosforilasi *Smad-2* dan *Smad-3* membentuk kompleks dengan heteromerik *SMAD-4*.¹⁶

TGF- β /Smad2/3 jalur sinyal diaktifkan dalam podosit glomerulus diabetes untuk menginduksi ekspresi TGF - β , seperti kolagen tipe IV, CTGF

dan VEGF. fibrosis ginjal aksi TGF- β /Smad2/3 jalur, namun diatur secara negatif oleh sebuah Smad penghambatan disebut Smad7, yang mengakibatkan penurunan fibrosis ginjal.¹⁶

Glomerulosklerosis pada model binatang dan manusia menunjukkan deplesi sel epitel viseral (podosit). Pelepasan mekanik podosit pada membran basalis glomerulus kedalam urin kemungkinan disebabkan oleh perubahan adhesi sel atau peningkatan perenggangan mekanis sel podosit. **53**



Gambar 1. Morfologi Glomerulus
Dikutip dari : Yogesh, 2010

Efektor ini memodulasi ekspresi gen target yang terlibat dalam fisiologis dan Kejadian CKD terkait, misalnya: pertumbuhan sel, diferensiasi, apoptosis dan deposisi ECM.⁴ tingkat yang lebih tinggi dari bioaktif TGF- β , yang mengakibatkan apoptosis sel endotel dan proteinuria. Sel-sel mesangial juga menghasilkan sinyal parakrin yang mempengaruhi fungsi podosit. Integrin berperan dalam interaksi antara podosit dan basal glomerulus membran (GBM). Integrin $\alpha\beta 1$ pada podosit menyebabkan adhesi pada laminin $\beta 2$ dari GBM. Gangguan interaksi ini menyebabkan hilangnya podosit dan glomerulosklerosis.²

Faktor-faktor ini mengaktifkan sel-sel mesangial secara autokrin dan memediasi interaksi dengan endotel glomerulus, sel-sel epitel dan sel-sel inflamasi dengan darah. Pada tahap awal glomerulosklerosis meningkatkan ukuran kompartemen mesangial, disebabkan oleh deposisi matriks mesangial: proliferasi sel mesangial dan hipertrofi.⁴

2.2. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekspresi TGF- β Pada Diabetes Melitus

2.2.1. Glukosa Darah

Peningkatan kadar glukosa darah menyebabkan efek langsung pada glikosilasi non enzimatis pada makromolekul seluler, menyebabkan perubahan struktural dan fungsional. Kadar glukosa tinggi menginduksi ROS intraseluler secara tidak langsung melalui AGE dan sitokin, termasuk TGF- β 1 dan Ang-II kemudian mengaktifkan kaskade sinyal transduktif.^{7,28}

peningkatan ekspresi protein mitokondria oleh *induced high glucose-1* (IHG-1) yang merupakan komponen penting dari fibrogenesis dan memperkuat sinyal TGF- β 1. Selain itu, fluktuasi glukosa darah dapat mempercepat fibrosis ginjal pada tikus diabetes dengan meningkatkan produksi kolagen dan menghambat degradasi kolagen, yang dimediasi oleh jalur sinyal TGF- β /smad.²² TGF- β meningkatkan penyerapan glukosa dan tingkat ekspresi GLUT-1 protein dan mRNA oleh sel mesangial terkultur.^{2,16,28}

WHO (2011) menyatakan bahwa kegunaan dari HbA1c merupakan informasi yang relevan untuk diagnosis dan *scrinning* kontrol gula darah diabetes sebagai tujuan ukuran kontrol glikemik.^{23,24}

Glycated hemoglobin (hemoglobin terglikasi, hemoglobin A1c, HbA1c, A1C, atau Hb1Ac merupakan bentuk hemoglobin digunakan terutama untuk mengidentifikasi konsentrasi glukosa plasma rata-rata selama periode waktu yang berkepanjangan. Hb terglikasi (HbA1c) merupakan gugus heterogen yang terbentuk dari reaksi kimia antara glukosa dengan hemoglobin.^{2,25}

Penentuan HbA1c dilakukan pada sampel darah EDTA-antikoagulan. HA-8140 otomatis dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC-HbA1c) menggunakan kation-pertukaran dan kromatografi fase terbalik pada fase padat asam metakrilat. Hemoglobin dielusi dengan PH yang bervariasi dalam fase gerak dalam jalur non enzimatis oleh paparan hemoglobin yang normal, untuk kadar glukosa plasma yang tinggi.^{25,26}

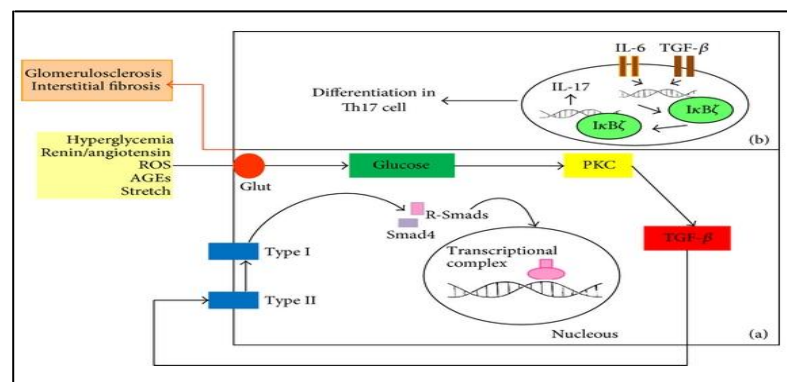
International Expert Commite (IEC) dan *American Diabetes Association* (ADA), merekomendasikan penggunaan tes HbA1C untuk mendiagnosa diabetes, dengan level >6,5%.^{2,27}

