

**Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada
Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2**

*Effect of Carica pubescens Fruit Juice on VEGF Expression in
Type 2 Diabetes Mellitus Wistar Rats Kidney*



Tesis

**“Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2 dan
memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Biomedik”**

**Oktadio Erikardo
22010119410011**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2021**

TESIS

Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2

Diajukan oleh

Oktadio Erikardo, S.Si
22010119410011

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada 14 September 2021
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

dr. Muflihatul Muniroh, M.Si. Med, PhD
NIP. 198302182009122004

Pembimbing II

Dr. dr. Nyoman Suci W., M. Kes, Sp. PK(K)
NIP. 197010231997022001

Penguji Ketua

dr. Nani Maharani, M.Si. Med, PhD
NIP. 198111122008122003

Penguji Anggota

dr. Vega Karlowee, Sp. PA, M.Si. Med, PhD
NIP. 198001302008122002

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko Sp.B(K).Onk.M.Kes
NIP. 197501242008011006

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan sebelumnya untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarisme sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 13 Oktober 2021



Oktadio Erikardo
22010119410011

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Identitas

Nama : Oktadio Erikardo, A.Md.A.K., S.Si.
NIM : 22010119410011
Tempat/ Tanggal lahir : Mataram, 30 Juni 1995
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-Laki
Status : Belum menikah
Alamat : Jl. Bangil I/9 BTN Taman Baru, Mataram,
Provinsi Nusa Tenggara Barat

Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri 02 Cakranegara : 2001-2008
2. SMP Negeri 02 Mataram : 2008-2011
3. SMA Negeri 02 Mataram : 2011-2014
4. D3 Analis Kesehatan-Poltekkes Kemenkes Mataram : 2014-2017
5. S1 Biologi-Universitas Nasional : 2017-2019

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga Tesis yang berjudul “Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2” ini dapat terselesaikan. Dalam penyusunan Tesis ini peneliti mendapat dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes., Sp.S(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
2. Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko Sp.B(K).Onk, M.Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
3. dr. Muflihatul Muniroh, M.Si.Med, PhD selaku Pembimbing I yang berkontribusi sangat besar dalam memberi rekomendasi judul, masukan dan saran selama penulisan Tesis ini
4. Dr. dr. Nyoman Suci W., M.Kes, Sp.PK (K) selaku Pembimbing II yang juga turut berkontribusi dalam memberi masukan dan saran selama penulisan Tesis ini
5. dr. Nani Maharani, M.Si. Med., PhD selaku Penguji Ketua
6. dr. Vega Karlowee, Sp.PA, PhD selaku Penguji Anggota
7. Staf administrasi dan karyawan Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro yang selalu membantu dalam hal perizinan, persuratan dan lainnya
8. Kedua orang tua saya, Ibu Marnisah dan (Alm) Bapak Erikardo, Kakak saya Monthana Erikardo yang telah memberikan dukungan dan do’a serta motivasi selama masa pendidikan hingga dapat menyelesaikan tesis ini
9. Euis Purbasari selaku partner selama penelitian dan penyusunan tesis yang telah memberikan masukan, saran dan motivasi
10. Teman-teman mahasiswa Magister Ilmu Biomedik angkatan 2019 yang selalu memberikan dukungan dan motivasi belajar, serta pihak lainnya yang

turut membantu dalam melaksanakan penelitian dan penulisan tesis yang tidak dapat disebutkan satu-persatu

Peneliti menyadari bahwa dalam penyusunan tesis masih jauh dari kata sempurna. Kritik dan saran dari berbagai pihak diharapkan dapat membantu perbaikan penelitian selanjutnya. Peneliti berharap hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak. Aamiin

Semarang, 12 Juli 2021



Oktadio Erikardo

22010119410011

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN KEASLIAN PENELITIAN	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.5 Orisinalitas Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1 Diabetes Melitus (DM)	12
2.1.1 Glukosa Darah dan Diagnosis DM tipe 2.....	13
2.1.2 Mekanisme Komplikasi DM	14
2.1.3 Komplikasi Ginjal Akibat DM.....	19
2.2 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	20
2.2.1 Dampak peningkatan ekspresi VEGF pada ginjal DM	20
2.2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi VEGF	23
2.2.3 Mediator Penghambat Ekspresi VEGF	26

2.2.4 Metode Pemeriksaan Ekspresi VEGF	27
2.3 <i>Carica pubescens</i> (CP).....	28
2.3.1 Taksonomi dan Karakteristik Morfologi Buah CP.....	29
2.3.2 Potensi CP Menurunkan VEGF Pada DM	30
2.3.3 Faktor yang Mempengaruhi Kandungan CP	31
2.4 Kerangka Teori.....	33
2.5 Kerangka Konsep	34
2.6 Hipotesis.....	35
BAB III METODE PENELITIAN.....	36
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	36
3.2 Rancangan Penelitian	36
3.2.1 Bahan dan Alat Penelitian	37
3.2.2 Perlakuan Hewan Coba	37
3.2.3 Pembuatan Jus Buah CP	39
3.2.4 Penentuan Kandungan Rutin di Dalam Jus Buah CP.....	39
3.2.5 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Metode GOD-PAP	40
3.2.5 Terminasi dan Pengambilan Organ Ginjal Hewan Coba	41
3.2.6 Pewarnaan Imunohistokimia VEGF-a Ginjal.....	41
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	45
3.3.1 Populasi	45
3.3.2 Sampel dan Besar Sampel	45
3.3.3 Kriteria Sampel.....	46
3.4 Variabel Penelitian	46
3.5 Definisi Operasional.....	47
3.6 Pengolahan dan Analisis Data.....	48
3.7 Alur Penelitian	49
3.8 Etika Penelitian	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1 Gambaran Umum Penelitian	51
4.2 Ekspresi VEGF	52
4.3 Hubungan Ekspresi VEGF dengan Kadar GDP dan TNF- α	60

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	66
5.1 Kesimpulan	66
5.2 Saran.....	67
BAB VI RINGKASAN.....	68
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	87

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Orisinalitas penelitian	8
Tabel 2. Hasil Uji Statistik <i>Kruskal-Wallis</i> dan <i>Mann-Whitney</i>	57
Tabel 3. Hasil Uji Korelasi <i>Kendall-Tau</i>	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme AGEs Merusak Sel	16
Gambar 2. Dampak dari Aktivitas PKC	17
Gambar 3. Aktivasi NF- κ B.....	25
Gambar 4. Buah <i>Carica pubescens</i>	29
Gambar 5. Kerangka Teori.....	33
Gambar 6. Kerangka Konsep	34
Gambar 7. Skema Rancangan Penelitian	44
Gambar 8. Alur Penelitian.....	49
Gambar 9. Hasil Pewarnaan Ekspresi VEGF pada Tiap Kelompok.....	53
Gambar 10. Rerata Skor Ekspresi VEGF.....	55
Gambar 11. Grafik Rerata Ekspresi VEGF Ginjal, Kadar GDP, dan TNF- α	62

DAFTAR SINGKATAN

DM	: Diabetes Melitus
ACE	: <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AGEs	: <i>Advanced Glycation End Products</i>
Ang II	: Angiotensin II
AP-1	: Aktivator Protein-1
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
CP	: <i>Carica pubescens</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAG	: <i>Diacyl Glycerol</i>
DN	: Diabetes Nefropati
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GDP	: Glukosa Darah Puasa
GF	: <i>Growth Factor</i>
GFAT	: <i>Glutaminefructose-6-Phosphateamidotransferase</i>
GFR	: <i>Glomerular Filtration Rate</i>
GOD-PAP	: <i>Glucose Oxidase-Peroxidase Aminoantypirin</i>
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HIF	: <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
IHK	: Imunohistokimia
IL	: Interleukin
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NA	: <i>Nicotinamide</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor-κB</i>

NO	: Nitrit Oksida
PAI-1	: <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PEGF	: <i>Permeability Enhancing Growth Factor</i>
PKC	: Protein Kinase C
pO ₂	: <i>Partial Pressure of Oxygen</i>
RAGE	: <i>Receptor Advanced Glycation End Products</i>
RAS	: <i>Renin Angiotensin System</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SDF-1	: <i>Stromal-Derived Factor-1</i>
STZ	: <i>Streptozotosin</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
UDP	: <i>Uridine Diphosphate</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

ABSTRAK

Latar belakang: Kerusakan sel endotel akibat proses inflamasi atau stres oksidatif pada diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2) dapat memicu peningkatan ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Ekspresi VEGF berlebih dapat memicu angiogenesis yang abnormal. Buah *Carica pubescens* (CP) mengandung senyawa flavonoid seperti rutin dan kuersetin yang diketahui dapat menurunkan ekspresi VEGF serta dapat bertindak sebagai anti-hiperglikemia, anti-inflamasi, dan antioksidan sehingga berpotensi dalam menurunkan ekspresi VEGF pada kondisi DM tipe 2.

Tujuan: Menganalisis pengaruh jus buah CP terhadap ekspresi VEGF di ginjal serta hubungannya dengan kadar glukosa darah puasa (GDP) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) pada tikus yang diinduksi HFD-STZ, dengan rutin murni sebagai pembanding.

Metode: Desain penelitian ini adalah *randomized post-test only control group design*. Pemeriksaan ekspresi VEGF dengan metode imunohistokimia dilakukan pada 25 blok parafin organ ginjal tikus wistar jantan yang terbagi dalam 5 kelompok, yaitu: K- = tikus sehat; K+ = tikus DM tipe 2; X1 dan X2 = tikus DM tipe 2 yang diberikan jus buah CP dengan dosis 4 mL/200 g BB/hari dan 8 mL/200 g BB/hari; X3 = tikus DM tipe 2 yang diberikan rutin murni 10 mg/200 g BB/hari. Perlakuan diberikan melalui sonde lambung selama 30 hari.

Hasil: Ekspresi VEGF menurun secara signifikan pada kelompok perlakuan X1 dan X2 dibandingkan dengan kelompok K+ ($p < 0,05$) sedangkan, pada kelompok X3 tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K+. Antara kelompok X1 dan X2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi VEGF. Hubungan antara ekspresi VEGF dan kadar GDP menunjukkan hasil yang tidak signifikan, sedangkan antara ekspresi VEGF dan TNF- α menunjukkan hasil yang signifikan dengan arah hubungan yang positif.

Kesimpulan: Jus buah CP dapat menurunkan ekspresi VEGF di ginjal tikus wistar DM tipe 2. Penurunan ekspresi VEGF di ginjal tidak berhubungan dengan penurunan kadar GDP, tetapi berhubungan terhadap penurunan kadar TNF- α pada pemberian jus buah CP.

Kata kunci: *Carica pubescens*, DM tipe 2, GDP, TNF- α , VEGF

ABSTRACT

Background: Endothelial cell damage due to inflammation or oxidative stress in type 2 diabetes mellitus (type 2 DM) can lead to increased expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). VEGF overexpression can lead to abnormal angiogenesis. *Carica pubescens* (CP) fruit contains flavonoid compounds such as rutin and quercetin which are known to reduce VEGF expression and can act as anti-hyperglycemic, anti-inflammatory, and antioxidant so that it is possible to reduce VEGF expression in type 2 DM conditions.

Objective: Analyzing the effect of CP fruit juice on VEGF expression in the kidney and its relationship with fasting blood glucose (FBG) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels in HFD-STZ-induced rat, with pure rutin as a control.

Methods: The design of this study was a randomized post-test only control group design. VEGF expression was examined using immunohistochemical on 25 paraffin blocks of kidney organs from male wistar rats which were divided into 5 groups: (K-) healthy rats; (K+) type 2 DM rats; (X1) type 2 DM rats given CP fruit juice at a dose of 4 mL/200 g BW/day and (X2) 8 mL/200 g BW/day; (X3) type 2 DM rats given pure rutin 10 mg/200 g BW/day. The treatment was given through a gastric probe for 30 days.

Results: VEGF expression decreased significantly in the X1 and X2 treatment groups compared to the K+ group ($p < 0.05$). There was no significant difference in VEGF expression between groups X1 and X2. VEGF expression and FBG levels showed insignificant results, while VEGF and TNF- α expression showed significant results with a positive relationship.

Conclusions: CP fruit juice can reduce VEGF expression in the kidneys of type 2 DM Wistar rats. The decrease in VEGF expression in the kidneys correlated with a decrease in TNF- α levels in type 2 DM Wistar rats. This indicates that CP fruit juice can be useful in preventing kidney damage due to complications of DM.

Kata kunci: *Carica pubescens*, FBG, TNF- α , Type 2 DM, VEGF

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penderita diabetes mellitus (DM) memiliki risiko komplikasi yang lebih tinggi apabila tidak melakukan kontrol diabetes yang baik. Kadar glukosa darah yang tinggi (hiperglikemi) dan berlangsung lama adalah penyebab terjadinya kerusakan jaringan, hal tersebut terjadi karena glukosa mampu mempengaruhi fungsi dan struktur dari jaringan tubuh serta protein dalam sel. Terdapat 4 mekanisme utama yang menyebabkan kerusakan jaringan pada kondisi hiperglikemi, yaitu melalui peningkatan produksi *Advanced Glycation End Products* (AGEs), peningkatan jalur poliol, aktivasi protein kinase C (PKC) dan peningkatan jalur heksosamin.¹ Perubahan sistemik yang terjadi pada kondisi hiperglikemi tersebut dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan inflamasi yang mengakibatkan terjadinya hipoksia sel dan kerusakan jaringan.²

Diabetes Nefropati (DN) merupakan salah satu komplikasi yang sering terjadi pada penderita diabetes tipe 2 (30-40%).¹ Penyakit ini terjadi akibat disfungsi endotel dan respon angiogenik yang tidak seimbang.³ Pada kondisi ini, terjadi perubahan yang diawali dengan pembesaran ukuran ginjal, hiperfiltrasi glomerulus dan peningkatan matriks ekstraseluler.⁴ Beberapa hormon pertumbuhan sangat berperan terhadap patogenesis diabetik nefropati, seperti

insulin, *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF-B) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).⁵

Eksresi hormon pertumbuhan seperti VEGF telah diidentifikasi meningkat di sel tubulus proksimal pada kondisi hiperglikemi kronik (model DM tipe 2). Selain dapat mempengaruhi struktur tubulus, peningkatan ekspresi VEGF di tubulus juga diketahui dapat mengakibatkan terjadinya perubahan struktural di interstitium peritubular (fibrosis) dan glomerulus (degenerasi nefron dan fibrosis).^{6,7} Tubulus proksimal memiliki peran penting pada fase awal perkembangan DN, dimana proses patologis yang terjadi mampu mengakibatkan kerusakan glomerulus. Hal ini karena, tubulus proksimal merupakan penyumbang sebagian besar massa kortikal dan pertumbuhan ginjal pada diabetes. Saat tubulus tumbuh, filtrat glomerulus yang direabsorpsi akan semakin banyak dan akan lebih sedikit yang mencapai makula densa di ujung lengkung henle. Kondisi ini menyebabkan terjadinya peningkatan laju filtrasi glomerulus dari sistem umpan balik tubuloglomerulus. Sebagai konsekuensi dari hiperfiltrasi dan lingkungan diabetes, perubahan yang terjadi akan meningkatkan jumlah protein, faktor pertumbuhan dan AGEs dari filter glomeruli. Kondisi ini akan memicu terjadinya oksidatif stress dan inflamasi interstisial kortikal pada ginjal yang selanjutnya dapat menyebabkan terjadinya hipoksia dan fibrosis tubulointerstisial yang sangat menentukan progresivitas penyakit ginjal.^{7,8}

