

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes diturunkan dari bahasa Yunani yaitu *diabētēs* yang berarti pipa air melengkung (syphon). Diabetes dinyatakan sebagai keadaan di mana terjadi produksi urin yang berlebih pada penderita diabetes. Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu penyakit yang melibatkan hormon endokrin pankreas, antara lain insulin dan glukagon (Nugroho, 2006). Hal ini terkait dengan kelainan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang menyebabkan komplikasi kronis termasuk mikrovaskuler, makrovaskuler, dan gangguan neuropatik. Diabetes mellitus merupakan penyebab utama pada perkembangan stadium akhir penyakit ginjal. Diabetes adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan resistensi insulin, sekresi insulin yang tidak cukup, atau keduanya (Dipiro *dkk.*, 2008). Diabetes mellitus dikelompokkan menjadi 4 tipe yaitu (Deshpande *dkk.*, 2008) :

1. Tipe 1, yang disebabkan karena kerusakan sel beta pankreas dan ditandai dengan penurunan sekresi insulin.
2. Tipe 2, yang terjadi ketika ada peningkatan resistensi abnormal terhadap aksi insulin dan tubuh tidak dapat memproduksi insulin yang cukup untuk mengatasinya.
3. Diabetes gestasional, yang merupakan bentuk intoleransi glukosa yang mempengaruhi beberapa wanita selama kehamilan.
4. Sekelompok diabetes mellitus yang disebabkan oleh kelainan genetik tertentu dari fungsi sel beta pankreas, pankreatitis, obat-obatan atau bahan kimia.

Defisiensi insulin pada diabetes mellitus tipe 1 disebabkan karena autoimun yang menimbulkan kerusakan sel beta pankreas akibat reaksi sistem imun dengan antigen islet (Robertson, 2004). Sebagian besar kasus adalah karena proses imunologik walaupun sebagian kecil bersifat idiopatik (Sacher dan Richard, 2004). Diabetes mellitus tipe 1 disebut sebagai diabetes melitus yang tergantung pada sekresi insulin atau diabetes mellitus yang terjadi pada usia remaja, terdapat 5% sampai 10% dari semua kasus diabetes mellitus. Diabetes mellitus tipe 1 biasanya terjadi pada anak-anak dan orang dewasa yang usianya kurang dari 30 tahun, namun penyakit ini dapat terjadi pada semua usia (Marie dkk., 2008). Meskipun tingkat kejadian diabetes mellitus tipe 1 tergolong kecil, resiko terjadinya komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular sama tingginya dengan diabetes mellitus tipe 2 (Kangralkar dkk., 2010). Komplikasi mikrovaskular maupun makrovaskular pada diabetes mellitus umumnya merupakan penyebab terjadinya gagal ginjal dan kebutaan (Hur dkk., 2010).

Diabetes mellitus (DM) tipe 1 diperantarai oleh degenerasi sel β Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (streptozotosin, aloksan), atau secara genetik (*wolfram sindrome*) yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali. Hal tersebut mengakibatkan penurunan pemasukan glukosa dalam otot dan jaringan adiposa. Secara patofisiologi, penyakit ini terjadi lambat dan membutuhkan waktu yang bertahun-tahun, biasanya terjadi sejak anak-anak atau awal remaja. Penurunan berat badan merupakan ciri khas dari penderita DM 1 yang tidak terkontrol. Gejala yang sering mengiringi DM 1 yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Peningkatan volume urin disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik) dan benda-benda keton dalam urin. Lebih lanjut, diuresis osmotik tersebut akan mengakibatkan kondisi dehidrasi, kelaparan dan shock. Gejala haus dan lapar

merupakan akibat dari kehilangan cairan dan ketidakmampuan tubuh menggunakan nutrisi (Nugroho, 2006).

Pada DM I, kadar glukosa darah sangat tinggi, tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkannya secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Seiring dengan kondisi tersebut, terjadi perangsangan lipolisis serta peningkatan kadar asam lemak bebas dan gliserol darah. Dalam hal ini terjadi peningkatan produksi asetil-KoA oleh hati, yang pada gilirannya diubah menjadi asam asetoasetat dan pada akhirnya direduksi menjadi asam β -hidroksibutirat atau mengalami dekarboksilasi menjadi aseton. Pada kondisi normal, konsentrasi benda-benda keton relatif rendah karena insulin dapat menstimulasi sintesis asam lemak dan menghambat lipolisis. Hanya dibutuhkan kadar insulin yang kecil untuk menghambat lipolisis (Nugroho, 2006).

Target pengatasan diabetes mellitus yaitu mempertahankan kontrol glikosa darah sesuai rekomendasi (kadar hemoglobin terglukasi $\leq 6,5\%$) bagi pasien diabetes mellitus tipe 1 atau 2 (Erejuwa, 2012). Meskipun glukosa darah mencapai target normal, stres oksidatif dan komplikasi diabetes masih dapat terjadi. Pasien diabetes tetap mengalami komplikasi walaupun glukosa darah telah normal. Progresifitas kerusakan jaringan yang terjadi meskipun hiperglikemia telah teratasi disebut *memori hiperglikemia*. Kondisi tersebut disebabkan oleh perubahan epigenetik yang persisten akibat hiperglikemia yang 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 Michael, 2012).

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). Untuk memaksimalkan efek terapi insulin dalam mengatasi komplikasi diabetes terutama dalam mengatasi stres oksidatif, maka dibutuhkan terapi tambahan berupa antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, dan asam alfa lipoat.

2.1.1 Diabetes Nefropati (*Renal Disease*)

Diabetes nefropati didefinisikan sebagai proteinuria yang persisten (>500 mg protein atau >300 mg albumin per 24 jam) pada pasien tanpa infeksi saluran kemih atau penyakit lain yang menyebabkan proteinuria. Pada pasien

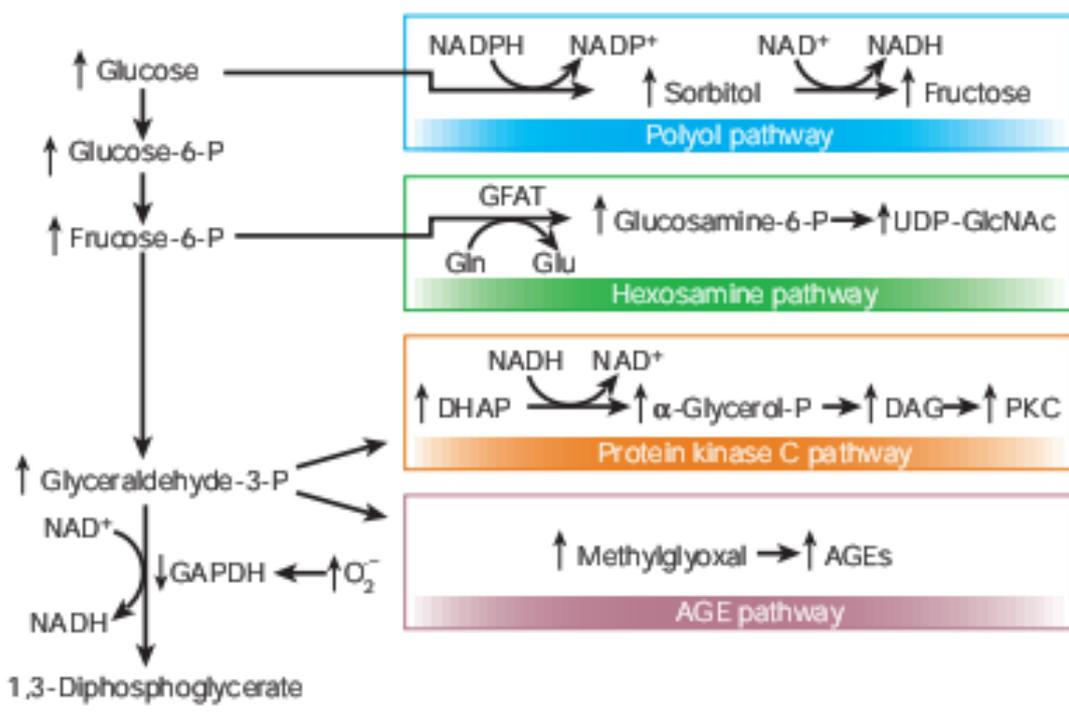
DM tipe 1, perkembangan nefropati secara klinis terjadi pada tahap akhir diabetes. Etiologi diabetes nefropati masih kurang dipahami. Regulasi metabolisme merupakan salah satu faktor resiko yang dapat diperbaiki dalam perkembangan diabetes nefropati. Pada pasien diabetes mellitus tipe 1 ataupun diabetes mellitus tipe 2, kontrol metabolik yang ketat dapat menurunkan resiko mikroalbuminuria dan proteinuria (Deshpande *dkk.*, 2008).

Peningkatan tekanan darah juga berhubungan dengan peningkatan resiko perkembangan diabetes nefropati. Faktor resiko lain termasuk merokok, obesitas, anemia, dan faktor genetik. Pasien dengan diabetes dan nefropati juga beresiko menderita penyakit jantung koroner dan stroke dibandingkan dengan pasien diabetes tanpa nefropati. Tingkat mortalitas pasien diabetes nefropati juga lebih besar dibandingkan dengan pasien diabetes tanpa nefropati. Secara keseluruhan, kejadian nefropati telah menurun dalam beberapa dekade terakhir karena perbaikan dalam mengontrol pasien diabetes terhadap kontrol glikemik serta kontrol hipertensi (Deshpande *dkk.*, 2008).

2.2 Stres Oksidatif pada Diabetes Mellitus tipe 1

Hiperglikemi menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas terutama ROS pada semua jaringan melalui auto-oksidasi glukosa dan glikosilasi protein. Radikal bebas dihasilkan sebagai produk sampingan pada metabolisme sel yang normal. Namun pada kondisi hiperglikemi terjadi gangguan keseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan seluler. Ketidakseimbangan ini menyebabkan disfungsi sel dan kerusakan jaringan. Peningkatan ROS pada diabetes disebabkan karena produksi antioksidan menurun. Kadar antioksidan yang rendah mempengaruhi kerentanan berbagai jaringan terhadap stres oksidatif dan dapat meningkatkan perkembangan komplikasi pada diabetes (Moussa, 2008).

Hiperglikemi akibat regulasi glukosa yang tidak terkontrol dan menyebabkan komplikasi pada diabetes mellitus tipe 1. Paparan glukosa yang tinggi menyebabkan perubahan kumulatif pada makromolekul. Terdapat empat kunci jalur metabolik yang menyebabkan kerusakan sel pada diabetes mellitus tipe 1 yaitu peningkatan jalur polioliol, peningkatan pembentukan *advanced glycation end product* (AGE), aktivasi protein kinase c (PKC), dan peningkatan jalur heksosamin (Rolo dan Carlos, 2006).



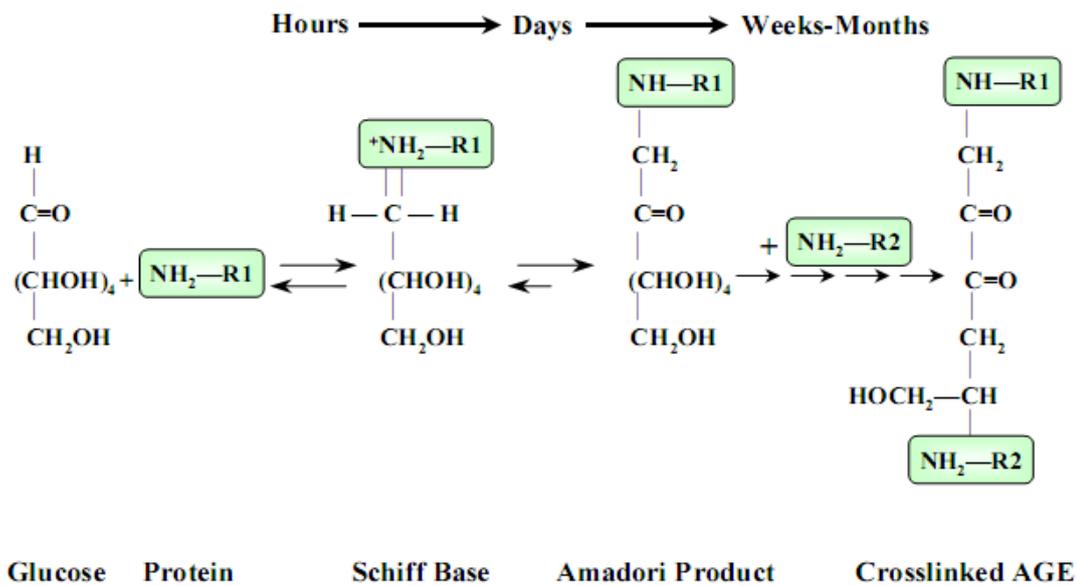
Gambar 2.1. Jalur Metabolik Penyebab Diabetes Mellitus. Potensi mekanisme hiperglikemia yang menginduksi overproduksi superoksida mitokondria mengaktifkan empat jalur kerusakan hiperglikemik. Kelebihan superoksida menghambat enzim glikolitik GAPDH, sehingga mengalihkan metabolit dari glikolisis ke jalur glukosa overutilisasi. Hal ini menyebabkan peningkatan fluks dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ke diasilgliserol (DAG), aktivasi PKC, dan fosfat triose menjadi metilgliksal, peningkatan AGE. Peningkatan fluks fruktosa-6-fosfat menjadi UDP-N-asetilglukosamin meningkatkan modifikasi protein oleh O-linked N-asetilglukosamin (GlcNAc) dan peningkatan fluks glukosa melalui jalur polioliol (Brownlee, 2001).

