

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Fibronektin pada DM**

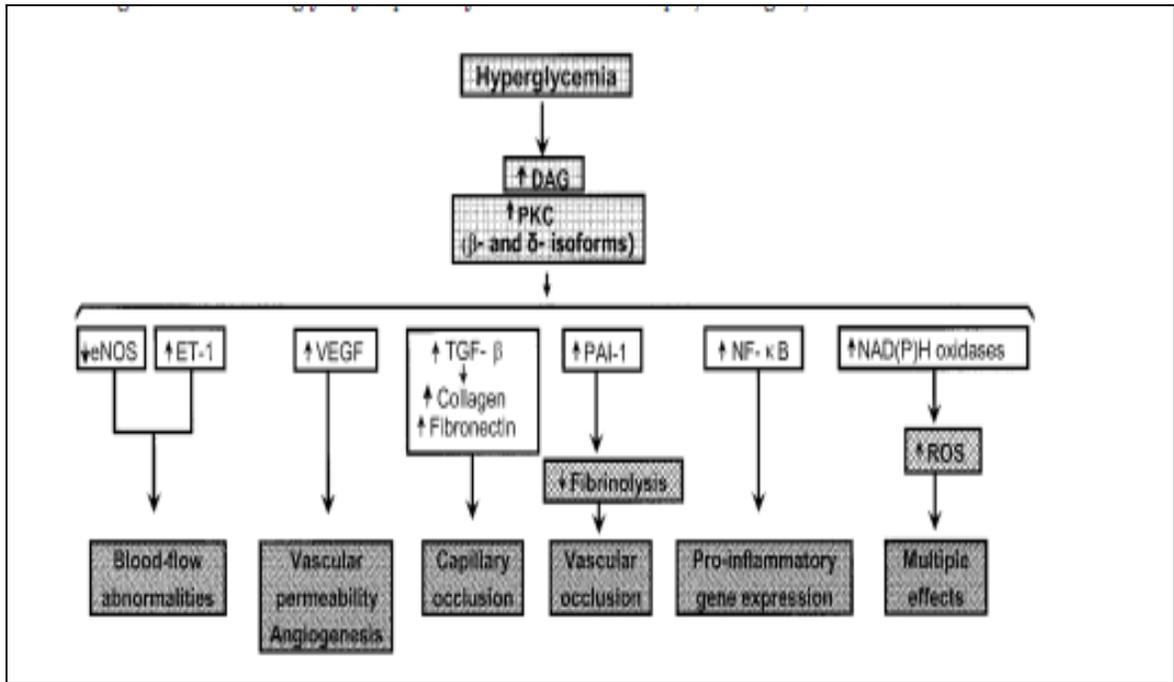
Fibronektin merupakan komponen penting pada matrik ekstraseluler yang diproduksi pada mesangial sel. Fibronektin adalah glikoprotein dalam matriks ekstraseluler dan permukaan sel dan memainkan peran penting dalam perbaikan dan rekonstruksi jaringan. Fibronektin molekul memiliki panjang 600 A , lebar 25 A dan berat molekul KD adalah 550 . Terdiri dari dua subunit . Ikatan disulfida yang mengikat subunit dengan subunit lain berdiri di dekat ujung terminal karboksi. Fibronektin juga berperan penting dalam embriogenesis , onkogeniktransformasi , adhesi sel, penyembuhan luka, perbaikan jaringan , fungsi platelet dan migrasi sel. Selanjutnya memiliki peran dalam peradangan sebagai opsonin dan agen *chemotactic* . Fibronektin disintesis oleh hepatosit, selain itu juga disintesis dan disekresi oleh beberapa jenis sel seperti makrofag , trombosit , fibroblas , sel-sel ketuban , endotelsel , melanosit ,sel mast , sel Schwann , sel sinovial dan kondrosit . Fibronektin plasma memiliki paruh hidup 24-72 jam . Rata-rata konsentrasi plasma fibronektin pada orang biasa adalah antara 250-400pg / ml .<sup>5</sup>