2.2.2. Reactive Oksigen Species (ROS)

Kenaikan growth factor disebabkan oleh peningkatan kadar glukosa darah. Hiperglikemia diyakini sebagai penyebab komplikasi diabetes melalui

reaksi glikasi, aktivasi *Protein Kinase-C*, dan *polyol pathway*, selanjutnya produksi berlebihan *reactive oxygen species* (ROS) dari mitokondria. Mekanisme ini saling mempengaruhi satu sama lain.⁵ Meningkatnya kadar glukosa darah maka akan meningkatkan sorbitol dalam sel ginjal dan akan mengakibatkan berkurangnya mioinositol, yang akan mengganggu osmoregulasi sel hingga sel itu rusak.²⁸

Glukosa tinggi menyebabkan overekspresi *growth factor-β* dan VEGF. Ekspresi reseptor ligan ini juga mengikat TGF-β tipe II di podocytes. Selanjutnya, glukosa tinggi dan eksogen TGF-β1 meningkat $\alpha 3$ (IV) kolagen dan ekspresi VEGF. Dengan demikian dampaknya meningkatkan efek ambient TGF-β1 pada $\alpha 3$ (IV) kolagen dan produksi VEGF dengan meningkatkan ekspresi reseptor TGF-β tipe II. Angiotensin-II juga muncul untuk merangsang podosit menghasilkan $\alpha 3$ (IV) kolagen melalui mekanisme yang melibatkan sinyal pada TGF-β dan VEGF.¹⁶



Gambar 2
Aktivasi sintesis TGF-β dan perannya dalam mekanisme proinflamasi
Dikutip dari : Gomes 2014.

TGF- β mengikat kompleks reseptor sehingga mengaktifkan *Smads* yang mengatur NF- κ B. TGF- β 1 dan IL-6 mempromosikan diferensiasi *limfosit-T naif* menjadi proinflamasi *T-helper* yang menghasilkan IL-17 melalui faktor transkripsi NF- κ B. Hasil dari proses ini adalah glomerulosklerosis dan fibrosis interstitial.²² Stres oksidatif pada Ang-II dapat mengaktifkan TGF- β dan sistem TGF- β sinyal dalam podocytes.³

TGF- β merangsang sintesis ECM oleh sel mesangial yang kompleks melalui jalur *Smad* dan fungsional dalam sel mesangial dan dapat memediasi ekspresi kolagen I. Namun, penghambatan *Smad7* mengurangi produksi kolagen dalam TGF- β merangsang sel-sel mesangial. TGF- β 1 juga merangsang berbagai kinase dalam sel mesangial. Dalam sel mesangial manusia dan tikus, TGF- β telah ditunjukkan untuk mengaktifkan ERK-1/ 2, PI3K dan jalur JNK-MAP kinase.⁴

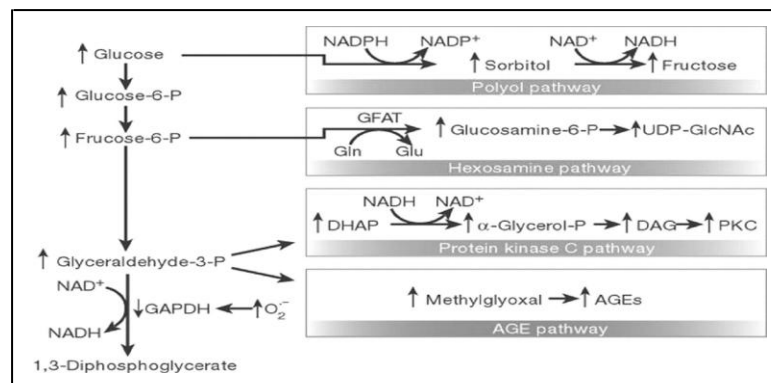
2.2.3. Jalur Poliol

Mekanisme awal yang ditemukan adalah *polyol pathway* menyebabkan meningkatnya aliran dalam saraf perifer.²⁸ Pembuluh darah, endotel, termasuk sel β pankreas yang menyeimbangkan glukosa intraseluler.²⁹ Jalur polyol terdiri dari enzim *aldosa reduktase* (AR), mengurangi glukosa menjadi sorbitol dengan bantuan co-faktor NADPH, dan enzim *sorbitol dehidrogenase* (SDH) dengan co-faktor NAD⁺, mengubah

sorbitol menjadi fruktosa, meningkatkan rasio NADH/ NAD dan dapat mengakibatkan stres oksidatif dan aktivasi *protein kinase-C*.³⁰

Jalur polioliol menentukan disfungsi endotel dengan 3 mekanisme:

1. Akumulasi sorbitol yang tinggi akan meningkatkan osmotik stres.
2. Peningkatan NADH/NAD⁺ rasio sitosolik, sebagai hasil dari ketidakseimbangan redoks mirip dengan hipoksia tissular, juga disebut hiperglikemia pseudohypoxia.
3. Akumulasi triose-fosfat merangsang pembentukan *methylglyoxal* (MG), yang menyebabkan AGE paling aktif, sehingga meningkatkan stres oksidatif.¹⁸



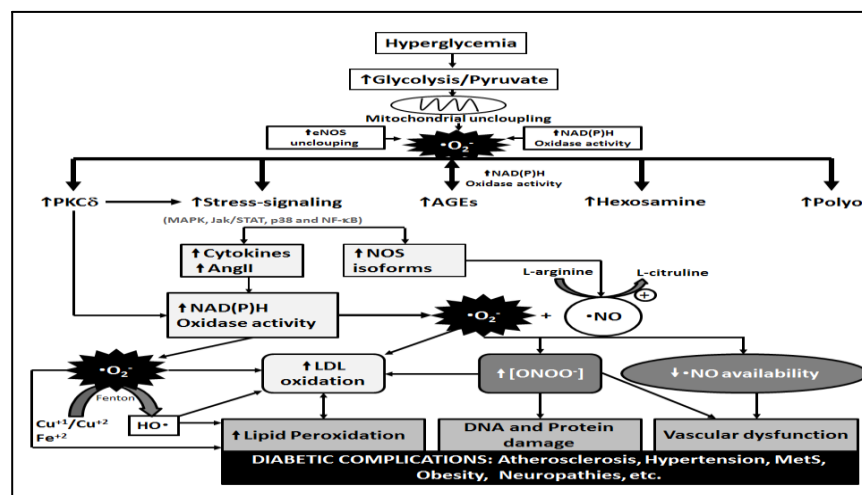
Gambar 3

overproduksi superoksida mengaktifkan empat jalur kerusakan hiperglikemik
Dikutip dari : Patel, 2013

kelebihan produksi radikal superoksida Kelebihan glukosa plasma mendorong produksi berlebihan donor elektron (terutama NADH/ H⁺) dari siklus asam trikarboksilat. Oksigen menghasilkan radikal superoksida dan ROS. Anion superoksida itu sendiri menghambat enzim glikolitik dehidrogenase gliseraldehida-3-fosfat, dan intermediet akibatnya, glukosa dan

glikolitik tumpah ke jalur poliol dan hexosamine, serta jalur tambahan yang berujung pada aktivasi PKC dan pembentukan AGE intraseluler.³¹

Peningkatan pembentukan *Advance Glycation End Product* (AGEs),³² stres oksidatif sangat berperan, umumnya akibat ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi dari *reactive oksigen spesies* (ROS).⁸ *protein kinase-C* (PKC) dan faktor transkripsi nuklear NF- κ B teraktivasi, menyebabkan peningkatan aliran pada jalur hexosamine.³² Selama tahap reaksi ini, hidrogen dalam bentuk setara sehingga mengurangi (NADH) dan energi diproduksi dalam bentuk *adhenosin trifosfat* (ATP) sedangkan reduksi empat elektron dari molekul oksigen ke air menghasilkan radikal bebas.³¹



Gambar 4. Aktivasi PKC pada Hiperglikemia
Di kutip dari : Bandeira *et al*, 2013.

2.2.4. Jalur AGE

Kadar AGEs dalam darah meningkat dalam perkembangan komplikasi mikrovaskuler pada *renal mesangial cell growth*. Ikatan ini memicu timbulnya

reactive oxygen species (ROS) dan aktivasi NF- κ B terhadap sel target, endothelium, makrofag dan respon peningkatan permeabilitas vaskuler.⁷

Tubulus proksimal adalah situs utama untuk filter reabsorpsi AGEs. Ekspresi TGF- β 1 berhubungan erat dengan akumulasi AGEs di ginjal. AGEs mentranskripsi TGF- β 1, melalui PKC atau stres oksidatif. Pada eksperimental diabetes, stres oksidatif meningkat sebanding dengan akumulasi AGEs. AGE berkontribusi terhadap pelepasan sitokin proinflammatory dan ekspresi faktor pertumbuhan dan molekul adhesi seperti VEGF dan CTGF, TGF- β 1, IGF-1, PDGF, TNF- α , IL-1 β , dan IL-6.³⁰

Pada hewan diabetes, akumulasi AGE di ginjal juga menentukan proteinuria, proliferasi sel mesangial dan penebalan GBM. AGE bertindak melalui reseptor (RAGE): AGE-R1, R2-AGE, AGE-R3, dan juga dengan reseptor jalur independen. Sebagai hasil dari AGE-Interaksi RAGE ada diaktifkan serin / treonin kinase, PKC dan penting lainnya jalur transkripsi: NF- κ B dan *mitogen active protein kinase* (MAPK). RAGE menginduksi sintesis dan pelepasan sitokin: TGF- β 1, *Platelet Derived Growth Faktor* (PDGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF) meningkatkan produksi kolagen IV, sintesis laminin dan fibronectin. Peran AGEs pada DKD adalah berikut: peningkatan AGE di GBM, permeabilitas pembuluh darah meningkat, penebalan GBM, peningkatan produksi matriks mesangial dengan glomerular hipertrofi dan glomerulosklerosis.¹⁸

