

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Ekstraks etanol buah *Morinda citrifolia L*

Pembuatan ekstrak mengkudu dilakukan dengan cara mengesktrak buah mengkudu dengan larutan etanol 70 %. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium farmakologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Hasil ekstraksi berupa senyawa bioaktif mengkudu. Pelarut etanol dipilih karena pelarut ini dapat menarik \pm 89 % senyawa fenol dari buah *Morinda citrifolia L* ,hal ini dikarenakan etanol memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen intramolekul dengan gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa fenolik dan meningkatkan kelarutannya⁶⁷

Analisis hasil ekstrak *Morinda citrifolia L* terdiri dari total fenolat 18,5 mg asam galat tiap gr ekstrak; kadar flavonoid 18,3 mg quecertin tiap gr ekstrak diperiksa dengan metode Spektroskopi; uji antioksidan didapatkan hasil EC₅₀ 104,25 dengan metode DPHH.

6.2. Kadar Glukosa Darah Pasca Induksi *Streptozotocin*

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian STZ dalam dosis 40mg/kgbb, untuk menginduksi kerusakan pulau Langerhans dan sel β pankreas. Induksi STZ multipel dosis rendah menyebabkan *delayed onset* diabetes melalui aksi kombinasi kerusakan sel β dan cedera imunologik.³⁴

Hasil pemeriksaan kadar glukosa darah setelah suntikan STZ intraperitoneal, telah terjadi hiperglikemia pada semua kelompok adalah > 300 mg/dL. Kadar glukosa darah terendah adalah kelompok X3, selanjutnya adalah kelompok X1, K(+), dan tertinggi adalah X2. Proses perubahan konsentrasi glukosa darah akibat induksi STZ merupakan refleksi dari abnormalitas fungsi sel β dan menginduksi organ lain secara *reversible*, seperti ginjal dan medulla adrenal. STZ masuk ke dalam sel β pankreas melalui reseptor yang sama dengan glukosa yaitu GLUT-2, hal ini menjelaskan penelitian West, *et al* yang mengamati bahwa respon awal STZ adalah menghilangkan respon sel β terhadap glukosa,⁵⁹ yang dengan adanya STZ kemungkinan menyebabkan terhalangnya ikatan glukosa dengan GLUT-2. Kemudian terjadi respon umpan balik temporer diikuti oleh kerusakan dan hilangnya respon sel β secara permanen. Bleasel, *et al* mengatakan pemberian dosis 65mg/KgBB/iv; pencapaian kadar glukosa urin 500mg/Dl dan glukosa darah diperoleh 300-400mg/dL, selama dua minggu maka dikatakan hewan coba berada pada kondisi diabetes nefropati. Pada induksi kadar 40mg/kgBB tidak menunjukkan kematian dan kesakitan. Kadar mikroalbuminuria terjadi peningkatan pada minggu kedelapan dengan nilai terendah 7 mg/dl dan kadar tertinggi 219mg/dl.⁵⁹

6.3. Pengaruh Pemberian *Ekstrak Buah Morinda citrifolia L* Terhadap kadar MAU

Hasil uji statistik antar kelompok penelitian menunjukkan rerata kadar albumin dalam urin kelompok X2 adalah lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok

K(+) dengan $p=0,002$. Rerata kadar albumin urin kelompok X2 lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok X4 ($p=0,03$).

Produk AGEs merupakan reaksi antara glukosa dan protein yang akan meningkatkan produk glikosilasi dengan proses non enzimatis protein antara prekursor dikarbonil yang merupakan turunan glukosa intraseluler dengan amino dari protein intraseluler dan ekstraseluler. Terbentuknya AGEs dapat merusak sel, karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Adanya penimbunan ini dalam jangka panjang, akan merusak membran basalis dan mesangium yang akhirnya akan merusak seluruh glomerulus. Peneliti lain mengemukakan gangguan hemodinamik dan hipertrofi mendukung adanya hipertensi glomeruler dan hiperfiltrasi.

