

**PERBEDAAN JUMLAH SEL TUBULUS GINJAL NEKROSIS ANTARA
YANG MENDAPAT EKSTRAK METANOL DAGING BUAH MAHKOTA
DEWA (*Phaleria macrocarpa*) DENGAN VITAMIN E
Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2**

Karya Tulis Ilmiah

untuk Memenuhi Sebagian Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

Program Studi Pendidikan Dokter



oleh:

Roby Cahyono

13711149

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2017

**NECROTIC KIDNEY TUBULAR CELLS COUNT DIFFERENCE
BETWEEN TREATMENT WITH METHANOLIC EXTRACT OF *Phaleria
macrocarpa*'s MESOCARP AND VITAMIN E
Experimental Study on Type 2 Diabetes Mellitus Rat Model**

A Scientific Paper

As a Part of Requirement to Obtain a Degree Bachelor of Medicine



Author:

Roby Cahyono

13711149

**FACULTY MEDICINE
ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA
YOGYAKARTA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

Karya Tulis Ilmiah

**PERBEDAAN JUMLAH SEL TUBULUS GINJAL NEKROSIS ANTARA
YANG MENDAPAT EKSTRAK METANOL DAGING BUAH MAHKOTA
DEWA (*Phaleria macrocarpa*) DENGAN VITAMIN E
Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2**

Disusun dan diajukan oleh:

Roby Cahyono

13711149

Telah diseminarkan tanggal: 2 Maret 2017

Dan telah disetujui oleh:

Penguji



dr. Dwi Nur Ahsani, M.Sc.

Tanggal: 3 Maret 2017

Pembimbing



dr. Evy Sulistyoningrum, M.Sc.

Tanggal: 3 Maret 2017

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Erlina Marfianti, M.Sc., Sp.PD.

Disahkan oleh:

Dekan Fakultas Kedokteran



dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp.PK.

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Daftar Isi.....	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar.....	vi
Daftar Lampiran	vii
Halaman Pernyataan.....	viii
Kata Pengantar	ix
Intisari	xi
<i>Abstract</i>	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Keaslian Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
1.5.1 Teoritis	7
1.5.2 Praktis.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Telaah Pustaka	8
2.1.1 Diabetes Melitus.....	8
2.1.2 Ginjal.....	10
2.1.3 Nefropati Diabetik.....	13
2.1.4 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.....	15
2.1.5 Mahkota Dewa	17
2.1.6 Vitamin E.....	19
2.2 Kerangka Teori.....	20
2.3 Kerangka Konsep	20
2.4 Hipotesis.....	21

BAB III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	22
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	22
3.4 Variabel Penelitian	23
3.5 Definisi Operasional.....	24
3.6 Instrumen Penelitian.....	25
3.7 Alur Penelitian	26
3.8 Analisis Data	27
3.9 Etika Penelitian	27
3.10 Jadwal Penelitian.....	29
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil Penelitian	30
4.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian.....	30
4.1.2 Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis.....	32
4.2 Pembahasan.....	35
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1 Simpulan	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian Penelitian.....	6
Tabel 2. Hasil Data Karakteristik Subjek Penelitian.....	31



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Anatomi Ginjal	11
Gambar 2. Histologi Ginjal	13
Gambar 3. Perbandingan Nekrosis Sel Tubulus Ginjal	15
Gambar 4. Mahkota Dewa	18
Gambar 5. Gambaran Mikroskopis Umum Korteks Ginjal Subjek Penelitian	32
Gambar 6. Gambaran Mikroskopis Sel Tubulus Ginjal Subjek Penelitian.....	33
Gambar 7. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antar Kelompok.....	34
Gambar 8. Skema Pengambilan Lapang Pandang Pertama	53
Gambar 9. Skema Pengambilan Lapang Pandang Kedua.....	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Langkah-langkah Pembuatan Preparat Mikroskopis.....	49
Lampiran 2. Skema Tata Cara Pengambilan Lapang Pandang.....	53
Lampiran 3. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Sulistyoningrum <i>et al.</i> (2015) ..	54
Lampiran 4. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Penelitian.....	55
Lampiran 5. Surat Determinasi Buah Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i> (<i>Scheff.</i>) <i>Boerl.</i>).....	56
Lampiran 6. Langkah-langkah Pembuatan Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa.....	57
Lampiran 7. Uji Normalitas Data Kakarakteristik Subjek Penelitian	58
Lampiran 8. Uji Beda Berat Badan Tikus dan Indeks Relatif Organ.....	64
Lampiran 9. Uji Beda Berat Ginjal dan Volume Ginjal.....	65
Lampiran 10. Uji Beda Volume Ginjal antar Kelompok	66
Lampiran 11. Uji Validitas Data Pengamatan Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis Interobserver	69
Lampiran 12. Uji Normalitas Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis	70
Lampiran 13. Uji Beda Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis	73
Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian.....	75

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Roby Cahyono

NIM : 13711149

Judul : Perbedaan Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antara yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Vitamin E (Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2)

Pembimbing : dr. Evy Sulistyoningrum, M.Sc.

Menyatakan bahwa,

1. Karya Tulis Ilmiah (KTI) ini merupakan hasil sendiri dan bukan plagiasi,
2. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian berjudul “Perbedaan Kadar MDA (Malondialdehyde) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dan Vitamin E.” yang diteliti oleh dr. Evy Sulistyoningrum, M.Sc. dan dr. Putrya Hawa, M.BioMed yang sudah mendapatkan izin penelitian dari peneliti.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya tanpa paksaan atau tekanan dari pihak manapun. Saya bersedia bertanggung jawab secara hukum apabila terdapat hal-hal yang tidak sesuai dengan pernyataan tersebut.

Yogyakarta, 2 Maret 2017



Roby Cahyono

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur peneliti panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas izin dan kehendak-Nya peneliti dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian KTI dengan judul “**Perbedaan Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antara yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Vitamin E (Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2)**”. Laporan hasil penelitian KTI ini ditulis dengan tujuan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penyusunan laporan hasil penelitian KTI ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Maka dari itu peneliti menyampaikan terima kasih, penghargaan, dan rasa hormat kepada,

1. dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp.PK. sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dan dosen pembimbing akademik atas izin penelitian, nasihat, dan bimbingan untuk penelitian ini,
2. dr. Erlina Marfianti, M.Sc., Sp. PD. sebagai ketua jurusan program studi pendidikan dokter Universitas Islam Indonesia atas izin penelitian dan bimbingan yang diberikan untuk penelitian ini,
3. dr. Evy Sulistyoningrum, M.Sc. sebagai pembimbing penelitian yang berkenan meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, pelajaran, motivasi, dan contoh dengan sabar dan perhatian dalam penelitian ini,
4. dr. Dwi Nur Ahsani, M.Sc. sebagai penguji KTI atas motivasi, bimbingan, kritik, dan saran yang diberikan untuk penelitian ini,
5. Patria Aditya Arimukti sebagai sahabat, guru, sekaligus pemberi contoh untuk peneliti dalam penelitian maupun kehidupan sehari-hari,
6. Sahabat terdekat peneliti selama masa studi preklinik (Sausan Fanana, Kiki Faradina, dan Jamilah Aulia Haikhah) atas dukungan, bantuan, kepercayaan, dan kesetiaan persahabatan terhadap peneliti,
7. Rekan sejawat penelitian (Malombassi Dharmawan Hadiwidjojo Hutomo, Sausan Fanana, Jamilah Aulia Haikhah, dan lainnya) atas bantuan dan kerja sama dalam pelaksanaan penelitian ini,

8. **Almamater** Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Surakarta atas seluruh **pembelajaran** tentang akademik maupun nonakademik meliputi kehormatan, **harga diri**, harkat dan martabat,
9. **Sahabat** yang selalu peneliti banggakan dan sayangi (Fitri Maulani, **Kholifastia Imanusti**, Arum Cahyaning Pekerti, Hardianti Deliana Rifqi, dan **lainnya**) atas persahatan selama masa studi di SMA Negeri 1 Surakarta hingga **saat ini**,
10. **Seluruh** keluarga, guru, teman sejawat, almamater, dan pihak lainnya atas **dukungan**, pelajaran, dan motivasi dalam menyelesaikan penelitian.

Peneliti menyadari bahwa laporan hasil penelitian KTI ini masih memiliki **banyak** kekurangan, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang **membangun** untuk perbaikan di masa depan. Peneliti berharap laporan hasil **penelitian** KTI ini dapat bermanfaat bagi pembaca terutama peneliti untuk **kemajuan** ilmu pengetahuan khususnya di bidang kedokteran.

Yogyakarta, 2 Maret 2017



Roby Cahyono

**PERBEDAAN JUMLAH SEL TUBULUS GINJAL NEKROSIS ANTARA
YANG MENDAPAT EKSTRAK METANOL DAGING BUAH MAHKOTA
DEWA (*Phaleria macrocarpa*) DENGAN VITAMIN E
Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2**

Intisari

Latar belakang: Diabetes Melitus (DM) adalah kelainan metabolik yang menjadi penyebab ketujuh kematian terbanyak di dunia yang didominasi oleh DM tipe 2 (DMT2). Kondisi DMT2 kronis dapat menyebabkan nefropati diabetik. Ekstrak metanol daging buah *Phaleria macrocarpa* (PM) telah menunjukkan efek menguntungkan pada nefropati diabetik.

Tujuan: Mengetahui perbedaan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antara yang mendapat PM dengan vitamin E pada tikus model DMT2.

Metode: Desain penelitian ini adalah eksperimental dengan *post test only-control group*. Dua puluh blok parafin ginjal kanan tikus putih dibagi dalam 4 kelompok sejumlah sesuai perlakuan sondase yaitu kelompok kontrol tikus sehat (K1) dan kontrol tikus DMT2 (K2), kelompok tikus DMT2 yang mendapat 250 mg/KgBB PM (P1), dan kelompok tikus DMT2 yang mendapat 100 mg/KgBB vitamin E (P2). Tikus DMT2 diinduksi dengan nikotinamid dan streptozotosin secara intraperitoneal. Setelah 6 minggu perlakuan, sel tubulus ginjal nekrosis dihitung secara mikroskopis sebagai parameter nefropati diabetik.

Hasil: Kelompok P1 ($142,2 \pm 7,69$) dan P2 ($265,6 \pm 7,92$) memiliki rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis lebih sedikit dibandingkan kelompok K2 ($460,2 \pm 12,09$) ($p < 0,05$), meskipun kelompok P1 dan P2 memiliki rerata jumlah sel tubulus ginjal lebih banyak dibandingkan kelompok K1 ($91,8 \pm 8,56$) ($p < 0,05$). Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok P1 lebih sedikit dibandingkan kelompok P2 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Terdapat perbedaan jumlah sel tubulus ginjal antara yang mendapat PM dengan vitamin E pada tikus model DMT2.

Kata kunci: DM tipe 2, jumlah sel tubulus ginjal nekrosis, *Phaleria macrocarpa*, nefropati diabetik.

**NECROTIC KIDNEY TUBULAR CELLS COUNT DIFFERENCE
BETWEEN TREATMENT WITH METHANOLIC EXTRACT OF *Phaleria
macrocarpa*'s MESOCARP AND VITAMIN E
Experimental Study on Type 2 Diabetes Mellitus Rat Model**

Abstract

Background: Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder which lead to seventh cause of death in worldwide and dominated by type 2 diabetes mellitus (T2DM). Chronic T2DM state could cause diabetic nephropathy. Methanolic extract of *Phaleria macrocarpa*'s mesocarp (PM) has been shown beneficial effect on diabetic nephropathy.

Objective: To determine necrotic kidney tubular cells count difference between treatment with PM and vitamin E treatment in T2DM animal model.

Methods: The design of study was experimental study with post test only-control group. Twenty paraffin block of right kidney of albino male rats were divided into four groups equally according to the sondage treatment, healthy control rats (K1) and T2DM control rats (K2), T2DM rats which were treated by 250 mg/Kg of PM (P1), and T2DM rats which were treated by 100 mg/Kg of vitamin E (P2). T2DM rats were induced by nicotinamide and streptozotocin intraperitoneally. After six weeks of treatments, necrotic kidney tubular cells count were counted histologically as diabetic nephropathy parameter.

Result: P1 group (142.2 ± 7.69) and P2 group (265.6 ± 7.92) had lower of necrotic kidney tubular cells count mean compared to K2 group ($460,2 \pm 12,09$) ($p < 0.05$). Although P1 group and P2 group had higher of necrotic kidney tubular cells count mean compared to K1 (91.8 ± 8.56) ($p < 0.05$). P1 group had higher of necrotic kidney tubular cells mean compared to P2 group ($p < 0.05$).

Conclusion: There is difference of necrotic kidney tubular cells count between treatment with PM and vitamin E in T2DM animal model.

Keywords: T2DM, diabetic nephropathy, *Phaleria macrocarpa*, total kidney's necrotic tubular cells.

BAB I. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Prevalensi penderita Diabetes Melitus (DM) yang berumur di atas 18 tahun pada tahun 2014 mencapai 9% dari total populasi dunia. Prevalensi ini diikuti dengan tingkat mortalitas hingga 1,5 juta jiwa akibat DM pada tahun 2012, sehingga diperkirakan pada tahun 2030 DM akan menjadi penyebab ketujuh kematian terbanyak di dunia (WHO, 2015). Shaw *et al.* (2009) melaporkan prevalensi DM pada umur 20-79 tahun meningkat dari 6,4% pada tahun 2010 menjadi 7,7% pada tahun 2030 di dunia. Indonesia sebagai negara berkembang menduduki peringkat 10 dengan prevalensi DM sebanyak 4,7% (7,3 juta jiwa). Diperkirakan prevalensi DM akan meningkat menjadi 5,9% (11,8 juta jiwa) pada tahun 2030. Kenaikan prevalensi tersebut menyebabkan Indonesia naik peringkat menjadi peringkat 9 negara dengan prevalensi DM tertinggi pada umur 20-79 tahun (Whiting *et al.*, 2011). Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) menduduki peringkat pertama dengan prevalensi DM 2,6% yang diikuti dengan Daerah Khusus Ibukota (DKI) Jakarta (2,5%), Sulawesi Utara (2,4%), dan Kalimantan Timur (2,3%) pada tahun 2013 untuk umur di atas 15 tahun (RISKESDAS, 2013). Prevalensi tersebut diperkirakan akan terus mengalami peningkatan seiring dengan perkembangan ekonomi dan urbanisasi yang menyebabkan penurunan aktivitas fisik dan kejadian obesitas (Shaw *et al.*, 2009).

Diabetes melitus adalah penyakit metabolik terkait gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein (Albert *et al.*, 2012) yang ditandai dengan hiperglikemia dikarenakan defisiensi insulin atau resistensi insulin atau keduanya (Purnamasari, 2014). Hal tersebut terkait dengan jenis DM dimana DM tipe 1 terkait dengan defisiensi insulin absolut dan DM tipe 2 terkait dengan resistensi insulin. Terdapat juga DM tipe lain yang disebabkan defek genetik spesifik, penyakit lain, infeksi, tumor, atau penggunaan obat atau senyawa kimia yang mempengaruhi kerja insulin serta DM tipe gestasional terkait dengan resistensi insulin karena masalah hormonal pada masa kehamilan (Purnamasari, 2014). Prevalensi DM didominasi oleh DM tipe 2 yang mencapai 90% dari total kejadian DM (WHO, 2015) karena perubahan gaya hidup yang menimbulkan

resistensi insulin seperti penurunan aktivitas fisik, diet tinggi kalori, dan obesitas yang banyak terjadi saat ini (Whiting *et al.*, 2011).

Diabetes melitus tipe 2 adalah penyakit kronis yang tidak dapat disembuhkan secara sempurna. Keadaan DM tipe 2 yang akut maupun kronis dapat menimbulkan komplikasi jika tidak diobati dengan baik. Komplikasi DM tipe 2 akut antara lain ketoasidosis dan hiperglikemia hiperosmolaritas. Komplikasi DM tipe 2 kronis antara lain kelainan mikrovaskular (retinopati, nefropati, neuropati) dan makrovaskular (penyakit serebrovaskuler dan kardiovaskuler) (Powers, 2012). Kelainan vaskuler pada DM meliputi nefropati, neuropati, retinopati, dan kardiomiopati dilaporkan merupakan penyebab utama peningkatan angka morbiditas dan mortalitas pada DM (Jeenger *et al.*, 2014). Kamble dan Bodhankar (2013) melaporkan bahwa kasus 43% gagal ginjal kronis di dunia sebenarnya disebabkan oleh nefropati diabetik dan Esther dan Manonmani (2014) juga melaporkan bahwa nefropati juga menjadi penyebab utama *End Stage Renal Disease* (ESRD) di dunia. Pasien ESRD memerlukan terapi dialisis darah rutin atau transplantasi ginjal untuk menghindari komplikasi kardiovaskuler yang dapat menyebabkan mortalitas (Hendromartono, 2014). Menurut Kamble dan Bodhankar (2013), 60% kematian pada kasus DM disebabkan oleh komplikasi nefropati diabetik.

Kelainan vaskuler yang menyebabkan nefropati dikaitkan dengan keberadaan stres oksidatif golongan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) akibat kondisi hiperglikemia, dislipidemia, dan inflamasi yang terjadi pada DM (Li *et al.*, 2012). Keadaan stres oksidatif mampu mengakibatkan disfungsi endotel dan memacu inflamasi, sehingga akan membentuk siklus yang berulang antara inflamasi dan stres oksidatif yang merusak fungsi dan struktur anatomi ginjal (Jeenger *et al.*, 2014). Proses nefropati awal ditandai dengan penambahan ukuran ginjal, volume glomerulus, dan fungsi ginjal yang diikuti dengan akumulasi matriks ekstraseluler glomerulus, mikroalbuminuria, glomerulosklerosis, dan fibrosis tubulus. Tahap akhir gagal ginjal akibat nefropati ditandai dengan proteinuria, hipertensi, dan insufisiensi ginjal (Sheela *et al.*, 2013). Nefropati diabetik juga ditandai dengan adanya degenerasi dan nekrosis sel tubulus serta perdarahan intertubulus yang dapat mengganggu fungsi reabsorpsi

dan sekresi ginjal (Esther dan Manonmani, 2014). Degenerasi dan nekrosis epitel tubulus ginjal dikaitkan dengan proses peroksidasi lipid dan komponen struktural sel lain oleh ROS (Forbes *et al.*, 2008). Kerusakan tersebut pada DM tipe 2 melebihi kemampuan sel tubulus ginjal untuk mengompensasi jejas sel, sehingga menimbulkan jejas irreversibel sel yang ditunjukkan dengan degenerasi dan nekrosis sel tubulus ginjal (Kumar *et al.*, 2013). Fungsi reabsorpsi dan sekresi ginjal menjaga kadar cairan, elektrolit, dan pH darah tetap normal serta membantu pembuangan zat sisa atau toksik dari tubuh (Tortora dan Derrickson, 2014). Gangguan pada fungsi reabsorpsi dan sekresi yang terjadi pada nefropati diabetik dapat menyebabkan asidosis metabolik, intoksikasi obat dan hasil akhir metabolisme, hingga syok yang dapat berakibat kematian.

