

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun salam terhadap kadar 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 dapat meningkatkan proses mitogenesis, interaksi sel dan adhesi yang memiliki peran dalam proses epitalisasi. sehingga dapat menghambat enzim α -glukosidase dengan memerangkap (*scaveng-ing*) radikal bebas, sehingga dapat menurunkan gula darah. Penelitian terdahulu juga menunjukkan penurunan glukosa darah dengan dosis 200 atau 300 mg kg-BB, dapat menurunkan 53,45% gula darah tikus puasa. Hal ini menunjukkan bahwa flavonoid menstabilkan reaksi ROS melalui reaktivasi

peningkatan radikal bebas karena reaktivitas yang tinggi dari kelompok *hydroxyl* flavonoid membuat radikal bebas menjadi *inactive*.^{11,36, 46}

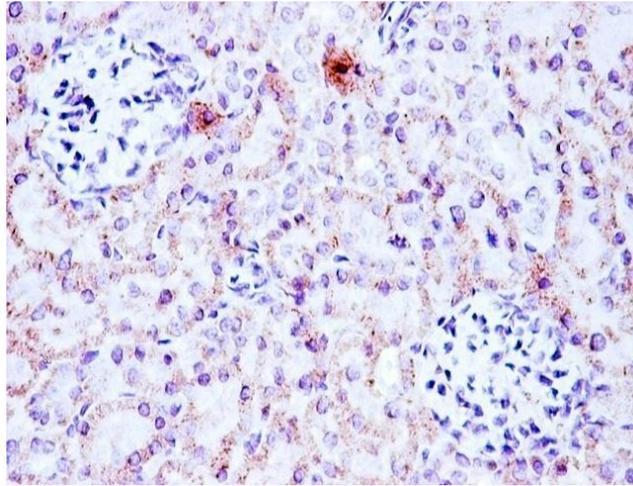
Pada penelitian awal menggunakan dosis ekstrak daun salam dengan rujukan dosis 2,62 mg/ 20 gram BB ekstrak³. Pada awal penelitian ditetapkan dosis EEDS pada masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :Perlakuan 1 : EEDS 18,1 mg/ 200 gr berat badan, Perlakuan 2 : EEDS 36,2 mg/ 200 gr berat badan, Perlakuan 3 : EEDS 72,4 mg/ 200 gr berat badan. Hasil penelitian menggunakan dosis awal tersebut menunjukkan bahwa rata-rata gula darah sewaktu Post EEDS pada kelompok perlakuan dosis 1 adalah 493 mg/dl, sedangkan pada dosis 2 adalah 527,75 mg/dl, dan perlakuan dosis 3 adalah 522 mg/dl. Hasil analisis menunjukkan bahwa rata-rata GDS Pre EEDS adalah 522,62 mg/dl dengan standard deviasi 72,71 mg/dl. Setelah pemberian EEDS rata-rata GDS adalah 523,18 mg/dl dengan standard deviasi 136,15 mg/dl. Pada hasil analisis menggunakan uji t dependent terhadap perbedaan rata-rata GDS Pre EEDS dengan GDS Post EEDS menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara GDS Pre EEDS dengan GDS Post EEDS (*p value* : 0,275). 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 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 :

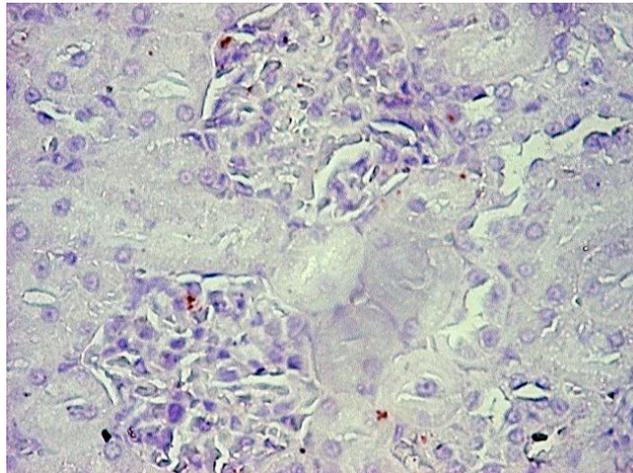
Perlakuan 1 : EEDS 150 mg/ 200 gr berat badan, perlakuan 2 : EEDS 300 mg/ 200 gr berat badan dan dosis perlakuan 3 : EEDS 450 mg/ 200 gr berat badan. Pada studi Lelono dan Tachibana telah menggunakan ekstrak daun salam dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB dalam 21 hari. Pada dosis 100 mg/kg BB dapat meregulasi gula darah.