VEGF merupakan sinyal protein yang berperan untuk menginduksi terjadinya vaskulogenesis dan angiogenesis.^{9,10,11} Peningkatan ekspresi VEGF

menjadi penanda ketika terjadi kerusakan sel endotel akibat proses inflamasi atau stres oksidatif, sebagai respon untuk membentuk pembuluh darah baru.^{12,13} Produksi VEGF yang tepat bermanfaat untuk memelihara struktur dan fungsi ginjal. Tetapi, kelebihan dari ekspresi VEGF justru memicu angiogenesis yang abnormal.¹⁴ Beberapa mediator mengakibatkan terjadinya peningkatan ekspresi VEGF pada ginjal di fase awal diabetik nefropati, seperti hiperglikemia yang menyebabkan hipoksia, angiotensin, *reactive oxygen species* (ROS) dan AGEs.^{15,16}

Studi meta analisis menunjukkan bahwa hiperglikemia yang timbul akibat diabetes atau gangguan toleransi glukosa (pra-diabetes) menunjukkan hubungan yang kuat dengan peningkatan ekspresi VEGF.¹⁷ Kondisi hiperglikemi mampu merangsang produksi VEGF di podosit dan tubulus ginjal melalui aktivasi PKC, ROS dan jalur *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dengan mengatur Angiotensin II pada sel tubulus proksimal. Tingkat VEGF mRNA juga diatur oleh AGEs melalui faktor transkripsi seperti *nuclear factor-kappa β* (NF-κβ) dan aktivator protein-1 (AP-1). Selain itu, *transforming growth factor-B1* (TGF-B 1) yang diekspresikan dalam sel endotel glomerulus diabetes dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang diekspresikan melalui faktor transkripsi NF-κβ juga mampu meningkatkan ekspresi protein VEGF.^{16,18,19} TNF-α merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan penting pada proses inflamasi vaskuler dan aterosklerosis.²⁰ Peningkatan stres oksidatif seperti ROS dan RNS yang berasal

dari Angiotensin II, oksidasi glukosa dan AGEs pada penderita DM juga dapat meningkatkan VEGF dengan menstabilkan *Hypoxia-Inducible Factor -1a*.¹

Eksresi berlebihan dari VEGF akan mengubah sinyal-sinyal intra dan interseluler yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel-sel yang mengekspresikan VEGFR seperti podosit, sel endotel tubulus dan sel-sel mesangial²¹ yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi ginjal, seperti hipertropi glomerulus, glomerulosklerosis, proteinuria, pembesaran mesangial, sklerosis mesangial dan sel endotel.^{10,22,3} Hipoksia merupakan penyebab utama terjadinya sekresi VEGF. Tikus yang mengalami DM akibat induksi *streptozotosin* (STZ) akan menurunkan pO₂ pada medula ginjal, sehingga mengakibatkan hipoksia yang diinduksi oleh *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF), dimana faktor ini mengatur transkripsi VEGF mRNA.²³

Carica pubescens (CP) adalah tanaman khas yang tumbuh pada dataran tinggi dan kaya dengan kandungan vitamin C yang bermanfaat sebagai antioksidan. Di Indonesia tanaman ini dapat ditemukan di daerah dataran tinggi Dieng.²⁴ Pada buah CP terkandung senyawa flavonoid yang dapat bertindak sebagai antioksidan, seperti kuersetin.²⁵ Selain itu, di dalam buah CP juga mengandung senyawa rutin yang merupakan salah satu golongan flavonoid yang diketahui memiliki efek sebagai anti-inflamasi dan anti-hiperglikemi.²⁶⁻²⁹ Pemberian senyawa flavonoid seperti kuersetin dan rutin diketahui mampu menghambat proliferasi sel dan ekspresi VEGF pada kultur sel.^{30,31} Senyawa rutin

dengan dosis 50 mg/kg BB atau 10 mg/200 g BB juga terbukti mampu mengontrol kadar glukosa darah dan metabolisme lipid.³²

Studi secara biokimia menunjukkan bahwa ekstrak buah CP memiliki aktivitas sebagai anti-hiperglikemia dan anti-hipertensi³³. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya juga membuktikan bahwa pemberian jus buah CP dengan dosis 4 mL/200 g BB dan 8 mL/200 g BB menunjukkan kadar glukosa darah puasa (GDP) dan TNF- α yang lebih rendah dibandingkan dengan hewan coba tikus DM tanpa pemberian jus buah CP.²⁸ Meskipun memiliki khasiat dalam mengontrol kadar glukosa darah dan inflamasi pada kondisi DM, akan tetapi perannya secara spesifik pada organ yang terpengaruh oleh DM, seperti dalam mencegah komplikasi pada organ ginjal belum pernah diteliti.

Komplikasi yang dapat terjadi pada DM berdampak sangat signifikan terhadap mortalitas, morbiditas dan kualitas hidup. Peningkatan stres oksidatif dan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α pada kondisi DM dapat meningkatkan ekspresi VEGF di tubulus ginjal secara berlebihan dan berperan pada perkembangan DN.^{14,34} Buah CP mengandung senyawa yang bersifat antioksidan, anti-hiperglikemi dan anti-inflamasi memiliki potensi untuk mengatasi kondisi tersebut, sehingga perlu untuk dilakukan penelitian “Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi VEGF pada Ginjal Tikus Wistar DM Tipe 2”. Hasil pemeriksaan ekspresi VEGF di ginjal pada penelitian ini juga akan dihubungkan dengan kadar GDP dan TNF- α yang sudah diperoleh dari penelitian sebelumnya.²⁸

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dari latar belakang yang telah dikemukakan, *Carica pubescens* merupakan salah satu tanaman yang berpotensi untuk mengatasi komplikasi ginjal pada pasien DM Tipe 2, maka dapat dirumuskan permasalahan:

Bagaimanakah pengaruh jus buah *Carica pubescens* terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus Wistar DM Tipe 2?

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan Umum

Membuktikan Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi VEGF pada Ginjal Tikus Wistar DM Tipe 2.

1.2.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian diet tinggi lemak dan *nicotinamide-streptozotocin* terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2.
2. Menganalisis pengaruh pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 gram BB dan 8 mL/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2.
3. Menganalisis pengaruh pemberian rutin dengan dosis 10 mg/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2 (kontrol flavonoid).
4. Menganalisis perbedaan pengaruh antar kelompok pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 gram BB, 8 mL/200 gram BB dan pemberian rutin dengan dosis 10 mg/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2.

5. Menganalisis hubungan antara ekspresi VEGF pada jaringan ginjal dengan kadar GDP dan TNF- α serum pada tikus wistar DM tipe 2.

1.3 Manfaat Penelitian

- 1) Perkembangan Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini diharapkan mampu menambah literatur dan pengetahuan tentang *Carica pubescens* yang bermanfaat sebagai adjuvan dan diet sehat pada penderita DM Tipe 2.

- 2) Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat berguna bagi masyarakat untuk memanfaatkan jus *Carica pubescens* sebagai salah satu sumber makanan sehat yang baik bagi penderita DM.

- 3) Ekonomi

Penelitian ini diharapkan mampu meningkatkan nilai jual dari *Carica pubescens* sebagai produk oleh-oleh khas dieng yang bermanfaat bagi penderita DM Tipe 2.

- 4) Peneliti lain

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi atau acuan peneliti lain yang tertarik terhadap manfaat dari *Carica pubescens* pada DM.

1.4 Orisinalitas Penelitian

Setelah dilakukan telusur pustaka, tidak ditemukan adanya penelitian atau publikasi sebelumnya yang telah menjawab rumusan masalah pada penelitian.

Hasil telusur pustaka dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Orisinalitas Penelitian

No	Judul, peneliti, nama jurnal	Tujuan, jumlah sampel, desain	Hasil
1.	- <i>Carica pubescens</i> fruit juice reduces tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and fasting blood glucose (FBG) levels in type 2 diabetes mellitus Wistar rats. ²⁸ - Kusuma, Rachmawati, Anjani, Muniroh. - Food Research 4 (Suppl.3): 67-74	- Mengetahui pengaruh pemberian jus buah CP terhadap TNF- α dan kadar glukosa darah puasa pada tikus Wistar yang diinduksi High Fat Diet-Streptozotocin. - 25 ekor tikus Wistar jantan - <i>Randomized post-test only control group</i>	Kadar TNF- α dan glukosa darah puasa menurun secara signifikan pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol positif sehingga disimpulkan bahwa jus buah CP berpotensi menurunkan kadar TNF- α dan glukosa darah puasa.
2.	- Pengaruh Jus Buah Karika (<i>Carica pubescens</i>) Terhadap Kadar SOD dan Profil Lipid (Trigliserida dan <i>High Density Lipoprotein</i>) Studi pada Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2. ³⁵ - Rachmawati. - Thesis Universitas Diponegoro.	- Mengetahui pengaruh pemberian jus buah CP terhadap kadar SOD, TG, dan HDL pada tikus Wistar yang diinduksi <i>High Fat Diet</i> -Streptozotocin. - 25 ekor tikus Wistar jantan - <i>Randomized post-test only control group</i>	Terjadi peningkatan kadar SOD dan HDL, serta penurunan kadar TG secara nyata pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif sehingga jus buah CP berpotensi untuk meningkatkan kadar SOD, HDL dan menurunkan TG.

- | | | | |
|----|---|---|---|
| 3. | <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using <i>In Vitro</i> Models. - Pinto, Ranilla, Apostolidis, Lajolo, Genovese, Shetty.³³ - Journal of Medical Food. | <ul style="list-style-type: none"> - Untuk melihat potensi buah lokal Peru (<i>Carica pubescens</i>, <i>Pouteria lucuma</i>, <i>Inga feuille</i>, dan lain-lain), dalam mengontrol kondisi hiperglikemia dan hipertensi. - 5 gram sampel diekstrak dalam 100 mL etanol - Studi <i>In Vitro</i> secara biokimia | <p>Ekstrak buah kering <i>Carica pubescens</i> memiliki aktivitas sebagai inhibitor α-amilase, α-glukosidase, dan <i>Angiotensin I-Converting Enzyme</i> (ACE) sehingga buah ini memiliki potensi sebagai sumber makanan dengan manfaat anti hipertensi dan anti hiperglikemia.</p> |
| 4. | <ul style="list-style-type: none"> - Efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah limfosit tikus <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi <i>azoxymethane</i>: studi di laboratorium penelitian dan pengujian terpadu 4 Universitas Gadjah Mada.³⁶ - Yudina, Gumay, Muniroh. - Jurnal Kedokteran Diponegoro. | <ul style="list-style-type: none"> - Mengetahui efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah limfosit tikus <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi <i>azoxymethane</i>. - 25 ekor tikus <i>Sprague dawley</i> jantan - <i>Randomized post-test only control group</i> | <p>Jumlah limfosit pada tikus yang diberikan ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok <i>azoxymethane</i> sehingga disimpulkan ekstrak <i>Carica pubescens</i> dapat menurunkan jumlah limfosit tikus <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi <i>azoxymethane</i>.</p> |
| 5. | <ul style="list-style-type: none"> - Efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah neutrofil tikus <i>Sprague dawley</i> yang | <ul style="list-style-type: none"> - Mengetahui efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah neutrofil tikus <i>Sprague dawley</i> | <p>Ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> dapat menurunkan jumlah sel neutrofil secara signifikan pada tikus <i>Sprague dawley</i> yang</p> |

	diinduksi <i>azoxymethane</i> . ³⁷ - Blezeinsky, Gumay, Hardian. - Jurnal Kedokteran Diponegoro.	yang diinduksi <i>azoxymethane</i> . - 25 ekor tikus <i>Sprague dawley</i> jantan - <i>True eksperimental laboratorik Post Test Only with Control Group Design</i>	diinduksi <i>azoxymethane</i> .
6.	- Efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah leukosit pada tikus <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi <i>azoxymethane</i> : studi di laboratorium penelitian dan pengujian terpadu 4 Universitas Gadjah Mada. ³⁸ - Sugeng, Gumay, Bakri. - Jurnal Kedokteran Diponegoro.	- Mengetahui efek pemberian ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> terhadap jumlah leukosit tikus <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi <i>azoxymethane</i> . - 25 ekor tikus <i>Sprague dawley</i> jantan - <i>Randomized post-test only control group</i>	Ekstrak daun <i>Carica pubescens</i> mampu menurunkan jumlah leukosit secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan pencarian pustaka yang telah ditemukan, penelitian yang akan dilakukan oleh peneliti berbeda dengan penelitian sebelumnya. Penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya banyak yang menggunakan sediaan CP dalam bentuk ekstrak daun atau ekstrak buah. Selain itu, penelitian sebelumnya lebih banyak meneliti tentang potensi CP pada hewan coba tikus dengan pemodelan kanker kolorektal (induksi *azoxymethane*). Penggunaan sediaan CP dalam bentuk jus buah dan pemodelan tikus DM dilakukan pada satu penelitian sebelumnya. Namun,

variabel terikat yang diteliti pada penelitian tersebut adalah GDP dan $\text{TNF-}\alpha$. Sedangkan pada penelitian ini, pemberian jus buah CP dilakukan pada hewan coba tikus Wistar DM dengan variabel terikat yang diteliti yaitu, ekspresi VEGF pada ginjal secara imunohistokimia.

BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1. Diabetes Melitus (DM)

Diabetes Melitus merupakan penyakit metabolik yang mengganggu homeostasis glukosa dan timbul akibat ketidakmampuan pankreas dalam memproduksi insulin (DM tipe 1) atau ketidakmampuan tubuh dalam memanfaatkan insulin / resistensi insulin (DM tipe 2).³⁹ Ketergantungan terhadap suntikan insulin terjadi pada penderita DM tipe 1, hal tersebut karena terjadi ketidakmampuan dalam memproduksi insulin akibat rusaknya sel β pankreas yang disebabkan oleh autoimun. Sedangkan, pada penderita DM Tipe 2 yang terjadi akibat resistensi insulin perifer, mengakibatkan terjadi peningkatan kadar insulin sebagai respon untuk mengkompensasi resistensi insulin. Produksi insulin secara terus menerus memaksa sel beta pankreas untuk bekerja lebih dan jika sel beta pankreas tidak lagi mampu mengimbangi peningkatan kebutuhan insulin, maka kadar glukosa darah akan meningkat dan terjadi DM Tipe 2.^{4,40}

Berdasarkan *American Diabetes Association*, terdapat beberapa faktor risiko yang menyebabkan dan memperparah terjadinya DM. Faktor risiko tersebut terbagi menjadi 2, yaitu faktor risiko yang dapat dimodifikasi dan tidak dapat dimodifikasi. Faktor risiko yang dapat dimodifikasi seperti berat badan, aktivitas fisik, diet, hipertensi, dislipidemia dan gaya hidup (merokok dan minum alkohol) merupakan faktor-faktor yang masih dapat diubah dan dikontrol. Sedangkan,

riwayat keluarga DM (genetik), ras dan etnik menjadi faktor yang tidak dapat dimodifikasi dan diubah.⁴⁰⁻⁴²

2.1.1 Glukosa Darah dan Diagnosis DM Tipe 2

Glukosa darah yang terdapat pada plasma merupakan bahan bakar metabolik utama yang digunakan oleh tubuh. Glukosa darah berasal dari tiga sumber, yaitu penyerapan makan di usus, glikogenolisis (pemecahan glikogen dalam hati), dan glukoneogenesis (pembentukan glukosa dalam hati dan ginjal dari karbon lain seperti laktat, piruvat, asam amino dan gliserol). Konsentrasi glukosa plasma pada kondisi fisiologis berada dalam kisaran yang relative sempit, yaitu antara 72-126 mg/dL.⁴³

Resistensi insulin yang terjadi pada penderita DM tipe 2 mengakibatkan terjadinya penurunan transportasi glukosa darah ke hati, sel otot dan sel-sel lemak, sehingga berujung pada hiperglikemi. Hiperglikemi kronis yang terjadi pada DM tipe 2 dapat mengakibatkan kerusakan lebih lanjut pada sensitivitas dan sekresi insulin (glukooksisitas) dan diperparah oleh peningkatan asam lemak bebas (lipotoksisitas).^{44,45}

Penegakan diagnosis DM Tipe 2 dilakukan dengan pemeriksaan glukosa darah. Berdasarkan PERKENI (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia) tahun 2015, diagnosis DM tipe 2 dapat ditegakan apabila:

- 1) Kadar glukosa darah puasa (GDP) ≥ 126 mg/dL. Puasa adalah kondisi dimana tidak adanya asupan kalori, minimal dilakukan selama 8 jam.
- 2) Kadar glukosa darah sewaktu (GDS) ≥ 200 mg/dL.