Saat ini pengobatan DM bertujuan utama untuk mengendalikan kadar gula darah dalam batas normal. Pada DM tipe 2, digunakan obat-obatan hipoglikemia seperti sulfonilurea atau glinid dan obat-obatan untuk memperbaiki resistensi insulin seperti biguanid dan tiazolinidion. Obat alfa glukosidase inhibitor untuk menurunkan absorpsi gula dan insulin parenteral juga biasa diberikan pada pasien DM tipe 2 (Powers, 2012). Obat-obatan tersebut dapat mengendalikan kadar gula darah dengan baik, namun tidak dapat mencegah dengan efektif komplikasi nefropati dan kardiomiopati, bahkan jika ditambah obat dislipidemia, hipertensi, dan renin angiotensin bloker (Li *et al.*, 2012). Selain itu, penggunaan obat-obatan tersebut dikaitkan dengan timbulnya efek samping pengobatan. Maka dari itu pengobatan DM tipe 2 membutuhkan inovasi baru yang dapat mengobati dan mencegah komplikasi DM tipe 2, dimana salah satunya dengan penggunaan agen herbal.

Indonesia sebagai negara tropis memiliki keaneragaman hayati yang bisa dimanfaatkan di dunia medis, salah satunya buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Buah mahkota dewa memiliki beberapa zat aktif yang berperan dalam pengobatan dan pencegahan komplikasi DM tipe 2 dengan mekanisme antioksidan, antiinflamasi, (Hendra *et al.*, 2011) dan antihiperqlikemia (Ali *et al.*, 2013). Selain itu dilaporkan juga efek antikanker, antihiperlipidemia, antibakteri, antifungi, dan vasorelaksan yang dimiliki zat aktif buah mahkota dewa. Beberapa zat aktif tersebut antara lain saponin, alkaloid, polifenol, fenol, flavanoid, lignans,

dan tannins yang banyak ditemukan pada buah mahkota dewa (Altaf *et al.*, 2013). Flavonoid dan fenol mampu menghambat reaksi oksidasi dan menetralkan beberapa golongan ROS seperti superoksida, radikal hidroksil, dan radikal peroksilsehingga dapat mencegah peroksidasi lipid dan kerusakan protein, karbohidrat, dan *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) akibat radikal bebas (Soeksmanto *et al.*, 2007). Ekstrak buah mahkota dewa juga dilaporkan memiliki kemampuan antihiperlikemia dengan inhibisi enzim alfa glukosidase (Ali *et al.*, 2013). Selain itu, rebusan daging buah mahkota dewa juga terbukti memperbaiki kondisi dinding pembuluh darah yang mengalami aterosklerosis (Kautsari *et al.*, 2010). Ekstrak metanol buah mahkota dewa juga dilaporkan berfungsi untuk memperbaiki komplikasi nefropati yang ditandai dengan penurunan kadar mikroalbuminuria, ureum, dan kreatinin darah serta perbaikan struktur anatomi ginjal pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Ekstrak metanol buah mahkota dewa juga dapat menurunkan ekspresi VEGF dan TGF- β yang berperan dalam hipertrofi ginjal, glomerulosklerosis, dan pembentukan jaringan parut lainnya sebagai respon inflamasi (Sulistyoningrum *et al.*, 2013). Ekstrak metanol buah mahkota dewa juga dapat menurunkan hipertrofi ginjal pada kondisi stres oksidatif akibat sindrom metabolik (Yanti *et al.*, 2014). Kondisi stres oksidatif tersebut juga terjadi pada kondisi DM tipe 2. Triastuti *et al.* (2009) melaporkan bahwa antinefropati diabetik ekstrak mahkota dewa berkaitan dengan kemampuan ekstrak buah mahkota dewa dalam menurunkan kadar marker stres oksidatif *Malondyaldehyde* (MDA) dan meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), *Glutathione Peroxidase* (GPx), dan *Glutathione* (GSH) pada ginjal.

Kandungan pada buah mahkota dewa yang bersifat antioksidan, antihiperlikemia, antiaterosklerosis, dan lain-lain diharapkan mampu mengendalikan DM tipe 2 serta mencegah komplikasi. Komplikasi DM tipe 2 dapat terjadi pada berbagai organ yang dapat diamati untuk menguji manfaat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa seperti organ ginjal, hati, testis, dan sebagainya. Penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) telah menguji manfaat kandungan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa untuk mencegah komplikasi DM tipe 2 pada organ testis, sedangkan penelitian ini adalah penelitian

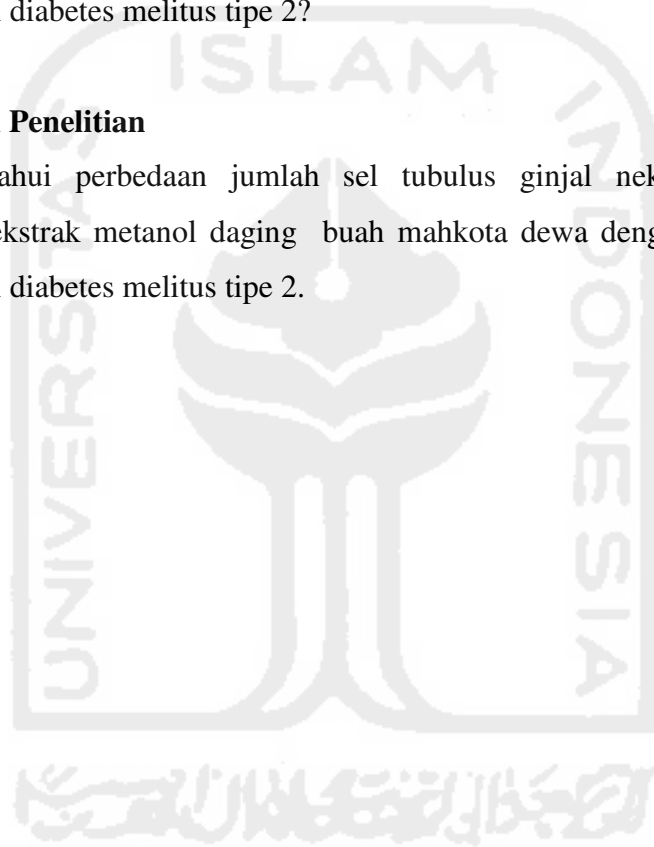
lanjutan yang mengaji manfaat kandungan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa untuk mencegah komplikasi nefropati diabetik. Sehingga diharapkan penelitian ini mampu menjadi salah satu usaha untuk menurunkan tingkat prevalensi, morbiditas, maupun mortalitas pasien DM tipe 2.

1.2.Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antara yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan vitamin E pada tikus model diabetes melitus tipe 2?

1.3.Tujuan Penelitian

Mengetahui perbedaan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antara yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan vitamin E pada tikus model diabetes melitus tipe 2.



1.4.Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian Penelitian

No.	Judul	Peneliti	Perbedaan	
			Penelitian terdahulu	Penelitian ini
1.	<i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl. Improved Renal Histological Change in Alloxan Induced Diabetic Rats	Sulistiyoningrum <i>et al.</i> , 2013	Pengamatan hipertrofi glomerulus dan glomerulosklerosis pada tikus model diabetes melitus tipe 1 terinduksi dengan aloksan	Pengamatan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada tikus model diabetes melitus tipe 2 terinduksi STZ dan NAD
2.	<i>Phaleria macrocarpa</i> Supress Nephropathy by Increasing Renal Antioxidant Enzyme Activity in Alloxan Induced Diabetes Rats	Triastuti <i>et al.</i> , 2009	Pengamatan kadar enzim antioksidan endogen ginjal (SOD, CAT, GPx, GSH), MDA, <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN), gula darah, dan hipertrofi ginjal tikus model diabetes melitus tipe 1 terinduksi aloksan yang diberi ekstrak metanol, etil asetat, butanol, dan air kulit buah mahkota dewa	Pengamatan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada tikus model diabetes melitus tipe 2 terinduksi STZ dan NAD yang diberi ekstrak metanol daging buah mahkota dewa
3.	Methanol Extract of <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl. Improved Renal and Liver Histological Changes in Fructose 10% Induced Rats	Yanti <i>et al.</i> , 2014	Pengamatan hipertrofi ginjal dan diameter vena sentralis tikus model sindrom metabolik terinduksi fruktosa 10%	Pengamatan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada tikus model diabetes melitus tipe 2 terinduksi STZ dan NAD

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Teoritis

Menambah khasanah ilmu pengetahuan mengenai khasiat buah mahkota dewa dalam pencegahan komplikasi DM tipe 2 pada ginjal yang bisa dijadikan *evidence based medicine*.

1.5.2. Praktis

a. Masyarakat

Adanya hasil penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat buah mahkota dewa terhadap pencegahan komplikasi DM tipe 2 pada ginjal.

b. Industri Obat

Hasil penelitian dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam pengembangan obat-obatan untuk penyakit DM tipe 2 dan komplikasinya pada ginjal.

c. Peneliti lain

Hasil penelitian dapat digunakan sebagai dasar informasi bagi pengembangan penelitian selanjutnya, terutama untuk uji klinis.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Telaah Pustaka

2.1.1. Diabetes Melitus

Diabetes melitus adalah sindrom kronis terkait gangguan metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid (Albert *et al.*, 2012) yang ditandai dengan hiperglikemia dikarenakan insufisiensi sekresi insulin atau resistensi insulin atau keduanya (Purnamasari, 2014). Diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 jenis yaitu DM tipe 1, DM tipe 2, DM tipe lain, dan DM gestasional. Diabetes melitus tipe 1 disebabkan oleh destruksi sel beta pankreas (penghasil insulin) karena reaksi autoimun dan paling sering terjadi pada anak-anak sehingga terjadi defisiensi total atau subtotal insulin. Diabetes melitus tipe 2 dikarenakan faktor heterogen yang menyebabkan penurunan jumlah reseptor sel target insulin, sehingga terjadi resistensi insulin yang diikuti gangguan sekresi insulin (Powers, 2012). Diabetes melitus tipe 2 adalah jenis diabetes melitus yang paling banyak terjadi hingga 90% dari total angka kejadian diabetes melitus di dunia (WHO, 2015). Diabetes melitus tipe lain dikarenakan defek genetik spesifik, infeksi, tumor, penggunaan obat atau senyawa kimia yang mengganggu kerja insulin. Diabetes melitus tipe gestasional dikarenakan perubahan hormonal yang menyebabkan perubahan metabolisme sehingga menyebabkan resistensi insulin (Powers, 2012).

Penyebab diabetes melitus tipe 2 bersifat multifaktorial yang dapat dipicu oleh beberapa faktor resiko seperti kelainan poligenik, obesitas, penuaan, kurangnya aktivitas fisik, dan hiperinsulinemia (Purnamasari, 2014). Lyssenko *et al.* (2008) melaporkan bahwa adanya riwayat keluarga yang menderita DM tipe 2, peningkatan *Body Mass Index* (BMI), peningkatan enzim hati, kebiasaan merokok, dan penurunan kadar dan kerja insulin merupakan faktor resiko dari DM tipe 2. Maka dari itu penyebab dari DM tipe 2 sulit ditegakkan secara tunggal.

Diabetes melitus tipe 2 secara garis besar memiliki beberapa tahap yang sama pada patogenesis. Hiperglikemia dan hiperinsulinemia adalah tahap awal dari DM tipe 2 sebagai respon dari sel β pankreas untuk menekan kadar gula darah tetap normal. Insulin yang berlebih ditangkap oleh miosit (sel otot skeletal), hepatosit,

dan adiposit sebagai sinyal untuk mengekspresikan *Glucose Transporter 4* (GLUT 4), suatu gerbang sel yang memfasilitasi influks glukosa dari ruang ekstraseluler ke dalam intraseluler sehingga kadar gula darah di ruang ekstraseluler termasuk darah tetap dalam kadar normal (Powers, 2012). Tingginya kadar lemak atau senyawa antara lemak intraseluler berperan pada resistensi insulin. Tingginya kadar lemak intraseluler akan menyebabkan penurunan efektivitas kerja mitokondria sehingga terjadi penumpukan senyawa antara lemak berupa Diasil Gliserol (DAG) dan peningkatan aktivitas Protein Kinase C (PKC). Senyawa tersebut mengganggu transduksi sinyal insulin. Gangguan transduksi sinyal insulin akan menyebabkan penurunan ekspresi GLUT 4, peningkatan glukoneogenesis di hepatosit, peningkatan kadar lemak bebas di darah, dan penurunan sekresi adipokin yang mengakibatkan resistensi insulin (Shulman, 2014). Akumulasi resistensi insulin yang terjadi di miosit, hepatosit, dan adiposit menyebabkan peningkatan kadar lemak dan glukosa darah yang mengakibatkan lipotoksisitas, glukotoksisitas, dan kegagalan kompensasi sekresi insulin pada sel β pankreas yang berakibat hiperglikemia dan hipoinsulinemia karena kematian sel β pankreas (Powers, 2012).

Keadaan DM tipe 2 yang akut maupun kronis dapat menimbulkan komplikasi jika tidak diobati dengan baik. Komplikasi akut DM tipe 2 yaitu ketoasidosis dan hiperglikemia hiperosmolaritas. Komplikasi kronis DM tipe 2 dapat berupa kelainan mikrovaskular (retinopati, nefropati, dan neuropati) dan makrovaskular (penyakit pembuluh darah perifer, serebrovaskuler, dan kardiovaskuler) (Powers, 2012). Komplikasi kronis DM tipe 2 diawali dengan keadaan hiperglikemia yang berkepanjangan. Hiperglikemia berkepanjangan dapat menyebabkan penumpukan sorbitol dan fruktosa intraseluler, pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs), stres oksidatif, peningkatan koagulasi, dan inflamasi sistemik. Hal tersebut dapat mengakibatkan iskemia dan hipoksia jaringan karena penyempitan pembuluh darah (Waspadji, 2014). Jeenger *et al.* (2014) melaporkan bahwa stres oksidatif yang diperantasi ROS dan RNS dapat secara langsung menyebabkan kerusakan jaringan tanpa menyebabkan hipoksia dan iskemia jaringan terlebih dahulu.

Menurut Purnamasari (2014), di Indonesia diagnosis DM dapat ditegakkan dengan beberapa kriteria yaitu,

1. Gejala klasik DM meliputi mudah lelah, polifagia, polidipsia, dan poliuria disertai kadar glukosa plasma >200 mg/dL (11,1 mmol/L) atau,
2. Gejala klasik DM disertai kadar glukosa plasma puasa (minimal 8 jam) >126 mg/dL (7,0 mmol/L) atau,
3. Glukosa plasma 2 jam postprandial 75 gr glukosa terlarut dalam air setelah puasa minimal 8 jam >200 mg/dL (11,1 mmol/L).

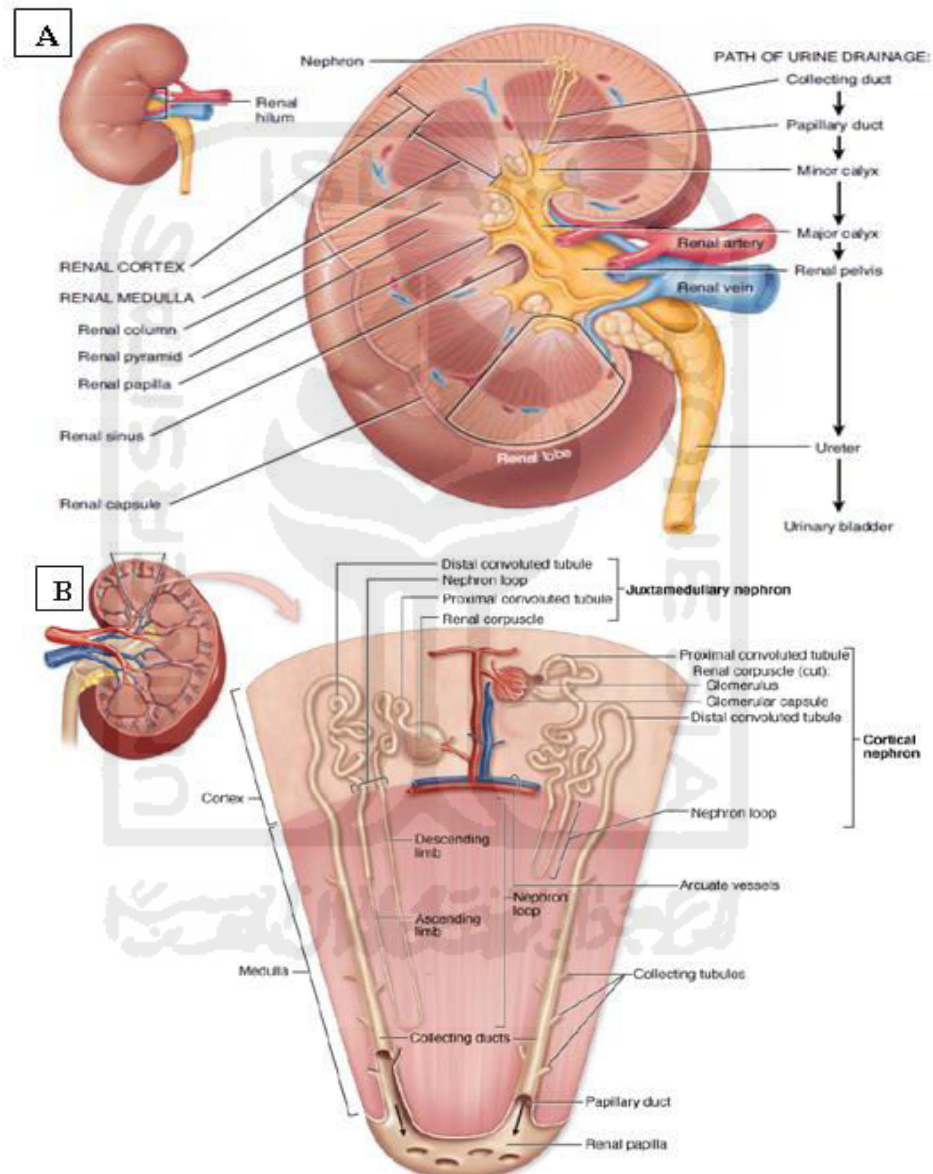
Kriteria menurut Purnamasari (2014) tersebut memiliki persamaan yaitu keadaan hiperglikemia yang dapat menyebabkan komplikasi DM kronis.

