

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN INSULIN (*Tithonia diversifolia*)
TERHADAP KADAR NEFRIN URIN PADA TIKUS MODEL
DIABETES MELITUS**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

**Luthfiyah Kamila Afandi
185070501111031**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN INSULIN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP KADAR NEFRIN URIN PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Oleh:

Luthfiyah Kamila Afandi

185070501111031

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 9 Desember 2021

Dan dinyatakan lulus oleh

Penguji-I

Dr. apt. Valentina Yurina, S.Si., M.Si.

NIP. 198302092010122001

Pembimbing-I, Penguji-II

apt. Oktavia Rahayu A., S.Farm., M.Biomed.

NIK. 2016099210192001

Pembimbing-II, Penguji-III

apt. Uswatun Khasanah., S.Farm., M.Farm

NIK. 2011068512222001

Mengetahui

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

apt. Alvan Febrian Shalas, M.Farm.

NIP. 198502182019031007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Luthfiyah Kamila Afandi

NIM : 185070501111031

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 02 Desember 2021

Yang membuat pernyataan,



Luthfiyah Kamila Afandi

NIM. 185070501111031

ABSTRAK

Afandi, Luthfiah Kamila. 2021. *Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (Tithonia diversifolia) terhadap Kadar Nefrin Urin pada Tikus Model Diabetes*

Melitus. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. (2) apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm.

Diabetes melitus (DM) adalah salah satu penyakit dengan prevalensi tertinggi di dunia. Di Indonesia sendiri, prevalensi DM mencapai angka 2%. Diabetes melitus berpotensi mengalami komplikasi, salah satunya yakni nefropati diabetik (ND). Marker yang dapat digunakan sebagai penanda kerusakan ginjal pada ND adalah nefrin. Beberapa studi terbaru telah membuktikan bahwa nefrin lebih baik dalam mendeteksi kerusakan ginjal lebih awal daripada albuminuria. Penatalaksanaan terapi DM sangat penting untuk mencegah dan menghambat progresivitas terjadinya komplikasi. Salah satu tanaman yang sudah dikenal memiliki efek antidiabetes yakni *Tithonia diversifolia*. Dosis ekstrak daun *Tithonia diversifolia* yang digunakan pada penelitian ini adalah 50 mg/KgBB, 100 mg/KgBB dan 150 mg/KgBB. Enam kelompok. 36 tikus wistar dibagi dalam 6 kelompok yakni kelompok normal (non-diabetes), kelompok positif (diabetes tanpa diberi terapi), 3 kelompok diberi terapi *Tithonia*, dan 1 kelompok diberi terapi glikuidon. Urin tikus DM yang telah diberi perlakuan selama 42 hari akan dikumpulkan dan diukur konsentrasi nefrin urin menggunakan metode ELISA. Dari hasil pengukuran didapatkan kadar nefrin urin pada kelompok kontrol positif (KP) meningkat secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) ($p < 0,05$). Pada semua kelompok yang diberi terapi ekstrak *T. diversifolia* mengalami penurunan konsentrasi nefrin secara signifikan ($p < 0,05$). Penelitian ini mengungkapkan bahwa pemberian ekstrak *T. diversifolia* dapat menurunkan kadar nefrin pada urin tikus DM. Namun, diperlukan adanya penelitian lanjutan dengan parameter lainnya seperti kreatinin urin untuk menentukan derajat keparahan nefropati diabetik.

Kata kunci: Nefropati diabetik, *Tithonia diversifolia*, Nefrin

ABSTRACT

Afandi, Luthfiyah Kamila. 2021. ***The Effectiveness of Insulin Leaf Extract (Tithonia diversifolia) on Urinary Nephrine Levels in Diabetes Mellitus Model Rats.*** Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. (2) apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm.

Diabetes mellitus (DM) is one of the diseases with the highest prevalence in the world. In Indonesia, the prevalence of DM reaches 2%. Diabetes mellitus has the potential to experience complications, one of which is diabetic nephropathy (ND). The marker that can be used as a marker of kidney damage in ND is nephrin. Several recent studies have shown that nephrin is better at detecting kidney damage earlier than albuminuria. One of the plants that are known to have anti-diabetic effects is *Tithonia diversifolia*. The doses of *T. diversifolia* leaf extract used in this study were 50 mg/kg BW, 100 mg/kg BW, and 150 mg/kg BW. The 36 Wistar rats were divided into 6 groups, namely the non-diabetic group, the positive group, 3 groups receiving *Tithonia* therapy, and gliquidone group therapy. The urine of DM rats that have been treated for 42 days will be collected and the urine nephrin concentration measured using the ELISA method. From the measurement results, it was found that urine nephrin levels in the positive control group increased significantly when compared to the non-diabetic group ($p < 0.05$). In all groups treated with *T. diversifolia* extract, the nephrin concentration decreased significantly ($p < 0.05$). This study revealed that the administration of *T. diversifolia* extract could reduce nephrin levels in the urine of DM rats. However, further research is needed with other parameters such as urine creatinine to determine the severity of diabetic nephropathy.

Keywords: Diabetic nephropathy, *Tithonia diversifolia*, Nefrin

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUTAN	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diabetes Melitus	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Epidemiologi	5
2.1.3 Patogenesis	7
2.1.4 Terapi Farmakologis	12
2.2 Nefropati Diabetik	15
2.2.1 Definisi	15
2.2.2 Epidemiologi	16
2.2.3 Patogenesis	18

2.2.3.1 Jalur Hemodinamik	18
2.2.3.2 Jalur Metabolik	22
2.2.4 Penatalaksanaan Nefropati Diabetik	26
2.3 Proteinuria	28
2.4 Podosit dan Nefrin	32
2.5 Tanaman Insulin	36
2.5.1 Taksonomi	36
2.5.2 Habitat	36
2.5.3 Morfologi	37
2.5.4 Kandungan Senyawa	38
2.5.5 Manfaat	40
2.6 Model Hewan Coba Diabetes Melitus	44
2.7 Glikuidon	45
2.8 ELISA	46
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	49
3.2 Hipotesis Penelitian	51
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	52
4.2 Sampel penelitian	52
4.3 Variabel Penelitian	53
4.3.1 Variabel Bebas	53
4.3.2 Variabel Terikat	53
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	54
4.5 Alat dan Bahan	54
4.5.1 Alat dan Bahan Untuk Perawatan serta Pembuatan Makanan Tikus	54
4.5.2 Alat Penimbang Berat Badan Tikus	54
4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Buffer Sitrat	54
4.5.4 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Tikus Model DM	55
4.5.5 Alat dan Bahan Pemberian Terapi	55
4.5.6 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Insulin	55

4.5.7 Alat dan Bahan Pengumpulan Sampel Urin	55
4.5.8 Alat dan Bahan Pengamatan Nefrin Urin.....	55
4.6 Definisi Operasional	57
4.7 Alur Penelitian	58
4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data	58
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Insulin	58
4.8.2 Persiapan Hewan Coba	59
4.8.3 Pembuatan Buffer Sitrat (Pelarut Streptozotisin)	60
4.8.4 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus	60
4.8.5 Pemberian Terapi	61
4.8.6 Identifikasi Kadar Nefrin Urin	61
4.8.6.1 Pengumpulan Sampel	61
4.8.6.2 Preparasi Reagen Elisa Nefrin	65
4.8.6.3 Prosedur ELISA	66
4.9 Analisis Data	
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Ekstraksi Daun Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)	68
5.2 Analisis Pengukuran Konsentrasi Nefrin Urin	69
BAB VI PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	72
6.2 Implikasi di Bidang Kefarmasian	76
6.3 Keterbatasan Penelitian	76
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	79
7.2 Saran	79
DAFTAR PUSTAKA	78
LAMPIRAN	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Estimasi Jumlah Orang Dewasa (20-79 Tahun) dengan Diabetes pada Tahun 2019	6
Gambar 2.2	<i>The Egregious Eleven</i>	8
Gambar 2.3	Nefron Normal dan Diabetik dengan Perubahan Hemodinamik Ginjal.....	21
Gambar 2.4	Mekanisme Jalur Hemodinamik dalam Perkembangan ND	21
Gambar 2.5	Proses Oksidasi Glukosa dan Stres Oksidatif yang Diinduksi Kondisi Hiperglikemi.....	26
Gambar 2.6	Struktur Membran Basal Glomerulus	30
Gambar 2.7	Glomerulopati pada Diabetes Nefropati	31
Gambar 2.8	Karakteristik dan Interaksi pada Nefrin	34
Gambar 2.9	Komponen Molekuler Celah Diafragma.....	34
Gambar 2.10	<i>Tithonia diversifolia</i>	37
Gambar 3.1	Kerangka Konsep.....	49
Gambar 4.1	Alur Penelitian.....	57
Gambar 4.2	Seri Pengenceran Larutan Standard ELISA.....	62
Gambar 4.3	Prosedur Pengujian Kadar Nefrin Urin dengan Metode ELISA.....	65
Gambar 4.4	ELISA <i>Plate Mapping</i>	66
Gambar 5.1	Hasil Ekstraksi Daun <i>T. diversifolia</i>	68
Gambar 5.2	Grafik Rerata Konsentrasi Nefrin Urin H-42.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	<i>Stages of Diabetic Nephropathy</i>	16
Tabel 2.2	Penelitian Terkait Analisis Nefrin pada Subjek DM	35
Tabel 2.3	Senyawa yang Terkandung dalam <i>T.diversifolia</i> dan Manfaatnya	40
Tabel 2.4	Penelitian Eskperimental Aktivitas Antidiabetik <i>T. diversifolia</i>	43
Tabel 5.1	Persentase Rendemen Ekstraksi Daun <i>T.diversifolia</i>	68
Tabel 5.2	Rerata dan Standar Deviasi Konsentrasi Nefrin Urin H-42.....	69
Tabel 5.3	Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i> Konsentrasi Nefrin Urin.....	71



DAFTAR SINGKATAN

ACE	=	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ACE-I	=	<i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor</i>
AGT	=	<i>Angiotensinogen</i>
Ang-I	=	<i>Angiotensin-1</i>
Ang-II	=	<i>Angiotensin-II</i>
AOPPs	=	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
ARB	=	<i>Angiotensin Receptor Blocker</i>
AT-1	=	<i>Angiotensin-II Receptor Subtype 1</i>
CCB	=	<i>Calcium Channel Blocker</i>
CD2AP	=	<i>CD2-associated protein</i>
CKD	=	<i>Chronic Kidney Disease</i>
CTGF	=	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAG	=	<i>Diasilgliserol</i>
DHAP	=	<i>Dihidroksiaseton Fosfat</i>
DKD	=	<i>Diabetic Kidney Disease</i>
DM	=	<i>Diabetes Melitus</i>
DPP-4 inhibitor	=	<i>Dipeptidyl Peptidase-4 inhibitor</i>
ECM	=	<i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	=	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays</i>
ESRD	=	<i>End Stage Renal Disease</i>
ET	=	<i>Endothelin</i>
ET-1	=	<i>endothelin-1</i>

ETA	= endothelin reseptor subtipe-A
ETB	= endothelin reseptor subtipe-B
F6P	= <i>fructose-6-phosphate</i>
FFA	= <i>Free Fatty Acid</i>
G6P	= <i>glucose-6-phosphate</i>
GADPH	= gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase
GAP	= <i>glyceraldehyde-3-phosphate</i>
GAPDH	= <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GBM	= <i>Glomerular Basement Membrane</i>
GFAT	= Glutamin Fruktosa-6-fosfat Amidotransferase
GFB	= <i>Glomerular Filtration Barrier</i>
GFR	= <i>Glomerular Filtration Rate</i>
GGK	= Gagah Ginjal Kronis
GIP	= <i>Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GLP-1	= <i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
GSH	= Glutathione
HGP	= <i>Hepatic Glucose Production</i>
IDF	= <i>International Diabetes Federation</i>
IKK β	= <i>inhibitor nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IRS	= <i>Insulin Receptor Substrate</i>
JNK1	= <i>C-Jun N-terminal Kinase 1</i>
LFG	= Laju Filtrasi Glomerulus
MCP-1	= <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>

NAD ⁺	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
ND	= Nefropati Diabetik
NFκB	= nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	= Nitric Oxide
NPHN	= Nephrin
OHO	= Obat Hipoglikemik Oral
PARP-1	= poly-ADP-ribose polymerase-1
PDGF-B	= Platelet-Derived Growth Factor Subunit B
PKC	= Protein Kinase C
PPAR-γ	= peroxisome proliferator activated receptor gamma
RAAS	= Renin-Angiotensin-Aldosterone System
RAGE	= Receptor for Advanced Glycation End Products
ROS	= Reactive Oxygen Species
SGLT	= Sodium Glucose co-Transporter
STZ	= Streptozotosin
TD	= <i>Tithonia diversifolia</i>
TGF-β	= Transforming Growth Factor-β
TNF-α	= Tumor Necrosis Factor-α
TZD	= Tiazolidindion
UACR	= Urine Albumin-Creatinine Ratio
UAE	= Urinary Albumin Excretion

VEGF

= *Vascular Endothelial Growth Factor*

WHO

= *World Health Organization*

ZO-1

= *Zona Occludens*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Layanan Etik	85
Lampiran 2. Perhitungan Buffer Pelarut Streptozotisin	86
Lampiran 3. Preparasi Ekstrak Daun Insulin dan Glikuidon	87
Lampiran 4. Surat Determinasi Tanaman <i>T. diversifolia</i>	88
Lampiran 5. <i>Optical Density</i> dan Konsentrasi Nefrin Urin (ng/ml).....	89
Lampiran 6. OD Larutan Standar Nefrin Urin dan Persamaan Regresinya...	90
Lampiran 7. Uji Statistik Konsentrasi Nefrin Urin.....	91
Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian.....	100



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit gangguan metabolik kronis yang memiliki karakteristik hiperglikemia dan terjadi karena adanya kelainan fungsi sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (Perkeni, 2015). Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018, angka prevalensi DM berdasarkan diagnosis dokter pada pasien berusia ≥ 15 tahun yakni sebesar 2%.

Sedangkan, angka prevalensi pada tahun 2018 berdasarkan hasil pemeriksaan gula darah sebesar 8,5%. Disebutkan pula bahwa hanya sekitar 25% penderita diabetes yang mengetahui bahwa dirinya mengidap DM (Pusdatin Kemenkes, 2020).

DM merupakan salah satu penyakit yang berpotensi mengalami komplikasi, diantaranya seperti retinopati diabetik, penyakit kardiovaskuler diabetik dan nefropati diabetik (ND), yang merupakan komplikasi paling umum dan serius dialami oleh penyandang DM (Zhang *et al.*, 2018). Pada 30% pasien ND disebabkan oleh DM-tipe 1, dan 40% karena DM-tipe 2 (Alicic *et al.*, 2017). ND menjadi penyebab utama penyakit gagal ginjal kronis (GGK), yang secara bertahap dimulai dengan normoalbuminuria, mikroalbuminuria, makroalbuminuria dan meningkat menjadi penyakit gagal ginjal stadium akhir atau *end stage renal disease* (ESRD) (Zhang *et al.*, 2018). Hingga saat ini, pemeriksaan laboratorium seperti kadar albuminuria, rasio albumin kreatinin urin dan kreatinin serum yang digunakan untuk penegakkan diagnosis ND (Perkeni, 2015). Namun, studi terbaru telah

membuktikan bahwa nefrin lebih baik dalam mendeteksi kerusakan ginjal lebih awal daripada albuminuria.

Nefrin merupakan salah satu biomarker kerusakan ginjal pada nefropati diabetik. Nefrin memiliki peran penting dalam mengontrol struktur diagram celah podosit dan sebagai pusat jalur persinyalan (Zhu and Cijiang, 2015). Podosit merupakan sel terminal yang memiliki aktivitas diferensiasi tinggi di glomerulus ginjal. Studi terbaru menunjukkan bahwa ketidaknormalan struktur dan fungsi podosit terjadi pada awal perjalanan penyakit ginjal pada DM. Pada penelitian oleh Coward dkk., (2007) menunjukkan bahwa podosit merupakan sel yang sensitif terhadap insulin yang mana nefrin memiliki peran penting dalam respon podosit terhadap insulin (Bandiara dan Soelaeman, 2011). Adanya protein nefrin pada urin atau yang disebut nefrinuria, memiliki potensi untuk menjadi biomarker penting pada kerusakan glomerulus dini (Fiseha, 2015).

Studi yang telah dilakukan oleh Jim *et al.*, (2012) diperoleh hasil bahwa nefrinuria terjadi pada 100% pasien DM-tipe 2 dengan mikroalbuminuria dan makroalbuminuria, serta 54% pada pasien DM-tipe 2 dengan normoalbuminuria. Sedangkan pada pasien DM-tipe 1, nefrinuria diamati pada 30% pasien DM-tipe 1 dengan normoalbuminuria serta 28% pasien dengan mikroalbuminuria (Lee and Choi, 2015). sehingga dapat disimpulkan bahwa adanya nefrin pada urin dapat menjadi pendeteksi awal kerusakan ginjal pada nefropati diabetik.

Penatalaksanaan nefropati diabetik yang saat ini digunakan yaitu pemberian obat hipoglikemik oral (OHO) maupun insulin untuk mengontrol glukosa darah mencapai target HbA1c sebesar 7% (Kepmenkes, 2020).

Kemudian untuk pengobatan albuminuria atau nefropati dapat menggunakan ACE-I dan ARB yang telah terbukti dapat menunda perkembangan penyakit. Apabila penatalaksanaan dengan satu golongan obat tidak ditoleransi, dapat dilakukan penggantian terapi dengan golongan lainnya (ADA, 2004). Penggantian dan terapi tambahan dapat menggunakan obat-obatan golongan diuretik, CCB, dan β -blockers. Namun, pada pemberian ACE-I, ARB, dan diuretik perlu dilakukan monitoring kadar serum kreatinin dan kalium (Perkeni, 2015). Selain itu, pemakaian obat-obatan konvensional sebagai terapi DM maupun komplikasi nefropati dapat menimbulkan berbagai efek samping yang memerlukan pengawasan dan penanganan khusus. Sehingga, tidak jarang masyarakat lebih memilih pengobatan herbal sebagai alternatif terapi.

Salah satu tanaman yang memiliki potensi mengobati diabetes adalah tanaman insulin atau *Tithonia diversifolia*. Hasil studi yang telah dilakukan, menyebutkan bahwa daun *T. diversifolia* mengandung zat aktif (fitokimia) yang terbukti mempunyai efek menurunkan kadar gula darah (glukosa) pada kelompok tikus perlakuan yang diinduksi STZ (Solfaine dkk., 2019).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti bermaksud ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *T. diversifolia* sebagai antidiabetes, khususnya pengaruhnya terhadap penurunan konsentrasi nefrin pada urin tikus wistar yang diinduksi STZ, untuk pencegahan komplikasi nefropati diabetik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan yang dihadapi, yaitu:

Apakah pemberian ekstrak daun *T. diversifolia* dapat menurunkan kadar nefrin pada urin tikus model diabetes melitus?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan dari penulisan karya tulis ini, antara lain:

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap penurunan kadar nefrin pada urin tikus model diabetes melitus.

1.3.2 Tujuan Khusus

Membandingkan dan menganalisis dosis ekstrak *T.diversifolia* yang paling efektif dalam menurunkan kadar nefrin pada urin tikus DM yang diinduksi STZ.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat digunakan untuk mengembangkan teori serta menambah informasi yang menjadi dasar penelitian lanjutan, khususnya untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun insulin terhadap kadar nefrin urin pada DM.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat digunakan untuk memberikan informasi kepada masyarakat terkait fungsi ekstrak daun insulin untuk mengurangi progresivitas penyakit DM.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

2.1.1 Definisi

DM adalah salah satu penyakit gangguan metabolik, ditandai dengan kondisi hiperglikemia yang terjadi karena adanya kelainan fungsi sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya (Perkeni, 2015). Hiperglikemia yakni suatu kondisi medis yang ditunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa darah melebihi normal. Hiperglikemia ini dapat menjadi karakteristik beberapa penyakit terutama DM. Klasifikasi DM berdasarkan penyebabnya, terdapat empat kelompok, yaitu DM-tipe 1, DM-tipe 2, DM gestasional dan DM tipe lainnya (Kepmenkes, 2020).

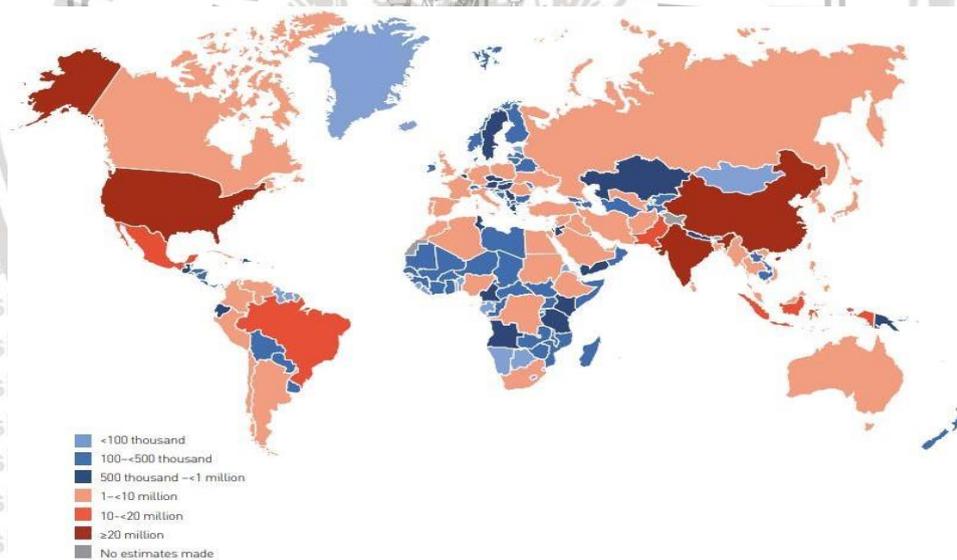
Komplikasi yang terjadi karena penyakit DM dapat berupa gangguan pada pembuluh darah baik makrovaskular ataupun mikrovaskular. Selain itu juga dapat menyebabkan gangguan pada sistem saraf atau neuropati. Gangguan ini dapat terjadi pada pasien yang sudah lama terdiagnosis DM-tipe 2 maupun pasien yang baru terdiagnosis. Komplikasi makrovaskular yang umum terjadi pada organ jantung, otak dan pembuluh darah, sedangkan komplikasi mikrovaskular dapat terjadi pada organ mata dan ginjal. Pasien DM-tipe 2 juga umumnya mengalami keluhan neuropati, baik neuropati motorik, sensorik ataupun otonom (Kepmenkes, 2020).

2.1.2 Epidemiologi

The International Diabetes Federation (IDF) membuat estimasi prevalensi diabetes untuk tahun 2019 yang diproyeksikan pada tahun 2030 dan 2045. Estimasi diabetes yang dibuat adalah untuk orang dewasa berusia 20-79 tahun,

dan mencakup DM-tipe 1 serta DM-tipe 2, baik yang terdiagnosis maupun tidak terdiagnosis. Pada tahun 2019, diperkirakan dari seluruh populasi orang dewasa (20-79 tahun) di dunia, 9,3% atau 463 juta orang menderita DM (**Gambar 2.1**).

Dan sekitar 79,4% tinggal di negara berpenghasilan rendah dan menengah. Berdasarkan perkiraan di tahun 2019 itu, pada tahun 2030 diproyeksikan sejumlah 578,4 juta dan pada tahun 2045 sejumlah 700,2 juta orang dewasa berusia 20-79 tahun, akan hidup dengan penyakit diabetes (IDF, 2019). Terdapat banyak faktor terjadinya peningkatan epidemi DM, diantaranya penuaan populasi, pembangunan ekonomi, urbanisasi, kebiasaan makan yang tidak sehat



dan gaya hidup (Zheng *et al.*, 2017).