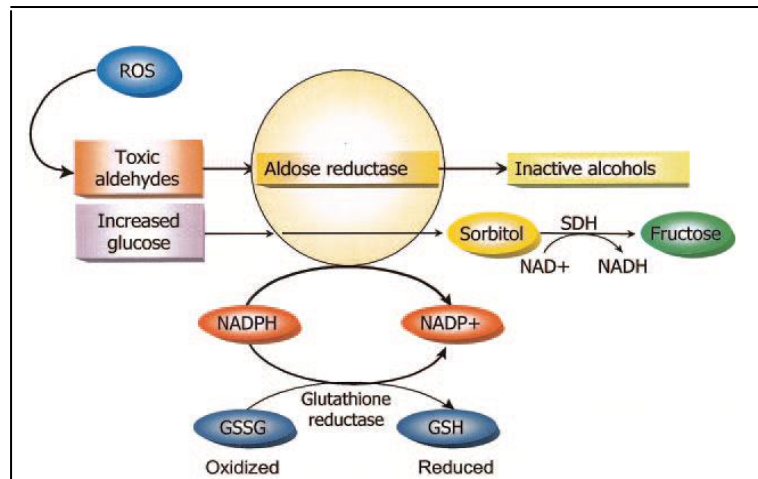
Hal ini juga dapat menyebabkan apoptosis podosit dan penebalan GBM, serta *epitel-mesenchymal transition* (EMT) dari podosit dalam

pengembangan glomerulosclerosis. Selanjutnya, sinyal diaktifkan oleh TGF- β /Smad podosit dapat menyebabkan faktor pertumbuhan jaringan ikat dan faktor pertumbuhan endotel vaskular berlebih, yang dapat bertindak sebagai mekanisme efektor parakrin pada sel mesangial untuk merangsang sintesis matriks mesangial. Dalam podocytopathies proliferasif, seperti seluler atau FSGS, TGF- β menginduksi aktivasi ERK dan berperan dalam proliferasi podosit, melalui TGF- β -induced EMT dari podosit.¹⁹

Peningkatan ekspresi TGF- β 1 mesangial mRNA pada podosit meliputi sklerotik segmen glomerulus menunjukkan peningkatan TGF- β 1 ekspresi protein. Lee melaporkan bahwa TGF- β disekresikan sebagai kompleks laten oleh sel mesangial disimpan dalam matriks mesangial, dari bentuk larut laten TGF- β dilepaskan dan terlokalisasi pada permukaan podosit pada penyakit glomerular kronis.⁶ AGE dapat menghambat respirasi mitokondria dan meningkatkan pembentukan ROS intraseluler dan inflamasi sitokin, keduanya mengubah fungsi vaskular.²⁸

2.2.5. Jalur PKC

Hiperglikemia juga mengaktifkan *protein kinase-C* (PKCS) karena meningkatkan *diasil glycerol* (DAG). jalur ini kemudian memiliki beberapa efek yang tidak diinginkan, termasuk peningkatan Tingkat TGF- β yang dapat berujung ke peningkatan fibrosis di ginjal, peningkatan aktivitas NF- κ B dan proinflammation. Aktivasi peningkatan PKC meningkatkan aktivitas NOXes (NADPH oksidase) sehingga menyebabkan ROS dan stres oksidatif.¹⁶



Gambar 5
PKC meningkatkan ROS

Signaling PKC dapat mempromosikan ekspresi *oksida nitrat endotel synthase* dan menghambat ekspresi *endotelin-1*, yang secara kolektif mendukung vasodilatasi pembuluh darah. Aktivitas PKC memberi sinyal lebih pada sejumlah protein lain yang berdampak pada vaskular, permeabilitas, angiogenesis, kontraktilitas, dan koagulasi.³¹ Vasodilator memproduksi endotel oksida nitrat (NO) sintase (eNOS) menurun, sedangkan vasokonstriktor endothelin-1 meningkat. *Transforming growth factor-β* dan PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) juga meningkat.²⁸

Aktivitas PKC tinggi di glomerules DM pasien, memiliki efek sebagai berikut:

1. Perubahan langsung atau tidak langsung dari permeabilitas pembuluh darah melalui *Vaskular endothelial growth faktor* (VEGF)
2. Perubahan aliran darah menurunkan *endotel nitrat oksida sintesis* (eNOS) meningkatkan sintesis *endotelin-1* (ET-1)

3. Penebalan membran basal glomerulus (GBM) melalui peningkatan TGF- β .¹⁸

2.2.6. Jalur Heksosamin

Heksosamine dimetabolisir oleh jalur glikolisis dari jalur glukosa-6 phosphat menjadi fruktosa-6 melalui enzim *Glutamin fructose 6 phosphat amidotransferase*, yang merupakan suatu substrat untuk reaksi sintesis proteoglikan dan pembentukan glikoprotein-*O-linked*, yang berhubungan dengan peningkatan sintesis *growth factor* melalui Ang-II mengaktifkan promotor GFAT dalam sel mesangial dan podosit. Ekspresi dari GFAT menyebabkan peningkatan ekspresi TGF- β dan ekspresi fibronektin. Selain itu, TGF- β 1 dan ECM juga menyebabkan kenaikan produksi glukosa yang tinggi.^{7,16,31}

