

EFEK PEMBERIAN *Morinda citrifolia*, L PADA KADAR TGF- β SERUM DAN EKSPRESI KOLAGEN PADA GINJAL TIKUS DIABETES NEFROPATI

Arya Iswara¹, Udadi Sadana², Indranila Kustarini²

1) Fakultas Ilm Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang.

Email: iswara.arya2011@yahoo.com

2) Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

ABSTRACT

Background: *Morinda citrifolia* L contain components that lowering the oxidative stress and the ability to regenerate the renal function through the measurement of renal extra cellular matrix and growth factor. The detection from renal functions remission can be measured through the *transforming growth factor* beta (TGF- β) level, and collagen deposition. **Aims:** This experiment was to prove the *Morinda citrifolia* L effect to lowering the TGF- β level and collagen deposition in streptozotocin-induced nephropathy diabetic Sprague Dawley rats. **Method:** *The post test only control group design* experiment in thirty rats randomized into positive control group and four treatment group and induced with streptozotocin in 40mg/kgWB doses. The rats treated with *Morinda citrifolia* extract which was divided into four doses (10;20;40;80mg/dL) then determine TGF- β level and collagen deposition. The data analyzed using SPSS ver 17 with *oneway-ANOVA* and *post hoc LSD*, *Kruskal-Wallis* and *Mann-Whitney U* and *Spearman's Rho* with confidence interval 95% ($p < 0,05$). **Result:** The statistically analysis from rats treated with morinda extract resulted a significant result in TGF- β level, correlation between TGF- β level and collagen deposition ($p < 0,05$). **Conclusion:** *Morinda citrifolia* treatment can substantially improve the activity of the renal function, shown by lower TGF- β level and better density of collagen deposition compared with control group and 10-20 mg/dL morinda treatment dose showed the best result.

Keywords: Nephropathy diabetics, *Morinda citrifolia*, TGF- β level and collagen deposition.

PENDAHULUAN

Diabetes Nefropati (DN) merupakan salah satu komplikasi mikrovaskuler diabetes melitus akibat hiperglikemi yang bersifat kronis. Sebanyak 25% penderita DM tipe 1 dan 30-40% penderita DM tipe 2 menjadi DN dan berkembang menjadi gagal ginjal terminal.^{1,2} Perubahan patobiologik DM tipe 2 melalui jalur protein kinase C (PKC), *advanced glycation end products* (AGEs), *polyol pathway*, dan heksosamin menyebabkan produksi sitokin dan *growth factor* seperti TGF- β sebagai produk utama dari sel mesangial ginjal. Peningkatannya sebagai sitokin proinflamasi terlihat pada sekresinya yang berlebihan pada urin tikus diabetes.³ Kadar glukosa tinggi menstimulasi peningkatan produksi kolagen oleh sel mesangial, dimediasi oleh aktivasi TGF- β sebagai autokrin.⁴

Tikus diinduksi STZ untuk menjadi DN atas dasar pengaruh streptozotocin pada homeostasis glukosa dan insulin mencerminkan kelainan fungsi sel beta.⁵ Streptozotocin menghambat sekresi insulin dan menyebabkan keadaan diabetes melitus tergantung insulin.⁶ *Morinda citrifolia* L dengan kandungan zat bioaktif antara lain xeronin, polisakarida dan vitamin sangat bermanfaat dalam proses perbaikan fungsi ginjal DN melalui aktifitas biologis zat tersebut sebagai antioksidan dan imunomodulator.⁷ Penelitian ini bermaksud untuk menggali informasi tentang efek MC pada DN maupun efeknya dalam menurunkan stress oksidatif dan meningkatkan imunomodulator dalam perbaikan fungsi ginjal melalui pengukuran *growth factor* TGF- β dan ekspresi kolagen dalam area mesangial tikus.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*.^{8,9} Tiga puluh enam tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* umur 12 minggu, berat badan 180-220 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan dan di adaptasikan dengan diberi pakan standar PAR-G BR II secara ad libitum, kemudian di induksi STZ : 40 mg/kg STZ dalam 0,1 N Citrat buffer sampai pH 4,3 dan dibiarkan 72 jam sehingga terjadi hiperglikemia dan mikroalbuminuria (kelompok kontrol DN).