2.1.2. Ginjal

Ginjal merupakan organ utama dalam sistem ekskresi tubuh manusia yang berfungsi untuk mengeliminasi kelebihan air dan senyawa yang tidak dibutuhkan tubuh melalui urin. Ginjal terletak secara retroperitoneal dan dilapisi oleh tiga lapisan berurutan dari luar yaitu kapsula renalis berupa jaringan padat ireguler, kapsula adiposa, dan fasia renalis berupa jaringan ikat padat ireguler. Ketiga lapisan tersebut berfungsi melindungi ginjal dari trauma serta mempertahankan letak dan keutuhan ginjal. Secara anatomi ginjal dibagi menjadi bagian luar yaitu korteks dan bagian dalam yaitu medula dengan struktur tambahan berupa hilum renalis sebagai tempat masuknya pembuluh darah, pembuluh limfa, dan ureter (Gambar 1A) (Tortora dan Derrickson, 2014). Korteks dan medula merupakan struktur pembentuk jaringan parenkim ginjal dengan unit satuan kerja berupa nefron yang terdiri atas korpuskulum renal, tubulus konvolotus proksimal, lengkung nefron, tubulus konvolotus distal, dan duktus kolektivus (Gambar 1B) (Mescher, 2010).

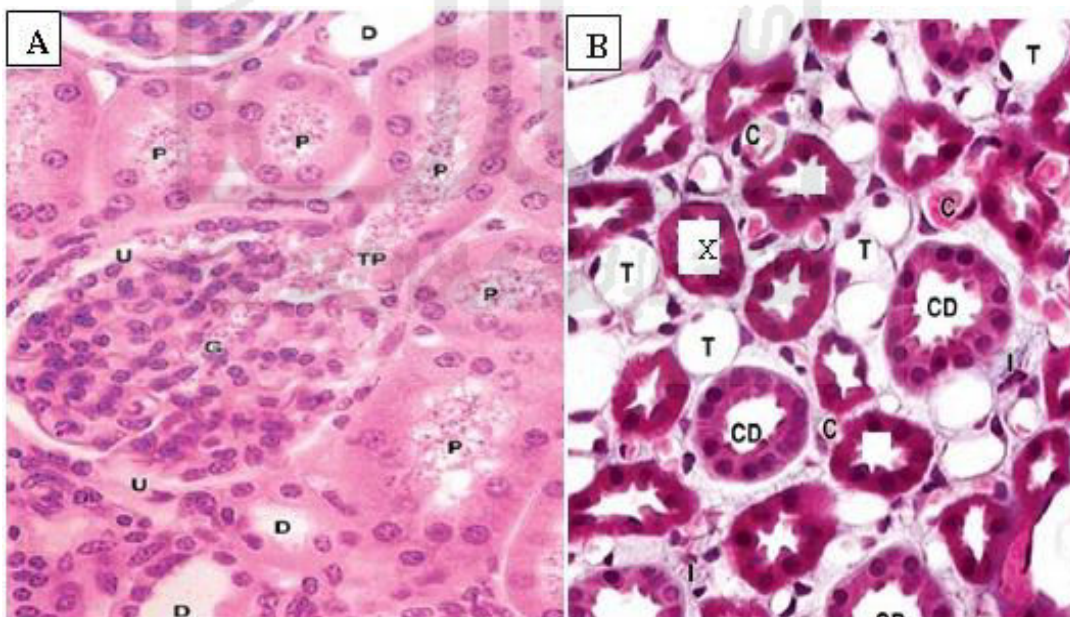
Korpuskulum renal merupakan salah satu struktur nefron yang berfungsi untuk filtrasi darah dan terletak pada korteks. Struktur korpuskulum renal terdiri dari anyaman kapiler (glomerulus) berasal dari arteriol aferen dan menjadi arteriol eferen, podosit, dan sel mesangial yang dibungkus oleh kapsula glomerular ber dinding epitel squamosa simpleks (Mescher, 2010). Endotel dan lamina basalis pembuluh darah, podosit, serta sel mesangial glomerulus membentuk sebuah mekanisme penyaringan yang berfungsi untuk membatasi zat larut air yang bisa

keluar ke spasiun glomerular. Zat larut air tersebut antara lain air, ion-ion, glukosa, vitamin, asam amino, protein plasma yang sanagt kecil, ammonia dan urea. Mekanisme penyaringan tersebut juga menghalangi keluarnya zat berukuran besar seperti eritrosit, leukosit, trombosit, albumin, dan molekul besar bermuatan negatif. Zat yang tersaring tersebut selanjutnya akan disalurkan ke tubulus konvolotus proksimal (Tortora dan Derrickson, 2014).



Gambar 1. Anatomi Ginjal. Anatomi ginjal terdiri dari korteks dan medula (A). Satu unit nefron (B) (Tortora dan Derrickson, 2014; Mescher, 2010).

Tubulus konvolotus proksimal dan distal terletak pada korteks (Gambar 2A) memiliki fungsi utama berupa reabsorpsi sebagian besar zat yang sudah terfiltrasi dari glomerulus yang dikendalikan oleh hormon aldosteron, *Antidiuretic Hormone* (ADH), dan *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP) (Mescher, 2010). Epitel kuboid simpleks yang memiliki mikrovili akan tampak tebal dan hampir menutupi lumen pada dinding tubulus konvolotus proksimal. Epitel tersebut memfasilitasi reabsorpsi terutama air, glukosa, asam amino, protein, dan ion-ion elektrolit seperti natrium, kalium, kalsium, klorida, bikarbonat, dan fosfat. Zat-zat yang direabsorpsi berfungsi untuk menjaga kadar elektrolit, pH, kadar glukosa, dan osmolaritas darah tetap normal. Tubulus konvolotus proksimal juga memiliki fungsi sekresi beberapa zat yang berlebih atau tidak dibutuhkan tubuh. Zat-zat tersebut antara lain ion kalium, ammonium, hidrogen serta obat-obatan yang dikonsumsi maupun kelebihan hormon yang larut air. Fungsi sekresi tersebut menjaga kadar elektrolit dan pH tubuh tetap dalam batas normal serta mengeliminasi zat yang tidak dibutuhkan atau bersifat toksik dari tubuh. Fungsi sekresi tertentu terutama air dalam pembentukan kepekatan urin dikendalikan oleh duktus kolektivus dan lengkung nefron yang terletak pada medula ginjal (Gambar 2B) (Tortora dan Derrickson, 2014).



Gambar 2. Histologi Ginjal. Korteks Ginjal (A) terdiri atas glomerulus (G), spasiun glomerular (U), lumen tubulus (TP), tubulus konvolotus proksimal (P), dan distal (D). Medula Ginjal (B) terdiri atas duktus kolektivus (CD), lengkung nefron tebal (X), lengkung nefron tipis (T), ruang intersisial (I), dan kapiler (C) (Mescher, 2010).

2.1.3. Nefropati Diabetik

Komplikasi kronis DM tipe 2 yang meliputi mikrovaskuler (retinopati, nefropati, neuropati) dan makrovaskuler (penyakit pembuluh darah perifer, serebrovaskuler, dan kardiovaskuler) (Powers, 2012) disebabkan iskemia dan hipoksia karena gangguan aliran darah serta kerusakan peroksidasi struktural langsung oleh ROS dan RNS (Waspadji, 2014). Nefropati diabetik ditandai dengan adanya mikroalbuminuria (30 mg/hari atau 20 μ g/menit) yang disertai peningkatan tekanan darah dan penurunan filtrasi glomerulus yang dapat menjadi ESRD (Hendromartono, 2014). Nefropati diabetik juga ditandai dengan perubahan ukuran ginjal, volume glomerulus, dan fungsi ginjal (Sheela *et al.*, 2013), perubahan struktural ginjal seperti perdarahan intertubulus, degenerasi dan nekrosis epitel tubulus (Esther dan Manonmani, 2014).

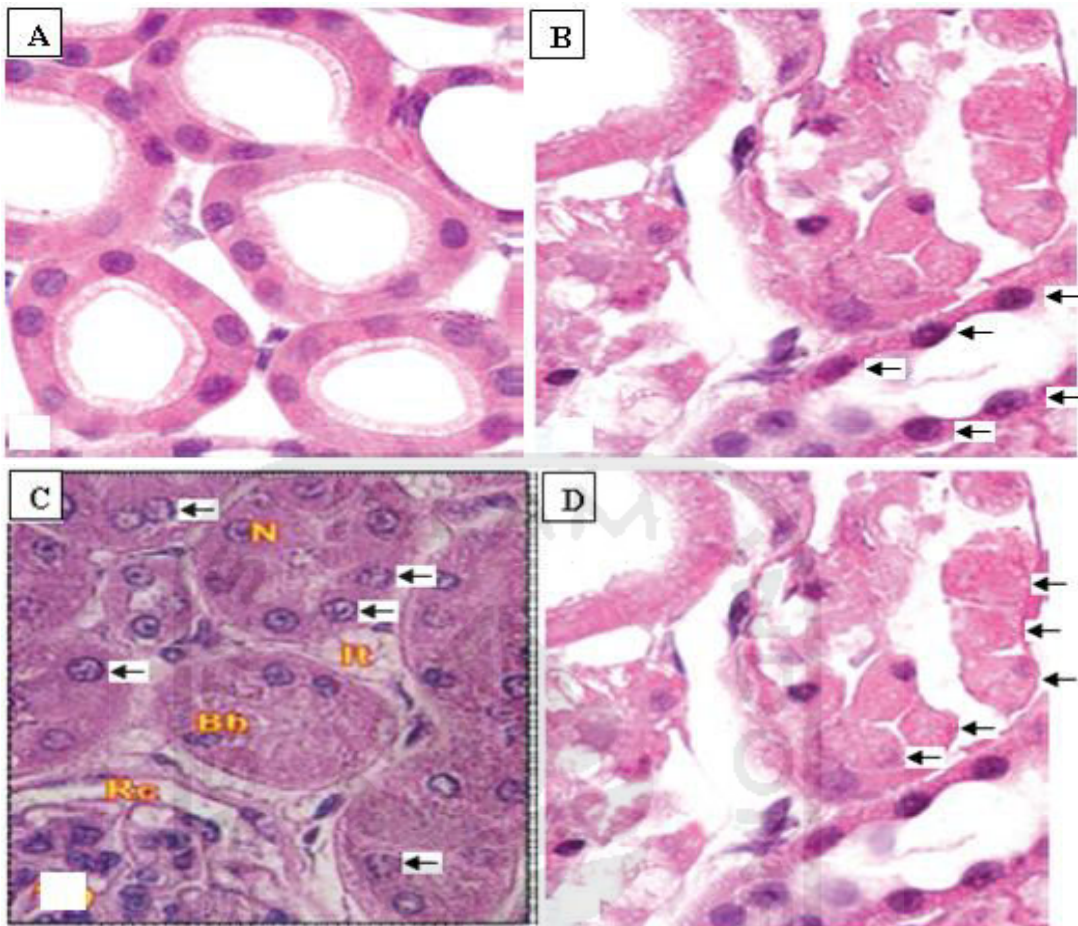
Nefropati diabetik dapat disebabkan oleh beberapa mekanisme yang diawali dengan hiperglikemia kronis. Glukosa berlebih pada ruang ekstraseluler dapat masuk ke dalam sel-sel di organ ginjal melalui *Glucose Transporter 1* (GLUT1), gerbang sel yang memfasilitasi influks glukosa dan tidak tergantung insulin, sehingga terjadi hiperglikemia intraseluler (Hendromartono, 2014). Hiperglikemia intraseluler tak terkendali dapat terjadi pada sel-sel ginjal seperti epitel glomerulus, sel mesangial, dan epitel tubulus konvolotus proksimal. Glukosa intraseluler berlebih dapat dimetabolisme dengan jalur glikolisis hingga fosforilasi oksidatif di mitokondria yang menghasilkan hasil samping berupa karbon dioksida (CO₂) dan ROS (Forbes *et al.*, 2008). Glukosa intraseluler berlebih juga dapat dimetabolisme dengan jalur poliol, DAG, dan heksoamin. Peningkatan DAG intraseluler dapat mengaktifkan PKC dan *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) yang menyebabkan ekspresi GLUT 1 dan TGF- β , sehingga mengakibatkan influks glukosa berlebih dan peningkatan ekspresi matriks ekstraseluler (MES) seperti kolagen, fibronektin, dan laminin yang disertai penghambatan degradasi MES. Penimbunan MES dapat diperbanyak dengan keadaan hiperglikemia, dimana MES yang tersusun atas protein dapat mengalami glikosilasi nonenzimatik oleh glukosa menjadi AGEs yang sulit untuk diuraikan. *Advanced Glycated End Products* dapat berikatan dengan *Receptor Advanced Glycated End Products* (RAGE) pada sel-sel ginjal yang menyebabkan

peningkatan aktivitas PKC dan MAPK sehingga menyebabkan ekspresi TGF- β , sitokin proinflamasi, angiotensinogen, serta pembentukan ROS (Hendromartono, 2014).

Reactive Oxygen Species yang meliputi superoksida (O_2^-), hidroksil ($\bullet OH$), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan hasil dari reaksi reduksi parsial oksigen dan bersifat tidak stabil karena kekurangan elektron pada elektron berpasangannya, sehingga membutuhkan donor elektron yang bisa didapat dari DNA, glukosa, protein, dan lipid (Ray *et al.*, 2014). Reaksi oksidasi terhadap DNA, glukosa, protein, dan lipid yang merupakan komponen struktural sel dapat menyebabkan kerusakan sel (Soeksanto *et al.*, 2007) yang berakibat apoptosis atau nekrosis (Kumar *et al.*, 2013). Reaksi oksidasi terhadap lipid pada membran sel dapat menghasilkan radikal peroksil ($\bullet RO_2$) yang tidak stabil, sehingga dapat menyebabkan reaksi berantai pada senyawa lainnya.

Epitel tubulus ginjal yang mengalami kerusakan dapat ditunjukkan dengan perubahan gambaran histologi dibandingkan dengan epitel tubulus ginjal normal. Kerusakan awal yang bersifat reversibel ditunjukkan dengan pembentukan gelembung di permukaan sel, peningkatan eosinofilia sitoplasma, dan pembengkakan sel yang mengalami kerusakan. Sel tubulus ginjal yang mengalami kerusakan ireversibel atau nekrosis ditunjukkan dengan hilangnya nukleus, fragmentasi sel, kebocoran sitoplasma, dan hilangnya integritas antar sel (Kumar *et al.*, 2013).

Nekrosis tubulus ginjal dapat diidentifikasi dari pola gambaran sel. Pola nekrosis pertama adalah piknosis yang ditandai dengan kondensasi dan peningkatan basofilia nukleus serta peningkatan eosinofilia sitoplasma. Piknosis dapat disertai dengan gambaran sel yang menjadi pipih (Gambar 3B) (Yang *et al.*, 2007). Pola nekrosis kedua adalah karioreksis yang ditandai dengan fragmentasi nukleus piknosis (Gambar 3C) (Abdelhalim dan Jarrar, 2011). Pola nekrosis ketiga adalah kariolisis yang ditandai dengan hilangnya basofilia nukleus akibat hidrolisis kromatin oleh enzim *Deoxyribonuclease* (DNase) dan menyisakan sitoplasma tanpa nukleus (Gambar 3D). Gambaran nekrosis selanjutnya hanya menyisakan debris sitoplasma tanpa integritas yang jelas (Kumar *et al.*, 2013).



Gambar 3. Perbandingan Nekrosis Sel Tubulus Ginjal. Epitel tubulus ginjal normal (A). Epitel tubulus ginjal yang mengalami piknosis (tanda panah) (B). Epitel tubulus ginjal yang mengalami karioreksis (tanda panah) (C). Epitel tubulus ginjal yang mengalami kariolisis (tanda panah), sel epitel tubuler normal (N), ruang intersisial (It), mikrovili (Bb), korpuskulum renal (Rc) (D) (Kumar *et al.*, 2013; Hummdi, 2012).

2.1.4. Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Hewan coba eksperimental merupakan subjek yang lazim digunakan dalam penelitian untuk memahami patogenesis, komplikasi, pengujian obat, dan pengaruh genetik maupun lingkungan sebagai faktor resiko DM. Hewan coba dapat diinduksi dengan manipulasi genetik, makanan, operatif, dan induksi dengan zat kimia atau kombinasi untuk dapat menimbulkan DM (Srinivasan dan Ramarao, 2007). Jenis hewan coba yang memiliki kemiripan karakteristik endokrin dengan manusia dan lazim digunakan ialah tikus dan mencit (Islam dan Loots, 2009).

Induksi DM pada hewan coba dapat menggunakan zat kimia yang menyebabkan destruksi sel beta pankreas seperti aloksan dan streptozotosin (STZ)

(Etuk, 2010). Streptozotosin bersifat sitotoksik terhadap sel beta pankreas dengan cara meningkatkan kadar nitrit oksida (NO) intraseluler yang berakibat kerusakan DNA oleh NO, peningkatan produksi ROS yang dapat menyebabkan kerusakan DNA, glukosa, protein, dan lipid struktural sel beta pankreas, serta deplesi ATP sebagai energi akibat penurunan *Nicotinamide Adenin Dinucleotide* teroksidasi (NAD^+) (Szkuldeski, 2012). Kombinasi dari tiga mekanisme toksik tersebut dapat menyebabkan kematian atau destruksi sel beta pankreas yang bersifat analog DM tipe 1 pada manusia.

Kondisi destruksi sel beta pankreas dapat dikendalikan dengan mempertahankan kadar NAD^+ . Sifat sitotoksik STZ pada hewan coba yang dapat meningkatkan ROS dan deplesi NAD^+ dapat terhambat dengan pemberian nikotinamid (NAD) sebagai bahan dasar pembentukan NAD^+ . Kadar NAD^+ yang dijaga akan mempertahankan produksi ATP dan menghambat ketersediaan substrat *xantine oxidase* untuk membentuk ROS (Lenzen, 2008). Pemberian STZ yang diikuti NAD akan menyebabkan destruksi sel beta pankreas secara terkendali yang menyebabkan kondisi hiperglikemia tanpa perubahan kadar insulin plasma dan berakhir pada resistensi insulin, sehingga analog dengan kondisi DM tipe 2 pada manusia (Srinivasan dan Ramarao, 2007). Induksi kombinasi STZ dan NAD pada tikus dilaporkan dapat menimbulkan komplikasi seperti DM tipe 2 pada manusia yang salah satunya ialah nefropati diabetik yang timbul 4 hingga 8 minggu setelah pemberian kombinasi STZ dan NAD (Esther dan Manonmani, 2014).

Pemberian STZ untuk tikus yang dikombinasikan dengan pemberian NAD dapat dilakukan secara intraperitoneal, atau subkutan, atau intravena. Dosis STZ yang diperlukan untuk dapat menginduksi DM tipe 1 sebesar 80 hingga 100 mg/KgBB dosis tunggal (Szkuldeski, 2012), sedangkan dosis yang diperlukan setelah pemberian NAD untuk induksi DM tipe 2 sebesar 65 mg/KgBB pada tikus galur *Wistar* atau *Sprague Dawley* (Srinivasan dan Ramarao, 2007). Pemberian NAD dapat dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 230 mg/KgBB kemudian diikuti dengan pemberian STZ setelah 15 menit pemberian NAD (Srinivasan dan Ramarao, 2007; Esther dan Manonmani, 2014).