Perubahan matriks ekstraseluler dan kerusakan dalam pembuluh darah terjadi pada pasien diabetes. Pada diabetes akumulasi protein dalam matriks subendothelial terlihat sebagai PAS positif. Peningkatan kadar plasma dari fibronektin menunjukkan adanya cedera dinding dan matriks ekstra seluler. Peningkatan sintesa fibronektin dan penurunan degradasi dari komponen matrik ekstraselular seperti fibronektin dan

kolagen terlihat pada saat glukosa darah tinggi. Akumulasi tersebut merupakan salah satu indikasi adanya kerusakan fungsi pada ginjal.<sup>5,6</sup>

Penimbunan matrik ekstraselular pada membran basalis gromerulus merupakan penyebab ekspansi mesangial dan intertisiil serta penebalan membran basalis gromerulus. Secara progresif kelainan tersebut berakibat pada penurunan fungsi ginjal dan perubahan struktur pada gromerulus. Beberapa faktor yang berkontribusi pada kelainan tersebut diantaranya:

- a. Peningkatan faktor pertumbuhan (*growth factor*) seperti: TGF- $\beta$ , IGF, VEGF.
- b. Aktivasi protein kinase C (PKC)
- c. Aktivasi sitokin seperti renin, renin angiotensin, endotelin.
- d. Peningkatan pembentukan AGEs (*advance glycation end product*)
- e. Peningkatan aktivasi jalur aldose redutase melalui jalur poliol.
- f. Pembentukan ROS(*reactive oxygen species*)
- g. Perubahan metabolisme proteoglikan gromerulus.<sup>11</sup>



Gambar.1. Akibat hiperglikemi pada jaringan tubuh

### 2.1.1. Peningkatan faktor pertumbuhan (*growth factor*)

#### a. TGF $\beta$ (*Transforming Growth Factors*)

*Transforming growth factors* (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) dan reseptornya terdapat pada semua sel glomerulus dan sel tubulus proksimal. TGF  $\beta$  menstimulasi sintesis protein matrik ekstraseluler, menurunkan sintesis MMP (*metalloproteinase*), dan peningkatan produksi TIMP (*Tissue inhibitor of MMPs*). *Mitogen activated protein kinase* berperan dalam glucose-induced TGF  $\beta$  sehingga terjadi peningkatan produksi matrik ekstraseluler pada sel mesangial.<sup>10</sup>

b. IGF (*Insulin-like growth factor*)

Penurunan produksi IGF pada hepar dan sekresi growth hormone menurun pada DM, sehingga IGF -1 pada ginjal terstimulasi dan menginduksi terjadinya proliferasi pada sel mesangial.<sup>10</sup>

c. VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)

*Vascular endothelial growth factor* merupakan mitogen poten di sel endothelial vaskuler dan regulator penting dalam angiogenesis. Pada sel endothel glomerulus terdapat reseptor VEGF tipe 2. Kelainan secara mekanik pada sel mesangial memicu terjadinya produksi VEGF yang berakibat pada gangguan haemodinamik glomerulus.<sup>10</sup>

d. EGF (*Epidermal growth factor*)

Reseptor EGF terdapat pada mesangium, tubulus, dan sel interstisiil glomerulus. EGF berpengaruh terhadap sintesa Matrik ekstraseluler seperti fibronektin dan perubahan protein matrik ekstraseluler. EGF juga merangsang prolifersi tubulus dan menyebabkan hipertropi pada ginjal.<sup>10</sup>

**2.1.2. Aktivasi protein kinase C (PKC)**

Peningkatan sintesa glukosa-6P akan diikuti peningkatan produksi fruktosedan menstimulasi peningkatan dehidrooksidaseton dan gliseraldehyde. Peningkatan ini mengakibatkan peningkatan diasilgliserol (DAG) yang akan mengaktivasi PKC. Aktivasi PKC menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskuler,

ekspresi molekul adhesi seperti VCAM dan ICAM,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport dan pH intrasel, proliferasi sel, sintesis kolagen membrana basalis, sintesis fibronektin, prostanooid – prostanooid vasokonstriktor, hormon – hormon vasoaktif, AGEs (Advanced Glycosylated End products), endotelin-I, serta hambatan terhadap ekspresi gen.<sup>10</sup>