2.2.7. Oksidatif Stres

Stres oksidatif menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi antioksidan dan radikal bebas, sebagai akibatnya salah satu dari antioksidan berkurang dan radikal bebas meningkat, dengan konsekuensi potensial atas munculnya lesi oksidatif. Secara khusus stres oksidatif menyebabkan pelepasan sitokin dan faktor pertumbuhan sehingga mengakselerasi inflamasi kronik dan disfungsi endotel.^{7,18}

2.2.8. RAS

RAS (*Renin angiotensin system*) signifikan menyebabkan peningkatan produksi TGF- β ginjal. RAS dan jaringan lain mengeluarkan prorenin ke dalam sirkulasi darah dan mengaktivasi tripsin. Perubahan akut volume cairan ekstraseluler diatur RAS endogen dalam tubulus proksimal, independen dari sistem sistemik. Penelitian secara in-vivo menunjukkan bahwa perfusi tubulus proksimal dengan solusi ultrafiltrate dilakukan untuk menentukan laju transpor volume tubulus proksimal. RAS intrarenal juga menyebabkan berbagai kondisi volume vaskular berubah.^{3,33}

Enzim *Angiotensin converting* (ACE) inhibitor mencegah TGF- β 1 berlebih di podosit dan glomerulosklerosis pada tikus dengan penurunan massa ginjal. Selain itu, pemberian tipe Ang II-1 (AT-1) receptor blocker untuk tikus diabetes menurunkan ekspresi TGF- β 1 glomerulus dan faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF).³

2.2.9. Angiotensin-II

Tekanan mekanis atau regangan biomekanik di podocytopathies dapat menyebabkan perubahan hemodinamik, cedera progresif dan overekspresi TGF- β oleh angiotensin II (Ang II). Stres oksidatif yang disebabkan oleh Ang- II dapat mengaktifkan TGF- β , *Smads* dan *Renin angiotensin system*. Sinyal ini diatur oleh jalur sinyal *extrasellular kinase* (ERK) di podosit. Peningkatan aktivitas TGF- β dalam podosit (*sel epitel visceral glomerulus*)

dapat menyebabkan penebalan *membrane basalis glomerulus* (GBM) akibat kelebihan protein pada GBM dan gangguan degradasi GBM.^{16,33}

secara lokal Ang II langsung menginduksi cedera podosit melalui aktivasi reseptor AT-1. efek peningkatan kadar Ang II meningkatkan reabsorpsi tubulus proksimal dan laju filtrasi pada nefron distal serta ekskresi natrium urine. Ang-II merangsang pertumbuhan jaringan ikat dan meningkatkan kandungan total protein serta ukuran sel.³³

2.3. Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp)

2.3.1. Morfologi Daun Salam

Tanaman salam adalah *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.³⁴

Tanaman ini tersebar diberbagai daerah, baik dipegunungan maupun di dataran rendah.³⁵ Tanaman salam dapat ditemukan di dataran rendah sampai 1.400 meter di atas permukaan laut. pohon salam mungkin ketinggian sekitar 25 meter, memiliki akar lurus besar, batang bulat dan halus pohon surface. Tanaman salam memiliki bunga kecil, putih, dan harum.³⁶ Daun tunggal, letak berhadapan, bertangkai yang panjangnya ½ - 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.^{34,37,38}

2.3.2. Taxonomi Daun Salam

Secara ilmiah, Daun salam bernama *Eugenia polyantha* Wight dan sinonim adalah *Eugenia lucidula* Miq dan *Syzygium polyanthum* Wight.³⁶ Tanaman ini ditetapkan 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).³⁷

2.3.3. Manfaat Daun Salam

Daun Salam dapat dimanfaatkan sebagai pelengkap bumbu masak, juga dikenal secara tradisional dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol tinggi, diare, hipertensi dan diabetes melitus.³⁷

Penelitian menunjukkan terget stres oksidatif dan nitrosatif serta apoptosis sel ginjal disebabkan oleh hiperglikemia melalui pemberian antioksidan atau protein sitoprotektif. Antioksidan yang diberikan pada binatang dapat memberikan efek protektif pada pengembangan diabetes nefropati. Komponen endogenous antioksidan dapat memperbaiki keseimbangan redoks. Penelitian pada mencit diabetes yang diinduksi stz menunjukkan bahwa perlakuan waktu singkat dengan antibodi TGF-

β dapat menurunkan hipertrofi, fibronektin, kolagen tipe IV, dan ekspresi TGF- β .^{29, 30, 50, 51, 52}

Studiawan melaporkan bahwa ekstrak daun salam memiliki efek hipoglikemik. Dalam penelitiannya, hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 15 ekor sebagai berikut: 1) Kelompok kontrol: Hewan coba diberi perlakuan dengan suspensi CMC Na ; 2) Kelompok I: Hewan coba diberi perlakuan dengan ekstrak daun salam setara dengan 1 kali dosis manusia atau 2,62 mg/ 20 gr BB mencit; 3) Kelompok II: Hewan coba diberi perlakuan dengan ekstrak daun salam setara dengan 2 kali dosis manusia atau 5,24 mg/ 20 g BB mencit. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun *Eugenia polyantha* dosis 2,62 mg/kg BB dan 5,24 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa mencit jantan yang diinduksi dengan aloksan.³⁹ Dugaan glikosida flavonoid yang terkandung dalam daun tersebut bertindak sebagai penangkap radikal hidroksil sehingga mencegah aksi diabetogenik dari aloksan.