6.2. Pengaruh pemberian ekstrak etanol salam terhadap ekspresi TGF- β podosit glomerulus ginjal

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai allred score TGF- β pada podosit glomerulus ginjal menunjukkan lemah, baik pada kelompok kontrol ataupun kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak daun salam pasca induksi *streptozotocin* hari kelima tidak berdampak pada ekspresi TGF- β di podosit glomerulus. Hasil uji statistik juga menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna pada score ekspresi TGF- β di podosit glomerulus ginjal. ($p < 0,05$). Perbandingan antara score ekspresi TGF- β pada kelompok penelitian ditampilkan pada gambar 9.



Gambar 8 : Ekspresi TGF- β podosit glomerulus ginjal tikus SD (P-3) dengan proportion score (PS) :0 dan intensity score (IS) : 0 , pada pembesaran gambar 200x
P34T (P3-4 TGF β)



Gambar 9 : Ekspresi TGF- β 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
P15T (P1-5 TGF β)

TGF- β memainkan peranan penting dalam menjaga stabilitas struktur pembuluh darah. TGF- β dan reseptornya terdapat pada semua sel tubulus

proksimal dan sel glomerulus yaitu di podosit. Pada penelitian sistem kultur dijelaskan bahwa overekspresi TGF- β lebih banyak terjadi di podosit.^{3,18} Ekspresi TGF- β podosit glomerulus terdapat pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dua. Namun demikian penelitian menunjukkan bahwa ekspresi TGF- β banyak terdapat tubulus ginjal pada semua kelompok. Sedangkan pada sel podosit ekspresi TGF- β hanya sedikit.^{16, 17, 19}

Pada stase awal, diabetes ekspresi TGF- β pada glomerulus meningkat, beberapa *growth factor* berimplikasikan pada patogenesis diabetes melitus melalui sistem interna yang kompleks, TGF- β diperkirakan sebagai poin penting dari pertemuan/ pemusatan jalur hemodinamik dan meabolik yang di induksi oleh PKC dan AGES. mengakibatkan peningkatan AGE (*advanced glycation end-product*). Interaksi AGE dengan RAGE (*Receptor for advanced glycation end-product*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive oxygen species*) intraseluler.²⁷ Penumpukan AGE pada berbagai jaringan dapat mengakibatkan berbagai komplikasi. Ginjal merupakan tempat metabolisme AGE sekaligus lokasi akumulasi AGE dan kerusakan akibat AGE. AGEs meningkatkan sklerosis glomerulus podosit, fibrosis dan hipertrofi ginjal.^{14, 18, 28, 29, 31}

Ekspresi TGF- β menstimulasi beberapa komponen matriks pada waktu itu, juga merubah komposisi matriks ekstraseluler. TGF- β mungkin merupakan mediator penting dari pemulihan glomerulus di glomerulonefritis proliferasi. TGF- β diperlukan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel endotel glomerulus dan peritubular. Di ginjal, ekspresi TGF- β

yang paling menonjol dalam podocytes glomerulus dan sel epitel tubular, sedangkan reseptor TGF- β terutama ditemukan pada seluruh permukaan glomerulus dan tubulus proksimal. Ekspresi TGF- β pada podosit glomerulus tikus *Sprague dawley* dengan GDS yang normal (108 mg/dL). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi TGF- β podosit glomerulus terdapat pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan satu dan dua. Namun pada tubulus ginjal ekspresi TGF- β banyak ditemukan disemua kelompok.

