

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Karakteristik Subjek Penelitian

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

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

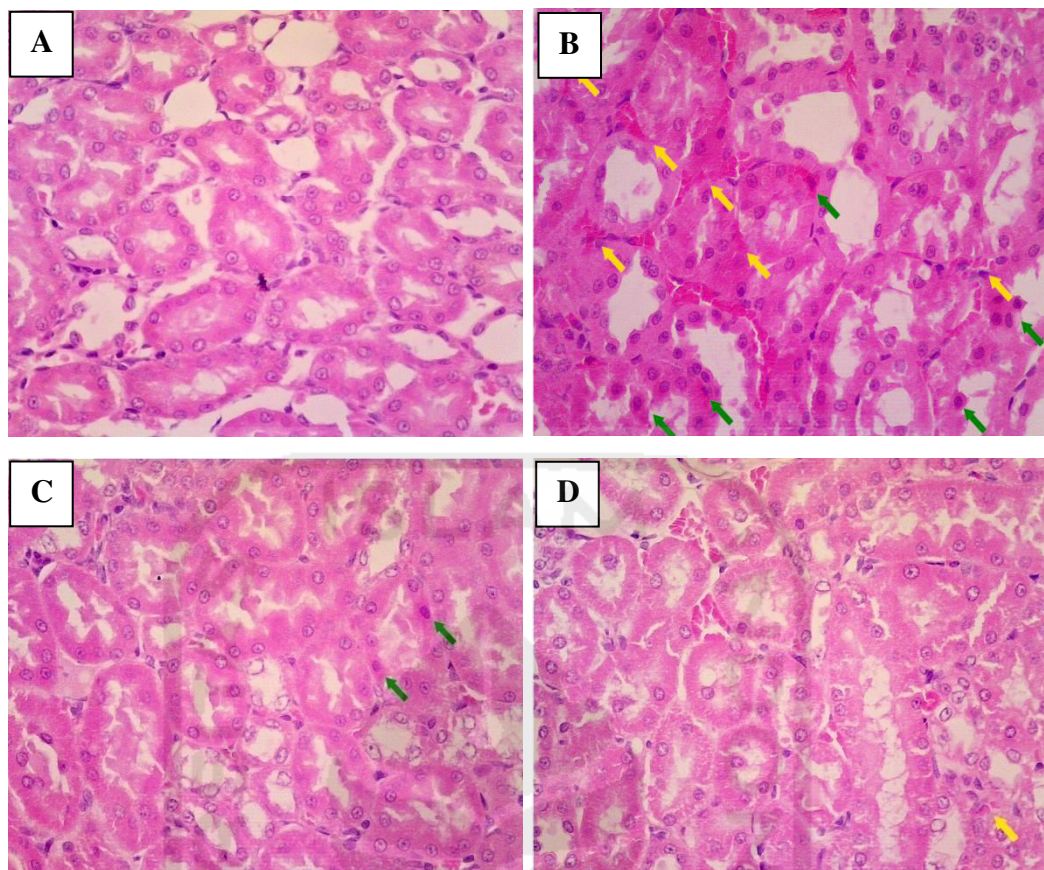
dan ≤ 126 mg/dL bagi kelompok sehat setelah 72 jam pascainjeksi NAD dan STZ atau plasebo. Kriteria inklusi dan eksklusi serta pengacakan dengan rancangan acak lengkap dilakukan pada subjek penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015). Pengukuran berat badan tikus putih *Rattus norvegicus* (Sprague Dawley)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

Tabel 2. Hasil Data Pengukuran Karakteristik Subjek Penelitian.

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

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

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



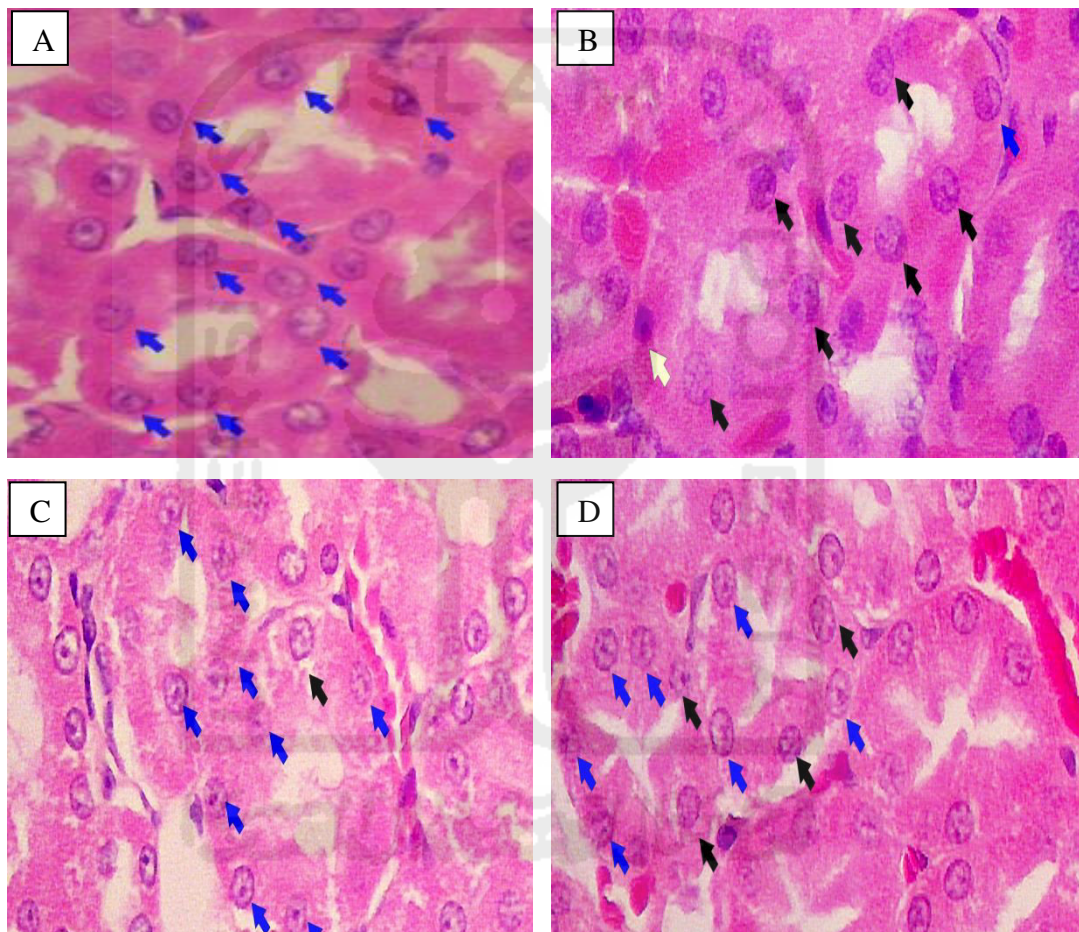
Gambar 5. Gambaran Mikroskopis Umum Korteks Ginjal Subjek Penelitian.