Hiperfiltrasi akan menyebabkan terjadinya filtrasi protein, di mana pada keadaan normal tidak terjadi. Bila terjadi reabsorpsi tubulus terhadap protein meningkat, maka akan terjadi akumulasi protein dalam sel epitel tubulus dan menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi seperti endotelin-1, osteoponin dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Faktor ini akan merubah ekspresi dari sitokin proinflamasi dan fibrosis sitokin ke infiltrasi sel mononukleus, menyebabkan kerusakan tubulointerstisial dan terjadi *renal scaring/renal injury*.

\ Jalur AGEs, precursor AGEs keluar secara difus dan memodifikasi molekul matriks ekstraseluler, mengubah sinyal matriks dan menyebabkan disfungsi sel.

Protein yang di modifikasi berikatan dengan reseptor AGE (RAGE) dan mengaktifkan sitokin inflamasi dan factor pertumbuhan .²⁸

Kadar AGEs dalam darah meningkat dalam perkembangan komplikasi mikrovaskuler pada *renal mesangial cell growth* yang terjadi selama diabetes nefropati. Ikatan AGEs dengan reseptor AGEs (RAGE) memicu timbulnya *reactive oxygen species* (ROS) dan aktivasi NF- κ B terhadap sel target, endothelium, sel mesangial dan makrofag dengan respons peningkatan permeabilitas vaskuler, sehingga terjadi *transvascular albumin leakage* yang menimbulkan mikroalbuminuria.²⁸

Morinda citrifolia L dari hasil penelitian mengandung antioksidan yaitu karetonoid , vitamin C dan vitamin A, dimana antioksidan memiliki efek protektif pada nefropati diabetes pada model mencit DMT2, terutama pada hiperglikemi , fokus pada sel mesangial.⁶⁷ Produksi ROS , mengaktifasi *nuclear transcription factor kappaB (NF κ B)* dan *activator protein-1(AP-1)* dan ekspresi *transforming growth factor-beta1(TGF β 1)* dan *monocyte chemotractant protein-1 (MCP-1)* menunjukkan paparan kadar glukosa tinggi menginduksi produksi ROS pada mitokondria kultur sel mesangial merupakan hasil aktifasi faktor transkripsi dan produksi sitokin memegang peranan penting pada ekspansi mesangial, dan merupakan gambaran pathogenesis diabetes nefropati .⁶⁷ Akumulasi karotenoid pada mitokondria kultur human sel mesangial menurunkan produksi ROS- modified protein pada mitokondria. Karotenoid mencegah progresifitas diabetes nefropati

melalui efek *ROS scavenging* pada mitokondria sel mesangial dan diharapkan sangat bermanfaat pada pengelolaan diabetes nefropati .⁶⁷

6.4. Pengaruh Pemberian *Ekstrak Buah Morinda citrifolia L* Terhadap Ekspresi VEGF Ginjal

Penelitian hasil score ekspresi VEGF jaringan ginjal hewan coba dengan STZ, induksi diabetes setelah pemberian MC berbagai dosis dari hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada skor ekspresi VEGF antara kelompok penelitian ($p < 0,001$). Perbandingan skor ekspresi VEGF pada kelompok penelitian juga ditampilkan pada gambar 9.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *vascular endothelial growth factor* (VEGF) berpengaruh terhadap patogenesis terjadinya mikroalbuminuria pada pasien diabetes. VEGF meningkatkan permeabilitas kapiler pada berbagai organ dan berperan pada regulasi permeabilitas glomerulus pada ginjal. Hasil analisis ekstrak buah mengkudu secara spektroskopi mengandung senyawa kimia yaitu fenolat merupakan turunan dari senyawa polifenol yang menunjukkan kerja sebagai inhibitor ekspresi dari VEGF, suatu pro-angiogenik mayor dan faktor proaterosklerotik pada VSMCs melalui pencegahan aktivasi redoks-sensitif dari p38 MAPK-pathway. Pada studi tentang potensi inhibitor dari polifenol pada SMCs terlihat bahwa *presenting hydroxyl residu* pada posisi 3' dapat menghambat induksi PDGF_{AB} dan ekspresi VEGF melalui pencegahan aktivasi p28 MAPK dan JNK, polifenol memiliki keistimewaan aktifitas sebagai *radical scavenging*.⁴