Di glomerulus, TGF- β diproduksi oleh podosit dan sel mesangial.²¹ TGF- β memiliki efek terhadap proliferasi, hipertropi dan apoptosis pada sel ginjal, dimana glomerulus merupakan situs cedera awal. Peningkatan aktivitas TGF- β oleh podosit menyebabkan tidak hanya penebalan GBM tetapi juga apoptosis podosit, sehingga podosit dianggap lebih sensitif terhadap peningkatan kadar TGF- β .⁴

Peningkatan ekspresi TGF- β pada daerah yang terekspresikan (ginjal) mengindikasikan terjadinya terjadinya proses inflamasi dan fibrosis pada daerah tersebut.²¹ Pada pasien dengan penyakit podosit progresif, seperti segmental fokal glomerulosklerosis dan nefropati membranosa, ekspresi TGF- β ditingkatkan dalam podosit. biomekanik regangan pada penyakit ini dapat menyebabkan overekspresi TGF- β dan Ang II oleh podosit.³¹

Pada penelitian yang dilakukan beberapa dekade lalu menunjukkan peranan TGF- β sebagai mediator patobiologi glomerular dan

tubulointerstisial pada penyakit ginjal kronis, penelitian tentang sinyal TGF- β yang berfokus pada biologi molekular fibrogenesis yaitu sebagai mediator apoptosis dari epitel mesensim sehingga terjadi proses mekanisme progresifitas penyakit ginjal. Menurut Ziyadeh et al kaskade sinyal TGF- β merupakan patomekanisme aktivasi seluler yang mendasari penyakit ginjal.^{5, 31, 32}

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol setelah 19 hari pasca induksi STZ sebagian besar menunjukkan ekspresi TGF- β pada podosit glomerulus. Pada kelompok perlakuan ekspresi TGF- β yang belum muncul setelah induksi, karena aktivasi sinyal TGF- β berurutan dari dua permukaan sel reseptor, yakni tubulus proksimal dan glomerulus.^{6,20,16,14} sehingga ekspresi pada podosit belum muncul dan pasca induksi hari kelima sudah diberi terapi ekstrak daun salam sehingga ekspresi TGF- β pada podosit kelompok perlakuan lemah.

Secara statistik dapat dilihat bahwa perbedaan allred score pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol lebih disebabkan karena jarak antara induksi STZ dengan pemeriksaan IHC terlalu dekat. Hasil pemeriksaan HbA1c pada kelompok perlakuan menunjukan bahwa hewan uji masih dalam kondisi diabetes dengan kontrol yang baik (2,5 %-5,9%). Studi lain menunjukkan bahwa TGF- β disekresikan oleh sel mesangial, disimpan dalam matriks mesangial, kemudian TGF- β dilepaskan dan terlokalisasi pada permukaan podosit.⁶ Sehingga memungkinkan ekspresi

TGF- β belum benar-benar muncul pada podosit tikus perlakuan sudah di beri terapi EEDS.

Kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita diabetes mellitus memicu terjadinya proses proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGE (*advanced glycation end-product*). Interaksi AGE dengan RAGE (*Receptor for advanced glycation end-product*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive oxygen species*) intraseluler.²⁷ Penumpukan AGE pada berbagai jaringan dapat mengakibatkan berbagai komplikasi. Ginjal merupakan tempat metabolisme AGE sekaligus lokasi akumulasi AGE dan kerusakan akibat AGE. AGEs meningkatkan sklerosis glomerulus podosit, fibrosis dan hipertrofi ginjal.^{29,31,32,40}

Penelitian Wharram menunjukkan pada tikus diabetes bahwa terapi antioksidan tidak efektif bila diberikan sendirian dan efektif hanya bila dikombinasikan dengan pengobatan insulin. Penelitiannya menunjukkan bahwa hasil terapi insulin dalam penurunan yang signifikan, namun tidak lengkap tekanan darah dan parameter ROS-dimediasi lain, sementara terapi antioksidan saja tidak berpengaruh pada parameter ini.⁴ Terapi antioksidan hanya merupakan penundaan jaringan yang rusak diabetes daripada memberikan pemulihan lengkap.

6.3. Keterbatasan penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah:

untuk mengobservasi ekspresi TGF- β tidak hanya pada podosit glomerulus tetapi juga pada tubulus proksimal dan sel mesangial ginjal. Waktu yang relatif singkat ternyata belum memunculkan ekspresi TGF- β pada podosit glomerulus, sehingga menyebabkan hasil yang negatif. Proses pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan GDS, HbA1c harus memperhatikan waktu dan jarak tempuh tempat pemeriksaan sampel untuk mencegah terjadinya lisis.