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

4.1.2. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis

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

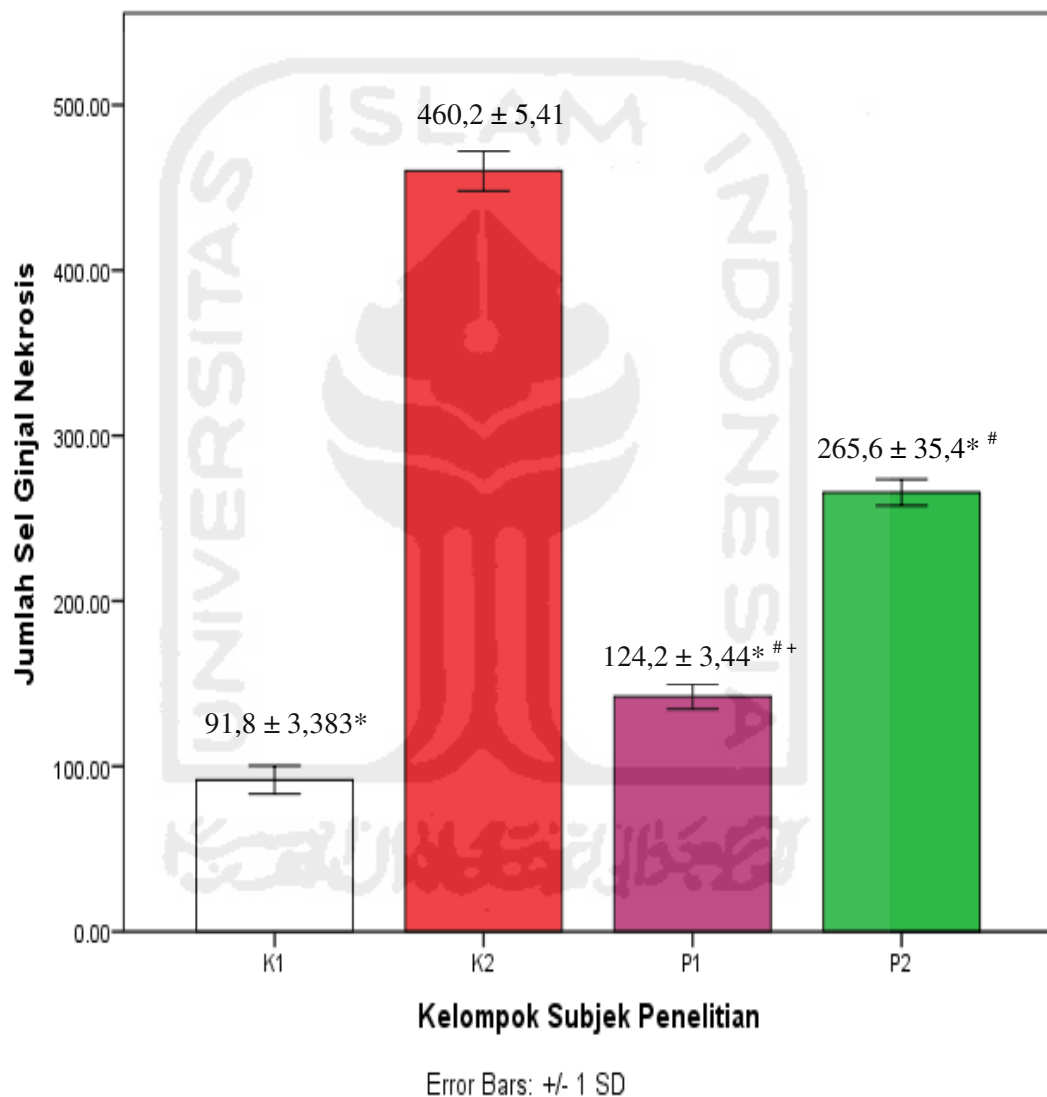
Sel tubulus ginjal yang diamati adalah sel yang masih memiliki gambaran batas inti sel yang utuh dan jelas dari tubulus yang bulat. Pengamatan dilakukan secara *single blinding* dengan 1 interobserver. Perbandingan hasil pengamatan peneliti dengan interobserver menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara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



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

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

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



Gambar 7. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis antar Kelompok.

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

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

4.2. Pembahasan

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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