Hiperglikemia menyebabkan peningkatan konversi enzimatik dari glukosa menjadi sorbitol polialkohol, dengan seiring berkurangnya NADPH dan glutation. Hiperglikemia menginduksi overproduksi dari superoksida yang secara signifikan akan menghambat dehidrogenase glukosa-6-fosfat, enzim ini membatasi laju dari

2.2.1 Peningkatan AGE

Advanced glycation end product (AGEs) terlibat dalam patogenesis terjadinya komplikasi mikrovaskular pada pasien diabetes seperti nefropati, neuropati, dan retinopati (Rolo dan Carlos, 2006). 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 (Hegab *dkk.*, 2012). Pada basa Schiff, karbon oksigen aldehyd ikatan rangkap diubah menjadi karbon nitrogen ikatan rangkap dengan tiamin. Pembentukan basa Schiff relatif cepat dan reversibel. Basa Schiff akan mengalami perubahan susunan kimia yang menghasilkan produk amadori. Reaksi ini diyakini terjadi secara cepat melalui perubahan bentuk rantai enol terbuka. Akibatnya, amadori terakumulasi pada protein, dan memulai proses *advance glycation*. AGEs timbul dari autooksidasi glukosa menjadi glioksal, dekomposisi produk Amadori menjadi 3-deoxyglucosone, fragmentasi gliseraldehida-3-fosfat dan dihidroksi aseton fosfat menjadi metilglioksal (Rolo dan Carlos, 2006).

Glioksal, metilglioksal, dan 3-deoksiglukoson merupakan dikarbonil intraseluler reaktif yang bereaksi dengan kelompok amino intraseluler dan protein ekstraseluler untuk membentuk AGEs. Produksi prekursor AGE intraseluler mengganggu integritas sel target dengan memodifikasi fungsi protein atau dengan menginduksi produksi reseptor yang memediasi ROS yang dapat menyebabkan perubahan ekspresi gen (Rolo dan Carlos, 2006). Jenis AGE yang dapat dideteksi diantaranya pentosidin dan N-karboksimetilisin (CML) (Su-Yen Goh dan Cooper, 2008). Proses terbentuknya AGE dapat dilihat pada gambar 2.3 berikut.

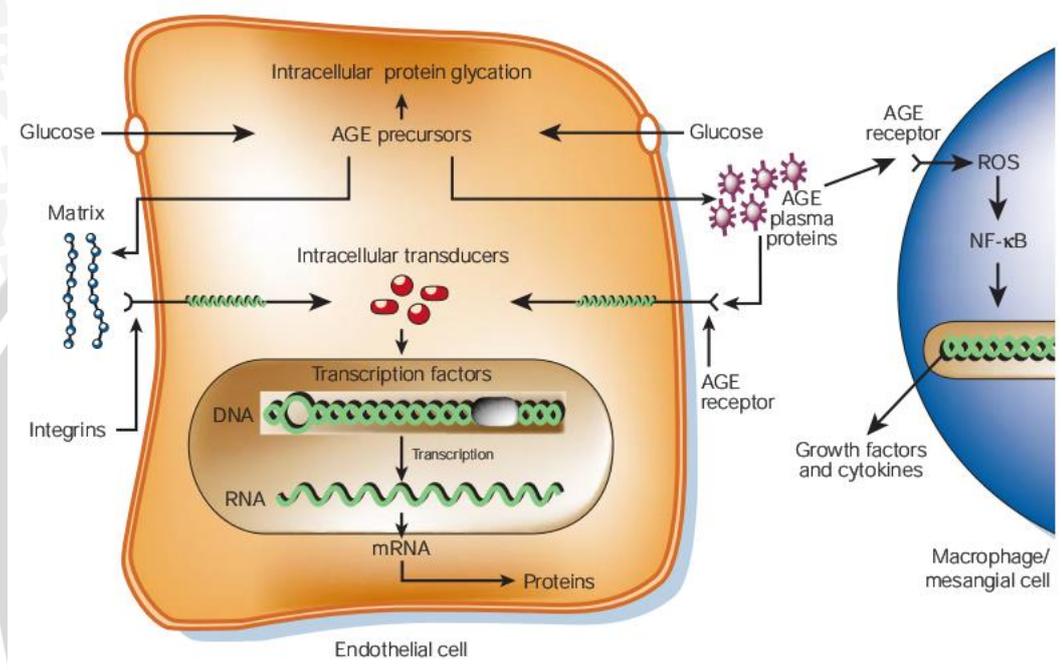


Gambar 2.3. Proses Pembentukan AGE. Pembentukan AGE diawali dengan reaksi antara gugus karbonil glukosa dengan asam amino yang disebut reaksi Maillard. Dari reaksi Maillard yang berlangsung selama beberapa jam, basa Schiff yang bersifat labil akan terbentuk. Basa Schiff akan mengalami perubahan susunan 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).

Glikosilasi protein jaringan mempengaruhi perkembangan komplikasi mikrovaskuler berupa nefropati dan lainnya. Pada hiperglikemia kronis, glukosa yang meningkat akan bergabung dengan asam amino bebas. Proses nonenzimatik awalnya membentuk produk glikosilasi yang awalnya reversibel kemudian menjadi ireversibel. AGE meningkatkan akumulasi protein matriks dalam sel epitel glomerulus. Pada nefropati, AGE mengubah transduksi sinyal melalui perubahan pada sitokin, faktor pertumbuhan jaringan ikat dan radikal bebas serta interaksi dengan reseptor AGE pada sel endotel, monosit, sel mesangial dan podosit (Satirapoj, 2010).

AGE menyebabkan kerusakan sel target melalui tiga mekanisme umum. Pertama, AGE mengubah fungsi protein intraseluler. Kedua, komponen matriks ekstraseluler dimodifikasi oleh prekursor AGE yang berinteraksi dengan komponen matriks lain dan dengan reseptor protein matriks (integrin) pada sel.

Ketiga, protein plasma dimodifikasi oleh prekursor AGE yang mengikat reseptor AGE pada sel endotel, sel mesangial dan makrofag, yang kemudian merangsang produksi ROS. Ligasi reseptor AGE ini akan mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B pleiotropic yang menyebabkan perubahan patologis terhadap ekspresi gen (Brownlee, 2001).



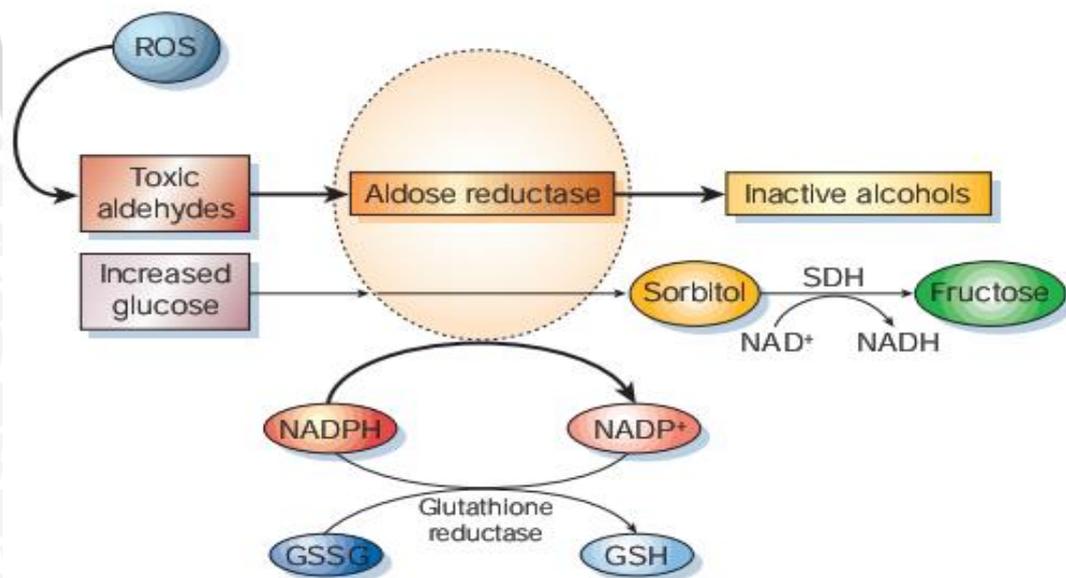
Gambar 2.4. Mekanisme AGE menyebabkan kerusakan sel. AGE mengubah beberapa fungsi seluler. Perubahan protein matriks ekstraseluler menyebabkan interaksi abnormal dengan protein matriks lain dan dengan integrin. Perubahan protein plasma oleh AGE menyebabkan ligan mengikat reseptor AGE dan mendorong perubahan ekspresi gen dalam sel-sel endotel, sel mesangial, dan makrofag (Brownlee, 2001).

2.2.2 Jalur Poliol

Reduktase aldosa (alditol : NAD (P)+1-oksido-reduktase, EC 1.1.1.21) adalah enzim pertama dalam jalur poliol. Enzim ini dibentuk di sitosol, monomer oksido-reduktase yang mengkatalisis reduksi NADPH dari berbagai senyawa karbonil, termasuk glukosa. Reduktase aldosa memiliki afinitas rendah (K_m tinggi) terhadap glukosa, dan pada konsentrasi glukosa normal pada pasien non-diabetes. Metabolisme glukosa melalui jalur ini memiliki persentase yang sangat

kecil. Tetapi pada kondisi hiperglikemia, peningkatan glukosa menyebabkan peningkatan konversi enzimatik terhadap sorbitol polialkohol dengan penurunan NADPH. Pada jalur polioliol, NAD⁺ direduksi menjadi NADH. Sorbitol menginduksi stres osmotik, penurunan aktivitas (Na⁺ dan K⁺) ATPase, peningkatan sitosol NADH/NAD⁺ dan penurunan NADPH sitosol. Sorbitol tidak berdifusi dengan mudah melewati membran sel, dan dapat mengakibatkan kerusakan osmotik pada sel mikrovaskuler (Brownlee, 2001).

Oksidasi sorbitol oleh NAD⁺ akan meningkatkan rasio NADH sitosol : NAD⁺, sehingga menghambat aktivitas enzim dehidrogenase gliseraldehida-3-fosfat (GAPDH), dan meningkatkan konsentrasi metilglioksal, prekursor AGEs, dan diasilgliserol (DAG) melalui gliserol-3-fosfat, sehingga mengaktifkan PKC. Aktivasi *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP) oleh hiperglikemia dimediasi oleh peningkatan produksi ROS. NADPH digunakan untuk regenerasi glutation (GSH) yang dapat menyebabkan atau memperburuk stres oksidatif intraseluler (Brownlee, 2001).

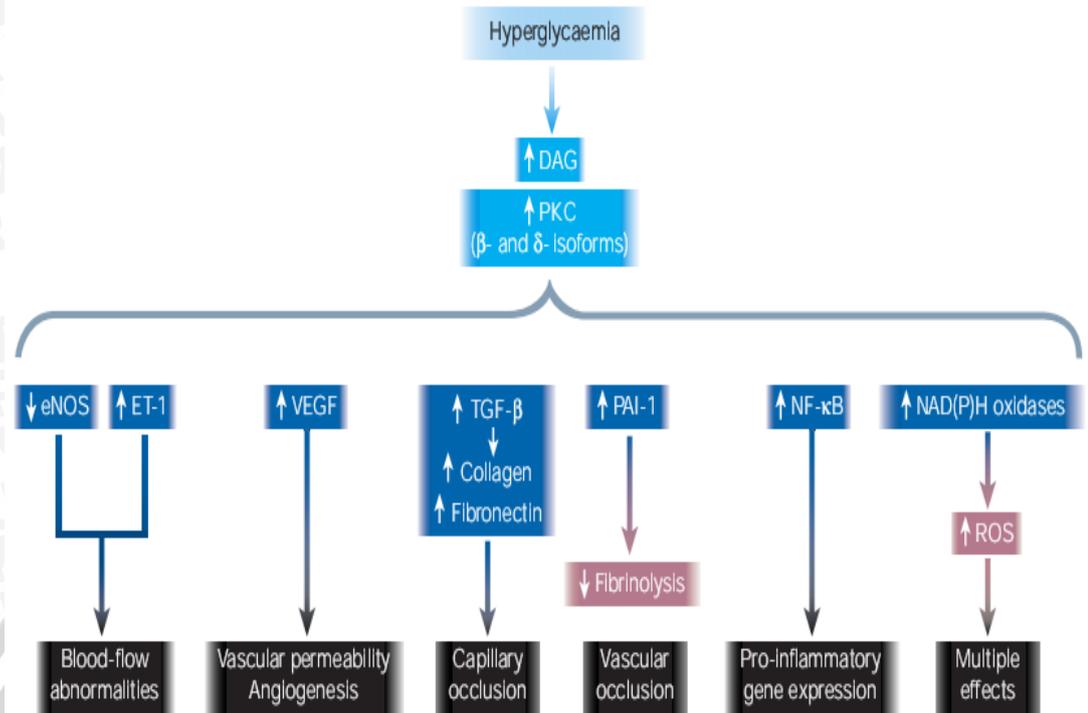


Gambar 2.5. Jalur Polioliol. Reduktase aldosa mengurangi aldehida yang dihasilkan oleh ROS untuk inaktif alkohol, dan glukosa menjadi sorbitol, menggunakan NADPH sebagai kofaktor. Dalam sel-sel dimana aktivitas reduktase aldosa mengurangi glutation (GSH), dan meningkatkan stres oksidatif. Sorbitol dehidrogenase mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa menggunakan NAD⁺ sebagai kofaktor (Brownlee, 2001).