### 2.1.3. Aktivitas sitokin (Renin, angiotensin)

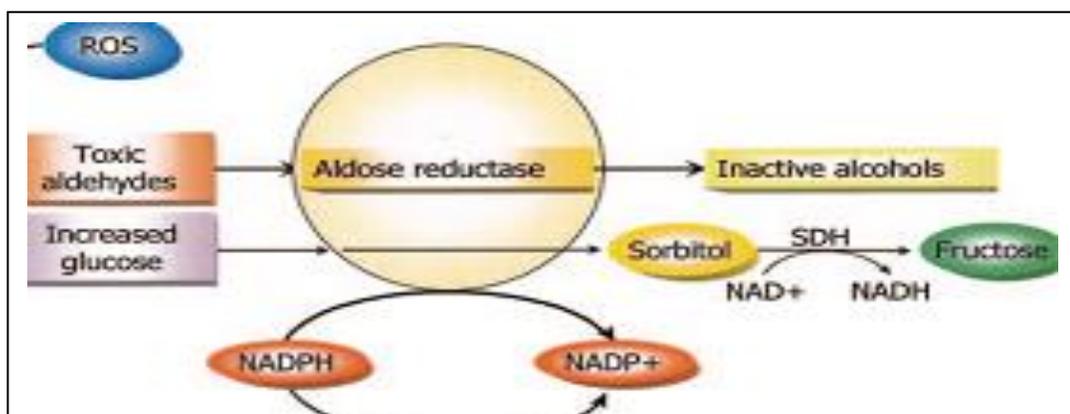
TGF  $\beta$  diproduksi sebagai akibat peningkatan aktivitas aparatus jaxtoglomerulus karena produksi prorenin dan berkaitan dengan kelainan matrik ekstraseluler seperti fibronektin. Selain renin, sitokin lain seperti angiotensin II juga menstimuli sintesis matrik ekstraseluler karena peningkatan TGF  $\beta$ .<sup>10</sup>

### 2.1.4. Peningkatan pembentukan AGEs (*Advance glycation end product*)

Sintesis growth factor seperti TGF dirangsang melalui peningkatan AGEs dan menstimulasi pertumbuhan sel. Proses glikasi ini menyebabkan peningkatan produksi matrik ekstraseluler seperti kolagen, laminin dan fibronektin.<sup>11</sup>

### 2.1.5. Peningkatan aldose reduktase melalui jalur poliol.

Aldose reduktase merupakan enzim katalis glukosa menjadi sorbitol, akumulasi sorbitol karena peningkatan enzim ini menyebabkan meningkatnya diasilgliserol (DAG) sebagai aktivator PKC yang menyebabkan ekspansi sel mesangial dan proliferasi sel.<sup>12,13</sup>



Gambar 2. Peningkatan aldose reduktase melalui jalur poliol.

#### **2.1.6. Pembentukan ROS (*Reactive oxygen species*)**

*Nitric oxide* merupakan turunan ROS (*reactive oxygen species*) yang akan mengaktivasi aldose reduktase. Peningkatan aldose reduktase yang menghasilkan sorbitol akan mengganggu integritas dan fungsi seluler.<sup>14</sup>

#### **2.1.7. Perubahan metabolisme proteoglikans glomerulus**

Hilangnya proteoglikan anionik berperan pada sekresi albumin. Komponen utama glikosaminogen pada membran basalis glomerulus adalah heparin sulfat yang menghambat proliferasi sel mesangium.<sup>12</sup>

### **2.2. Tanaman obat lain yang berpengaruh terhadap ekspresi fibronektin**

Selain daun salam, terdapat tanaman obat lain yaitu *acorus tatarinowii* & *morinda citrifolia* yang terbukti dapat menurunkan ekspresi fibronektin pada sel mesangial. *Acorus tatarinowii* adalah tanaman sejenis rimpang yang tumbuh di negara China. Oleh masyarakat China tanaman ini digunakan sebagai obat herbal. Tanaman ini mengandung antioksidan yang menghambat pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) dan secara efektif menghambat peningkatan fibronektin pada sel mesangial.