- 3) Kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL setelah 2 jam pada Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan beban glukos sebanyak 7 gram.
- 4) Kadar HbA1C \geq dengan menggunakan metode yang terstandarisasi oleh *National Glycohaemoglobin Standardization Program (NGSP)*.⁴⁶

2.1.2 Mekanisme Komplikasi DM

Penderita DM Tipe 2 memiliki risiko penyakit jantung dan pembuluh darah 2-4x lebih tinggi daripada orang tanpa diabetes, serta risiko kejadian hipertensi dan dislipidemia yang juga lebih tinggi dibandingkan dengan orang tanpa diabetes. Kelainan dari pembuluh darah bahkan sudah dapat terjadi sebelum kondisi diabetes terdiagnosis, hal tersebut karena adanya resistensi insulin pada saat pradiabetes. Resistensi insulin merupakan penyebab utama terjadinya komplikasi makrovaskular pada penderita DM, sedangkan komplikasi mikrovaskular lebih disebabkan karena kondisi hiperglikemia kronik. Kedua kerusakan vaskular tersebut, diawali dengan terjadinya disfungsi endotel akibat proses glikosilasi dan stres oksidatif yang terjadi pada sel endotel.⁴⁷

Disfungsi endotel menyebabkan terganggunya tubuh dalam mempertahankan homeostasis pembuluh darah. Disfungsi endotel merupakan suatu kondisi dimana sel endotel kehilangan fungsinya secara fisiologis seperti kecenderungan untuk meningkatkan vasodilatasi, fibrinolisis dan anti-agregasi. Sel endotel mampu mensekresikan beberapa mediator yang dapat menyebabkan vasokonstriksi seperti endotelin-a dan tromboksan A₂, serta beberapa mediator vasodilatasi seperti, nitrit oksida (NO), prostasiklin dan *endothelium-derived*

hyperpolarizing factor. NO sendiri memiliki peran utama dalam vasodilatasi arteri.⁴⁸

Kondisi hiperglikemia kronis merupakan pemicu terjadinya gangguan produksi dan aktivitas NO, sehingga kasus disfungsi endotel hampir selalu ditemukan pada penderita DM Tipe 2. Sel endotel yang terpapar dengan kondisi hiperglikemia mengakibatkan terjadinya apoptosis yang mengawali kerusakan pada tunika intima. Proses apoptosis tersebut terjadi melalui proses yang kompleks, yaitu aktivasi integrin akibat aktivasi jalur sinyal B-1 integrin yang menginduksi peningkatan p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan c-Jun N-terminal (JNK) yang nantinya menyebabkan terjadinya apoptosis. Sel endotel yang mengalami apoptosis kemudian akan mengaktifasi vascular endothelial-cadherin yang mengakibatkan apoptosis pada sel-sel sekitar yang rentan mengalami aterosklerosis.^{1,47}

Penyebab utama terjadinya kerusakan jaringan pada pasien DM terbagi menjadi 4 mekanisme yaitu, peningkatan jalur poliol, peningkatan AGEs, aktivasi PKC dan peningkatan jalur flux heksosamin. Selain itu, superoksida yang diproduksi dari mitokondria juga mengaktifasi faktor inflamasi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) dari monosit yang memicu aterogenesis. Kondisi hiperglikemia juga secara langsung dapat menyebabkan keadaan hipoksia pada jaringan yang diakibatkan adanya defek mikro dan makrovaskuler. Keadaan hipoksia tersebut mampu mempermudah kerusakan jaringan karena menurunkan

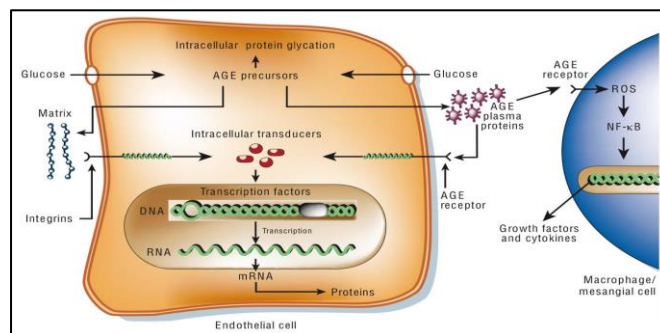
HIF-1 α yang merupakan faktor yang berperan dalam adaptasi hipoksia pada kondisi hiperglikemia.⁴⁹

Empat jalur metabolik utama yang mengakibatkan kerusakan jaringan dan komplikasi pada penderita DM:

a. Jalur Poliol

Pada jalur ini, terjadi peningkatan sorbitol dalam jaringan karena kadar glukosa intrasel yang meningkat mampu merangsang aktivitas enzim *aldose reductase* yang mengkatalisir terbentuknya sorbitol. Enzim *sorbitol dehydrogenase* dapat mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa. Sorbitol dan fruktosa tidak terfosforilasi dan bersifat hidrofilik, sehingga sulit untuk menembus membran sel yang mengakibatkan terjadinya penumpukan poliol di dalam sel dan terjadinya gangguan osmotik. Penumpukan yang terjadi dapat mengaktifasi jalur *stres sensitive signaling pathway* yang memicu produksi mediator inflamasi dan terjadinya apoptosis.⁴⁹⁻⁵¹

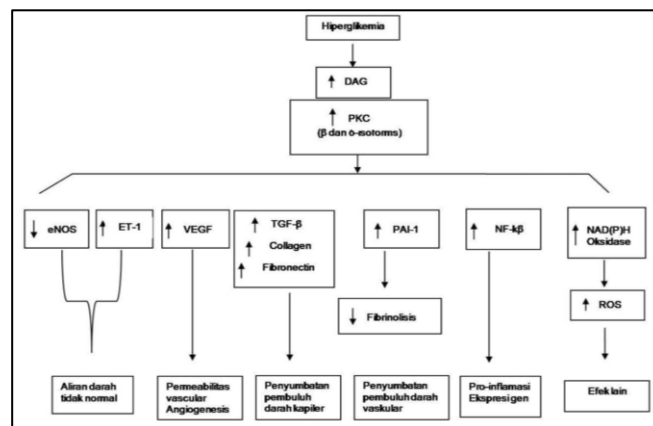
b. Peningkatan AGEs



Gambar 1. Mekanisme AGEs merusak sel⁵²

AGEs merupakan kelompok protein heterogen, lipid dan asam nukleat yang terbentuk secara non-enzimatik pada kondisi hiperglikemia dan produksi stres oksidatif. Produksi prekursor AGE intraseluler dapat merusak sel target melalui 3 mekanisme (Gambar 1). Mekanisme pertama dengan memodifikasi protein intraseluler sehingga mengubah fungsi dari protein intraseluler tersebut. Kedua, prekursor AGE dapat memodifikasi komponen matriks ekstraseluler sehingga mampu berinteraksi secara tidak normal dengan komponen matriks lain dan reseptor matriks protein (integrin) pada sel. Sedangkan mekanisme ketiga, prekursor AGE memodifikasi protein plasma untuk dapat berikatan dengan reseptor AGE pada sel endotel, mesangial dan makrofag yang kemudian menginduksi faktor transkripsi NF- κ B yang menyebabkan perubahan patologi pada ekspresi gen⁵² dan memproduksi sitokin inflamasi (TNF- α , IL-1 dan IL-6), serta faktor pertumbuhan seperti VEGF.⁵¹

c. Aktivasi PKC



Gambar 2. Dampak dari aktivitas PKC⁴⁹

Saat kondisi hiperglikemia terjadi, peningkatan kadar glukosa intrasel yang meningkat akan menyebabkan sintesa molekul *diacyl glycerol* (DAG) yang merupakan *critical activating cofactor* dari bentuk klasik senyawa PKC. Aktivasi PKC (Gambar 2) dapat mempengaruhi berbagai ekspresi gen seperti endothelin-1, VEGF, *transforming growth factor- β* (TGF- β), *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-I), *nuclear factor-k β* (NF-k β), NADPH oksidase dan menurunkan kadar *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Perubahan yang terjadi akibat aktivasi PKC tersebut secara klinis mengakibatkan kelainan pada sistim vaskuler dan reaksi inflamasi.⁵¹

d. Peningkatan jalur Heksosamin

Glukosa intrasel dalam kadar normal akan dimetabolisme melalui jalur glikolisis yang menghasilkan glukosa fosfat dan kemudian menjadi senyawa fruktosa-6fosfat. Namun, bila kadar glukosa intrasel meningkat, maka sebagian senyawa fruktosa-6fosfat akan dikonversi menjadi *glucosamine-6-phosphate* dan selanjutnya menjadi *Uridine Diphosphate* (UDP) *N-acetyl glucosamine* oleh enzim *glutaminefructose-6-phosphateamidotransferase* (GFAT). *N-acetyl glucosamine* dapat berikatan dengan faktor transkripsi *serine-threorinine residues* dan menginduksi terbentuknya beberapa gen seperti TGF- β dan PAI-1.⁵¹

2.1.3 Komplikasi Ginjal Akibat DM

Diabetes nefropati (DN) merupakan komplikasi yang dialami oleh sekitar sepertiga pasien yang menderita DM dan DN juga merupakan penyebab utama pada penyakit ginjal tahap akhir. Angka survival yang buruk (mortalitas 5 tahun sebanyak 70%) terjadi pada penderita DM yang menjalani hemodialisis.⁴⁷ Secara klinis penderita DN ditentukan dengan adanya mikroalbuminuria yang diikuti dengan peningkatan proteinuria dan penurunan laju filtrasi glomerulus / *glomerular filtration rate* (GFR). Hiperfiltrasi glomerulus merupakan indikator awal dari DN (praklinis) yang ditandai oleh adanya peningkatan GFR, tanpa perubahan morfologis atau hanya hipertrofi glomerulus.¹

Interaksi antara faktor hemodinamik dan metabolik menjadi penyebab terjadinya DN. Kontribusi faktor hemodinamik terhadap perkembangan DN adalah dengan mengaktivasi jalur hormon vasoaktif seperti *Renin Angiotensin System* (RAS) dan endotelin melalui peningkatan tekanan sistemik dan intraglomerular. Selain itu, faktor dinamik juga meningkatkan *intracellular second messengers*, seperti *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), PKC NF-K β dan berbagai Growth Factor (GF) seperti TGF- β , sitokin prosklerotik, *Permeability Enhancing Growth Factor* (PEGF) dan VEGF.⁵³

Kondisi hiperglikemia pada penderita DM dan peningkatan produksi mediator humoral, sitokin dan berbagai GF menyebabkan terjadinya perubahan struktur ginjal, seperti peningkatan deposisi matrik mesangial dan perubahan fungsi ginjal seperti peningkatan permeabilitas membrana basalis glomerulus.

Perubahan metabolik yang disebabkan oleh kondisi hiperglikemia dan gangguan hemodinamik akan mempengaruhi perkembangan dan progresifitas DN.⁵⁴

2.2 *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan suatu faktor pertumbuhan endotel spesifik yang menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel endotel, memediasi vasodilatasi endotelium, meningkatkan permeabilitas vaskuler dan berperan dalam remodeling matriks intersitial.⁵⁵ Ekspresi VEGF di ginjal yang paling banyak terdapat dalam podosit glomerulus (sel epitel visceral glomerulus) dan sel epitel tubular, sedangkan reseptor untuk VEGF ditemukan terutama pada glomerulus, proglomerular dan sel endotel peritubular.⁴

Podosit berperan penting untuk menjaga *barrier* filtrasi glomerulus karena berkontribusi secara struktural dengan penyediaan celah diafragma dan membran basal glomerulus. Ekspresi VEGF pada glomerular memiliki fungsi untuk pemeliharaan endotelium glomerulus dan permeabilitas selektif makromolekul. Jika terjadi disfungsi glomerulus, proteinuria dapat terjadi karena glomerulus tidak mampu lagi mempertahankan selektivitas makromolekul dari *barrier* filtrasi.⁵⁶

2.2.1 Dampak Peningkatan Ekspresi VEGF Pada Ginjal DM

Hiperglikemi kronik yang terjadi pada penderita DM dapat memicu berbagai kelainan metabolik dan hemodinamik yang saling berhubungan dan berkontribusi pada peningkatan ekspresi VEGF yang berujung pada komplikasi mikrovaskuler. Peningkatan VEGF berhubungan dengan glomerulomegali dan

pembentukan pembuluh darah yang berlebihan (abnormal) pada tikus dan manusia dengan DN.⁵⁷ Peningkatan ekspresi VEGF pada kondisi DM mengakibatkan terjadinya pembesaran mesangial, terganggunya fenestrasi podosit, proteinuria dan hipertropi podosit, kondisi ini mengarah pada pembentukan komplikasi ginjal.⁵⁶ Selain itu, induksi *Overexpression* VEGF melalui podosit pada tikus sehat juga menghasilkan kelainan glomerulus yang mirip dengan kondisi DN, seperti proteinuria, glomerulomegali, penebalan GBM, pembesaran mesangial dan *podocyte effacement*.⁵⁸

Ekspresi VEGF yang tinggi dapat menyebabkan hilangnya fungsi fisiologis glomerulus dalam mempertahankan selektivitas makromolekul dari *barrier* filtrasi glomerulus sebagai salah satu mekanisme yang bertanggung jawab atas terjadinya proteinuria. Kondisi ini dapat disebabkan oleh VEGF melalui beberapa mekanisme, mekanisme yang pertama, VEGF yang berasal dari podosit dapat berikatan dengan VEGFR yang terdapat pada sel-sel endotel kapiler, ikatan VEGF/VEGFR ini mengakibatkan terjadinya peningkatan hiperfiltrasi glomerulus. Hipertrofi podosit juga mampu menyebabkan hiperfiltrasi glomerulus dengan mengubah fenestrasi kapiler atau komponen membrane basement. Hipertrofi podosit dapat terjadi karena podosit tidak hanya memproduksi VEGF, tetapi juga mampu mengekspresikan reseptor VEGF. Mekanisme lainnya adalah VEGF merangsang peningkatan kolagenase oleh sel endotel yang mengakibatkan gangguan proteolitik dari membran sel.⁵⁹

Pada pemodelan tikus DM yang diinduksi STZ, menunjukkan total rata-rata luas permukaan, panjang dan jumlah kapiler glomerulus yang meningkat dibandingkan kelompok kontrol pada hari ke-10 dan 50 pasca injeksi STZ. Pemeriksaan secara imunohistokimia menunjukkan terjadinya pembentukan pembuluh darah yang berlebihan dan abnormal pada DM. Pembentukan pembuluh darah yang abnormal ditunjukkan dengan dinding yang tipis di membran basal, sementara sel-sel endotel mengalami pembengkakan, gambaran ini menunjukkan secara struktural bahwa pembuluh darah yang terbentuk belum *mature* dan layak, sehingga mengakibatkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang menyebabkan ekstravasasi protein plasma serta pembentukan lesi pada ginjal penderita DM.⁶⁰