2.1.5. Mahkota Dewa

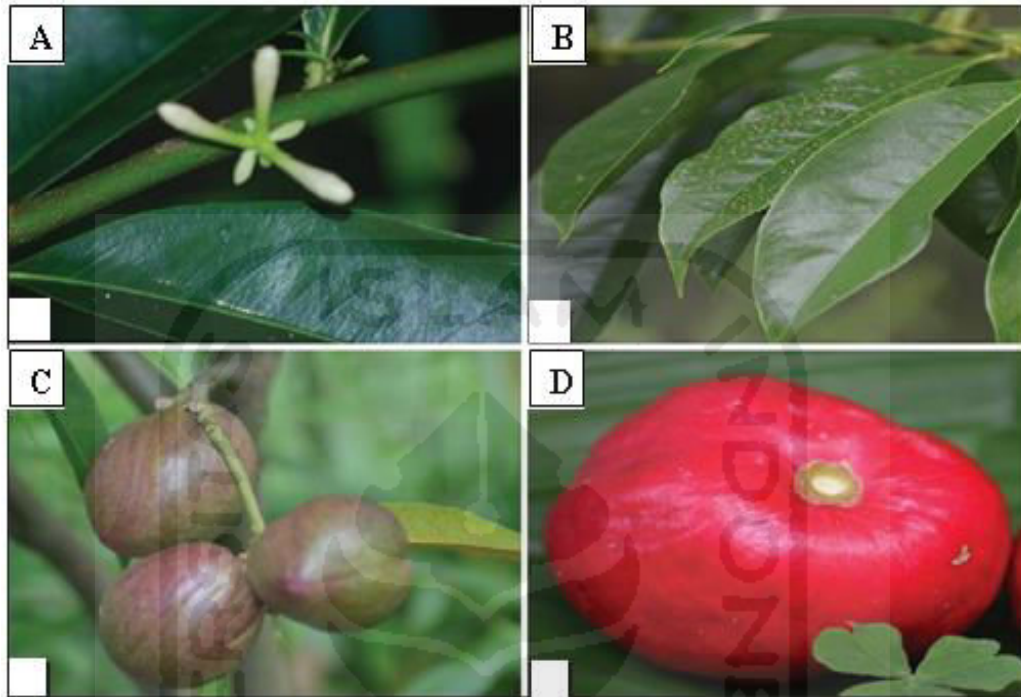
Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) adalah tanaman yang berasal dari Papua, Indonesia. Mahkota dewa juga dikenal dengan nama *crown of god* (Hendra *et al.*, 2011). Taksonomi tanaman mahkota dewa adalah sebagai berikut,

Kingdom	: Plantae
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Thymelaeales
Suku	: Thymelaeaceae
Marga	: Phaleria
Spesies	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl.

Mahkota dewa tumbuh pada iklim tropis dan memiliki struktur tanaman lengkap meliputi batang, daun, bunga, dan buah (Hendra *et al.*, 2011). Tinggi pohon mahkota dewa berkisar antara 1 hingga 18 meter dengan kulit batang hijau kecoklatan dan kayu berwarna putih. Mahkota dewa tumbuh di ketinggian 10 hingga 1.200 m di atas permukaan laut dengan usia produktif berkisar dari 10 sampai 20 tahun. Daun mahkota dewa berwarna hijau meruncing dengan panjang mulai dari 7 hingga 10 cm dan lebar 3 hingga 5 cm seperti pada Gambar 4B. Bunga mahkota dewa berwarna hijau hingga merah marun berjumlah majemuk dan tersusun secara berkelompok yang terdiri dari 2 hingga 4 bunga tiap kelompok seperti pada Gambar 4A (Altaf *et al.*, 2013). Buah mahkota dewa berwarna hijau ketika belum matang dan berwarna merah ketika matang berbentuk gerhana dengan diameter sekitar 3 cm seperti pada Gambar 4C dan 4D (Hendra *et al.*, 2011). Biji mahkota dewa berjumlah 1 hingga 2 biji tiap buah dan berwarna coklat berbentuk bulat telur dan anatrop (Altaf *et al.*, 2013).

Mahkota dewa memiliki kandungan zat aktif yang dapat dimanfaatkan di dunia medis pada buah, daun, batang, dan akar. Buah mahkota dewa secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan DM, kanker, penyakit hati, penyakit kardiovaskuler, gangguan ginjal dan lainnya. Daging buah mahkota dewa adalah bagian buah yang memiliki kandungan zat aktif tinggi meliputi fenol dan flavonoid, sehingga banyak penelitian yang mengaji manfaat dari ekstrak daging

buah mahkota dewa (Hendra *et al.*, 2011). Alkaloid memiliki fungsi detoksifikasi racun secara umum, terpenoid dan saponin memiliki fungsi antiinflamasi, analgesik, dan sitotoksik, sedangkan phalerin dapat berperan sebagai antioksidan (Simanjuntak, 2008).



Gambar 4. Mahkota Dewa. Bunga mahkota dewa (A). Daun mahkota dewa (B). Buah mahkota dewa muda (C). Buah mahkota dewa matang (D) (Altaf *et al.*, 2013).

Flavonoid pada daging buah mahkota dewa meliputi kaempferol, myricetin, naringin, rutin dan quercetin memiliki manfaat dalam pengobatan DM. Flavonoid pada mahkota dewa bersifat antihiperqlikemia dengan menghambat enzim α -glukosidase secara reversibel, sehingga dapat menurunkan absorpsi glukosa pada saluran cerna (Ali *et al.*, 2013). Flavonoid juga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghambat reaksi oksidasi termasuk pembentukan ROS serta dapat menetralkan radikal bebas seperti radikal hidroksil (\bullet OH) dengan cara reduksi atau donor elektron. Flavonoid mahkota dewa juga memiliki fungsi antiinflamasi yang ditunjukkan dengan kemampuannya dalam mengeradikasi NO sebagai salah satu mediator inflamasi (Hendra *et al.*, 2011). Triastuti *et al.* (2009) melaporkan bahwa ekstrak metanol daging buah mahkota dewa juga dapat meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti SOD, CAT, GPx, dan GSH dan menurunkan kadar MDA sebagai penanda stres oksidatif pada ginjal dengan dosis 250 mg/KgBB.

2.1.6. Vitamin E

Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang terdapat pada membran plasma sel tubuh, termasuk sel tubulus pada ginjal. Vitamin E dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan memutus reaksi oksidasi berantai oleh ROS yang menghasilkan radikal peroksil (Agarwal *et al.*, 2008). Fungsi antioksidan tersebut dapat mempertahankan struktur membran plasma sel dan peroksidasi lipid akibat ROS serta menetralkan ROS pada keadaan stres oksidatif (Hong *et al.*, 2010). Keadaan stres oksidatif yang terjadi pada DM juga dapat ditekan dengan vitamin E untuk menghindari komplikasi DM pada beberapa organ seperti nefropati (Waspadji, 2014).

Beberapa penelitian yang mengaji kasus nefrotoksikosis pada tikus, pemberian vitamin E dapat mencegah kenaikan kadar urea darah (Atasayar *et al.*, 2009), menurunkan proses peroksidasi lipid dan produksi NO, serta meningkatkan kadar SOD dan CAT pada organ ginjal (Armagan *et al.*, 2008). Pemberian vitamin E pada studi gagal ginjal akut juga dapat menurunkan kadar kreatinin darah (Kitzler *et al.*, 2012) dan menurunkan kadar MDA ginjal pada kasus stres oksidatif akibat hiperkolestrolemia (Prasad *et al.*, 2012). Penelitian lain yang mengaji manfaat vitamin E pada kasus nefropati diabetik menunjukkan penurunan kadar MDA dan NO ginjal, penurunan kadar BUN dan kreatinin darah, serta peningkatan GPx dan GSH ginjal (Ozkaya *et al.*, 2011; Haidara *et al.*, 2009). Penurunan senyawa NO berlebih yang bersifat proinflamasi dapat mengurangi proses inflamasi, sehingga kadar mediator inflamasi lain yang menyebabkan kerusakan dan fibrosis pada ginjal dapat menurun. Penurunan kadar BUN dan kreatinin darah sendiri menunjukkan perbaikan fungsi filtrasi ginjal pada korpuskulum renal. Parameter kerusakan ginjal mikroskopis juga dapat dikendalikan dengan pemberian vitamin E seperti inflamasi perivaskular, kerusakan umum tubulus (Atasayar *et al.*, 2009), vakuolisasi sitoplasma, infiltrasi seluler, atrofi glomerulus, dan nekrosis sel tubulus ginjal (Aslam *et al.*, 2010) pada kasus nefrotoksikosis. Momeni dan Eskandari (2012) melaporkan bahwa dosis vitamin E sebesar 100 mg/KgBB secara oral dapat memberikan efek perlindungan terhadap stres oksidatif untuk mencegah kerusakan jaringan akibat ROS.

2.4. Hipotesis

Terdapat perbedaan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antara yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan vitamin E pada tikus model diabetes melitus tipe 2.



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only-control group*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2015 hingga Maret 2017, bertempat di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Farmakologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Islam Indonesia, serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian yaitu bahan biologi tersimpan berupa blok parafin ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan yang telah mendapat perlakuan sebelum berumur 2-3 bulan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dengan sampel dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) dengan judul Perbedaan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penelitian tersebut menggunakan tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* sebagai subjek penelitian.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang akan digunakan berjumlah 20 blok parafin ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*. Penelitian ini tidak melakukan pengacakan dan penentuan kriteria inklusi maupun eksklusi. Pengacakan serta penentuan kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan pada penelitian sebelumnya yaitu penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015).

Sampel penelitian berjumlah 20 terbagi menjadi 4 kelompok. Tiap kelompok terdapat 5 sampel. Pengelompokan sampel tersebut sesuai dengan perlakuan yang diberikan pada penelitian sebelumnya sebagai berikut,

1. Hewan coba sehat yang mendapatkan perlakuan berupa aquades 1 mL secara oral (K1),
2. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan perlakuan berupa aquades 1 mL secara oral (K2),
3. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa 250 mg/KgBB secara oral (P1),
4. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan vitamin E secara oral 100 mg/KgBB (P2).

Kondisi DM tipe 2 diinduksi dengan injeksi NAD (230 mg/KgBB) yang diikuti dengan injeksi STZ (65 mg/KgBB) secara intraperitoneal dengan selisih waktu injeksi NAD dan STZ selama 15 menit, sedangkan hewan coba sehat diberikan injeksi pelarut NAD dan STZ secara intraperitoneal sebagai plasebo. Perlakuan diberikan setelah gula darah hewan coba terkonfirmasi sesuai kelompok perlakuan hewan coba selama 6 minggu. Dasar pengambilan jumlah sampel tiap kelompok berdasarkan jumlah minimal dengan cadangan 1 sampel tiap kelompok yang dihitung dengan rumus *Resource Equation* (Charan *et al.*, 2013) sebagai berikut,

$$E = (\text{Jumlah total hewan coba} - \text{Jumlah total kelompok})$$

Keterangan: E: *Degree of Freedom* (DF)

Angka E dianggap optimal jika dalam rentang 10 hingga 20 (Charan *et al.*, 2013).

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian vitamin E dosis 100 mg/kgBB dan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dosis dengan dosis 250 mg/kgBB.

3.4.2. Variabel Tergantung

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel tubulus ginjal nekrosis tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa

Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan dosis 250 mg/kg (Triastuti *et al.*, 2009). Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa adalah hasil ekstraksi daging buah mahkota dewa dengan metanol, diberikan pada kelompok perlakuan mahkota dewa dengan dosis 250 mg/kg berat badan, satu kali sehari per sonde selama 6 minggu. Buah mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Merapi Herbal Farma dari pohon yang tumbuh di daerah Kaliurang, Sleman, Yogyakarta. Sebagian tanaman mahkota dewa yang dipergunakan pada penelitian ini dideterminasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas MIPA UII. Surat determinasi buah mahkota dewa terlampir pada Lampiran 5. Pembuatan ekstrak ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas MIPA. Langkah-langkah metode pembuatan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa terlampir pada Lampiran 6.

3.5.2. Vitamin E

Vitamin E adalah serbuk farmagrid vitamin E yang didapatkan dari perusahaan farmasi Dexa Medika, diberikan pada kelompok perlakuan vitamin E dengan dosis 100 mg/kg berat badan, satu kali sehari per sonde selama 6 minggu (Momeni dan Eskandari, 2012).

3.5.3. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis

Jumlah sel tubulus ginjal nekrosis adalah jumlah sel teramati yang mengalami nekrosis (piknosis dan karioreksis) dan masih memiliki gambaran batas inti sel yang jelas pada tubulus konvolotus proksimal dan distal berpenampang bulat pada korteks ginjal kanan. Gambaran piknosis dan karioreksis terdapat pada Gambar 3. Jumlah tubulus yang diamati sebanyak 100 tubulus yang diambil secara acak dan merata dari 5 lapang pandang berbeda (Zhang *et al.*, 2008). Skema tata cara pengambilan lapang pandang dilampirkan pada Lampiran 2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX21 yang dilengkapi Optilab ginjal kanan masing-masing kelompok hewan coba.

3.5.4. Berat Badan Tikus

Berat badan tikus adalah massa hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) pada akhir perlakuan sebelum terminasi yang diukur dengan neraca massa dengan ketelitian 0,01 gram.

3.5.5. Berat Ginjal

Berat ginjal adalah massa ginjal kanan hewan coba (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) yang diukur setelah tahap terminasi dengan menggunakan neraca massa dengan ketelitian 0,001 mg.

3.5.6. Volume Ginjal

Volume ginjal adalah volume organ ginjal kanan hewan coba (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) yang diukur setelah tahap terminasi dengan menggunakan gelas ukur dengan ketelitian 0,5 mL. Pengukuran dilakukan dengan mengamati selisih perubahan aquades pada gelas ukur sebelum dan sesudah ginjal kanan dimasukkan (Larkin *et al.*, 2012).

3.5.7. Indeks Relatif Organ

Indeks relatif organ adalah persentasi berat ginjal dibanding berat badan tikus dalam persen. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung berat ginjal dibagi berat badan tikus dikali seratus (Aniagu *et al.*, 2005).

3.6. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

3.6.1. Alat Penelitian

1. Alat-alat gelas
2. Set alat bedah
3. Tempat penampung hewan coba dan organ yang diawetkan
4. Seperangkat alat untuk preparasi dan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)
5. Mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan Optilab

3.6.2. Bahan Penelitian

1. Ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang telah mendapat perlakuan sebanyak 20 buah.
2. Aquadestilata

3. Bahan-bahan untuk prosesi jaringan dengan metode parafin
4. Bahan-bahan untuk pewarnaan HE

3.7. Alur Penelitian

3.7.1. Terminasi

Pada akhir perlakuan dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015), seluruh hewan coba dikorbankan dengan cara dekapitasi dibawah anestesi ringan menggunakan eter, kemudian dilakukan pengambilan ginjal kanan. Ginjal kemudian diukur berat dan volumenya sebelum disimpan dalam tabung berisi larutan PBS formalin untuk persiapan pembuatan preparat mikroskopis.

3.7.6. Pembuatan Preparat Mikroskopis

Organ ginjal yang telah difiksasi kemudian diambil untuk dibuat preparat mikroskopis metode parafin dan pewarnaan HE di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gajah Mada. Langkah-langkah pembuatan preparat mikroskopis secara terinci dilampirkan pada bagian Lampiran 1.

3.7.7. Pengamatan Preparat Mikroskopis

Dari sediaan yang diperiksa, ditentukan lapang pandang yang akan diamati dengan pola yang sama menggunakan perbesaran 40X untuk menentukan 5 lapang pandang terpilih dan selanjutnya perbesaran 100X untuk menentukan 2 lapang pandang terpilih. Skema tata cara penentuan lapang pandang yang akan diamati dilampirkan pada Lampiran 2. Total 10 lapang pandang terpilih akan diamati gambaran nekrosis sel tubulus ginjal yang ditemukan sebanyak 10 tubulus untuk masing-masing lapang pandang terpilih. Pengamatan ciri gambaran nekrosis sel tubulus ginjal dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400X. Gambaran nekrosis (piknosis dan karioreksis) sel tubulus terdapat pada Gambar 3. Semua pengamatan preparat histologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dilengkapi dengan optilab dan dilakukan dokumentasi data penelitian. Pengamatan dilakukan secara *single blind* oleh peneliti dibantu 1 orang interobserver. Validitas pengamatan dilakukan dengan melakukan uji t berpasangan terhadap hasil pemeriksaan. Hasil pengamatan dianggap valid jika nilai $p > 0,05$.

3.8. Analisis Data

Analisis dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS versi 15.00 untuk OS. Microsoft Windows XP. Karakteristik hewan coba ditampilkan dalam tabel yang mencantumkan rerata dan standar deviasi. Uji normalitas dilakukan dengan Uji *Saphiro Wilk*. Hasil data yang menunjukkan terdistribusi secara normal dilanjutkan dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) 1 jalan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok subjek penelitian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD*. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

3.9. Etika Penelitian

Pada penelitian akan selalu diusahakan untuk dilakukan langkah-langkah etika penelitian yaitu,

1. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, maupun kegagalan, dan keberhasilan penelitian,
2. Peneliti telah mengajukan kaji etik kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia sebelum melaksanakan prosedur penelitian di laboratorium dan telah mendapatkan persetujuan dengan nomor registrasi 38/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2016. Surat keterangan lolos kaji etik terlampir pada Lampiran 4.
3. Peneliti menggunakan ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang didapat dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) dengan judul Perbedaan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang telah disetujui Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor registrasi 21/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2015. Surat *ethical clearance* tersebut dilampirkan pada Lampiran 3.

4. Peneliti telah mengajukan permohonan izin terlebih dahulu sebelum melaksanakan penelitian. Permohonan izin ditujukan untuk laboratorium farmakologi sebagai tempat nekropsi dan laboratorium histologi sebagai tempat pengamatan data Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian dilakukan selama 12 bulan sejak Desember 2015 hingga Maret 2017 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Farmakologi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia, serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Penelitian juga telah lolos kaji etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor registrasi 38/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2016. Surat keterangan lolos kaji etik dilampirkan pada Lampiran 4.