Gambar 2.1 Estimasi Jumlah Orang Dewasa (20-79 Tahun) dengan Diabetes pada Tahun 2019 (IDF, 2019)

Regional negara yang menduduki peringkat pertama dan kedua dengan prevalensi diabetes tertinggi pada penduduk usia 20-79 tahun yakni negara di wilayah Arab-Afrika Utara (12,2%) dan Pasifik Barat (11,4%). Wilayah Asia Tenggara menempati peringkat ke-3 dengan prevalensi sebesar 11,3%. Cina,

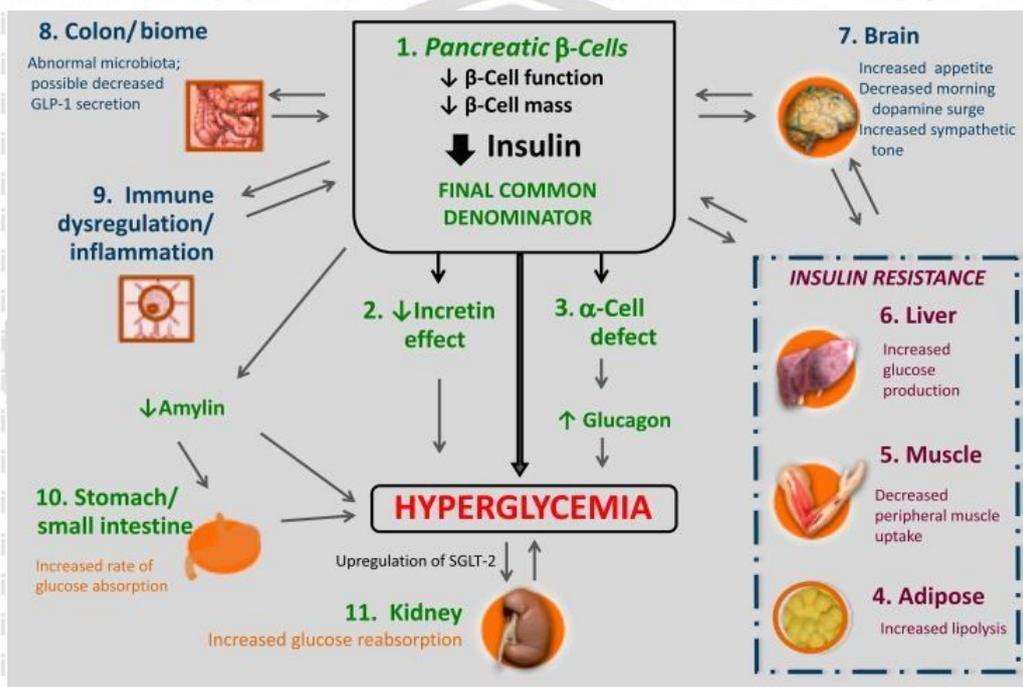
India, dan Amerika Serikat merupakan tiga besar negara dengan jumlah penderita DM tertinggi, dengan jumlah 116,4 juta, 77 juta, dan 31 juta. Sedangkan Indonesia menempati peringkat ke-7 penderita DM terbanyak, yakni sebesar 10,7 juta. Indonesia menjadi satu-satunya negara di Asia Tenggara yang masuk daftar 10 negara dengan jumlah penderita DM terbanyak. Hal ini menunjukkan bahwa Indonesia memiliki kontribusi besar terhadap prevalensi kasus diabetes di Asia Tenggara (Pusdatin Kemenkes, 2020).

Berdasarkan data tahun 2018, prevalensi diabetes melitus pada penduduk Indonesia berusia ≥ 15 tahun yakni sebesar 2%, angka tersebut berdasarkan penegakan diagnosis dokter. Namun, jika berdasarkan pemeriksaan gula darah yakni sebesar 8,5% (Pusdatin Kemenkes, 2020). Angka tersebut menunjukkan bahwa jumlah penyandang DM di Indonesia sangat besar dan merupakan pekerjaan yang berat untuk dapat ditangani sendiri oleh tenaga kesehatan (Kepmenkes, 2020).

2.1.3 Patogenesis

Seperti yang telah diketahui, terdapat beberapa tipe dari diabetes, diantaranya yaitu DM tipe-1, DM tipe-2, diabetes gestasional, dan diabetes tipe lainnya. Pada penelitian tugas akhir ini, tipe diabetes yang menjadi pembahasan utama yakni, DM-tipe 2. Terjadinya resistensi insulin pada otot dan liver serta adanya kegagalan fungsi sel beta pankreas merupakan patofisiologi utama dari DM tipe-2. Dari hasil studi terkini diketahui bahwa kegagalan sel beta pankreas dengan derajat berat terjadi lebih dini dari yang diperkirakan sebelumnya. Tidak hanya otot, liver, dan sel beta saja yang berperan dalam patofisiologi DM-tipe 2, organ lain seperti: jaringan lemak, usus besar, usus halus, sel alpha pankreas,

ginjal, dan otak juga ikut berperan dalam memicu terjadinya gangguan toleransi glukosa pada DM-tipe 2 (Perkeni, 2015). Secara garis besar patofisiologi DM-tipe 2 disebabkan oleh sebelas faktor atau yang disebut *egregious eleven* (Gambar 2.2), sebagai berikut:



Gambar 2.2 *The Egregious Eleven* (Schwartz et al., 2016)

1. Kegagalan sel beta pankreas

Kegagalan ini disebabkan karena sel beta pankreas mengalami penurunan fungsi dan penurunan massa sel yang berakibat pada penurunan sekresi insulin. Umumnya, saat dilakukan penegakkan diagnosis DM-tipe 2, fungsi sel beta pankreas sudah berkurang. Obat anti diabetes yang memiliki mekanisme kerja di jalur ini adalah sulfonilurea, meglitinid, GLP-1 agonis dan DPP-4 inhibitor (Perkeni, 2015; Schwartz et al., 2016).

2. Penurunan efek inkretin

Glukosa yang dikonsumsi secara oral memicu respon insulin jauh lebih besar daripada jika diberikan secara intravena. Efek tersebut disebut efek inkretin. Diperankan oleh dua hormon yakni *glucagon-like polypeptide-1* (GLP-1) dan *glucose-dependent gastric inhibitory polypeptide* (GIP). Pada DM-tipe 2 ditemukan terjadinya defisiensi GLP-1 dan resistensi hormon GIP. Selain itu, hormon inkretin juga dapat segera dipecah oleh adanya enzim *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4). Sehingga, obat yang dapat digunakan untuk menghambat jalur ini adalah DPP-4 inhibitor (Perkeni, 2019).

3. Defek sel alpha pankreas

Sel- α pankreas memiliki fungsi dalam sintesis hormon glukagon yang kadarnya dalam plasma akan meningkat saat kondisi puasa. Terjadinya peningkatan hormon glukagon ini dapat menimbulkan peningkatan signifikan *hepatic glucose production* (HGP) dalam keadaan basal dibandingkan individu normal. Tentunya, hal tersebut dapat memicu kondisi hiperglikemia. Obat yang dapat menghambat sekresi glukagon maupun reseptornya meliputi GLP-1 agonis, DPP-4 inhibitor dan amylin (Perkeni, 2015; Schwartz *et al.*, 2016).

4. Jaringan adiposa (sel lemak)

Resistensi sel lemak terhadap efek antilipolisis dari insulin, dapat menyebabkan terjadinya peningkatan proses lipolisis dan peningkatan kadar *free fatty acid* (FFA) dalam plasma. Adanya peningkatan FFA dapat merangsang proses glukoneogenesis sehingga mencetuskan resistensi insulin di liver dan otot. Selain itu, FFA juga dapat

mengganggu sekresi insulin. Gangguan oleh FFA ini disebut *lipotoxocity*. Obat yang mekanisme kerjanya di jalur ini adalah tiazolidindion (Perkeni, 2015; Schwartz *et al.*, 2016).

5. Otot

Pada individu DM-tipe 2 terjadi gangguan kinerja insulin yang *multiple* di intramioselular sebagai akibat dari gangguan fosforilasi tirosin sehingga menimbulkan gangguan transport glukosa dalam sel otot, terjadi penurunan sintesis glikogen, dan penurunan oksidasi glukosa. Obat anti diabetes yang bekerja di jalur ini yaitu metformin dan tiazolidindion (Perkeni, 2015; Schwartz *et al.*, 2016).

6. Liver

Resistensi insulin berat yang terjadi pada individu DM-tipe 2 dapat memicu glukoneogenesis sehingga HGP dalam keadaan basal mengalami peningkatan. Obat anti diabetes yang dapat menekan proses glukoneogenesis adalah metformin (Perkeni, 2015; Schwartz *et al.*, 2016).

7. Otak

Hipotalamus merupakan organ pengatur utama yang berperan dalam meregulasi nafsu makan (Dodds, 2017). Insulin memiliki peran kuat dalam menekan nafsu makan. Pada individu obesitas baik yang dengan DM maupun tidak DM, dalam tubuhnya mengalami kondisi hiperinsulinemia yang merupakan bentuk mekanisme kompensasi dari resistensi insulin. Individu golongan ini mengalami peningkatan asupan makanan akibat dari adanya resistensi insulin yang juga terjadi di otak.

Terdapat tiga jenis obat anti diabetes yang bekerja di jalur ini, meliputi

GLP-1 agonis, amylin, dan bromokriptin (Perkeni, 2015; Schwartz *et al.*, 2016).

8. Kolon/Mikrobiota

Mikrobiota usus telah terbukti berkaitan dengan patofisiologi DM-tipe 1, DM-tipe 2, dan obesitas. Adanya perubahan komposisi mikrobiota pada usus berkontribusi dalam kondisi hiperglikemia. Diperkirakan pemberian probiotik dan prebiotik dapat sebagai mediator untuk mengatasi hiperglikemia (Perkeni, 2019).

9. Disregulasi imun atau inflamasi

Inflamasi sistemik derajat rendah terbukti berhubungan kuat dengan patogenesis DM-tipe 2. Adanya induksi stres pada endoplasma karena meningkatnya kebutuhan metabolisme untuk insulin. Pada DM-tipe 2 terjadi resistensi insulin perifer dan penurunan sekresi insulin, serta inflamasi kronis derajat rendah di jaringan perifer seperti adiposa, hepar dan otot (Perkeni, 2019).

10. Usus halus / lambung

Saluran pencernaan memiliki peran dalam absorpsi karbohidrat melalui kinerja enzim alfa glukosidase yang dapat memecah polisakarida menjadi monosakarida yang selanjutnya diserap oleh usus, akibatnya terjadi peningkatan glukosa darah setelah makan. Obat yang bekerja menghambat jalur ini adalah acarbose.

Selain itu, pada lambung terjadi percepatan pengosongan lambung karena penurunan produksi amilin pada diabetes yang merupakan konsekuensi kerusakan sel beta pankreas. Hal tersebut berakibat pada

peningkatan absorpsi glukosa di usus halus dan berkaitan dengan peningkatan kadar glukosa postprandial (Perkeni, 2019).

11. Ginjal

Fungsi ginjal salah satunya yaitu memfiltrasi glukosa. Glukosa yang telah tefiltrasi 90% akan diserap kembali melalui peran SGLT-2 pada bagian *convulated* tubulus proksimal. Sedangkan 10% sisanya akan diserap melalui peran SGLT-1 pada tubulus desenden dan asenden. Pada individu dengan DM terjadi peningkatan ekspresi gen SGLT-2, yang mana dapat menyebabkan glukosa tidak bisa dikeluarkan lewat urin. Akibatnya, terjadi peningkatan reabsorpsi glukosa di tubulus ginjal dan mengalami peningkatan kadar glukosa darah. Obat yang dapat menghambat SGLT-2 atau disebut *SGLT-2 inhibitor* yakni dapaglifozin, empaglifozin, dan canaglifozin. *SGLT-2 inhibitor* ini akan menghambat reabsorpsi kembali glukosa di tubulus ginjal dan glukosa dapat dikeluarkan lewat urin (Perkeni, 2019).

2.1.4 Terapi Farmakologis

Penatalaksanaan DM-tipe 2 dengan pengaturan makan dan gaya hidup sehat merupakan hal yang harus diperhatikan. Pemberian obat-obatan konvensional dapat diberikan bersamaan dengan terapi non-farmakologis. Terapi farmakologis DM dapat berupa obat oral maupun suntikan.

1) Obat antihiperqlikemia oral

Terdapat lima golongan obat antihiperqlikemia oral berdasarkan mekanisme kerjanya, sebagai berikut:

a) Peningkat sensitivitas insulin

- Metformin, dapat menurunkan glukosa darah dengan mengurangi proses glukoneogenesis dan memperbaiki ambilan glukosa perifer.

- Tiazolidindion (TZD), obat ini dapat bekerja sebagai agonis enzim peroxisome proliferasi-activated receptor gamma (PPAR- γ), yakni reseptor insulin yang berada di sel otot, lemak, dan hati.

b) Pemacu sekresi insulin

- Sulfonilurea, menstimulasi sel beta pankreas untuk mensekresi insulin dengan cara mengikat reseptor sulfonilurea. Contoh obat golongan ini yakni glibepiride, gliclazide, dan glibenclamide.

- Meglitinide, memiliki mekanisme kerja sama dengan sulfonilurea, dengan penekanan pada peningkatan sekresi insulin fase pertama. Contoh obat golongan ini meliputi repaglinide dan nateglinide.

c) Inhibitor alfa glukosidase

Obat golongan ini memiliki mekanisme kerja memperlambat absorpsi karbohidrat di saluran cerna, sehingga dapat menurunkan glukosa darah pasca makan. Contoh obat golongan ini adalah acarbose dan voglibose.

d) DPP-4 inhibitor

Obat golongan ini akan menghambat lokasi pengikatan pada DPP-4 sehingga dapat mencegah inaktivasi GLP-1. Akibatnya, terjadi peningkatan kadar GLP-1 dan GIP dalam bentuk aktif di

sirkulasi darah, sehingga terjadi perbaikan toleransi glukosa, meningkatkan respon insulin, dan menurunkan sekresi glukagon. Contoh obat golongan ini yakni vildagliptin, sitagliptin, linagliptin, saxagliptin, dan alogliptin.

e) SGLT-2 inhibitor

Golongan ini dapat menghambat reabsorpsi glukosa di tubulus proksimal dan meningkatkan ekskresi glukosa di urin, sehingga gula darah menurun. Contoh obat golongan ini meliputi empagliflozin, dapagliflozin, canagliflozin dan ipragliflozin.

2) Obat antihiperqlikemia suntik

a) Insulin

- Insulin basal, menstimulasi *uptake* glukosa perifer (sel otot dan sel lemak) dan menghambat produksi glukosa di hati. Insulin ini berfungsi untuk mengendalikan glukosa dara basal (puasa atau sebelum makan).
- Insulin prandial, untuk mengendalikan glukosa darah setelah makan.

b) Agonis reseptor GLP-1, dapat meningkatkan sekresi insulin dan menurunkan sekresi glukagon, sehingga dapat menurunkan kadar HbA1c dengan menurunkan glukosa darah *post prandial*.

Selain itu juga dapat memperlambat pengosongan lambung. Contoh obat golongan ini yaitu liraglutide, lixisenatide, albiglutide, dulaglutide, exenatide, dan semaglutide (Kepmenkes, 2020).

2.2 Nefropati Diabetik

2.2.1 Definisi

Nefropati diabetik yakni suatu sindrom klinis pada penderita DM yang ditandai dengan adanya albuminuria persisten pada kisaran 30-299 mg/24 jam sebagai penanda dini dan dapat meningkat menjadi ≥ 300 mg/24 jam yang sering berlanjut menjadi gagal ginjal kronik stadium akhir. Penegakkan diagnosis ND jika didapatkan kadar albumin > 30 mg dalam urin 24 jam pada 2 dari 3 kali pemeriksaan dalam kurun waktu 3-6 bulan, tanpa ditemukannya penyebab albuminuria lainnya (Perkeni, 2015). Nefropati diabetik merupakan satu dari beberapa komplikasi mikrovaskuler yang terjadi karena adanya kelainan vaskuler ginjal pada penderita DM yang berkaitan dengan gangguan metabolisme karbohidrat atau intoleransi glukosa (Putri, 2015; Rivandi dan Yonata, 2015).

Secara klinis, ND ditandai dengan peningkatan progresif *urinary albumin excretion* (UAE), yang berkorelasi dengan peningkatan tekanan darah dan risiko kardiovaskular. Hal tersebut juga disertai dengan penurunan bertahap *glomerular filtration rate* (GFR), yang akhirnya berkembang menjadi ESRD. terjadinya kerusakan *glomerular filtration barrier* (GFB) akan mengarah ke peningkatan protein urin yang dikenal sebagai albuminuria, yang merupakan salah satu tanda awal ND dan disfungsi vaskular sistemik. Derajat albuminuria dan proteinuria berkorelasi dan juga merupakan prediktor klinis penting dari perkembangan tingkat penyakit ginjal. Terdapat lima tahap perkembangan penyakit ND (**Tabel 2.1**) (Sagoo and Gnudi, 2020).

Pada pasien dengan diabetes tipe 2, kejadian mikroalbuminuria adalah 2,0% per tahun dan prevalensi 10 tahun setelah diagnosis. Skrining untuk nefropati diabetik harus dimulai pada saat diagnosis pada pasien dengan

diabetes tipe 2, karena 7% dari mereka sudah memiliki mikroalbuminuria pada saat itu. Namun, prevalensi mikroalbuminuria sebelum 5 tahun pada kelompok ini dapat mencapai 18%, terutama pada pasien dengan kontrol glikemik dan lipid yang buruk serta tingkat tekanan darah yang tinggi (Gross et al., 2005).

Tabel 2.1 Stages of Diabetic Nephropathy

Stage of diabetic nephropathy	GFR	UAE	Serum and clinical findings	Morphological findings
Stage 1: glomerular hyperfiltration (at diagnosis)	Normal >90 mL/min/1.73 m ² or increased	<30 mg/day	No serum significant finding and normal blood pressure	increased renal size, glomerular hyperfunction and hypertrophy
Stage 2: silent stage (2-5 years)	Normal >90 mL/min/1.73 m ²	<30 mg/day	No serum significant finding and maybe yes/no hypertension	Thickening of basement membrane and mesangial proliferation
Stage 3: incipient nephropathy (5-15 years)	<60 mL/min/1.73 m ²	Microalbuminuria: 30-300 mg/day	No serum significant finding and hypertension	Increased basal membrane thickness and mesangial expansion
Stage 4: overt nephropathy (10-25 years)	<30 mL/min/1.73 m ²	Macroalbuminuria: >300 mg/day	Serum creatinin and BUN has begun to increase, hypertension, significant loss of kidney function	Diffuse/nodular glomerulosclerosis
Stage 5: end-stage renal disease (15-30 years)	<15 mL/min/1.73 m ²	Macroalbuminuria: >300 mg/day	Uremia, hypertension, major loss of kidney function	Glomerular fibrosis/sclerosis

GFR: glomerular filtration rate; UAE: urinary albumin excretion

Sagoo and Gnudi, 2020; Ertugul et al, 2011; Sharma and Sharma, 2013

2.2.2 Epidemiologi

Nefropati diabetik atau istilah lainnya adalah *diabetic kidney disease* (DKD) merupakan komplikasi serius yang terjadi pada 20-40% penderita diabetes. Di

negara barat, DKD menjadi penyebab tunggal utama penyakit ginjal stadium akhir (ESRD) (Gheith *et al.*, 2016). Komplikasi mikrovaskuler ini berkembang pada sekitar 30% pasien dengan DM-tipe 1 dan sekitar 40% dengan DM-tipe 2 (Alicic *et al.*, 2017). Di Amerika Serikat sekitar 50% ESRD disebabkan oleh ND.

Sedangkan di Asia, hampir 60% penderita diabetes dan hipertensi mengalami komplikasi ND. Secara global, lebih dari 80% ESRD disebabkan oleh diabetes atau hipertensi, ataupun kombinasi keduanya. Proporsi ESRD yang dikaitkan dengan diabetes, bervariasi antara 10-67%. Prevalensi ESRD juga 10 kali lebih tinggi pada penderita diabetes dibandingkan dengan yang tidak diabetes (IDF, 2019).

Tahun 1981, ND menjadi penyebab kematian urutan ke-6 di negara barat.

Saat ini 25% penderita gagal ginjal menjalani terapi dialisis karena DM, terutama DM-tipe 2 (Satria dkk., 2018). Pada tahun 2017, di tingkat global, prevalensi DKD pada pria dan wanita masing-masing adalah 15,48/1000 dan 16,50/1000.

Sedangkan angka kematian akibat DKD pada tahun 2017 diperkirakan sebanyak 219.451 untuk populasi pria dan 206.848 untuk populasi wanita. Angka kematian ini menyumbang sekitar 34% dari semua jumlah kejadian kematian akibat CKD pada populasi pria dan 36% pada wanita. Proporsi ini meningkat sejak tahun 1990, dimana angka kematian DKD adalah 29% dari seluruh kematian CKD pada pria dan 32% dari seluruh kematian CKD pada wanita (Thomas, 2019).

Di wilayah Asia Tenggara, pada tahun 2015, terdapat satu juta orang dewasa mengalami kematian karena penyakit ginjal sebagai akibat komplikasi DM dan menempati urutan pertama penyebab kematian akibat komplikasi (Rini dkk., 2018). Sedangkan di Indonesia, berdasarkan data dari *Indonesian Renal*

Registry (IRR) tahun 2017, ND menjadi penyakit kedua terbanyak penyebab dari penyakit ginjal kronik (PGK) tahap 5, yakni sebesar 29% (Kepmenkes, 2020).

2.2.3 Patogenesis

Nefropati diabetik memiliki beberapa fase perkembangan yang berbeda.

Perubahan fungsional terjadi pada tingkat glomerulus, termasuk hiperfiltrasi dan hiperperfusi glomerulus sebelum timbulnya perubahan klinis yang terukur.

Perubahan tersebut akan berakibat pada terjadinya penebalan membran basal glomerulus, hipertrofi glomerulus dan ekspansi mesangial. Berbagai mekanisme berkontribusi pada perkembangan ND, adanya hubungan antara perubahan metabolik dan hemodinamik yang diinduksi hiperglikemia sangat berperan dalam tahapan kerusakan ginjal (Dronavalli *et al.*, 2008).

2.2.3.1 Jalur Hemodinamik

Kondisi hiperglikemia persisten pada penderita DM dapat berdampak terhadap hemodinamik ginjal penderita. Patogenesis ND melalui jalur hemodinamik ini diperantarai aktivasi sejumlah jalur hormonal vasoaktif, meliputi *renin-angiotensin-aldosterone system* (RAAS), endothelin, dan urotensin II (Maric, 2008). Mekanisme perjalanan berbagai hormon vasoaktif tersebut dalam mempengaruhi hemodinamik ginjal, dijelaskan sebagai berikut:

1. *Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (RAAS)

Hiperglikemia dapat menstimulasi sintesis angiotensinogen (AGT). Kemudian AGT diubah menjadi angiotensin-1 (Ang-I) oleh renin yang diproduksi oleh sel jukstaglomerular di tubulus proksimal. Ang-I selanjutnya diubah menjadi angiotensin-II (Ang-II) oleh *angiotensin-converting enzyme* (ACE) (Susanto, 2015). Aktivasi reseptor angiotensin-II yang disebut angiotensin-II receptor subtype 1 (AT-1) akan memediasi sekresi aldosteron dari korteks adrenal

(Yacoub and Campbell, 2015; Arora and Singh, 2013). Dari setiap tahapan proses RAAS tersebut, akan menghasilkan berbagai manifestasi klinis nefropati diabetik sebagai berikut:

- Renin, dapat secara langsung meningkatkan produksi TGF- β yang merupakan suatu sitokin fibrogenik. Renin akan berikatan dengan reseptor spesifiknya pada permukaan sel-sel mesangial dan menyebabkan hipertrofi (Yacoub and Campbell, 2015).
- Angiotensin-II, aktivasi AT-1 terhadap respon vaskular Ang-II berperan pada perubahan hemodinamik nefropati diabetik yakni hiperfiltrasi awal dan penurunan GFR. Selain itu juga berkontribusi pada perkembangan cedera struktural ginjal pada ND. Ang-II dapat meningkatkan proliferasi sel dan sintesis *extracellular matrix* (ECM). Tindakan oleh Ang-II ini dikaitkan dengan stimulasi sejumlah sitokin profibrotik seperti TGF- β , VEGF, PDGF, dan CTGF serta aktivasi yang melibatkan PKC dan NF- κ β , yang akhirnya menyebabkan glomerulosklerosis dan fibrosis tubulointerstitial (Maric, 2008).
- Aldosteron, aktivitas aldosteron berkontribusi terhadap fibrosis dan inflamasi tubulointerstitial. Aldosteron meningkatkan produksi ECM melalui peningkatan ekspresi TGF- β 1 dan kolagen tipe-IV. Selain itu, aldosteron juga merangsang produksi ROS melalui aktivasi NADPH oksidase di sel mesangial (Yacoub and Campbell, 2015).