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 intraseluler hormonal, neuronal, dan stimulus faktor pertumbuhan (Mohora *dkk.*, 2007). Protein kinase C terdiri dari sedikitnya sebelas isoform, sembilan diantaranya diaktifkan oleh *lipid second messenger diacylglycerol (DAG)*. Hiperglikemi meningkatkan jumlah DAG pada sel mikrovaskuler, retina, dan glomerulus ginjal melalui peningkatan sintesis *de novo* DAG dari glikolitik dihidroksiaseton fosfat. Peningkatan sintesis *de novo* dari DAG mengaktifkan PKC baik dalam sel-sel vaskular, retina, maupun glomeruli ginjal. β - dan δ - isoform pada PKC secara utama diaktifkan, namun peningkatan isoform PKC lain juga ditemukan seperti PKC α - dan β - pada glomerulus ginjal. Hiperglikemi juga mengaktifkan isoform PKC secara tidak langsung melalui kedua ligasi reseptor AGE dan peningkatan aktivitas jalur poliol yang meningkatkan ROS (Brownlee, 2001).

Aktivasi isoform PKC- β memediasi gangguan aliran darah retina dan ginjal dengan menekan produksi nitrat oksida dan/atau meningkatkan aktivitas endotelin-1. Aktivasi abnormal dari PKC menurunkan produksi nitrit oksida pada glomerulus yang diakibatkan hiperglikemi. Aktivasi PKC juga menghambat ekspresi rangsangan insulin dari messenger RNA untuk sintase nitrit oksida endotel (eNOS). Hiperglikemia meningkatkan aktivitas MAP-kinase endotelin-1 pada sel mesangial glomerulus. Aktivasi PKC karena hiperglikemia juga menginduksi peningkatan VEGF dalam sel otot polos. Selain itu, PKC juga dapat meningkatkan akumulasi protein matriks dengan menginduksi TGF- β 1, fibronektin dan kolagen tipe IV pada sel mesangial glomerulus (Brownlee, 2001).

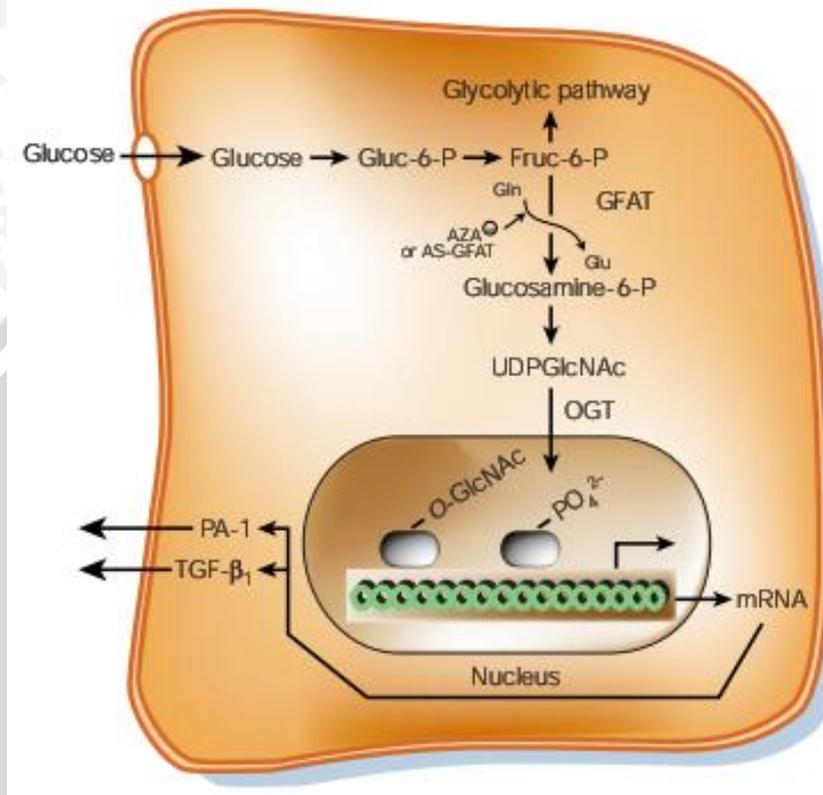


Gambar 2.6. Akibat dari Aktivasi Protein Kinase C (PKC). Hiperglikemia meningkatkan diasilgliserol (DAG), yang mengaktifkan PKC, terutama isoform β - dan δ -. Aktivasi PKC memiliki akibat patogen dengan mempengaruhi ekspresi endotel oksida nitrat sintetase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β) dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), dan dengan mengaktifkan NF- κ B dan NADPH oksidase (Brownlee, 2001).

2.2.4 Peningkatan Jalur Heksoamin

Pada jalur heksosamin, fruktosa-6-fosfat diubah melalui glikolisis menjadi glukosamin-6-fosfat. Enzim yang mengubah glukosa ini ialah amidotransferase fruktosa-6-fosfat (GFAT). Jalur ini menyebabkan peningkatan ekspresi TGF- α , TGF- β 1, dan PAI-1 (Brownlee, 2001). Karena hiperglikemia menginduksi overproduksi dari superoksida yang secara signifikan menghambat aktivitas dehidrogenase gliseraldehida-3-fosfat, penghambatan ini akan mengaktifkan semua jalur hiperglikemik dengan mengalihkan metabolit glikolitik ke jalur sinyal. Selama hiperglikemia, karena kebutuhan nutrisi meningkat, kelebihan glukosa akan didorong masuk ke jalur heksosamin. Produk akhir dari jalur ini adalah UDP-*N-acetylglucosamine* (GlcNAc) yang merupakan substrat untuk glikosilasi terhadap faktor intraseluler termasuk faktor transkripsi. Adanya

faktor ini dapat mempengaruhi ekspresi banyak gen termasuk *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) dan akan meningkatkan keparahan komplikasi diabetes (Rolo dan Carlos, 2006).



Gambar 2.7. Jalur Heksosamin. Fruktosa-6-fosfat (Fruc-6-P) diubah menjadi glukosamin-6-fosfat oleh enzim glutamin: amidotransferase fruktosa-6-fosfat (GFAT). Intraseluler glikosilasi dengan penambahan N-asetilglukosamin (GlcNAc) untuk serin dan treonin dikatalisis oleh enzim O-GlcNAc transferase (OGT). Peningkatan gugus GlcNAc untuk serin dan residu treonin faktor transkripsi seperti SP1, meningkatkan produksi faktor PAI-1 dan TGF- β_1 , AZA, azaserine, AS-GFAT, antisense ke GFAT (Brownlee, 2001).

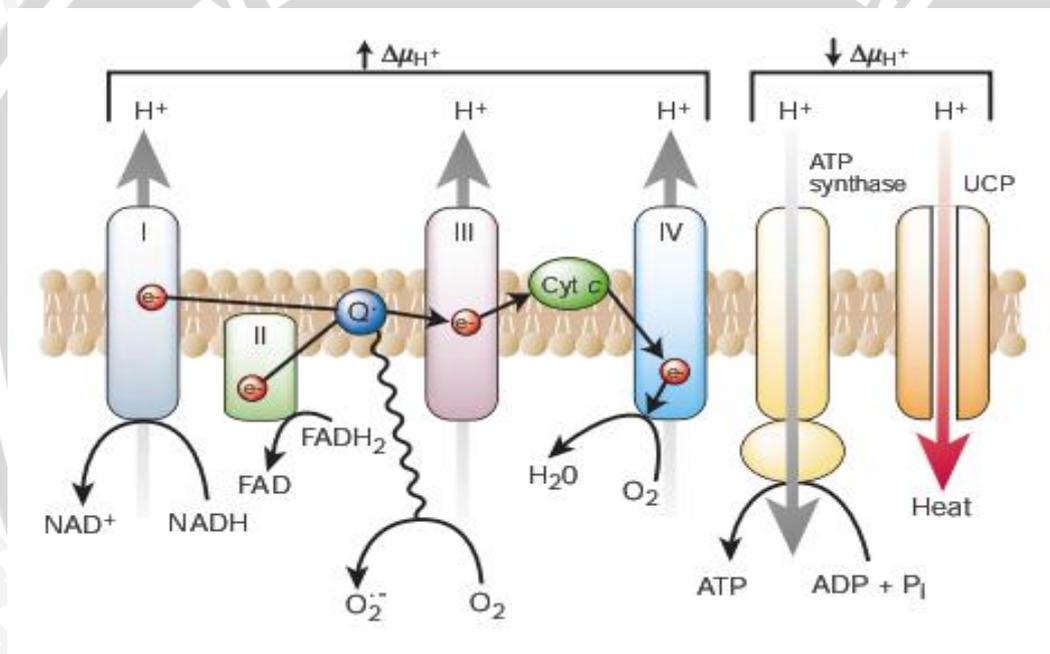
Glukosamin-6-fosfat menghambat aktivitas glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Salah satu dampaknya yaitu menurunkan reduksi NADP^+ menjadi NADPH. Hal ini menyebabkan penurunan rasio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Penurunan rasio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ akan menyebabkan stres oksidatif melalui penurunan regenerasi antioksidan glutation. Selain itu, penurunan avaiabilitas NADPH akan menurunkan aktivitas katalase sehingga konversi H_2O_2 menjadi H_2O terganggu (Mohora *dkk.*, 2007).

2.2.5 Jalur Mitokondria

Mitokondria adalah sumber utama ROS dalam sel sebagai akibat dari transport elektron yang tidak sempurna. Piruvat yang berasal dari glikolisis diangkut ke dalam mitokondria oleh siklus asam trikarboksilat (TCA) untuk menghasilkan NADH. Elektron yang berasal dari oksidasi substrat yang disalurkan melalui operator redoks dari rantai pernafasan (kompleks I, II, III, dan IV) ke aseptor elektron molekul oksigen. Melalui pengurangan empat elektron tersebut, oksigen diubah dalam bentuk air. Faktor utama yang mengatur pembentukan ROS mitokondria dalam keadaan redoks dari rantai pernafasan. Transfer elektron melalui rantai pernafasan mitokondria menghasilkan gradien proton (tegangan). Dalam kondisi normal, banyak energi dari tegangan gradien ini digunakan untuk menghasilkan ATP melalui ATP sintase. Amplitudo dari gradien proton elektrokimia yang dikenal sebagai kontrol pernafasan mengatur tingkat keseluruhan transport elektron dalam rantai pernafasan. Ketika perbedaan potensial elektrokimia yang dihasilkan oleh gradien proton tinggi (seperti kondisi hiperglikemia), superoksida akan menghasilkan transport elektron lanjutan seperti *ubisemiquinone*. Hal ini terjadi karena aktivitas kompleks rantai pernafasan sebagai pompa proton yang diatur oleh gradien transmembran proton (ΔpH) dan potensial membran ($\Delta\psi_{\text{mt}}$) (Rolo dan Carlos, 2006).

Jika sudah cukup tinggi, ΔpH dan $\Delta\psi_{\text{mt}}$ akan menghambat pompa proton. Setiap ROS memiliki perbedaan potensial redoks, dan masing-masing akan merespon secara berbeda terhadap perubahan ΔpH dan $\Delta\psi_{\text{mt}}$. Secara keseluruhan, kebanyakan efektor bioenergi melalui pengaruhnya terhadap ΔpH dan $\Delta\psi_{\text{mt}}$, dapat memodulasi generasi ROS pada mitokondria. Peningkatan hiperglikemia yang diinduksi dalam donor transfer elektron (NADH dan FADH_2) meningkatkan fluks elektron melalui rantai transport elektron mitokondria.