Subjek dalam penelitian ini adalah blok parafin ginjal kanan tikus putih *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* berjenis kelamin jantan yang sudah mendapatkan perlakuan pada penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015). Penelitian tersebut membagi subjek penelitian menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 5 ginjal kanan untuk masing-masing kelompok. Kelompok kontrol sehat adalah ginjal kanan yang didapat dari tikus sehat yang mendapatkan sonde aquades 1 mL tiap hari selama 6 minggu (K1). Kelompok kontrol DM tipe 2 adalah subjek penelitian yang didapat dari tikus DM tipe 2 yang mendapatkan sonde aquades 1 mL tiap hari selama 6 minggu (K2). Kelompok perlakuan mahkota dewa adalah subjek penelitian yang didapat dari tikus DM tipe 2 yang mendapatkan sonde ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan dosis 250 mg/KgBB tiap hari selama 6 minggu (P1). Kelompok perlakuan vitamin E adalah subjek penelitian yang didapat dari tikus DM tipe 2 yang mendapatkan sonde vitamin E dengan dosis 100 mg/KgBB tiap hari selama 6 minggu (P2). Kondisi DM tipe 2 diinduksi dengan NAD (230 mg/KgBB) dan STZ (65 mg/KgBB) dengan pelarut *buffer* sitrat pH 4,5, sedangkan kelompok kontrol sehat hanya mendapat injeksi *buffer* sitrat dan aquades sebagai plasebo. Perlakuan selama 6 minggu diberikan setelah konfirmasi pemeriksaan gula darah puasa ≥ 126 mg/dL bagi kelompok DM tipe 2

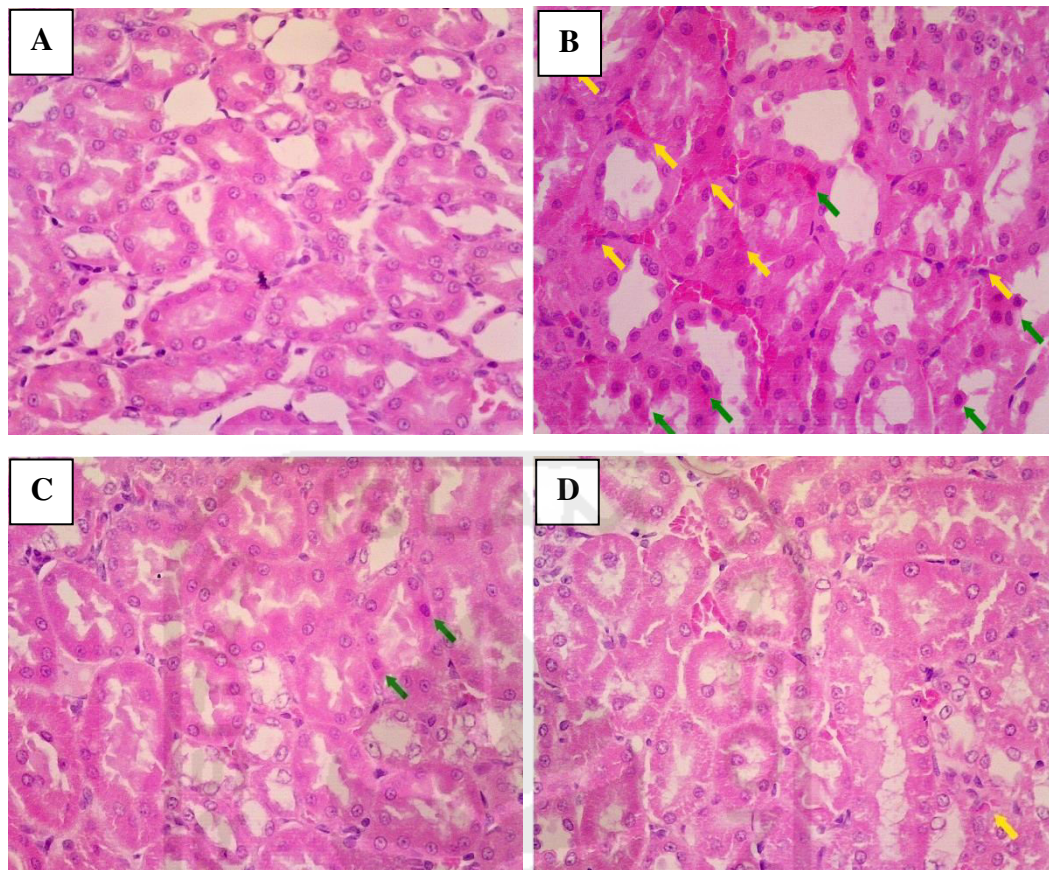
dan ≤ 126 mg/dL bagi kelompok sehat setelah 72 jam pascainjeksi NAD dan STZ atau plasebo. Kriteria inklusi dan eksklusi serta pengacakan dengan rancangan acak lengkap dilakukan pada subjek penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015). Pengukuran berat badan tikus putih *Rattus norvegicus* (*Sprague Dawley*) dilakukan pada akhir perlakuan yang dilanjutkan dengan nekropsi ginjal kanan untuk dilakukan pengukuran berat dan volume. Berikut hasil rerata pengukuran tersebut,

Tabel 2. Hasil Data Pengukuran Karakteristik Subjek Penelitian.

Kelompok	Berat Badan Tikus (gr)	Berat Ginjal (mg)	Volume Ginjal (mL)	Indeks Relatif Organ (%)
K1	280,64 \pm 20,62	0,82 \pm 0,06	0,90 \pm 0,22*	0,29 \pm 0,02
K2	231,28 \pm 64,65	0,69 \pm 0,06	0,50 \pm 0,00	0,31 \pm 0,06
P1	272,62 \pm 9,03	0,80 \pm 0,09	0,90 \pm 0,22*	0,29 \pm 0,04
P2	245,90 \pm 21,55	0,73 \pm 0,08	1,00 \pm 0,00*	0,30 \pm 0,05

Keterangan: (*) menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok K2 (Hasil Uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan Uji *Mann-Whitney*). Kelompok kontrol sehat (K1). Kelompok kontrol DM tipe 2 (K2). Kelompok perlakuan mahkota dewa (P1). Kelompok perlakuan vitamin E (P2). (Data dalam rerata \pm standar deviasi)

Hasil pengukuran data pengukuran tersebut dilakukan akhir perlakuan minggu 6 sebelum dekapitasi (berat badan) dan setelah nekropsis ginjal kanan (berat ginjal dan volume ginjal). Berdasarkan hasil pengukuran data karakteristik subjek penelitian tersebut, terdapat perbedaan bermakna volume ginjal kanan antara kelompok K1, P1, dan P2 dibandingkan dengan kelompok K2 ($p < 0,05$). Data hasil pengukuran karakteristik hewan coba yang lainnya tidak menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p > 0,05$). Hasil analisis statistik berat badan tikus, berat ginjal, volume ginjal, dan indeks relatif organ terlampir pada Lampiran 7, 8, 9, dan 10. Karakteristik subjek penelitian secara mikroskopis umum menunjukkan beberapa gambaran perdarahan intertubulus dan jejas reversibel pada korteks ginjal kanan kelompok K2 (Gambar 5B), sedangkan gambaran mikroskopis secara umum kelompok K1, P1, dan P2 menunjukkan gambaran normal (Gambar 5A, C, D).

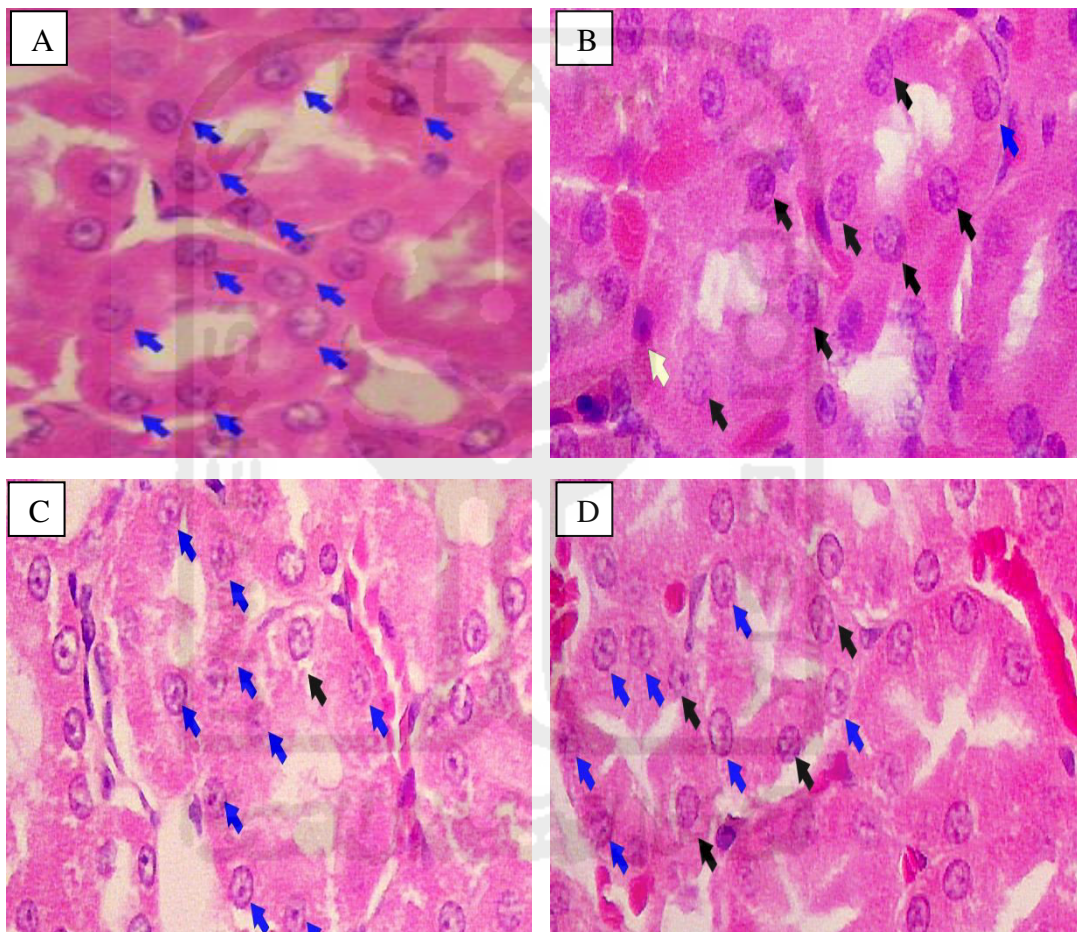


Gambar 5. Gambaran Mikroskopis Umum Korteks Ginjal Subjek Penelitian. Korteks ginjal kelompok kontrol sehat (K1) (A). Korteks ginjal kelompok kontrol DM tipe 2 (K2) yang menunjukkan gambaran perdarahan (panah kuning) dan jejas sel reversibel (panah hijau) (B). Korteks ginjal kelompok perlakuan mahkota dewa (P1) (C). Korteks ginjal kelompok perlakuan vitamin E (P2) (D).

4.1.2. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis

Penelitian dimulai dengan dekapitasi hewan coba pada penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) di bawah anestesi ringan eter. Nekropsi ginjal kanan kemudian dilakukan untuk dibuat preparat mikroskopis dengan metode blok parafin dan pewarnaan HE. Pengamatan preparat mikroskopis dilakukan untuk menentukan tubulus yang akan diamati dan menghitung jumlah sel tubulus ginjal nekrosis. Jumlah tubulus yang diamati sebanyak 100 tubulus yang diambil secara acak dari tiap preparat mikroskopis ginjal kanan. Pengamatan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400X. Seluruh pengamatan preparat mikroskopis tersebut dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan Optilab. Hasil pengamatan sel tubulus nekrosis ditampilkan pada Gambar 6.

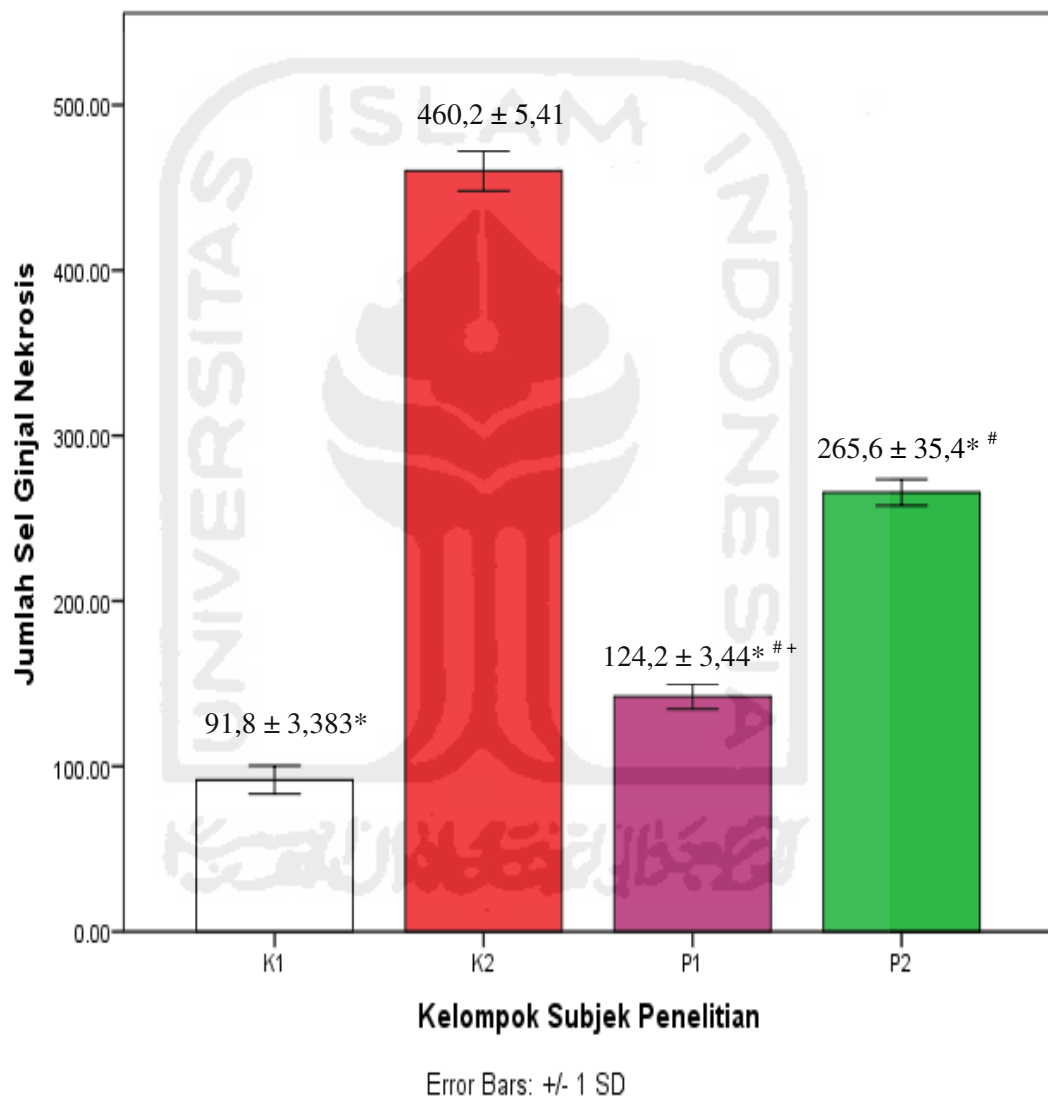
Sel tubulus ginjal yang diamati adalah sel yang masih memiliki gambaran batas inti sel yang utuh dan jelas dari tubulus yang bulat. Pengamatan dilakukan secara *single blinding* dengan 1 interobserver. Perbandingan hasil pengamatan peneliti dengan interobserver menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara bermakna dengan nilai $p > 0,05$ yang ditunjukkan pada Lampiran 11. Data hasil pengamatan peneliti selanjutnya diuji normalitas dengan Uji *Saphiro Wilk*. Data hasil pengamatan menunjukkan distribusi yang normal menggunakan uji tersebut dengan nilai $p > 0,05$ yang ditunjukkan pada Lampiran 12.



Gambar 6. Gambaran Mikroskopis Sel Tubulus Ginjal Subjek Penelitian. Sel tubulus ginjal kelompok kontrol sehat (K1) normal (panah biru) dan karioreksis (panah hitam) (A). Sel tubulus ginjal kelompok kontrol DM tipe 2 (K2) dengan sel tubulus ginjal piknosis (panah putih) (B). Sel tubulus ginjal kelompok perlakuan mahkota dewa (P1) (C). Sel tubulus ginjal kelompok perlakuan vitamin E (P2) (D).

Uji beda antar kelompok dilakukan dengan Uji ANOVA 1 jalan dimana syarat varian yang sama dan distribusi data yang normal telah dipenuhi. Hasil Uji ANOVA 1 jalan menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan

bermakna rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antar minimal 2 kelompok subjek penelitian. Hasil uji data dengan Uji ANOVA 1 jalan ditampilkan pada Lampiran 13. Uji *Post Hoc Turkey HSD* dilakukan untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil analisis menunjukkan antar kelompok K1, K2, P1, dan P2 memiliki perbedaan bermakna ($P < 0,05$). Hasil uji data dengan uji *Post Hoc Turkey HSD* ditampilkan pada Lampiran 14. Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antar kelompok ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antar Kelompok.

Keterangan: (*) berbeda bermakna dengan kelompok kontrol DM tipe 2 (K2) ($p < 0,05$), (#) berbeda bermakna dengan kelompok kontrol sehat (K1) ($p < 0,05$), (+) berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan vitamin E (P2) ($p < 0,05$). Kelompok kontrol sehat (K1), kelompok kontrol DM tipe 2 (K2), kelompok perlakuan mahkota dewa (P1), kelompok perlakuan vitamin E (P2). (Data dalam rerata ± standar deviasi).

Hasil uji analisis data menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antar seluruh kelompok. Kelompok K1 memiliki nilai rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis yang paling sedikit dengan nilai $91,8 \pm 3,83$. Kelompok P1 memiliki nilai rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis sebanyak $142,2 \pm 3,44$ dan kelompok P2 dengan nilai $265,6 \pm 35,4$. Kelompok kontrol DM tipe 2 memiliki rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis terbanyak dengan nilai $460,2 \pm 5,41$. Hasil tersebut mendukung hipotesis penelitian bahwa jumlah sel tubulus ginjal nekrosis yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa lebih sedikit dibandingkan dengan yang mendapat vitamin E pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

4.2.Pembahasan

Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan kelompok sehat (K1), kontrol DM tipe 2 (K2), perlakuan mahkota dewa (P1), dan perlakuan vitamin E (P2) memiliki perbedaan bermakna. Urutan rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis dari yang paling sedikit ialah kelompok sehat, perlakuan mahkota dewa, perlakuan vitamin E, lalu kontrol DM tipe 2. Jumlah sel tubulus ginjal nekrosis yang sedikit menunjukkan penyebab nekrosis sel yang terkendali, dimana dalam penelitian ini adalah mekanisme akibat DM tipe 2.

Diabetes melitus tipe 2 adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia akibat resistensi insulin (Purnamasari, 2014). Kondisi tersebut dapat dicetuskan dengan pemberian kombinasi STZ dan NAD. Streptozotosin dapat menyebabkan kerusakan sel beta pankreas sebagai penghasil insulin dengan meningkatkan kadar NO intraseluler, peningkatan produksi ROS, dan deplesi ATP akibat penurunan NAD^+ teroksidasi sel beta pankreas. Kombinasi dari mekanisme tersebut dapat menyebabkan kematian beta pankreas yang mengakibatkan defisiensi insulin dimana hal tersebut analog dengan DM tipe 1 (Szkuldeski, 2012). Kondisi destruksi sel beta pankreas dapat dikendalikan dengan mempertahankan kadar NAD^+ . Sifat sitotoksik STZ pada hewan coba yang meningkatkan ROS dan deplesi NAD^+ dapat terhambat dengan pemberian NAD sebagai bahan dasar pembentukan NAD^+ . Kadar NAD^+ yang dijaga akan mempertahankan produksi ATP dan menghambat ketersediaan substrat *xantine*

oxidase untuk membentuk ROS (Lenzen, 2008). Pemberian STZ yang diikuti NAD akan menyebabkan destruksi sel beta pankreas secara terkendali yang menyebabkan kondisi hiperglikemia tanpa perubahan kadar insulin plasma dan berakhir pada resistensi insulin, sehingga analog dengan kondisi DM tipe 2 pada manusia (Srinivasan dan Ramarao, 2007). Kondisi tersebut dapat ditunjukkan dengan kondisi hiperglikemia setelah 72 jam pascainduksi NAD (230 mg/KgBB) yang diikuti STZ (65 mg/KgBB) dengan selisih waktu 15 menit pada hewan coba di penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015).