Inflamasi kronik akibat gangguan metabolik pada penderita DM dapat menyebabkan perkembangan plak aterosklerosis. Faktor angiogenesis seperti VEGF merupakan salah satu penanda inflamasi yang berkaitan dengan aterosklerosis. VEGF berperan penting dalam perkembangan plak aterosklerosis. Pada lesi awal, VEGF berperan dalam proses angiogenesis vasa vasorum untuk memberikan nutrisi bagi perkembangan dan perluasan intima agar dapat menjaga pertumbuhan dan stabilisasi plak sehingga mencegah terjadinya kematian sel. Namun pada plak tahap lanjut, infiltrasi sel inflamasi dan produksi sitokin pro-angiogenik seperti VEGF menyebabkan pembentukan pembuluh darah yang tidak terkontrol sehingga terjadi pembentukan pembuluh darah baru yang belum *mature* dan bersifat rapuh. Pembuluh darah yang bersifat rapuh akan mudah

mengalami raktur, menyebabkan terjadinya arus sel darah merah ke dalam plak yang akan merangsang proses inflamasi dan mengganggu stabilitas plak.¹²

2.2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspresi VEGF

Beberapa kondisi dapat mempengaruhi ekspresi VEGF adalah hipoksia, hiperglikemia, hewan coba DM Tipe 1 dan pada tikus diabetes yang diinduksi *streptozotosin* (STZ).¹⁶ Hiperglikemia mengatur Angiotensin II (Ang II) pada sel tubulus proksimal tikus, yang nantinya melalui jalur ERK dan ROS akhirnya akan menginduksi ekspresi VEGF. AGEs adalah salah satu mediator yang juga mampu mengatur ekspresi VEGF, melalui faktor transkripsi seperti NF- κ B dan aktivator protein-1 (AP-1) yang nantinya mengatur tingkat VEGF mRNA. Selain itu, TGF- β 1 yang diekspresikan pada sel endotel glomerulus diabetes juga dapat meningkatkan konsentrasi protein VEGF pada sel tubular tikus. Stres oksidatif pada penderita DM yang dihasilkan dari oksigen dan nitrogen spesies reaktif (ROS & RNS) dari proses Ang II, oksidasi glukosa dan AGEs, yang berlebih dan tidak dapat dibersihkan oleh antioksidan akan meningkatkan ekspresi VEGF dengan menstabilkan HIF-1 α .^{1,16}

A. Hipoksia

Sebelum ditemukan jejas pada struktur tubulo interstisial, hipoksia berperan dalam penyakit ginjal fase awal. Kapiler glomerulus yang terganggu, seperti glomerulosklerosis mengakibatkan penurunan perfusi peritubular dan asupan oksigen tubulus. Penelitian pada hewan coba yang diinduksi STZ menunjukkan terjadi hipoksia jaringan pada fase awal (sebelum terjadi perubahan

struktur) di organ ginjal penderita DM yang dilihat menggunakan teknik *blood oxygen-level dependent* dan *magnetic resonance imaging* (MRI).¹⁶

Hipoksia merupakan salah satu pemicu utama terjadinya angiogenesis. Kondisi hipoksia meningkatkan regulasi *hypoxia-inducible factor*, yang merupakan salah satu faktor transkripsi yang mengikat elemen hipoksia di wilayah promotor pada gen VEGF. Lingkungan yang hipoksia memicu sel untuk meningkatkan regulasi VEGF, *stromal-derived factor-1* (SDF-1), *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan angiopoietin-2.¹⁹

B. Sistem Renin Angiotensin

Pada penderita DM terjadi peningkatan aktivitas renin di plasma, seperti peningkatan kadar *angiotensin converting enzyme* (ACE) dan angiotensin II (Ang II). Aktivitas Ang II yang berlebih memicu peningkatan VEGF, TGF β dan stres oksidatif, dimana aktivitas Ang II tersebut dimediasi oleh hipertensi glomerulus dan albuminuria.⁵⁷

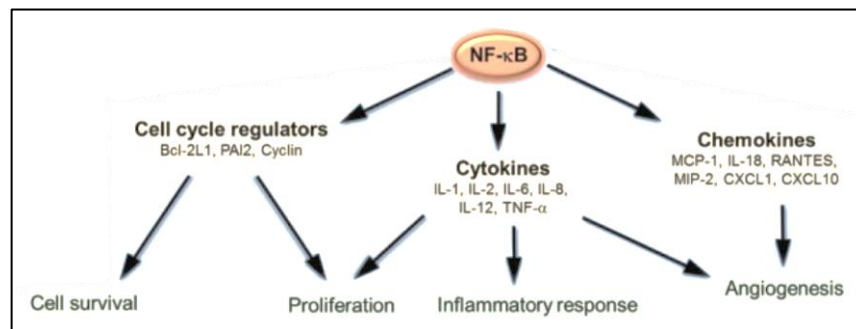
C. Reactive Oxygen Spesies dan Nitric Oxide

Stres oksidatif merupakan salah satu faktor penting dalam penyakit diabetes, serta komplikasinya. Peningkatan ROS/RNS terjadi melalui jalur poliol, oksidasi glukosa, *advanced glycation*, transfer elektron mitokondria yang tidak teratasi oleh antioksidan pada penderita DM. ROS/RNS mampu meningkatkan ekspresi VEGF dengan mengaktifkan dan menstabilkan HIF-1 α . Kemudian, VEGF mengaktifkan eNOS melalui p13k/akt dan merangsang pembentukan *nitric oxide generation*. Namun, karena adanya superoksida, NO

dengan cepat berubah menjadi peroksinitrit yang secara efektif meningkatkan ROS daripada NO.⁵⁷ Stres oksidatif juga dapat memicu faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1 yang merupakan gen-gen pro-inflamasi.⁶¹

D. Inflamasi

Penderita DM umumnya ditandai dengan keadaan inflamasi kronis bersamaan dengan sekresi sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan (seperti IL-1, IL-6, TNF, TGF- β dan VEGF) yang menstimulus angiogenik. Peningkatan sekresi sitokin pro-inflamasi dan faktor pertumbuhan terjadi akibat aktivasi faktor transkripsi NF- κ B melalui berbagai jalur pada kondisi DM, seperti aktivasi PKC, peningkatan AGEs, peningkatan jalur poliol, aktivitas Ang II dan stres oksidatif.^{49,51} Sitokin dan faktor pertumbuhan seperti TNF- α , TGF- β dan IL-1 dapat menstimulus ekspresi dan transkripsi mRNA VEGF.^{18,19,62,63}



Gambar 3. Aktivasi NF- κ B.⁶⁴

NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang mengatur berbagai gen yang terlibat dalam berbagai respon kekebalan dan inflamasi. Pada gambar 3 menunjukkan, aktivasi NF- κ B yang dapat terjadi pada kondisi DM dapat menyebabkan terekspresinya gen-gen sitokin pro-inflamasi yang dapat

mengakibatkan terjadinya respon inflamasi, proliferasi dan angiogenesis dengan mengekspresikan sejumlah *growth factor* (GF) seperti VEGF. Faktor transkripsi NF- κ B juga dapat distimulus oleh senyawa ROS yang diinduksi oleh TNF- α , sehingga kondisi ini dapat menyebabkan respon inflamasi kronis yang berujung pada peningkatan ekspresi GF seperti VEGF.^{64,65}

E. Advanced Glycation End Products (AGEs)

AGEs mampu menginduksi peningkatan VEGF-A baik secara in vitro dan in vivo. AGEs mampu mengikat beberapa reseptor (RAGE dan AGE-R1-3) yang terdapat pada beberapa jenis sel ginjal. Interaksi AGE-RAGE dapat mengaktifkan NADPH oksidase yang berakibat pada peningkatan ROS di sitosol, mengaktifkan PKC dan jalur NF yang mengarah pada pelepasan VEGF, TGF- β dan *connective tissue growth factor* (CTGF). Selain itu, interaksi tersebut juga menyebabkan produksi sitokin pro-inflamasi dan pembentukan *mitochondrial* ROS yang mengakibatkan terjadinya stres oksidatif yang membuat kerusakan dan gangguan pada ginjal.⁵⁷

2.2.3 Mediator Penghambat Ekspresi VEGF

Terdapat beberapa terapi yang telah dikembangkan sebagai antidiabetik dan mampu menurunkan ekspresi VEGF. Terapi tersebut berperan sebagai inhibitor VEGF (Iressa, Tarceva), sebagai penarik/pengikat VEGF (Bivacizumab, ranizumab, pengabtanib), sebagai blokir ikatan VEGF-VEGFR:DC101 dan sebagai penghambat reseptor tyrosine kinase (sunitinib dan sorafenib).¹⁹ Selain itu, terdapat pula terapi alternatif dengan menggunakan

Morinda citrifolia L dan *Phaleria macrocarpa* yang dapat menurunkan ekspresi VEGF pada ginjal.^{34,66}

2.2.4 Metode Pemeriksaan Ekspresi VEGF

Terdapat beberapa metode dalam pemeriksaan VEGF, seperti imunohistokimia, *quantitative immunoassays*, *western blot* dan *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pemeriksaan VEGF dengan metode imunohistokimia (IHK) dapat digunakan untuk melihat ekspresi VEGF pada suatu lokasi tertentu yang lebih spesifik.⁶⁷

Metode IHK merupakan suatu metode pewarnaan jaringan dengan memanfaatkan ikatan antigen dengan antibodi yang telah diberi label. Ekspresi VEGF dikatakan positif apabila sitoplasma sel terpulas dengan warna coklat. Evaluasi pewarnaan VEGF dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan aplikasi *computer-assisted image analysis* atau secara visual oleh patologis yang berpengalaman. Metode evaluasi pewarnaan VEGF dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.⁶⁸

Evaluasi secara kualitatif dilakukan dengan melakukan penilaian berdasarkan intensitas pewarnaan (negatif, lemah, sedang dan kuat) yang selanjutnya diklasifikasikan menjadi dua kategori, yaitu imunoreaktif level rendah (negatif dan lemah) dan imunoreaktif level tinggi (sedang dan kuat). Sedangkan, evaluasi secara kuantitatif dilakukan dengan sistem skoring dari dua poin penilaian, yaitu intensitas dan proporsi hasil pewarnaan.^{68,69} Penilaian ekspresi VEGF secara kuantitatif memiliki variasi metode skoring yang cukup beragam,

hal ini disebabkan karena masih belum adanya metode skoring yang standar (baku emas) untuk pemeriksaan ini.⁶⁸ Salah satu metode skoring kuantitatif yang telah dikembangkan adalah dengan memberi skor intensitas dan proporsi dalam 4 kategori penilaian penilaian, yaitu:

- Intensitas : negatif (0), lemah (1), sedang (2), dan kuat (3)
- Proporsi : negatif (0), lemah (<10%), sedang (11-20%), dan kuat (>50%)

Penilaian tingkat imunoreaktivitas kemudian diperoleh berdasarkan perkalian antara kedua skor tersebut yang terbagi atas imunoreaktif rendah (1-2), sedang (3-4) dan tinggi (5-9).⁷⁰

2.3 *Carica pubescens* (CP)

Carica pubescens merupakan salah satu tanaman khas dataran tinggi yang kaya akan vitamin C. Di Indonesia, tanaman ini dikenal dengan nama “karika” atau “pepaya gunung”. *Carica pubescens* merupakan kerabat dekat (satu genus) dengan *Carica papaya* (pepaya) sehingga kedua tanaman tersebut memiliki kemiripan yang tinggi, termasuk secara morfologi. Perbedaan utamanya dengan pepaya adalah tanaman ini hanya tumbuh di tempat dengan ketinggian 1.400-2.400 meter di atas permukaan laut (dpl), temperatur rendah dan curah hujan tinggi. Di Indonesia, tanaman ini dapat dijumpai di kawasan Bromo dan Dataran Tinggi Dieng.²⁵

2.3.1 Taksonomi dan Karakteristik Morfologi Buah CP

Carica pubescens memiliki taksonomi sebagai berikut⁷¹:

Kingdom : Plantae
 Sub kingdom : Tracheobionta
 Super division : Spermatophyta
 Division : Angiospermae
 Kelas : Monocotyledonae
 Sub kelas : Dilleniidae
 Ordo : Violales
 Familia : Caricaceae
 Genus : *Carica*
 Spesies : *Carica pubescens*



Gambar 4. Buah CP⁷²

Buah CP memiliki kemiripan bentuk dengan buah papaya (*Carica papaya*), namun memiliki ukuran yang lebih kecil. Buah CP memiliki kulit buah yang tebal dan bergetah, ketika matang kulit buah CP memiliki warna kuning yang sebelumnya berwarna hijau saat masih mentah. Daging buah CP memiliki tekstur yang lebih keras dibandingkan buah papaya dan memiliki warna kuning sampai jingga, serta memiliki rasa sedikit asam dengan wangi yang harum dan khas. Buah CP memiliki biji yang terdapat pada rongga dalam buah dan terbungkus oleh selaput. Biji buah CP yang berwarna merah menandakan buah masih mentah dan biji yang berwarna hitam menandakan buah CP sudah matang.^{26,71}

2.3.2 Potensi CP Menurunkan Ekspresi VEGF Pada DM

Penelitian mengenai tanaman obat dan potensinya mulai banyak dikembangkan, termasuk potensi dari tanaman *C. pubescens*. Identifikasi fitokimia yang menggunakan sampel buah CP yang tumbuh pada kawasan Bromo, Cangar dan Dataran Tinggi Dieng menunjukkan bahwa buah CP

mengandung senyawa flavonoid, polifenol, tanin dan triterpenoid.²⁵ Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang secara umum juga diketahui memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan manusia. Flavonoid secara umum dilaporkan memiliki aktivitas sebagai anti-diabetes dan anti-inflamasi.⁷³

Kuersetin (dan glikosidanya) merupakan kelompok flavonol terbesar, yaitu sekitar 60-75% dari flavonoid. Kuersetin dipercaya mampu melindungi tubuh dari beberapa penyakit degeneratif dengan cara mencegah peroksidase lemak dan bertindak sebagai antioksidan.²⁵ Selain itu, senyawa fenol yang juga terkandung dalam CP adalah Rutin.^{26,27} Manfaat rutin dalam kesehatan adalah sebagai anti-hiperglikemi dan anti-inflamasi. Mekanisme rutin sebagai anti-hiperglikemi adalah melalui inhibisi α -glukosidase dan α -amilase yang terlibat dalam pencernaan karbohidrat, sehingga terjadi pengurangan penyerapan glukosa dari usus kecil. Rutin juga dapat menstimulus sekresi insulin dari sel beta pankreas dan meningkatkan pengambilan glukosa oleh jaringan.^{29,74} Selain itu, rutin juga dapat menjadi terapi preventif untuk mencegah komplikasi pada penderita DM, termasuk mencegah terjadinya komplikasi ginjal dengan menekan ekspresi protein p38 yang menginduksi apoptosis, mengurangi mengurangi mediator-mediator yang menyebabkan kerusakan ginjal, oksidatif stres dan menghambat ekspresi mediator yang menyebabkan kerusakan ginjal pada DM.⁷⁵ Selain itu, buah CP juga kaya akan serat dan enzim papain yang bermanfaat untuk sistem pencernaan, lambung dan usus besar, serta vitamin C yang bermanfaat sebagai antioksidan untuk mengatasi radikal bebas.⁷⁶