Akibatnya, ada peningkatan rasio ATP/ADP dan hiperpolarisasi dari potensial membran mitokondria. Perbedaan potensial elektrokimia yang tinggi ini dihasilkan oleh gradien proton yang menyebabkan penghambatan sebagian dari transport elektron kompleks III, yang mengakibatkan akumulasi elektron koenzim Q yang akan mendorong pengurangan parsial O_2 untuk menghasilkan radikal bebas anion superoksida. Percepatan penurunan koenzim Q dan peningkatan ROS diyakini menjadi sumber utama terjadinya disfungsi mitokondria yang berhubungan dengan patogenesis terjadinya komplikasi diabetes (Rolo dan Carlos, 2006).



Gambar 2.8. Produksi Superoksida Oleh Rantai Transpor Elektron Mitokondria. Peningkatan hiperglikemia yang diturunkan oleh donor elektron dari siklus TCA (NADH dan $FADH_2$) menghasilkan potensial membran mitokondria yang tinggi ($\Delta\mu H^+$) dengan memompa proton melintasi membran dalam mitokondria. Hal ini menghambat transpor elektron di kompleks III, meningkatkan radikal bebas dari koenzim Q (ubiquinone), yang mengurangi O_2 ke superoksida (Brownlee, 2001).

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 memiliki efek toksik terhadap sel, baik secara langsung maupun melalui degradasi radikal hidroksil yang sangat beracun. Peroksidasi lipid juga dapat bereaksi dengan logam transisi seperti besi atau tembaga untuk membentuk aldehida stabil seperti malondialdehid yang akan merusak membran sel. Peroksidasi radikal dapat menghapus hidrogen dari lipid, menghasilkan hidroperoksida yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Maritim *dkk.*, 2002). Dampak merugikan yang disebabkan peroksidasi lipid diantaranya inaktivasi enzim dan reseptor di membran sel, depolimerisasi polisakarida, reaksi silang (*crosslinking*) dan fragmentasi protein (Goraca *dkk.*, 2009). Peroksidasi lipid dapat terjadi di berbagai jaringan salah satunya adalah ginjal. Peroksidasi lipid berperan penting terhadap diabetes glomerulosklerosis. Berawal dari fase hiperfiltrasi pada ginjal diabetes yang digambarkan dengan albuminuria yang diikuti dengan proteinuria dan pada akhirnya akan menyebabkan glomerulosklerosis serta gagal ginjal (Palsami dan Subramania, 2011).

2.3.1 Proses Peroksidasi Lipid

Radikal bebas didefinisikan sebagai atom atau molekul yang mempunyai elektron tak berpasangan di orbital terluarnya. Elektron tak berpasangan ini sangat reaktif untuk berikatan dengan elektron lainnya. Namun, bila radikal bebas bertemu dengan enzim atau *Polyunsaturated Fatty Acid* (asam lemak tak jenuh rantai panjang) akan terjadi proses peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid ini menghasilkan beberapa produk akhir diantaranya adalah senyawa

malondialdehid (MDA). Jumlah radikal bebas yang berlebih mengakibatkan peningkatan proses peroksidasi lipid sehingga produksi MDA juga meningkat (Yustika *dkk.*, 2013).

Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika radikal bebas bereaksi dengan senyawa asam lemak tak jenuh majemuk (*poly unsaturated fatty acid* atau PUFA) yang disebut juga peroksidasi lipid. Pada umumnya peroksidasi lipid dapat dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu (Wahyuningsih, 2009):

1. **Tahapan inisiasi** yang merupakan tahapan awal pembentukan radikal bebas.
2. **Tahapan propagasi** ialah pemanjangan rantai radikal. Propagasi akan terjadi secara terus-menerus dan akan menghasilkan radikal bebas ($R\bullet$) lainnya yang akan bereaksi dengan senyawa lain
3. **Tahapan terminasi** yang merupakan tahapan akhir pembentukan peroksidasi lipid. Tahap ini ialah bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan antioksidan sehingga potensi propagasinya rendah.

Reaksi radikal bebas dengan PUFA akan menghasilkan lipid bebas ($R\bullet$). Lipid bebas yang bereaksi dengan oksigen akan membentuk radikal peroksi lipid ($ROO\bullet$). Apabila radikal peroksi lipid tersebut bereaksi dengan PUFA lain maka akan membentuk lipid hidroperoksida ($ROOH$) dan lipid bebas yang baru dan reaksi ini berlangsung terus menerus. Hal ini disebabkan adanya lipid bebas baru yang terbentuk sehingga reaksi berlanjut. Faktor perkembangan peroksidasi lipid yaitu pembentukan radikal oksigen bebas, keberadaan substrat lipid, dan aktivitas antioksidan. Reaksi peroksidasi lipid dimulai dari pengambilan sebuah atom hidrogen dari gugus metilena pada PUFA yang dilakukan oleh radikal bebas. Tahap ini merupakan proses pembentukan radikal bebas karbon ($\bullet CH$) yang disebabkan adanya penghilangan satu atom H pada CH_2 . Hal tersebut terjadi karena adanya ikatan rangkap pada asam lemak yang dapat melemahkan ikatan antara atom C dan H yang berdekatan dengan ikatan

rangkap sehingga menyebabkan atom H mudah berikatan dengan radikal bebas (Wahyuningsih, 2009).

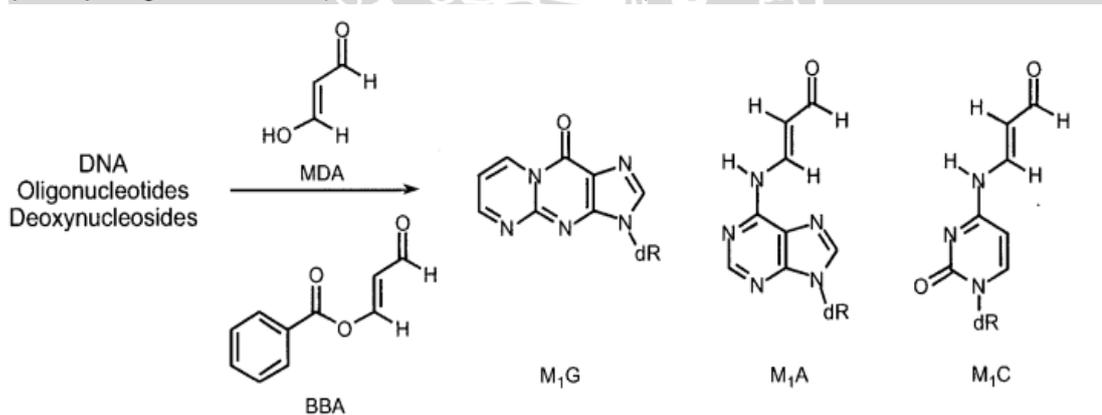
Tahap berikutnya merupakan penstabilan karbon radikal bebas melalui penataan ulang ikatan rangkap, sehingga terbentuk senyawa diena terkonjugasi. Jika diena terkonjugasi ini berikatan dengan O_2 maka akan terbentuk radikal lipid peroksida (ROO^*). Radikal lipid peroksida ini akan memudahkan pengambilan atom hidrogen dari molekul lipid lain. Selanjutnya, radikal peroksida ini bergabung dengan atom H yang lain membentuk Lipid Hidroperoksida dan radikal bebas yang baru. Selain itu, radikal peroksida ini dapat membentuk peroksida siklik yang disebut endoperoksida. Proses ini akan berhenti jika radikal lipid peroksida bereaksi dengan radikal bebas yang lain seperti senyawa antioksidan atau senyawa biologi seperti protein. Berikut tahapan pembentukan radikal bebas (Wahyuningsih, 2009):

- Inisiasi : $RH + OH^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$
- Propagasi : $RH + R^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + RH$
- Terminasi : $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$

Peroksidasi lipid dapat mengganggu membran yang akan menyebabkan perubahan fluiditas dan permeabilitas, penghambatan proses metabolisme, dan perubahan transport ion. Kerusakan mitokondria yang disebabkan oleh peroksidasi lipid dapat menyebabkan generasi ROS lebih lanjut. Selain itu, peroksidasi lipid mendegradasi produk aldehida reaktif, termasuk malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE), dan akrolein. Aldehida akan berikatan dengan protein melalui reaksi dengan kelompok tiol dan mengubah fungsi protein. Aldehida juga dapat bereaksi dengan kelompok amino dari guanosisin untuk membentuk senyawa siklik. Peroksidasi lipid dan produk-produk aldehida dapat menyebabkan penipisan GSH melalui detoksifikasi oleh GSH-Px dan glutathione S-transferase (Adibhatla dan Hatcher, 2006).

2.3.2 Efek Malondialdehid dalam Tubuh

Malondialdehid (MDA) merupakan produk dari oksidasi lipid dan sebagai produk dari sintesis tromboksan dan prostaglandin. Konsentrasi MDA meningkat pada kondisi diabetes mellitus dan ditemukan pada plak aterosklerosis pada pasien diabetes. Toksisitas MDA muncul dari reaktivitas tinggi, khususnya terhadap protein dan DNA (Slatter *dkk.*, 2000). MDA merupakan salah satu produk lipid peroksida yang terbentuk setelah putusya rantai karbon asam lemak tak jenuh (Routledge *dkk.*, 1993). MDA merupakan kontributor terhadap kerusakan DNA dan mutasi yang diproduksi secara endogen melalui peroksidasi lipid dan biosintesis prostaglandin. Replikasi MDA mengubah *single-stranded* genom M13 pada *Escherechia coli* yang menyebabkan mutasi G→T, A→G, dan C→T. Ketiga jenis mutasi ini menunjukkan situs utama modifikasi DNA oleh MDA secara *in vitro*. Hasil yang paling banyak dari MDA ialah M₁G₁ yang dibentuk melalui reaksi dengan guanin pada jaringan manusia (Niedernhofer *dkk.*, 2003).



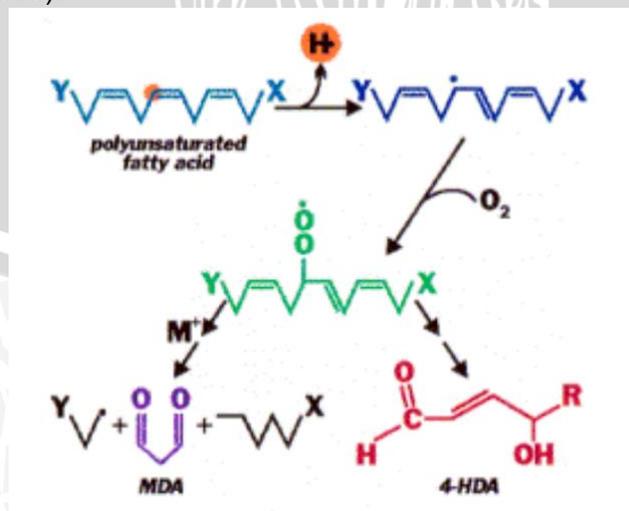
Gambar 2.9. Struktur hasil pembentukan dari reaksi MDA dengan DNA (Niedernhofer *dkk.*, 2003).

2.3.3 Pembentukan Malondialdehid dalam Tubuh

Oksidasi dari lipid kompleks secara *in vivo* merupakan penyebab terbesar dari *oxygen-derived free radicals* (OFR) seperti OH[•]. Radikal ini dibentuk melalui lipoksigenase sebagai respon untuk kerusakan jaringan, biasanya dari

H₂O₂ atau radikal metalion kompleks. Sasaran utama dari perusakan spesies adalah asam lemak rantai panjang tak jenuh terhadap fosfolipid seluler yang sangat rentan terhadap serangan karena susunan ikatan ganda dan tunggal. Lipid peroksida yang dihasilkan sering terurai menjadi radikal bebas yang bereaksi dengan sebagian besar molekul biologis termasuk protein dan lipid. Dekomposisi lebih lanjut dari peroksida lipid ini menghasilkan aldehida yang toksik, khususnya 4-hidroksinonerial (terutama dari asam linoleat), malondialdehid (terutama dari asam arakidonat) dan akrolein. Hepar mengeliminasi MDA dari sirkulasi melalui aksi *aldehyde dehydrogenase* dan tiokinase sehingga MDA memiliki waktu paruh sekitar 2 jam pada tikus, tetapi beberapa (10 ± 30%) harus mengikat semi-permanen untuk protein karena tidak dihilangkan dalam waktu 12 jam (Slatter *dkk.*, 2000).

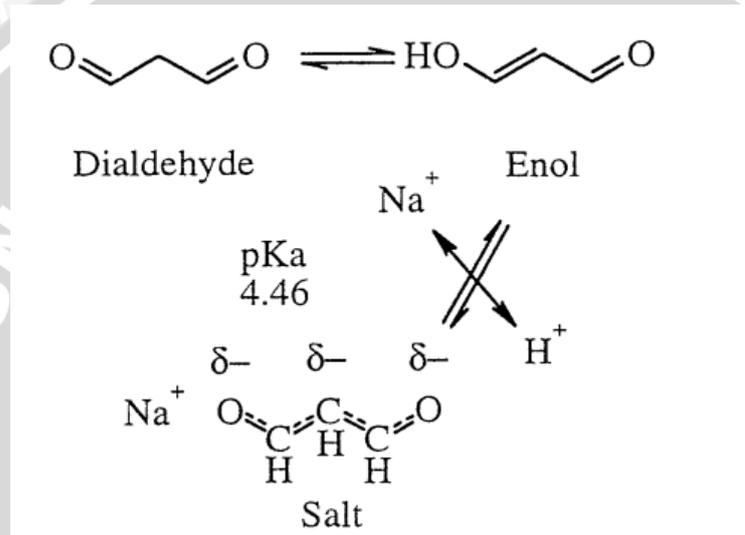
Mekanisme pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang oleh gugus radikal hidroksil (OH), sehingga lipid bersifat radikal. Kemudian radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O₂) membentuk radikal peroksil (OO), yang selanjutnya menghasilkan MDA (dengan ikatan tak jenuh lebih dari tiga) (Yustika *dkk.*, 2013).