Menurut Melhem pemberian α -lipoic acid yang merupakan antioksidan pada tikus diabetic akibat induksi streptozotocin dosis 60 mg/kgBB intra peritoneal dapat menurunkan kadar TGF- β dan mengurangi ekspansi mesangial glomerulus.⁴⁰

Fenomena penurunan kadar AGE pada peningkatan antibodi anti-AGE telah dibuktikan pada sebuah penelitian pada mencit diabetes yang sebelumnya divaksinasi dengan AGE-BSA akan mengalami

penurunan kadar AGE dalam sirkulasi. Peran *antibody anti-AGE* yakni menurunkan kadar AGE dalam sirkulasi melalui terbentuknya imun kompleks AGE-IC yang nantinya di eliminasi oleh makrofag melalui Fc γ RII-B2.⁴¹ sehingga dapat menghambat overekspresi dari TGF- β .

2.3.4. Kandungan Kimiawi Daun Salam

Fitokimia dari ekstrak *syzygium polyanthum* (Wight) Walp menunjukkan bahwa ekstrak etanol Daun Salam mengandung alkaloid, karbohidrat, tanin, steroid, triterpenoid, dan flavonoid, serta saponin pada buah Salam.¹⁴ Daun salam juga terdapat kandungan kimia berupa minyak atsiri, sitral dan eugenol, tanin dan flavonoida.³⁵ Uji Fitokimia diketahui 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. Steroid dan triterpenoid ditampilkan sifat analgesik.^{39,42}

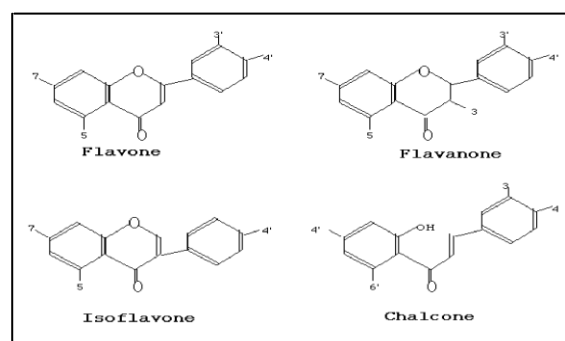
2.3.5. Peran Flavonoid Terhadap Ekspresi TGF- β

Senyawa flavonoid yang merupakan salah satu golongan dari polifenol sampai saat ini belum dimanfaatkan secara optimal dan masih digunakan secara terbatas. Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid tidak stabil terhadap perubahan pengaruh oksidasi, cahaya, dan perubahan

kimia, sehingga apabila teroksidasi strukturnya akan berubah dan fungsinya sebagai bahan aktif akan menurun bahkan hilang dan kelarutannya rendah. Kestabilan dan kelarutan dapat ditingkatkan dengan cara mengubah senyawa flavonoid menjadi bentuk glikosida melalui reaksi kimia maupun enzimatik dengan bantuan enzim transferase.⁴³

Flavonoid termasuk golongan senyawa dengan struktur kimia C6-C3-C6. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin A, satu cincin B dan tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi.⁴⁴ Umumnya terkait dengan gula sebagai *O*-glikosida dan *C*-glikosida, dalam sel tumbuhan terdapat dalam vakuola sel. Flavonoid membentuk kompleks dengan protein yang memiliki aktivitas anti diabetes dengan cara meningkatkan proliferasi sel β pankreas.³⁵

Flavonoid dapat meningkatkan proses mitogenesis, interaksi sel dan adhesi yang memiliki peran dalam ephitelization process.³⁶ sehingga dapat menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.⁴⁵



Gambar 6. Struktur Flavonoid
Dikutip dari : Sumono and Wulan: 2008

Flavonoid menghambat enzim yang bertanggungjawab pada produksi radikal anion superoksida seperti xantin oksidase dan protein kinase. Flavonoid juga menunjukkan penghambatan terhadap siklo-oksigenase, lipoksigenase, mikrosomal monooksigenase, glutathion S-transferase, suksin oksidase mitondria, dan NADH oksidase yang seluruhnya terlibat dalam pembentukan ROS. Flavonoid merupakan anti-oksidan kelas tinggi karena bekerja dengan memerangkap (*scaveng-ing*) radikal bebas dan ROS seperti radikal anion superoksida, dan radikal bebas hidroksil.⁴⁶