Pada DM, kondisi hiperglikemia dan stres oksidatif dari ROS/RNS yang berasal dari jalur poliol, oksidasi glukosa, AGEs dan mitokondrial ROS yang diproduksi berlebih mampu meningkatkan ekspresi VEGF.^{1,57} Buah CP memiliki kandungan fitokimia yang bersifat anti-hiperglikemi, anti-inflamasi dan anti-oksidan sehingga mampu menghambat ekspresi VEGF pada penderita DM.²⁵⁻²⁷

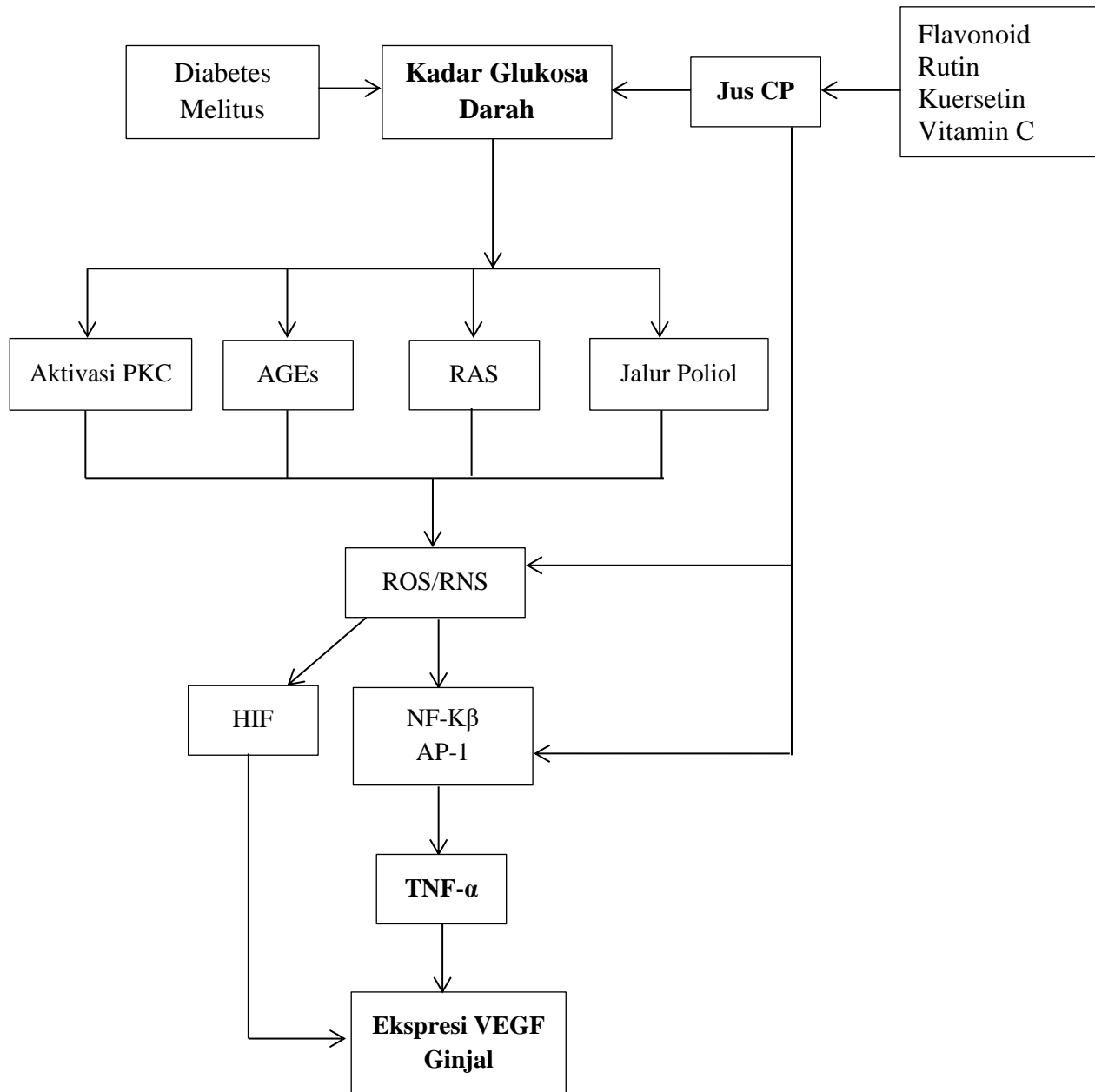
2.3.3 Faktor yang Mempengaruhi Kandungan CP

Kandungan fitokimia suatu tanaman secara alami dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Suatu spesies tanaman yang sama mampu beradaptasi dengan cara yang berbeda terhadap lingkungan sekitar tempat tumbuhnya. Penelitian sebelumnya terhadap kandungan flavonoid pada buah CP yang tumbuh pada kawasan Bromo, Cangar dan Dieng memiliki kandungan total flavonoid yang berbeda. Perbedaan konsentrasi tersebut dapat terjadi karena kondisi lingkungan tumbuh yang berbeda. Kondisi lingkungan seperti suhu, kelembaban udara, pencahayaan, unsur tanah, lokasi tumbuh dan ketinggian berpengaruh terhadap tampilan tanaman dan kandungan fitokimia yang dikandung.^{25,28,71}

Proses pengolahan juga sangat berpengaruh terhadap kandungan fitokimia yang terkandung dalam suatu tanaman. Proses dalam pengolahan buah CP seperti pencucian, perendaman, penggaraman, perebusan, pengeringan, penambahan senyawa lain (seperti gula atau kapur) dan teknik pengemasan dapat berpengaruh terhadap kandungan fitokimia yang terdapat pada buah CP.^{24,77} Selain itu, tingkat kematangan buah juga berpengaruh terhadap kandungan gizi dan fitokimia yang

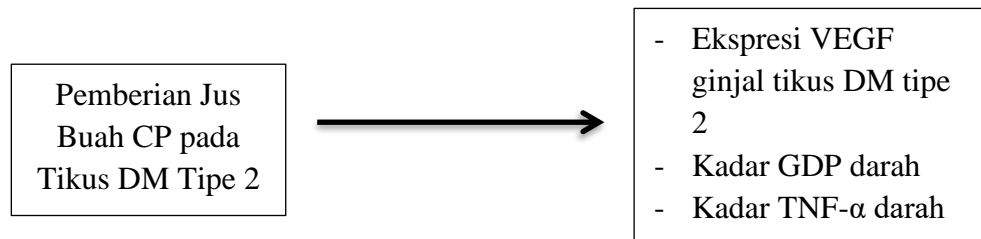
terkandung di dalamnya. Tingkat kematangan buah papaya umumnya ditentukan berdasarkan perubahan warna pada kulit buah.^{73,78}

2.4 Kerangka Teori



Gambar 5. Kerangka Teori

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep

2.6 Hipotesis

- a. Terdapat pengaruh pemberian diet tinggi lemak dan *nicotinamide-streptozotocin* terhadap ekspresi VEGF pada jaringan ginjal tikus wistar kelompok DM tipe 2.
- b. Terdapat pengaruh pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 gram BB dan 8 mL/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada jaringan ginjal darah tikus wistar kelompok DM tipe 2.
- c. Terdapat pengaruh pemberian rutin dengan dosis 10 mg/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2 (kontrol flavonoid).
- d. Terdapat perbedaan pengaruh antara kelompok pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 gram BB, 8 mL/200 gram BB dan pemberian rutin dengan dosis 10 mg/200 gram BB terhadap ekspresi VEGF pada ginjal tikus wistar DM tipe 2.
- e. Terdapat hubungan antara ekspresi VEGF pada jaringan ginjal dengan kadar GDP dan TNF- α pada serum darah tikus wistar DM tipe 2.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2021 di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret (Surakarta).

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental* dengan pendekatan *post test only control group design* dan penentuan sampel pada tiap kelompok perlakuan dilakukan dengan alokasi random. Proses aklimatisasi dan intervensi sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya dan penelitian ini akan melanjutkan untuk pemeriksaan organ ginjal dari blok parafin yang berasal dari penelitian dengan judul “Pengaruh Jus Buah Karika (*Carica pubescens*) Terhadap Kadar *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan Glukosa Darah Puasa”.²⁸

Penelitian ini menggunakan blok parafin organ ginjal tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan yang dibagi dalam lima kelompok dengan teknik randomisasi sederhana, yaitu satu kelompok kontrol negatif (K-), satu kelompok kontrol positif (K+), satu kelompok diberikan jus buah CP dosis 4 mL/200 g BB/hari (X1), satu kelompok diberikan jus buah CP dosis 8 mL/200 g BB/hari (X2), dan satu kelompok dengan pemberian rutin murni dengan dosis 10 mg/200 g BB/hari (X3).

3.2.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan:

- 1) Blok parafin jaringan ginjal tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan
- 2) Cat Imunohistokimia untuk VEGF-A: *Monoclonal Mouse Antibody* VEGF (C-1) : sc-7269 *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*
- 3) Reagen DAB (3,3-Diaminobenzidine)
- 4) *Streptavidin Peroxidase*
- 5) Reagen *Hematoxilin Mayer*
- 6) Alkohol (96%, 90%, 80%, 70%)
- 7) *Xylol*
- 8) Parafin cair

Alat:

- 1) Pemotongan blok parafin menjadi slide preparat: Mikrotom
- 2) Pewarnaan dan pemeriksaan imunohistokimia: Mikroskop, obyek gelas, *cover glass*, inkubator, *microwave*, *tissue processor*, *base mold*, mikropipet

3.2.2 Perlakuan Hewan Coba²⁸

Tikus yang memenuhi kriteria sampel ditempatkan pada kandang individu dengan kondisi suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, kelembaban $50\pm 5\%$ dan siklus pencahayaan 12 jam. Pakan standar yang diberikan pada tikus adalah Comfeed II sebanyak 20 g/hari yang mengandung *crude* protein 15%, *crude* fat 3-7%, *crude* fiber 6%, abu

7%, kalsium 0,9-1,1% dan fosfor 0,6-0,9%. Sedangkan untuk untuk minuman diberikan *ad libitum* selama periode aklimatisasi sampai dengan akhir penelitian.

Proses aklimatisasi dilakukan selama 7 hari agar tikus dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan di *animal laboratory*. Setelah periode aklimatisasi (7 hari), tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok tikus yang tidak diberikan diet tinggi lemak dan kelompok yang diberikan diet tinggi lemak. Komposisi diet tinggi lemak yang diberikan adalah Comfeed II 90%, lemak babi 10% dan kolesterol murni 1,25% dan diberikan setiap 3 hari selama 14 hari sebanyak 20 gram/tikus/hari. Pada hari ke-22, kelompok tikus yang telah diberi diet tinggi lemak diberikan induksi secara intraperitoneal dengan NA sebanyak 110 mg/kg BB (dilarutkan dalam NaCl 1,5 ml/100 gram BB) dan 15 menit setelah itu dilanjutkan dengan pemberian induksi STZ sebanyak 40 mg/kg BB (dilarutkan dalam buffer natrium sitrat 1,5 ml/100 gram BB). Tiga hari kemudian, dilakukan pemeriksaan glukosa darah puasa dengan mengambil sampel darah sebanyak 2 ml melalui plexus retroorbital. Tikus dikatakan diabetes bila memiliki kadar glukosa >200 mg/dL.⁷⁹ Setelah status diabetes terkonfirmasi, dilakukan pembagian kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol positif, kelompok X1 (jus buah CP 4 ml/200 gram BB/hari), kelompok X2 (jus buah CP 8 ml/200 gram BB/hari), kelompok X3 (rutin 10 mg/200 gram BB/hari). Semua perlakuan diberikan melalui sonde selama 30 hari.

3.2.3 Pembuatan Jus Buah CP

Dikupas kulit dan dibuang biji dari buah CP, kemudian dicuci hingga bersih. Setelah bersih, buah dipotong lebih kecil dan dibilas dengan air garam, lalu direbus selama 3 menit dengan suhu 60 °C untuk menghilangkan getah pada buah. Buah CP yang telah bersih dari getah, kemudian diambil 100 gram untuk diolah menjadi jus menggunakan blender dan homogenizer.

3.2.4 Penentuan Kandungan Rutin pada Jus Buah CP

Dilarutkan 50 gram rutin murni ke dalam 50 mL etanol untuk mendapatkan larutan stock dengan konsentrasi 1000 ppm. Diencerkan dari larutan stock dengan etanol menjadi konsentrasi 0 sampai 50 ppm. Larutan yang telah diencerkan tersebut kemudian diambil masing-masing sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam kuvet, setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer (panjang gelombang 359 nm).

Jus buah CP dilarutkan dengan etanol dengan perbandingan 1:1 dan diaduk menggunakan vortex. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Kemudian, diambil 2 mL supernatan untuk dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 359 nm. Kadar rutin dalam jus buah CP dapat diketahui dengan membandingkan nilai absorbansi larutan jus buah CP dengan larutan rutin.

3.2.5 Pemeriksaan kadar glukosa darah metode GOD-PAP

Prinsip kerja metode ini adalah serum darah yang mengandung glukosa akan bereaksi dengan reagen GOD-PAP untuk membentuk asam glukonat dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya, H_2O_2 yang terbentuk akan bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan fenol sehingga terbentuklah *quinoneimine*. Jumlah zat warna merah yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah konsentrasi glukosa.

Proses persiapan sampel:

Darah yang diperoleh dari pengambilan pada plexus retroorbital dimasukkan ke dalam tabung yang tidak mengandung antikoagulan karena yang akan digunakan untuk pemeriksaan berupa serum. Kemudian, tabung yang telah berisi darah tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Lalu ambil bagian bening (supernatan) untuk kemudian diperiksa kadar glukosa darah puasanya.

Proses pemeriksaan glukosa darah:

Disiapkan sebanyak 27 tabung dengan rincian: 25 tabung berisi sampel (serum darah) sebanyak 10 μ l, 1 tabung berisi larutan standar sebanyak 10 μ l dan 1 tabung berisi blanko (akuades) sebanyak 10 μ l. Kemudian tambahkan masing-masing sebanyak 1000 μ l reagen GOD-PAP ke dalam 27 tabung tersebut. Campur larutan dengan menggunakan vortex. Lalu lakukan inkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25 °C. Baca absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Hitung kadar glukosa darah dengan rumus:

$$\text{Kadar glukosa darah (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{Konsentrasi standar}}{\text{Absorbansi standar}}$$

3.2.6 Terminasi dan Pengambilan Organ Ginjal Hewan Coba

Terminasi hewan coba dilakukan setelah 30 hari diberikan perlakuan (hari ke-31). Hewan uji dimasukkan ke dalam toples berisi kapas yang diberikan eter, dilakukan rangsangan nyeri pada telapak kaki tikus untuk memastikan apakah efek anestesi telah bekerja. Setelah tikus kehilangan kesadaran, dilakukan terminasi dengan cara dislokasi leher. Hewan uji yang telah mati kemudian diletakan di atas papan fiksasi dengan perut menghadap ke atas. Proses pembedahan dilakukan pada bagian *abdominothoracal* dan dilakukan nekropsi organ ginjal. Organ dipotong dan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi formalin-PBS 10%. Selanjutnya dapat dilakukan uji histopatologi ginjal.

3.2.7 Pewarnaan Imunohistokimia VEGF-A Ginjal

Pembuatan dan pembacaan preparat organ ginjal dengan pewarnaan imunohistokimia VEGF-A dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah. Pengamatan ekspresi VEGF dilakukan pada seluruh lapangan pandang preparat organ ginjal dengan penilaian berdasarkan proporsi dan intensitas pewarnaan. Pengamatan dilakukan oleh dua ahli patologis.