Tikus dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif dan 1 kelompok kontrol positif, dan 4 kelompok perlakuan. Selanjutnya tikus diberi *Morinda citrifolia* selama 15 hari. Mengkudu untuk perlakuan dalam bentuk ekstrak mengkudu yang diekstrak dengan ethanol 70% dengan volume 10 mg/dl, 20 mg/dl, 40 mg/dl dan 80 mg/dl/hr yang disondekan.

Sampel darah tikus diambil melalui *plexus retroorbitalis* sebanyak 2 ml untuk mengetahui kadar TGF- β serum. Kadar TGF- β pada akhir penelitian diukur dengan metode ELISA (Quantikine, USA). Untuk menentukan ekspresi kolagen pada glomerulus ginjal, tikus di *sacrified*, ginjal diproses pengecatan immunohistokimia menggunakan reagen ABCAM (Rabbit to polyclonal collagen IV). Pembacaan skoring kolagen di glomerulus didapatkan dari hasil pengamatan 2 pengamat melalui mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dan dilakukan uji *Kappa* dengan nilai *Intensity Scoring*¹⁰: 1=lemah; 2=sedang; 3=kuat; 4=sangat kuat.

HASIL

Kadar TGF- β serum

Tabel 1. Tabel data analisis kadar TGF- β

K	Kadar TGF- β	
	Mean	Std. deviasi
K1	92,6	17,0
K2	127,3	27,4
K3	117,1	29,8
K4	124,6	23,6
K+	159,3	22,0

Rerata kadar TGF- β yang ditunjukkan pada tabel terdapat nilai terendah pada kelompok K1 dan nilai tertinggi pada kelompok K+. Data pada tabel 6 ini menunjukkan bahwa pemberian *Morinda citrifolia* L pada dosis 10, 20, 40, 80 mg/dL berpengaruh dalam menurunkan kadar TGF- β yang dapat dilihat dari nilai pada kelompok K1, K2, K3, K4 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K+

uji *oneway-ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$ ($p=0,002$) dilanjutkan dengan melakukan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan tiap-tiap kelompok.

Tabel 2. Tabel uji beda kadar TGF- β

Kelompok	Mean Difference	Std. Error	P
K1-K2	-34.73167*	14.09367	.021
K1-K3	-24.49667	14.09367	.094
K1-K4	-31.96000*	14.09367	.032
K1-K+	-66.67167*	14.09367	.000
K2-K3	10.23500	14.09367	.474
K2-K4	2.77167	14.09367	.846
K2-K+	-31.94000*	14.09367	.032
K3-K4	-7.46333	14.09367	.601
K3-K+	-42.17500*	14.09367	.006
K4-K+	-34.71167*	14.09367	.021

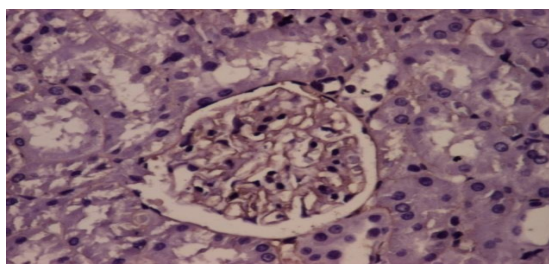
Hasil menunjukkan kelompok K1 berbeda dengan semua kelompok perlakuan. Perbedaan juga terdapat pada kelompok K+ yang berbeda dengan kelompok K2, K3 dan K4.

Ekspresi kolagen

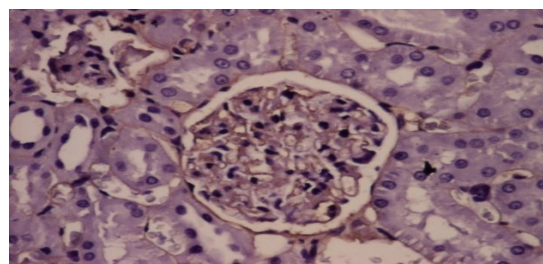
Tabel 3. Tabel data analisis ekspresi kolagen

K	Ekspresi Kolagen	
	Mean	Std. deviasi
K1	2,72	0,05
K2	1,38	0,11
K3	2,49	0,10
K4	3,06	0,38
K+	3,30	0,95

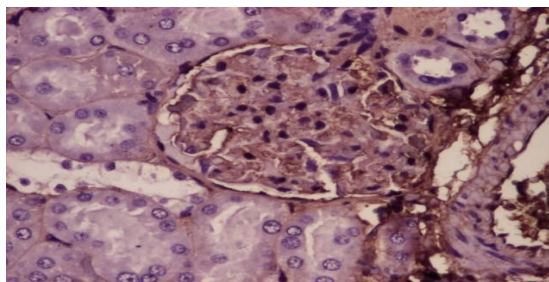
Rerata terendah pada ekspresi kolagen yang terdapat pada tabel ditunjukkan pada kelompok K2 dan nilai tertinggi pada kelompok K+.



