

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Salam terhadap Ekspresi Kolagen Mesangial Tikus *Sprague dawley* Diabetik

The Effect of *Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp Extracts towards Collagen Mesangial Expression of Diabetic Rats

Tunik Saptawati¹, Winarto², Tri Nur Kristina³

ABSTRAK

Ekstrak etanol daun salam (EEDS) dibuat dari maserasi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) mengandung flavonoid yang bersifat anti oksidan dan dapat menurunkan glukosa darah. Diperkirakan bahwa EEDS dapat menekan akumulasi kolagen mesangial sebagai komponen matriks ekstra seluler pada DM sehingga dapat menghambat terjadinya komplikasi DM. Sebanyak 20 ekor tikus *Sprague dawley* jantan yang diinduksi DM dengan *Streptozotocin* dosis 40 mg/kgBB, dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang diberi EEDS dosis 150:300; dan 450 mg/200grBB selama 15 hari. Pada hari ke 16 diperiksa kadar gula darah sewaktu (GDS), HBA1c, dan ekspresi kolagen mesangial (*Allred Score*). Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi kolagen yang bermakna pada 4 kelompok penelitian dengan nilai $p=0,027$ ($p<0,05$). Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan ekspresi kolagen pada kelompok P2 lebih rendah dibanding kelompok kontrol dengan nilai $p=0,032$ ($p<0,05$). Pemberian EEDS dosis 300 mg/200grBB dapat menurunkan ekspresi kolagen mesangial tikus DM.

Kata kunci: EEDS, ekspresi kolagen mesangial, DM

ABSTRACTS

Aethanol extracts of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp leaves (AESP) contains flavonoids that can lower blood glucose level and anti-oxidants. It is estimated this extracts can suppress the accumulation of mesangial collagen as a component of extra cellular matrix that can inhibit DM complication. This study is conducted to prove that AESP can decrease collagen mesangial expression of diabetic rats. A number of 24 male Sprague dawley rats were induced diabetic by *Streptozotocin* 40 mg/kgBW dose intra- peritoneal. The rats divided into 4 groups. Control group received no extracts. P1, P2 and P3 were given AESP 150, 300 and 450 mg/200grBW/day respectively for 15 days. Assesement of blood glucose level and collagen mesangial expression was performed on 16th day. Results of *Kruskalls wallis* test showed that there were significant difference of collagen mesangial expression in the four study groups with $p=0,027$ ($p<0,05$).

dan mengurangi ekspansi mesangial glomerulus.¹⁰

Daun salam diperoleh dari tanaman *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp atau *Eugenia polyantha* yang banyak tumbuh dan mudah diperoleh di Indonesia. Kandungan kimia yang terdapat pada daun salam adalah minyak atsiri (0,05%) yang mengandung sitral dan eugenol, tanin dan flavonoid. Flavonoid adalah salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada bagian tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.¹¹

Daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) dengan kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidannya diharapkan mampu menghambat pembentukan ROS dengan menangkap radikal hidroksil pada DM sehingga mengurangi ekspansi mesangial glomerulus khususnya dengan menurunkan ekspresi kolagen yang merupakan salah satu komponen ECM.

METODE

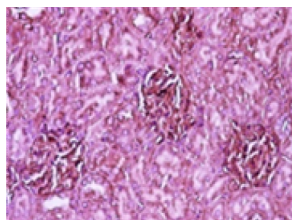
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only control group*. Sampel adalah tikus *Sprague dawley* jantan DM usia 6-12 minggu, berat badan 100-200 gr, kadar glukosa darah sewaktu (GDS) > 200 mg/dl dari Lembaga Pengembangan dan Penelitian Terpadu (LPPT) Unit IV UGM Yogyakarta.

Tikus dibuat DM dengan diinduksi *Streptozotocin* (STZ) dosis tunggal 40 mg/kgBB secara intra peritoneal. Penentuan tikus mencapai DM dilakukan 4 hari setelah induksi dengan pengukuran GDS dengan metode heksokinase.

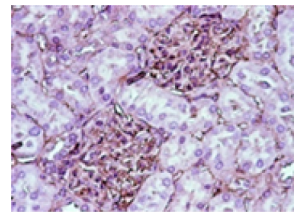
Sebanyak 24 ekor tikus DM dibagi menjadi 4 kelompok penelitian yang meliputi 1 kelompok kontrol (K) tanpa pemberian ekstrak dan 3 kelompok perlakuan dengan pemberian EEDS per oral sekali sehari dengan dosis 150 mg/200grBB (P1), 300 mg/200grBB (P2) dan 450 mg/200grBB selama 15 hari. Pada hari ke 16 dilakukan pengukuran kadar GDS dan HbA1c. Selanjutnya tikus diterminasi untuk diambil organ ginjal dan dibuat

Tabel 2 menunjukkan bahwa GDS meningkat pada kelompok kontrol dan setelah pemberian EEDS selama 15 hari kadar GDS mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3). Penurunan GDS kelompok perlakuan ini menunjukkan efek hipoglikemik dari EEDS. Kelompok P2 dengan pemberian EEDS dosis 300 mg/ 200 grBB mengalami penurunan GDS paling besar dibanding kelompok P1 (dosis EEDS 150mg/ 200 grBB) dan kelompok P3 (dosis EEDS 450 mg/200 grBB).

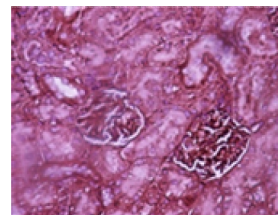
Ekspresi kolagen mesangial dinyatakan dalam *Allred score* yang merupakan penjumlahan dari *proportion score* dan *intensity score*. Gambar 1 menunjukkan foto ekspresi kolagen mesangial pada tikus DM kelompok kontrol.



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. Foto ekspresi kolagen mesangial tikus DM kelompok kontrol (a) *Allred score* =7 (PS=4, IS=3); (b) *Allred score* = 3 (PS=2, IS=1); (c) *Allred score*=6 (PS=3, IS=3)

Tabel 3. Data *proportion score*, *intensity score* dan *Allred score* ekspresi kolagen mesangial

Kelompok	<i>Proportion Score</i>	<i>Intensity score</i>	<i>Allred Score</i>
Kontrol	3,04 ± 0,55	2,40 ± 0,55	6,2 ± 0,84
P1	3,33 ± 0,58	1,67 ± 0,58	4,7 ± 0,56
P2	2,50 ± 0,56	1,50 ± 0,58	4,0 ± 1,16
P3	2,75 ± 0,50	2,25 ± 0,50	5,3 ± 0,50

Data *allred score* diperoleh dari hasil pembacaan proporsi dan intensitas tiap presparat oleh 2 pembaca yang telah dilakukan uji reliabilitas dengan *Cronbabs α* = 0,88 (>0,497/ R tabel) yang berarti ada

Hasil uji statistik terhadap *proportion score* dan *intensity score* dan *Allred Score* menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi kolagen pada tikus DM lebih ditentukan oleh peningkatan proporsi dibanding intensitasnya. Pemberian EEDS dosis 300 mg/200 grBB mampu menurunkan ekspresi kolagen mesangial tikus DM.

DISKUSI

Pada penelitian ini penentuan DM dilakukan 4 hari setelah induksi STZ 40 mg/kgBB sesuai dengan data pustaka yang menyebutkan bahwa pemberian STZ dosis 60 mg/kgBB proses autoimun yang mengakibatkan kerusakan sel β Langerhans pankreas dan akan memunculkan gejala klinik DM dalam waktu 2 sampai 4 hari. STZ merupakan senyawa diabetogenik yang akan membuat degenerasi sel β Langerhans pancreas dan penurunan sekresi insulin yang diperlukan untuk metabolisme karbohidrat.³⁶ Pemberian STZ dosis 40-60

mg/kgBB secara iv dan ip akan menginduksi DM tipe 1 (IDDM).³⁸

Hasil identifikasi zat bioaktif menghasilkan data bahwa EEDS yang digunakan pada penelitian ini mengandung senyawa alkaloid, saponin, quinon, fenolik, triterpenoid, steroid dan flavonoid. Hasil uji aktifitas antioksidan dengan metode difenilpicril 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 $IC_{50} = 7.587$. Berdasarkan hasil pengujian ini diharapkan EEDS pada penelitian ini dengan kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidannya akan dapat menghambat pembentukan ROS dan menghambat kerusakan pancreas dan ginjal sehingga akan menurunkan kadar GDS tikus DM dan ekspresi kolagen mesangial.

Hasil pengukuran kadar GDS sebelum dan sesudah pemberian EEDS

ECM) seperti fibronektin , laminin dan kolagen tipe IV .³

Selain glukosa darah, kenaikan ekspresi kolagen dipengaruhi juga oleh menurunnya jumlah insulin. Pada penelitian ini induksi STZ menyebabkan kerusakan sel β Langerhans pancreas yang berakibat menurunnya jumlah sekresi insulin.

Ekspresi kolagen mesangial yang ditampilkan pada tabel 4 menunjukkan bahwa kelompok perlakuan menunjukkan *Allred score* yang lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Hal ini jelas menunjukkan bahwa pemberian EEDS mampu menurunkan ekspresi kolagen mesangial, sesuai dengan kemampuannya menurunkan glukosa darah.

EEDS dengan kandungan flavonoidnya mampu berfungsi sebagai antioksidan sehingga mampu menghambat pembentukan ROS dengan menangkap radikal hidroksil pada DM sehingga mengurangi ekspansi mesangial glomerulus khususnya dengan menurunkan ekspresi kolagen yang merupakan salah satu

komponen ECM. Penurunan GDS dan ekspresi kolagen pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa pemberian EEDS selama 15 hari mampu menghambat pembentukan ROS sehingga mengurangi terjadinya stress oksidatif sehingga dapat memperbaiki fungsi pancreas maupun fungsi ginjal.

Pada gambar 2 , grafik *boxplot* memperlihatkan bahwa median ekspresi kolagen kelompok perlakuan berada di bawah median skor ekspresi kolagen kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan skor ekspresi kolagen terendah ditunjukkan pada kelompok P2, yaitu $4,0 \pm 1,16$. Hasil uji statistik terhadap data skor ekspresi kolagen menunjukkan perbedaan skor pada 4 kelompok penelitian, dan terdapat perbedaan yang bermakna antara skor ekspresi kolagen kelompok kontrol dengan P2. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EEDS dapat menurunkan ekspresi kolagen mesangial tikus *Sprague dawley* DM dan dosis yang paling sesuai adalah 300 mg/200 gr BB .

- Albumin Urine Level, TGF- β serum Level and Collagen Expression, *Tesis Magister Ilmu Biomedik FK Undip*, 2011
16. Brownlee M, The Pathobiology of Diabetic Complications, *Diabetes* , 2005 June ; 54 : 1615-25
 17. World Health Organization, Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus, *Abbreviated Report of a WHO Consultation*, 2011: 1-18
 18. D'Emden MC et al, The Role of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in Australia, *MJA*, 2012 August 20; 197 (4): 1-3
 19. Widijanti A, Glycated Haemoglobin (HbA1c) pada Diabetes Melitus, *Medika Jurnal Kedokteran Indonesia* , 2013 ; XXXIX (09)
 20. Setiawan M, Pre diabetes dan Peran HbA1c dalam skrining dan Diagnosis Awal DM, *Jurnal UMM*, 2011 Januari; 7 (14): 57-64
 21. American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 2008 January; 31: 562-7
 22. Ban Camellia and Twigg Stephen M, Fibrosis in diabetes complication : pathogenic mechanism and circulating and urinary markers, *Vascular Health and Risk management*, 2008;4 (3): 575-96
 23. Haneda et al, Overview of Glucose Signaling in Mesangial Cells in Diabetic Nephropathy, *J Am soc Nephrol* , 2003; 14: 1374-82
 24. Erensoy et al, Effects of ACE inhibition on expression of type IV collagen and laminin in renal glomeruli in experimental diabetes, *Acta Histochem*, 2004; 106 (4): 279-87
 25. Qian Y et al. From fibrosis to sclerosis : Mechanism of Glomerulosclerosis in Diabetic Nephropathy, *Diabetes* , 2008 June; 57: 1439-45
 26. Sharma K et al, neutralization of TGF- β by Anti-TGF- β Antibody Attenuates Kidney Hypertrophy and Enhanced Extracellular Matrix gene Expression in STZ Induced Diabetic mice, *Diabetes*, 1996 June; 45: 522-30
 27. Al Farabi M J, Antibodi terhadap Advanced Glycation End Product, Cara Mutakhir Mencegah Komplikasi Diabetes Melitus, *CDK-210*, 2013; 40 (11): 807-14
 28. Hua Hong, et al, High Glucose-Enhanced Mesangial Cell Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Activation and α 1(IV) Collagen Expression in Response to Endothelin-1, *Diabetes*, 2001 October; 50: 2376-82
 29. Anderson et al, Insulin and angiotensin II are additive in stimulating TGF- β 1 and matrix