Terdapat kandungan kimia vitamin A dan E, quecetin yang merupakan senyawa flavonoid yang berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hydrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hydrogen menyebabkan radikal bebas stabil dan berhenti melakukan gerakan ekstrim, sehingga tidak merusak lipida, protein dan DNA yang menjadi target kerusakan sel.⁴⁴ Antioksidan dapat mempengaruhi jalur MAPK melalui modulasi ROS, atau langsung mengaktifasi MAPK, dan memiliki efek protektif pada DN pada hewan coba mencit DMT-2, terutama pada hiperglikemia, fokus pada sel mesangial. Antioksidan mencegah progresifitas DN melalui efek ROS scavenging pada mitokondria sel mesangial dan diharapkan sangat bermanfaat pada pengelolaan DN.⁴⁶ Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menghambat atau mencegah reaksi oksidasi, salah satu reaksi adalah reaksi glikosilasi atau reaksi Maillard yaitu nonenzimatik antara gugus amina protein dengan gugus aldehid dari glukosa akan menghasilkan senyawa dikarbonil dan *advanced glycation end products* (AGEs).⁶⁸

Reaksi pembentukan AGEs diduga turut mendasari komplikasi pada diabetes mellitus, akibat diabetes secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati serta katarak. Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak mengkudu berperan dalam menghambat laju pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil.⁶⁸

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak mengkudu dapat mengurangi ekspresi VEGF yang dapat dilihat dari gambar hispatologik ginjal dan melalui menghambat laju pembentukan AGEs.

Hasil uji imunohistokimia menunjukkan pemberian ekstrak mengkudu dapat menunjukkan ekspresi VEGF lebih kecil dibandingkan dengan kontrol (+) karena adanya senyawa flavonoid menjadikan ikatan lemah terhadap ikatan HIF 1 α yang dibandingkan dengan ikatan ATP pada kedua protein kinase sehingga ekspresi VEGF tidak terhambat. Ekstrak mengkudu memacu angiogenik dapat dilihat dari skor yang mencerminkan kuatnya interaksi senyawa dengan protein target, memiliki aktivitas penghambatan angiogenesis. Angiogenesis memiliki proses yang kompleks tergantung keseimbangan antara stimulator dan inhibitor angiogenik.⁴⁵

6.5. Hubungan antara kadar albumin dalam urin dengan skor ekspresi VEGF

Berdasarkan hasil uji statistik hubungan antara kadar albumin dalam urin dengan skor ekspresi VEGF jaringan ginjal hewan coba, hasil uji korelasi Spearman menunjukkan koefisien korelasi antara skor ekspresi VEGF jaringan ginjal dengan kadar albumin dalam urin adalah $-0,19$ ($p=0,3$). Sedangkan pada kelompok K(+), X1 dan X2 menunjukkan koefisien antara skor ekspresi VEGF jaringan ginjal dengan albumin dalam urin adalah $0,51$, ($p=0,03$). Pada kelompok X3 dan X4 terjadi peningkatan kembali kadar albumin dalam urin dapat dilihat pada gambar 8.