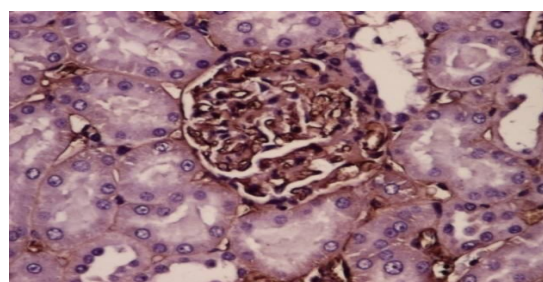
Gambar 1. Intensitas kolagen skor 1



Gambar 2. Intensitas kolagen skor 2



Gambar 3. Intensitas kolagen skor 3



Gambar 4. Intensitas kolagen skor 4

Hasil dari uji *oneway-ANOVA* yang telah dilakukan mendapatkan hasil $p < 0,05$ ($p = 0,000$) yang menunjukkan adanya perbedaan ekspresi kolagen di tiap kelompok perlakuan, selanjutnya dilakukan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan tiap-tiap kelompok.

Tabel 4. Tabel uji beda ekspresi kolagen

Kelompok	Mean Difference	Std. Error	P
K1-K2	1.33333*	.04999	.000
K1-K3	.23167*	.04999	.000
K1-K4	-.33833*	.04999	.000
K1-K+	-.58667*	.04999	.000
K2-K3	-1.10167*	.04999	.000
K2-K4	-1.67167*	.04999	.000
K2-K+	-1.92000*	.04999	.000
K3-K4	-.57000*	.04999	.000
K3-K+	-.81833*	.04999	.000
K4-K+	-.24833*	.04999	.000

Hasil dari uji *post hoc* ekspresi kolagen menunjukkan perbedaan pada seluruh kelompok. Skor ekspresi kolagen ini didapat dari uji *Kappa* dari hasil pembacaan 2 pembaca/observer. Nilai *Kappa* yang diperoleh yaitu 1 (>75) yang berarti ada kesesuaian yang baik antar pembaca. Nilai probabilitas (Approx. Sig) yang didapat adalah 0,000 (<0,05) yang berarti *Kappa* benar-benar signifikan dan hasil pengamatan dari 2 pembaca benar-benar sesuai.

PEMBAHASAN

Nilai rerata kadar TGF- β yang terendah terdapat pada kelompok K1 yaitu kelompok dengan perlakuan pemberian dosis morinda sebesar 10 mg/dL sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian morinda dengan dosis 10 mg/dL merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar TGF- β .

Kelompok perlakuan induksi morinda menunjukkan nilai yang rendah dari kelompok kontrol tanpa perlakuan morinda karena kadar glukosa tinggi menginduksi ROS intraseluler secara tidak langsung melalui AGE dan sitokin, termasuk TGF- β 1 dan AngiotensinII. Angiotensin II meningkatkan ekspresi TGF- β dan sintesis protein matriks, dalam kondisi dimana pengaruh hipertensi glomerulus terhindarkan. Pengaruh angiotensin II pada sintesis protein matriks diblokir oleh antibodi penetral untuk TGF- β . AGE meningkatkan ROS pada sel mesangial neonatal dan sel epitel tubulus proksimal.¹¹ sehingga diperlukan morinda yang

merupakan salah satu antioksidan dan memiliki komponen endogenous antioksidan seperti glutathione, thioredoxin, dan biliverdin/ bilirubin dan diit antioksidan, seperti vitamin C dan E dan beta karoten dapat memperbaiki keseimbangan redoks.