Kondisi DM tipe 2 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* dapat mengakibatkan komplikasi nefropati diabetik dalam 4 minggu (Esther dan Manonmani, 2014). Waktu tersebut telah terlampaui pada lama perlakuan di penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) selama 6 minggu. Kondisi nefropati diabetik dapat ditunjukkan dengan berbagai bentuk seperti perubahan ukuran ginjal, volume glomerulus, fungsi ginjal, akumulasi matriks ekstraseluler glomerulus, mikroalbuminuria, glomerulosklerosis, dan fibrosis tubulus pada tahap awal. Tahap akhir nefropati diabetik berupa gagal ginjal ditandai dengan proteinuria, hipertensi, dan insufisiensi ginjal (Sheela *et al.*, 2013). Nefropati diabetik juga dapat ditandai dengan degenerasi dan nekrosis sel tubulus serta perdarahan intertubulus (Esther dan Manonmani, 2014).

Pengamatan mikroskopis secara umum korteks ginjal pada kelompok K2 sebagai kontrol DM tipe 2 menunjukkan adanya perdarahan intertubulus dan degenerasi sel tubulus berupa jejas reversibel. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Esther dan Manonmani (2014) yang menyatakan terdapat perdarahan intertubulus pada nefropati diabetik. Perdarahan intertubulus dapat terjadi karena rupturnya pembuluh darah yang menyebabkan gambaran kebocoran pembuluh darah dan ekstrasvasasi eritrosit ke ruang intertubulus. Rupturnya pembuluh darah tersebut dapat dikarenakan aterosklerosis (Kautsari *et al.*, 2010), angiogenesis tak sempurna (Sulistyoningrum *et al.*, 2013), dan disfungsi endotel (Kumar *et al.*, 2013) yang mengakibatkan kerapuhan pembuluh darah pada DM tipe 2. Degenerasi sel tubulus berupa jejas reversibel sendiri dapat diakibatkan proses kerusakan sel (Kumar *et al.*, 2013) akibat reaksi oksidasi terhadap komponen struktural sel oleh ROS (Soeksmanto *et al.*, 2007) yang banyak terakumulasi pada

kondisi DM tipe 2 (Forbers *et al.*, 2008). Hasil analisis karakteristik subjek penelitian ini juga menunjukkan terdapat perbedaan bermakna rerata volume ginjal kanan antara kelompok kontrol sehat, perlakuan mahkota dewa, dan perlakuan vitamin E terhadap kontrol DM tipe 2, dimana rerata volume ginjal kanan kelompok kontrol DM tipe 2 lebih kecil daripada rerata volume ginjal kanan kelompok lainnya. Hal tersebut dapat terjadi akibat akumulasi matriks ekstraseluler di ginjal yang diikuti dengan degenerasi parenkim ginjal (Hendromartono, 2014) yang dapat diperantarai oleh ekspresi TGF- β , dimana mediator tersebut meningkat pada kondisi nefropati diabetik (Sulistyoningrum *et al.*, 2013). Akumulasi matriks ekstraseluler pada awalnya mampu meningkatkan volume ginjal, namun kerusakan parenkim ginjal yang akhirnya digantikan oleh matriks ekstraseluler justru menurunkan volume ginjal. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Sheela *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa terjadi peningkatan ukuran ginjal pada tahap awal nefropati diabetik.

Hasil penelitian ini menunjukkan rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok kontrol DM tipe 2 memiliki perbedaan bermakna dengan seluruh kelompok lain dan memiliki nilai rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis tertinggi. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Esther dan Manonmani (2014) yang menyatakan terdapat peningkatan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada nefropati diabetik. Hal tersebut dapat terjadi akibat berbagai macam proses yang terjadi pada DM tipe 2 yang dapat menyebabkan kerusakan sel irreversibel dan berakhir pada nekrosis atau apoptosis. Kondisi hiperglikemia kronis menyebabkan hiperglikemia intraseluler melalui GLUT 1 di sel tubulus ginjal (Hendromartono, 2014). Gula berlebih tersebut akan dimetabolisme secara aerob dengan hasil sampingan berupa ROS yang dapat merusak sel dengan cara reaksi peroksidasi lipid dan reaksi oksidasi terhadap protein, karbohidrat, dan DNA sel (Ray *et al.*, 2014). Hal tersebut jika terjadi secara berlebihan dapat mengakibatkan kerusakan irreversibel yang berlanjut menjadi nekrosis sel dengan gambaran yang dapat berupa piknosis, karioreksis, dan kariolisis (Kumar *et al.*, 2013). Nekrosis sel tubulus ginjal pada DM tipe 2 juga dapat terjadi akibat proses inflamasi, penumpukan AGEs, dan iskemik yang mempercepat proses kerusakan irreversibel (Hendromartono, 2014).

Gambaran mikroskopis secara umum korteks ginjal kelompok P1 yang merupakan kelompok perlakuan mahkota dewa dan mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa, menunjukkan gambaran sedikit degenerasi sel dengan integritas tubulus yang baik tanpa perdarahan intertubulus atau gambaran kerusakan lain yang bermakna seperti pada kelompok kontrol DM tipe 2. Hal tersebut dapat menunjukkan efek protektif yang dimiliki ekstrak metanol daging buah mahkota dewa, terutama dalam mengendalikan perdarahan intertubulus dan degenerasi sel. Flavonoid ekstrak metanol daging buah mahkota dewa memiliki kemampuan antiaterosklerosis (Kautsari *et al.*, 2010), antiinflamasi (Hendra *et al.*, 2011), dan antiangiogenesis (Sulistyoningrum *et al.*, 2013) yang dapat menjaga kualitas pembuluh darah dari kerapuhan yang dapat berakibat rupturnya pembuluh darah pada nefropati diabetik. Hasil analisis data karakteristik subjek penelitian juga menunjukkan terdapat perbedaan bermakna rerata volume ginjal antara kelompok perlakuan mahkota dewa dan kontrol DM tipe 2, dimana rerata volume ginjal kelompok perlakuan mahkota dewa lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol DM tipe 2. Rerata volume ginjal kelompok perlakuan mahkota dewa juga tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol sehat. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dapat menghambat kerusakan parenkim ginjal yang diikuti dengan akumulasi matriks ekstraseluler, sehingga menyebabkan pertambahan yang kemudian diikuti dengan penurunan volume ginjal. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dapat menurunkan ekspresi TGF- β , dimana TGF- β merupakan mediator terjadinya akumulasi matriks ekstraseluler (Hendromartono, 2014). Hendromartono (2014) juga menjelaskan bahwa ekspresi TGF- β dapat ditingkatkan dengan kondisi hiperglikemia intraseluler, mediator inflamasi, ROS, dan AGEs. Efek antihiperglikemia (Ali *et al.*, 2013), antiinflamasi, antioksidan dan (Hendra *et al.*, 2011) terdapat pada ekstrak buah mahkota dewa, sehingga kondisi yang dapat meningkatkan ekspresi TGF- β dapat ditekan pada nefropati diabetik.

Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada kelompok perlakuan mahkota dewa lebih rendah dan berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol

DM tipe 2. Hal tersebut menunjukkan efek protektif yang dimiliki ekstrak metanol daging buah mahkota dewa terhadap nefropati diabetik. Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa memiliki kandungan zat aktif tinggi meliputi fenol dan flavonoid yang dapat bersifat sebagai antiinflamasi, antioksidan (Hendra *et al.*, 2011), antihiperqlikemia (Ali *et al.*, 2013), dan antiaterosklerosis (Kautsari *et al.*, 2010). Flavonoid pada mahkota dewa bersifat antihiperqlikemia dengan menghambat enzim α glukosidase secara reversibel, sehingga dapat menurunkan absorpsi glukosa pada saluran cerna (Ali *et al.*, 2013). Hambatan absorpsi glukosa tersebut memiliki potensi untuk mengendalikan kadar gula darah tetap normal. Hal tersebut mampu mengendalikan produksi ROS secara berlebihan dengan mengurangi bahan metabolisme aerob berupa gula darah (Forbes *et al.*, 2008). Flavonoid juga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghambat reaksi oksidasi termasuk pembentukan ROS serta dapat menetralkan radikal bebas dengan cara reaksi reduksi atau donor elektron. Flavonoid mahkota dewa juga memiliki fungsi antiinflamasi dengan menurunkan kadar NO sebagai salah satu mediator inflamasi (Hendra *et al.*, 2011). Triastuti *et al.* (2009) melaporkan bahwa ekstrak metanol daging buah mahkota dewa juga dapat meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti SOD, CAT, GPx, dan GSH dan menurunkan kadar MDA sebagai penanda stres oksidatif pada ginjal. Kombinasi mekanisme tersebut akan menekan faktor penyebab nekrosis sel tubulus ginjal yaitu ROS, inflamasi, dan iskemik, sehingga jumlah sel tubulus ginjal nekrosis lebih sedikit.

Gambaran mikroskopis secara umum korteks ginjal kelompok P2 yang mendapatkan vitamin E, menunjukkan gambaran sedikit perdarahan intertubulus dengan integritas tubulus yang baik tanpa degenerasi atau gambaran kerusakan lain yang bermakna seperti pada kelompok kontrol DM tipe 2. Hal tersebut dapat menunjukkan efek protektif yang dimiliki vitamin E, terutama dalam mengendalikan perdarahan intertubulus dan degenerasi sel. Vitamin E merupakan antioksidan yang dapat larut pada komponen struktural sel berupa lemak serta dapat memutus reaksi oksidasi berantai oleh ROS (Agarawal *et al.*, 2008). Kondisi stres oksidatif yang terjadi pada DM tipe 2 dapat menyebabkan akumulasi ROS yang berakibat pada kerusakan ginjal (Waspadji, 2014), dimana hal tersebut dapat ditekan oleh vitamin E. Vitamin E juga merupakan antioksidan standar

untuk parameter yang menggunakan pengamatan mikroskopis karena mampu mempertahankan integritas sel dengan cara menyatu pada komponen lemak sel untuk melindungi dari kerusakan akibat ROS. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang mengaji vitamin E dengan parameter pengamatan mikroskopis dimana vitamin E dapat mencegah inflamasi perivaskuler, kerusakan umum tubulus (Atasayar *et al.*, 2009), vakuolisasi sitoplasma, infiltrasi seluler, atrofi glomerulus, dan nekrosis sel tubulus ginjal (Aslam *et al.*, 2009) pada kondisi stres oksidatif. Saremi dan Arora (2010) juga melaporkan bahwa vitamin E mampu menghambat aterosklerosis. Efek antiaterosklerosis tersebut dapat mempertahankan dinding pembuluh darah dari kerapuhan yang menyebabkan ruptur. Hasil analisis data karakteristik subjek penelitian menunjukkan perbedaan bermakna antara rerata volume ginjal kelompok perlakuan vitamin E dengan kontrol DM tipe 2, dimana rerata volume ginjal kelompok perlakuan vitamin E lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol DM tipe 2. Hal tersebut berarti bahwa vitamin E mampu mengendalikan akumulasi matriks ekstraseluler yang diperantai ekspresi TGF- β . Ekspresi TGF- β sendiri dapat dipengaruhi oleh mediator inflamasi, hiperglikemia intraseluler, ROS, dan AGEs (Hendromartono, 2014), sedangkan vitamin E memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan (Armagan *et al.*, 2008). Hal tersebut yang memungkinkan menjadi alasan vitamin E mampu mengendalikan akumulasi matriks ekstraseluler yang ditunjukkan dengan perbedaan bermakna rerata volume ginjal dibandingkan dengan kelompok kontrol DM tipe 2.

Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok perlakuan vitamin E lebih sedikit dan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol DM tipe 2. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Aslam *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa vitamin E mampu menurunkan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis pada kondisi stres oksidatif. Vitamin E dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan memutus reaksi oksidasi berantai oleh ROS yang menghasilkan radikal peroksil (Agarwal *et al.*, 2008). Fungsi antioksidan tersebut dapat mempertahankan struktur membran plasma sel dan peroksidasi lipid akibat ROS serta menetralkan ROS pada keadaan stres oksidatif (Hong *et al.*, 2010). Keadaan stres oksidatif yang terjadi pada DM juga dapat ditekan dengan vitamin E untuk menghindari komplikasi DM pada

beberapa organ seperti nefropati diabetik (Waspadji *et al.*, 2014). Penelitian lain yang mengaji manfaat vitamin E pada kasus nefropati diabetik menunjukkan penurunan kadar MDA dan NO ginjal, penurunan kadar BUN dan kreatinin darah, serta peningkatan GPx dan GSH ginjal (Ozkaya *et al.*, 2011; Haidara *et al.*, 2009). Penurunan senyawa NO berlebih yang bersifat proinflamasi dapat mengurangi proses inflamasi, sehingga kadar mediator inflamasi lain yang menyebabkan kerusakan dan fibrosis pada ginjal dapat menurun. Penurunan kadar BUN dan kreatinin darah sendiri menunjukkan perbaikan fungsi filtrasi ginjal pada korpuskulum renal. Faktor penyebab kematian sel akibat ROS dan iskemik tersebut berarti dapat dikendalikan oleh vitamin E, sehingga menurunkan jumlah sel tubulus ginjal nekrosis (Waspadji, 2014).

Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok perlakuan vitamin E lebih banyak dan berbeda bermakna dibandingkan kelompok perlakuan mahkota dewa. Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa memiliki manfaat dalam pencegahan nefropati diabetik dengan efek antiinflamasi dan antioksidan (Hendra *et al.*, 2011), dimana efek tersebut juga dimiliki vitamin E (Ozkaya *et al.*, 2011; Haidara *et al.*, 2009). Haidara *et al.* (2009) melaporkan vitamin E memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi pada nefropati diabetik yang ditunjukkan dengan penurunan MDA ginjal, peningkatan GPx darah dan NO ginjal, namun dengan dosis 300 mg/KgBB dan 600 mg/KgBB selama 4 minggu. Penelitian ini menggunakan vitamin E dengan dosis 100 mg/KgBB selama 6 minggu. Hal tersebut mengindikasikan bahwa efek antioksidan dan antiinflamasi vitamin E lebih tergantung pada dosis dibandingkan waktu penggunaan, sehingga penggunaannya tidak cukup untuk melindungi ginjal dari nefropati diabetik dibandingkan efek antioksidan dan antiinflamasi ekstrak metanol daging buah mahkota dewa. Efek antihiperqlikemia di sisi lain juga tidak dimiliki oleh vitamin E (Haidara *et al.*, 2009), namun dimiliki oleh ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (Ali *et al.*, 2013). Kondisi hiperqlikemia sebanding dengan kondisi stres oksidatif akibat ROS dikarenakan gula darah melalui proses metabolisme aerob dapat menghasilkan ROS (Forbes *et al.*, 2008). Iskemia ginjal akibat aterosklerosis juga dapat menjadi penyebab nefropati diabetik, sehingga agen antiaterosklerosis seperti vitamin E (Saremi dan Arora, 2010) dan ekstrak buah mahkota dewa (Kautsari *et al.*, 2010)

bermanfaat dalam pencegahan komplikasi tersebut (Waspadji, 2014). Hasil telaah tersebut menunjukkan bahwa rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok perlakuan vitamin E lebih banyak dan berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok perlakuan mahkota dewa karena vitamin E tidak memiliki kemampuan antihiperqlikemia dan kurangnya dosis untuk menimbulkan efek antiinflamasi dan antioksidan yang cukup untuk pencegahan nefropati diabetik.