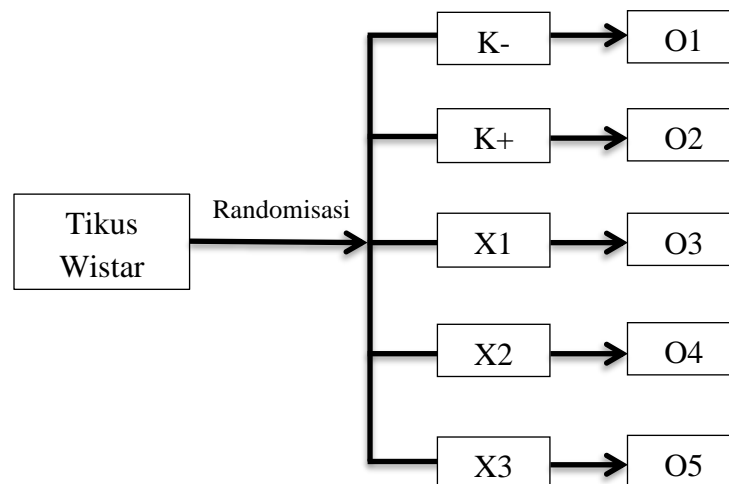
Proses pembuatan blok parafin jaringan dimulai dari proses fiksasi organ dengan NBF 10%, setelah itu dilakukan proses dehidrasi (alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 96%) dan *clearing* (*xylol*) dengan alat *tissue processor*. Selanjutnya dilakukan proses *embedding* dan *blocking* sehingga organ tertanam pada lilin parafin.

Prosedur pewarnaan imunohistokimia VEGF-A:

- 1) Blok paraffin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3 μm , kemudian diletakan pada obyek gelas.
- 2) Masukkan objek gelas tadi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1-2 jam atau 30 menit pada suhu 60°C.
- 3) Kemudian, dilakukan proses deparafinisasi dengan mencelupkan preparat ke dalam *xylol* sebanyak 3x selama 3 menit.
- 4) Selajutnya, proses rehidrasi dilakukan dengan alkohol bertingkat (96%, 90%, 80%, 70%) masing-masing sebayak 2x selama 3 menit.
- 5) Setelah itu, preparat dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan PBS sebanyak 2x, masing-masing 10 menit.
- 6) Preparat yang telah dicuci kemudian direndam dengan buffer sitrat 0,01 M, pH 6,0. Kemudian dipanaskan di dalam *microwave* selama 15 menit, mula-mula dengan pemanasan tinggi (80°C), kemudian dengan pemanasan sedang (50°C) selama 5 menit.

- 7) Preparat kemudian didinginkan pada suhu kamar selama kurang lebih 30 menit dan dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2x, masing-masing 10 menit.
- 8) Antibodi primer VEGF-A (abcam: ab1316) ditetaskan sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar atau semalaman pada suhu 4°C.
- 9) Selanjutnya, preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 2x, masing-masing selama 10 menit.
- 10) *Biotinlated anti-polyvalent* kemudian ditetaskan pada preparat dan didiamkan selama 10 menit.
- 11) Setelah 10 menit, preparat dicuci dengan *buffer saline* sebanyak 2x, masing-masing 10 menit.
- 12) Kemudian, ditetaskan *streptavidin peroxidase* dan didiamkan 10 menit.
- 13) Preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 2x, masing-masing 10 menit.
- 14) Preparat selanjutnya ditetaskan dengan reagen DAB selama 10 menit.
- 15) Kemudian, dicuci dengan air mengalir dan dilakukan *Counterstain* dengan hematoksilin mayer selama 2 menit.
- 16) Preparat dicuci kembali dengan air mengalir dan dilakukan proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 96%) masing-masing sebanyak 2x selama 3 menit.

17) Langkah terakhir, preparat dicelupkan ke dalam *xylol* sebanyak 3x, masing-masing selama 3 menit dan ditutup dengan *cover glass* untuk selanjutnya dapat diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 dan 400x.



Gambar 7. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

- K- : Kelompok kontrol negatif (kelompok tikus sehat, yaitu tidak diberikan HFD-STZ-NA dan tidak diberikan intervensi jus buah CP ataupun rutin murni)
- K+ : Kelompok kontrol positif (kelompok tikus DM tipe 2 yang tidak diberikan intervensi jus buah CP ataupun rutin murni)
- X1 : Kelompok tikus DM tipe 2 yang diberikan jus buah CP dengan dosis 4 ml/200 gram BB/hari selama 30 hari

- X2 : Kelompok tikus DM tipe 2 yang diberikan jus buah CP dengan dosis 8 ml/200 gram BB/hari selama 30 hari
- X3 : Kelompok tikus DM tipe 2 yang diberikan rutin murni dengan dosis 10 mg/200 gram BB/hari selama 30 hari
- O1-O5 : Hasil pemeriksaan ekspresi VEGF-A pada organ ginjal, kadar GDP, dan TNF- α

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada (UGM), Yogyakarta-Indonesia.

3.3.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah blok parafin jaringan ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang sesuai dengan kriteria sampel yang telah ditentukan. Proses penelitian yang sudah dilakukan menggunakan total sampel yang sesuai dengan standar WHO, yaitu 5 ekor tikus pada tiap kelompok dan 1 ekor tikus sebagai cadangan, sehingga besar total sampel blok parafin jaringan ginjal tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 5 blok parafin pada tiap kelompok, dengan total sampel penelitian 25 blok parafin jaringan ginjal tikus (5 kelompok) dan 5 blok parafin jaringan ginjal tikus yang berasal dari kelompok cadangan. Kelompok cadangan digunakan untuk

menghindari kurangnya jumlah sampel jika terdapat blok parafin yang dikeluarkan dari sampel penelitian berdasarkan kriteria eksklusi.⁸⁰

3.3.3 Kriteria Sampel

Pemilihan sampel dilakukan mengikuti kriteria-kriteria berikut:

1. Kriteria Inklusi:

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Tikus sehat (kondisi yang aktif bergerak)
- c. Usia 2 bulan
- d. Berat badan 150-250 gram

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mengalami cacat fisik
- b. Tikus mengalami luka infeksi

3. *Drop out*

- a. Tikus mati selama perlakuan
- b. Tikus mengalami diare selama proses penelitian
- c. Tikus tidak aktif selama proses induksi *streptozotosin* (STZ)

3.4 Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas dari penelitian ini adalah Jus CP.
- 2) Variabel terikat dari penelitian ini adalah ekspresi VEGF ginjal, GDP, dan TNF- α .

3.5 Definisi Operasional

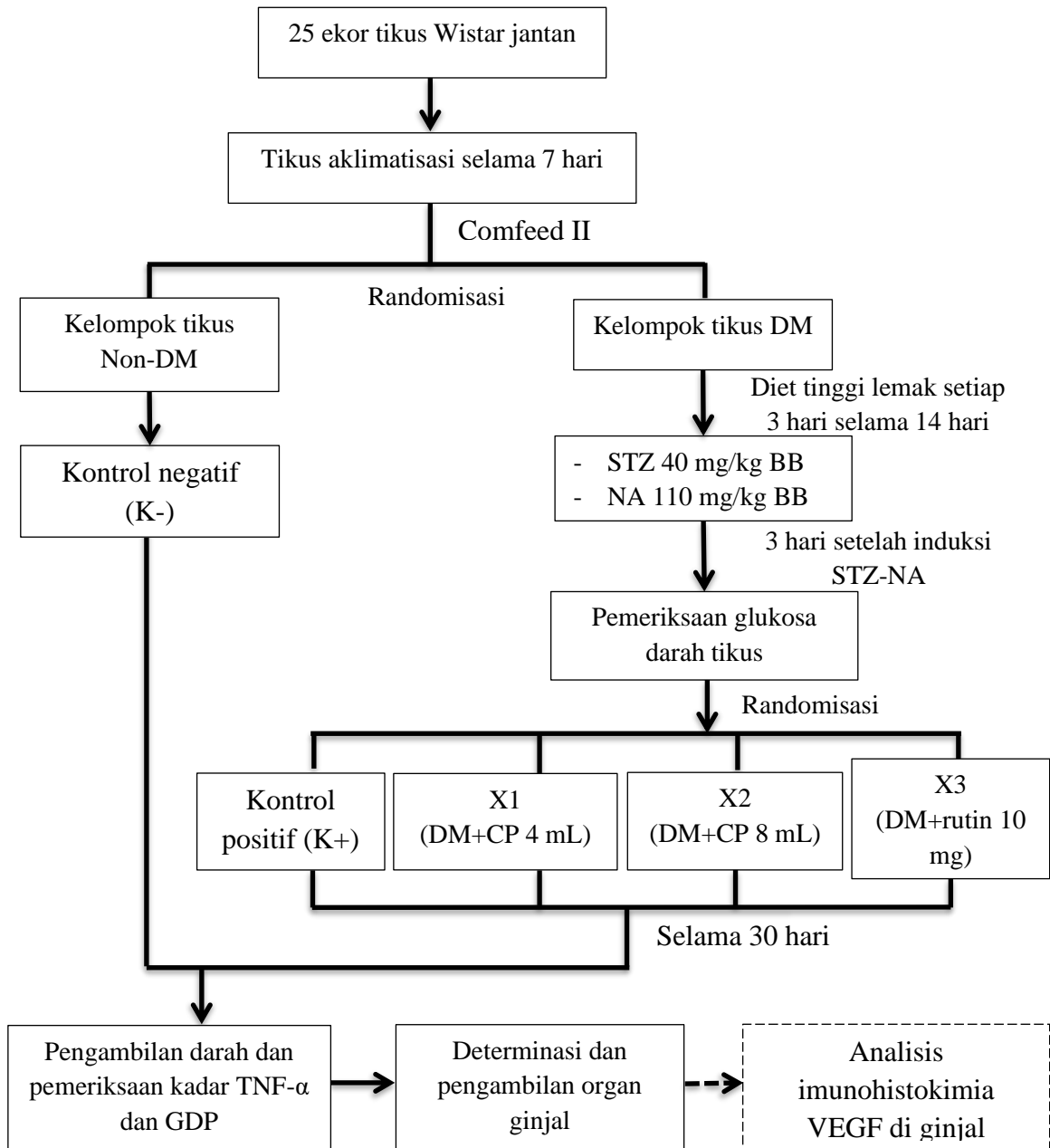
No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Satuan	Skala
1	Jus Buah CP	Pemberian jus buah CP secara oral dengan dosis: a. 4 ml/200 gram BB/hari b. 8 ml/200 gram BB/hari	Penentuan dosis jus buah CP berpedoman pada pengamatan penelitian sebelumnya ²⁸	mL/200 gram BB	Ordinal
2	Ekspresi VEGF	Ekspresi VEGF di tubulus organ ginjal pada tikus yang telah diberikan perlakuan.	-Pemeriksaan dilakukan dengan metode imunohistokimia. -Pengamatan dilakukan di bagian tubulus ginjal pada seluruh lapang pandang yang tersedia dalam satu preparat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran lensa objektif 100 dan 400x. -Penilaian ekspresi VEGF diukur dengan menilai proporsi dan intensitas VEGF oleh 2 ahli patologi anatomi.	Evaluasi pewarnaan dinilai berdasarkan proporsi sel yang terpulsa dan intensitas pewarnaan ^{68,69,81} . Proporsi: 0 : <10% sel terpulsa 1 : 11-20% sel terpulsa 2 : 21-50% sel terpulsa 3 : >50% sel terpulsa Intensitas: 0 : Negatif 1 : Lemah 2 : Sedang 3 : Kuat Nilai proporsi dan intensitas kemudian dikalikan dan hasilnya terbagi menjadi tiga subklasifikasi: 1-3 : Imunoreaktif rendah 4-6 : Imunoreaktif sedang 7-9 : Imunoreaktif tinggi	Interval
3	Kadar GDP	Kadar glukosa darah puasa serum pada tikus yang dipuaskan selama 6-8 jam.	Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan metode GOD-PAP dan data diperoleh dari hasil peneliti sebelumnya. ²⁸	mg/dL	Rasio
4	Kadar TNF- α	Kadar TNF- α yang diukur setelah intervensi selama 30 hari selesai.	Pemeriksaan kadar TNF- α serum diukur dengan menggunakan teknik ELISA dan data diperoleh dari hasil peneliti sebelumnya. ²⁸	pg/mL	Rasio

3.6 Pengolahan dan Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh berupa data primer skor ekspresi VEGF di ginjal dan data sekunder berupa hasil kadar glukosa darah puasa dan TNF- α . Selanjutnya dilakukan *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisis data dilakukan dengan program komputer dan data kemudian disajikan dalam tabel untuk melihat karakteristik tiap set data.

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, didapatkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*. Perbedaan dianggap bermakna bila nilai $p < 0,05$ (tingkat kepercayaan 95%) dan bila didapati hasil bermakna, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk menganalisis perbedaan antar perlakuan. Uji statistik untuk mengetahui hubungan antara ekspresi VEGF-A terhadap kadar GDP dan TNF- α menggunakan uji *Kendall-Tau*.

3.7 Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

Keterangan:

— : Proses yang sudah dilakukan sebelumnya

- - - : Proses yang dilakukan pada penelitian ini

3.8 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang No. 24/EC/H/FK-UNDIP/III/2021.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Gambaran Umum Penelitian

Proses penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret (Surakarta). Proses yang dilakukan meliputi pembuatan preparat imunohistokimia (IHK). Sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan blok parafin organ ginjal tikus yang sebelumnya telah diberikan perlakuan berupa pemberian jus buah CP dengan dosis 4 mL/200 gram BB, 8 mL/200 gram BB atau 10 mg/200 gram BB rutin murni yang berasal dari penelitian sebelumnya oleh Kusuma *et al* (2020). Proses perlakuan hewan coba yang dilakukan pada penelitian ini meliputi dengan proses aklimatisasi, induksi DM tipe 2 dengan HFD-STZ-NA, pengambilan darah, pemberian perlakuan yang sesuai dengan kelompok, terminasi hewan coba, pengambilan organ ginjal dan prosesing jaringan menjadi blok parafin.²⁸

Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan di awal penelitian untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan memenuhi syarat kriteria inklusi. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap minggu selama masa aklimatisasi dan pemberian HFD. Berat badan tikus sebelum perlakuan didapatkan dengan menimbang berat badan tikus yang dilakukan tiga hari setelah tikus diinduksi STZ. Selama masa intervensi, penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap tiga hari sekali.