2. Endothelin (ET)

Endothelin merupakan vasokonstriktor kuat yang bersifat proinflamasi, mitogenik, dan profibrotik di ginjal. Terdapat 3 macam isoform endothelin, salah satunya endothelin-1 (ET-1). ET-1 bekerja di ginjal terutama melalui endothelin reseptor

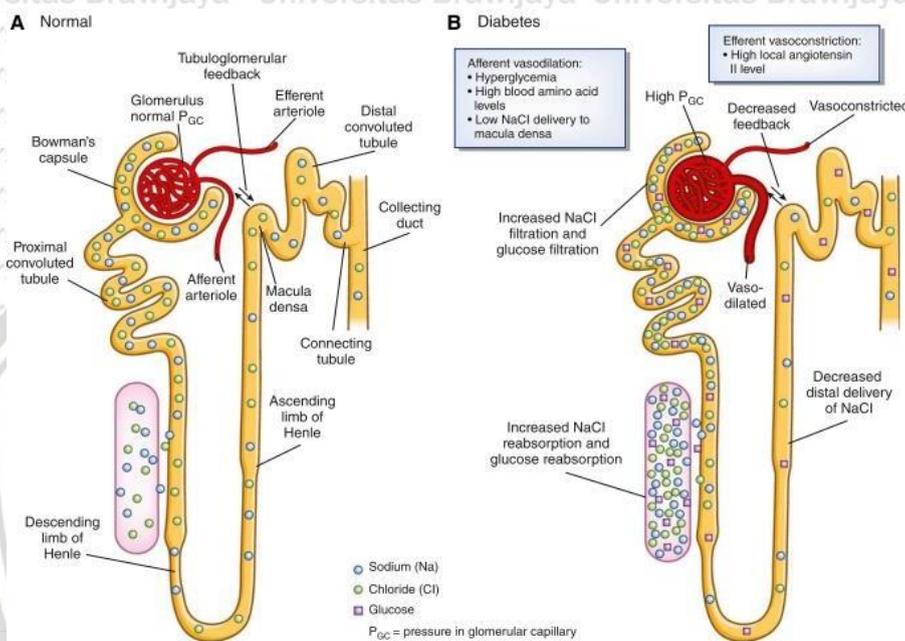
subtipe-A (ETA) dan reseptor subtipe-B (ETB). Di ginjal, keduanya tersebar luas, menunjukkan bahwa ET berperan dalam memodulasi sejumlah fungsi ginjal dalam kondisi fisiologis normal. Tetapi, ET-1 juga merupakan mediator penting dari fungsi ginjal dalam kondisi patologis ginjal, seperti nefropati diabetik (Maric, 2008). Aktivasi ET-1 melalui reseptor ETA, menghasilkan peningkatan stres oksidatif, ekspresi berlebih mediator inflamasi di sirkulasi dan glomerulus, serta terjadi perubahan permeabilitas glomerulus terhadap albumin. Secara keseluruhan, peningkatan ET-1 menginduksi vasokonstriksi, cedera podosit, proliferasi mesangial, akumulasi ECM, *glomerulosclerosis*, fibrosis dan inflamasi (Anguiano *et al.*, 2015).

3. Urotensin II

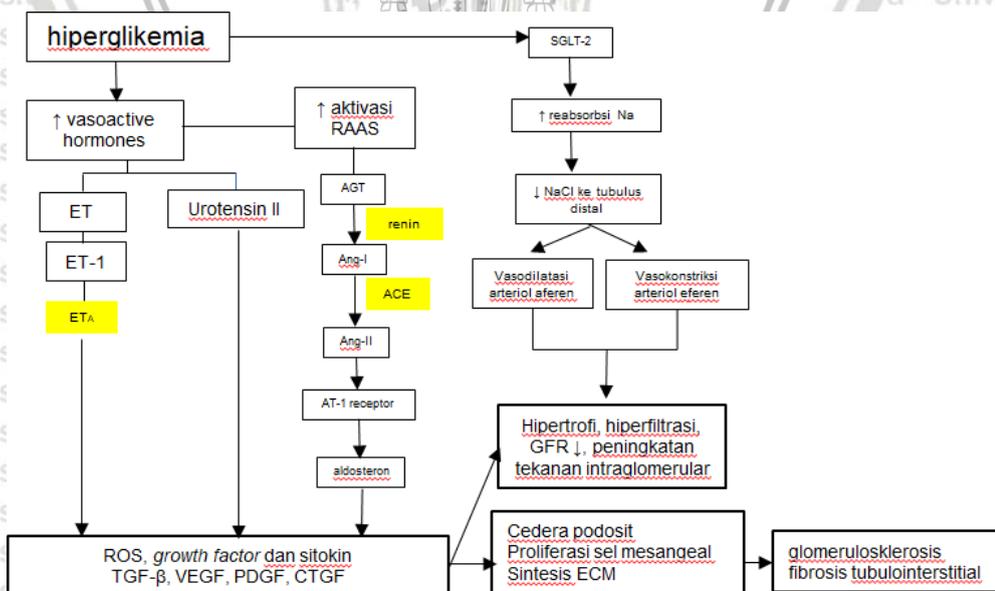
Urotensin II adalah vasokonstriktor yang sangat kuat dengan potensi yang lebih besar daripada ET-1 (Maric, 2008). Pada pasien diabetes, ditemukan adanya peningkatan urotensin-II. Upregulasi urotensin-II dan reseptornya karena diabetes, berperan penting pada TGF- β 1 dalam memediasi fibrosis dan disfungsi ginjal (Pang *et al.*, 2012).

Selain peran dari vasoaktif hormon, perubahan hemodinamik ginjal karena hiperglikemia juga diperantarai oleh sodium-glucose co-transporter (SGLT-2). Peningkatan reabsorpsi glukosa oleh ginjal di tubulus proksimal yang diperankan oleh SGLT-2 berakibat pada peningkatan ekspresi SGLT-2. SGLT-2 akan menurunkan pengiriman zat terlarut distal terutama NaCl ke makula densa, akibatnya, terjadi penurunan umpan balik tubuloglomerular sehingga menyebabkan dilatasi arteriol aferen untuk meningkatkan perfusi glomerulus, sementara secara bersamaan produksi lokal Ang-II tinggi pada arteriol eferen menyebabkan vasokonstriksi. Efek keseluruhannya adalah peningkatan tekanan

intraglomerular dan hiperfiltrasi glomerulus (Ziyadeh and Wolf, 2008; Alicic *et al.*, 2017) (**Gambar 2.3**). Bagan mekanisme jalur hemodinamik dalam perkembangan ND terdapat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.3 Nefron Normal dan Diabetik dengan Perubahan Hemodinamik Ginjal (Alicic *et al.*, 2017).



Gambar 2.4 Mekanisme Jalur Hemodinamik dalam Perkembangan ND

2.2.3.2 Jalur Metabolik

Jalur metabolik ini berkaitan dengan proses glikolisis yang terjadi dalam sel tubuh. Kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan glikolisis yang kemudian dapat meningkatkan regulasi empat jalur lainnya, yakni jalur poliol, jalur heksosamin, AGEs, dan aktivasi protein kinase C (PKC). Glikolisis adalah jalur biokimia pemecahan glukosa oleh sel untuk membentuk energi (Manikowski and Atta, 2015). Normalnya, proses glikolisis berjalan seperti berikut:

- Pertama, glukosa difosforilasi oleh enzim heksokinase menjadi *glucose-6-phosphate* (G6P).
- G6P kemudian diubah menjadi *fructose-6-phosphate* (F6P) melalui aksi enzim fosfoglukoisomerase. Selain berlanjut pada proses glikolisis, G6P juga dapat disalurkan ke jalur pentosa fosfat untuk menghasilkan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) untuk reaksi sintesis seluler. NADPH merupakan kofaktor reaksi anabolik.
- Selanjutnya, F6P yang terbentuk akan menghasilkan *glyceraldehyde-3-phosphate* (GAP) oleh enzim *phosphofruktokinase aldolase*.
- GAP kemudian difosforilasi oleh enzim *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) untuk menghasilkan produk akhir glikolisis yakni piruvat, yang selanjutnya terjadi proses karboksilasi dengan koenzim untuk memulai siklus Krebs dalam matriks mitokondria dan menghasilkan energi atau ATP, alur proses glikolisis ini dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.

Di sisi lain, pada kondisi fisiologis normal, proses seluler (termasuk oksidasi glukosa) akan menghasilkan mitochondrial product yakni *superoxide anion radical*, namun tubuh mampu mengatasinya dengan pertahanan antioksidan tubuh yang ada (Ighodaro, 2018).

Pada kondisi hiperglikemia, *superoxide anion radical* diproduksi secara berlebihan, sehingga dapat menekan sistem antioksidan tubuh, yang akibatnya dapat menginduksi stres oksidatif dan menimbulkan kerusakan inti DNA serta biomolekul lainnya. Akibat dari kerusakan DNA yakni terjadi aktivasi enzim perbaikan DNA yang disebut *poly-ADP-ribose polymerase-1* (PARP-1). Hal tersebut akan berdampak pada terjadinya rangsangan jalur pro-oksidatif lainnya seperti jalur AGE, PKC, heksosamin, dan polioli. Proses kontribusi keempat jalur tersebut dalam perkembangan kerusakan ginjal pada nefropati diabetik, akan dijelaskan sebagai berikut:

1. *Advanced Glycation End Products* (AGEs)

- Akumulasi glukosa dalam darah dapat memicu proses auto-oksidasi molekul yang mengarah pada pembentukan glioksal (prekursor AGE).
- Defosforilasi non-enzimatik dari metabolit pemecahan glukosa yakni gliceraldehyde-3-phosphate (GAP) dan isomernya dihydroxyacetone-3-phosphate (DHAP) menghasilkan pembentukan methylglyoxal (MGO) (prekursor AGE).
- Prekursor AGE yang ketiga yakni 3-deoxyglucosone (3DG) terbentuk dari pemecahan glukosa yang diturunkan dari 1-amino-1-deoxyfructose lysine adduct atau yang biasa disebut Amadori product.

Selanjutnya, prekursor AGEs tersebut akan berinteraksi secara tidak normal dengan komponen matriks ekstraseluler atau berikatan dengan masing-masing reseptornya yang dapat mendorong pembentukan *oxidative stress* baik secara langsung maupun tidak langsung melalui aktivasi PKC (Ighodaro, 2018).

2. Protein Kinase C (PKC)

Aktivasi jalur PKC dipicu oleh kondisi hiperglikemia yang menginduksi produksi superoxide anion radical yang berlebihan, pada kondisi normal superoxide anion radical ini juga diproduksi, namun antioksidan endogen tubuh dapat mengatasinya. Karena pada kondisi hiperglikemia menyebabkan produksi superoxide anion radical yang berlebihan dan menekan sistem antioksidan tubuh, sehingga menginduksi stres oksidatif dan menimbulkan kerusakan inti DNA serta komponen biomolekular lainnya. Akibat dari kerusakan DNA tersebut adalah aktivasi enzim perbaikan DNA yang disebut *poly-ADP-ribose polymerase-1* (PARP-1), yang mana PARP-1 ini dapat menghambat aktivitas enzim glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) yang berperan pada proses glikolisis, akibatnya, terjadi akumulasi glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) dan isomernya, dihydroxyacetone-3-phosphate (DHAP). Akumulasi DHAP akan direduksi menjadi glycerol-3-phosphate (G3P) dengan adanya asam lemak bebas yang akan mendorong sintesis diacylglycerol (DAG) yang akan berinteraksi dengan reseptor AGEs dan menginduksi stres oksidatif melalui peningkatan aktivasi PKC (Ighodaro, 2018).

3. Jalur Poliol

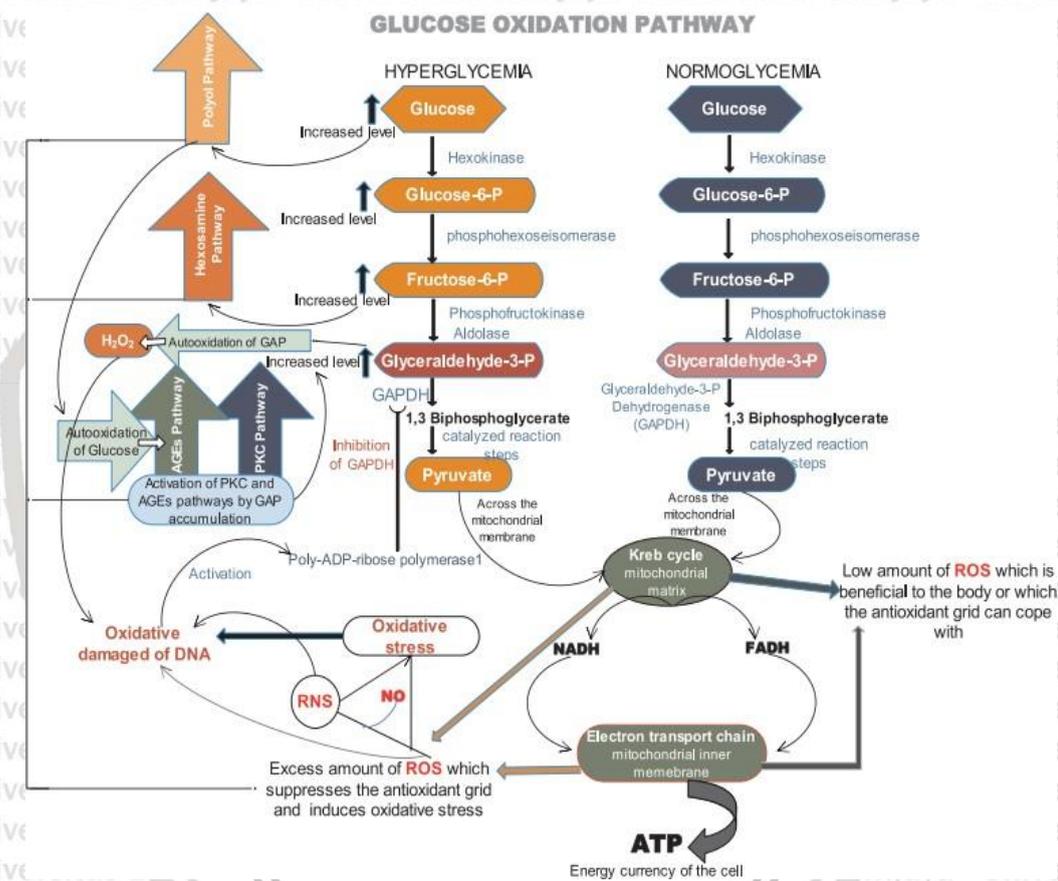
Kondisi glukosa dalam darah yang tinggi memicu aktivasi enzim aldose reductase. Enzim tersebut mengkatalisis reduksi glukosa menjadi polialkohol yang disebut sorbitol, menggunakan komponen enzim nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). NADPH, memiliki peran penting dalam pemeliharaan siklus redoks seluler yang melibatkan aktivitas glutathione peroxidase (GPx) dan glutathione reductase (GRx) yang memanfaatkan molekul NADPH sebagai co-faktor dalam menjaga glutathione (GSH) yang merupakan

suatu antioksidan endogen. Konsumsi berlebihan NADPH karena peningkatan aktivitas aldose reductase di jalur poliol dapat menurunkan tingkat GRx sehingga produksi GSH menurun. Akibatnya, terjadi peningkatan kerentanan biomolekul terhadap kerusakan oksidatif karena stress oxidative. Selanjutnya, enzim kedua yang berperan dalam jalur poliol yaitu sorbitol dehydrogenase (SDH) yang mengkatalisis konversi sorbitol menjadi fruktosa menggunakan komponen NAD⁺ sebagai co-faktor. Peningkatan aktivitas SDH yang mengarah pada pembentukan fruktosa dalam jumlah besar, yang mana fruktosa mudah terfosforilasi dan dihidrolisis menjadi GAP dan DHAP. Triosa fosfat tersebut terakumulasi dan mendorong pembentukan prekursor AGE (MGO) melalui mekanisme auto-oksidasi dan aktivasi jalur PKC melalui sintesis DAG. Proses-proses tersebut secara kolektif memfasilitasi lingkungan oksidatif (oksidatif stress) di sel (Ighodaro, 2018).

4. Jalur heksosamin

Jalur heksosamin ini terlibat dalam metabolisme glikosis, pada produk intermediate, fructose-6-phosphate (F6P). Proses tersebut melibatkan aktivitas enzim glucosamine-fructose amidotransferase (GFAT) yang memetabolisme F6P menjadi glucosamine-6-phosphate yang kemudian dirubah menjadi Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) melalui aksi enzim UDP-N-acetylglucosamine sintase. UDP-GlcNAc adalah senyawa metabolisme yang penting untuk pembentukan rantai gliksil protein dan lipid. Selain itu juga digunakan untuk modifikasi protein pasca-translasi yang mana suatu proses yang dikendalikan oleh enzim O-glucosamine-N-acetyltransferase. Hiperaktivitas enzim ini dapat menyebabkan perubahan ekspresi gen dan peningkatan ekspresi transcription factors seperti TGF- α dan TGF- β yang menghambat mitogenesis sel

mesangeal dan mengaktifkan proliferasi matriks kolagen dan berakibat pada penebalan membran basal (Ighodaro, 2018). Alur proses keempat jalur yang telah dijelaskan diatas, dapat dilihat pada pada **gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Proses Oksidasi Glukosa dan Stres Oksidatif yang Diinduksi Kondisi Hiperglikemik (Ighodaro, 2018)

2.2.4 Penatalaksanaan Nefropati Diabetik

Sebagai kontrol glukosa, target HbA1c pada pasien DM dengan komplikasi nefropati yakni sebesar 7%. Obat antidiabetes dan insulin dapat diberikan kepada pasien dengan pertimbangan indikasinya. Pasien dengan nilai LFG <30 ml/menit/1,73 m² pemberian obat antidiabetes golongan sulfonilurea kerja panjang dan metformin, diperlukan perhatian khusus. Pemberian inhibitor

DPP-4 juga diperlukan penyesuaian dosis. Pada pemberian ACE inhibitor dan ARB sebagai kontrol tekanan darah dengan target TD <140/90 mmHg, diperlukan kontrol pemeriksaan secara berkala kadar serum kreatinin dan kalium serum. Penggunaan bersamaan ARB dan ACE inhibitor tidak disarankan. Karena dapat menyebabkan hiperkalemia dan memperberat fungsi ginjal. Saat tekanan darah sudah mencapai target, ACE inhibitor atau ARB tetap diberikan jika mengalami mikroalbuminuria atau proteinuria yang masif. Pada pasien yang intoleran ACE inhibitor atau ARB, dapat menggunakan terapi tambahan maupun sebagai terapi pengganti, seperti obat golongan diuretik, *calcium channel blockers* (CCB), dan β -blockers (Kepmenkes, 2020).

Selain menggunakan obat-obatan konvensional, perbaikan gaya hidup juga diperlukan untuk memperbaiki kondisi tubuh. Perbaikan gaya hidup atau kebiasaan, diantaranya yakni berhenti merokok, perbanyak aktivitas fisik ringan, modifikasi pola makan dengan mengurangi konsumsi garam (tidak lebih dari 100 mEq/hari), dan tidak mengonsumsi makan tinggi lemak. Tidak disarankan mengurangi konsumsi protein, karena tidak mengubah kadar glukosa, risiko penyakit kardiovaskuler, ataupun penurunan LFG pasien. Namun, pada pasien yang memiliki penyakit ginjal kronik, diperlukan pembatasan konsumsi protein sebesar <0,8 g/kgBB/hari. Pasien yang telah menjalani terapi dialisis dapat meningkatkan konsumsinya (Kepmenkes, 2020).

Pasien penyakit ginjal akut dapat menjalani terapi dialisis jangka pendek, sedangkan pasien dengan gagal ginjal tahap akhir dapat menjalani terapi dialisis jangka panjang atau permanen untuk menunjang kesehatannya. Pertimbangan diperlukannya tindakan dialisis yakni apabila LFG < 15 ml/menit, hiperkalemia, anuria, kadar ureum > 200 mg/dL atau pasien mengalami kelebihan cairan

dengan edema paru. Umumnya, dialisis yang dilakukan di Indonesia yaitu hemodialisis menggunakan mesin dialiser yang memiliki fungsi sebagai ginjal buatan, dan dialisis peritoneal menggunakan membran peritoneum (Kepmenkes, 2020).

Terapi non-farmakologi lainnya yang dapat menjadi opsi terapi yakni cangkok atau transplantasi ginjal. Tindakan bedah ini ideal untuk mengatasi gagal ginjal terminal. Pencangkokan ginjal dapat diperoleh dari pendonor yang masih hidup ataupun dari pendonor yang baru saja meninggal. Setelah dilakukannya tindakan pencangkokan, pasien diberikan terapi immunosupresif, seperti steroid yang juga dapat berpengaruh pada kadar glukosa darah pasien, maka diperlukan pemberian insulin untuk mengontrol kadar glukosa darahnya (Kepmenkes, 2020).

2.3 Proteinuria

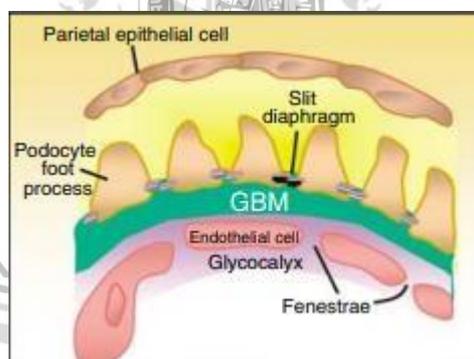
Proteinuria merupakan tanda klinis ND, yang menunjukkan adanya keparahan penyakit. Proteinuria memiliki peranan sentral dalam patogenesis disfungsi ginjal yang progresif. Sekitar 20% aliran plasma disaring di glomerulus setiap harinya, dan hanya sejumlah kecil protein yang terdeteksi dalam urin normal yakni sekitar 40-80 mg/hari. Protein dalam urin biasanya terdiri dari albumin (30-40%), uromodulin (50%), immunoglobulin (5-10%), dan rantai ringan (5%). Setiap protein yang disaring di glomerulus, diambil dan didegradasi oleh sel tubulus proksimal yang kemudian diserap kembali ke kapiler peritubulus (Jefferson *et al.*, 2008). ND telah menjadi penyebab utama gagal ginjal kronis, dimulai dengan normoalbuminuria, mikroalbuminuria, makroalbuminuria dan akhirnya mengarah ke ESRD. Untuk waktu yang lama, proteinuria telah dianggap

sebagai *gold standard* untuk evaluasi dan pemantauan fungsi ginjal (Zhang *et al.*, 2018).

Urin mengandung berbagai macam protein dengan berat molekul yang berbeda, termasuk albumin (Karalliedde and Viberti, 2020). Sehingga sampai saat ini, konsentrasi albumin dalam urin menjadi pertimbangan pemeriksaan adanya kerusakan fungsi ginjal. Berdasarkan Kepmenkes (2020), pemeriksaan laboratorium sebagai penegakan diagnosis ND yakni termasuk pemeriksaan kreatinin serum dan rasio albumin kreatinin urin (UACR), sebaiknya dilakukan minimal sekali setahun pada semua pasien DM. Klasifikasi albuminuria berdasarkan UACR, yakni, normoalbuminuria (UACR kurang dari 30 mg/g), mikroalbuminuria (UACR antara 30-300 mg/g), dan makroalbuminuria (UACR diatas 300 mg/g) (Shahid *et al.*, 2017). Di Indonesia, klasifikasi ND tidak lagi menggunakan istilah mikroalbuminuria dan makroalbuminuria tetapi albuminuria saja. ND terbagi menjadi albuminuria persisten pada kadar 30-299 mg/24 jam dan albuminuria persisten pada kadar ≥ 300 mg/24 jam (Kepmenkes, 2020).

Adanya protein atau albumin dalam urin yang biasa disebut proteinuria utamanya mencerminkan adanya kerusakan glomerulus dan peningkatan permeabilitas glomerulus terhadap molekul makro. Adanya beberapa kelainan struktural ginjal diketahui terjadi mendahului perkembangan proteinuria pada ND, termasuk peningkatan lebar membran basal dan ekspansi mesangial. Tingkat ekspansi mesangial dan intersisial telah ditemukan memiliki korelasi dengan tingkat albuminuria. Ekspansi mesangial progresif dimungkinkan karena glikoprotein, kolagen, ataupun faktor lain. Desposit *electron-dense* di dalam atau di sekitar membran basal glomerulus dapat membatasi area permukaan filtrasi kapiler glomerulus dan menyebabkan proteinuria (Williams, 2005).

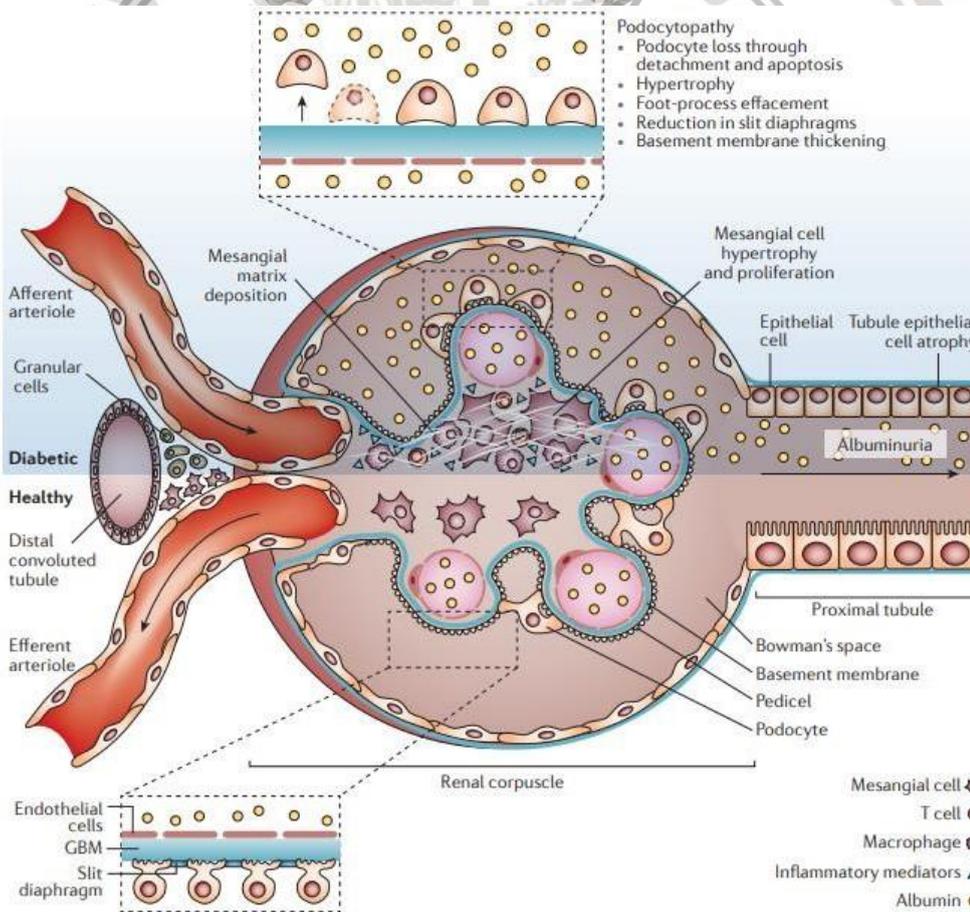
Komponen selektivitas glomerulus melibatkan dua filter molekuler yang berdekatan, yakni, membran basal glomerulus dan celah diafragma. Membran basal glomerulus pada manusia adalah struktur kompleks tiga lapis yang terdiri dari sel-sel endotel dengan fenestrasi, membran basal glomerulus fibrilar padat itu sendiri, dan podosit atau sel epitel viseral (**Gambar 2.6**). Pada manusia lapisan membran basal yang melekat pada sel epitel endotel dan viseral memiliki ketebalan 250-350 nm. Komponen tunggal yang paling melimpah dari membran filtrasi adalah kolagen tipe IV. Progresivitas ekskresi albumin normal menjadi proteinuria berkorelasi dengan menurunnya kemampuan selektivitas membran filtrasi. Pada DM-tipe 1 dan 2 terjadi disfungsi selektivitas ukuran membran filtrasi glomerulus terhadap filtrasi protein plasma. Pada model eksperimental ND, proteinuria dikaitkan dengan penurunan kepadatan celah pori (Williams, 2005).



Gambar 2.6 Struktur Membran Basal Glomerulus (Jefferson et al., 2008)

Membran basal glomerulus (MBG) berfungsi membatasi pengeluaran makromolekul. Muatan negatif pada MBG yang hilang dapat menyebabkan hilangnya reaksi penolakan antara MBG dan protein plasma yang bermuatan negatif. Pada penyakit ginjal dengan proteinuria, terdapat perubahan muatan negatif heparan sulfat proteoglikan pada MBG. Hilangnya muatan anion MBG dapat menyebabkan terjadinya proteinuria karena terjadi proses digesti enzimatik

masking anionic site oleh antibodi berakibat pada meningkatnya permeabilitas MBG terhadap albumin. Selain itu, mekanisme terjadinya proteinuria juga disebabkan karena perubahan struktural MBG, yakni lepasnya *foot processes* podosit dari MBG (**Gambar 2.7**) dapat meningkatkan aliran plasma melewati MBG yang tanpa adanya *foot processes*. Adanya kelainan fungsional dan struktural komponen slit diafragma seperti nefrin dan Neph1 sebagai komponen utama slit diafragma akan berakibat pada kelainan integritas slit diafragma yang kemudian terjadi kebocoran protein melalui *slit pore* podosit (Pardede, 2004).



Gambar 2.7 Glomerulopati pada Diabetes Nefropati (Thomas *et al*, 2015).

2.4 Podosit dan Nefrin

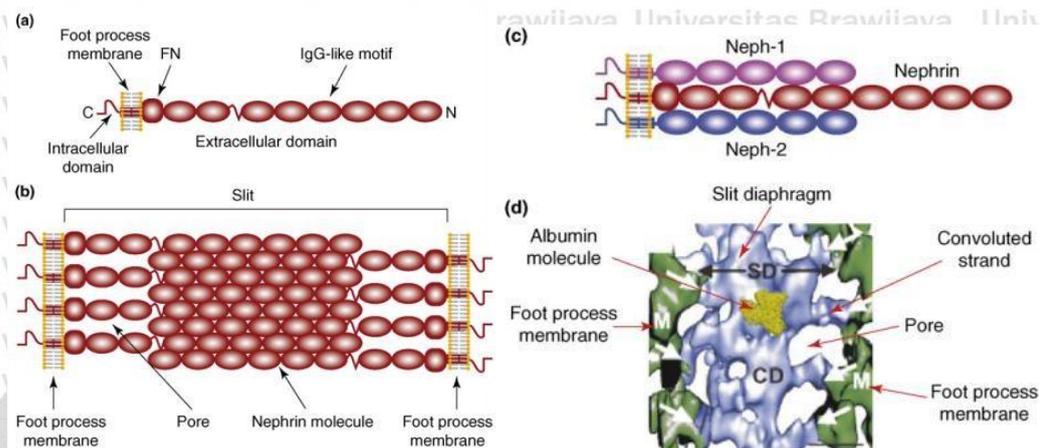
Proteinuria, terutama mikroalbuminuria sebagai salah satu manifestasi utama dari ND, tidak hanya merupakan penanda penting untuk diagnosis dini ND, tetapi juga merupakan faktor yang berbahaya bagi ginjal. Terjadinya proteinuria, erat kaitannya dengan disfungsi sawar filtrasi glomerulus (Li LL *et al.*, 2012). Dinding kapiler glomerulus membentuk struktur filter yang memungkinkan air dan zat terlarut plasma lewat dengan cepat ke dalam *capsula bowman*, serta mencegah albumin dan molekul lainnya yang lebih besar. Molekul melintasi penghalang filtrasi berdasarkan ukuran, bentuk, dan muatan. Penghalang filtrasi terdiri dari tiga lapisan, yaitu *fenestrated capillary endothelium*, GBM, dan lapisan podosit (Patakka and Tryggvason, 2007). Podosit adalah sel epitel viseral pada dinding kapiler glomerulus yang memiliki foot processes dan membentuk lapisan di sekeliling kapiler. Podosit tersusun dari tiga segmen struktural dan fungsional yakni badan sel, *major processes*, dan *foot processes* (Pardede, 2004). Prosesus kaki podosit saling berintegrasi dan bergabung dengan prosesus kaki podosit tetangganya sehingga terbentuk penghalang fisik. Pada ND, telah diamati bahwa podosit menghilang. Hal ini bisa dimediasi oleh peningkatan Smad7, AGE, angiotensin II dan ROS. Selain itu, hiperglikemia menyebabkan pelepasan podosit dari GBM. Hiperglikemia menginduksi ROS melalui NADPH oksidase dan berakibat pada apoptosis podosit. Dalam kondisi diabetes, semua jenis sel ginjal termasuk sel endotel, sel tubulointerstitial, podosit dan sel mesangial dapat terpengaruh. Adanya cedera dan disfungsi satu jenis sel dapat meluas ke sel ginjal lainnya, sehingga mempengaruhi fungsi ginjal (Pourghasem *et al.*, 2015).

Nefrin disintesis oleh podosit glomerulus yang merupakan protein dengan peran penting pada slit diafragma, dan juga berperan dalam fungsi sel termasuk

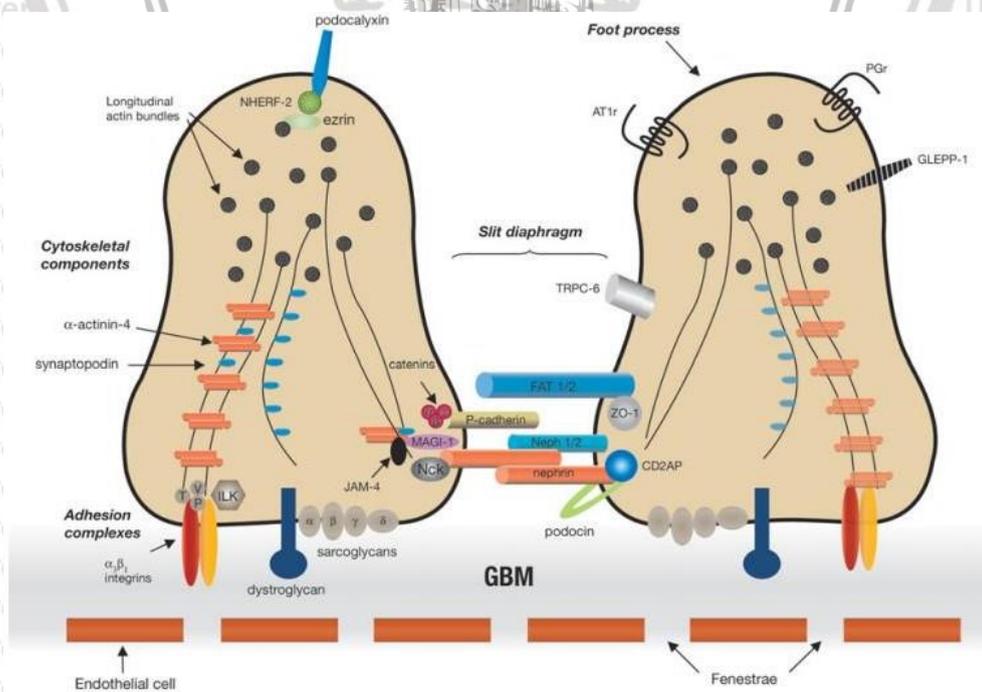
adhesi, penyebaran, serta migrasi sel (Pardede, 2004). Nefrin adalah protein transmembran yang tersusun dari domain intraseluler pendek, dan domain ekstraseluler dengan delapan motif mirip IgG distal dan satu motif mirip fibronektin tipe III proksimal (**Gambar 2.8a**). Berdasarkan struktur domain dan lokasinya di celah diafragma, molekul nefrin berinteraksi dalam celah diafragma melalui interaksi hemofilik yang membentuk struktur berpori di slit diafragma (**Gambar 2.8b**). Protein transmembran superfamili Neph yang diantaranya yakni Nep1, Nep2, dan Nep3 secara struktural berkaitan dengan nefrin. Namun semua protein tersebut memiliki domain ekstraseluler yang lebih pendek dengan hanya lima motif mirip IgG. Neph ditemukan di banyak jaringan, tetapi di glomerulus Nep1 dan Nep2 terletak di slit diafragma. Berdasarkan studi *in vitro* Gerke *et al.*, (2003) disebutkan bahwa domain ekstraseluler nefrin dapat berinteraksi dengan Nep1 (**Gambar 2.8c**). Analisis struktur celah diafragma dengan metode elektron-tomografi menunjukkan bahwa diafragma terdiri dari untaian berlilitan yang melintasi garis tengah celah dan membentuk lembaran seperti *zipper* dengan pori-pori seukuran albumin atau lebih kecil (**Gambar 2.8d**) (Patrakka and Tryggvason, 2007). Selain nefrin, protein lain, seperti CD2-associated protein (CD2AP), transient receptor potential channel 6 (TRPC6), podocin, P-cadherin, α - and β -catenin, zonula occludens-1 (ZO-1) juga terlokalisasi dalam domain subseluler slit diafragma untuk membentuk suatu molecular sieve (Gambar 2.9) (Michaud and Kennedy, 2007).

Sebuah studi systematic review, menyebutkan terdapat 19 studi menunjukkan hasil bahwa analisis nefrin urin memiliki potensi untuk menjadi biomarker penting pada kerusakan glomerulus dini (Fiseha, 2015). Metode yang paling umum digunakan untuk pengukuran nefrin urin adalah dengan ELISA

(Kandasamy *et al.*, 2014). Beberapa studi penelitian yang meneliti nefrin urin sebagai marker kerusakan ginjal pada diabetes terangkum pada **tabel 2.2**.



Gambar 2.8 Karakteristik dan Interaksi pada Nefrin (Patrakka and Tryggvason, 2007).



Gambar 2.9 Komponen Molekuler Celah Diafragma (Louis *et al.*, 2007).

Tabel 2.2 Penelitian Terkait Analisis Nefrin pada Subjek DM

NO	Subjek	Assay method	Hasil	Referensi
1.	Tikus wistar DM tipe 1 dan ND	elektroforesis	<ul style="list-style-type: none"> tidak ditemukan adanya nefrin pada urin tikus yang dinduksi STZ pada minggu ke-4 dan meningkatmaksimum pada minggu ke-6 nefrin berhubungan dengan perubahan awal nefropati diabetik 	Aaltonen <i>et al.</i> , 2001
2.	Tikus wistar yang diinduksi STZ	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> nefrinuria terdeteksi sebelum albuminuria dan gangguan ginjal sehubungan dengan deteksi dini ND 	Alter <i>et al.</i> , 2012
3.	Tikus akita DM tipe-1 dan ND	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ekskresi nefrin urin dikaitkan dengan cedera ginjal dan mendeteksi awal proses penyakit onset hiperglikemia berhubungan dengan nefrinuria 	Chang <i>et al.</i> , 2012
4.	Pasien DM-tipe 1 dengan ND	elektroforesis	Nefrinuria ditemukan pada 30% dari normoalbuminuria, 17% dari mikroalbuminuria, dan 28% dari makroalbuminuria	Patari <i>et al.</i> , 2003
5.	Pasien DM dan glomerulosclerosis	mRNA RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Nefrinuria lebih tinggi pada pasien dengan ND dibandingkan kelompok kontrol Nefrinuria berkorelasi dengan proteinuria 	Wang <i>et al.</i> , 2007
6.	Pasien DM-tipe 2	elektroforesis	<ul style="list-style-type: none"> Setiap fragmen nefrin diaitkan dengan penurunan eGFR Nefrinuria berkaitan kuat dengan rasio albumin/kreatinin 	Ng <i>et al.</i> , 2011
7.	Pasien ND	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> Nefrinuria terjadi mendahului mikroalbuminuria Nefrinuria ditemukan pada 54% dari normoalbuminuria, 100% dari mikroalbuminuria dan makroalbuminuria 	Jim <i>et al.</i> , 2012
8.	Pasien ND	mRNA RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Pada normoalbuminuria menunjukkan adanya peningkatan nefrin urin Nefrinuria ditemukan pada 53% dari normoalbuminuria, 71% dari mikroalbuminuria, dan 90% dari makroalbuminuria Nefrinuria berkorelasi dengan stage ND 	do Nascimento <i>et al.</i> , 2013
9.	Pasien DM-tipe 2	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> Nefrinuria ditemukan pada 82% dari normoalbuminuria, 88% dari mikroalbuminuria, dan 100% dari makroalbuminuria Nefrin menjadi pendeteksi awal ND tahap awal 	Kostovska <i>et al.</i> , 2020

2.5 Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*)

2.5.1 Taksonomi

Menurut Rojas *et al.*, (2018) tanaman insulin atau *Tithonia diversifolia* memiliki taksonomi sebagai berikut :

Domain	: eukariot
Kingdom	: plantae
Filum	: spermatophyta
Subfilum	: angiospermae
Kelas	: dikotiledon
Ordo	: asterales
Famili	: asteraceae
Genus	: <i>Tithonia</i>
Spesies	: <i>Tithonia diversifolia</i>

2.5.2 Habitat

Tithonia diversifolia merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko dan Amerika Tengah. Tanaman ini telah diperkenalkan secara luas di seluruh daerah tropis dan subtropis di dunia. Saat ini telah banyak ditemukan budidaya tanaman TD di seluruh daerah Amerika Selatan, Hindia Barat, Afrika, Asia, Australia dan di banyak pulau di seberang Samudra Pasifik dan Hindia. Tanaman ini merupakan gulma yang sering tumbuh di tepi jalan, tepi lapangan, tepi sungai, dan tepi hutan (Rojas *et al.*, 2018). Tumbuh di daerah dengan ketinggian 550-1950 m dan suhu 15-31°C serta curah hujan 100-2000 mm (Kandungu *et al.*, 2013).

2.5.3 Morfologi

TD dapat digambarkan sebagai spesies seperti semak berbunga yang dapat tumbuh hingga lebih dari 2-3 m (**Gambar 2.10**). bunganya berukuran lebar 5-15 cm dan berbentuk seperti bunga aster. Kepala (capitulum) panjangnya 10-30 cm dan memiliki kuntum kecil berwarna kuning yang saling berdesakan dan ditumbuhi *bracts* hijau. Dibagian terluar capitulum terdapat 7-15 kuntum seperti kelopak yang membingkai 80-120 kuntum kecil. Pembungaan terjadi pada bulan Oktober dan setiap batang dewasa dapat menghasilkan beberapa bunga. Batangnya lurik dan biasanya tidak berdaun dibagian bawahnya. Saat muda, permukaan batang berbulu dan berwarna hijau, tetapi berubah menjadi kayu dengan inti berongga saat TD matang. Daun TD berukuran 15-30 cm dapat digambarkan sebagai sub-ovate, petiolate, 3-7 lobed namun sering *unlobed* pada tunas baru dan daun atas, berbulu halus, dan tersusun bergantian. Tangkai daun berwarna hijau muda dengan panjang 2-10 cm. biji berukuran 4-8 mm, berwarna keabu-abuan, agak bersudut 4, dan tertutup oleh rambut yang rapat. TD yang matang akan menghasilkan 80.000 hingga 16.000 biji/m² setiap tahun, yang 70% dapat berkecambah sepenuhnya (Tagne *et al.*, 2018).



Gambar 2. 10 *Tithonia diversifolia* (Kandungu *et al.*, 2013).

2.5.4 Kandungan Senyawa dalam *Tithonia diversifolia*

Pada tanaman TD terkandung senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, terpenoid dan fenol pada daun, akar dan batang (Olayinka dkk., 2015 dalam Tagne *et al.*, 2018). Demikian juga, glikosida yang terdeteksi dalam proporsi yang cukup besar dalam ekstrak air dan metanol tunas TD (Otusanya dan Ilori, 2012 dalam Tagne *et al.*, 2018). Namun, perlu diketahui bahwa sintesis metabolit sekunder pada berbagai bagian TD dipengaruhi oleh suhu, curah hujan, kelembaban, radiasi matahari, dan serapan hara tanah (Tagne *et al.*, 2018). Hingga saat ini, terdapat lebih dari seratus metabolit sekunder telah diisolasi dari berbagai ekstrak TD dan strukturnya telah ditetapkan berdasarkan IR, NMR, dan spektrum massanya (Baruah *et al.*, 1979 dalam Tagne *et al.*, 2018). Namun, komponen utama TD yang memiliki efek sebagai antidiabetik yakni flavonoid dan seskuiterpen. Keduanya paling banyak ditemukan pada bagian daun (Sasmita dkk., 2017).

Flavonoid telah dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang berkaitan dengan aktivitas antidiabetes dengan melindungi tubuh terhadap kerusakan oleh spesies oksigen reaktif. Mengenai mekanisme sebagai antidiabetes, flavonoid memiliki peran yang signifikan dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan berperan dalam regenerasi sel-sel beta pankreas yang mengalami kerusakan, sehingga dapat memperbaiki kondisi defisiensi insulin pada DM. Selain itu juga, flavonoid mampu memperbaiki sensitivitas reseptor insulin. Antioksidan yang dihasilkan dapat menekan proliferasi sel β pankreas, yangman antioksidan dapat mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi resistensi insulin (Sasmita dkk., 2017).

Komponen utama lainnya dari TD yakni seskuiterpen yang memiliki fungsi mengurangi ketidaksensitifan terhadap insulin. Secara signifikan seskuiterpen dapat meningkatkan metabolisme glukosa tanpa memberikan efek toksik pada adiposit. Seskuiterpen bekerja menghambat faktor inflamasi pada sel mesangial ginjal manusia yang mengalami hiperglikemia. Mekanisme lainnya dari seskuiterpen yakni berkaitan dengan kemampuan dalam menghambat *Advanced Oxidation Protein Product-Induced MCP-1 Expression in Podocyte* (Sasmita dkk., 2017). AOPPs merupakan mediator patogen ginjal yang telah ditemukan terlibat tidak hanya pada obesitas dan sindrom metabolik tetapi juga pasien diabetes dengan atau tanpa komplikasi mikrovaskular. AOPPs adalah toksin uremik yang mengandung ditirosin dan *cross-linking protein* yang terbentuk selama stress oksidatif sebagai akibat dari reaksi antara oksidan terklorinasi dan protein plasma (Wang *et al.*, 2013). Akumulasi kronis AOPPs dapat menyebabkan peradangan pada kedua ginjal penderita diabetes dan nondiabetes, karena adanya peningkatan signifikan infiltrasi makrofag. AOPPs juga menyebabkan penurunan ekspresi nefrin dan podocin di podosit, sehingga memicu apoptosis podosit (Sasmita dkk., 2017). Berbagai manfaat lainnya dari senyawa yang terkandung dalam *T. diversifolia* terdapat pada **Tabel 2.3**.

Tabel 2.3 Senyawa yang Terkandung dalam T.diversifolia dan Manfaatnya

No	Senyawa	Mekanisme	Referensi
1.	Flavonoid - Katekin - Silibinin	<p>a. Aktivitas antioksidan dalam flavonoid dengan menyumbangkan atom hidrogen sehingga teroksidasi dan berikatan dengan ROS, dapat bermanfaat untuk :</p> <ul style="list-style-type: none"> • melindungi tubuh dari kerusakan akibat ROS • meregenerasi sel-sel β pankreas yang rusak sehingga terjadi perbaikan defisiensi insulin • memperbaiki sensitivitas reseptor insulin <p>b. flavonoid bekerja diluar pankreas dengan menstimulasi pemanfaatan glukosa perifer, melalui peningkatan aktivitas jalur glikolitik dan glikogenik, sehingga dapat menekan jalur glikogenolisis dan glukoneogenesis, akibatnya terjadi penurunan glukosa darah</p> <p>c. flavonoid bekerja dengan mengurangi penyerapan glukosa dan mengatur aktivitas ekspresi enzim dalam proses metabolisme karbohidrat</p> <p>d. berkaitan dengan mekanisme flavonoid dalam mencegah komplikasi DM yakni sebagai berikut:</p> <ul style="list-style-type: none"> • membersihkan radikal bebas yang berlebihan • memutus rantai reaksi radikal bebas • memblokir jalur poliol dengan menghambat enzim aldose reduktase • menghambat metabolisme sukrosa menjadi fruktosa <p>e. katekin dapat meningkatkan kadar glikogen hepar</p> <p>f. silibinin dapat menghambat proses glikogenolisis dengan cara inaktivasi enzim <i>glucose-6-phosphatase</i></p>	Sasmita <i>et al.</i> , 2017; Rinawati <i>et al.</i> , 2019
2.	Seskuiterpen - Tagitinin A - Tagitinin C	<ul style="list-style-type: none"> • mengurangi ketidaksensitifan terhadap insulin • meningkatkan metabolisme glukosa tanpa efektoksik pada adiposit • menghambat sitokin inflamasi pada sel mesangial akibat induksi glukosa yang tinggi • menghambat AOPPs • menghambat aktivitas NF-κB yang berkaitan dengan patofisiologis ND yakni glomerulonefritis 	Sasmita <i>et al.</i> , 2017; Rinawati <i>et al.</i> , 2019
3.	Tanin	<ul style="list-style-type: none"> • aktivitas hipoglikemik dengan meningkatkan proses glikogenesis • sebagai pengkhelat yang dapat mengerutkan membran epitel usus sehingga penyerapan asupan gula berkurang 	Rinawati <i>et al.</i> , 2019

2.5.5 Manfaat

Secara tradisional, semua bagian tanaman TD terutama daun, telah banyak digunakan oleh masyarakat adat untuk mengobati berbagai penyakit, mulai dari

aplikasi topikal untuk mengobati luka, gangguan otot rangka, abses, kondisi dermatologis dan sakit perut hingga pemberia secara oral untuk diabetes, malaria, demam, hepatitis dan penyakit menular, beberapa studi in vitro dan in vivo telah memberikan bukti heterogen yang mendukung sebagian besar klaim terapi tradisional TD. Skrining fitokimia *bioassay* dari ekstrak TD mengarah pada identifikasi banyak bioaktif dengan implikasi teraupetik yang signifikan dan indeks keamanan yang menguntungkan. Namun, selain penggunaan ekstensif dalam pengobatan tradisional, ada banyak pemanfaat lainnya dari tanaman TD yakni digunakan sebagai tanaman hias, kayu kabar, pakan ternak, pupuk hijau, biopestisida, dan pagar hidup (Tagne *et al.*, 2018).

Manfaat TD sebagai antidiabetes telah diteliti oleh beberapa peneliti. Miura *et al.*, (2005) telah melaporkan bahwa pada dosis 500 dan 1500 mg/kg ekstrak etanol TD menyebabkan penurunan kadar glukosa yang signifikan pada mencit KK-Ay dalam waktu 7 jam pengobatan. Selain itu, pemberian TD berulang mengakibatkan hipoglikemia dengan adanya penurunan insulin plasma. Hasil ini menunjukkan bahwa TD meningkatkan hiperinsulinemia pada DM-tipe 2 (Miura *et al.*, 2005 dan Tagne *et al.*, 2018). Demikian juga, ekstrak air daun TD pada dosis oral 400 mg/kg menghasilkan penurunan glukosa darah pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Lebih tepatnya, 36% dan 82,3% pada hari 1 dan 21 pengobatan, efek ini sebanding dengan yang dihasilkan oleh kelompok glibenklamid dosis 10 mg/kg yang digunakan sebagai kontrol positif. Temuan ini menunjukkan bahwa TD dapat meningkatkan pelepasan insulin oleh sel-sel beta pankreas pada tikus diabetes tipe 1 (Olukunle *et al.*, 2014 dalam Tagne *et al.*, 2018).

Penelitian lainnya juga dilakukan oleh Thongsom *et al.*, (2013) yang telah melaporkan bahwa pemberian ekstrak air daun TD dosis 500 mg/kg selama 30 hari menghasilkan penurunan kadar glukosa yang signifikan pada tikus diabetes dan non-diabetes. Efek yang diamati lebih tinggi daripada yang dihasilkan oleh glibenklamid dosis 60 mg/kg, artinya TD dosis 500 mg/kg ekstrak air dapat menjadi dosis efektif untuk diabetes (Thongsom *et al.*, 2013 dalam Tagne *et al.*, 2018). Ekstrak air TD juga ditemukan untuk mencegah kerusakan oksidatif di pankreas dan hati, sebagaimana dibuktikan dengan adanya pengurangan malondialdehid setelah pengobatan tikus. Pengamatan ini menunjukkan bahwa efek antidiabetes dari TD mungkin terletak pada potensi radikal bebasnya (Purnomo *et al.*, 2014 dalam Tagne *et al.*, 2018). Beberapa penelitian eksperimental terkait efek antidiabetes *T. diversifolia* terdapat pada **Tabel 2.4**.

Tabel 2.4 Penelitian Eksperimental Aktivitas Antidiabetik *T. diversifolia*

No	Sampel	Subjek	Hasil	Referensi
1	ekstrak etanol 80%	Mencit KK-Ay	Menurunkan kadar glukosa pada dosis 500 dan 1500 mg/kgBB	Miura <i>et al.</i> , 2005
2	Ekstrak air daun <i>T. diversifolia</i>	Tikus Wistar yang diinduksi aloksan	Menurunkan kadar glukosa darah sebesar 82,3% pada dosis 400 mg/kgBB ekstrak di hari ke-21 terapi	Okulunke <i>et al.</i> , 2014
3	Ekstrak air daun <i>T. diversifolia</i>	Tikus yang diinduksi aloksan	Pada dosis 500 mg/kgBB ekstrak dapat menurunkan glukosa darah setelah 30 hari terapi	Thongsom <i>et al.</i> , 2013
4	Ekstrak rebusan	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) betina yang diinduksi STZ	Ekstrak rebusan daun dewasa dapat menurunkan kadar glukosa darah sebesar 71,16%	Rinawati <i>et al.</i> , 2019
5	Ekstrak etanol 70% daun <i>T. diversifolia</i>	Tikus <i>Sprague Dawley</i> yang diinduksi STZ dan nikotamid	Ekstrak dosis, 100 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah, menekan polifagia dan meningkatkan bobot tikus	Fauziah <i>et al.</i> , 2018
6	ekstrak etanol 96% daun <i>T. diversifolia</i>	Tikus wistar yang diinduksi aloksan	Dosis 5,14 ml/200 gBB dapat menurunkan glukosa darah, dengan nilai rata-rata sebesar 136,80 mg/dL.	Sasmita <i>et al.</i> , 2017
7	Ekstrak etanol	Mencit jantan yang diinduksi glukosa 50% b/v	Ekstrak konsentrasi 19 mg dapat menurunkan kadar gula darah sebesar 42%	Muin, 2019
8	Ekstrak etanol 96% daun <i>T. diversifolia</i>	Tikus wistar yang diinduksi STZ	Pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa dan konsentrasi protein adiponektin	Solfaine <i>et al.</i> , 2019
9	Ekstrak etanol 70% daun <i>T. diversifolia</i> dan daun <i>Malus domestica</i>	Tikus <i>Sprague Dawley</i> yang diinduksi aloksan	Ekstrak dapat menurunkan kadar GDP dan memperbaiki struktur histologi pankreas tikus	Yazid <i>et al.</i> , 2021
10	ekstrak etanol 80% daun <i>T. diversifolia</i>	mencit (<i>Mus musculus</i>) jantan yang diinduksi aloksan	Ekstrak dosis 500 mg/kgBB paling efektif menurunkan kadar gula darah sebesar 62,90%	Prahmanti dan Liandra, 2019
11	Ekstrak etanol daun <i>T. diversifolia</i>	mencit (<i>Mus musculus</i>) yang diinduksi STZ	Ekstrak dosis 500 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah paling efektif	Parawansah <i>et al.</i> , 2016

2.6 Model Hewan Coba Diabetes Melitus

Klasifikasi hewan coba secara umum dibedakan menjadi dua, yakni model hewan genetik dan model hewan non genetik. Model hewan genetik adalah hewan dengan fungsi tubuh normal dan secara fenotip memiliki kesamaan dengan manusia atau spesies hewan abnormal karena mutasi genetik spontan. Sedangkan model hewan non genetik adalah hewan normal yang fungsi fisiologisnya dirubah melalui proses pembedahan, modifikasi genetik, dan pemberian zat kimia. Model hewan non genetik ini lebih sering dipakai daripada model hewan genetik karena biaya yang diperlukan lebih murah, jumlah ketersediaan lebih banya, lebih mudah dilakukan metode induksinya dan pemeliharannya. Namun, kekurangannya yaitu perkembangannya tidak dapat diprediksi karena dipengaruhi banyak faktor (Husna dkk., 2019).

Model hewan non genetik dapat menunjukkan kemiripan patogenesis DM yang terjadi pada manusia. Model hewan coba ini, merupakan hewan dengan fungsi fisiologis normal atau tidak mengalami DM, akan tetapi diberi suatu perlakuan yang menjadikannya mengalami DM. Induksi DM dapat dilakukan dengan cara pankreatektomi atau membuang sebagian pankreas, manipulasi genetik, dan memberi zat kimia serta modifikasi diet atau gabungan keduanya.

Pemberian perlakuan tersebut bertujuan untuk mendapatkan kondisi patologis yakni defisiensi insulin atau kerusakan fungsi sel β -pankreas dan resistensi insulin yang perubahannya dapat diamati secara klinis (Husna dkk., 2019).

Salah satu cara yang dapat ditempuh untuk mendapat hewan coba dengan kondisi DM yakni dengan pemberian zat kimia tertentu seperti streptozotosin (STZ). STZ memiliki sifat sitotoksik selektif terhadap sel β pankreas yang efeknya timbul setelah 72 jam pemberian. Sifat selektif sel β pankreas yang dimiliki STZ

karena gugus glukosa pada struktur kimia STZ mempermudah masuknya STZ ke sel β pankreas. Dibandingkan sel lainnya, sel β pankreas lebih aktif melakukan ambilan glukosa. Selain sel β pankreas, sel yang rentan terhadap induksi STZ yakni sel hepatosit dan sel tubulus ginjal. Terdapat tiga jalur yang menyebabkan kerusakan sel β pankreas akibat induksi STZ, yakni, pertama, metilasi DNA sehingga terjadi inaktivasi enzim poli-ADP-ribosa transferase yang berperan dalam perbaikan sel, kedua, produksi nitrit oksida, dan ketiga pembentukan radikal bebas (Husna dkk., 2019).

Assessment resistensi insulin dapat dilakukan dengan cara *Homeostasis model assessment-insulin resistance* (HOMA-IR) untuk menilai fungsi sel dan resistensi insulin (IR) dari glukosa dan insulin. Sampel dari setiap tikus dianalisis dalam rangkap tiga, dan hasilnya dinyatakan sebagai U/mL insulin plasma. HOMA-IR kemudian dihitung sebagai glukosa puasa (mmol/L) \times insulin puasa (μ U/mL)/22,5 (Chao *et al.*, 2018).

2.7 Glikuidon

Glikuidon adalah obat andiabetes golongan sulfonilurea generasi kedua yang mempunyai efek mendorong sekresi insulin endogen dari sel beta pankreas dan secara efektif menurunkan glukosa darah. Obat ini dapat dengan cepat diserap oleh saluran usus ketika diminum dan memiliki efek stimulasi bifasik pada sekresi insulin. Sekitar 95% glikuidon diekskresikan melalui empedu dan feses, sehingga akumulasi obat tidak menjadi masalah pada pasien dengan insufisiensi ginjal. WHO merekomendasikan glikuidon sebagai obat lini pertama untuk pengobatan lesi ginjal ringan hingga sedang pada pasien dengan ND. Selain memiliki efek menurunkan kadar glukosa plasma, glikuidon juga dapat meningkatkan

sensitivitas jaringan perifer dan hepatosit terhadap insulin. Yara *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa glikuidon secara nyata dapat menurunkan tingkat *nonenzymatic glycosylation protein* dan meningkatkan tingkat *lens glutathione* pada tikus diabetes. Yanardag *et al.*, (2005) melaporkan bahwa glikuidon dapat mengurangi lesi hati yang diinduksi STZ dengan mengurangi stres oksidatif pada tikus diabetes. Pada pasien dengan ND, penggantian glibenklamid oral dengan glikuidon terbukti dapat meningkatkan GFR dan menurunkan albumin urin (Tian *et al.*, 2018).

Lesi mikrovaskular yang diinduksi DM dianggap sebagai salah satu penyebab utama ND. Ketika metabolisme glukosa terganggu, produksi AGEs meningkat, AGEs yang bekerja pada reseptor kapiler glomerulus yaitu RAGE, dan meningkatkan stres oksidatif dengan mengaktifkan PKC yang menyebabkan akumulasi ROS dan NO yang mengakibatkan cedera sel endotel kapiler glomerulus. PKC berperan dalam patogenesis ND, dengan berkontribusi pada aktivasi sitokin, *growth of extracellular matrix*, pertumbuhan dan proliferasi seluler, angiogenesis, kontraksi dan dilatasi pembuluh darah, serta perubahan permeabilitas pembuluh darah (Ke *et al.*, 2014).

2.8 ELISA

Elisa adalah salah satu metode deteksi serologis berdasarkan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan menggunakan enzim sebagai indikator reaksi. Prinsip dasar ELISA adalah menganalisis adanya interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabeli enzim. Yangmana enzim ini akan

menimbulkan reaksi dengan substrat sehingga menghasilkan warna. Warna yang ditimbulkan dapat menjadi penentu secara kualitatif dengan pandangan mata dan secara kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi *optical density* (OD) pada ELISA *plate reader* (Yusrini, 2005).

Terdapat empat teknik ELISA, yakni *direct* ELISA, *indirect* ELISA, *sandwich* ELISA dan *competitive* ELISA. Prinsip *direct* ELISA yakni antigen melekat pada fase solid dengan adsorpsi pasif. Setelah dicuci, antibodi berlabel enzim ditambahkan, kemudian setelah masa inkubasi dan sistem substrat ditambahkan, warna akan dibiarkan berkembang (Crowther, 2009).

Sistem *indirect* mirip dengan sistem *direct* karena antigen langsung melekat pada fase padat dan ditargetkan oleh menambahkan antibodi (mendeteksi antibodi). Namun, antibodi yang ditambahkan ini tidak diberi label dengan enzim tetapi ditargetkan oleh antibodi yang terkait dengan enzim. Antibodi tersebut diproduksi melawan imunoglobulin spesies di mana mendeteksi antibodi diproduksi dan disebut anti-spesies konjugasi (Crowther, 2009).

Sandwich ELISA dapat dibagi menjadi dua sistem, yakni *direct sandwich* ELISA dan *indirect sandwich* ELISA. *Direct sandwich* ELISA memanfaatkan antibodi yang menempel pada fase padat untuk menangkap antigen. Antigen kemudian dideteksi menggunakan serum spesifik untuk antigen tersebut. Antibodi yang mendeteksi diberi label dengan enzim. Antibodi penangkap dan antibodi pendeteksi dapat berupa serum yang sama atau dari hewan yang berbeda dari spesies yang sama atau dari spesies yang berbeda. *Indirect sandwich* ELISA, antigen ditangkap oleh antibodi fase padat. Antigen kemudian dideteksi menggunakan antibodi spesies lain. Ini pada gilirannya terikat terikat oleh konjugat anti-spesies. Dengan demikian, spesies serum untuk pelapis dan

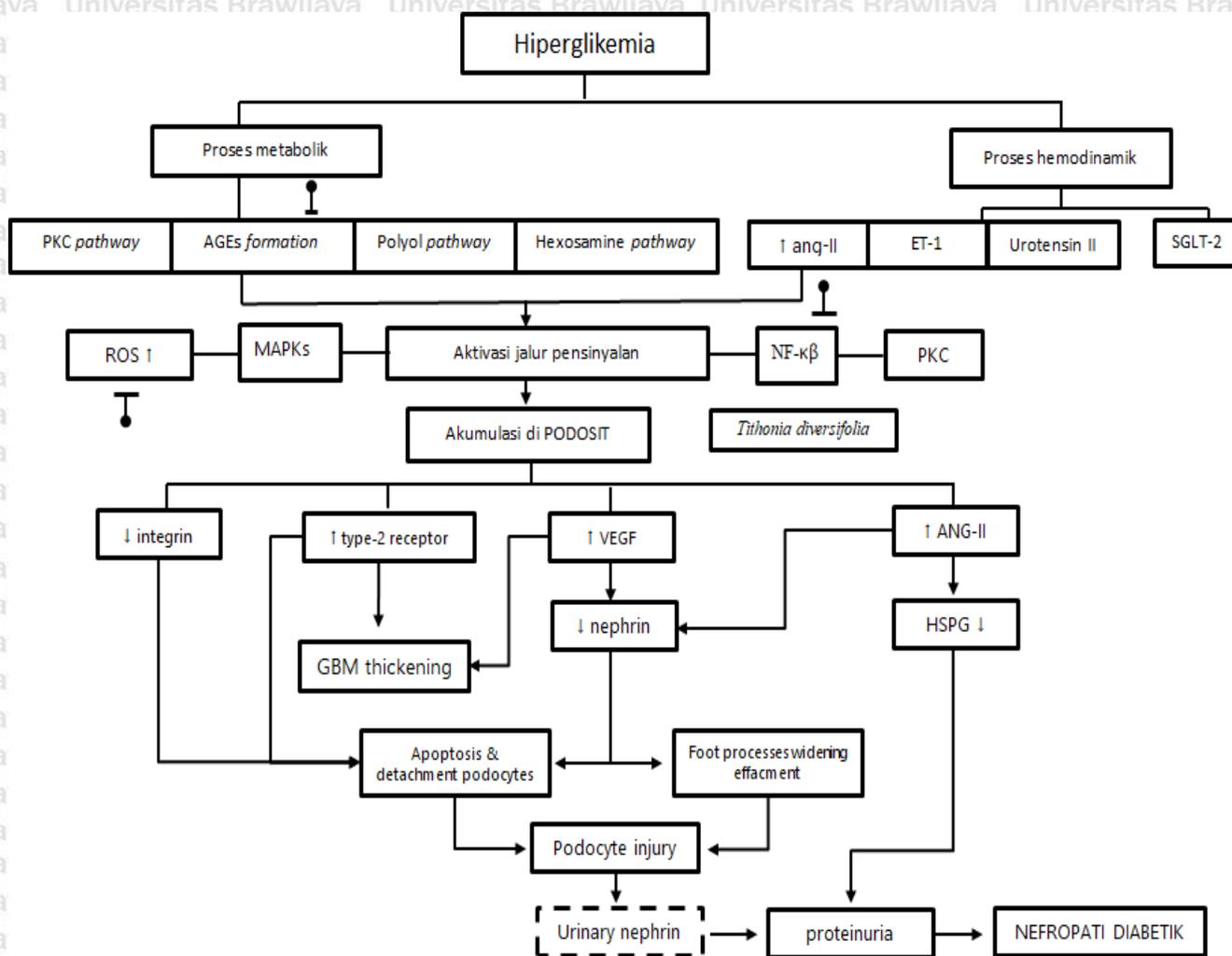
antibodi pendeteksi harus berbeda, konjugat anti-spesies tidak dapat bereaksi dengan antibodi pelapis (Crowther, 2009).

ELISA *competitive*, juga dikenal sebagai ELISA pemblokiran, mungkin merupakan teknik ELISA yang paling kompleks. Namun, masing-masing jenis pengujian di atas dapat disesuaikan dengan format kompetitif. ELISA kompetitif/inhibisi sebagian besar digunakan untuk mengukur konsentrasi antigen atau antibodi dalam sampel dengan mendeteksi interferensi pada keluaran sinyal yang diharapkan. Pada dasarnya, sampel antigen atau antibodi bersaing dengan referensi untuk mengikat sejumlah terbatas antibodi atau antigen berlabel, masing-masing. Semakin tinggi konsentrasi antigen sampel, semakin lemah sinyal output, menunjukkan bahwa output sinyal berbanding terbalik dengan jumlah antigen dalam sampel (BioRad, 2021).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

— : jalur penghantaran

→ : memicu/menghasilkan

□ : variabel yang tidak diteliti

□ : variabel yang diteliti

● : senyawa *T. diversifolia* yang menghambat

Kondisi glukosa yang tinggi dapat memicu aktivasi berbagai jalur mekanisme dalam tubuh. Secara umum, terdapat dua proses yang mengalami perubahan saat kondisi hiperglikemia yakni proses metabolik dan hemodinamik.

ROS yang dihasilkan dari perubahan proses tersebut dinyatakan sebagai pensinyalan yang paling umum terlibat. ROS memberikan efek merusak tidak hanya melalui oksidasi protein, lipid dan asam nukleat tetapi juga bertindak sebagai molekul pemberi sinyal yang mengaktifkan transduksi sinyal intraseluler dan kaskade transkripsi yakni *mitogen activated protein kinase* (MAPKs) dan nuclear factor kappa β (NF- κ β). Selain itu, PKC juga berperan dalam aktivasi kaskade MAPKs (Lewko and Stepinski, 2009).

Stimulasi sitokin fibrogenik oleh kondisi hiperglikemia melalui jalur metabolik seperti jalur heksosamin yang mana glukosamin-6-fosfat dapat meningkatkan transkripsi sitokin TGF- β 1. Selain itu, TGF- β dan VEGF diaktifkan oleh AGEs karena adanya ikatan dengan reseptornya. Aktivasi PKC juga berperan dalam meningkatkan TGF- β . Selain melalui jalur metabolik, pada jalur hemodinamik yakni angiotensin II yang mana merupakan komponen paling berperan pada jalur ini dengan menstimulasi sitokin profibrotik (Manikowski and Atta, 2015).

Berbagai faktor metabolik dan hemodinamik di lingkungan diabetes berkumpul di podosit untuk meningkatkan produksi VEGF dan Ang-II. Efek lainnya yakni upregulasi reseptor TGF-tipe II dan downregulasi sel permukaan integrin α 3 β 1.

VEGF pada podosit beroperasi melalui pensinyalannya dengan VEGFR-1 dan merangsang produksi kolagen α 3 (IV) menyebabkan penebalan GBM dan

menekan ekspresi nefrin, hal itu berdampak pada terjadinya apoptosis dan pelebaran atau penipisan prosesus kaki podosit. Ang-II juga menekan ekspresi nefrin dan menurunkan produksi *heparan sulphate proteoglycans* (HSPG) yang bermuatan negatif. Ang-II dan glukosa yang tinggi dapat meningkatkan regulasi reseptor TGF-tipe II dan dapat meningkatkan respon podosit terhadap TGF- β . Interaksi reseptor TGF- β /tipe-II merangsang produksi matriks ekstraseluler oleh podosit (berkontribusi pada penebalan GBM) dan oleh mesangium menyebabkan ekspansi matriks mesangial. TGF- β dalam podosit juga mendorong apoptosis dan menurunkan ekspresi integrin yang dapat menyebabkan pelepasan podosit dan podosituria (Wolf *et al.*, 2005). Lepasnya podosit ke urin beserta protein spesifiknya yang salah satunya adalah nefrin merupakan penanda awal adanya kerusakan struktur *barrier filtrasi glomerulus*. Nefrin pada urin dapat menjadi marker kerusakan ginjal awal.

Dari penjelasan diatas mengenai mekanisme hiperglikemia memicu kerusakan ginjal, baik dari segi perubahan anatomi maupun fungsi fisiologis sehingga menyebabkan nefropati diabetik. Daun *Tithonia diversifolia* mengandung senyawa flavonoid dan seskuiterpen, dianggap dapat mencegah atau menghambat kerusakan sel β pankreas. Biomarker yang diteliti sebagai penanda adanya kerusakan ginjal yakni nefrin.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dapat menurunkan kadar nefrin dalam urin pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain eksperimen yang digunakan pada penelitian tugas akhir ini yaitu *true experimental design post-test only* secara *in vivo* dengan melihat adanya pengaruh ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap kadar nefrin urin pada hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar model DM. Kelompok perlakuan pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok. Pemilihan sampel menggunakan teknik *simple random sampling*.

4.2 Sampel penelitian

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar sebagai sampel penelitian. Tikus yang dipilih memiliki karakteristik berusia 6-8 minggu dengan berat badan 160-225 gram, jantan, dan dalam kondisi sehat yang ditandai dengan bergerak aktif. Jumlah sampel penelitian dihitung menggunakan rumus Federer, sebagai berikut :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1)5 \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel penelitian

Dari hasil perhitungan diatas, maka diperlukan replikasi paling sedikit adalah empat kali untuk setiap kelompok. Namun, untuk menghindari kemungkinan adanya hewa coba yang mati sebesar 25% (f) pada masa percobaan, diperlukan pula perhitungan penambahan jumlah sampel dengan rumus $1/1 - f$ (Supranto, 2000), sebagai berikut :

$$1/(1-0,25) \times 4 = 5,33 \sim 6$$

Sehingga, tiap kelompok paling tidak dilebihkan satu tikus, tetapi untuk mengantisipasi adanya kematian yang banyak terjadi, tiap kelompok dilebihkan 2 tikus, yang artinya jumlah total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 36 ekor.

Kriteria inklusi sampel pada penelitian ini, antara lain:

1. Tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan (untuk menghindari pengaruh hormonal pada tikus betina)
2. Belum pernah digunakan untuk penelitian
3. Umur 6-8 minggu (dewasa)
4. Berat badan \pm 160-225 gram
5. Keadaan umum tikus sehat yang ditandai dengan bergerak aktif dan tingkah laku normal

Kriteria eksklusi sampel pada penelitian ini, antara lain:

1. Tikus memiliki kecacatan anatomi tubuh
2. Tikus mengalami penurunan berat badan $>10\%$ setelah masa aklimatisasi

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang diberikan ada sampel kelompok perlakuan.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar nefrin urin sampel.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli-November 2020 di Laboratorium Farmasi Divisi Farmasi Bahan Alam untuk pembuatan ekstrak, Laboratorium Hewan FKG UB untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba, Laboratorium Biomedik FK UB untuk pengukuran kadar nefrin urin.

4.5 Alat dan Bahan / Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan serta Pembuatan Makanan Tikus

Selama masa perawatan, tikus masing-masing diletakkan dalam wadah bak plastik berukuran 30 cm x 40 cm x 15 cm. setiap bak plastik berisi 1 ekor tikus dan disediakan pula botol air, sekam, tutup bak dari kawat serta pakan tikus. Untuk prosedur penampungan urin tikus, disediakan kadang metabolik yang dimodifikasi khusus dengan adanya wadah penampung urin, selain itu terdapat pula kawat pembatas di dalam bak dan selang untuk menghubungkan urin yang tertampung di bak ke wadah penampung urin. Pakan tikus berupa pakan pelet dengan jumlah 20% bobot rata-rata tikus. Pelet dicampur bersama tepung terigu dengan perbandingan 1:2 (pelet:tepung terigu). Setiap tikus diberi makan satu kali sehari. Pakan yang tersisa setiap harinya ditimbang menggunakan timbangan analitik digital.

4.5.2 Alat Penimbang Berat Badan Tikus

Untuk mengukur berat badan tikus menggunakan neraca analitik digital.

4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Buffer Sitrat

Asam sitrat, natrium sitrat, *water for injection* (WFI), NaOH, HCl, gelas beaker, labu ukur, pipet volume, pH meter.

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Tikus putih jantan galur wistar berumur 6-8 minggu dengan berat 160-200 gram (kelompok KN, KP, P1, P2, P3, dan P4), streptozotosin (STZ) bioWORLD (nomor katalog: 18833-66-4) dosis 45 mg/kg BB, buffer sitrat 50 Mm (pH 4,5), membran filter 0,2 µm, glukometer, bunsen, pinset, kapas, alkohol swab, falkon.

4.5.5 Alat dan Bahan Pemberian Terapi

Tikus putih jantan berumur 6-8 minggu dengan berat 160-200 gram (kelompok KP, P1, P2, P3, dan P4), ekstrak daun insulin dosis 50, 100, 150 mg/kg BB, larutan CMC-Na, tube, spatel, syringe 1 ml, labu ukur 50 ml.

4.5.6 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Insulin

Serbuk daun insulin 500 gram yang telah dilakukan determinasi (**Lampiran 4**), 5 liter etanol 70%, corong Buchner, rotary evaporator, oven, cawan porselen, botol gelap, spatel, gelas beaker, gelas ukur.

4.5.7 Alat dan Bahan Pengumpulan Sampel Urin

Pengumpulan sampel urin dilakukan pada hari ke-42 dengan meletakkan tikus pada kandang khusus yang dinamakan kandang metabolik. Kandang tersebut telah dimodifikasi sehingga bisa mengumpulkan urin yang dieksresikan tikus. Urin akan terkumpul pada botol yang terletak pada bagian bawah bak kandang.

4.5.8 Alat dan Bahan Pengamatan Nefrin Urin

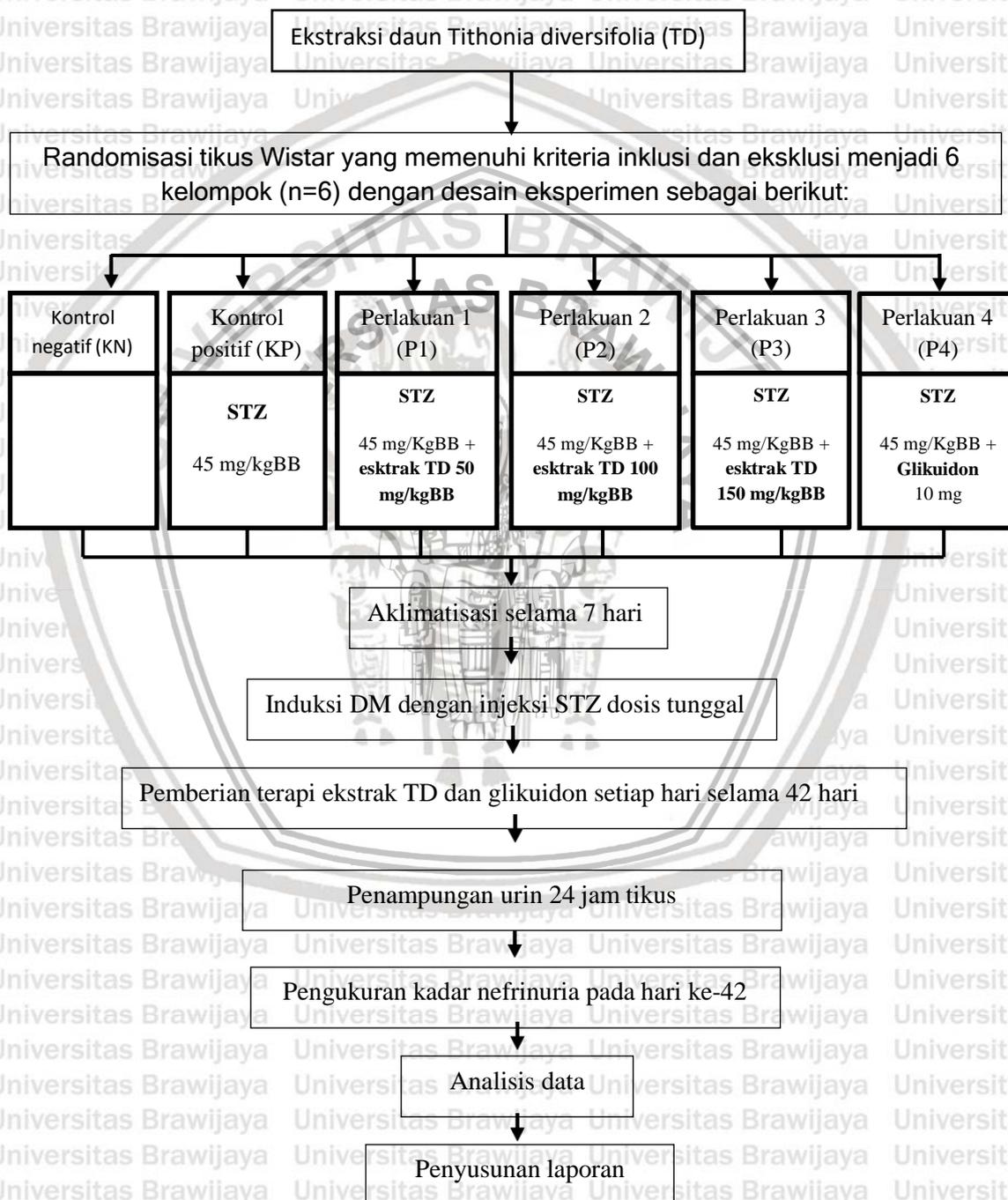
Sampel urin, wadah penampung urin, falkon, tip biru, tip kuning, tip putih, tissue, reagen Rat NPHN(Nephrin) ELISA Kit Elabscience® yang terdiri dari micro ELISA plate, reference standard, concentrated biotinylated detection ab (100×), concentrated hrp conjugate (100×), reference standard & sample diluent, biotinylated detection ab diluent, hrp conjugate diluent, concentrated wash buffer (25×), substrate reagent, stop solution dan plate sealer.

4.6 Definisi Operasional

- Ekstrak daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) adalah serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang didapatkan dari Balai Materia Medika Batu yang telah dilakukan determinasi (**Lampiran 4**) dan dijadikan ekstrak dengan teknik maserasi dengan etanol 70%.
- Streptozotosin merupakan senyawa untuk menginduksi diabetes melitus pada hewan coba dengan mekanisme merusak sel beta pankreas. Apoptosis sel β pankreas menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Dosis yang digunakan untuk penelitian ini yaitu 45 mg/kg BB dengan pemberian rute intraperitoneal.
- Glikuidon adalah obat antidiabetes yang digunakan sebagai pembanding efek penurun kadar glukosa darah. Dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10 mg/kgBB.
- Hewan coba tikus model DM yakni tikus dengan glukosa darah puasa (GDP) ≥ 200 mg/dL. Pada penelitian ini, GDP diukur pada hari ke-0 yakni sebelum diinjeksi STZ, kemudian hari ke-3, 7, 14, 21, 28, 35, dan 42 setelah induksi STZ.
- Pengukuran kadar nefrin urin menggunakan metode ELISA. Sampel yang diukur merupakan sampel urin akhir terapi yakni hari ke-42. Adanya nefrin pada urin tikus, dapat menjadi indikasi kerusakan ginjal.

4.7 Alur Penelitian

Alur penelitian disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

1. Daun insulin diekstraksi menggunakan metode maserasi.
2. Serbuk simplisia daun TD sebanyak 500 mg dimaserasi menggunakan 2 liter etanol 70% selama 24 jam.
3. Filtrat dipisahkan menggunakan corong buchner.
4. Ekstrak dimaserasi kedua kalinya menggunakan 1,5 liter etanol 70%.
5. Filtrat dipisahkan menggunakan corong buchner.
6. Kemudian dimaserasi kembali dengan 1,5 liter etanol 70%.
7. Filtrat dipisahkan menggunakan corong buchner.
8. Hasil dari filtrasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 80 rpm untuk menguapkan etanol.
9. Selanjutnya ekstrak pekat tersebut, dipekatkan kembali menggunakan oven pada suhu 40°C untuk menghilangkan kandungan air hingga bobot konstan yakni perubahan bobot ekstrak pekat tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes, 2014).

4.8.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian yang menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian harus memiliki izin etik sebelum melakukan penelitian. Surat persetujuan laik etik terdapat di Lampiran 1. Tikus yang digunakan sebagai penelitian, sebelum dimulainya masa percobaan, diaklimatisasi dahulu selama 7 hari di dalam bak plastik berukuran 30 x 40 x 15 cm dan disediakan botol minum air, sekam serta tutup bak yang terbuat dari kawat dengan bingkai dari kayu. Selama masa aklimatisasi, tikus diberikan asupan makanan dan minum. Makanan untuk tikus terbuat dari pakan pelet dicampur dengan tepung dengan perbandingan 2:1.

Sedangkan minum untuk tikus berupa air putih. Perlu dilakukan penimbangan berat badan tikus sebelum dimulainya masa aklimatisasi. Tiap kelompok, berisi 6 ekor tikus yang dipilih secara acak.

4.8.3 Pembuatan Buffer Sitrat (Pelarut Streptozotisin)

1. Asam sitrat dan natrium sitrat ditimbang berdasarkan perhitungan pada Lampiran 2
2. Asam sitrat yang telah ditimbang, dilarutkan menggunakan larutan WFI di dalam gelas beaker 100 ml, lalu dituang ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan larutan WFI hingga tanda batas (Larutan A).
3. Natrium sitrat yang telah ditimbang dilarutkan menggunakan larutan WFI di dalam gelas beaker 100 ml, lalu dituang ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan larutan WFI hingga tanda batas (Larutan B).
4. Sebanyak 14 ml larutan A dan 11 ml larutan B diambil menggunakan pipet volume, lalu dimasukkan pada labu ukur 50 ml dan ditambahkan larutan WFI hingga tanda batas dan dicampurkan hingga homogen (Larutan C atau larutan buffer sitrat).
5. Larutan C dipindahkan ke dalam gelas beaker dan diukur pH-nya menggunakan pH-meter.
6. Dilakukan *adjust* pH dengan menambahkan NaOH atau HCl sesuai kebutuhan hingga pH mencapai 4,5.
7. STZ ditimbang dengan dosis 45 mg/kgBB
8. STZ dilarutkan dengan larutan buffer sitrat yang telah dibuat sebelumnya dan dihomogenkan.
9. Larutan difiltrasi menggunakan membran filter berukuran 0,2 μm dan ditampung pada botol falkon.

4.8.4 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

1. Tikus kelompok KP, P1, P2, P3, dan P4 dipuasakan selama 8 jam sebelum diinjeksi STZ.
2. STZ dengan dosis 45 mg/kgBB yang telah dilarutkan menggunakan buffer sitrat diinjeksikan pada tikus melalui rute intraperitoneal
3. Pengukuran GDP dilakukan pada hari ke-0 sebelum injeksi STZ, kemudian hari ke-3, 7, 14, 28, 35 dan 42 setelah induksi STZ.
4. Pengukuran GDP dilakukan dengan cara melukai ujung ekor tikus menggunakan jarum syringe. Darah tikus yang keluar diletakkan pada stik glukometer hingga mencukupi untuk bisa mendeteksi kadar glukosa darah, kemudian GDP dicatat. Tikus dinyatakan DM apabila kadar GDP-nya sebesar ≥ 200 mg/dL.

4.8.5 Pemberian Terapi

1. Pemberian ekstrak TD pada tikus kelompok P1, P2, dan P3, serta pemberian glikuidon pada tikus kelompok P4 dilakukan setiap hari selama 42 hari.
2. CMC-Na 1% ditimbang sebanyak 500 mg.
3. CMC-Na dilarutkan pada gelas beaker dengan aquadest hangat hingga larut dan diaduk hingga homogen.
4. Larutan CMC-Na dipindahkan ke labu ukur 50 ml, kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas.
5. Ekstrak TD dan glikuidon yang telah ditimbang sesuai berat badan tikus (Lampiran 3) dilarutkan dengan larutan CMC-Na.
6. Bobot tikus ditimbang setiap minggu untuk menyesuaikan dosis terapi

4.8.6 Identifikasi Kadar Nefrin Urin

Kit ELISA (Elabscience®) pada penelitian ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Pelat ELISA mikro yang disediakan dalam kit ini telah dilapisi sebelumnya dengan antibodi khusus untuk NPHN (nephrin) Tikus. Standar atau sampel ditambahkan ke sumur pelat mikro ELISA dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi deteksi terbiotinilasi spesifik untuk Rat NPHN dan konjugat Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan berturut-turut ke masing-masing pelat mikro dan diinkubasi. Komponen bebas akan tersapu. Larutan substrat ditambahkan ke setiap sumur. Hanya sumur yang mengandung NPHN Tikus, antibodi deteksi terbiotinilasi dan Konjugat Avidin-HRP yang akan tampak berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan stop solution dan warna berubah menjadi kuning. Densitas optik (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

Nilai OD sebanding dengan konsentrasi NPHN Tikus. Konsentrasi NPHN tikus dapat dihitung dalam sampel dengan membandingkan OD sampel dengan kurva standar.

4.8.6.1 Pengumpulan Sampel

1. Sampel disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$

Catatan : apabila dilakukan penyimpanan sampel urin perlu diberi formaldehyde 1 tetes sebagai pengawet

2. Supernatan diambil

Kebutuhan sampel : 100 uL/ well

4.8.6.2 Preparasi Reagen ELISA Nefrin

1. Penyiapan

- Diletakkan semua reagen pada suhu ruang (18-25 °C) sebelum digunakan.

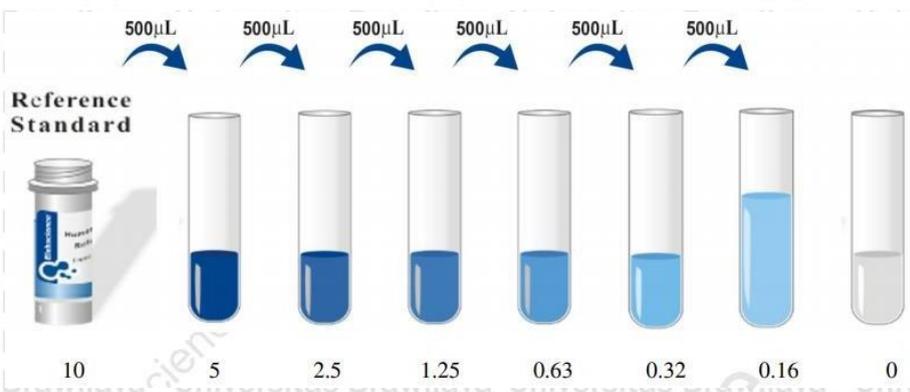
- Microplate dipanaskan terlebih dahulu selama 15 menit sebelum pengukuran OD.

2. Wash buffer :

- dilarutkan 30 ml wash buffer konsentrat dengan 720 ml aquades untuk membuat larutan wash buffer encer sebanyak 750 ml
- apabila terdapat kristal pada wash buffer konsentrat, dipanaskan pada suhu 40 °C di water bath dan diaduk perlahan sampai kristal larut sempurna.

3. Larutan standard (larutan baku kerja) :

- standard disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.
- Ditambahkan 1 ml Reference Standard & Sample diluent
- diamkan selama 10 menit dan dibalikkan perlahan beberapa kali
- Setelah larut semua, aduk homogen dengan pipet. Rekonstitusi menghasilkan larutan kerja 10 ng/ml. kemudian dibuat seri pengenceran seperti pada **Gambar 4.2.**



Gambar 4.2 Seri Pengenceran Larutan Standard ELISA

4. Larutan kerja Biotinylated Detection Ab :

- sebelum percobaan hitung dahulu kebutuhannya (100 uL/ sumur).

Kebutuhan larutan kerja Biotinylated Detection Ab = 100 uL/
sumur x 96 sumur = 9.600 uL= 10.000 uL

- tabung stock disentrifugasi sebelum digunakan
- Larutan baku Biotinylated Detection Ab konsentrat (kadar 100x)
diencerkan hingga kadar 1x dengan volume 10.000 uL

Perhitungan pengenceran sebagai berikut:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$100 . V1 = 1. 10000 \text{ uL}$$

$$V1 = 100 \text{ uL} \square \text{ larutan konsentrat yang diambil}$$

- Diambil larutan baku Biotinylated Detection Ab konsentrat sebanyak 100 uL lalu ditambahkan pelarut Biotinylated Detection Ab ad 10.000 UI

5. Larutan baku kerja HRP conjugate konsentrat

Horseradish peroxidase (HRP) adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrogen peroksida dengan substrat donor elektron organik untuk membentuk produk warna, fluoresen, atau chemiluminescent pada oksidasi. HRP merupakan glikoprotein, dan rantai polisakaridanya sering digunakan dalam reaksi ikatan silang untuk memasang enzim dengan antibodi. Tujuan utama dari biokonjugasi antibodi adalah persiapan konjugat antibodi-enzim stabil yang dapat berfungsi sebagai reporter yang diarahkan pada target untuk mendeteksi atau menghitung antigen spesifik dengan immunoassay. Metode yang digunakan untuk mencapai tujuan ini harus menghasilkan antibodi yang mempertahankan afinitas pengikatan

antigen tinggi dengan aktivitas enzimatik yang kuat (Hnasko, 2015).

Prosedur preparasi larutan baku kerja HRP konjugat, sebagai berikut:

- sebelum percobaan dihitung dahulu kebutuhannya (100 μ L/ sumur). Kebutuhan larutan kerja HRP conjugate = 100 μ L/ sumur x 96 sumur = 9.600 μ L = 10.000 μ L
- disentrifugasi tabung stock sebelum digunakan
- Larutan baku kerja HRP conjugate konsentrat (kadar 100x) diencerkan hingga kadar 1x dengan volume 10.000 μ L

Perhitungan :

$$M1.V1 = M2.V2$$

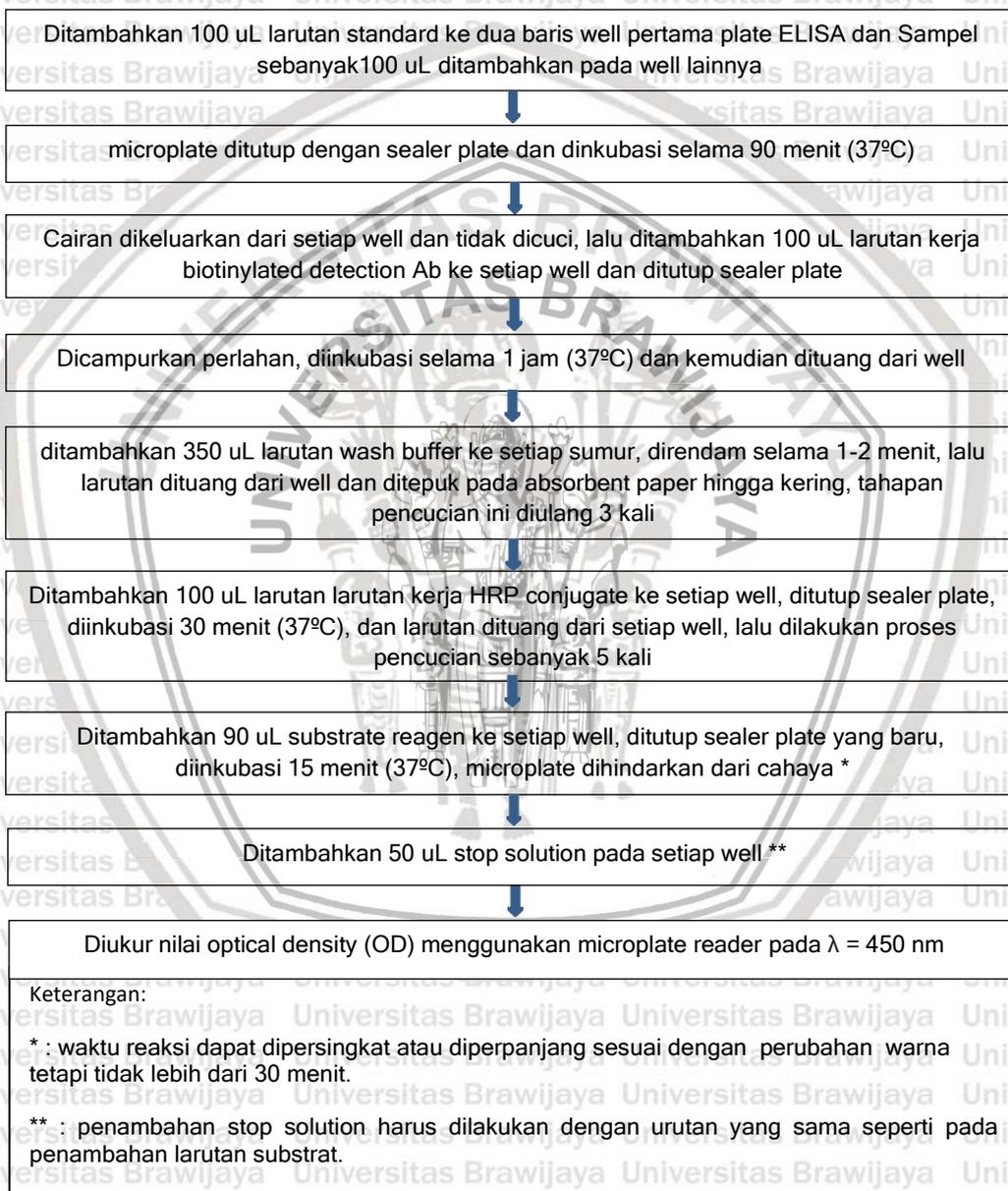
$$100 . V1 = 1 . 10000 \mu\text{L}$$

$$V1 = 100 \mu\text{L} \square \text{larutan konsentrat yang diambil}$$

- Diambil Larutan baku kerja HRP conjugate konsentrat sebanyak 100 μ L lalu ditambahkan pelarut HRP conjugate ad 10.000 μ L

4.8.6.3 Prosedur ELISA

Prosedur pengujian kadar nefrin pada urin tikus dilakukan seperti pada (Gambar 4.3):



Gambar 4.3 Prosedur Pengujian Kadar Nefrin Urin dengan Metode ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10,0	10,0	KN1	KP1	P1-1	P2-1	P3-1	P4-1				
B	5,0	5,0	KN2	KP2	P1-2	P2-2	P3-2	P4-2				
C	2,5	2,5	KN3	KP3	P1-3	P2-3	P3-3	P4-3				
D	1,25	1,25	KN4	KP4	P1-4	P2-4	P3-4	P4-4				
E	0,63	0,63	KN5	KP5	P1-5	P2-5	P3-5	P4-5				
F	0,32	0,32	KN6	KP6	P1-6	P2-6	P3-6	P4-6				
G	0,16	0,16										
H	○	○										

Keterangan:

- : standar
- : sampel
- : blangko

Gambar 4.4 ELISA Plate Mapping

4.9 Analisis Data

Data hasil pengukuran konsentrasi nefrin urin pada tikus Wistar model DM pada penelitian ini menggunakan metode ELISA, selanjutnya dilakukan pengolahan data dan dianalisis secara statistika menggunakan software IBM SPSS *Statistics* 25 dengan taraf signifikansi sebesar 5%. Untuk menguji normalitas data dengan jumlah sampel ≤ 50 , dilakukan dengan metode uji *Shapiro-Wilk*. Uji varians data atau homogenitas juga perlu dilakukan untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama atau tidak. Data dikatakan terdistribusi normal dan memiliki varians data yang sama, jika nilai $p > 0,05$. Apabila setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas

diperoleh hasil yang tidak memenuhi syarat dilakukan uji parametrik, maka dilakukan transformasi data atau menggunakan alternatif uji non-parametrik.

Karena pada penelitian ini sampel terbagi menjadi 6 kelompok tidak berpasangan, maka analisis data menggunakan metode uji parametrik *One-way of Variance* (ANOVA). Pada hasil uji ANOVA paling tidak terdapat dua kelompok data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna. Apabila pada uji parametrik tidak memenuhi syarat, maka dapat dilakukan alternatif dengan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui apakah dua atau lebih median berbeda. Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, selanjutnya dilakukan analisis *Post-Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Uji lanjutan atau *Post-Hoc* untuk uji ANOVA yakni *Post-Hoc Tukey* dengan menggunakan *Least Signifikan Differences* (LSD), sedangkan apabila menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*, maka untuk uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Hasil akhir maserasi didapatkan ekstrak berwarna hijau kecoklatan, berwujud cair dengan konsistensi kental dan beraroma seperti teh hijau seperti pada Gambar 5.1. Dari ekstrak yang diperoleh, dilakukan penimbangan bobot ekstrak yang kemudian dapat dihitung persentase rendemen seperti pada Tabel

5.1 dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot rendemen ekstrak}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$



Gambar 5.1 Hasil Ekstraksi Daun *T.diversifolia*

Tabel 5.1 Persentase Rendemen Ekstraksi Daun *T.diversifolia*

	Bobot simplisia (g)	Bobot Rendemen Ekstrak (g)	% Rendemen (%)
Ekstraksi 1	285,714	34,5	12,079
Ekstraksi 2	500	51,5	10,3
Rata-rata	392,857	43	10,945%

5.2 Analisis Pengukuran Konsentrasi Nefrin Urin

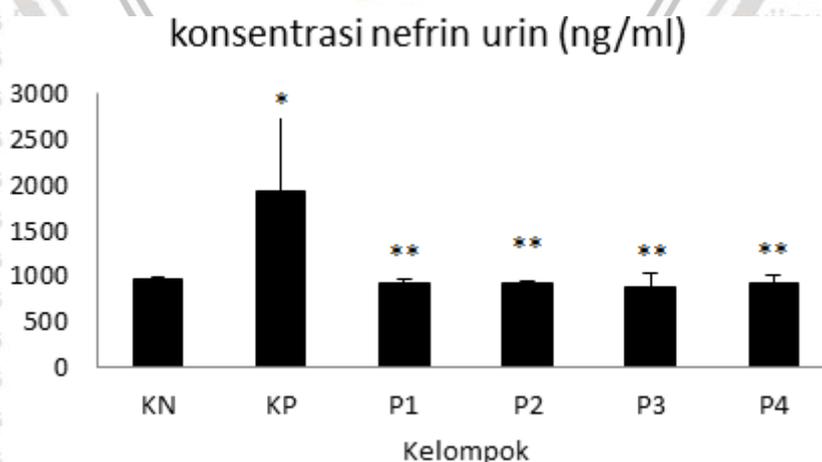
Pada hari ke-42 dilakukan penampungan urin tikus selama 24 jam yang selanjutnya urin dimasukkan dalam vial dan disentrifugasi. Sampel urin yang telah disentrifugasi digunakan sebagai sampel pengukuran nilai nefrin urin yang dilakukan dengan metode ELISA. Luaran hasil pengukuran ELISA yakni berupa *optical density* (OD) yang kemudian dikonversi menjadi satuan konsentrasi (**Lampiran 5**) yangmana data ini digunakan untuk analisis statistik penelitian ini.

Hasil OD larutan standar uji ELISA nefrin urin beserta regresinya terdapat pada **Lampiran 6**. Rerata dan standar deviasi konsentrasi nefrin urin setiap kelompok terdapat pada **Tabel 5.2** dan grafik profil rerata konsentrasi nefrin urin setiap kelompok terdapat pada **Gambar 5.2**.

Tabel 5.2 Rerata dan Standar Deviasi Konsentrasi Nefrin Urin H-42

kelompok	K N	KP	P1	P2	P3	P4
Nefri nurin (ng/ml)	965,313 ± 26,815	1930,362 ± 846,604*	927,934 ± 32,150**	932,235 ± 7,934**	872,066 ± 153,756**	930,976 ± 73,520**

*: berbeda signifikan dibandingkan dengan KN ($p < 0,05$); **: berbeda signifikan dibandingkan dengan KP ($p < 0,05$)



Gambar 5.2 Grafik Rerata Konsentrasi Nefrin Urin H-42

*: berbeda signifikan dibandingkan dengan KN ($p < 0,05$); **: berbeda signifikan dibandingkan dengan KP ($p < 0,05$).

Data hasil pengukuran dianalisis secara statistik menggunakan software *Statistical Product and Service Solution (SPSS)* 25 dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p=0,05$). Untuk mengetahui pola distribusi data maka perlu dilakukan uji normalitas. Pada penelitian ini, yangmana memiliki besaran sampel ≤ 50 maka untuk uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Dari uji normalitas didapatkan hasil bahwa semua kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi $p>0,05$ (**Lampiran 7.1**) yang artinya semua data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas *Levene's test* dan didapatkan hasil uji homogenitas dengan signifikansi 0,010 dimana $p<0,05$ (**Lampiran 7.2**) maka dikatakan data tidak terdistribusi homogen. Karena data tidak homogen maka diperlukan transformasi data dan setelah dilakukan transformasi data, hasil uji homogenitas tetap tidak signifikan yakni 0,013 ($p<0,05$). Sehingga sebagai alternatif, dapat digunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui apakah terdapat data yang memiliki perbedaan signifikan antar kelompok. Dan dari hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai signifikansi 0,035 dimana $p<0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan atau bermakna diantara keenam kelompok perlakuan. Hasil uji *Kruskal-Wallis* terdapat pada **Lampiran 7.3**. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok lainnya. Dari hasil uji lanjutan *Mann-Whitney* didapatkan bahwa KP berbeda signifikan terhadap KN dengan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* 0,021 ($p<0,05$), P1 berbeda signifikan terhadap KP dengan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* 0,021 ($p<0,05$), P2 berbeda signifikan terhadap KP dengan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* 0,021 ($p<0,05$), P3 berbeda signifikan terhadap KP dengan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* 0,029 ($p<0,05$), serta P4 berbeda signifikan terhadap KP dengan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* 0,021 ($p<0,05$). Hasil uji lanjutan *Kruskal-*

Wallis terdapat pada Tabel 5.3. Dan untuk *output* SPSS uji Mann-Whitney terdapat pada Lampiran **Lampiran 8**.

Tabel 5.3 Hasil Uji Mann-Whitney Konsentrasi Nefrin Urin

	KN	K P	P1	P2	P3	P4
KN		0,021*				
KP			0,021**	0,021**	0,029**	0,021**
P1				0,773	0,386	1,000
P2					0,248	1,000
P3						0,386
P4						

*: berbeda signifikan dibandingkan dengan KN ($p < 0,05$); **: berbeda signifikan dibandingkan dengan KP ($p < 0,05$).

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan tikus Wistar putih yang diinduksi DM dengan STZ 45 mg/kgBB sebagai subjek untuk meneliti kadar nefrin pada urin dan membandingkan antara kelompok normal, kelompok positif, kelompok yang diberi terapi ekstrak *T. diversifolia* dan glikuidon. STZ sudah digunakan pada banyak penelitian sebagai zat kimia penginduksi DM. Seperti pada penelitian Saputra *et al.*, 2018 yang menggunakan STZ dosis 45 mg/kgBB yang diinjeksikan rute intraperitoneal sebagai agen diabetogenik, dan dihasilkan tikus mengalami kondisi hiperglikemia dalam kurun waktu 3 hari. Hasil tersebut sama seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Fatmawati *et al.*, 2019 yang juga menggunakan STZ dosis 45 mg/kgBB dan didapatkan tikus mengalami hiperglikemia 72 jam setelah injeksi. STZ bersifat sitotoksik selektif sel β pankreas yang efek hiperglikemianya dapat timbul setelah 72 jam pemberian. Sifat selektif tersebut terjadi karena adanya gugus glukosa pada struktur kimia STZ yang dapat memberikan kemudahan masuknya STZ ke sel β pankreas (Husna *et al.*, 2019). STZ juga dapat menginduksi produksi ROS yang dapat berakibat pada kerusakan sel β pankreas (Saputra *et al.*, 2018). Pemberian STZ pada rentang dosis 40-55 mg/kgBB memberikan efek gangguan sekresi insulin parsial seperti DM tipe 2 sedangkan pada dosis >60 mg/kgBB dapat mengakibatkan kerusakan sel pankreas yang masif seperti DM tipe 1 (Husna *et al.*, 2019). Terjadinya kondisi hiperglikemia sebagai akibat induksi STZ dengan dosis 45 mg/kgBB pada penelitian ini dimungkinkan karena terjadinya gangguan sel β pankreas,

yangmana STZ mengalami ikatan dengan GLUT-2 yang dapat memberikan akses STZ masuk ke dalam sitoplasma sel β pankreas sehingga terjadi peningkatan depolarisasi pada mitokondria yang disebabkan oleh masuknya ion Ca^{2+} serta diikuti penggunaan energi secara berlebihan. Proses tersebut mengakibatkan terjadinya gangguan produksi insulin sehingga glukosa yang masuk ke dalam tubuh tidak dapat dimetabolisme dengan optimal (Saputra *et al.*, 2018).

Peningkatan kadar glukosa dalam darah atau hiperglikemia yang terjadi pada tikus model DM dapat memicu terjadinya komplikasi pada ginjal atau disebut nefropati diabetik. Aktivasi jalur metabolik dan hemodinamik oleh kondisi hiperglikemia berakibat pada kerusakan podosit sehingga meningkatkan produksi VEGF dan Ang-II, upregulasi reseptor TGF-tipe II dan downregulasi sel permukaan integrin $\alpha 3 \beta 1$. Berbagai proses tersebut berdampak pada terjadinya penebalan GBM dan penurunan ekspresi nefrin di ginjal sehingga terjadi apoptosis dan pelebaran atau penipisan prosesus kaki podosit. Peningkatan produksi Ang-II dapat pula menurunkan ekspresi nefrin pada ginjal. TGF- β yang terdapat pada podosit sebagai akibat dari upregulasi TGF-tipe II mengakibatkan penurunan ekspresi integrin dan terjadi pelepasan podosit ke urin (podosituria) (Wolf *et al.*, 2005). Podosit yang lepas ke urin membawa serta protein spesifiknya yakni nefrin sehingga terjadi nefrinuria atau adanya protein nefrin pada urin. Ditemukannya nefrin pada urin dapat menjadi penanda awal terjadinya kerusakan struktur *barrier filtration glomerulus*. Hal tersebut berkorelasi dengan hasil penelitian Tugas Akhir ini, yangmana pada kelompok kontrol positif (KP) konsentrasi nefrin urin meningkat signifikan dibandingkan kelompok kontrol normal (KN), dengan nilai signifikansi 0,021 ($p < 0,05$). Rata-rata konsentrasi

kelompok KP yakni 1930,362 ng/ml sedangkan kelompok KN yakni 965,313 ng/ml. Pada penelitian sebelumnya yang juga melakukan pengukuran konsentrasi nefrin urin pada tikus model DM, didapatkan bahwa setelah 18 minggu masa perlakuan diperoleh nilai konsentrasi nefrin urin yakni 209476 ng/ml pada tikus non-diabetes dan 1047563 pada tikus diabetes dengan signifikansi 0,005 ($p < 0,05$), yang artinya ekskresi nefrin urin meningkat signifikan pada tikus diabetes (Alter *et al.*, 2012).

Daun *T. diversifolia* diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan merendam simplisia daun *T. diversifolia* dengan pelarut etanol 70%. Dari hasil ekstraksi didapatkan rendemen ekstraksi sebesar 12,079% (ekstraksi 1) dan 10,3% (ekstraksi 2). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi yakni waktu lamanya proses ekstraksi, suhu, jenis pelarut, perbandingan bahan dengan pelarut yang digunakan, dan ukuran partikel (Chairunnisa *et al.*, 2019).

Masa pemberian terapi ekstrak daun *T. diversifolia* dan glikuidon pada tikus wistar model DM pada penelitian ini adalah selama 42 hari. Pada hari ke-42, urin ditampung selama 24 jam dan urin di sentrifugasi untuk dijadikan sampel uji nefrin urin. Berdasarkan analisis statistik didapatkan bahwa pada semua kelompok yang diberi terapi ekstrak daun *T. diversifolia* nilai signifikansinya $< 0,05$ jika dibandingkan dengan kelompok KP yang artinya pada tikus DM yang diberi terapi ekstrak *T. diversifolia* dengan dosis 50, 100 dan 150 mg/kgBB selama 42 hari progresivitas komplikasi kerusakan ginjal pada tikus DM lebih rendah dibandingkan dengan tikus DM yang tidak diberikan terapi antidiabetes yang dibuktikan dengan menurunnya konsentrasi nefrin urin. Pada *T. diversifolia* mengandung senyawa yang memiliki efek sebagai antidiabetik yakni flavonoid (katekin dan silibinin) serta seskuiterpen (tagitinin A dan C). Mekanisme flavonoid

sebagai antidiabetes yakni dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen yang berperan dalam regenerasi sel-sel beta pankreas. Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari adanya kerusakan spesies oksigen reaktif (Sasmita *et al.*, 2017). Melalui aktivitas antioksidan tersebutlah, kerusakan sel-sel pada subjek DM dapat dihambat. ROS yang banyak dihasilkan sebagai akibat dari kondisi hiperglikemia dapat ditekan atau diikat oleh antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya proses pensinyalan berbagai jalur patogenesis nefropati diabetik. Selain itu juga, flavonoid dapat menghambat metabolisme sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Sasmita *et al.*, 2017). Produksi glukosa dan fruktosa yang berlebih dapat mengaktifkan jalur metabolisme patogenesis ND. Adanya akumulasi glukosa dalam darah dapat memicu terbentuknya prekursor AGE dan mendorong pembentukan *oxidative stress*. Pada jalur poliol pembentukan fruktosa dalam jumlah besar dapat terfosforilasi dan terhidrolisis menjadi GAP dan DHAP yang selanjutnya dapat mendorong pembentukan prekursor AGE yakni MGO. Akumulasi proses tersebut memicu lingkungan oksidatif di sel (Ighodaro, 2018).

Mekanisme flavonoid dalam menurunkan kadar glukosa darah sama seperti obat antidiabetes golongan sulfonilurea yakni dengan cara meningkatkan sekresi insulin pada pankreas (Sasmita *et al.*, 2017). Pada penelitian ini, menggunakan obat antidiabetes golongan sulfonilurea yakni glikuidon dengan dosis 10 mg. Dari hasil analisis statistik diperoleh hasil bahwa konsentrasi nefrin urin pada kelompok yang diberi terapi glikuidon mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan nilai signifikansi 0,021 ($p < 0,05$). Hasil ini berhubungan dengan adanya penelitian oleh Ke *et al.*, 2014 yang menemukan bahwa terdapat penurunan an downregulasi ekspresi

RAGE setelah pemberian glikuidon selama 4 minggu. Selain ketebalan GBM menurun dan morfologi serta distribusi podosit membaik. Analisis biokimia menunjukkan penurunan yang nyata pada protein urin selama 24 jam dan kadar albumin urin 24 jam, hal tersebut menunjukkan bahwa glikuidon meningkatkan filtrasi glomerulus. Hasil dari penelitian tersebut membuktikan bahwa pemberian terapi glikuidon dapat memperbaiki manifestasi klinis ND, meskipun penelitian tersebut tidak mengukur konsentrasi nefrin urin.

6.2 Implikasi di Bidang Kefamasian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *T. diversifolia* terhadap konsentrasi nefrin urin pada tikus Wistar model DM yang diinduksi STZ. Didapatkan bahwa pemberian ekstrak daun *T. diversifolia* dosis 50, 100, dan 150 mg/kgBB dapat memberikan penurunan konsentrasi nefrin pada urin tikus model DM yang artinya pemberian terapi I ini dapat mencegah atau memperbaiki kondisi ginjal menurun akibat hiperglikemia. Maka, ekstrak daun *T. diversifolia* ini bisa menjadi terapi alternatif diabetes melitus terutama sebagai bentuk pencegahan terjadinya komplikasi ND.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini, adalah:

1. Pada penelitian ini tidak mengukur konsentrasi kreatinin urin, dan pada studi penelitian lain terdapat yang menggunakan rasio *urinary nephrite-to-creatinine* (UNCR) yang dikorelasikan dengan tingkat albuminuria subjek ND.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *T. diversifolia* dengan dosis 50, 100, 150 mg/kgBB dapat menurunkan secara signifikan konsentrasi nefrin pada urin tikus model nefropati diabetik.

7.2 Saran

Dari keterbatasan penelitian ini, dapat disarankan untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan sebagai berikut:

1. Dilakukan pengukuran terhadap parameter kreatinin urin .

DAFTAR PUSTAKA

Aaltonen P, Luimula P, Astrom E, Palmén T, Gronholm T, Palojoki E, Jaakkola I, Ahola H, Tikkanen I, Holthofer H: Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2001, 81:1185–1190.

Alicic R.Z., Rooney M.T., and Tuttle K.R. Diabetic Kidney Disease Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2017, 12 (12): 2032-2045.

Alter ML, Kretschmer A, Von Websky K, Tsuprykov O, Reichetzer C, Simon A, Stasch JP, Hoher B: Early Urinary and Plasma Biomarkers for Experimental Diabetic Nephropathy. *Clinical Laboratory* 2012, 58:659–671.

American Diabetes Association. Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27 (1): 579-583.

Anguiano L., Riera M., Pascual J., and Soler M.J. Endothelin Blockade in Diabetic Kidney Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 2015, 4, 171-1192.

Arora M.K., and Singh U.K. Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: An Update. , *Vascular Pharmacology*, 2013, doi: 10.1016/j.vph.2013.01.001.

Bandiara R., dan Soelaeman M.R. Podosit dan Penyakit Ginjal Diabetes. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 2011, 11 (1): 80-91.

Baruah, N.C., Sharma, R.P., Madhusudanan, K.P., Thyagarajan, G., Herz, W., Murari, R., 1979. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. *J. Org. Chem.* 44, 1831–1835. doi:10.1021/jo01325a018.

Chang JH, Paik SY, Mao L, Eisner W, Flannery PJ, Wang L, Tang Y, Mattocks N, Hadjadj S, Goujon JM, Ruiz P, Gurley SB, Spurney RF: Diabetic kidney disease in FVB/NJ Akita mice: temporal pattern of kidney injury and urinary nephrin excretion. *PLoS One* 2012, 7:e33942.

Coward RJ., Welsh GI., Koziell A., Hussain S., Ni L., et al. Nephrin is Critical for The Action of Insulin on Human Glomerular Podocytes. *Diabetes*, 2007, 56 (4): 1127-35.

Do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, Dos Santos M, Pereira S, Veronese FV: Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. *BMC Nephrol* 2013, 14(8):214.

Dodds WJ. Central Nervous System Regulation of Appetite in Humans and Pet Animals. *Annals of Clinical and Experimental Metabolism*, 2017, 2 (1): 1013. Dronavalli S., Duka I., and Bakris G.I. The Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 2008, 4 (8): 444-452.

Fatmawati, A., Bachri, M., dan Nurani, L. Combination Effects of Moringa oleifera Leaf Ethanol Extract and Andrographis paniculata Herb on Blood Glucose Levels and Pancreas Histopathology of Diabetic Rats Induced by Streptozotocin, 2019, *Traditional Medicine Journal*, 24(2).

Fauziyah Y., Sunarti S., Hanoum I. F., Wahyuningsih M. S. H. (2018) 'Ethanol Extract of Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray Standardized Ameliorates Hyperglycemia, Polyphagia, and Weight Loss in Diabetic Rats', *Molekul*, 13(1): 72-79.

Fiseha T. Urinary Biomarkers for Early Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. *Biomarker Research*, 2015, 3 (16): 1-7.

Gerke, P. et al. Homodimerization And Heterodimerization Of The Glomerular Podocyte Proteins Nephrin and NEPH1. *J. Am. Soc. Nephrol*, 2003, 14, 918–926.

Gheith O., Farouk N., Nampoory N., Halim M.A., and Al-Otibi T. Daibetic Kidney Disease: World Wide Difference of Prevalence and Risk Factor. *Journal of Nephro pharmacology*, 2016, 5 (1): 49-56.

Husna F., Suyatna F., Arozal W., dan Purwaningsih E. Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 2019,6(3), 131 – 141.

Husna F., Suyatna FD., Arozali W., dan Purwaningsih E.H. Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2019, 6 (3): 131-141.

IDF. 2019. *IDF Diabetes Atlas Ninth Edition 2019*. International Diabetes Federation, Belgium.

Ighodaro O.M. Molecular Pathways Associated With Oxidative Stress In Diabetes Mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108 656–662.

Jefferson JA., Shankland SJ., and Pichler RH. Proteinuria in Diabetic Kidney Disease: A Mechanistic Viewpoint. *Kidney International*, 74 (1): 22-36.

Jim B., Ghanta M., Qipo A., Fan Y., Chuang P.Y., Cohen H.W., et al. Dysregulated Nephrin in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetes: A Cross Sectional Study, *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36041.

Kandasamy Y., Smith R., Lumbers ER., and Rudd D. Nephrin — a Biomarker of Early Glomerular Injury. *Biomarker Research*, 2014, 2 (21): 1-8.

Kandungu J., Anjarwalla L., Mwaura DA., Ofori, Jamnadass PC., Stevenson et al. Pesticidal Plant Leaflet *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray. 2013. http://projects.nri.org/options/images/PESTICIDAL_PLANT_LEAFLETS_8_Tithonia_diversifolia.pdf. Diakses pada tanggal 15 Juli 2021.

Karalliedde J., and Viberti G. Proteinuria in Diabetes Bystander or Pathway to Cradiorenal Disease?. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, 21 (12): 2020-2027.