Hiperglikemia menyebabkan peningkatan DAG (*Diacylglycerol*), yang selanjutnya mengaktivasi protein kinase-C, utamanya pada isoform β dan δ . Aktivasi PKC menyebabkan beberapa akibat patogenik melalui pengaruhnya terhadap *endothelial nitric oxide synthetase* (eNOS), endotelin-1 (ET-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β) dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), dan aktivasi NF- κ B dan NAD(P)H oxidase, penelitian ini mengimplikasikan kausal meningkat albumin terglikasi dalam pengembangan kelainan kontribusi untuk nefropati diabetes. menipisnya glomerular dari protein nephrin dan berlebih dari VEGF menyertai peningkatan ekskresi albumin urin dan kolagen IV yang mencirikan diabetes *db / db* tikus, dan keempat kelainan yang dilemahkan dengan pemberian senyawa yang menghambat proses percepatan glikasi nonenzimatik albumin ditemukan di hiperglikemia diabetes binatang. Penelitian ini konsisten bahwa peningkatan konsentrasi albumin terglikasi memberikan kontribusi kerusakan podosit pada diabetes, dan memberikan pada relevansi vivo dan in vitro bahwa paparan sel epitel dalam budaya untuk albumin terglikasi berkurang ekspresi nephrin⁶⁸. Hasil lebih lanjut melibatkan albumin terglikasi di genesis dari VEGF glomerular peningkatan yang ditemukan pada diabetes, kemungkinan berhubungan dengan produksi-albumin terglikasi diinduksi TGF- β 1⁶⁹, yang sendiri merupakan stimulus ampuh sekresi VEGF⁷⁰. Penurunan dalam ekspresi TGF- β 1 ginjal, VEGF, dan albumin kemih dan kolagen tipe IV dalam menanggapi 23CPA konsisten dengan laporan bahwa terapi anti-VEGF mengurangi albuminuria pada hewan pengerat, bahwa podosit adalah sumber utama dari VEGF pada glomerulus, dan bahwa yang

diturunkan dari VEGF podosit dapat beroperasi dalam loop autokrin untuk mempromosikan produksi kolagen IV, mengubah permeabilitas penghalang penyaringan.^{33,72,73}

Penelitian menunjukkan bahwa albumin terglikasi memberikan kontribusi untuk kerusakan podosit pada diabetes, mungkin melalui satu atau lebih mekanisme patologi yang diusulkan oleh Mundel dan Shankland⁷⁴ (yaitu, gangguan pada kompleks diafragma celah dan rakit lipid tersebut; kelainan pada glomerular basement membran interaksi-podosit, kelainan dari sitoskeleton aktin dan protein yang terkait seperti α -actinin-4, dan perubahan dalam domain apikal dari podosit, seperti netralisasi beban permukaan sel negatif). Kerusakan dan kerugian podosit diyakini penentu penting dalam pengembangan glomerulosclerosis dan gagal ginjal progresif yang dihasilkan⁷⁵, mungkin timbul dari berkurangnya dukungan ke loop kapiler glomerulus yang mendasari dan kurangnya gaya yang berlawanan untuk tekanan kapiler hidrostatis yang dapat menyebabkan penggundulan membran basal, menonjol keluar dari lingkaran kapiler, pembentukan synechiae, protein inspissated, hyalinosis, dan progresif jaringan parut⁷⁵,

Adanya busa yang berlebihan ketika buang air kecil dapat menjadi petanda awal simtoma albuminuria, walaupun urin yang berbusa dapat juga disebabkan oleh hal lain seperti defisiensi tiamin, hipertensi, kekurangan hepatoseluler, tirotoksikosis, anemia dan penggunaan obat-obatan anti peradangan sejenis non steroid yang umumnya menyebabkan reabsorpsi garam darah.⁷⁶

6.6. Keterbatasan penelitian:

Keterbatasan penelitian ini bisa disebabkan VEGF yang berperan pada patogenesis diabetes mikrovaskuler komplikasi, juga dipengaruhi permeabilitas makromolekul dan distimulasi oleh monosit kemotaksis dan produksi faktor jaringan yang lain, juga karena jenis varian hewan percobaan dan perbedaan jenis glomerulus disease. Penyebab lain albuminuria adalah tekanan darah tinggi, gagal jantung kongestif, sindrom metabolik, atau kerusakan ginjal dari sindrom nefrotik. Bahkan tanpa penyakit ini, memiliki lebih tinggi dari tingkat normal albumin dalam urin merupakan faktor risiko penyakit kardiovaskuler .

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :