

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Mellitus

Abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein pada diabetes mellitus diakibatkan gangguan aktivitas insulin pada jaringan target. Gangguan tersebut disebabkan sekresi insulin yang inadekuat dan/atau menurunnya respon jaringan terhadap insulin sehingga terjadi hiperglikemia. Hiperglikemia kronik menimbulkan kerusakan, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ terutama mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah (American Diabetes Association, 2007). Oleh sebab itu, pasien diabetes memerlukan terapi untuk menurunkan kadar gula darah hingga normal. Target pengatasan diabetes mellitus yaitu mempertahankan kontrol gula darah sesuai rekomendasi (kadar hemoglobin terglikasi  $\leq 6,5\%$ ) bagi pasien diabetes mellitus tipe 1 atau 2 (Erejuwa, 2012).

Komplikasi diabetes berkaitan erat dengan kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan kondisi ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan sehingga memicu terjadinya kerusakan (Moussa, 2008). Stres oksidatif disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang terakumulasi di sel maupun jaringan. Ada faktor-faktor yang berperan meningkatkan pembentukan ROS pada diabetes mellitus diantaranya hiperglikemia, resistensi insulin, dislipidemia, hiperinsulinemia, penurunan fungsi perlindungan antioksidan, peningkatan leptin dan pengaruh gaya hidup (Erejuwa, 2012).

Diabetes mellitus tidak seperti penyakit-penyakit lain yang juga mengalami peningkatan stres oksidatif. Diabetes mellitus tergolong penyakit yang unik. Meskipun gula darah mencapai target normal, stres oksidatif dan komplikasi diabetes masih dapat terjadi. Pasien diabetes tetap mengalami komplikasi walaupun glukosa darah telah normal. Fenomena tersebut juga terjadi pada binatang yang diinduksi diabetes. Progresifitas kerusakan jaringan yang terjadi meskipun hiperglikemia telah teratasi disebut *memori hiperglikemia*. Kondisi tersebut disebabkan oleh perubahan epigenetik yang persisten akibat hiperglikemia menginduksi mitokondria untuk memproduksi superoksida. Paparan hiperglikemia secara singkat menginduksi perubahan epigenetik pada sel-sel endotel aorta manusia (paparan 16 jam) dan sel-sel aorta pada tikus nondiabetes (paparan 6 jam). Perubahan epigenetik menyebabkan peningkatan ekspresi gen p65 dan gen-gen proinflamasi yang bergantung p65. Oleh sebab itu, kontrol gula darah ketat diperlukan pada awal gejala diabetes (Giacco dan Brownlee, 2010).

Terapi insulin intensif untuk pengatasan hiperglikemia dapat menurunkan resiko mikrovaskular dan makrovaskular pada penderita diabetes mellitus tipe 1. Namun, efek penurunan komplikasi makrovaskular dengan terapi intensif membutuhkan waktu lama. Penelitian *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT) menggunakan 1.441 pasien diabetes mellitus tipe 1 yang dirandomisasi untuk mendapatkan terapi intensif (dosis insulin sesuai hasil pengukuran glukosa per hari dengan target glukosa darah 70-120 mg/dl sebelum makan dan 180 mg/dl setelah makan) atau terapi konvensional (tanpa target glukosa darah dengan injeksi 1-2 kali insulin per hari). Setelah 6,5 tahun, kadar hemoglobin terglikasi dan komplikasi mikrovaskular (retinopati, neuropati, dan

nefropati) lebih rendah dibandingkan kelompok konvensional. Namun, efek terhadap komplikasi makrovaskular belum terbukti. Penelitian dilanjutkan oleh *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) dengan menggunakan 1394 pasien dari penelitian DCCT. Sebagian besar pasien yang mendapat terapi konvensional beralih menjadi terapi intensif dan kontrol glukosa darah menunjukkan hasil sama antar subyek. Setelah intervensi selama 11 tahun, kejadian kardiovaskular lebih rendah pada pasien yang mendapat terapi insulin intensif sejak penelitian DCCT dibandingkan pasien yang mendapat insulin intensif sejak penelitian EDIC (DCCT/EDIC Study Research Group, 2005).

Terapi insulin intensif menimbulkan perubahan repolarisasi jantung, hipoglikemia, dan mortalitas. Robinson dkk. (2004) meneliti kadar glukosa darah, potasium plasma, katekolamin, dan elektrokardiogram pada 22 pasien diabetes mellitus tipe 1. Hasil penelitian menunjukkan terapi insulin intensif menyebabkan hipoglikemia pada malam ke tujuh. Pada saat hipoglikemia, pasien mengalami perpanjangan interval QTc yang menandakan repolarisasi jantung abnormal. Penelitian Murphy dkk. (2004) juga menunjukkan hasil bahwa 29 dari 44 subyek mengalami perpanjangan QTc setelah hipoglikemia spontan yang diduga berkaitan dengan insulin menginduksi hipokalemia. Hipoglikemia juga menyebabkan mortalitas pada pasien diabetes mellitus tipe 1. Tanenberg dkk. (2010) melaporkan kematian laki-laki berusia 23 tahun dengan riwayat diabetes mellitus tipe 1 yang menggunakan *insulin pump*. Analisa *post-mortem* menunjukkan kadar glukosa darah 30 mg/dl dan kadar glukosa vitreous humor 25 mg/dl.

Peningkatan mortalitas akibat terapi intensif juga dialami pada pasien diabetes mellitus tipe 2 pada penelitian *The Action to Control Cardiovascular Risk*

in *Diabetes* (2008) dengan menggunakan 10.251 pasien diabetes mellitus tipe 2 (rata-rata usia 62,2 tahun) dengan median hemoglobin terglikasi 8,1% dirandomisasi untuk menentukan terapi glikemik intensif (target hemoglobin terglikasi < 6,0%) atau terapi standar (target hemoglobin terglikasi 7,0-7,9%) selama 3,5 tahun. Infark miokard nonfatal lebih rendah pada kelompok terapi standar dan tingkat mortalitas akibat kardiovaskular lebih tinggi pada kelompok terapi intensif, sedangkan kejadian stroke nonfatal tidak ada perbedaan signifikan antara kedua grup. Tingkat mortalitas lebih tinggi pada terapi intensif juga ditunjukkan dalam hasil penelitian Duckworth dkk (2008) dengan menggunakan 1.791 veteran militer dengan rata-rata lama mengidap diabetes mellitus 11,5 tahun. Subyek dirandomisasi untuk masuk kelompok yang mendapat terapi dosis tinggi kombinasi rosiglitason dengan metformin (kelompok terapi intensif) atau mendapat dosis rendah kombinasi glibepirid dengan rosiglitason (kelompok terapi standar) selama 5,6 tahun dengan pemberian insulin sebelum intervensi jika kadar hemoglobin terglikasi belum mencapai < 6% pada kelompok intensif dan < 9% pada kelompok terapi standar. Tingkat kematian akibat gangguan kardiovaskular pada terapi intensif sebesar 40% dan kelompok terapi standar sebesar 33%. Namun, ekskresi albumin dan progres makroalbuminuria lebih besar pada kelompok yang mendapatkan terapi glikemik standar.

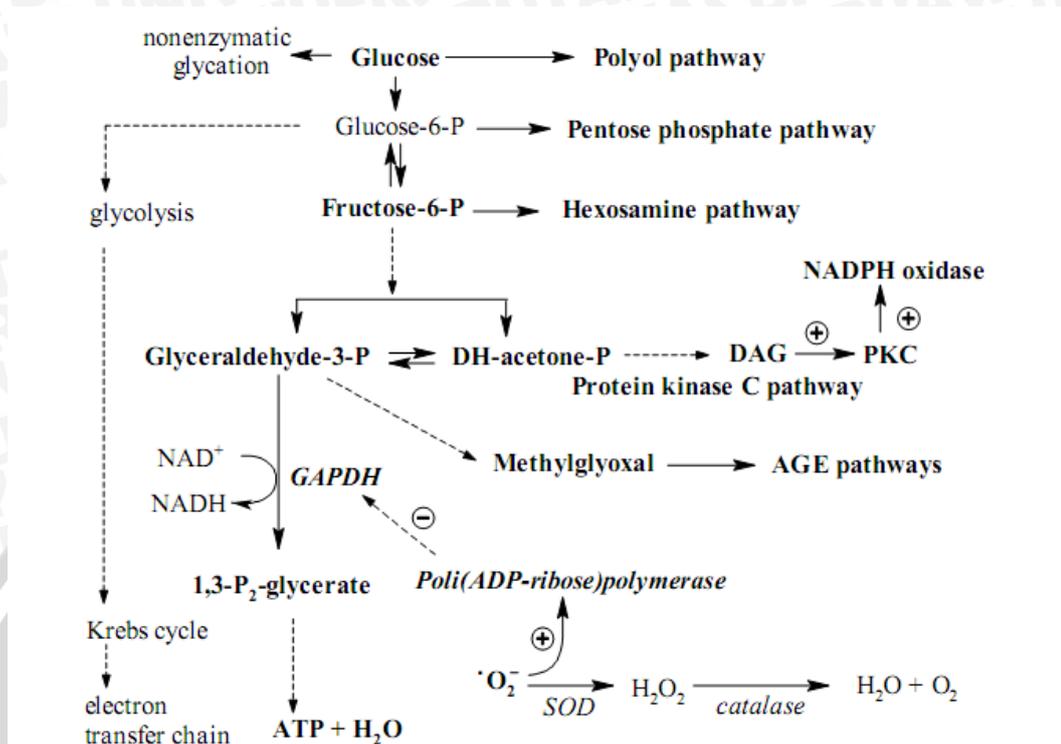
## 2.2 Stres Oksidatif pada Diabetes Mellitus tipe 1

Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh limfosit T, makrofag, dan sel-sel dendritik yang merusak sel beta pankreas. Kerusakan sel beta ditandai dengan autoantibodi terhadap sel islet, insulin, asam glutamat dekarboksilase (GAD65), dan tirosin fosfatase IA – 2 dan IA – 2B (Peter, 2007). Autoimun dipicu adanya predisposisi genetik, faktor lingkungan (infeksi virus dan nutrisi) dan penyakit

autoimun seperti *grave disease*, hashimoto tiroiditis, vitiligo, *celiac sprue*, hepatitis autoimun, *myasthenia gravis*, dan anemia perniosa (American Diabetes Association, 2007). Hiperglikemia sebagai konsekuensi kerusakan sel beta dalam jangka waktu lama menyebabkan stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan protein, lipid, dan DNA yang akan menyebabkan apoptosis sel, gangguan metabolisme dan sinyal sel serta penuaan. Penelitian Varvarovska dkk. (2004) menunjukkan peningkatan malondialdehid dan penurunan kadar glutation reduksi (GSH) dan kapasitas antioksidan plasma secara signifikan pada anak diabetes mellitus tipe 1 dibandingkan anak yang normal.

Peningkatan stres oksidatif pada hiperglikemia disebabkan peningkatan produksi ROS dan gangguan aktivitas antioksidan melalui jalur enzimatik, nonenzimatik, dan mitokondria (Mohora dkk., 2007). Sumber stres oksidatif pada jalur enzimatik berasal dari berbagai mekanisme yaitu metabolisme glukosa melalui jalur sorbitol yang menghasilkan  $\cdot O_2$ , reaksi glukosa dengan protein membentuk AGE, dan autooksidasi gliseraldehid yang membentuk radikal hidroksil. Lalu, stres oksidatif melalui jalur nonenzimatik disebabkan pembentukan ROS oleh aktivitas NOS dan NADPH oksidase (Johansen dkk., 2005). Stres oksidatif yang terjadi pada hiperglikemia dapat dilihat pada Gambar

2.1

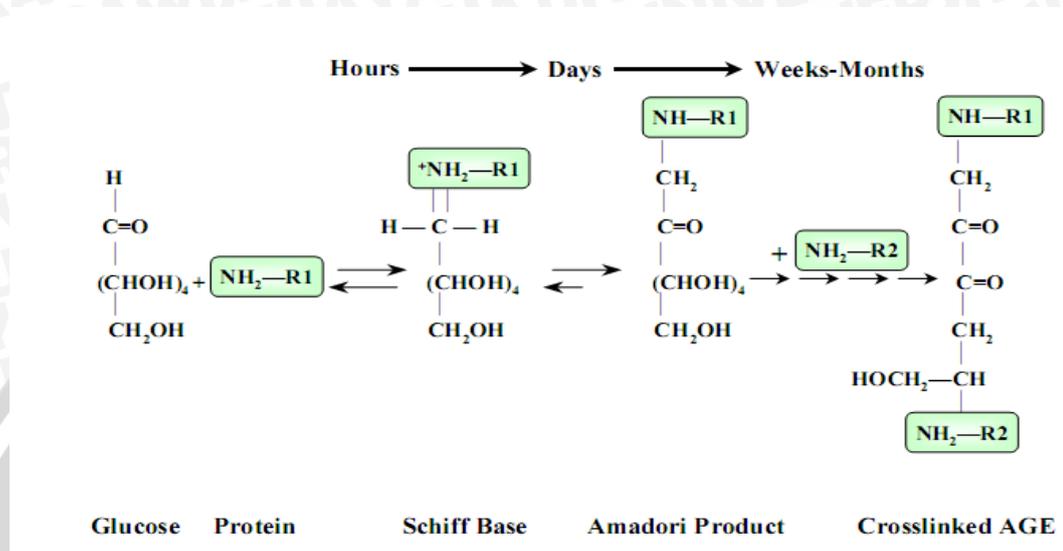


**Gambar 2.1 Stres Oksidatif pada Kondisi Hiperglikemia.** Hiperglikemia menyebabkan stres oksidatif melalui pembentukan AGE (glikasi nonenzimatis), jalur polioliol, jalur heksoamin, autooksidasi gliseralehid, peningkatan aktivitas protein kinase C, dan transfer elektron (Mohora, 2007).

### 2.2.1 Peningkatan AGE

Akumulasi *advanced glycation end product* (AGE) meningkat pada diabetes mellitus, lanjut usia, gagal ginjal, dan inflamasi kronis. Dalam tubuh, AGE akan terakumulasi pada kulit, neural, vaskular, renal, dan jaringan jantung. Pembentukan AGE diawali dengan reaksi antara gugus karbonil glukosa dan asam amino yang disebut reaksi Maillard. Dalam waktu beberapa jam, reaksi Maillard menghasilkan komponen yang sifatnya labil yaitu basa Schiff. Selama beberapa minggu basa Schiff mengalami perubahan susunan kimia yang menghasilkan produk Amadori (Hegab dkk, 2012). Produk Amadori akan mengalami oksidasi dalam waktu beberapa minggu-bulan untuk membentuk AGE yang stabil (Mohora dkk, 2007). Jenis AGE yang dapat dideteksi

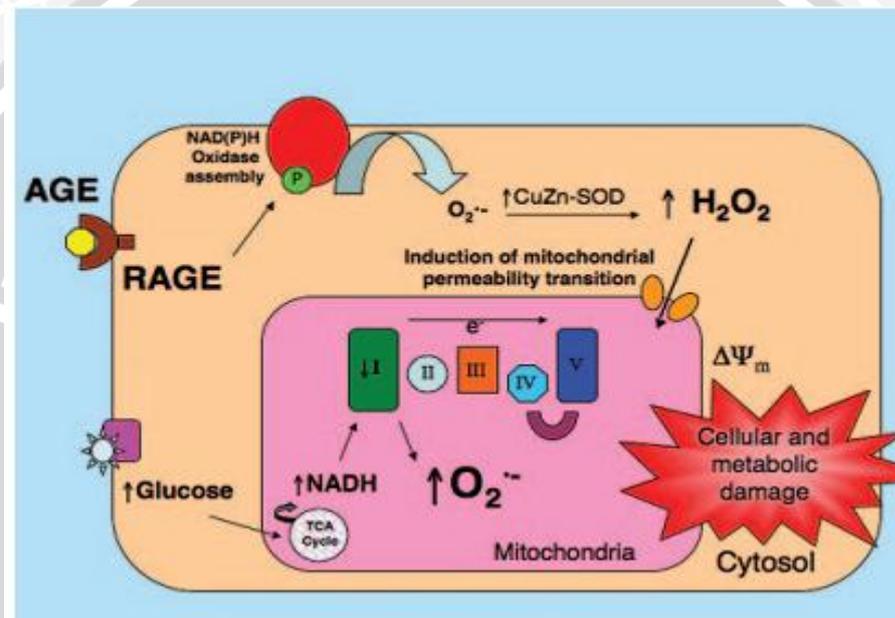
diantaranya pentosidin dan N-karboksimetilisin (CML) (Su-Yen Goh dan Cooper, 2008). Proses terbentuknya AGE dapat dilihat dalam Gambar 2.2



**Gambar 2.2 Proses Pembentukan AGE.** Pembentukan AGE diawali dengan reaksi antara gugus karbonil glukosa dengan asam amino yang disebut reaksi Maillard. Dari reaksi Maillard yang berlangsung selama beberapa jam, basa Schiff yang bersifat labil akan terbentuk. Basa Schiff akan mengalami perubahan susunan kimia dengan pembentukan ikatan rangkap dengan tujuan meningkatkan kestabilan. Perubahan susunan tersebut membentuk produk Amadori yang terjadi dalam waktu beberapa hari. Dalam hitungan minggu hingga bulan, produk Amadori mengalami oksidasi dan membentuk AGE (Aronson, 2002).

Hubungan peningkatan AGE terhadap kerusakan sel melalui tiga mekanisme yaitu: AGE memodifikasi protein intraselular, modifikasi matriks ekstraselular, dan ikatan dengan reseptornya (RAGE). RAGE terdistribusi pada sel endotel, sel otot polos, monosit/makrofag, limfosit T, kardiomyosit, glomerular podosit, sel dendritik, neuron sistem saraf pusat dan perifer. Interaksi AGE dengan RAGE akan menginduksi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NADPH oksidase) kemudian menghasilkan ROS. Hiperglikemia kronik juga meningkatkan penghantaran elektron oleh NADH ke kompleks 1. Perpindahan elektron dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dibutuhkan untuk mengaktivasi mPT (*mitochondrial permeability transition*). mPT menurunkan aktivitas kompleks 1

sehingga meningkatkan produksi superoksida di mitokondria. Peningkatan produksi ROS berkaitan dengan peningkatan AGE karena berdasar penelitian Coughlan dkk. (2009) ekspresi RAGE yang berlebihan tanpa peningkatan AGE tidak menyebabkan peningkatan produksi  $H_2O_2$  di sitosol. Pembentukan ROS melalui peningkatan AGE dapat dilihat pada Gambar 2.3



**Gambar 2.3 Pembentukan ROS melalui Peningkatan AGE.** Ikatan AGE dengan reseptornya (RAGE) menginduksi NADPH oksidase dan menghasilkan  $O_2^-$  (superoksida). Oleh superoksida dismutase,  $O_2^-$  diubah menjadi  $H_2O_2$  (hidrogen peroksida). Hiperglikemia meningkatkan penghantaran elektron oleh NADH ke kompleks 1 rantai transpor elektron. Peningkatan elektron bersama peningkatan  $H_2O_2$  mengaktifkan mPT (*mitochondrial permeability transition*) yang menurunkan aktivitas kompleks 1. Penurunan aktivitas kompleks 1 menyebabkan peningkatan produksi  $O_2^-$  (Coughlan, 2009).

### 2.2.2 Jalur Poliol

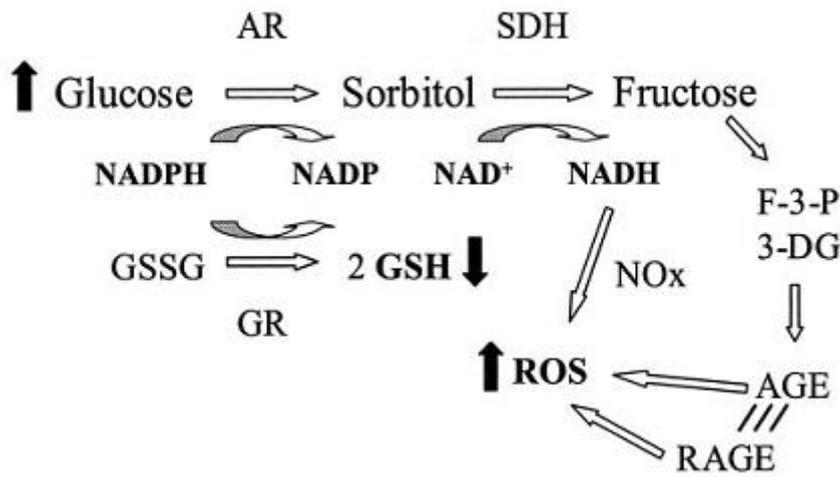
Sebagian besar glukosa akan difosforilasi menjadi glukosa 6-fosfat oleh heksokinase pada normoglikemia. Sebagian kecil glukosa tidak difosforilasi dan masuk ke dalam jalur poliol. Jalur poliol merupakan jalur alternatif bagi metabolisme glukosa (Ahmed, 2005). Dalam jalur ini, metabolisme glukosa melibatkan enzim aldose reduktase yang mereduksi glukosa menjadi sorbitol.

Kemudian, sorbitol dioksidasi menjadi fruktosa oleh enzim sorbitol dehidrogenase dengan kofaktor *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form* (NAD<sup>+</sup>) (Giacco dan Brownlee, 2010).

Aktivitas jalur poliol dapat menimbulkan stres oksidatif melalui berbagai mekanisme diantaranya melalui penurunan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form* (NADPH), gangguan aktivitas glutation, dan gangguan sintesis nitrit oksida. NADPH dibutuhkan sebagai kofaktor dalam proses reduksi glukosa menjadi sorbitol sehingga terjadi oksidasi NADPH menjadi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form* (NADP) yang menurunkan kadar NADPH (Farhangkhoe, 2006). Penurunan NADPH juga mempengaruhi aktivitas glutation karena NADPH merupakan kofaktor dalam reduksi glutation. NADPH turut berperan dalam reduksi glutation sehingga glutation aktif menangkap radikal bebas. Berikut reaksi reduksi glutation dengan kofaktor NADPH:



Sorbitol dehidrogenase membutuhkan NAD<sup>+</sup> sebagai kofaktor dalam aktivitasnya. Oleh sebab itu, produksi *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form* (NADH) di dalam sitosol meningkat ketika oksidasi sorbitol menjadi fruktosa sehingga rasio NADH/ NAD<sup>+</sup> juga meningkat. Dari sitosol, NADH akan ditransport ke dalam mitokondria untuk dioksidasi melalui rantai respirasi. Proses tersebut menghasilkan radikal superoksida dan spesies oksigen reaktif lain (Ahmed, 2005). Selain itu, fruktosa dan metabolitnya seperti fruktosa-3-fosfat dan 3-deoksiglukoson menyebabkan glikasi protein sehingga membentuk AGE. Kemudian, AGE berikatan dengan RAGE yang akan meningkatkan stres oksidatif (Chung, 2003). Mekanisme jalur poliol menyebabkan stres oksidatif dapat dilihat pada Gambar 2.4



**Gambar 2.4 Mekanisme Stres Oksidatif melalui Jalur Polioliol.** Tingginya kadar glukosa menyebabkan tidak semua glukosa difosforilasi. Sebagian kecil glukosa direduksi aldose reduktase menjadi sorbitol. Proses reduksi tersebut membutuhkan kofaktor NADPH sehingga reaksi reduksi sorbitol bersama-sama dengan oksidasi NADPH menjadi NADP. Semakin banyak NADPH yang dibutuhkan akan menurunkan kadar NADPH sehingga timbul gangguan reduksi glutation (GSH). Oksidasi sorbitol menjadi fruktosa dikatalisis oleh enzim sorbitol dehidrogenase. Proses oksidasi membutuhkan NAD<sup>+</sup> sebagai kofaktor akibatnya rasio NADH/NAD<sup>+</sup> meningkat. NADH akan dibawa ke mitokondria dan dioksidasi menghasilkan anion superoksida. Metabolit fruktosa yaitu Fruktosa-3-Fosfat (F-3-P) dan 3-deoksiglukoson (3-DG) dapat membentuk AGE, terikat dengan RAGE, dan menghasilkan ROS (Chung, 2003).

Penurunan NADPH juga berdampak terhadap sintesis nitrit oksida karena NADPH merupakan salah satu kofaktor nitrit oksida sintetase yang mensintesis nitrit oksida dari L-arginin. Jika terjadi gangguan pada kofaktor, NOS akan menghasilkan radikal 'O<sub>2</sub>' yang akan diubah menjadi HO' dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mohora dkk., 2007).

### 2.2.3 Aktivasi Protein Kinase C

Protein kinase C (PKC) merupakan enzim yang termasuk serin dan threonin kinase yang tersebar secara meluas pada jaringan mamalia. Enzim ini berperan dalam transduksi sinyal intraselular hormonal, neuronal, dan stimulus faktor pertumbuhan. Hiperglikemia akan mengaktivasi protein kinase C secara langsung maupun tidak langsung. Aktivasi langsung melalui beberapa

mekanisme diantaranya sintesis *de novo* diasilgliserol, sedangkan secara tidak langsung dengan ligasi reseptor AGE dan peningkatan aktivitas pada jalur poliol (Mohora dkk., 2007).

Peningkatan protein kinase C menyebabkan stimulasi NADPH oksidase semakin besar dan stimulasi tersebut akan meningkatkan produksi  $\text{O}_2^-$  (Johansen dkk., 2005). Stimulasi terhadap NADPH oksidase melalui translokasi komponennya yaitu p47phox, p67phox, dan GTPase Rac. Kemudian, protein-protein tersebut akan berikatan dengan heterodimer gp91phox-p22phox di membran lalu menginduksi konformasi gp91phox. Proses tersebut mengaktifkan NADPH oksidase lalu menyebabkan perpindahan elektron dari dalam menuju keluar sel. Elektron tersebut kopling dengan oksigen lalu membentuk  $\text{O}_2^-$  (Tarar, 2012).

#### 2.2.4 Peningkatan Heksoamin

Hiperglikemia meningkatkan produksi fruktosa-6-fosfat. Fruktosa-6-fosfat diubah menjadi glukosamin-6-fosfat oleh enzim glukosamin: fruktosa-6-fosfat amidotransferase (GFAT). Glukosamin-6-fosfat menghambat aktivitas glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Salah satu dampaknya yaitu menurunkan reduksi  $\text{NADP}^+$  menjadi NADPH. Hal ini menyebabkan penurunan rasio  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ . Penurunan rasio  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  akan menyebabkan stres oksidatif melalui penurunan regenerasi antioksidan glutation. Selain itu, penurunan avabilitas NADPH akan menurunkan aktivitas katalase sehingga konversi  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi  $\text{H}_2\text{O}$  terganggu (Mohora dkk., 2007).

### 2.2.5 Autoksidasi Gliseraldehid

Gliseraldehid 3-fosfat merupakan produk yang terbentuk dari glukosa ketika glikolisis aerob. Selain itu, gliseraldehid juga dapat terbentuk melalui konversi dihidroksiaseton dengan bantuan enzim triose-fosfat isomerase. Gliseraldehid dapat dioksidasi oleh enzim *glyceraldehydes-phospate dehydrogenase* (GAPDH). Akhir proses glikolisis menghasilkan piruvat yang akan masuk ke dalam mitokondria kemudian dioksidasi menjadi asetil-CoA dan diproses dalam siklus asam trikarboksilat dan memulai fosforilasi oksidatif. Selain proses tersebut, metabolisme dapat terjadi melalui jalur lain yaitu autooksidasi gliseraldehid.

Gliseraldehid bersifat menstimulasi sekresi insulin, tetapi dalam jumlah tinggi justru menghambat pelepasan insulin. Dengan adanya logam-logam redoks aktif, autooksidasi gliseraldehid akan menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan  $\alpha$ -ketoaldehid. Hidrogen peroksida dapat membentuk radikal hidroksil yang sangat toksik dan mutagenik.  $\alpha$ -ketoaldehid menyebabkan glikasi gugus kromofor pada protein dan pembentukan radikal hidroksil (Robertson, 2004).

### 2.2.6 Gangguan Aktivitas Antioksidan Enzimatis

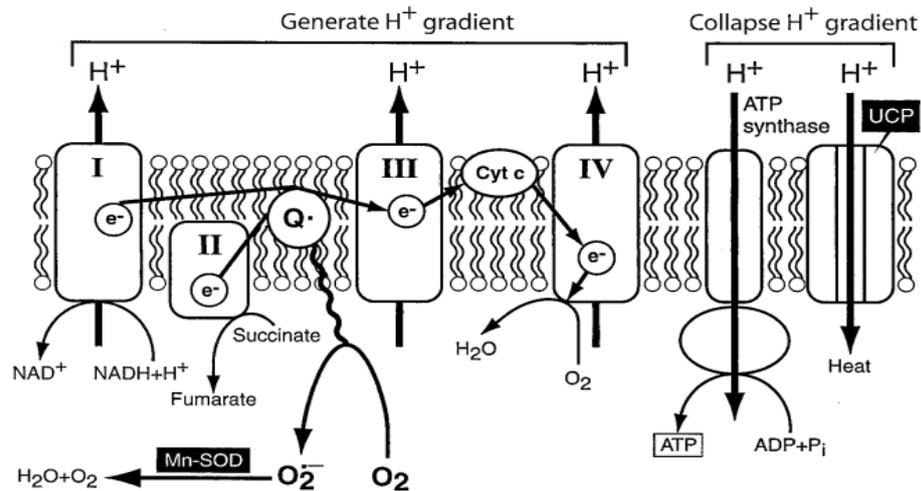
ROS dapat ditangkap oleh antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase, glutathion peroksidase, dan katalase. Namun, aktivitas antioksidan tersebut dapat mengalami perubahan pada diabetes mellitus. Beberapa penelitian menunjukkan kadar antioksidan bervariasi pada pasien diabetes. Penelitian Piper dkk. (1995) menunjukkan peningkatan aktivitas katalase dan tidak ada perubahan aktivitas superoksida dismutase dan glutathion peroksidase pada vaskular. Penelitian Wohaeib dan Godin (1987) menunjukkan peningkatan aktivitas katalase dan superoksida dismutase pada pankreas tikus diabetes.

Namun, aktivitas antioksidan tersebut menurun pada liver (Ahmed, 2005). Peningkatan aktivitas antioksidan pada diabetes mellitus merupakan kompensasi atas peningkatan radikal oksidan (Ramakhrisna dan Jailkhani, 2007).

Glikasi protein pada hiperglikemia dapat menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan. Aktivitas glutathion reduktase menurun dalam kondisi tersebut sehingga menyebabkan penurunan reduksi GSSG menjadi GSH. Kadar GSH menjadi menurun di dalam tubuh. Penurunan GSH menyebabkan penurunan aktivitas glutathion peroksidase karena GSH berperan sebagai substrat dan kofaktor enzim tersebut. Penurunan GSH disebabkan gangguan aktivitas enzim dan transport glutathion teroksidasi (GSSG). Enzim  $\gamma$ -glutamisistein sintetase dan glutathion reduktase yang berperan dalam sintesis glutathion menurun. Kecepatan transport GSSG yang akan diubah menjadi GSH juga menurun (Ahmed, 2005).

### 2.2.7 Jalur Mitokondria

Elektron akan berpindah dari NADH dan  $\text{FADH}_2$  yang terletak di membran dalam mitokondria selama fosforilasi oksidatif. Perpindahan elektron pada komplek I dan II dalam rantai mitokondria akan menghasilkan ATP dan terbentuknya  $\text{O}_2^-$  (superoksida). Secara normal,  $\text{O}_2^-$  akan diatasi oleh antioksidan. Dari hasil penelitian Brownlee (2001), hiperglikemia menginduksi pembentukan  $\text{O}_2^-$  pada mitokondria yang berkontribusi dalam memicu stres oksidatif pada diabetes mellitus. Pada hiperglikemia, glikolisis meningkatkan pembentukan piruvat yang berlebihan sehingga pada proses fosforilasi oksidatif pembentukan  $\text{O}_2^-$  juga semakin meningkat (Johansen dkk, 2005). Pembentukan superoksida melalui jalur mitokondria dapat dilihat pada Gambar 2.5



**Gambar 2.5. Pembentukan Superoksida melalui Jalur Mitokondria.** Ada empat protein kompleks yang berada pada rantai transpor elektron di mitokondria (I, II, III, dan IV). Ketika glukosa dimetabolisme melalui siklus asam trikarboksilat, donor-donor elektron akan dihasilkan yaitu NADH yang mendonorkan elektron pada kompleks I dan FADH<sub>2</sub> pada kompleks II. Elektron tersebut melalui koenzim Q kemudian dipindah ke kompleks III, sitokrom-C, dan kompleks IV. Dari kompleks IV, elektron berikatan dengan O<sub>2</sub> sehingga terjadi reduksi air. Sistem transpor elektron menghasilkan energi melalui tegangan pada mitokondria yang akan menghasilkan ATP melalui ATP sintetase. Namun, hiperglikemia menyebabkan peningkatan glukosa yang dioksidasi sehingga donor elektron juga semakin banyak. Hal ini menyebabkan transfer elektron ke kompleks III terhambat dan elektron kembali menuju koenzim Q. Pada waktu yang sama, koenzim Q mendonorkan elektron pada molekul oksigen sehingga terjadi produksi O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (Brownlee, 2004).

### 2.3 Peroksidasi Lipid

Stres oksidatif merupakan mekanisme yang mendasari patogenesis diabetes dan komplikasi diabetes. Pada pasien diabetes, stres oksidatif tidak hanya ditandai peningkatan ROS dan penurunan kadar antioksidan, tetapi juga terjadi peroksidasi lipid (Moussa, 2008). Peroksidasi lipid merupakan kerusakan oksidatif pada lipid yang mengandung asam lemak tak jenuh dengan lebih dari satu ikatan rangkap (Mahbob, 2005). Peroksidasi lipid yang terjadi di bagian phospholipid bilayer pada membran biologis akan mempengaruhi sifat biofisika membran seperti menurunkan fluiditas membran, perubahan sifat membran dan penurunan resistensi elektrik. Gangguan pertahanan membran akibat peroksidasi lipid menimbulkan keluarnya enzim-enzim sitosolik dari sel yang lebih lanjut akan

menyebabkan kerusakan sel dengan keluarnya enzim-enzim dan molekul berukuran besar. Peroksidasi lipid juga berefek terhadap organel yaitu menurunkan sifat laten lisosom sehingga mudah mengalami kerusakan (Devasagayam dkk., 2003).

### 2.3.1 Proses Peroksidasi Lipid

Peroksidasi lipid disebabkan reaksi antara lipid dengan radikal bebas (Kangralkar dkk., 2010). Proses peroksidasi lipid diawali dengan serangan pada asam lemak tak jenuh (LH) oleh ROS ( $\cdot X$ ) atau  $Fe^{2+}$  yang mengambil atom hidrogen dari gugus metilen ( $-CH_2$ ). Dari  $\cdot X$  atau  $Fe^{2+}$  elektron berpindah menuju atom karbon membentuk karbon radikal ( $CH\cdot$ ). Asam lemak tak jenuh yang mengandung elektron tak berpasangan ( $L\cdot$ ) bereaksi dengan oksigen membentuk radikal lipid peroksida ( $LOO\cdot$ ). Radikal ini dapat mengambil atom hidrogen dari molekul lipid yang lain dan membentuk  $LOOH$ .  $LOOH$  bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  akan menghasilkan  $Fe^{3+}$  dan  $LO\cdot$  (radikal lipoksi).

Selain membentuk  $LOOH$ , reaksi lipid peroksida dengan molekul lipid akan membentuk  $L\cdot$ . Pembentukan  $L\cdot$  dari reaksi tersebut menunjukkan peningkatan peroksidasi lipid.  $L\cdot$  bereaksi dengan oksigen membentuk  $LOO\cdot$  yang tidak stabil dan membentuk produk-produk seperti malondialdehid (MDA) dan 4-hidroksinonenal (Devasagayam dkk., 2003). Berikut proses peroksidasi lipid:

1.  $LH + \cdot X \rightarrow L\cdot + XH$
- 1a.  $LH + Fe^{2+} \rightarrow L\cdot + Fe^{3+} + H^+$
2.  $L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$
3.  $LOO\cdot + LH \rightarrow L\cdot + LOOH$

4.  $\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LO}^{\bullet} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{-}$
5.  $\text{LOO}^{\bullet} \rightarrow \text{MDA dan nonenal}$

Peroksidasi lipid akan menghasilkan produk-produk toksik seperti lipid hidroksiperoksida, malondialdehid (MDA), dan 4-hidroksinonenal. Lipid hidroksiperoksida merupakan produk intermediet dari asam lemak tak jenuh, fosfolipid, glikolipid, ester, dan kolesterol yang terbentuk melalui reaksi enzimatik atau nonenzimatik dengan adanya ROS. Lipid hidroksiperoksida menyebabkan putusnya untai ganda DNA yang dibuktikan pada limfosit dan fibroblast manusia setelah terpapar lipid hidroksiperoksida. Dengan adanya logam besi, ikatan oksigen pada lipid hidroksiperoksida akan terpecah dan membentuk radikal alkoksil. Radikal alkoksil akan mengawali reaksi berantai dari peroksidasi lipid (Devasagayam dkk., 2003). MDA sebagai indikator utama peroksidasi lipid juga bersifat genotoksik yang telah dibuktikan dalam percobaan dengan induksi mutasi pada sel bakteri dan manusia (Sing dkk., 2001). Produk lain seperti 4-hidroksinonenal mempengaruhi homeostasis adiposit melalui gangguan diferensiasi dan meningkatkan regulasi ekspresi prokolagen tipe 1 dalam konsentrasi  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M (Murdolo dkk., 2012).

### 2.3.2 Efek Malondialdehid dalam Tubuh

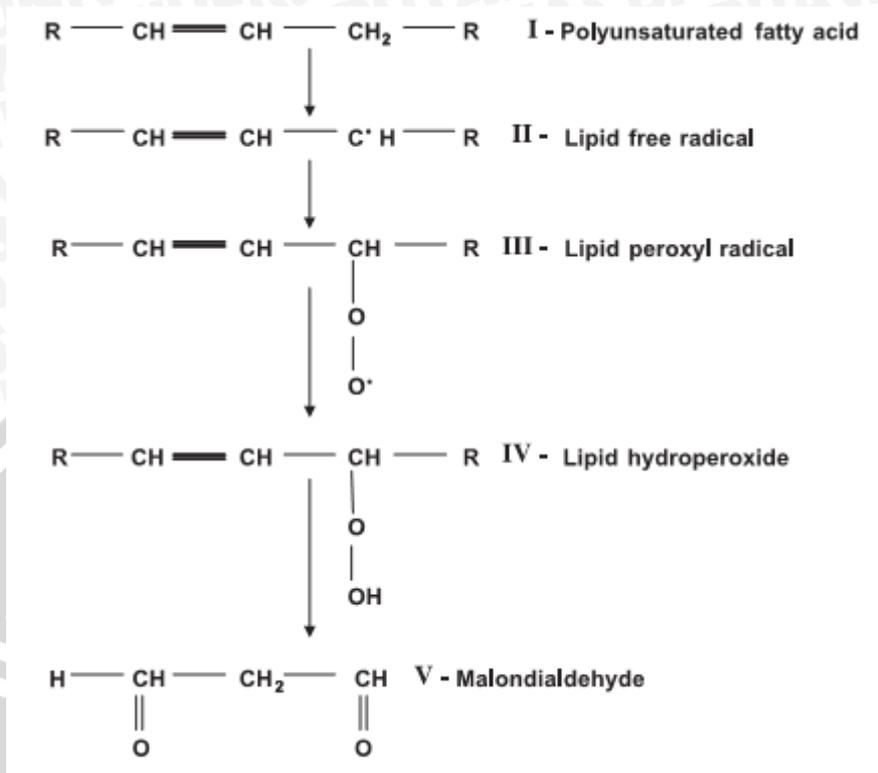
Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu produk lipid peroksida yang terbentuk setelah putusnya rantai karbon asam lemak tak jenuh. MDA menimbulkan kerusakan DNA dan bersifat mutagen. Untaian ganda DNA yang terpapar MDA menyebabkan modifikasi DNA melalui insersi dan delesi serta peningkatan level mutasi ketika DNA tersebut bereplikasi. Frekuensi mutasi meningkat sebesar 44 kali dari tingkat mutasi dasar pada sel manusia. Level

mutasi tersebut lebih besar dibandingkan frekuensi mutasi akibat paparan sinar UV, genotoksin endogen, dan nitrit oksida (Routledge dkk., 1993).

MDA bereaksi dengan basa DNA lalu membentuk ikatan silang lalu menghasilkan deoksiadenosin ( $M_1A$ ), deoksisitidin ( $M_1C$ ), dan deoksiguanosin ( $M_1G$ ). Produk utama ikatan MDA dengan basa DNA yaitu pirimidopurin atau  $M_1G$  menyebabkan transversasi  $G \rightarrow T$  dan transisi  $G \rightarrow A$  pada sel *E. coli* ketika replikasi. Namun, hasil tersebut tidak dapat menyimpulkan bahwa  $M_1G$  merupakan faktor utama penyebab mutasi pada sel manusia karena beberapa alasan yang pertama mutasi akibat paparan MDA merupakan insersi dan delesi yang tidak terdeteksi pada uji mutagenesis  $M_1G$  pada sel manusia. Alasan kedua, kadar  $M_1G$  meningkat seiring peningkatan MDA tetapi frekuensi mutasi *plateau* ketika konsentrasi MDA maksimal pada penelitian. Alasan terakhir, mutagenesis akibat MDA membutuhkan *nucleotide excision repair* (NER) sedangkan  $M_1G$  merupakan substrat NER yang meningkatkan potensi mutagenik NER (Niedernhofer, 2003).

### 2.3.3 Pembentukan Malondialdehid dalam Tubuh

MDA terbentuk melalui peroksidasi asam lemak tak jenuh dan metabolisme asam arakidonat. MDA merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid yang terbentuk setelah degradasi rantai samping aldehyd. Pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid dapat dilihat pada Gambar 2.6

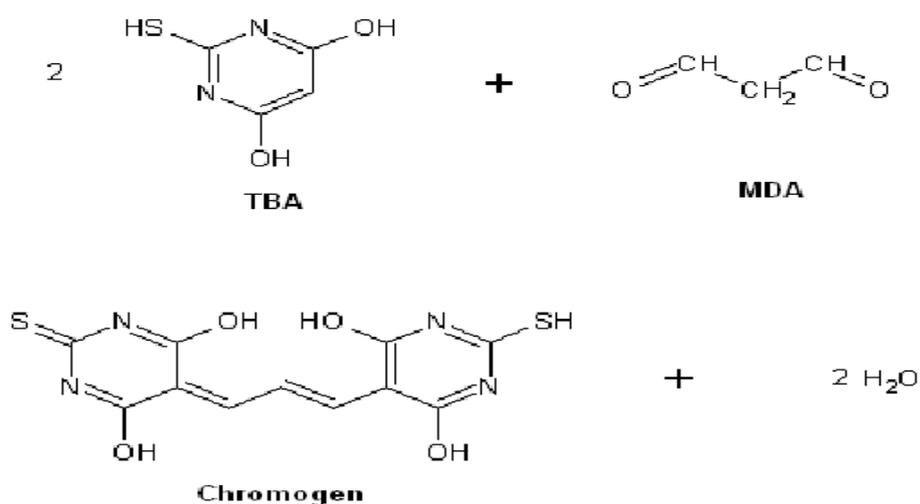


**Gambar 2.6 Pembentukan MDA dari Peroksidasi Lipid.** Pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan radikal bebas menyerang ikatan rangkap asam lemak tak jenuh (reaksi 1). Ikatan rangkap lemah menyebabkan atom hidrogen berpindah menuju radikal dan elektron berpindah menuju asam lemak menghasilkan radikal lipid (reaksi 2). Radikal lipid teroksidasi sehingga membentuk radikal peroksil lipid (reaksi 3). Radikal peroksil bereaksi dengan asam lemak tak jenuh lainnya dan menarik elektron dan mengambil atom hidrogen kemudian membentuk lipid hidroksiperoksida (reaksi 4). Lipid hidroksiperoksida tidak stabil dan mengalami fragmentasi yang menghasilkan MDA (reaksi 5) (Grotto dkk., 2009).

Pembentukan MDA melalui metabolisme asam arakidonat dikatalisis oleh siklooksigenase menjadi prostaglandin endoperoksida (PGH<sub>2</sub>). PGH<sub>2</sub> dikatalisis oleh tromboksan sintetase menjadi MDA dan *12-L-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic-acid* (HHT). Proses pembentukan MDA dari PGH<sub>2</sub> dapat dilihat pada Gambar 2.7



secara maksimal didapatkan pada pemanasan selama 60 menit dan reaksi berlangsung cepat pada pH asam dengan konsentrasi asam tiobarbiturat 20-80 mM. Reaksi tersebut dapat dikuantifikasi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Reaksi antara MDA dengan asam tiobarbiturat dapat dilihat pada Gambar 2.9



**Gambar 2.9 Reaksi MDA dengan Dua Molekul TBA.** Reaksi antara MDA dengan TBA diawali dengan serangan nukleofilik yang melibatkan atom karbon nomor lima pada TBA dengan atom karbon nomor satu pada MDA. Lalu, proses dehidrasi terjadi dan diikuti serangan nukleofilik melibatkan molekul kedua TBA kemudian membentuk warna merah muda.

Metode TBARS dapat digunakan untuk mendefinisikan kondisi pada sistem membran seperti mikrosom dan liposom. Aplikasi metode tersebut pada cairan biologis dan ekstrak jaringan masih menjadi permasalahan karena MDA terbentuk melalui dekomposisi lipid peroksida ketika pemanasan sampel dengan TBA. Dekomposisi tersebut dipercepat oleh besi yang terdapat dalam reagen. Preparasi jaringan dan cairan biologis yang menggunakan berbagai reagen yang mengandung besi akan meningkatkan konsentrasi MDA pada sampel yang

dianalisis. Oleh sebab itu, butilat hidrositoluen ditambahkan pada sampel untuk mencegah dekomposisi lipid peroksida (Sochor, 2012).

#### **2.4 Stres Oksidatif pada Jantung**

Diabetes mellitus menimbulkan komplikasi makrovaskular seperti aterosklerosis pada arteri besar (karotid, aorta, dan femoral) dan arteri koroner yang berperan dalam patogenesis infark miokard dan stroke. Selain itu, komplikasi mikrovasikular yaitu mikroangiopati yang menyebabkan gangguan pada ginjal dan retina juga dapat menimbulkan gangguan fungsi jantung. Tanpa abnormalitas tekanan darah dan penyakit arteri koroner akibat komplikasi vaskular, diabetes mellitus akan mempengaruhi struktur dan fungsi jantung yang menyebabkan diabetes kardiomiopati. Hal ini ditunjukkan pada penelitian Rubler dkk. 30 tahun yang lalu yaitu empat orang pasien diabetes menderita gagal jantung kongestif tanpa adanya abnormalitas arteri koroner. Penelitian Schannwell dkk. (2002) menunjukkan pasien diabetes mellitus tipe 1 tanpa riwayat penyakit arteri koroner mengalami penurunan pengisian diastolik, peningkatan pengisian atrial, perpanjangan relaksasi isovolumetrik, dan peningkatan jumlah detak supraventrikular. Lalu, penelitian Carugo dkk. (2001) menunjukkan pasien diabetes mellitus tipe 1 tanpa komplikasi makrovaskular dan mikrovasikular mengalami peningkatan ketebalan dinding dan massa ventrikel kiri serta penurunan fraksi ejeksi.

Patogenesis diabetes kardiomiopati melibatkan berbagai faktor seperti gangguan homeostasis kalsium, peningkatan regulasi sistem renin-angiotensin, stres oksidatif, gangguan metabolisme substrat, dan disfungsi mitokondria (Boudina dan Abel, 2007). Stres oksidatif disebabkan peningkatan produksi ROS akibat hiperglikemia yang memodulasi berbagai proses biokimia diantaranya

peningkatan AGE, peningkatan jalur poliol, aktivasi protein kinase C, dan peningkatan transport elektron dari mitokondria. Perubahan-perubahan tersebut menyebabkan peningkatan produksi  $\cdot\text{O}_2^-$  yang dapat bereaksi dengan radikal hidroksil dan hidrogen peroksida. Selain itu,  $\cdot\text{O}_2^-$  dapat bereaksi dengan NO untuk menghasilkan peroksinitrit. Peningkatan  $\cdot\text{O}_2^-$  dan ROS lainnya dapat menimbulkan peroksidasi lipid, nitrasi protein, dan oksidasi *low density lipoprotein* (LDL) (Farhangkhoei, 2006). Namun, peningkatan ROS tidak diimbangi dengan destruksi ROS oleh antioksidan karena ekspresi dan aktivitas superoksida dismutase dan glutathion peroksidase di jantung menurun pada diabetes mellitus (Johansen dkk., 2005).

Respon yang timbul akibat paparan stres oksidatif yaitu apoptosis sel miokard. Apoptosis sel jantung dipicu oleh pelepasan sitokrom c mitokondria dan aktivasi kaspase-3. Adanya pelepasan dan aktivasi stimulus disebabkan peningkatan produksi ROS dan RNS pada sel jantung setelah terekspos glukosa darah yang tinggi (Lu Cai dkk., 2006). Peningkatan apoptosis menyebabkan penurunan kontraktilitas jantung, pembentukan serabut otot yang abnormal, penipisan dan pelebaran dinding jantung. Penurunan kontraktilitas jantung menyebabkan hipertrofi miosit sebagai kompensasi untuk memelihara volum stroke sehingga beban jantung akan meningkat. Peningkatan beban jantung menyebabkan peningkatan gen *c-jun* yang merupakan bagian faktor transkripsi Activator Protein-1 (AP-1) (Kang, 2001). Peningkatan *c-jun* menginduksi ekspresi gen yang menimbulkan hipertrofi sehingga terjadi sintesis protein dan sarkomer. Selain itu, peningkatan beban jantung meningkatkan stres pada dinding jantung yang memperberat gangguan keseimbangan energi dan menyebabkan iskemia.

Respon iskemia mengaktifasi fibroblas untuk menstimulasi pembentukan kolagen dan menyebabkan fibrosis pada bagian ventrikel baik yang mengalami infark maupun tidak. Selain itu, kerusakan sel jantung akan mengaktifasi miokard kolagenese yang merupakan enzim inaktif pada ventrikel kiri sehingga produksi kolagen meningkat (Cohn dkk., 2000). Peningkatan sintesis kolagen tanpa diimbangi degradasi oleh matrik metaloproteinase (MMP-2) akan menyebabkan kekakuan pada ventrikel kiri dan disfungsi jantung (Chun-jun Li, 2012).

### **2.5 Asam Alfa Lipoat**

Antioksidan berperan mengontrol peroksidasi lipid. Dalam tubuh, terdapat antioksidan yang menghambat kerusakan peroksidatif dengan menangkap spesies oksigen reaktif. Kondisi diabetes mellitus kadar antioksidan endogen semakin menurun. Penelitian menunjukkan pasien diabetes mellitus mengalami penurunan kadar glutathion (Mahbob dkk., 2005). Selain itu, kadar vitamin C dan E juga menurun pada pasien diabetes mellitus (Melhem dkk., 2001). Hal ini menunjukkan kapasitas penangkapan radikal bebas juga semakin menurun. Oleh sebab itu, pasien diabetes mellitus mengalami peningkatan peroksidasi lipid dan menyebabkan timbulnya berbagai komplikasi.

Penurunan kadar dan aktivitas antioksidan menjadi pertimbangan dalam terapi diabetes. Pada saat ini, suplemen antioksidan telah diberikan dalam terapi diabetes mellitus. Salah satu suplemen yang diindikasikan bagi diabetes adalah asam alfa lipoat (ALA) atau asam tioktat. ALA memiliki banyak kelebihan dibandingkan antioksidan lain. Tidak seperti antioksidan lainnya, ALA memiliki aktivitas biologis dalam bentuk oksidasi maupun reduksi. Selain itu, ALA juga mampu meregenerasi antioksidan lain seperti vitamin C, vitamin E, dan glutathion

(Golbidi dkk., 2011). Keunggulan tersebut membuat ALA dipertimbangkan sebagai terapi diabetes mellitus.

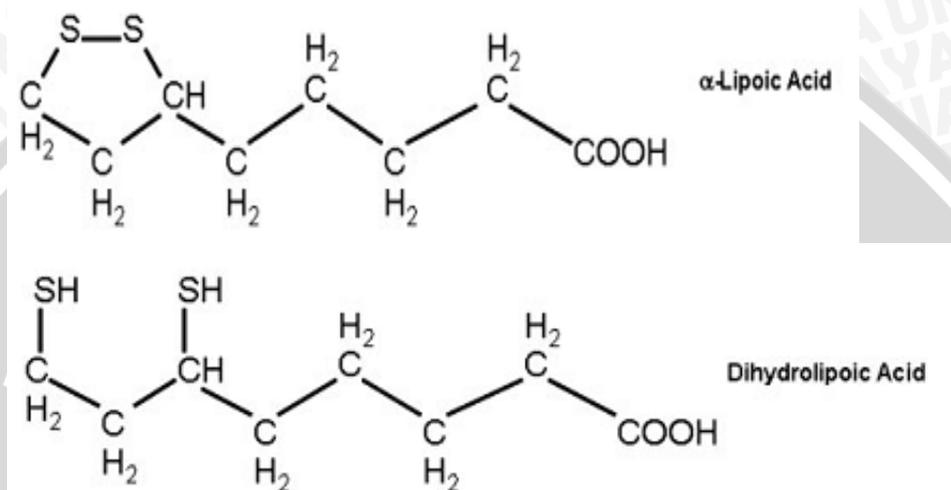
### 2.5.1 Sumber Asam Alfa Lipoat

Isomer R-LA disintesis dalam mitokondria hewan dan tumbuhan dari asam oktanoat dan sistein. Isomer R-LA berikatan kovalen dengan lisin membentuk lipolisin (Wollin dan Jones, 2003). Lipolisin banyak terkandung dalam bayam, brokoli, dan tomat, sedangkan pada hewan banyak terdapat di hati dan ginjal (Packer dkk., 2001). Dari makanan, ALA diabsorpsi dalam bentuk lipolisin karena enzim-enzim proteolitik tidak efektif memecah ikatan peptida dalam kompleks tersebut. Namun, kebutuhan ALA pada mamalia tidak cukup hanya dari makanan sehingga diperlukan sintesis *de novo* di jantung, hati, dan testis (Wollin dan Jones, 2003). Bioavailabilitas ALA yang bersumber dari makanan sangat kecil dalam sirkulasi. Oleh sebab itu, potensi terapi didapatkan dari suplemen dibandingkan langsung dari makanan (Wollin dan Jones, 2003).

### 2.5.2 Struktur Kimia Asam Alfa Lipoat

ALA disebut juga dengan asam tioktat dengan nama kimia 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ) (Golbidi dkk., 2011). Struktur ALA terdiri dari asam lemak rantai pendek yang berikatan dengan gugus sulfhidril. Potensi antioksidan diakibatkan oleh gugus sulfhidril (Balkis dkk., 2008). Adanya karbon asimetrik menyebabkan ALA memiliki dua isomer optis yaitu R-LA dan S-LA. Namun, isomer R-LA terikat protein dan bertindak sebagai kofaktor pada sistem biologis. Meskipun isomer R-LA lebih berpotensi dibandingkan S-LA, suplemen ALA terdiri dari dua isomer tersebut. Hal ini bertujuan meningkatkan bioavailabilitas ALA karena S-LA mencegah polimerisasi R-LA sehingga konsentrasi dalam darah

tinggi (Golbidi dkk., 2011). Baik dalam sel mengandung mitokondria ataupun tidak, ALA akan direduksi menjadi bentuk yang poten yaitu DHLA (Dihydrolipoic Acid). Struktur ALA dan DHLA dapat dilihat pada Gambar 2.10.



**Gambar 2.10 Struktur Kimia ALA dan DHLA.** Asam alfa lipoat ( $\alpha$ -lipoic acid) atau ALA terdiri dari delapan atom karbon dengan satu karbon kiral. Reduksi ALA melibatkan pelepasan ikatan sulfida dan masing-masing atom sulfur mengikat atom hidrogen yang akan membentuk gugus dithiol. Bentuk reduksi ALA disebut *dihydrolipoic acid* (DHLA) (Wollin dan Jones, 2003).

### 2.5.3 Aktivitas Antioksidan Asam Alfa Lipoat

ALA sejak lama dikenal sebagai kofaktor untuk enzim bioenergetik di mitokondria. Selain itu, ALA memiliki berbagai aktivitas farmakologi dan antioksidan. Aktivitas farmakologi diantaranya memperbaiki kontrol glikemik, mengatasi polineuropati akibat diabetes mellitus, dan toksisitas pada kasus keracunan logam berat. Lalu, aktivitas antioksidan ALA diantaranya menangkap radikal bebas, khelatasi logam, regenerasi antioksidan, dan meningkatkan kadar glutathione (Smith dkk., 2004).

Aktivitas antioksidan juga dimiliki oleh DHLA yang lebih poten dibandingkan ALA karena lebih mudah ditransport ke bagian dalam sel dan

efektif di bagian ekstraselular (Wollin dan Jones, 2003). Proses reduksi ALA terjadi dalam sel mengandung mitokondria maupun tidak. Pada sel yang mengandung mitokondria, ALA direduksi menjadi DHLA melalui reaksi bergantung NADH dan enzim lipoamid dehidrogenase. Sel yang tidak mengandung mitokondria akan mereduksi ALA melalui NADPH dengan bantuan glutathion dan tioredoksin reduktase (Golbidi dkk, 2011).

#### 2.5.3.1. Aktivitas Menangkap Radikal Bebas

Aktivitas menangkap radikal bebas ALA dan DHLA disebabkan oleh gugus thiol. Adanya gugus thiol membuat ALA dan DHLA lebih poten menangkap berbagai spesies oksigen dan nitrogen lebih baik dibandingkan dengan GSH (Goraca dkk., 2009). DHLA/ALA memiliki potensial redoks  $-0,32$  V yang lebih tinggi dibandingkan GSH/GSSG yaitu  $-0,24$ . Perbedaan potensial redoks menunjukkan DHLA memiliki potensi lebih besar dalam mereduksi dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif dibandingkan glutathion (Wollin dan Jones, 2003).

Baik ALA maupun DHLA memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang larut dalam cairan maupun lipid (Golbidi dkk, 2011). Meskipun sama-sama dapat menangkap radikal bebas, aktivitas DHLA lebih dominan dibandingkan ALA dalam menangkap ROS. Selain itu, ALA lebih mudah diinaktivasi oleh radikal bebas sehingga potensinya dapat menurun. Dari kedua sifat tersebut, DHLA lebih poten dalam menangkap ROS (Packer dkk., 2001). Jenis-jenis ROS yang dapat ditangkap oleh ALA maupun DHLA dapat dilihat dalam Tabel 2.1

**Tabel 2.1 Jenis ROS yang Ditangkap ALA dan DHLA (Packer dkk., 2001)**

Oksidan	Asam Alfa lipoaat	Asam Dihidrolipoaat
Hidrogen peroksida	Ya	Ya
Singlet Oksigen	Ya	Tidak
Radikal hidroksil	Ya	Ya
Radikal Nitrit Oksida	Ya	Ya
Radikal Superoksida	Tidak	Ya
Asam hipoklorat	Ya	Ya
Peroksinitrit	Ya	Ya
Radikal peroksil	Tidak	Ya

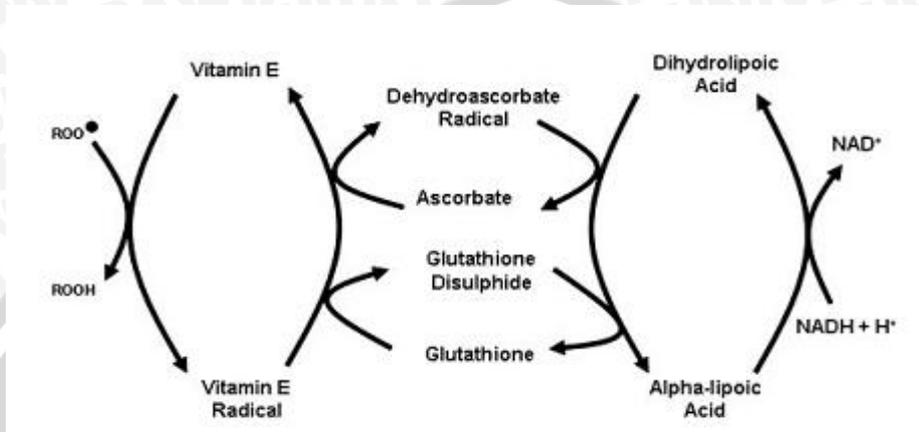
### 2.5.3.2 Khelatasi logam

ALA mengkhelat logam-logam selain aktivitas menangkap radikal bebas. ALA dapat membentuk kompleks stabil dengan  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$ , tetapi tidak dapat mengkhelat  $Fe^{3+}$ , sedangkan DHLA mampu mengkhelat  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$  (Haleagrahara dkk., 2011). Aktivitas khelatasi logam tersebut ditimbulkan oleh gugus thiol pada ALA dan DHLA. Aktivitas khelatasi logam telah dibuktikan pada penelitian di hewan yaitu DHLA mampu menurunkan akumulasi besi terkait peningkatan usia (Golbidi dkk., 2011).

### 2.5.3.3 Regenerasi Antioksidan Lain

Antioksidan yang bereaksi dengan radikal bebas akan menjadi teroksidasi yang lebih lanjut menyebabkan penurunan fungsi antioksidan tersebut. DHLA mampu mereduksi antioksidan lain yang telah tereduksi seperti vitamin C, E, dan GSH (Golbidi dkk., 2011). Penelitian menunjukkan peningkatan glutation tereduksi (GSH) dan rasio GSH/GSSG di jaringan jantung setelah pemberian ALA pada induksi stres oksidatif akibat lipopolisakarida. Efek peningkatan GSH dan penurunan GSSG disebabkan oleh aktivitas pereduksi dari DHLA yang merupakan agen pereduksi poten (Goraca dkk., 2009). DHLA mampu

meregenerasi vitamin E secara tidak langsung melalui reduksi dehidroaskorbat yang akan mereduksi alfa tokoferol. Aktivitas regenerasi antioksidan oleh DHLA pada Gambar 2.11.



**Gambar 2.11 Regenerasi Antioksidan oleh DHLA.** Regenerasi antioksidan endogen oleh *dihydro-lipoic acid* (DHLA) melibatkan berbagai substansi. Asam alfa lipoat mampu mereduksi radikal dehidroaskorbat menjadi askorbat. Selain itu, DHLA mereduksi glutathion disulfida menjadi glutathion yang aktif menangkal radikal bebas. Regenerasi askorbat dan glutathion akan mereduksi vitamin E radikal sehingga sehingga potensi antioksidan kembali aktif (Wollin dan Jones,2003).

#### 2.5.3.4 Peningkatan Kadar Antioksidan GSH

ALA meningkatkan kadar GSH melalui peningkatan reduksi sistin menjadi sistein. Sistein akan meningkatkan biosintesis GSH sehingga kadar GSH dapat meningkat (Packer dkk., 2001). Selain itu, ALA dapat menginduksi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf<sub>2</sub>) yang meregulasi transkripsi GSH. Secara normal, Nrf<sub>2</sub> berada dalam sitoplasma dalam kondisi dorman. Oleh sebab itu, induksi ALA pada Nrf<sub>2</sub> secara signifikan dapat meningkatkan kapasitas sintesis GSH selular (Golbidi dkk., 2011).

#### 2.5.5 Dosis Suplemen Asam Alfa Lipoat

Rekomendasi dosis suplemen ALA untuk neuropati pada manusia 600-1800 mg per hari. Penelitian Ziegler dkk. (2006) menggunakan desain penelitian

four arm, parallel group, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trials dengan tiga dosis ALA yang digunakan peroral yaitu 600 mg, 1200 mg, dan 1800 mg selama lima minggu pada pasien diabetes polineuropati distal simetris. Dari ketiga dosis tersebut, tidak ada perbedaan signifikan antara ketiga grup dibanding plasebo untuk *paresthesia* dan kesemutan. Namun, rata-rata skor TSS (*Total Symptom Score*) setiap kelompok berbeda signifikan dibandingkan plasebo setelah lima minggu meskipun saat skrining perbedaan tersebut tidak signifikan. Tingkat penurunan TSS sebesar 62% pada ALA 600 mg, 50% pada ALA 1200, dan 56% pada ALA 1800 mg, dan 26% pada placebo.

Dosis ALA yang digunakan pada hewan coba antara 25 hingga 100 mg/kg/hari yaitu dosis 25 dan 50 mg/kg/hari peroral digunakan dalam penelitian Haleagrahara dkk. (2011) yang menunjukkan efek penurunan stres oksidatif pada sumsum tulang belakang yang terpapar timah, dosis 30 mg/kg/hari secara peroral digunakan dalam penelitian Melhem dkk. (2002) yang dapat menghambat progresifitas kerusakan ginjal pada tikus Sprague-dawley dan dosis 100 mg/kg/hari secara intraperitoneal digunakan dalam penelitian Stevens dkk. (2000) yang dapat mencegah stres oksidatif pada tikus diabetes (Bhatti dkk., 2005). Selain neuropati, dosis ALA 100 mg/kg intraperitoneal juga digunakan untuk penelitian pada jantung tikus wistar diabetes mellitus yaitu penelitian Chun-jun Li dkk. (2009) yang terbukti menurunkan apoptosis miokard dan Chun-jun Li. (2012) yang hasilnya menunjukkan penurunan stres oksidatif di mitokondria, *remodeling* matriks ekstraselular, c-Jun N-terminal kinase (JNK), dan aktivasi MAPK p38. Namun, beberapa penelitian menggunakan dosis oral bervariasi untuk menguji efek ALA terhadap jantung tikus diabetes mellitus yaitu dosis 80 mg/kg berat badan per hari digunakan dalam penelitian Shotton dkk. (2003) selama 8 minggu

yang mampu mencegah penurunan norepinefrin pada tikus wistar diabetes, dosis 200 mg/kg berat badan per hari digunakan dalam penelitian Eun Lee dkk. (2012) selama 16 minggu yang menunjukkan pencegahan peningkatan bobot jantung, ekspresi RAGE, liver kinase B1 jantung, akumulasi kolagen, dan menghambat penurunan ekspresi antioksidan superoksida dismutase pada pada tikus *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF) diabetes. Lalu, penelitian Midaoui dan Champlain (2002) menggunakan dosis 500 mg/kg per hari selama tiga minggu yang secara signifikan mencegah peningkatan tekanan darah dan produksi  $O_2^-$  di aorta pada tikus Sprague-Dawley diabetes.

#### **2.5.6 Farmakokinetik Suplemen Asam Alfa Lipoat**

ALA diabsorpsi dengan cepat di saluran pencernaan. Pada penelitian terhadap manusia, administrasi ALA menunjukkan absorpsi maksimum antara 0,5 hingga 1 jam. Dua isomer optis ALA (R-LA dan S-LA) menunjukkan absorpsi yang berbeda. R-LA menunjukkan nilai *area under curve* dan  $C_{max}$  lebih tinggi dibandingkan S-LA pada penggunaan peroral. Namun, konsentrasi keduanya dalam plasma tidak berbeda jika diberikan secara parenteral (Packer dkk., 2001).

Absorpsi ALA (R-LA dan S-LA) akan menurun jika diberikan bersamaan dengan makanan. Oleh sebab itu, administrasi dilakukan 30 menit sebelum makan. Motilitas saluran cerna tidak mempengaruhi absorpsi ALA, meskipun digunakan pada pasien diabetes dengan penurunan fungsi motilitas (Packer dkk., 2001). Setelah fase absorpsi, kadar ALA meningkat dalam plasma hingga satu jam lalu menurun dengan cepat (Eun Hee Koh dkk., 2011). Distribusi ALA dari plasma dimediasi oleh protein pembawa yang juga berperan dalam penyerapan ALA di saluran pencernaan (Shay, 2009).

Bioavailabilitas ALA berbeda antara rute parenteral dengan oral. Pada uji preklinis dengan menggunakan tikus, hasil menunjukkan bioavailabilitas ALA sebesar 66% dalam plasma. Hasil ini berbeda jauh jika dibandingkan dengan rute parenteral. Rendahnya bioavailabilitas kemungkinan disebabkan oleh *first pass metabolism*. Hal ini ditunjukkan dari hasil penelitian yang menentukan kadar ALA dalam urin. Meskipun bioavailabilitas sekitar 66% dalam plasma, kadar ALA dalam urin menunjukkan nilai 93% setelah 168 jam (Packer dkk., 2001).

ALA dimetabolisme di hepar kemudian menghasilkan metabolit-metabolit seperti asam bisnorlipoat, tetranorlipoat, dan  $\beta$ -hidroksi-bisnorlipoat. Meskipun dimetabolisme di hepar, ALA aman digunakan bagi pasien dengan gangguan fungsi hepar. Bahkan, terapi ALA menunjukkan hasil memuaskan pada pasien dengan penyakit hepar. ALA dan metabolitnya diekskresikan melalui ginjal dengan kecepatan sebanding dengan ambilan ALA ke dalam jaringan. Meskipun diekskresikan melalui ginjal, ALA aman digunakan pada pasien gagal ginjal tahap akhir (Golbidi dkk., 2011).

### 2.5.7 Efek Samping dan Toksisitas

ALA menyebabkan alergi kulit dan hipoglikemia pada dosis lebih dari 2000 mg/hari. Namun, alergi kulit dapat diatasi dengan pemberian antihistamin. Keluhan lain yang disebabkan penggunaan ALA diantaranya kehilangan nafsu makan dan sensasi pahit di tenggorokan akibat menelan kapsul (Porasuphatana dkk., 2012). Namun, efek samping ALA tidak selalu terjadi ketika digunakan. Dari hasil penelitian, ALA tidak menunjukkan efek samping ketika digunakan pada dosis 2,4 gram perhari dan dosis 1,8 gram perhari selama enam bulan (Esgro, 2010).

Tidak ada laporan mengenai toksisitas ALA dalam dosis tinggi pada manusia. Pada anjing, LD<sub>50</sub> terjadi ketika administrasi dosis 400-500 mg/kg berat badan. Tikus menunjukkan toleransi lebih tinggi dibanding anjing. LD<sub>50</sub> pada tikus dilaporkan terjadi pada dosis > 2 g/kg berat badan (Esgro, 2010). LD<sub>50</sub> ALA antara rute oral berbeda dengan intraperitoneal. Pada rute oral, LD<sub>50</sub> dilaporkan pada dosis 1130 dan 502 mg/kg pada mencit dan tikus, sedangkan LD<sub>50</sub> rute intraperitoneal 200 dan 160 mg/kg (Wollin dan Jones, 2003). Keamanan penggunaan ALA pada ibu hamil dan menyusui belum diketahui (Pasley, 2010). Oleh sebab itu, ALA belum dapat direkomendasikan bagi ibu hamil dan menyusui.