Penelitian ini merupakan salah satu penelitian yang menguji manfaat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa pada pencegahan nefropati diabetik, namun terdapat beberapa keterbatasan dalam pelaksanaan penelitian ini. Penelitian ini mengamati jumlah sel tubulus ginjal nekrosis dengan pewarnaan HE yang mampu menimbulkan subjektivitas dalam menentukan ciri-ciri sel nekrosis sesuai definisi operasional penelitian ini. Hal tersebut dapat lebih dikendalikan dengan pewarnaan preparat menggunakan *Immunohistochemistry* spesifik terhadap antigen yang diekspresikan oleh sel apoptosis atau nekrosis seperti kaspase, *Nuclear Factor kappa B* (Nf- κ B), atau lainnya (Kumar *et al.*, 2013). Penelitian ini juga hanya mengamati jumlah sel tubulus ginjal nekrosis sebagai parameter nefropati diabetik, sedangkan manfaat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa pada nefropati diabetik tidak hanya hal tersebut. Pengamatan parameter lain pada nefropati diabetik secara komprehensif seperti kadar MDA ginjal, antioksidan endogen ginjal (Triastuti *et al.*, 2009), kreatinin dan BUN (darah Ozkaya *et al.*, 2011; Haidara *et al.*, 2009), dan lainnya akan memberikan informasi yang lebih lengkap terkait manfaat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa pada pencegahan nefropati diabetik. Penelitian ini juga menggunakan blok parafin ginjal kanan (bahan biologi tersimpan) sebagai subjek penelitian, sehingga tidak mampu mengendalikan variabel pengganggu pada hewan coba serta tidak mampu menentukan dosis dan lama pemberian ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dan vitamin E. Hal tersebut menyebabkan kurangnya informasi mengenai kemampuan antinefropati diabetik ekstrak metanol daging buah mahkota dewa maupun vitamin E pada dosis dan lama pemberian yang berbeda.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Simpulan penelitian ini adalah jumlah sel tubulus ginjal nekrosis antara yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa berbeda dengan yang mendapat vitamin E pada tikus model DM tipe 2. Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok yang mendapat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa lebih sedikit dibandingkan kelompok yang mendapat vitamin E. Rerata jumlah sel tubulus ginjal nekrosis kelompok perlakuan mahkota dewa dan perlakuan vitamin E lebih sedikit secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol DM tipe 2, namun lebih banyak secara bermakna daripada kelompok kontrol sehat.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian serupa antara lain,

1. Perlu dilakukan penelitian yang mengaji manfaat maupun toksisitas ekstrak buah mahkota dewa dengan berbagai pelarut hingga isolasi senyawa sebagai pencegahan nefropati diabetik untuk menemukan bentuk terbaik dari buah mahkota dewa dalam pencegahan nefropati diabetik,
2. Perlu dilakukan penelitian yang mengaji variasi dosis dan lama penggunaan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dalam pencegahan nefropati diabetik untuk menemukan dosis dan lama penggunaan terbaik dalam pencegahan nefropati diabetik,
3. Perlu dilakukan penelitian serupa dengan pewarnaan yang lebih spesifik untuk mengaji mengenai manfaat ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dalam pencegahan nefropati diabetik,
4. Perlu dilakukan penelitian yang mengaji variasi dosis dan lama penggunaan vitamin E dalam pencegahan nefropati diabetik untuk menemukan dosis dan lama penggunaan terbaik dalam pencegahan nefropati diabetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhalim, M.A.K., Jarrar, B.M. 2011. Gold Nanoparticles Induced Cloudy Swelling to Hidropic Degeneration, Cytoplasmic Hyaline Vacuolation, Polymorphism, Binucleation, Karyopyknosis, Karyolysis, Karyorrhesis, and Necrosis in The Liver. *Lipid in Health and Disease*. 10: 166.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. 2008. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 59(1): 2-11.
- Albert, D., Mitchell, R.N., Block, A.N., Moore, K., Bruce, B.B., Petri, W., *et al.* 2012. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary* (32thed). Elsevier Saunders. Philadelphia. 502.
- Ali, R.B., Atangwho, I.J., Kuar, N., Ahmad, M., Mahmud, R., Asmawi, M.Z. 2013. In Vitro and In Vivo Effect of Standardized Extract and Fraction of Phaleria macrocarpa Fruits Pericarp on Lead Carbohydrate Digesting Enzymes. *Complementary and Alternative Medicie*. 13: 39.
- Altaf, R., Asmawi, M.Z.B., Dewa, A., Sadikun, A., Umar, M.I. 2013. Phytochemistry and Medicinal Properties of Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. Extracts. *Pharmacognosy Review*. 7(13): 73-80.
- Aniagu, S.O., Nwinyi, F.C., Akumka, D.D., Ajoku, D.A., Dzarma, S., Izebe, K.S., *et al.* 2005. Toxicity study in rats fed nature cure bitters. *African Journal of Biotechnology*. 4(1): 72-78
- Armagan, A., Kutluhan, S., Yilmaz, M., Yilmaz, N., Bulbul, M., Vura, H., *et al.* 2008. Topiramate and vitamin E modulate antioxidant enzyme activities, nitric oxide and lipid peroxidation levels in pentylenetetrazole-induced nephrotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 103(2): 166-70.
- Aslam, F., Khan, A., Khan, M.Z., Sharaf, S., Gul, S.T., Saleemi, M.K. 2010. Toxicopathological changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with Vitamin E and selenium. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62(4): 441-50.
- Atasayar, S., Gurer-Orhan, H., Orhan, H., Gurel, B., Girgin, G., Ozgunes, H. 2009. Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 61(1): 23-32.
- Charan, J., Kantharia, N.D. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 4(4): 303-06.

- Esther, G.S., Manonmani, A.J. 2014. Effect of *Eugenia Jambolana* on Streptozotocin Nicotinamide Type 2 Diabetic Nephropathy in Rats. *International Journal of Drug Development & Research*. 6(1): 175-87.
- Etuk, E.U. 2010. Animals model for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(2): 130-34.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., Cooper, M.E. 2008. Oxidative Stress as A Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes*. 57: 1446-54.
- Haidara, M.A., Mikhailidis, D.P., Rateb, M.A., Ahmed, Z.A., Yassin, H.Z., Ibrahim, I.M., *et al.* 2009. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. 23(2): 130-36.
- Hendra, R., Ahmad, S., Oskoueian, E., Sukari, A., Shukor, M.Y. 2011. Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *Complementary and Alternative Medicie*. 11: 110.
- Hendromartono. 2014. Nefropati Diabetik dalam Setiati, S., Alwi, I., Sudoyo, A.W., Simadibrata, M., Setiyohadi, B., Syam, A.F. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* (6thed). Interna Publishing. Jakarta. 2323-27.
- Hong, Z., Haling, L., Hui, M., Guijie, Z., Leyan, Y., Dubing, Y. 2010. Effect of Vitamin E Supplemen in Diet on Antioxidant Ability of Testis in Boer Goat. *Animal Reproduction Science*. 117(1): 90-4.
- Islam, M.S., Loots, d.T. 2009. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 31(4): 249-61.
- Jeenger, M.K., Shrivastava, S., Yerra, V.G., Naidu, Ramakrishna, S., Kumar, A. 2015. Curcumin: A Pleiotropic Phytonutrient in Diabetic Complications. *Nutrition*. 31(2015): 276-82.
- Kamble, H.V., Bodhankar, S.L. 2013. Trigonelline and Sitagliptin Attenuates Nicotinamides-Streptozotocin Induced Diabetic Nephropathy in Wistar Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4): 583-89.
- Kautsari, S., Susatyo, P., Sulistyoningrum, E. 2010. Tinjauan Histologis Pembuluh Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes yang Diberi Rebusan Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpha* (Scheff.) Boerl.). *Mandala of Health*. 4(2): 92-96.

- Kitzler, T.M., Jaber, A., Sendlhofer, G., Rehak, P., Blinder, C., Petnehazy, E., *et al.* 2012. Efficacy of vitamin E and N-acetylcysteine in the prevention of contrast induced kidney injury in patients with chronic kidney disease: a double blind, randomized controlled trial. *Wiener klinische Wochenschrift*. 124(9): 312-29.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. 2013. *Robbins Basic Pathology* (9thed). Elsevier Saunders. Philadelphia. 1-28.
- Larkin, J., Esser, N., Calvo, E., Tsuchihashi, Z., Fiedler, U., Graeser, R., Kim, D. 2012. Efficacy of Sequential Treatment with Sunitinib-Everolimus in an Orthotopic Mouse Model of Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Research*. 32: 2399-406.
- Li, B., Liu, S., Miao, L., Cai, L. 2012. Prevention of Diabetic Complications by Activation of Nrf2: Diabetic Cardiomyopathy and Nephropathy. *Experimental Diabetes Research*. 2012: 1-7.
- Lenzen, S. 2008. The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetologia*. 51: 216-26.
- Lyssenko, V., Jonsson, A., Almgren, P., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., *et al.* 2008. Clinical Risk Factors, DNA Variants, and The Development of Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 359(21): 2220-32.
- Mescher, A.L. 2010. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas (12thed). McGraw Hill. Singapura. 332-47.
- Momeni, H.R., Eskandari, N. 2012. Effect of Vitamin E on Sperm Parameters and DNA Integrity in Sodium Arsenite-Treated Rats. *Iranian Journal Reproductive Medicine*. 10(3): 249-56.
- Ozkaya, D., Naziroglu, M., Armağan, A., Demirel, A., Koroqlu, B.K., Colakoqlu, N., *et al.* 2011. Dietary vitamin C and E modulates oxidative stress induced-kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. *Cell Biochemistry & Function*. 29(4): 287-93.
- Powers, A.C. 2012. Diabetes Mellitus dalam Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, H.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (18thed). McGraw-Hill. Amerika Serikat. 2968-3003.
- Prasad, K., McNair, E.D., Qureshi, A.M., Casper-Bell, G. 2012. Vitamin E slows the progression of hypercholesterolemia-induced oxidative stress in heart, liver and kidney. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 368(1): 181-87.

- Purnamasari, D. 2014. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus dalam Setiati, S., Alwi, I., Sudoyo, A.W., Simadibrata, M., Setiyohadi, B., Syam, A.F. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* (6thed). Interna Publishing. Jakarta. 2323-27.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. 2012. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signalling. *Cellular Signalling*. 24: 981-90.
- RISKESDAS. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Jakarta. 122-25.
- Saremi, A., Arora, S. 2010. Vitamin E and Cardiovascular Disease. *American Journal of Therapeutics*. 17(3): 56-65.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. 2009. Global Estimates of The Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87: 4-14.
- Sheela, N., Jose, M.A., Sathyamurthy, D., Kumar, B.N. 2013. Effect of Silymarin on Streptozotocin-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Nephropathy in Rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 7(2): 117-23.
- Shulman, G.I. 2014. Ectopic Fat Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *The New Journal English of Medicine*. 371: 1131-41.
- Simanjuntak, P. 2008. Identifikasi Senyawa Kimia dalam Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), Thymelaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 6(1): 23-28.
- Soeksmanto, A., Hapsari, Y., Simanjuntak, P. 2007. Kandungan Antioksidan pada Beberapa Bagian Tanaman Mahkota Dewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymelaceae). *Biodiversitas*. 8(5): 92-95.
- Srinivasan, K., Ramarao, P. 2007. Animal Models in Type 2 Diabetes Research: An Overview. *Indian Journal of Medical Research*. 125(3): 451-72.
- Sulistiyoningrum, E., Setiawati. 2013. *Phaleria macrocarpa* Reduces Glomerular Growth Factor Expression in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Universa Medicina*. 32(2): 71-79.
- Sulistiyoningrum, E., Setiawati, and Ismaulidhya, F.R. 2013. *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl improved renal histological change in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine*. 1(5): 87-92.

- Szkudelski, T. 2012. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in rat. Characteristic of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*. 237: 481-90.
- Tortora, G.J., Derrickson, B. 2014. *Principles of Anatomy and Physiology* (14thed). Wiley. Amerika Serikat. 979-1022.
- Triastuti, A., Park, H.J., Choi, J.W. 2009. Phaleria Macrocarpa Supress Nephropathy by Increasing Renal Antioxidant Enzyme Activity in Alloxan Induced Diabetes Rats. *Natural Product Sciences*. 15(3): 167-72.
- Waspadji, S. 2014. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus dalam Setiati, S., Alwi, I., Sudoyo, A.W., Simadibrata, M., Setiyohadi, B., Syam, A.F. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* (6thed). Interna Publishing. Jakarta. 2359-66.
- Whiting, D.R., Guariguata, D.R., Weil, C., Shaw, J. 2011. IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of The Prevalence of Diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 94: 311-21.
- WHO. 2015. Diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> (diupdate Januari 2015, diakses pada tanggal 20 November 2015).
- Yang, A., Trajkovic, D., Illanes, O., Ibanez, F.R. 2007. Clinicopathological and Tissue Indicators of Para-Aminophenol Nephrotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Toxicology Pathology*. 35: 521-32.
- Yanti, A.R., Radji, M., Mun'im, A., Suyatna, F.D. 2014. Methanol Extract of Phaleria macrocarpa(Scheff.) Boerl improved renal and liver histological changes in fructose 10% induced rats. *Journal of Pharmaetical dan Biological Research*. 2(1): 79-84.
- Zhang, J.R.P. Brown, M., Shaw, V.S., Vaidya, Y., Zhou. 2008. Immunolocalization of Kim-1, RPA-1 and RPA-2 in Kidney of Gentamicin-Mercury, or Chromium-treated Rats: Relationship to Renal Distributions of iNOS and Nitrotyrosine. *Journal of Toxicology and Pathology*. 36(3): 397-409.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Langkah-langkah Pembuatan Preparat Mikroskopis

No.	Tahap	Tindakan
Hari 1	PBS 1 liter	Mengambil serbuk ½ vial ditambah aquades 1 liter Mencampur dengan <i>stirrer</i> dan magnetnya
	PBS formalin 10%	Mencampur larutan PBS 900 cc ditambah 100 cc formalin pekat
		Memasukkan organ ke PBS formalin dan melabel dengan kertas menggunakan pensil
Hari 4	<i>Triming</i>	Memotong bagian organ yang akan dibuat preparat jika tidak akan <i>embedding</i> hari itu, memasukkan organ ke alkohol 70%
	Dehidrasi Pot dimasukkan ke <i>shaker</i> Menyiapkan botol dan ceret parafin (ditaruh di <i>hotplate stirrer</i>)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Memasukkan dalam alkohol 70% ke-1 (15 menit) 2. Memasukkan dalam alkohol 70% ke-2 (15 menit) 3. Memasukkan dalam alkohol 70% ke-3 (15 menit) 4. Memasukkan dalam alkohol 80% ke-1 (15 menit) 5. Memasukkan dalam alkohol 80% ke-2 (15 menit) 6. Memasukkan dalam alkohol 80% ke-3 (15 menit) 7. Memasukkan dalam alkohol 90% ke-1 (15 menit) 8. Memasukkan dalam alkohol 90% ke-2 (15 menit) 9. Memasukkan dalam alkohol 90% ke-3 (15 menit)

No.	Tahap	Tindakan
		10. Memasukkan dalam alkohol 95% ke-1 (15 menit) 11. Memasukkan dalam alkohol 95% ke-2 (15 menit) 12. Memasukkan dalam alkohol 95% ke-3 (15 menit) 13. Memasukkan dalam alkohol 100% ke-1 (15 menit) 14. Memasukkan dalam alkohol 100% ke-2 (15 menit) 15. Memasukkan dalam alkohol 100% ke-3 (15 menit)
	<i>Clearing</i>	1. Memasukkan dalam xylol ke-1 (5 menit) 2. Memasukkan dalam xylol ke-2 (5 menit) 3. Memasukkan dalam xylol ke-3 (5 menit)
	Infiltrasi parafin	1. Memasukkan dalam parafin ke-1 (30 menit) 2. Memasukkan dalam parafin ke-2 (30 menit) 3. Memasukkan jaringan pada <i>plate</i> . Menuang parafin, menutup dengan kaset 4. Meletakkan dalam suhu ruang sampai dingin
Hari 5	Simpan	Menyimpan dalam kulkas sampai <i>sectioning</i>
Hari 6	<i>Sectioning</i>	Menyalakan <i>hotplate</i> 50-70 derajat Celcius dan <i>waterbath</i> 40 derajat Celcius
	Menyiapkan 1. Batu es 2. Slide objek 3. Aquades	1. Blok dikompres dengan es 2. Mengunci putaran mikrotom 3. Memasang blok 4. Memutar ketebalan mikrotom 5 μ m 5. Membuka kunci putaran 6. Melakukan <i>sectioning</i> 7. Meletakkan pada aquades dan didiamkan

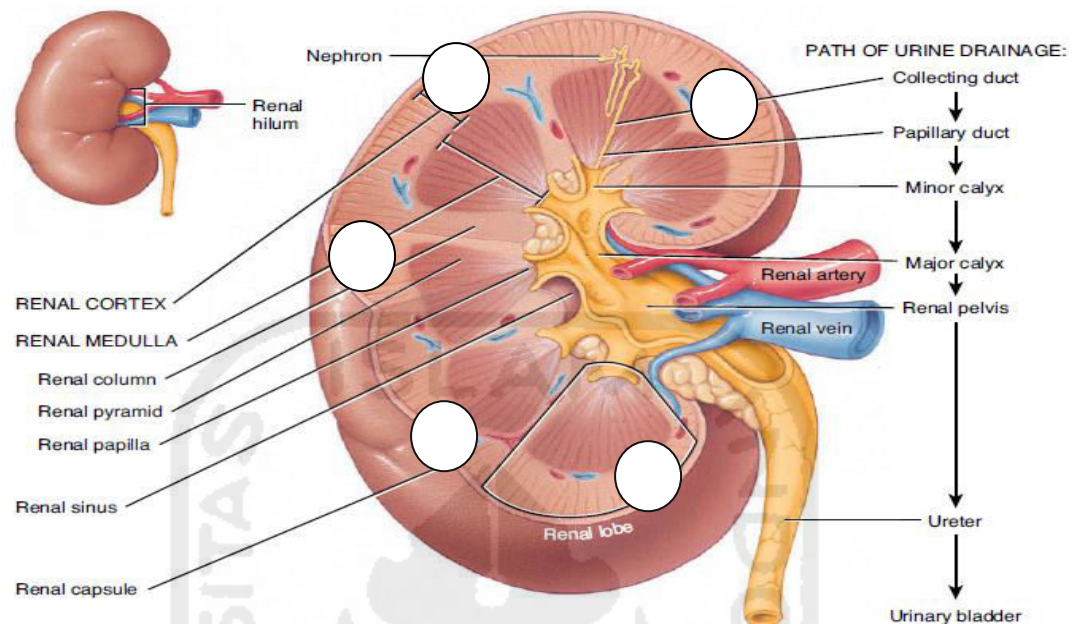
No.	Tahap	Tindakan
		8. Memindahkan ke <i>water bath</i> 9. Memindahkan ke <i>hotplate</i> ± 1 jam 10. Memasukkan dalam inkubator 37 derajat Celcius
Hari 7	<i>Staining</i>	Gelas objek dimasukkan ke <i>staining jar</i>
	Deparafinisasi	1. Memasukkan dalam xylol ke-1 (30 menit) 2. Memasukkan dalam xylol ke-2 (30 menit) 3. Mengeringkan dengan tisu
	Rehidrasi	1. Memasukkan dalam alkohol 100% ke-1 (5 menit) 2. Memasukkan dalam alkohol 100% ke-2 (5 menit) 3. Memasukkan dalam alkohol 95% (1 menit) 4. Memasukkan dalam alkohol 90% (1 menit) 5. Memasukkan dalam alkohol 80% (1 menit) 6. Memasukkan dalam alkohol 70% (1 menit) 7. Memasukkan dalam aquades 3 kali 8. Mengeringkan dengan tisu
		1. Memasukkan dalam hematoksilin (10 menit) 2. Memasukkan dalam aquades 3 kali 3. Memeriksa dengan mikroskop 4. Memasukkan dalam acid alkohol (10 detik) 5. Membasuh dengan air mengalir (10 detik) 6. Memasukkan dalam eosin (10 menit) 7. Memasukkan dalam aquades 2 kali 8. Memeriksa dengan mikroskop
	Dehidrasi	1. Memasukkan dalam alkohol 70% (10 detik) 2. Memasukkan dalam alkohol 80% (10 detik) 3. Memasukkan dalam alkohol 90% (10 detik) 4. Memasukkan dalam alkohol 95% (10 detik)

No.	Tahap	Tindakan
		5. Memasukkan dalam alkohol 100% (10 detik) 6. Mengeringkan dengan tisu
	<i>Mounting</i>	1. Memasukkan dalam xylol ke-1 (5 menit) 2. Memasukkan dalam xylol ke-2 (5 menit) 3. Memasukkan dalam xylol ke-3 (5 menit) 4. <i>Mounting</i> dengan perekat lalu ditutup dengan <i>cover glass</i>



Lampiran 2. Skema Tata Cara Pengambilan Lapang Pandang

1. Pengambilan lapang pandang pertama dengan perbesaran 40X



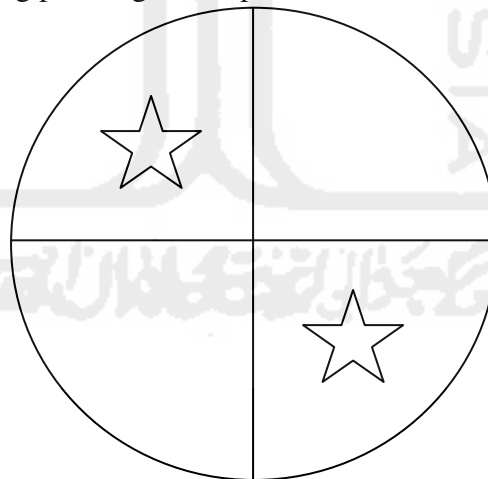
Keterangan:



: Lapang pandang pertama terpilih

Gambar 8. Skema Pengambilan Lapang Pandang Pertama

2. Pengambilan lapang pandang kedua perbesaran 100X



Keterangan:



: Lapang pandang pertama terpilih | : Garis bagi lapang pandang pertama terpilih
 ☆ : Lapang pandang kedua terpilih untuk pencarian 10 tubulus konvolotus proksimal dan distal.