Gambar 2.10. Mekanisme Pembentukan MDA (Yustika *dkk.*, 2013).

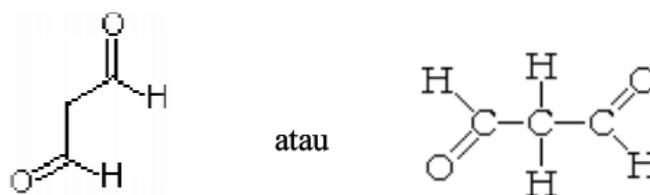
2.3.4 Struktur Kimia Malondialdehid

Malondialdehid adalah senyawa kristal higroskopis putih dan biasanya diperoleh dari hidrolisis asam 1,1,3,3-tetraethoxypropane. Berlabel radioaktif C-MDA dapat dibuat dari 1,3-propanadiol menggunakan alkohol dehidrogenase. Hal ini lebih stabil dalam plasma karena enolises mudah kehilangan proton pada pH netral untuk membentuk garam. Oleh karena itu, kereaktifannya sangat tergantung pada pH.



Gambar 2.11. Enol dan garam membentuk malondialdehid (Slatter *dkk.*, 2000).

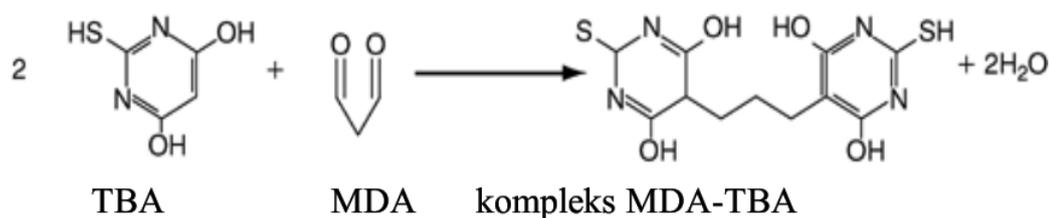
MDA disebut juga *bis* (dimetil asetal) merupakan senyawa aldehyd dengan tiga atom karbon yang mengandung gugus karbonil pada atom karbon nomor satu dan tiga. MDA memiliki berat molekul 72,07 dan tidak stabil pada pH asam. MDA akan melebur pada suhu 72-74 °C (IARC, 1987). Struktur kimia MDA dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Perlitasari, 2010).



Gambar 2.12. Struktur kimia Malondialdehid (Perlitasari, 2010).

2.3.5 Penentuan Kadar Malondialdehid

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar MDA plasma, salah satunya TBA (*Thiobarbituric Acid*) reactivity test yang dapat dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam. Hasilnya adalah pigmen berwarna merah yang dapat diukur pada panjang gelombang 532 nm. Jumlah MDA yang terdeteksi menggambarkan banyaknya peroksidasi lipid yang terjadi (Josephy, 1997). Kadar MDA plasma normal umumnya berkisar antara $0,89 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$ pada analisis langsung, dan $0,88 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$ dengan menggunakan HPLC (Badcock, 1997).



Gambar 2.13. Reaksi pembentukan senyawa kompleks MDA-TBA (Perlitasari, 2010).

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 Ginjal

Stres oksidatif diketahui memiliki peran penting terhadap perkembangan dan progresifitas diabetes nefropati. Kadar glukosa darah yang tinggi menginduksi *reactive oxygen species* (ROS) secara langsung melalui metabolisme glukosa dan autooksidasi, serta secara tidak langsung melalui perubahan *advanced glycation end product* (AGEs) dan ikatan reseptornya. ROS distimulasi oleh peningkatan glukosa darah dan meregulasi pembentukan *growth factor-β1*, aktivator penghambat-1 plasminogen, dan protein matriks ekstraseluler (ECM) oleh sel mesangial glomerular, sehingga mengarah pada *mesangial expansion*. ROS juga diaktivasi oleh signaling molekul seperti *protein kinase C* dan *mitogen-activated protein kinases* serta faktor transkripsi (nuklear faktor-κB, aktivator protein-1, dan protein spesifisitas I) yang mengarah pada transkripsi dari gen penyandi sitokin, *growth faktor*, dan ECM protein. Antioksidan dapat menghambat aktivasi sel mesangial melalui glukosa darah dan memperbaiki diabetes nefropati (Hunjoo dan Hi Bahl, 2001). Kadar glukosa darah yang tinggi juga meningkatkan produksi hidrogen peroksidasi secara langsung pada sel mesangial dan lipid peroksidasi pada glomerulus (Cam *dkk.*, 2003).

Aktivitas transport glukosa merupakan modulator penting dari pembentukan matriks ekstraseluler oleh sel mesangial. Transporter glukosa-1 (GLUT-1) mengatur masuknya glukosa kedalam sel-sel ginjal. Glukosa dan metabolitnya kemudian mengaktifkan jalur metabolisme, dan jalur ini berkontribusi terhadap ekspansi sel mesangial dan produksi sel matriks mesangial, apoptosis sel mesangial dan perubahan struktural sel mesangial. Hal ini diakibatkan karena tingginya konsentrasi glukosa pada sel mesangial dan overekspresi dari GLUT-1. Melalui jalur biokimia, hiperglikemia menyebabkan kerusakan jaringan seperti glikosilasi nonenzimatik yang menyebabkan peningkatan AGE, aktivasi protein kinase C (PKC), dan percepatan dari jalur

poliol. Stres oksidatif menjadi penyebab utama terjadinya nefropati dengan mengaktifkan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti VEGF, TGF- β , Interleukin 1 (IL-1), IL-6, dan IL-8, serta TNF- α yang pada akhirnya akan menyebabkan peningkatan permeabilitas albumin ginjal dan akumulasi matriks ekstraseluler, sehingga meningkatkan proteinuria, glomerulosklerosis, dan fibrosis pada ginjal (Satirapoj, 2010).

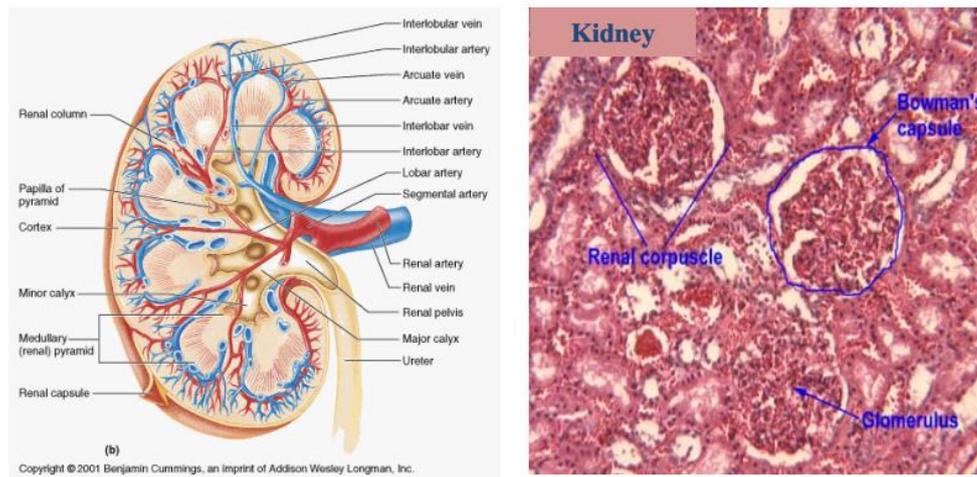
Stres oksidatif meningkat pada pasien diabetes dan akan meningkatkan produksi ROS melalui transport elektron mitokondria. ROS memediasi efek biologis seperti peroksidasi lipid membran sel, oksidasi protein, vasokonstriksi ginjal dan kerusakan DNA. Selain kemampuannya yang secara langsung menimbulkan kerusakan makromolekul, ROS juga berfungsi sebagai signaling molekul untuk meningkatkan aktivitas faktor nuklear kappa-B dan interaksi dengan tiga jalur metabolisme yang menyebabkan kerusakan sel. Konsentrasi penanda kerusakan DNA yang disebabkan ROS lebih tinggi pada pasien dengan nefropati berat. Analisis histologi pada spesimen ginjal dengan diabetes menunjukkan adanya perluasan matriks mesangial dan lesi nodular (Satirapoj, 2010).

ROS dalam jumlah yang kecil terbentuk sebagai hasil dari pembawa elektron yang bereaksi langsung dengan oksigen. Namun pada diabetes, elektron pembawa menjadi lebih reaktif sehingga meningkatkan produksi ROS. Kontributor lain terhadap pembentukan ROS pada nefropati adalah superoksida yang memproduksi enzim NADPH oksidase (NOx), dan xantin oksidase yang mengkatalisis oksidasi hipoksantin (terjadinya isoform NOx yang berbeda pada sel yang berbeda). *Nitric oxide synthase* menghasilkan radikal bebas yang bertindak sebagai protektor, tetapi dalam keadaan oksidatif dapat dikonversi menjadi spesies nitrogen reaktif (RNS) termasuk peroksinitrit (Wagener *dkk.*, 2009).

2.4.1 Anatomi dan Histologi Ginjal

Ginjal adalah organ yang menyaring plasma dan unsur-unsur plasma dari darah, dan kemudian secara selektif menyerap kembali air dan unsur-unsur berguna dari filtrat yang akhirnya mengeluarkan kelebihan dan produk buangan plasma. Hampir semua jenis hewan, ginjalnya memiliki bentuk seperti kacang, kecuali ginjal sapi dengan lobul-lobulnya, serta kuda dengan ginjal kanan menyerupai bentuk jantung. Ginjal terletak pada bagian dorsal dari rongga abdominal pada tiap sisi dari aorta dan vena kava, tepat pada posisi ventral terhadap beberapa vertebrae lumbal yang pertama. Ginjal dikatakan retroperitoneal, artinya terletak di luar rongga peritoneal. Ginjal kanan biasanya terletak lebih kranial dari pada yang kiri (Frandsen, 1992).

Secara makroskopis, sebuah ginjal dengan potongan memanjang memberi gambaran dua daerah yang cukup jelas. Daerah perifer yang beraspek gelap disebut korteks, dan selebihnya yang agak cerah disebut medula, berbentuk piramid terbalik. Secara mikroskopis, korteks yang gelap tampak diselang dengan interval tertentu oleh jaringan medula yang berwarna agak cerah, disebut garis medula (*medullary rays*). Substansi korteks di sekitar garis medula disebut labirin korteks. Medula tampak lebih cerah dan tampak adanya jalur-jalur yang disebabkan oleh buluh-buluh kemih yang lurus dan pembuluh darahnya. Secara histologi ginjal terdiri atas tiga unsur utama, yaitu (1) Glomerulus, yakni suatu gelung pembuluh darah kapiler yang masuk melalui arteri aferen, (2) Tubuli sebagai parenkim yang bersama glomerulus membentuk nefron, suatu unit fungsional terkecil dari ginjal, dan (3) Interstisium berikut pembuluh-pembuluh darah, limfe dan saraf (Juhryyah, 2008). Struktur normal ginjal dapat dilihat pada gambar 2.14 berikut.



Gambar 2.14. Struktur ginjal normal (Juhryyah, 2008).