Peran flavonoid daun salam dapat menghambat Alpha glukosidase (Agis) yang di hasilkan oleh usus halus. Enzim ini bertanggung jawab untuk katalitik pembelahan ikatan glikosidik dalam pencernaan proses karbohidrat.⁴⁷ Flavonoid mendonasikan atom hidrogennya melalui kemampuan mengkleat logam dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) dalam bentuk bebas yang disebut aglikon.⁴⁴ Bentuk senyawa flavonoid pada daun salam seperti gallic acid, eugenol, kaemferol dan quercetin yang berkontribusi dalam antioksidan.⁸

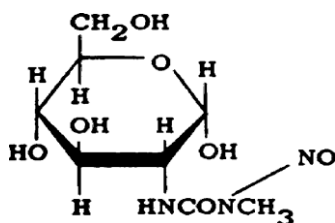
Alpha-glukosidase merupakan enzim yang terletak di membran epithelium dalam usus halus yang berfungsi menghidrolisis karbohidrat dalam makanan menjadi monosakarida, seperti glukosa dan fruktosa. Oleh enzim tersebut kemudian diserap ke dalam darah, meningkatkan kadar glukosa darah.⁴⁵ Kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun

salam dapat menurunkan ekspresi TGF- β podosit pada ginjal tikus diabetik melalui penurunan kadar glukosa darah dengan memutuskan rantai α -glukosidase.

Lelono dan Tachibana juga melaporkan Pada pemeriksaan hiperglikemia menunjukkan penurunan glukosa darah dengan dosis 100 mg kg-BB lebih baik dari pada dosis 200 atau 300 mg kg-BB, dapat menurunkan 53, 45 % dalam perawatan selama 21 hari. Selain itu Daun Salam juga berfungsi sebagai antioksidan (87%).¹¹

2.4. Induksi Streptozotocin

STZ atau 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-gluko piranose) merupakan bubuk putih dengan berat molekul 265,221g/ mol, adalah senyawa glukosamin-nitrosourea. Struktur kimia STZ adalah sebagai berikut :



Gambar 7.

Structure of Streptozotocin (STZ) as determined by Herr di kutip dari A.D. Bolz'an, M.S. Bianchi / *Mutation Research* 512 (2002) 121–134

STZ menyebabkan toksisitas pada sel-sel β pankreas dengan merusak DNA melalui mekanisme aktivasi *Poly-ADP ribosylation*.⁴⁹ penipisan NAD⁺ dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP memicu pembentukan substrat enzim *xanthine oxidase* sehingga terjadi pembentukan radikal superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil.¹³ STZ mirip dengan

glukosa yang diangkut ke dalam sel β oleh *GLUT2* (*Glucosa Transporter-2*) oleh membran sel dan menyebabkan alkilasi DNA dan secara tidak langsung⁴⁹ melalui *Nitrit Oxide* (NO).⁵⁰

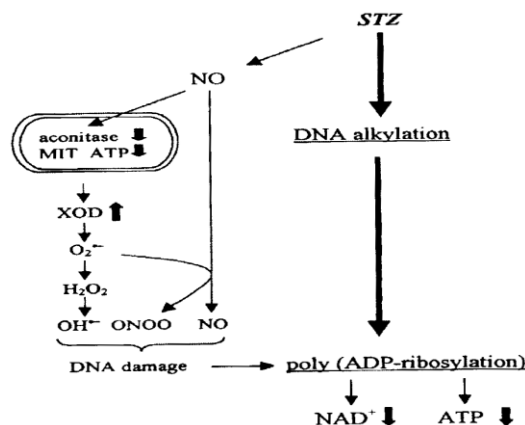
STZ menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas, dengan 2 cara, tergantung pada dosis. Selektivitas untuk sel β berhubungan dengan akumulasi preferensial kimia dalam sel β setelah masuk melalui reseptor transporter glukosa GLUT2: kesamaan struktural kimia dengan glukosa memungkinkan STZ untuk mengikat reseptor ini. Pada dosis tinggi, biasanya diberikan secara tunggal, STZ menyebabkan alkilasi DNA sehingga memunculkan reaksi kekebalan dan inflamasi, terkait dengan pelepasan glutamat dekarboksilase asam autoantigens. Dalam kondisi ini, kerusakan sel β dalam keadaan hiperglikemik dikaitkan dengan infiltrat inflamasi termasuk limfosit dalam pankreas.⁵¹

STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasikan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas. STZ merupakan donor NO (*nitric oxide*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas *guanilil siklase* dan pembentukan cGMP.¹³

NO dihasilkan sewaktu STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena 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 pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas.¹³

Szkudelski mekanisme induksi kerusakan sel β pancreas pada tikus oleh STZ (Gambar 8)



Gambar 8. Mekanisme induksi kerusakan sel β pancreas pada tikus oleh streptozotocin
MIT = mitokondria; XOD = xanthine oksidase

Induksi streptozotocin pada diabetes dalam waktu 48 jam langsung menyebabkan necrosis dan kerusakan pada sel- β pankreas. *Multiple-Dosis Low-Streptozotocin* (MLDS) menyebabkan respon sel imun memproduksi sitokin dan nitrogen. Ekspresi isoform sel- β diinduksi NO synthase (iNOS), NO dan ROS seperti peroxynitrite. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan kerusakan sel- β . produksi NO dikatalisis oleh enzim *nitric oxide synthase* (eNOS) yaitu *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Peningkatan kadar NO dan iNOS dalam suatu jaringan menunjukkan adanya