Ke J. T., Li M., Xu S. Q., Zhang W. J., Jiang Y. W., Cheng L., et al. Gliquidone Decrease Urinary Protein by Promoting Tubula Reabsorption in Diabetic Goto-Kakizaki Rats. *Journal of Endocrinology*, 2014, 220(2): 129-141.

Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/603/2020 tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa. 2020. Jakarta. Kementerian Kesehatan.

Kostovska I., Trajkovska K., Topuzovska S., Cekovska S., Spasovski G., Kostovski O., et al. Urinary Nephryn Is Earlier, More Sensitive And Specific Marker Of Diabetic Nephropathy Than Microalbuminuria. *J Med Biochem*, 2020, 39: 83–90.

Lee SY., and Choi M.E. Urinary Biomarkers for Early Diabetic Nephropathy: Beyond Albuminuria. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30 (7): 1063-1075.

Lewko B., and Stepinski J. Hyperglycemia and Mechanical Stress: Targeting the Renal Podocyte. *Journal Of Cellular Physiology*, 2009, 221(2):288-95.

Li LL., Qiang CZ., Hua WY., Hua ZJ., Wei YZ., Lin LL., et al. Relationship Between Urinary Nephryn and Urinary Albumin Changes in Diabetic Rats and Effects of Yiqiyangyinhuayutongluo Recipe. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 32 (2): 278-282.

Manikowski S.T. and Atta M.G. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/697010>.

Maric Christine. Vasoactive Hormones and the Diabetic Kidney. *The Scientific World Journal*, 2008, 8, 470–485.

Michaud J., and Kennedy C. The Podocyte In Health And Disease: Insights From The Mouse. *Clinical Science*, 2007, 112, 325–335.

Miura T., Nosaka K., Ishi H., and Ishida T. Antidiabetic Effect of Nitobegiku, the Herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay Diabetic Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28 (11): 2152-2154.

Muin R. Uji Efektivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*). *Journal of Pharmaceutical Science and Herbal Technology*, 2019, Vol.4 No.1.

Ng DPK, Tai BC, Tan E, Leong H, Nurbaya S, Lim XL, Chia KS, Wong CS, Lim WY, Holthofer H: Nephrynuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2011, 26:2508–2514.

Olayinka, B.U., Raiyemo, D.A., Obukohwo, E., 2015. Phytochemical And Proximate Composition Of *Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Ann. Food Sci Technol*. 16.

Olukunle JO., Okendiran BS., Sogebi EA., and Jacobs EB. Hypoglycaemic and Hypolipidaemic Effects of the Aqueous Leaf Extracts of *Tithonia diversifolia*. *Annual Research and Review in Biolog*, 4 : 2655-2662.

Otusanya, O., Ilori, O., 2012. Phytochemical Screening and the Phytotoxic Effects of Aqueous Extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *Int. J. Biol.* 4, 97–101. doi:10.5539/ijb. v4n3p97.

Pang X., Bai Q., Wu Fei, Chen G., Zhang A., and Tang C. Urotensin II Induces ER Stress and EMT and Increase Extracellular Matrix Production in Renal Tubular Epithelial Cell in Early Diabetic Mice. *Kidney Blood Presures Research*, 2016;41:434-449.

Parawansah, Nuralifah, dan Hasputra R. Uji Efek Antidiabetes Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia Difersivolia*) Pada Mencit Yang Diinduksi Streptozotosin. *Warta Farmasi*, 2016,5(1), 72 – 80.

Pardede SO. Podosit dan Slit Diafragma serta Perannya. *Sari Pediatri*, 2004, 6 (3): 119-124.

Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H: Nephriuria in Diabetic Nephropathy of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2003, 52:2969–2974.

Patrakka J., and Tryggvason K. Nephrin — a Unique Structural and Signaling Protein of the Kidney Filter. *TRENDS in Molecular Medicine*, 2007, 13 (9): 396-403.

Pourghasem M., Shafi H., and Babazadeh Z. Histological Changes Of Kidney In Diabetic Nephropathy. *Caspian J Intern Med*, 2015; 6(3):120-127.

Prahmanti K., dan Liandra D. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Paitan (*Titonia diversifolia*, H) terhadap Kadar Gula Darah Mencit (*Mus musculus*) Jantan. *Majalah Farmasetika*, 2019, 4 (Supl 1), 178 – 184.

Purnomo Y., Soeatmadji DW., Sumitro SB., and Widodo MA. The Comparison of Activity Dipeptidyl Peptidase Iv (Dpp-iv) Inhibitor Between Urena Lobata and *Tithonia Diversifolia* Leaf Extract. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2014, 106, S121. doi:10.1016/S0168-8227(14)70439-5.

Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI. 2020. *Infodatin Diabetes Melitus*. Kementrian Kesehatan, Jakarta.

Putri R.I. Faktor Determinan Nefropati Diabetik pada Penderita *Diabetes Mellitus* di RSUD dr. M. Soewandhie Surabaya. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 2015, 3 (1): 109-121.

Rinawati, Suharyanto dan Wijayanti N. Pengaruh Ekstrak Rebusan Daun *Tithonia Diversifolia (Hemsl.) A. Gray* Terhadap Kadar Glukosa Darah. *Jurnal Biotik*, 2019, Vol. 7, No. 1.

Rini S., Hadisaputro S., Lestraningsih., Nugroho H., dan Budjitno S. Faktor Risiko Penyakit Ginjal Kronik Diabetes (PGK-DM) pada Diabetes Mellitus Tipe-2. *Jurnal Epidemiologi Kesehatan Komunitas*, 2018, 3 (2): 101-108.

Rivandi J., dan Yonata A. Hubungan Diabetes Melitus dengan Kejadian Gagal Ginjal Kronik. *Jurnal Majority*, 2015, 4 (9): 27-34.

Rojas SJ., Winnifred A., and Morris OS. *Tithonia diversifolia* (Mexican Sunflower). Invasive Species Compendium, Wallingford, UK: CABI. DOI:10.1079/ISC.54020.20203483428.

Saputra NT, Suartha IN, Dharmayudha AA. 2018. Agen diabetagonik streptozotocin untuk membuat tikus putih jantan diabetes mellitus. Buletin Veteriner Udayana 10(2): 116-121.

Sasmita F.W., Susetyarini E., Husamah dan Pantiwati Y. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Alloxan. *Biosfera*, 2017, 34 (1): 22-31.

Satria H., Decroli E., dan Afriwardi. Faktor Risiko Pasien Nefropati Diabetik yang Dirawat di Bagian Penyakit Dalam RSUP dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2018, 7 (2): 149-153.

Schwartz S.S., Epstein S., Corkey B.E., Grant S.F., Gavin J.R., and Aguilar R.B. The Time is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationable and Implication of the β -Cell-Centric Classification Schema. *Diabetes Care*, 2016, 39 (2): 179-186.

Shahid M.A., Baig S., Zubairi A.M., and Ahmed F. Expression of Nephryn in Early Diagnosis of Diabetic Nephropathy. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*, 2017, 6 (2): 3-7.

Soelistijo S., Lindarto D., Decroli E., Permana H., Sucipto K., Kusnadi Y., et al. (2019) 'Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2019', PB PERKENI: Jakarta.

Soelistijo S., Novida H., Rudijanto A., Soewondo P., Suastika K., Manaf, A., dkk. (2015) 'Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia 2015', PB PERKENI: Jakarta.

Solfaine R., Muniroh L., dan Mubarakah W.W. Efek Ekstrak Daun *Tithonia diversifolia* terhadap Penurunan Konsentrasi Adiponektin pada Tikus Diabetik yang Diinduksi oleh Streptozotocin. *Jurnal Sain Veteriner*, 2019, 37 (2): 143-150.

Supranto, J. 2000 . *Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen*. Penerbit PT Rineka Cipta: Jakarta.

Tagne AM., Marino F., and Cosentino M. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a Medicinal Plant: A comprehensive Review of its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacotoxicology and Clinical Relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 28 (220): 94-116.

Thomas B. The Global Burden of Diabetic Kidney Disease: Time Trends and Gender Gaps. *Current Diabetes Reports*, 2019, 19 (18): 1-7.

Thomas M., Brownlee M., Susztak K., Sharma K., Dahm K., Zoungas S., et al. Diabetic Kidney Disease. *Nature Reviews*, 2015, 1: 1-19.

Thongsom, M., Chunglok, W., Kuanchuea, R., Tangpong, J., 2013. Antioxidant and hypoglycemic effects of *Tithonia diversifolia* aqueous leaves extract in alloxan-induced diabetic mice. *Adv. Environ. Biol.* 7, 2116–2125.

Tian H., Yang J., Xie Z., and Liu J. Gliquidone Alleviates Diabetic Nephropathy by Inhibiting Notch/Snail Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51: 2085-2097.

Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC: Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007, 106:c169–c179.

Wang JC, Zhao Y., Chen SJ., Long J., Jia QQ., Zhai JD., et al. AOPPs Induce MCP-1 Expression by Increasing ROS-Mediated Activation of the NF- κ B Pathway in Rat Mesangial Cells: Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013, 32: 1867-1877.

Williams M.E. Diabetic Nephropathy: The Proteinuria Hypothesis. *American Journal of Nephrology*, 2005, 25 (2): 77-94.

Wolf G., Chen S., and Ziyadeh F. Perspectives in Diabetes From the Periphery of the Glomerular Capillary Wall Toward the Center of Disease Podocyte Injury Comes of Age in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 2005, Vol. 54.

Yacoub R., and Campbell K.N. Inhibition of RAS In Diabetic Nephropathy. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 2015, (8) 29–40.

Yara A., Tunali T., Yarnadag R., Gursoy FO., Sacan OO., Emekli N., et al. The Effect of Glurenorm (Gliquidone) on Lenses and Skin in Experimental Diabetes. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31: 1038-1042.

Yarnadag R., Ozsoy SO., Orak H., and Ozygey Y. Protective Effects of Glurenorm (Gliquidone) Treatment on the Liver Injury of Experimental Diabetes. *Drug Chem Toxicol*, 2005, 28: 483-497.

Yazid F., Salim S., Rahamdika F., Rosmalena R., Artanti N., Sundowo A., dkk. Antidiabetic Effects of *Tithonia diversifolia* and *Malus domestica* Leaf Extracts in Alloxan-Induced Sprague Dawley Rats. *Sys Rev Pharm*, 2021;12(1):1630-1638.

Zhang J., Liu J., and Qin X. Advances in Early Biomarkers of Diabetic Nephropathy. *Rev Assoc Med Bras*, 2018, 64 (1): 85-92.

Zheng Y., Ley S.H., and Hu F.B. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 14 (2): 88-98.

Zhu L.X., and Cijiang HE.J. An Update : The Role of Nephrin Inside and Outside The Kidney. *Scienc China Life Sciences*, 2015, 58 (7): 649-657.

Ziyadeh F.N., and Wolf G. Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews*, 2008, 4 (1): 39-45.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Layanan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA
 FAKULTAS KEDOKTERAN
 Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
 http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 ("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 126 / EC / KEPK / 06 / 2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap Penurunan Nefropati Diabetik pada Tikus Model Diabetes Melitus
- PENELITI UTAMA** : Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed., Apt.
- ANGGOTA** : Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm, Apt.
 Firda Khoirunnisa
 Lailita Fahrin Nisa
 Mutia Khairunnisa Sya'bani
 Nabila Rifdati Fawwazia
 Weliyatul Auli Sasmita
- UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Percobaan Hewan Coba dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
 NIPK. 20180246051611001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2. Perhitungan Buffer Pelarut Streptozotisin

- Dosis STZ yang digunakan yaitu 40 mg/kgBB dilarutkan dalam buffer sitrat 50 mM (pH 4,5) dengan volume 1 ml/kgBB
- Pelarut buffer sitrat 50 mM (pH 4,5), dibuat dengan cara:
 - Larutan Asam Sitrat = 21,01 gram dalam 1 Liter WFI (Larutan A)
 - Larutan Natrium Sitrat = 29,41 gram dalam 1 Liter WFI (Larutan B)
 - Buffer Sitrat = 28 ml Larutan A + 22 ml Larutan B di ad 100 ml hingga pH 4,5
- STZ yang dibutuhkan apabila bobot tikus 200 gram:
 - Kebutuhan STZ =
$$\frac{40 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \times 5 \text{ kelompok} \times 6 \text{ tikus}$$

$$= 240 \text{ mg}$$
- Buffer sitrat yang dibutuhkan apabila bobot tikus 200 gram:
 - Kebutuhan buffer sitrat =
$$\frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \times 5 \text{ kelompok} \times 6 \text{ tikus}$$

$$= 6 \text{ ml}$$

→ 1 tikus diinduksi dengan 40 mg STZ dalam 0,2 ml buffer sitrat.
- Sehingga buffer sitrat yang dibuat yaitu 50 ml dengan cara:
 - Larutan Asam Sitrat = 0,52525 gram dalam 25 ml WFI (Larutan A)

$$\frac{21,01 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{25 \text{ mL}}$$

$$= 0,52525 \text{ gram}$$
 - Larutan Natrium Sitrat = 0,73525 gram dalam 25 ml WFI (Larutan B)

$$\frac{29,41 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{25 \text{ mL}}$$

$$= 0,73525 \text{ gram}$$
 - Buffer Sitrat = 14 ml Larutan A + 11 ml Larutan B di ad 50 ml hingga pH 4,5

Catatan:

- 1 tikus diinduksi dengan 40 mg STZ dalam 0,2 ml buffer sitrat
- Apabila 1 spuit 1 ml digunakan untuk 5 tikus → dibutuhkan ± 6 spuit untuk injeksi STZ

Lampiran 3. Preparasi Ekstrak Daun Insulin dan Glikuidon

- Dosis ekstrak misalkan untuk bobot 200 gram:
 - P1 : 50 mg/kg BB → 10mg/200 gram BB
 - P2 : 100 mg/kg BB → 20 mg/200 gram BB
 - P3 : 150 mg/kg BB → 30 mg/200 gram BB
- Total ekstrak yang dibutuhkan:
 - P1 : 10 mg / 200 gram BB X 6 tikus X 28 hari = 1,680 mg
 - P2 : 20 mg / 200 gram BB X 6 tikus X 28 hari = 3,360 mg
 - P3 : 30 mg / 200 gram BB X 6 tikus X 28 hari = 5,040 mg +

TOTAL = 10,080 mg = 10,08 gram

- Kebutuhan glikuidon apabila bobot 200 gram
 - = 0,01 mg/kgBB X 200 gramBB
 - = 2 mg/200gramBB
- Total kebutuhan glikuidon = 2 mg X 6 tikus X 42 hari = 504 mg
- Kebutuhan glikuidon per hari = 2 mg X 6 tikus = 12 mg
- Volume pelarut : 5ml/kgBB → 1 ml/200gramBB
- Total kebutuhan pelarut per hari = 1 ml X 5 kelompok X 6 tikus = 30 ml/hari

Yang dibagi menjadi:

- P1 : 60 mg ekstrak/6ml larutan CMC-Na
- P2 : 120 mg ekstrak/6ml larutan CMC-Na
- P3 : 180 mg ekstrak/6ml larutan CMC-Na
- P4 : 12 mg glikuidon/6 ml larutan CMC-Na
- Larutan CMC-Na yang dibutuhkan per hari: 24 ml ≈ 50 ml, yang dibuat dengan cara:
 - Larutan CMC-Na 1% = 0,5 gram/50ml

Catatan:

- 1 tikus diberikan pelarut sebanyak 1 ml/200 gram BB
- Total kebutuhan pelarut per hari : 30 ml

Lampiran 4. Surat Determinasi Tanaman *T. diversifolia*



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/338A/102.7/2020
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Paitan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : OKTAVIA RAHAYU ADIANINGSIH, S.Farm., M.Biomed., Apt.
NIK : 2016099210192001
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman paitan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas : Asterales
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae
Genus : *Tithonia*
Spesies : *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray

Nama umum : Daun insulin, paitan, rondoemoyo, kembang bulan, kayu paik, kipait, harsaga.
Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121a-122a.

2. Morfologi : Habitus: semak, dengan tinggi mencapai 2-3 m. Batang: berkayu. Daun: bulat telur menjari, bergerigi, kasar, panjang 10 sampai 40 cm, agak berkelenjar, dan bagian bawah keabu-abuan. Bunga: majemuk, berwarna kuning, lebar 5-15 cm dan panjang ± 10cm, memiliki bunga bentuk pita dan tabung. Biji: benih achenes, kecil, kering, atau pecah dengan dinding tipis, 4-siku, dan panjang ± 5mm.

3. Bagian yang digunakan : Daun.
4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 30 April 2020

Kepala UPT Laboratorium Herbal
Materia Medica Batu,



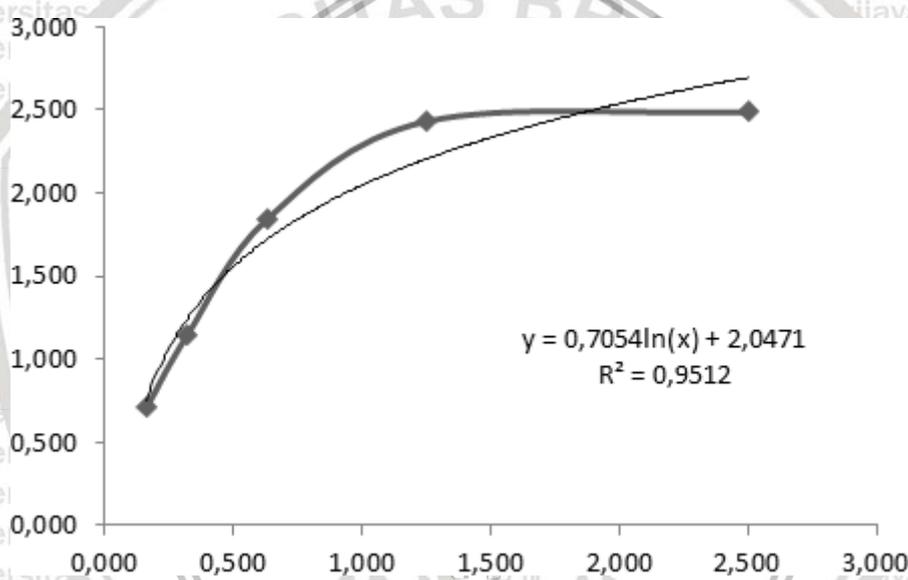
CHMAD M. BRUR, SKM, M.Kes.
NPS 1992011004

Lampiran 5 *Optical Density* dan Konsentrasi Nefrin Urin (ng/ml)

No	KEL	OD	KODE	konsentra sinefrin urin (ng/ml)	Rerata konsentra si (ng/ml)	SD	SEM
1	KN1	0,412	1	984,7273052	965,31355	26,81574 1	13,40787
2	KN2	0,384	1	946,405349			
3	KN3	0,417	1	991,7320225			
4	KN6	0,378	1	938,3895415			
5	KP2	0,480	2	1084,380312	1930,3623	846,6048 7	423,30243
6	KP4	0,763	2	1619,632864			
7	KP	1,218	2	3087,073627			
8	KPi	0,887		1930,362267			
9	P11 t	0,335	3	882,8954856	927,93461	32,15005 6	16,075028
10	P12	0,383	3	945,0646418			
11	P1	0,391	3	955,843706			
12	P1i	0,370		927,9346111			
13	P21 t	0,365	4	921,2540984	932,23587	7,934127 6	3,9670638
14	P2	0,379	4	939,7207791			
15	P2	0,376	4	935,7327212			
16	P2i	0,373		932,2358663			
17	P32	0,219	5	749,016585	872,06619	153,7565 5	76,878276
18	P34	0,238	5	769,4655619			
19	P35 t	0,337	5	885,4022854			
20	P3	0,480	5	1084,380312			
21	P41	0,303	6	843,7384038	930,97694	73,52068 5	36,760343
22	P44	0,388	6	951,7872245			
23	P45 t	0,356	6	909,574742			
24	P46	0,436	6	1018,807398			

Lampiran 6 OD Larutan Standar Nefrin Urin dan Persamaan Regresinya

No	Konsentrasi (ng/ml)	OD1	OD2	OD rata-rata
1	10,000	2,483	2,507	2,495
2	5,000	2,550	2,563	2,557
3	2,500	2,480	2,495	2,488
4	1,250	2,439	2,424	2,432
5	0,630	1,850	1,835	1,843
6	0,320	1,183	1,111	1,147
7	0,160	0,732	0,685	0,709



Lampiran 7 Uji Statistik Konsentrasi Nefrin Urin

7.1 Uji Normalitas Data Konsentrasi Nefrin Urin

Tests of Normality							
	kode	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi (ng/ml)	KN	.265	4	.	.858	4	.255
	KP	.250	4	.	.948	4	.706
	P1	.250	4	.	.905	4	.458
	P2	.250	4	.	.933	4	.611
	P3	.248	4	.	.880	4	.337
	P4	.139	4	.	1.000	4	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

7.2 Uji Homogenitas Data Konsentrasi Nefrin Urin

Test of Homogeneity of Variances						
konsentrasi (ng/ml)		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
		Based on Mean	4.220	5	18	.010
Based on Median		3.750	5	18	.017	
Based on Median and with adjusted df		3.750	5	3.225	.142	
Based on trimmed mean		4.213	5	18	.010	

7.3 Uji Non-parametrik *Kruskal-Wallis* Data Konsentrasi Nefrin Urin

Test Statistics ^{a,b}	
	konsentrasi (ng/ml)
Kruskal-Wallis H	11.988
df	5
Asymp. Sig.	.035
a. Kruskal Wallis Test	
b. Grouping Variable: kode	

7.4 Output SPSS Uji Mann-Whitney Konsentrasi Nefrin Urin

- **KN-KP**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

- **KP-P1**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

- **KP-P2**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **KP-P3**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	10.500
Z	-2.178
Asymp. Sig. (2-tailed)	.029
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **KP-P4**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **P1-KP**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] .029^b

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **P1-P2**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 ^b

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **P1-P3**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^b

- a. Grouping Variable: kode
- b. Not corrected for ties.

• **P1-P4**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000

Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P2-KP**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P2-P1**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P2-P3**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000

Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P2-P4**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P3-KP**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	10.500
Z	-2.178
Asymp. Sig. (2-tailed)	.029
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P3-P1**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	5.000

Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^b

a. Grouping Variable: kode
 b. Not corrected for ties.

• **P3-P2**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 ^b

a. Grouping Variable: kode
 b. Not corrected for ties.

• **P3-P4**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^b

a. Grouping Variable: kode
 b. Not corrected for ties.

• **P4-KP**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^b

a. Grouping Variable: kode
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P4-P1**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P4-P2**

Test Statistics^a

	konsentrasi (ng/ml)
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: kode

b. Not corrected for ties.

• **P4-P3**

Test Statistics^a

konsentrasi
(ng/ml)

Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^b

a. Grouping Variable: kode
b. Not corrected for ties.

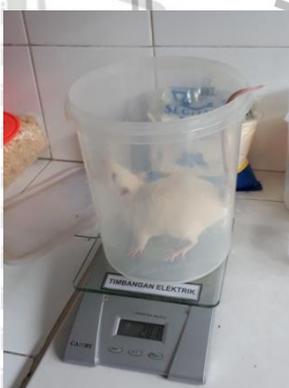


Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian

8.1 Ekstrak Daun *T. diversifolia*



8.2 Penimbangan Tikus Wistar



8.3 Masa Aklimatisasi Tikus



8.4 Injeksi STZ pada Tikus



8.5 Pembuatan Pakan Tikus



8.6 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus



8.7 Sentrifugasi Sampel Urin



8.8 Proses Pembedahan Tikus



8.9 Output Optical Density ELISA Nefrin Urin

	1	2	3	4	5	6
A			0.412	0.317	0.744	0.400
B	2.483	2.507	0.384	1.218	0.689	0.303
C	2.550	2.563	0.417	0.395	0.378	0.510
D	2.480	2.495	0.525	0.383	0.376	0.388
E	2.499	2.424	0.378	0.522	0.219	0.254
F	1.850	1.825	0.409	0.525	0.238	0.404
G	1.183	1.111	0.480	0.391	0.337	
H	0.732	0.685	0.763	0.365	0.576	

8.10 Pengumpulan Sampel Urin pada Kandang Metabolik