Gambar 9. Skema Pengambilan Lapang Pandang Kedua

Lampiran 3. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Sulistyoningrum *et al.* (2015)




UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
 Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
 Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkuii@yahoo.co.id

Nomor : 21/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2015

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

"Perbedaan Kadar MDA (Malondialdehyde) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dan Vitamin E."

Peneliti Utama : dr. Evy Sulistyoningrum, M.Sc
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.



Yogyakarta, 22 Juni 2015

Ketua
 Chairman

Prof. Dr. Wiryatun Lestariyana, Apt

*Ethical Approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Lampiran 4. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Penelitian




UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN

Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
 Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkuii@yahoo.co.id

Nomor : 38/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

"Perbedaan Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antara yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan Vitamin E."

Peneliti Utama : Roby Cahyono
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.



Yogyakarta, 27 Juni 2016

Ketua
Chairman

Prof. Dr. Dra. Wiryatun Lestariyana, Apt

**Ethical Approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran 5. Surat Determinasi Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*
(Scheff.) Boerl.)



LABORATORIUM BIOLOGI FARMASI
PROGRAM STUDI FARMASI
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
Gedung Laboratorium Terpadu UII, Jl. Kaliurang km 14,5 Ngemplak Sleman, Yogyakarta
Telp: (0274)895920 ext 3033, 3034

SURAT KETERANGAN

Nomor:05/UII/Jur Far/det/VIII/2015

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi
Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : dr.Evi Sulistyoningrum, M.Sc.
Instansi : FK UII
Pada tanggal : 10 Agustus 2015

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan
Dra.Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut: *Phaleria macrocarpa*, (Scheff) Boerl (mahkota dewa)

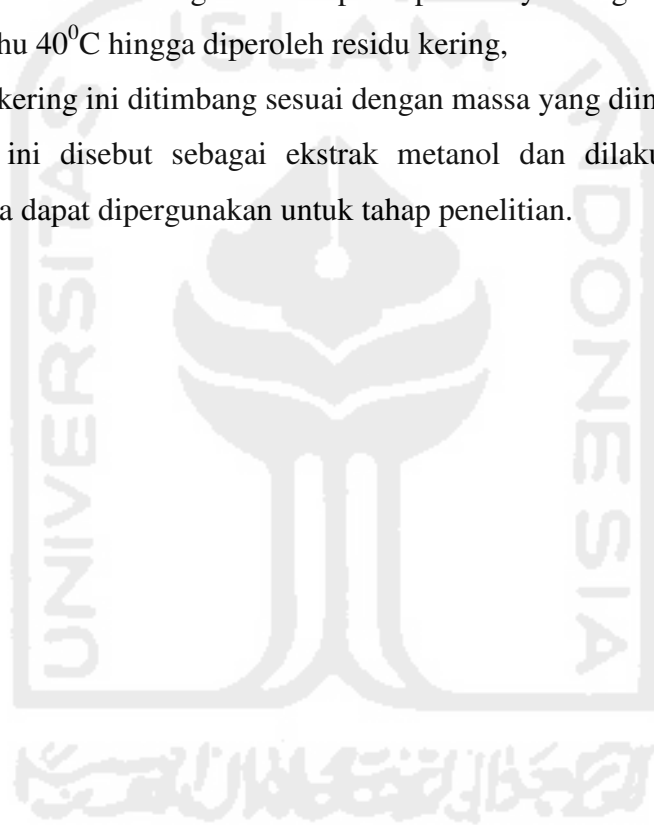
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 10 Agustus 2015
Kepala Laboratorium

Asih Triastuti, M.Pharm., Apt
NIP. 03613010

Lampiran 6. Langkah-langkah Pembuatan Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa

1. Buah mahkota dewa matang yang berwarna merah dicuci dan dipisahkan daging buahnya,
2. Daging buah diiris-iris lalu dikeringkan selama 7 hari dan dibuat serbuk,
3. Untuk mendapatkan ekstrak metanol, sebanyak 200 gram serbuk daging buah mahkota dewa diekstraksi dengan pelarut metanol sebanyak 1,5 Liter, secara maserasi selama tiga hari pada suhu ruang dengan pengulangan sebanyak tiga kali kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰C hingga diperoleh residu kering,
4. Residu kering ini ditimbang sesuai dengan massa yang diinginkan,
5. Residu ini disebut sebagai ekstrak metanol dan dilakukan freeze drying sehingga dapat dipergunakan untuk tahap penelitian.



Lampiran 7. Uji Normalitas Data Karakteristik Subjek Penelitian

Case Processing Summary

	Kelompok Subjek Penelitian	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Berat Badan Tikus	K1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	K2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Berat Ginjal	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Volume Ginjal	K1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	K2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Indeks Relatif Organ	K1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	K2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Descriptives^{a,b}

Kelompok Subjek Penelitian		Statistic	Std. Error		
Berat Badan Tikus	K1	Mean	280.6400	9.21958	
		95% Confidence Interval for Mean			
		Lower Bound	255.0424		
		Upper Bound	306.2376		
		5% Trimmed Mean	280.3667		
		Median	275.5000		
		Variance	425.003		
		Std. Deviation	20.61560		
		Minimum	256.20		
		Maximum	310.00		
		Range	53.80		
		Interquartile Range	37.25		
		Skewness	.506		.913
		Kurtosis	-.225		2.000

	Mean		231.2800	28.91365
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	151.0028 311.5572	
	5% Trimmed Mean		230.1000	
	Median		246.3000	
	Variance		4179.997	
K2	Std. Deviation		64.65290	
	Minimum		160.80	
	Maximum		323.00	
	Range		162.20	
	Interquartile Range		116.15	
	Skewness		.431	.913
	Kurtosis		-.590	2.000
	Mean		272.6200	4.03985
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	261.4036 283.8364	
	5% Trimmed Mean		272.9111	
	Median		276.0000	
	Variance		81.602	
P1	Std. Deviation		9.03338	
	Minimum		259.60	
	Maximum		280.40	
	Range		20.80	
	Interquartile Range		16.85	
	Skewness		-.827	.913
	Kurtosis		-1.162	2.000
	Mean		245.9000	9.63898
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	219.1379 272.6621	
	5% Trimmed Mean		245.4722	
	Median		245.0000	
P2	Variance		464.550	
	Std. Deviation		21.55342	
	Minimum		222.00	
	Maximum		277.50	
	Range		55.50	
	Interquartile Range		39.25	

		Skewness	.629	.913
		Kurtosis	-.024	2.000
		Mean	81980	.025236
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .74973 Upper Bound .88987	
		5% Trimmed Mean	.81967	
		Median	.83000	
		Variance	.003	
	K1	Std. Deviation	.056429	
		Minimum	.746	
		Maximum	.896	
		Range	.150	
		Interquartile Range	.101	
		Skewness	.038	.913
		Kurtosis	-.042	2.000
		Mean	68600	.027677
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .60916 Upper Bound .76284	
		5% Trimmed Mean	.68611	
		Median	.69000	
		Variance	.004	
	K2	Std. Deviation	.061887	
		Minimum	.610	
		Maximum	.760	
		Range	.150	
		Interquartile Range	.120	
		Skewness	-.081	.913
		Kurtosis	-1.901	2.000
		Mean	79520	.042054
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .67844 Upper Bound .91196	
		5% Trimmed Mean	.80033	
		Median	.81500	
		Variance	.009	
	P1	Std. Deviation	.094036	
		Minimum	.634	
		Maximum	.864	
		Range	.230	
		Interquartile Range	.144	
		Skewness	-1.795	.913
		Kurtosis	3.437	2.000

Berat Ginjal

		Mean	.72900	.033544
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .63587 Upper Bound .82213	
		5% Trimmed Mean	.72478	
		Median	.69200	
		Variance	.006	
	P2	Std. Deviation	.075007	
		Minimum	.676	
		Maximum	.858	
		Range	.182	
		Interquartile Range	.113	
		Skewness	1.855	.913
		Kurtosis	3.433	2.000
		Mean	.9000	.10000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .6224 Upper Bound 1.1776	
		5% Trimmed Mean	.9167	
		Median	1.0000	
		Variance	.050	
	K1	Std. Deviation	.22361	
		Minimum	.50	
		Maximum	1.00	
		Range	.50	
		Interquartile Range	.25	
		Skewness	-2.236	.913
		Kurtosis	5.000	2.000
Volume Ginjal		Mean	.9000	.10000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .6224 Upper Bound 1.1776	
		5% Trimmed Mean	.9167	
		Median	1.0000	
		Variance	.050	
	P1	Std. Deviation	.22361	
		Minimum	.50	
		Maximum	1.00	
		Range	.50	
		Interquartile Range	.25	
		Skewness	-2.236	.913
		Kurtosis	5.000	2.000
		Mean	.2930	.01064
Indeks Relatif Organ	K1	95% Confidence Interval Lower Bound	.2634	

		for Mean	Upper Bound	.3225	
		5% Trimmed Mean		.2925	
		Median		.2890	
		Variance		.001	
		Std. Deviation		.02379	
		Minimum		.27	
		Maximum		.32	
		Range		.05	
		Interquartile Range		.05	
		Skewness		.404	.913
		Kurtosis		-2.139	2.000
		Mean		.3106	.02895
		95% Confidence Interval	Lower Bound	.2302	
		for Mean	Upper Bound	.3910	
		5% Trimmed Mean		.3104	
		Median		.3062	
		Variance		.004	
	K2	Std. Deviation		.06473	
		Minimum		.23	
		Maximum		.40	
		Range		.17	
		Interquartile Range		.12	
		Skewness		.104	.913
		Kurtosis		-.063	2.000
		Mean		.2924	.01778
		95% Confidence Interval	Lower Bound	.2430	
		for Mean	Upper Bound	.3418	
		5% Trimmed Mean		.2938	
		Median		.3006	
		Variance		.002	
	P1	Std. Deviation		.03976	
		Minimum		.23	
		Maximum		.33	
		Range		.11	
		Interquartile Range		.06	
		Skewness		-1.469	.913
		Kurtosis		3.026	2.000

	Mean		.2989	.02072
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.2414	
		Upper Bound	.3565	
	5% Trimmed Mean		.2977	
	Median		.2984	
	Variance		.002	
P2	Std. Deviation		.04634	
	Minimum		.25	
	Maximum		.37	
	Range		.12	
	Interquartile Range		.08	
	Skewness		.962	.913
	Kurtosis		1.454	2.000

- a. Volume Ginjal is constant when Kelompok Subjek Penelitian = K2. It has been omitted.
b. Volume Ginjal is constant when Kelompok Subjek Penelitian = P2. It has been omitted.

Tests of Normality^{c,d}

	Kelompok Subjek Penelitian	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat Badan Tikus	K1	.198	5	.200 [*]	.977	5	.918
	K2	.197	5	.200 [*]	.930	5	.599
	P1	.246	5	.200 [*]	.879	5	.305
	P2	.155	5	.200 [*]	.969	5	.870
Berat Ginjal	K1	.172	5	.200 [*]	.985	5	.959
	K2	.171	5	.200 [*]	.962	5	.824
	P1	.333	5	.073	.785	5	.061
	P2	.289	5	.199	.767	5	.042
Volume Ginjal	K1	.473	5	.001	.552	5	.000
	P1	.473	5	.001	.552	5	.000
Indeks Relatif Organ	K1	.224	5	.200 [*]	.892	5	.366
	K2	.127	5	.200 [*]	.999	5	.999
	P1	.329	5	.082	.861	5	.232
	P2	.252	5	.200 [*]	.939	5	.660

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Volume Ginjal is constant when Kelompok Subjek Penelitian = K2. It has been omitted.

d. Volume Ginjal is constant when Kelompok Subjek Penelitian = P2. It has been omitted.

Lampiran 8. Uji Beda Berat Badan Tikus dan Indeks Relatif Organ

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Badan Tikus	Between Groups	7930.370	3	2643.457	2.053	.147
	Within Groups	20604.608	16	1287.788		
	Total	28534.978	19			
Indeks Relatif Organ	Between Groups	.001	3	.000	.168	.916
	Within Groups	.034	16	.002		
	Total	.035	19			



Lampiran 9. Uji Beda Berat Ginjal dan Volume Ginjal

Ranks			
	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank
Berat Ginjal	K1	5	14.60
	K2	5	5.80
	P1	5	13.20
	P2	5	8.40
	Total	20	
Volume Ginjal	K1	5	12.00
	K2	5	4.00
	P1	5	12.00
	P2	5	14.00
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}		
	Berat Ginjal	Volume Ginjal
Chi-Square	7.229	12.319
df	3	3
Asymp. Sig.	.065	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

Lampiran 10. Uji Beda Volume Ginjal antar Kelompok

1. Uji beda volume ginjal antara kelompok K1 dan K2

Ranks				
	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	K1	5	7.50	37.50
	K2	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics ^a		Volume Ginjal
Mann-Whitney U		2.500
Wilcoxon W		17.500
Z		-2.449
Asymp. Sig. (2-tailed)		.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.032 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

2. Uji beda volume ginjal antara kelompok K1 dan P1

Ranks				
	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	K1	5	5.50	27.50
	P1	5	5.50	27.50
	Total	10		

Test Statistics ^a		Volume Ginjal
Mann-Whitney U		12.500
Wilcoxon W		27.500
Z		.000
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		1.000 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

3. Uji beda volume ginjal antara kelompok K1 dan P2

Ranks

	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	K1	5	5.00	25.00
	P2	5	6.00	30.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Volume Ginjal
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

4. Uji beda volume ginjal antara kelompok K2 dan P1

Ranks

	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	K2	5	3.50	17.50
	P1	5	7.50	37.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Volume Ginjal
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.449
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

5. Uji beda volume ginjal antara kelompok K2 dan P2

Ranks

	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	K2	5	3.00	15.00
	P2	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Volume Ginjal
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-3.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

6. Uji beda volume ginjal antara kelompok P1 dan P2

Ranks

	Kelompok Subjek Penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Volume Ginjal	P1	5	5.00	25.00
	P2	5	6.00	30.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Volume Ginjal
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok Subjek Penelitian

b. Not corrected for ties.

Lampiran 11. Uji Validitas Data Pengamatan Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis Interobserver

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Peneliti	239.9500	20	145.94933	32.63526
	Interobserver	241.3000	20	145.82401	32.60724

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Peneliti & Interobserver	20	1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Peneliti - Interobserver	-1.35000	3.80132	.85000	-3.12907	.42907	-1.588	19	.129

Lampiran 12. Uji Normalitas Jumlah Sel Ginjal Nekrosis

Case Processing Summary

	Kelompok Subjek Penelitian	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah Sel Ginjal Nekrosis	K1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	K2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Descriptives

Kelompok Subjek Penelitian		Statistic	Std. Error
Jumlah Sel Ginjal Nekrosis	Mean	91.8000	3.82623
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	81.1767	
	Upper Bound	102.4233	
	5% Trimmed Mean	91.7778	
	Median	91.0000	
	Variance	73.200	
	Std. Deviation	8.55570	
	Minimum	81.00	
	Maximum	103.00	
	Range	22.00	
	Interquartile Range	16.00	
	Skewness	.116	.913
	Kurtosis	-.861	2.000
K1	Mean	460.2000	5.40740
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	445.1866	
	Upper Bound	475.2134	
	5% Trimmed Mean	460.2222	
	Median	461.0000	
	Variance	146.200	
K2	Std. Deviation	12.09132	

	Minimum	444.00	
	Maximum	476.00	
	Range	32.00	
	Interquartile Range	22.00	
	Skewness	-.082	.913
	Kurtosis	-.175	2.000
	Mean	142.2000	3.44093
	95% Confidence Interval for Lower Bound	132.6464	
	Mean Upper Bound	151.7536	
	5% Trimmed Mean	142.3333	
	Median	143.0000	
	Variance	59.200	
P1	Std. Deviation	7.69415	
	Minimum	131.00	
	Maximum	151.00	
	Range	20.00	
	Interquartile Range	14.00	
	Skewness	-.590	.913
	Kurtosis	-.022	2.000
	Mean	265.6000	3.54401
	95% Confidence Interval for Lower Bound	255.7603	
	Mean Upper Bound	275.4397	
	5% Trimmed Mean	265.8333	
	Median	269.0000	
	Variance	62.800	
P2	Std. Deviation	7.92465	
	Minimum	254.00	
	Maximum	273.00	
	Range	19.00	
	Interquartile Range	14.50	
	Skewness	-.884	.913
	Kurtosis	-.857	2.000

Tests of Normality

	Kelompok Subjek Penelitian	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	Df	Sig.	Statisti c	df	Sig.
Jumlah Sel Ginjal Nekrosis	K1	.137	5	.200 ⁺	.991	5	.984
	K2	.126	5	.200 ⁺	.999	5	.999
	P1	.141	5	.200 ⁺	.979	5	.928
	P2	.266	5	.200 ⁺	.901	5	.414

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 13. Uji Beda Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis

ANOVA

Jumlah Sel Ginjal Nekrosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	403357.350	3	134452.450	1575.307	.000
Within Groups	1365.600	16	85.350		
Total	404722.950	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel Ginjal Nekrosis

Tukey HSD

(I) Kelompok Subjek Penelitian	(J) Kelompok Subjek Penelitian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	368.40000 [*]	5.8429 4	.000	-385.1168	-351.6832
	P1	-50.40000 [*]	5.8429 4	.000	-67.1168	-33.6832
	P2	173.80000 [*]	5.8429 4	.000	-190.5168	-157.0832
K2	K1	368.40000 [*]	5.8429 4	.000	351.6832	385.1168
	P1	318.00000 [*]	5.8429 4	.000	301.2832	334.7168
	P2	194.60000 [*]	5.8429 4	.000	177.8832	211.3168
P1	K1	50.40000 [*]	5.8429 4	.000	33.6832	67.1168
	K2	318.00000 [*]	5.8429 4	.000	-334.7168	-301.2832
	P2	123.40000 [*]	5.8429 4	.000	-140.1168	-106.6832
P2	K1	173.80000 [*]	5.8429 4	.000	157.0832	190.5168

		-	5.8429	.000	-211.3168	-177.8832
	K2	194.60000	4			
		*				
	P1	123.40000	5.8429	.000	106.6832	140.1168
		*	4			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Jumlah Sel Ginjal Nekrosis

Tukey HSD^a

Kelompok Subjek Penelitian	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
K1	5	91.8000			
P1	5		142.2000		
P2	5			265.6000	
K2	5				460.2000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian