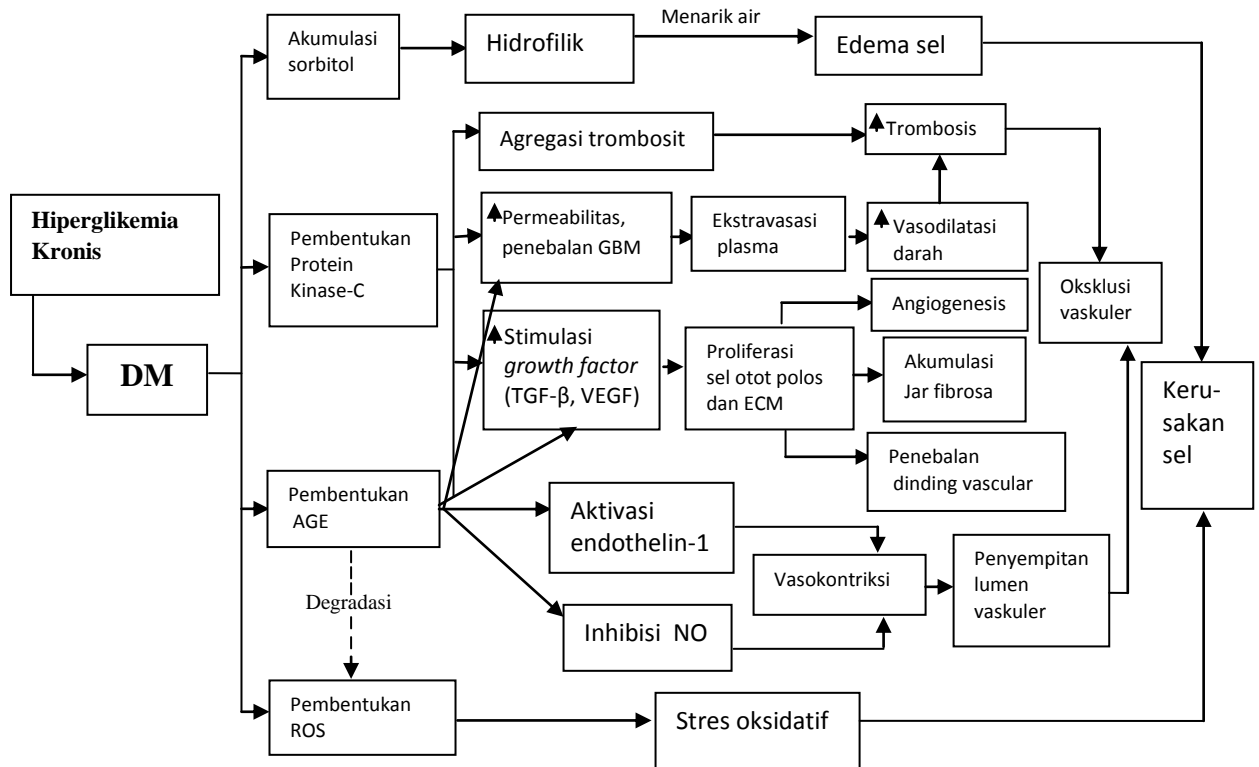
proses peradangan pada jaringan tersebut, keadaan ini menyebabkan hiperglikemia progresif dan insulinitis.⁵⁰ STZ menghambat siklus Krebs dan secara substansial mengurangi oksigen di mitokondria, membatasi produksi ATP menyebabkan hal ini menyebabkan deplesi nukleotida di sel- β .¹³

Akbarzadeh menyatakan bahwa berdasarkan pengamatan morfologi terhadap tingkat kerusakan sel-sel beta pankreas menunjukkan bahwa tikus yang diinduksi dengan STZ dosis 60 mg/kg BB mengalami DM sedang karena masih terdapat sejumlah sel-sel beta 2-4 hari. Sel Langerhans pancreas yang tersisa akan mengalami hipertrofi dan penurunan sekresi insulin yang diperlukan untuk metabolisme.⁵²

Menurut Szkudelsky kisaran dosis STZ yang sering digunakan tunggal intravena dosis pada tikus dewasa untuk menginduksi IDDM adalah antara 40 dan 60 mg/ kg b.w. tetapi dosis yang lebih tinggi juga digunakan. STZ juga berkhasiat setelah intraperitoneal pemberian dosis yang sama atau lebih tinggi, tetapi dosis tunggal di bawah 40 mg / kg b.w. mungkin tidak efektif.¹³

Induksi STZ pada tikus Sprague Dawley dosis 60 mg/kgBB, menyebabkan terjadinya hiperglikemia yang selanjutnya terjadi ekspansi matriks mesangial, glomerulosklerosis dan peningkatan ekspresi TGF- β . Kondisi ini dapat dihambat dengan pemberian asam α lipoat yang merupakan antioksidan sehingga menghambat stress oksidatif pada hiperglikemia.⁴⁰

2.5. Skema Patofisiologi Diabetes Melitus



Skema 1. Patofisiologi DM