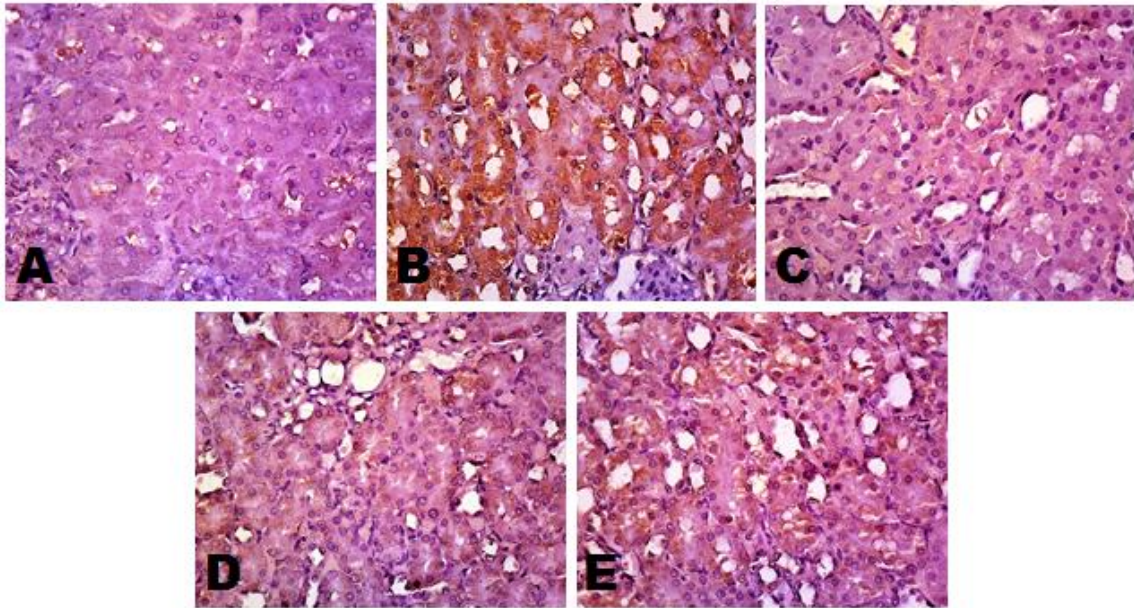
Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini memiliki rerata berat badan awal 171,52 g. Rerata berat badan hewan coba setelah pemberian HFD adalah 213,35 g, sedangkan rerata berat badan tikus setelah diinduksi STZ adalah 196,2 g. Selanjutnya, seluruh hewan coba yang diinduksi dikategorikan mengalami DM tipe 2 karena memiliki kadar glukosa darah puasa (GDP) >200 mg/dl, dengan rerata kadar GDP hewan coba setelah diinduksi adalah 272,93 mg/dl²⁸.

Buah CP yang digunakan pada penelitian ini berasal dari daerah Dieng, Wonosobo, Jawa Tengah. Jus buah CP yang digunakan pada penelitian ini dibuat baru setiap pagi selama 30 hari masa intervensi. Proses pembuatan jus buah CP dimulai dengan membersihkan daging buah dari kulit dan bijinya. Kemudian, daging buah dipotong-potong dan di-*blancing* pada suhu 60 °C selama 3 menit untuk menghilangkan getah dan melunakan tekstur buah. Setelah itu, daging buah diolah menjadi jus dengan menggunakan *blender* dan *homogenizer*. Jus buah CP yang dihasilkan memiliki tekstur yang sedikit kental namun masih bisa diberikan melalui sonde kepada hewan coba. Buah CP yang digunakan pada penelitian ini memiliki kandungan rutin sebesar 13,63 ug/g berat basah, flavonoid sebesar 141,24 ug/g berat basah atau 188,14 mg/100 g berat kering²⁸.

4.2 Ekspresi VEGF

Pengamatan ekspresi VEGF pada organ ginjal dilakukan setelah hewan coba diberikan intervensi yang sesuai dengan kelompoknya dan dilakukan terminasi, serta pengambilan organ ginjal untuk selanjutnya dapat dilakukan

processing jaringan dan pengecatan. Pengamatan dilakukan pada seluruh bagian ginjal (glomerulus dan tubulus) dan diamati pada seluruh lapangan pandang.



Gambar 9. Hasil pewarnaan imunohistokimia ekspresi VEGF di ginjal pada tiap kelompok

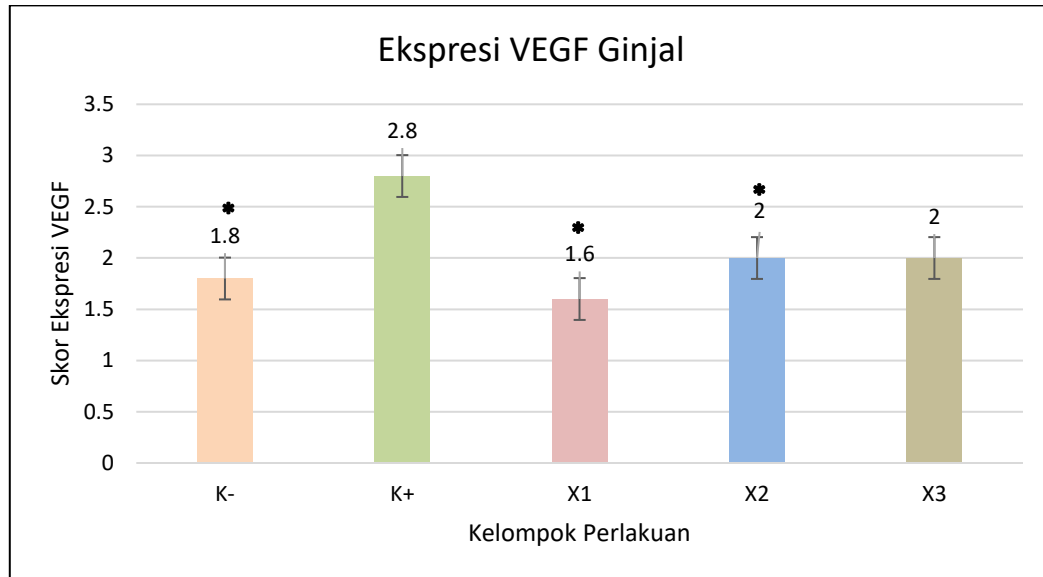
Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 100 dan 400x pada seluruh bagian dan lapang pandang dalam satu preparat. Ekspresi VEGF (terwarnai cokelat gelap pada bagian tubulus ginjal) yang dominan pada kelompok kontrol positif (K+), yang diikuti oleh kelompok pemberian rutin murni 10 mg/200 g BB (X3), kelompok pemberian jus buah CP 8 mL/200 g BB (X2), kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok pemberian jus buah CP 4 mL/200 g BB (X1). Tingkat imunoreaktivitas ditentukan berdasarkan perkalian antara skor proporsi dan intensitas.

Hasil pewarnaan ekspresi VEGF dapat dilihat pada Gambar 9 menunjukkan bahwa pewarnaan ekspresi VEGF lebih terkonsentrasi pada bagian tubulus, ini disebabkan karena sel epitel tubulus merupakan lokasi utama tempat

ekspresi VEGF bersama dengan podosit. Pada Gambar 9, dapat terlihat bahwa tingkat imunoreaktif tinggi (rerata) terjadi pada kelompok kontrol positif (K+), sedangkan pada kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok perlakuan (X1, X2 dan X3) memiliki rerata tingkat imunoreaktif sedang. Berdasarkan hasil penilaian didapatkan hasil dengan rerata skor ekspresi VEGF pada kelompok kontrol negatif (K-) adalah 1,8; pada kelompok kontrol positif (K+) adalah 2,8; pada kelompok pemberian jus buah CP dengan dosis 4 mL/200 g BB/hari (X1) adalah 1,6 dan pada kelompok pemberian jus buah CP dengan dosis 8 mL/200 g BB/hari (X2) adalah 2,0; serta pada perlakuan rutin murni dengan dosis 10 mg/200 g BB/hari (X3) adalah 2,0.

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* dilakukan pada data yang diperoleh dari seluruh kelompok perlakuan, pada uji ini didapati nilai signifikansi $p < 0,05$ yang berarti dapat disimpulkan bahwa data yang diperoleh tidak berdistribusi normal. Berdasarkan hasil tersebut, uji statistik *Kruskal-Wallis* dipilih untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi VEGF ginjal yang signifikan pada seluruh kelompok.

Hasil yang didapatkan dari uji statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ yang bermakna bahwa terdapat perbedaan ekspresi VEGF ginjal yang signifikan antar dua kelompok atau lebih. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui antar kelompok mana yang memiliki perbedaan secara signifikan.



Gambar 10. Rerata skor ekspresi VEGF

Error bars mengindikasikan *standard error* dari rerata tiap kelompok.

Tanda (*) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (K+) dengan uji *Mann-Whitney*

Berdasarkan Gambar 10, dapat terlihat rerata skor ekspresi VEGF ginjal paling tinggi terjadi pada kelompok K+ dan ikutin dengan kelompok X3, X2, K- dan X1. Hasil uji *Mann-Whitney* pada Gambar 10 menunjukkan bahwa terdapat hasil ekspresi VEGF ginjal yang signifikan antara kelompok K-/X1/X2 terhadap kelompok K+. Perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok kontrol negatif (K-) bermakna bahwa perlakuan yang dilakukan kepada kelompok kontrol positif telah berhasil untuk meningkatkan ekspresi VEGF pada organ ginjal hewan coba. Perbedaan yang signifikan ini dapat terjadi karena induksi HFD-STZ-NA yang menyebabkan hewan coba mengalami DM tipe 2, kondisi ini menimbulkan terjadinya peningkatan ekspresi VEGF di ginjal

akibat dari gangguan metabolik yang ditimbulkan. Berdasarkan penelitian Nakagawa *et al.*, pemodelan tikus DM dengan induksi STZ diketahui mampu meningkatkan ekspresi VEGF ginjal tikus pada hari ke-10 dan 50.⁶⁰ Peningkatan ekspresi VEGF pada kondisi DM tipe 2 disebabkan karena hiperglikemia, inflamasi, senyawa radikal bebas, hipoksia dan kerusakan sel yang rentan terjadi pada penderita DM tipe 2.^{1,16}

Perbedaan yang signifikan juga terjadi antara kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan X1 dan X2. Rendahnya ekspresi VEGF ginjal pada kelompok X1 dan X2 dapat disebabkan karena pada kelompok ini dilakukan upaya perbaikan kondisi dengan pemberian jus buah CP. Hal ini diduga dapat terjadi karena senyawa flavonoid yang terkandung pada buah CP seperti rutin dan kuersetin diketahui memiliki manfaat sebagai anti-hiperglikemi dan anti-inflamasi sehingga mampu mencegah terjadinya kerusakan sel akibat inflamasi ataupun stres oksidatif pada kondisi DM. Penurunan aktivitas inflamasi dan radikal bebas akibat pemberian jus CP diduga dapat mencegah terjadinya aktivasi jalur NF- κ B, MAPK dan HIF yang mampu menginduksi peningkatan ekspresi VEGF. Hasil ini sejalan dengan penelitian Luo *et al* (2008) dan Guruvayoorappan *et al* (2007) yang menunjukkan bahwa pemberian senyawa flavonoid seperti rutin dan kuersetin mampu menurunkan ekspresi VEGF pada kultur sel.^{30,31}

Tabel 2. Hasil uji statistik *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*

Kelompok Perlakuan	Ekspresi VEGF (Rerata±SD)	Nilai $p^{\#}$				
		K-	K+	X1	X2	X3
K-	1,8±0,447	-	**0,015	0,513	0,317	0,606
K+	2,8±0,447		-	**0,014	**0,014	0,065
X1	1,6±0,548			-	0,134	0,339
X2	2,0±0,000				-	1,000
X3	2,0±0,707					-
p^*	**0,023					

p^* = Nilai Uji *Kruskal-Wallis*

$p^{\#}$ = Nilai Uji *Mann-Whitney*

** = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Pada Tabel 2 menunjukkan perbedaan ekspresi VEGF ginjal yang tidak signifikan antara kelompok K+ dengan kelompok X3 ($p > 0,05$). Meskipun kelompok X3 memiliki nilai rerata ekspresi VEGF ginjal yang lebih rendah dibandingkan kelompok K+, perbedaan yang tidak signifikan ini mungkin dapat terjadi dikarenakan dosis yang digunakan masih belum mampu memberikan pengaruh yang cukup untuk menghasilkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K+. Selain itu, bila melihat hasil yang signifikan antara kelompok K+ dengan kelompok X1 dan X2, perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok K+ dan X3 juga mungkin dapat terjadi karena pemberian senyawa rutin saja belum mampu untuk mengatasi seluruh masalah metabolik yang timbul pada kondisi DM tipe 2, terutama pada masalah peningkatan ekspresi VEGF di ginjal. Hasil ini

berbeda dengan kelompok X1 dan X2 yang diberikan jus buah CP yang memiliki kandungan senyawa fitokimia yang lebih beragam seperti rutin, kuersetin dan vitamin C yang masing-masing senyawa diketahui memiliki manfaat untuk mengatasi masalah metabolik yang ditimbulkan pada kondisi DM tipe 2 seperti peningkatan kadar glukosa dan inflamasi, yang mampu memicu peningkatan ekspresi VEGF.^{26,29,30,82} Sehingga, pemberian jus buah CP lebih mampu bersinergi untuk menangani masalah metabolik yang berperan terhadap peningkatan ekspresi VEGF di ginjal pada kondisi DM tipe 2.

Hasil uji *Mann-Whitney* pada Tabel 2 juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan terjadi antara kelompok perlakuan X1 dan X2. Perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok X1 dan X2 memiliki makna bahwa kelompok X1 dan X2 memiliki manfaat yang sama baiknya atau setara dalam menurunkan ekspresi VEGF di ginjal pada kondisi hewan coba DM tipe 2. Kondisi ini memungkinkan untuk dapat terjadi karena semakin tinggi dosis tidak selalu sejalan dengan semakin tingginya efek terapeutik yang dihasilkan. Hasil ini mengindikasikan bahwa dosis jus CP 4 mL/200 g BB merupakan dosis yang lebih optimum dibandingkan dengan dosis 8 mL/200 g BB. Hal ini juga diperkuat dengan hasil yang tidak signifikan antara kelompok K- dan kelompok X1 yang menunjukkan bahwa dosis 4 mL/200 g BB jus buah CP mampu menurunkan ekspresi VEGF di ginjal sampai setara dengan kelompok kontrol atau hewan coba sehat. Sehingga, dapat diartikan bahwa pemberian jus buah CP dengan dosis 4

mL/200 g BB merupakan dosis minimum dengan efek maksimum yang mampu menurunkan ekspresi VEGF di ginjal pada tikus DM tipe 2.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Beu *et al* (2014) yang menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol tunas pisang goroho (*Musa acuminata L.*) dengan dosis 0,22 g/kgBB dan dosis 0,55 g/kgBB tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar glukosa darah dan bahkan memiliki tren pengaruh yang menurun.⁸³ Pada penelitian Kurniawan *et al* (2014) juga menunjukkan peningkatan dosis tidak selalu disertai dengan peningkatan efek yang signifikan atau bahkan justru menunjukkan penurunan efek terapeutik. Pada penelitian ini dilakukan pemberian ekstrak daun binahong dengan dosis 25,2 mg/200 g BB, 50,4 mg/200 g BB dan 100,8 mg/200 g BB terhadap efek anti-inflamasi dan menunjukkan bahwa pemberian dengan dosis 50,4 mg/200 g BB merupakan dosis dengan efek yang signifikan lebih baik dibandingkan kelompok lainnya.⁸⁴

Meskipun pada penelitian ini menunjukkan penggunaan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi VEGF adalah dengan dosis 4 mL/200 g BB, namun karena pada penelitian ini hanya menggunakan 2 kelompok dosis pemberian jus buah CP, maka tidak menutup kemungkinan bahwa dosis minimum dengan efek maksimum yang sebenarnya adalah dibawah 4 mL/200 g BB. Selain bermanfaat dari segi biaya, sumber daya dan efisiensi, penggunaan obat atau terapi yang menerapkan dosis optimal (dosis minimum dengan efek maksimum) juga memiliki manfaat dalam segi keamanan.⁸⁵ Hal ini karena pada dosis yang lebih tinggi juga

memiliki kemungkinan untuk mengandung zat lain yang memiliki efek buruk/antagonis dalam jumlah efektif yang memadai, sehingga menghasilkan efek terapeutik yang lebih lemah atau bahkan dapat memperburuk suatu kondisi. Kejadian seperti ini sering ditemukan pada aktivitas obat yang menggunakan bahan alam yang masih mengandung multisenyawa, dimana komponen senyawa yang terkandung di dalamnya dapat saling berinteraksi secara sinergis ataupun antagonis.⁸⁶ Selain itu, pemberian obat dengan dosis tinggi juga dapat meningkatkan interaksi senyawa obat dengan reseptor non-target yang dapat menimbulkan efek yang tidak diinginkan.⁸⁵ Sehingga, pemberian dengan dosis yang lebih besar belum tentu menghasilkan pengaruh terapeutik yang signifikan atau bahkan mampu memperparah suatu kondisi tergantung dari bagaimana interaksi senyawa yang terbentuk.^{84,86}