2.4.2 Efek Stres Oksidatif pada Histologi Ginjal

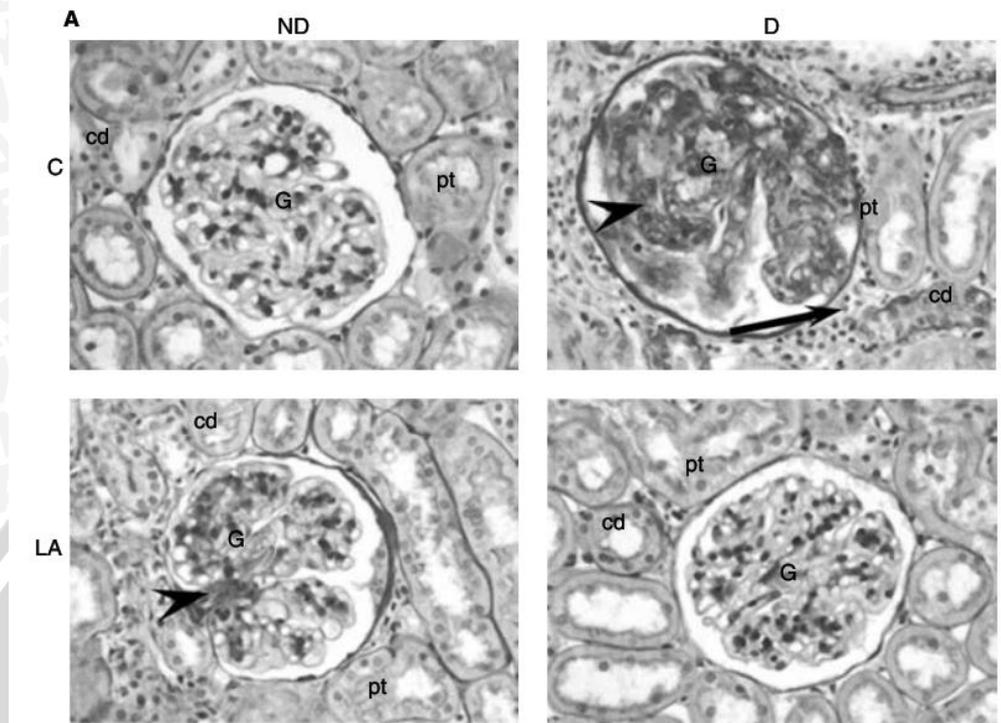
Stres oksidatif yang disebabkan oleh hiperglikemia berperan dalam patofisiologi diabetes nefropati. Peningkatan kadar glukosa intraseluler sebagai akibat dari peningkatan penyerapan glukosa ke ginjal, menyebabkan pembentukan produk akhir glikasi (AGE). AGE akan merangsang produksi radikal bebas yang akan menyebabkan stres oksidatif. Pada diabetes nefropati, ROS dihasilkan melalui peningkatan glukosa yang akan meningkatkan jalur polioliol, peningkatan AGE, dan peningkatan protein kinase C. Hal tersebut akan mengarah pada kerusakan jaringan ginjal melalui peningkatan sintesis protein ECM dan peningkatan ekspresi dari mediator inflamasi, sehingga akan mengarah pada glomerulosklerosis dan fibrosis tubulointersisil pada ginjal (Bhatti *dkk.*, 2005).

Hiperglikemia pada diabetes mellitus tipe 1 akan mempengaruhi histologi ginjal terutama glomerulus dengan ditandai penebalan membran basal glomerulus (GBM), dan ekspansi mesangial. Penebalan GBM ini biasanya terdeteksi pertama kali pada onset 1,5 sampai 2,5 tahun diabetes. Penebalan GBM ini menunjukkan adanya gangguan pada glomerulus. Ekspansi mesangial

terjadi karena adanya peningkatan pada matriks mesangial yang kemudian akan menyebabkan peningkatan komponen matriks mesangium. Ekspansi mesangial ini dapat dideteksi pada 5-7 tahun setelah onset diabetes. Penebalan GBM ini dapat terus berkembang dari waktu ke waktu. Ekspansi mesangial memiliki hubungan yang lebih asimptotik terhadap durasi diabetes melitus tipe 1. Terjadinya insufisiensi ginjal juga ditandai dengan peningkatan ekspansi mesangial dan peningkatan penebalan GBM. Difus ekspansi mesangial biasanya disebut juga sebagai difus diabetes glomerulosklerosis, dan dikaitkan dengan lesi nodular dari daerah ekspansi mesangial yang membentuk zona urat saraf mesangial yang besar dan bulat dengan palisading inti mesangial sekitar pinggiran nodul. Ekspansi mesangial dan penebalan GBM akan menyebabkan akumulasi protein matriks ekstraseluler (ECM), dengan peningkatan deposisi kolagen dari komponen ECM jenis IV dan VI, laminin dan fibronektin (Fioretto dan Michael, 2007).

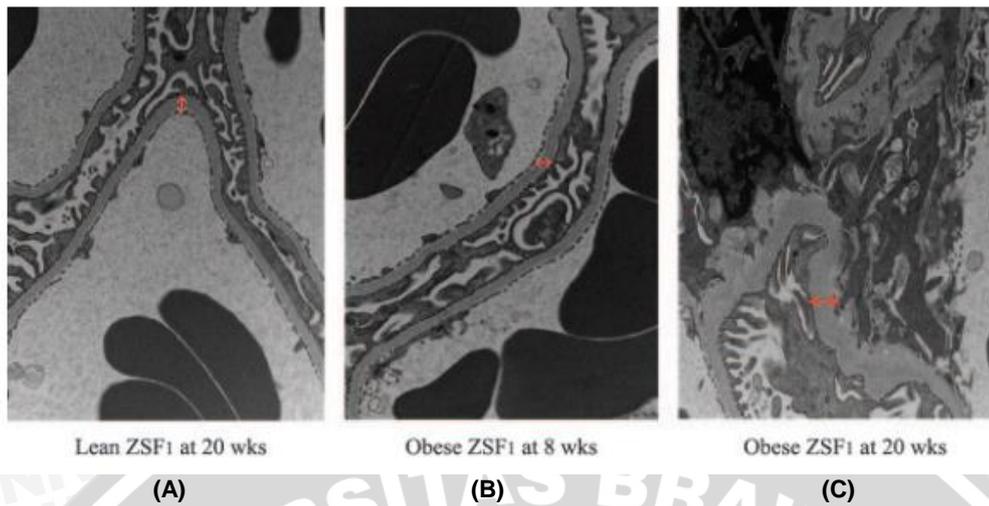
Peningkatan pembentukan AGE pada hiperglikemia merupakan salah satu penyebab disfungsi endotel pada diabetes. Pengikatan AGE dengan reseptornya dapat meningkatkan stres oksidatif dan menginduksi aktivasi sel endotel (Kathryn dkk., 2002). Disfungsi endotel ini dapat menyebabkan albuminuria secara langsung dengan meningkatkan tekanan glomerulus dan permeabilitas membran basa glomerulus. Secara tidak langsung, disfungsi edotel ini mempengaruhi sel mesangial dan fungsi podosit (seperti mekanisme inflamasi) (Stehouwer, 2004).

Penelitian Bhatti dkk. (2005), menunjukkan gambaran histologi ginjal pada tikus diabetes dan nondiabetes terhadap efek terapi asam alfa lipoat sebagai antioksidan dan prooksidan. DHLA juga memiliki efek prooksidan melalui kemampuannya untuk menurunkan besi dan meningkatkan radikal reaktif sulfur yang dapat menyebabkan kerusakan protein seperti *alpha 1-antiproteinase*.

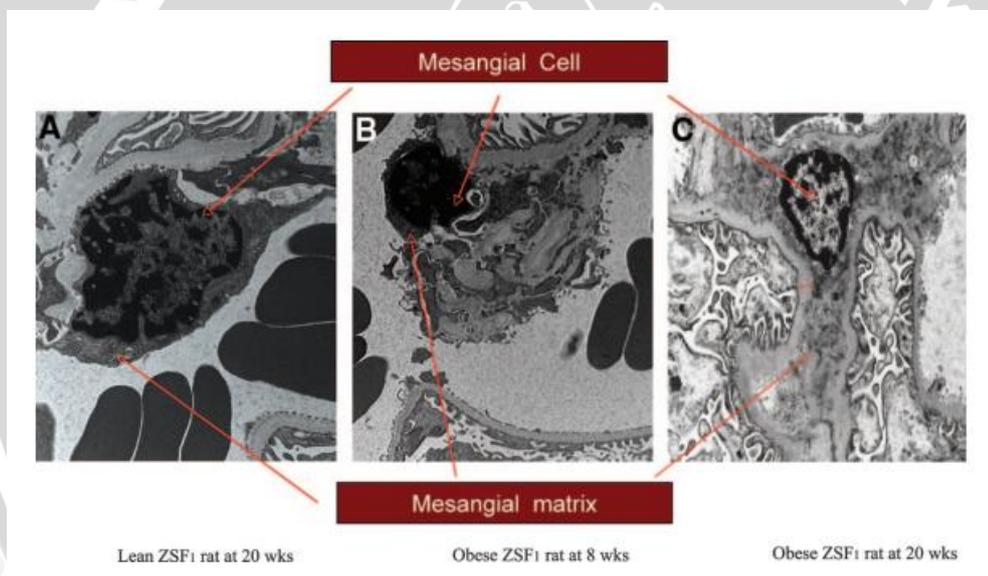


Gambar 2.15. Periodic acid-Schiff (PAS). (A) bagian korteks ginjal pada non-diabetes (ND) dan diabetes (D) yang diterapi dengan ALA, PAS tampak bernoda. Glomerulosklerosis (G) dengan penebalan membran basa glomerulus dari tubulus proksimal (pt), ekspansi mesangial (anak panah), dan infiltrat inflamasi (panah) (Bhatti *dkk.*, 2005).

Pada penelitian Prabhakar *dkk.* (2007), menunjukkan gambaran histologi ginjal pada tikus **ZSF₁** jantan yang mengalami hiperglikemia dan obesitas dengan usia 20 minggu. Tikus ini mendapat terapi ALA dan insulin untuk menurunkan stres oksidatif dan proteinuria. Histologi ginjal menunjukkan perubahan yang konsisten pada diabetes nefropati berupa penebalan membran basa glomerular, dan ekspansi mesangial. Perubahan histologi ginjal dapat dilihat pada gambar 2.16 dan 2.17.



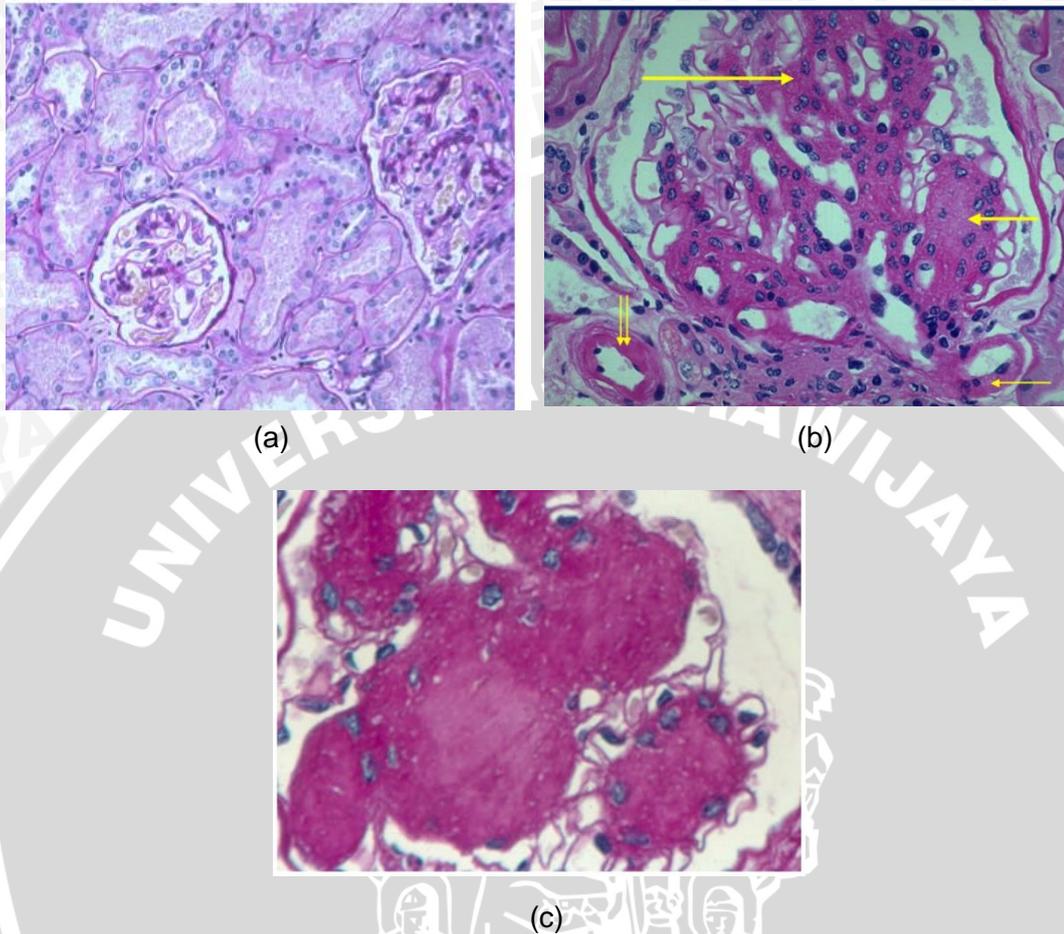
Gambar 2.16. Mikroskopis elektron ginjal dari tikus ZSF₁. (A) GBM pada tikus ZSF₁ yang kurus berusia 20 minggu. (B) GBM pada tikus ZSF₁ obesitas usia 8 minggu. (C) GBM pada tikus ZSF₁ obesitas usia 20 minggu. GBM pada (A) dan (B) berukuran 2 kali lebih kecil dari GBM (C). (lihat panah merah) (Prabhakar *dkk.*, 2007).