Antioksidan menghambat kadar glukosa tinggi induksi TGF- β 1 dan ekspansi ECM pada mesangial glomerulus dan sel epitel tubulus serta memperbaiki diabetes nefropati, hal tersebut menunjukkan bahwa stress oksidatif memegang peranan penting pada kerusakan ginjal diabetes. Sesuai dengan Wagener¹² dan Verzola¹³ yang mengatakan bahwa kadar glukosa tinggi merangsang ROS intraseluler pada mesangial dan sel epitel tubulus. Sejumlah sel apoptosis epitel tubulus proksimal, proteinuria, sklerosis glomerular dan tubulointerstitial, dan malondialdehid ginjal, sebagai indeks stres oksidatif, secara signifikan menurun setelah pemberian antioksidatif vitamin C. Vitamin C, vitamin E menormalkan disfungsi ginjal karena diabetes seperti volume glomerulus dan produksi TGF- β pada tikus diabetes karena diinduksi STZ.^{12,13}

Kandungan lain morinda yang berperan selain antioksidan vitamin C dan E adalah flavanoid yang mencegah cedera akibat radikal bebas dengan cara *scavenging* radikal bebas. Flavanoid menstabilkan reaksi ROS melalui reaktivasi pengikatan radikal bebas karena reaktivitas yang tinggi dari kelompok *hydroxyl* flavanoid membuat radikal bebas menjadi *inactive*.¹⁴ Lee¹⁵ juga menjelaskan bahwa aktivasi *NF-kappa beta*, PKC dan TGF- β yang diinduksi oleh AGE pada mesangial dapat secara efektif dihambat oleh antioksidan dengan menormalkan produksi superoksida yang berlebih.

Parameter lain yang diteliti adalah ekspresi kolagen. Data skor ekspresi kolagen memperlihatkan kelompok perlakuan dengan diberi morinda memiliki skor kolagen yang lebih baik daripada kelompok kontrol positif yang tidak diberi perlakuan pemberian morinda. Kelompok perlakuan morinda dengan dosis 20 mg/dL memiliki nilai rerata skor ekspresi kolagen yang paling rendah. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa dosis 20 mg/dL merupakan dosis yang paling baik untuk menurunkan ekspresi kolagen.

Pemberian morinda dapat memperbaiki gambaran ekspresi kolagen mesangial karena morinda mengandung antioksidan yang menghambat induksi TGF- β 1 dan ekspansi matriks ekstra seluler pada mesangial glomerulus dan sel epitel tubulus.^{16,17} Kolagen adalah protein utama yang menyusun komponen matriks ekstraseluler dan merupakan protein yang paling banyak ditemukan di dalam tubuh manusia.¹⁸

TGF- β 1 perlu dihambat karena TGF- β 1 berperan penting dalam pengaturan metabolisme matriks ekstraseluler (ECM) dan deposisi ECM.¹⁹ Kadar glukosa tinggi menginduksi TGF- β 1 pada mesangial glomerulus dan sel epitel tubulus pada ginjal diabetes. Jadi kadar glukosa tinggi menstimulasi peningkatan produksi kolagen oleh sel mesangial, dimediasi oleh aktivasi TGF- β sebagai autokrin.²⁰ Peningkatan TGF- β 1 jelas terlihat dalam berbagai kerusakan ginjal manusia dan hewan model, termasuk diabetes nefropati. Dengan demikian, penyakit ginjal kronis, ditandai dengan peningkatan ECM, yang mengganggu keseimbangan antara sintesis dan degradasi ECM dalam kondisi normal. Peningkatan sekecil apapun dalam glukosa darah dikombinasikan dengan peningkatan jumlah TGF- β pada ginjal dapat memperburuk kerusakan ginjal.¹⁹ Lesi nefropati diabetes mencakup peningkatan akumulasi kolagen IV, fibronektin, laminin, dan thrombospondin selain ekspresi baru kolagen interstitial I dan III dan isoform novel fibronektin dan laminin.²¹

Antioksidan dari morinda memiliki efek protektif pada diabetes nefropati pada model mencit DMT2, terutama pada hiperglikemi, fokus pada sel mesangial.²² Memproduksi ROS, mengaktifasi NF κ B dan *activator protein-1 (AP-1)* dan ekspresi TGF- β 1 dan *monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)* menunjukkan paparan kadar glukosa tinggi menginduksi produksi ROS pada mitokondria kultur sel mesangial merupakan hasil aktivasi faktor transkripsi dan produksi sitokin memegang peranan penting pada ekspansi mesangial, dan merupakan gambaran pathogenesis diabetes nefropati.⁶⁷ Akumulasi karotenoid pada mitokondria kultur sel mesangial menurunkan produksi ROS pada mitokondria. Karotenoid mencegah progresifitas diabetes nefropati melalui efek *ROS scavenging* pada mitokondria sel mesangial dan diharapkan sangat bermanfaat pada pengelolaan diabetes nefropati.²²

KESIMPULAN

Penelitian ini menggunakan beberapa dosis morinda, dosis bertingkat dari 10 mg/dL, 20 mg/dL, 40 mg/dL dan 80 mg/dL. Dosis-dosis tersebut memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap parameter yang diamati dalam penelitian ini yang berupa kadar TGF- β dan ekspresi kolagen, namun secara keseluruhan dapat dianjurkan dosis morinda sebesar 10 dan 20 mg/dL merupakan dosis yang paling efektif. Dosis ini menjadi dosis yang paling efektif dalam penelitian ini karena mengacu pada data hasil penelitian yang memperlihatkan bahwa mayoritas parameter yang diberi perlakuan dengan dosis 10 dan 20 mg/dL memberikan hasil yang paling baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Sho-ichi Y, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H. 2001. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J. Clin. Invest.*;108: 261-8.
2. Permana H. Pathogenesis nefropati diabetik. 2010. Dalam Naskah Lengkap Simposium Endokrinologi Klinik VIII 2010. Editor : Hartini et al. Bandung Pusat informasi Ilmiah Bag. Ilmu Penyakit Dalam FK UNPAD/RS Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia ;26-47.
3. Wang F, Li M, Ceheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, Zhao J, Guo RC, Gao L, Zhang X. 2009. Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*; 83: 828-35
4. Sheridan A.M. 2006. Molecular Mechanism Underlying Diabetic Nephropathy. *Nephrology Rounds.*; 4:1-6
5. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. 1996. N-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia.*; 52:344-7
6. Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-26
7. Ritz E, Dikow R. 2006. Hypertension and antihypertensive treatment of diabetic nephropathy. *Natur Clin Pract Nephrol*; 2 (10):506-66
8. Campbell DT, and Stanley JC. 1996. The post test-only control group design. In Experimental and quasi-experimental designs for research. Chicago; Rand McNally College Publishing Co.;25-31.
9. Portney LG, Watkins MP. 1993. Experimental Design In Foundations of Clinical Research Applications to Practice. Connecticut. Appleton & Lange, Stamford,;145-70
10. Nevin E, Selma Y, Melek O, Matem TD, Omer U, Husrev H. Effects of ACE inhibition on the expression of type IV collagen and laminin in renal glomeruli in experimental diabetes. 2004. *Actahistochemica.*; 279-87
11. Kagami S, Border WA, Miller DE & Noble NA. 1994. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*;93:2431-37
12. Wagener FADT, Dekker D, Berden JH, Xcharstuhl A, and van der Vlag J. 2009. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis*;14:1451-8
13. Verzola D, Gondolfo MD, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, Giannoni M, Rimoldi L, Lauria F, Miji M, Deferrari G and Garibotto G. 2007. Apoptosis in the kidney of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int*; 72:1262-72
14. Patel JM. 2008. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal* ;3.1-5
15. Lee HB, Yu M-R, Yang Y, Jiang Z, and Ha H. 2003. reactive oxygen species-regulated signaling pathway in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*;14: S241-5
16. Fukuda J-I, Yoneya M, and Yokoyama H. 2009. Consistent numerical evaluation of the anchoring energy of a grooved surface. *Phys. Rev.*;E79: 011705-18
17. Patni H, Mathew JT, Luan L, Franki N, Chander PN, and Singhal PC. 2007. Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol*; 293:F1065-71
18. Brownlee M. 2005. Banting Lecture 2004 The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying mechanism. *Diabetes*;54:1615-35

- 19 Tryggvason K, Wartiovaara J. 2001. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*; 10: 543–49
- 20 Gnudi L, Viberti G, Raij L, et al. 2003. GLUT-1 overexpression: Link between hemodynamic and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension*;42:19-24
- 21 Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, Okuda S. 2007. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets.* 8: 952–59
- 22 Solomon N. 1994. Molecular Mechanism of Xeronin and antioxidant. *J Pharm Soc.*