### **2.3. Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*)**

### **2.3.1. Morfologi Daun Salam**

Daun Salam adalah Daun *Syzygium polyanthum (wight.) Walp.* 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.<sup>15,16,17</sup>

### **2.3.2. Taxonomy Daun Salam**

Secara ilmiah, Daun salam bernama *Eugenia polyantha Wight* dan sinonim adalah *Eugenia lucidula Miq* dan *Syzygium polyanthum Wight*. 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).<sup>17</sup>

### **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. Tanaman obat adalah bagian terapeutik penting untuk berbagai penyakit karena mengandung banyak senyawa metabolit sekunder dengan nilai-nilai terapeutik. Pemberian ekstrak daun 0,72 g/kg BB selama 15 hari

dapat menurunkan kadar LDL kolesterol tikus hiperlipidemia menggunakan analisis metode *Precipitation of LDL, VLDL dan cyclomicron*. Senyawa- senyawa yang diduga mampu menurunkan kadar trigliserida tersebut adalah niasin, serat, tianin dan vitamin C. Pada ekstrak etanolik daun dosis 2,62 mg/20 g BB dan 5,24 mg/20 g BB dapat menurunkan secara bermakna kadar glukosa darah mencit jantan yang diinduksi aloksan. Dugaan glikosida flavonoid yang terkandung dalam daun tersebut bertindak sebagai perangkap radikal hidroksil sehingga mencegah aksi diabetogenik dari aloksan. Salam sebagai antidiare dapat menggunakan ekstrak etanolik kulit batang dosis 40mg/kg BB yang hampir sama dengan loperamid HCL (1 mg/kg BB) .<sup>17,18</sup>

#### **2.3.4. Kandungan Kimiawi Daun Salam**

Analisis fitokimia dari ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak etanol Daun Salam mengandung alkaloid, karbohidrat, tanin, steroid, triterpenoid, dan flavonoid, serta saponin pada buah Salam. Daun salam juga terdapat kandungan kimia berupa minyak atsiri, sitral dan eugenol, tanin dan flavonoid. Uji Fitokimia diketahui menunjukkan aktivitas obat dan aktivitas fisiologis. Saponin menunjukkan sifat hipokolesterolemik, steroid dan triterpenoid ditampikan sifat analgesik. Flavonoid telah dilaporkan memiliki antibakteri, antioksidan, anti-inflamasi, anti alergi, antimutagenik, dan aktivitas vasodilatasi. Steroid dan triterpenoid ditampikan sifat analgesik. <sup>17,18</sup>

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.<sup>19</sup>

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%). Alpha-glukosidase merupakan enzim yang terletak di membran epithelium dalam usus halus yang penting yang berfungsi menghidrolisis karbohidrat dalam makanan menjadi monosakarida, seperti glukosa dan fruktosa. Oleh enzim tersebut kemudian diserap ke dalam darah, meningkatkan kadar glukosa darah.<sup>20</sup>

Daun Salam yang digunakan sebagai antidiabetik ataupun antioksidan, hanya ditentukan berdasarkan satu tempat, pohon salam berusia 7 tahun dengan ketinggian 3-5 meter dengan diamete 20 cm. kemudian dipotong kecil-kecil dan dibuat ekstrak. (Lelono & Tachibana, 2013) dikeringkan dalam tiga hari dan di blender (Kusuma, et al., 2011). Berdasarkan penelitian menunjukkan ekstrak dengan pelarut air (1: 1) menunjukkan lebih banyak aktivitasnya sebagai inhibitor (IC<sub>50</sub> 70.90 jag inL-1) dari pada ekstrak metanol (IC<sub>50</sub> 91.52 jag mL<sub>-1</sub>) or ekstrak air (IC<sub>50</sub> 72.72 jag mL<sub>-1</sub>).

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.