Gambar 2.17. Elektron mikroskopik ginjal dari tikus ZSF₁. (A) ginjal pada tikus kontrol ZSF₁ kurus usia 20 minggu menunjukkan sel mesangial dan matriks. (B) tikus ZSF₁ obesitas usia 8 minggu. (C) tikus ZSF₁ obesitas usia 20 minggu (Prabhakar *dkk.*, 2007).

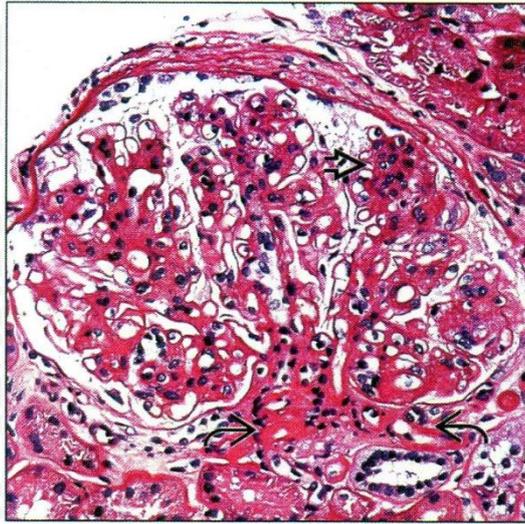
Manifestasi klinis diabetes nefropati ialah proteinuria, peningkatan tekanan darah, dan peningkatan laju filtrasi glomerulus. Lesi ginjal yang mendasari disfungsi ginjal berbeda pada diabetes mellitus tipe 1 dan tipe 2. Pada diabetes mellitus tipe 1, terjadi lesi tubular, interstitial dan arteriol pada ginjal, serta perubahan struktur pada glomerulus terutama tingkat ekspansi mesangial

(Fioretto dan Michael, 2007). Gambar 2.18 menunjukkan perubahan struktur pada glomerulus.

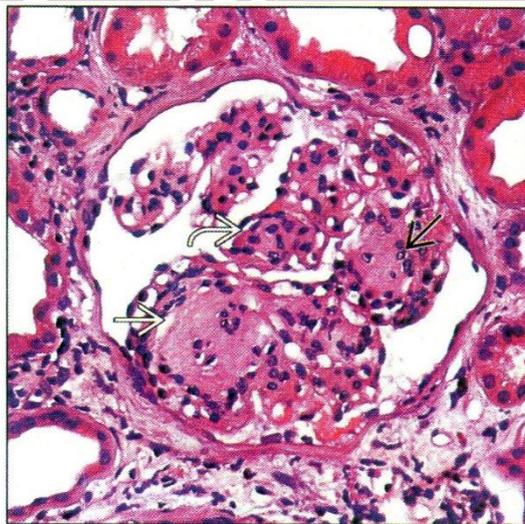


Gambar 2.18. Histologi ginjal pada diabetes nefropati. (a) struktur glomerulus normal. (b) glomerulus pada diabetes melitus tipe 1 dengan *diffuse* (panah tebal panjang) dan nodular ekspansi mesangial (panah tebal pendek), arteriol hyalinosis aferen (panah tipis ganda) dan eferen (panah tipis tunggal). (c) glomerulus pada diabetes melitus tipe 1 dengan lesi nodular, perhatikan inti di pinggiran nodul, akumulasi matriks di pusat, dan pembatasan kapiler glomerulus sekitarnya (Fioretto dan Michael, 2007).

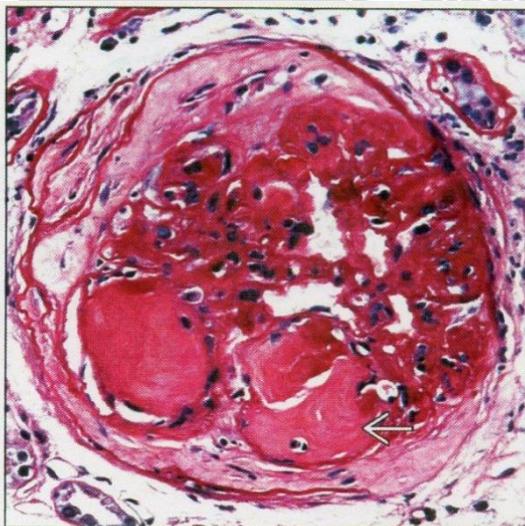
Gambaran histologi ginjal pada kondisi diabetes nefropati juga dapat dilihat pada gambar 2.19, 2.20, dan 2.21 berikut ini.



Gambar 2.19. Karakteristik Diabetes Nefropati. Pembesaran glomerulus dengan difusi mesangial sklerosis dan proliferasi moderat ➡. Tampak adanya insudasi pada hialin arteriolar. Seperti di antara limbic afferen dan efferen ➡ (Colvin dkk., 2011).



Gambar 2.20. Karakteristik Diabetes Nefropati. Nodul *Classic Kimmelstiel-Wilson (KW)* ➡ pada hasil biopsi dari pasien dengan DM jangka waktu panjang menunjukkan adanya paucicellular pusat dengan pemanjangan perifer nukleus mesangial ➡ dan cincin kapiler. Pemfokusan pada hiperselular mesangial seperti adanya prekursor lesi ➡ (Colvin dkk., 2011).



Gambar 2.21. Karakteristik Diabetes Nefropati. Adanya nodul pada bagian aseluler, dengan penurunan podosit dan endotel, serta sel mesangial. Laminasi yang samar merupakan kejelasan pada nodul, akibat episode kerusakan yang berulang ➡ (Colvin dkk., 2011).

2.5 Asam Alfa Lipoat

ALA telah dilaporkan memiliki efek menguntungkan di banyak negara dengan penyakit seperti diabetes, *multiple sclerosis*, dan demensia. ALA memiliki potensi dalam mengobati berbagai aspek patologi diabetes. Pada DM tipe 1, terjadi kerusakan sel beta yang menyebabkan penurunan sekresi insulin. Sedangkan pada DM tipe 2, terjadi resistensi insulin dari jaringan perifer. Diabetes mellitus sangat terkait dengan peningkatan stres oksidatif yang dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas atau berkurangnya pertahanan antioksidan. Stres oksidatif memainkan peran penting terhadap etiologi terjadinya komplikasi pada diabetes. Banyak jalur biokimia (misalnya glikasi protein, jalur poliol, aktivasi protein kinase C, autoksidasi glukosa) yang berhubungan dengan hiperglikemia dan dapat mengakibatkan peningkatan reaktif oksigen spesies (ROS). Stres oksidatif tidak hanya terkait dengan komplikasi diabetes, tetapi juga dikaitkan dengan resistensi insulin. ALA memiliki potensi pencegahan stres oksidatif pada diabetes baik tipe 1 maupun tipe 2. Pada hewan percobaan model diabetes mellitus tipe 1, pemberian intraperitoneal dari ALA (10 mg / kg berat badan) selama 10 hari mengakibatkan penurunan 50% pada tikus diabetes yang diinduksi dengan siklofosamid, efek yang dihasilkan ialah penekanan pelepasan *nitric oxide* (NO) oleh makrofag (Singh dan Ishwarlal, 2008).

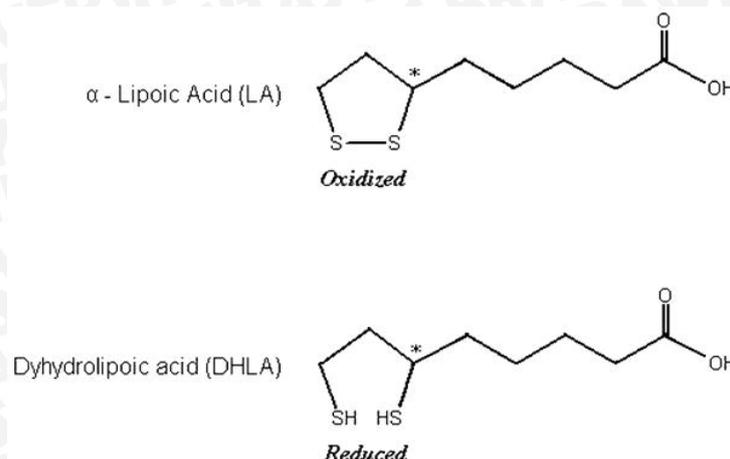
2.5.1 Sumber Asam Alfa Lipoat

Asam alfa lipoat (ALA) pertama kali diisolasi dari hati sapi pada tahun 1950. ALA adalah senyawa alami yang disintesis dalam jumlah kecil oleh tanaman dan hewan, termasuk manusia. Tubuh mensintesis ALA secara kovalen yang terikat dengan protein tertentu, dan berfungsi sebagai kofaktor untuk enzim kompleks dehidrogenase di mitokondria. ALA awalnya termasuk dalam vitamin B

kompleks. Namun saat ini ALA tidak dianggap sebagai vitamin. R-LA terjadi secara alami dalam makanan yang terikat kovalen dengan lisin pada protein (*lipollysine*). Konsentrasi tinggi ALA dapat ditemukan pada jaringan hewan dengan aktivitas metabolik yang luas seperti jantung, hati, dan ginjal. Sumber ALA mulai dari tertinggi hingga terendah adalah bayam, brokoli, tomat, kacang polong, kubis, dan bekatul (Singh dan Ishwarlal, 2008).

2.5.2 Struktur Kimia Asam Alfa Lipoat

Asam alfa lipoat terdiri dari dua kelompok *tiol* yang dapat teroksidasi. Sama dengan antioksidan glutathion tiol, ALA merupakan bagian dari sepasang redoks yang mengalami reaksi reduksi membentuk asam dihydrolipoic (DHLA). ALA berperan sebagai antioksidan dalam bentuk oksidasi dan reduksi. ALA dikenal juga sebagai asam tioktat dengan nama kimia 6,8-dithio-asam oktanoat, delapan karbon disulfida yang mengandung pusat kiral tunggal. ALA juga berisi karbon asimetrik, sehingga membentuk dua isomer optik (R-LA dan S-LA). Hanya isomer R-LA yang disintesis dan terikat dengan protein (Singh dan Ishwarlal, 2008). 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). ALA direduksi secara *in vivo* menjadi bentuk dithiolnya (DHLA) yang juga memiliki aktivitas biologis (Singh dan Ishwarlal, 2008).



Gambar 2.22. Struktur ALA dalam bentuk oksidasi dan reduksi (singh dan ishwarlal, 2008).

2.5.3 Aktivitas Antioksidan Asam Alfa Lipoat

Asam alfa lipoat memiliki efek antioksidan dalam mengatasi ROS dengan bertindak sebagai enzim kofaktor yang penting untuk bioenergetik mitokondria. ALA menunjukkan efek sebagai antihiperglikemi, memperbaiki resistensi insulin, menginduksi apoptosis sel kanker, dan efek antiobesitas melalui regulasi terhadap *AMP-activated protein kinase* pada hipotalamik. Secara klinik, ALA digunakan sebagai terapi untuk diabetes. ALA diberikan sebagai antiinflamasi dengan menghambat aktivasi faktor nuklear κB (NF- κB), dan juga dapat menurunkan ekspresi adesi molekul di sel endotel (Kang *dkk.*, 2009).

ALA (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, LA) merupakan antioksidan alami dan kofaktor untuk *dehidrogenase α -ketoacid* mitokondria, dan bekerja sebagai regulator terhadap metabolisme glukosa. Beberapa fakta menyatakan bahwa suplemen ALA bermanfaat untuk diabetes tipe 1 dan tipe 2, serta untuk komplikasi diabetes pada manusia dan hewan (Xianwen *dkk.*, 2011). 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).

2.5.3.1. Aktivitas Menangkap Oksigen Reaktif dan Nitrogen Spesies

ROS dan *reaktive nitrogen species* (RNS) mengandung reaktif tertinggi yang berpotensi menyebabkan kerusakan DNA, protein, dan lipid pada membran sel. Pada umumnya, ALA sebagai antioksidan merupakan senyawa yang dapat larut dalam air dan membran lipid atau disebut juga bahwa ALA merupakan senyawa hidrofilik dan hidrofobik. ALA memiliki aksi antioksidan yang bagus pada sitosol sebagai pada membran plasma (media cair dan lemak pada sel), pada serum dan lipoprotein (media cair dan lemak pada darah) seperti vitamin C (hidrofilik) dan vitamin D (hidrofobik). Konsentrasi jaringan tertinggi terhadap ALA mungkin dicapai dengan pemberian suplemen oral setidaknya 10 kali lebih rendah dibandingkan dengan antioksidan intraseluler lainnya, seperti vitamin C dan glutathione karena tingkat *clearance* yang cepat. Sebelumnya, pada penelitian melaporkan bahwa suplemen ALA (600 mg/hari selama 2 bulan) pada sukarelawan sehat secara signifikan meningkatkan waktu lag LDL dalam pembentukan peroksidasi lipid, penurunan kadar F2-isoprostan urin, dan tingkat karbonil plasma setelah oksidasi AAPH (Singh dan Ishwarlal, 2008).

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 glutathione (Wollin dan Jones, 2003). Jenis-jenis ROS yang dapat ditangkap oleh ALA maupun DHLA dapat dilihat dalam tabel 2.1 berikut.

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

Oksidan	Asam Alfa lipoat	Asam Dihidrolipoat
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

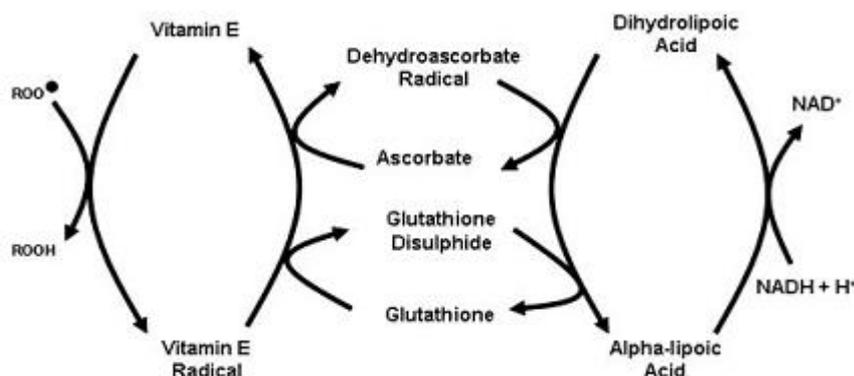
2.5.3.2 Khelatasi logam

Reduksi aktif ion logam seperti besi dan tembaga bebas, dapat menyebabkan stres oksidatif dengan mengkatalisis reaksi yang menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif. Senyawa pengkelat dapat mengikat ion logam bebas dengan cara mencegah ion logam bebas menghasilkan radikal bebas. ALA dapat menghambat kerusakan jaringan yang disebabkan karena oksidatif besi dan dapat mencegah kelebihan zat besi serta akumulasi tembaga pada hewan model (Singh dan Ishwarlal, 2008).

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 (Golbidi dkk., 2011).

2.5.3.3 Regenerasi Antioksidan Lain

Ketika antioksidan menangkap radikal bebas, maka antioksidan akan teroksidasi sendiri dan tidak mampu menangkap ROS lagi atau RNS sampai habis. DHLA adalah senyawa yang memiliki kemampuan untuk mengurangi bentuk teroksidasi dari beberapa antioksidan lain, termasuk vitamin C dan glutathion. Secara umum, DHLA memiliki aktivitas antioksidan yang lebih poten. DHLA dapat meregenerasi vitamin C dan vitamin E dari bentuk teroksidasinya. Meskipun glutathion tereduksi dua kali oleh reaktivitas kimia pada kelompok tiolnya, DHLA lebih poten dari pada glutathion dalam meregenerasi vitamin C. DHLA juga dapat mengurangi secara langsung atau tidak langsung, dengan mengurangi bentuk teroksidasi dari alfa-tokoferol (*alpha-tokoferil radikal*) vitamin C (*dehydroascorbate*), yang mampu mengurangi radikal alpha-tokoferil. Koenzime Q10 merupakan komponen penting dari rantai transpor elektron mitokondria yang juga memiliki aktivitas antioksidan. DHLA juga dapat mengurangi bentuk teroksidasi dari koenzim Q10, yang juga dapat mengurangi radikal alpha-tokoferil. Dengan demikian, ALA juga memainkan peran penting dalam sinergisme antioksidan yang digambarkan sebagai "jaringan antioksidan" dalam tubuh. Hal ini secara langsung mendaur ulang dan memperpanjang rentang hidup metabolisme vitamin C, glutathion, dan koenzim Q10, dan secara tidak langsung memperbaiki vitamin E. Dari hasil penelitian, ALA juga dapat meningkatkan sintesis glutathion pada hewan dengan meningkatkan ekspresi *gamma-glutamylcysteine ligase*, mengurangi sintesis enzim glutathion, dan dengan meningkatkan ambilan sistein, asam amino yang dibutuhkan untuk sintesis glutathion (Singh dan Ishwarlal, 2008). Aktivitas regenerasi antioksidan oleh DHLA pada gambar 2.23 berikut.



Gambar 2.23. Aktivitas Regenerasi DHLA. Regenerasi antioksidan endogen oleh *dihydroliipoic 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 potensi antioksidan kembali aktif (Wollin dan Jones, 2003).

2.5.3.4 Insulin Signaling dan Pemanfaatan Glukosa

Pengikatan insulin dengan reseptor insulin memicu autofosforilasi beberapa residu tirosin pada reseptor insulin. Aktivasi dari reseptor insulin dengan cara ini dapat merangsang fosforilasi protein yang mengakibatkan translokasi transporter glukosa (GLUT4) ke membran sel sehingga meningkatkan ambilan glukosa ke dalam sel. Dengan demikian, ALA dapat meningkatkan jalur insulin-signaling sehingga meningkatkan penyerapan glukosa ke otot dan sel-sel lemak. Atas dasar ini, maka ALA disebut sebagai senyawa *insulin mimetik* (Singh dan Ishwarlal, 2008).

2.5.4 Dosis Suplemen Asam Alfa Lipoat

Untuk pengobatan diabetes, dosis ALA yang dianjurkan adalah 300-600 mg/hari. Sebagai dukungan terhadap antioksidan, dosis ALA yang digunakan ialah 20-50 mg/hari. Pemberian ALA melalui Intravena dan oral disetujui untuk pengobatan diabetes neuropati di Jerman. Berdasarkan bukti-bukti yang ada, ALA dapat menurunkan glukosa darah, dengan meningkatkan fungsi insulin, dan

mengurangi resistensi insulin, yang merupakan penyebab dari banyak kasus penyakit jantung koroner dan obesitas. Suplemen oral ALA dengan dosis 300 mg/hari selama 4 minggu dapat meningkatkan vasodilatasi sebesar 44% dibandingkan dengan plasebo. Suplemen ALA dalam dosis 1200 mg/hari selama 6 minggu dapat meningkatkan perfusi kapiler di jaringan pada pasien diabetes dengan neuropati perifer (Singh dan Ishwarlal, 2008).

Pada penelitian Soriano *dkk.* (2008) dosis ALA yang digunakan ialah 100 mg/kg berat badan secara intraperitoneal selama 3 minggu untuk menilai kadar *glutathione* (GSH), *glutathione peroksidase* (GPx activity), dan MDA pada retina tikus diabetes. Hasil penelitian menunjukkan hubungan dosis dengan respon yaitu pada dosis 100 mg/kg berat badan dapat menurunkan kadar GSH dan GPx, serta menormalkan kadar MDA pada retina tikus diabetes. Penelitian Melhem *dkk.* (2002) juga menggunakan ALA dengan dosis awal 400 mg/kg berat badan yang selanjutnya diberikan dengan dosis 30 mg/kg berat badan yang dicampurkan pada makanan tikus *Sprague-Dawley* selama 7 bulan untuk menilai level glukosa darah, serta TGF- β pada ginjal tikus. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan hubungan dosis dengan respon ALA yaitu pada dosis tersebut tidak menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap level glukosa darah serta TGF- β . Dalam penelitian Stevens *dkk.* (2009) menggunakan ALA dengan dosis 100 mg/kg berat badan selama 6 minggu untuk menilai *nerve conduction neuropathy* (DPN) serta *reduce nerve blood flow* (NBF). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perubahan yang signifikan terhadap DPN dan NBF.

2.5.5 Farmakokinetik Suplemen Asam Alfa Lipoat

ALA disintesis secara *de novo* dari 8 karbon asam lemak (asam oktanoat) dan sistein (sebagai sumber sulfur) dalam hati. Katabolisme ALA juga berlangsung di hati. ALA memiliki 2 enansiomer yaitu *R-enansiomer* dan *S-enansiomer*. ALA alami terbentuk sebagai *R-enansiomer*, sedangkan pada ALA sintesis terdapat *R-enansiomer* dan *S-enansiomer*. Kedua enansiomer ini memiliki potensi yang berbeda, namun *R-enansiomer* lebih poten dalam merangsang penyerapan glukosa, serta untuk meningkatkan insulin yang distimulasi oleh *uptake* glukosa. *S-enansiomer* dapat meningkatkan afinitas dari glutation reduktase, namun dalam tingkat yang rendah. ALA mudah diserap dan cepat diubah dalam bentuk DHLA karena menurunnya *nicotinamide adenin dinukleotida* atau berkurangnya dinukleotida fosfat pada sebagian besar jaringan (singh dan ishwarlal, 2008).

Tidak seperti ALA pada makanan, ALA pada suplemen adalah dalam bentuk bebas (tidak terikat dengan protein). Dosis suplemen ALA yang tersedia ialah 200-600 mg, yang mungkin 1000 kali lebih besar dari pada yang terdapat pada makanan. Asupan makanan dapat mengurangi bioavailabilitas dari ALA. Oleh karena itu, ALA direkomendasikan untuk diberikan saat perut kosong (1 jam sebelum atau 2 jam sesudah makan). Setelah pemberian dosis oral ALA, konsentrasi plasma maksimal R-LA sebesar 40-50% lebih tinggi dari pada S-LA, hal ini menunjukkan R-LA diserap lebih baik dari pada S-LA. Namun kedua isomer ini dimetabolisme dan di eksresikan dengan cepat (singh dan ishwarlal, 2008).

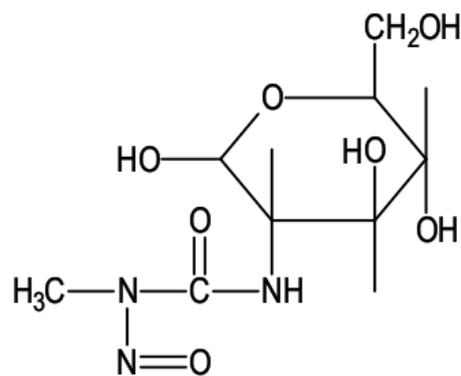
2.5.6 Efek Samping dan Toksisitas

Tidak ada indikasi yang menyebutkan bahwa dosis rendah dari LA seperti 5 mg memiliki efek samping. Dosis yang lebih tinggi dapat menyebabkan mual atau sakit perut, bersama dengan overstimulasi, kelelahan, dan insomnia. Dosis tinggi juga dapat berpotensi menurunkan glukosa darah. Hal ini memberikan manfaat bagi pasien dengan diabetes, namun membutuhkan pemantauan ketat terhadap kadar glukosa darah. Secara umum, suplemen ALA memiliki beberapa efek samping yang serius. Pada dosis yang lebih tinggi, efek samping yang dapat timbul ialah gejala gastrointestinal termasuk nyeri perut, mual, dan muntah, serta diare dan reaksi anafilaksis seperti spasme laring. Kemudian efek samping lain yang terjadi ialah reaksi alergi yang mempengaruhi kulit, termasuk ruam dan gatal-gatal. Urin berbau busuk juga telah dilaporkan oleh orang yang memakai 1.200 mg/hari ALA secara oral. Secara keseluruhan, ALA 600 mg/hari adalah dosis yang aman dan dianjurkan untuk diabetes (singh dan ishwarlal, 2008).

Tidak ada laporan mengenai toksisitas ALA dalam dosis tinggi pada manusia. Pada anjing, LD₅₀ terjadi ketika administrasi dosis 400-500 mg/kg berat badan. Tikus menunjukkan toleransi lebih tinggi dibanding anjing. LD₅₀ pada tikus dilaporkan terjadi pada dosis > 2 g/kg berat badan (Esgro, 2010). LD₅₀ ALA antara rute oral berbeda dengan intraperitoneal. Pada rute oral, LD₅₀ dilaporkan pada dosis 1130 dan 502 mg/kg pada mencit dan tikus, sedangkan LD₅₀ rute intraperitoneal 200 dan 160 mg/kg (Wollin dan Jones, 2003). Keamanan penggunaa ALA pada ibu hamil dan menyusui belum diketahui (Pasley, 2010). Oleh sebab itu, ALA belum dapat direkomendasikan bagi ibu hamil dan menyusui.

2.6 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranos] diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* dapat digunakan untuk menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Struktur kimia streptozotocin dapat dilihat pada gambar 2. Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 untuk intravena adalah 40-60 mg/kg, sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ juga dapat diberikan secara berulang, untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8-10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Di lain pihak, sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotocin pada neonatal tersebut sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada DM tipe II (Nugroho, 2006).



Gambar 2.24. Struktur kimia streptozotocin (Nugroho, 2006).

STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasikan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas. STZ merupakan donor NO (nitric oxide) yang mempunyai kontribusi

terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan sewaktu STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena 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 pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas. Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase (sel β pankreas mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim ini), lebih lanjut meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase mengkatalisis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Dari pembangkitan anion superoksida, terbentuk hidrogen peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel β pankreas. Kerusakan DNA akibat STZ dapat mengaktifasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD⁺ seluler, selanjutnya penurunan jumlah ATP, dan akhirnya terjadi penghambatan sekresi dan sintesis insulin. Selain itu, kalsium berlebih yang kemungkinan dapat menginduksi nekrosis, tidak mempunyai peran yang signifikan pada nekrosis yang diinduksi STZ (Nugroho, 2006).