#### **2.4. Induksi Streptozotocin (STZ)**

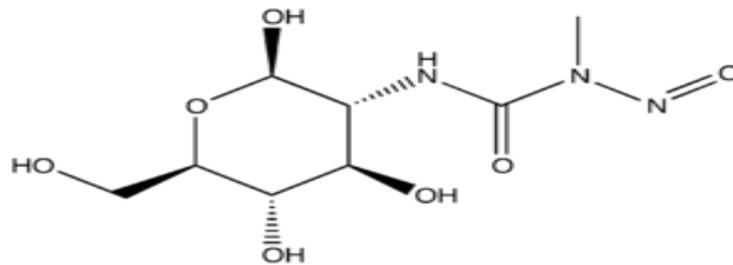
Penelitian tentang diabetes mellitus dilakukan menggunakan hewan percobaan didasarkan pada pathogenesis penyakit tersebut pada manusia. Menurut Cheta (1998) berdasarkan metoda pelaksanaannya hewan percobaan diabetes mellitus dibedakan menjadi dua yaitu :

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

Eksperimental laboratorium secara induksi dilakukan dengan beberapa metode. Secara pankreatomi, induksi diabetes mellitus dilakukan dengan mengambil 90-95% pancreas dari tubuh hewan uji. Sel Langerhans pancreas 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  $\beta$ -langerhans

pancreas. Pemberian STZ dosis 60mg/kg BB dapat menimbulkan proses autoimun yang mengakibatkan kerusakan sel  $\beta$  Langerhans dan akan memunculkan gejala klinik diabetes mellitus dalam waktu 2 sampai 4 hari. <sup>21</sup>

Streptozotocin atau 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-gluko piranose ) 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 dibawah.



Gambar 3.

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 IDDM. Selain itu STZ dapat menginduksi hewan coba menjadi diabetes mellitus tipe 2 apabila diberikan pada mencit atau tikus neonates yang berusia 1 sampai 2 hari. Dilaporkan bahwa STZ menyebabkan diabetes ringan sampai berat tergantung pada dosis yang diberikan baik secara intra vena maupun intra peritoneal. Perkembangan kondisi diabetes ditentukan oleh dosis, rute pemberian dan spesies hewan uji yang digunakan.<sup>22</sup>

Dosis STZ yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 adalah 40-60 mg/kg BB secara iv, 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  $\beta$  terhadap glukosa. Sementara sel  $\alpha$  dan  $\gamma$  tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian STZ pada neonates sehingga tidak berdampak pada perubahan glucagon dan somastatin. Patofisiologi tersebut identik dengan NIDDM.<sup>23</sup>

Jenis kelamin dan latar belakang genetic akan memengaruhi kerentanan hewan pengerat (Rodent) terhadap kerusakan pancreas 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.<sup>24</sup>

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 transferase dan AST (Aspartat amino transferase). Menurut Szkudelski mekanisme induksi kerusakan sel  $\beta$  pancreas pada tikus oleh STZ dapat dilihat pada gambar dibawah.

Gambar 4. Mekanisme induksi kerusakan sel  $\beta$  pancreas pada tikus oleh streptozotocin

MIT = mitokondria; XOD = xanthine oksidase

STZ menembus sel  $\beta$  Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA sel  $\beta$  pancreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan sel  $\beta$  pancreas. STZ merupakan donor NO ( nitrit oksid ) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan pada saat STZ mengalami metabolisme dalam sel. STZ juga

membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel  $\beta$  pancreas. 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  $\beta$  pancreas secara drastis.<sup>23</sup>

Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase di mana sel  $\beta$  pancreas mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim ini, yang selanjutnya akan meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase mengkatalisis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Dari pembentukan anion superoksida, terbentuk hydrogen peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel  $\beta$  pancreas. Kerusakan DNA akibat STZ dapat mengaktifasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD<sup>+</sup> 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. Induksi STZ pada tikus Sprague Dawley dosis 60 mg/kgBB, menyebabkan terjadinya hiperglikemia yang selanjutnya terjadi ekspansi matriks mesangial, glomerulosklerosis dan peningkatan kadar TGF $\beta$  pada urine. Kondisi ini dapat dihambat dengan pemberian asam  $\alpha$  lipoat yang merupakan antioksidan sehingga menghambat stress oksidatif pada hiperglikemia.<sup>23,25</sup>