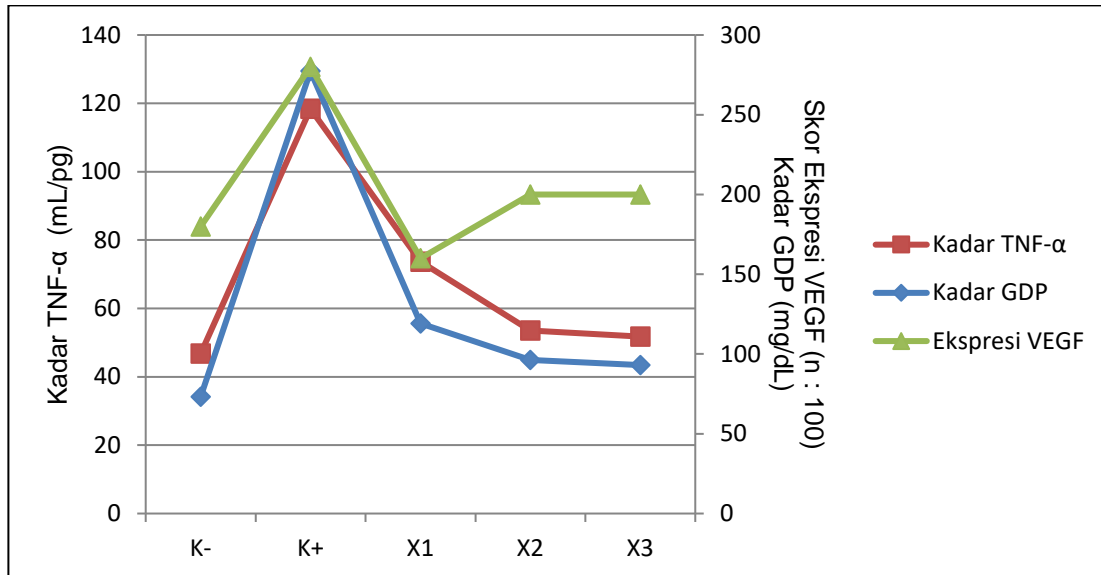
4.3 Hubungan Ekspresi VEGF dengan Kadar GDP dan TNF- α

Penelitian yang sudah dilakukan oleh Kusuma *et al* (2020) sebelumnya memiliki hasil bahwa pemberian jus buah CP atau rutin mampu secara signifikan menurunkan kadar GDP dan TNF- α pada tikus DM tipe 2. Pemberian jus buah CP dengan dosis 8 mL/200 g BB memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan pemberian dosis 4 mL/200 g BB, namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap pemberian 10 mg/200 g BB dosis rutin murni. Hasil ini memiliki makna bahwa pemberian jus buah CP dengan dosis 8 mL/200 g BB memiliki efek terapeutik yang sama dengan pemberian 10 mg/200 g BB dosis rutin murni, serta

kedua pemberian tersebut memiliki efek terapeutik yang lebih baik secara signifikan dibandingkan dengan pemberian jus buah CP dengan dosis 4 mL/200 g BB²⁸.

Penurunan kadar GDP setelah pemberian jus buah CP dapat terjadi karena pada buah CP mengandung berbagai senyawa yang memiliki manfaat untuk menurunkan kadar glukosa darah. Senyawa flavonoid, rutin, asam kafeat dan asam klorogenat yang terkandung pada jus buah CP diduga mampu menurunkan kadar glukosa dengan mengurangi penyerapan glukosa di usus halus dan menghambat kerja enzim α -amilase dan α -glukosidase. Selain itu, senyawa tersebut juga mampu meregenerasi dan melindungi sel- β pankreas dari glukotoksisitas, sehingga mampu meningkatkan sekresi insulin, serta dapat meningkatkan translokasi GLUT-4 untuk *uptake* glukosa ke dalam sel.^{32,87-90}

Pemberian jus buah CP juga menunjukkan penurunan kadar TNF- α yang diduga dapat terjadi karena kandungan senyawa flavonoid, kuersetin dan vitamin C di dalam jus buah CP yang mampu berperan sebagai anti-inflamasi dan antioksidan.^{27,77} Selain itu, senyawa rutin dan asam kafeat yang terkandung di dalam buah CP juga mampu menghambat ekspresi gen sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- α .^{32,91} Senyawa rutin juga dapat menghambat pembentukan AGEs yang mampu menyebabkan peningkatan sitokin pro-inflamasi dan kematian sel.^{88,92}



Gambar 11. Grafik Rerata Ekspresi VEGF Ginjal, Kadar GDP dan TNF- α

Grafik pada Gambar 11 menunjukkan bahwa rerata antara skor ekspresi VEGF ginjal, kadar GDP dan kadar TNF- α memiliki pola yang serupa, hal ini mengindikasikan bahwa ketiganya memiliki arah hubungan yang positif (searah). Pada kelompok kontrol negatif (K-) terlihat bahwa baik skor ekspresi VEGF, kadar GDP dan TNF- α memiliki skor/kadar yang rendah. Ketiganya sama-sama memiliki pola peningkatan grafik pada kelompok kontrol positif (K+) dan grafik kembali menurun pada kelompok X1. Perbedaan pola grafik terjadi pada kelompok X2, dimana pada skor ekspresi VEGF pola grafik justru mengalami peningkatan kembali dan selanjutnya mengalami pola datar pada kelompok X3. Sedangkan grafik kadar GDP dan TNF- α pada kelompok X2 menunjukkan pola penurunan dan selanjutnya sedikit menurun lagi pada kelompok X3.

Tabel 3. Hasil Uji Korelasi *Kendall-Tau*

	Kadar GDP	Kadar TNF-α
r	0,289	0,348
Ekspresi VEGF	p	*0,034
	n	25

r = koefisien korelasi

p = nilai signifikansi

* = signifikan ($p < 0,05$)

n = jumlah sampel

Berdasarkan uji statistik korelasi *Kendall-Tau* pada Tabel 3, didapatkan hasil bahwa antara kadar GDP dan ekspresi VEGF memiliki hubungan yang tidak signifikan ($p > 0,05$) dengan nilai koefisiensi 0,289 (lemah) dan arah hubungan yang positif. Hasil ini bermakna bahwa pada pemberian jus buah CP, penurunan kadar GDP tidak selalu diikuti dengan penurunan ekspresi VEGF dan berlaku juga untuk sebaliknya. Hasil ini tidak sejalan dengan beberapa studi sebelumnya yang menunjukkan hubungan yang signifikan antara kondisi hiperglikimia dan ekspresi VEGF.¹⁷ Perbedaan hasil pada penelitian ini diduga dapat disebabkan karena pada penelitian ini dilakukan intervensi dengan pemberian jus buah CP yang mungkin dapat menyebabkan perbaikan ekspresi VEGF melalui jalur-jalur lain.

Beberapa faktor lain seperti hipoksia, kerusakan sel atau inflamasi juga dapat mempengaruhi ekspresi VEGF.^{1,16} Sehingga, hubungan yang tidak signifikan ini mungkin dapat disebabkan karena selain memiliki manfaat sebagai anti-hiperglikemi, jus buah CP juga memiliki manfaat sebagai anti-inflamasi

dan antioksidan.^{26-29,82} Hal ini mengakibatkan terjadinya perbedaan derajat efektivitas karena berbagai senyawa yang terkandung pada buah CP mampu bersinergi menurunkan ekspresi VEGF dari berbagai faktor, sehingga menyebabkan korelasi kadar GDP dan ekspresi VEGF menjadi tidak signifikan.

Di sisi lain, korelasi antara ekspresi VEGF dan kadar TNF- α yang juga terlihat pada tabel 3 menunjukkan adanya korelasi yang signifikan dengan nilai koefisiensi 0,348 (lemah) dan memiliki arah hubungan yang positif. Hasil ini bermakna bahwa pada pemberian jus buah CP, penurunan kadar TNF- α akan disertai dengan penurunan ekspresi VEGF ginjal dan juga sebaliknya. Hal ini dapat terjadi karena keduanya sama-sama berperan pada proses inflamasi dan angiogenesis, serta memiliki beberapa jalur aktivasi yang sama, seperti jalur NF- κ B dan MAPK.^{93,94}

Peningkatan aktivitas jalur NF- κ B merupakan penyebab terjadinya inflamasi kronis pada kondisi DM, aktivitas jalur ini menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan faktor pertumbuhan seperti VEGF.⁹⁵⁻⁹⁷ Peningkatan TNF- α dan ekspresi VEGF juga dapat terjadi melalui jalur MAPK. Peningkatan senyawa radikal bebas pada kondisi DM mampu menstimulus fosforilasi MAPKKK dan mengaktivasi MAPKK yang kemudian akan memfosforilasi dan mengaktivasi MAPK. Aktivasi ini akan mengakibatkan terjadinya peningkatan TNF- α dan ekspresi VEGF.⁹⁶⁻⁹⁸

Senyawa anti-inflamasi dan antioksidan yang terkandung di dalam jus buah CP seperti flavonoid dan vitamin C diduga berperan dalam mencegah terjadinya

kerusakan sel akibat inflamasi ataupun radikal bebas yang diikuti dengan penurunan ekspresi VEGF ginjal pada kondisi DM. Senyawa flavonoid seperti kuersetin diketahui dapat menghambat aktivitas COX-2, NF- κ B, AP-1, MAPK dan PKC yang terlibat dalam peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan faktor pertumbuhan seperti VEGF.⁹⁹

Selain itu, penurunan kadar glukosa karena efek senyawa anti-hiperglikemi pada jus buah CP juga diduga ikut berperan dalam menurunkan inflamasi dan radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya aktivasi jalur NF- κ B, MAPK, HIF dan jalur lainnya yang mampu meningkatkan sitokin pro-inflamasi dan faktor pertumbuhan pada kondisi DM. TNF- α yang merupakan sitokin pro-inflamasi juga dapat memicu ekspresi VEGF sebagai upaya perbaikan dari kerusakan sel yang muncul pada saat terjadinya inflamasi.^{18,93} Kondisi ini menyebabkan pemberian jus buah CP pada tikus DM dapat mengakibatkan penurunan kadar sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang beriringan dengan penurunan ekspresi VEGF.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian diet tinggi lemak dan *nicotinamide-streptozotocin* mampu meningkatkan ekspresi VEGF di ginjal tikus Wistar kelompok DM tipe 2 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.
2. Pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 g BB/hari dan 8 mL/200 g BB/hari mampu menurunkan ekspresi VEGF di ginjal tikus DM tipe 2 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.
3. Pemberian rutin murni dengan dosis 10 mg/200 g BB/hari tidak mampu menurunkan ekspresi VEGF di ginjal pada tikus DM tipe 2.
4. Pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis 4 mL/200 g BB/hari memiliki pengaruh yang setara dengan pemberian dosis 8 mL/200 g BB/hari, dan lebih baik dibandingkan pemberian rutin murni dengan dosis 10 mg/200 g BB/hari dalam menurunkan ekspresi VEGF.
5. Penurunan ekspresi VEGF di ginjal memiliki hubungan terhadap penurunan kadar TNF- α , namun tidak berhubungan terhadap penurunan kadar GDP pada tikus DM tipe 2 yang diberikan pemberian jus buah *Carica pubescens* atau rutin murni.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat bagaimana pengaruh pemberian jus buah *Carica pubescens* dengan dosis yang lebih rendah untuk penentuan dosis minimum yang masih memiliki efek maksimum terhadap ekspresi VEGF di ginjal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek kombinasi pemberian jus buah *Carica pubescens* dan obat anti-hiperglikemia yang umum dikonsumsi pada penderita DM tipe 2 terhadap ekspresi VEGF di ginjal.

BAB VI

RINGKASAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan kelainan vaskular dan metabolik yang secara klinis ditandai dengan hiperglikemia kronis akibat gangguan dari metabolisme karbohidrat, lemak dan protein.^{100,101} Penderita DM memiliki risiko komplikasi yang lebih tinggi apabila tidak melakukan kontrol diabetes yang baik. Kadar glukosa darah yang tinggi (hiperglikemi) dan berlangsung lama adalah penyebab terjadinya kerusakan jaringan, hal tersebut terjadi karena glukosa mampu mempengaruhi fungsi dan struktur dari jaringan tubuh serta protein dalam sel.¹ Perubahan sistemik yang terjadi pada kondisi hiperglikemi dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan inflamasi vaskular yang mengakibatkan terjadinya hipoksia sel dan kerusakan jaringan.²

Diabetes Nefropati (DN) merupakan salah satu komplikasi yang sering terjadi pada penderita diabetes tipe 2 (30-40%).¹ Penyakit ini terjadi akibat disfungsi endotel dan respon angiogenik yang tidak seimbang.³ Pada kondisi ini, terjadi perubahan yang diawali dengan pembesaran ukuran ginjal, hiperfiltrasi glomerulus dan peningkatan matriks ekstraseluler.⁴ Beberapa hormon pertumbuhan sangat berperan terhadap patogenesis diabetik nefropati, seperti insulin, *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF-B) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).⁵

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) berperan dalam banyak patogenesis penyakit ginjal, termasuk pada DN. VEGF merupakan sinyal protein yang berperan untuk menginduksi terjadinya vaskulogenesis dan angiogenesis.^{9,10,11} Peningkatan ekspresi VEGF menjadi penanda ketika terjadi kerusakan sel endotel akibat proses inflamasi atau stres oksidatif, sebagai respon untuk membentuk pembuluh darah baru.^{12,13} Produksi VEGF yang tepat bermanfaat untuk memelihara struktur dan fungsi glomerular. Tetapi, kelebihan dari ekspresi VEGF justru memicu angiogenesis yang abnormal.¹⁴ Beberapa mediator mengakibatkan terjadinya peningkatan ekspresi VEGF pada ginjal di fase awal diabetik nefropati, seperti hiperglikemia yang menyebabkan hipoksia, angiotensin, *reactive oxygen species* (ROS) dan AGEs.^{15,16}

Kondisi hiperglikemi mampu merangsang produksi VEGF di podosit dan tubulus melalui aktivasi PKC, ROS dan jalur *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dengan mengatur Angiotensin II pada sel tubulus proksimal. Tingkat VEGF mRNA juga diatur oleh AGEs melalui faktor transkripsi seperti *nuclear factor-kappa beta* (NF- κ) dan aktivator protein-1 (AP-1). Selain itu, *transforming growth factor-B1* (TGF-B 1) yang diekspresikan dalam sel endotel glomerulus diabetes dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang diekspresikan melalui faktor transkripsi NF- κ juga mampu meningkatkan ekspresi protein VEGF.^{16,18,19} TNF- α merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan penting pada proses inflamasi vaskuler dan aterosklerosis.²⁰ Peningkatan stres oksidatif seperti ROS dan RNS yang berasal dari Angiotensin II, oksidasi glukosa dan AGEs pada

penderita DM dapat meningkatkan VEGF dengan menstabilkan *Hypoxia-Inducible Factor-1a*.¹

Ekspresi berlebihan dari VEGF akan mengubah sinyal-sinyal intra dan interseluler yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel-sel yang mengekspresikan VEGFR seperti podosit, sel endotel dan sel-sel mesangial²¹ yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi ginjal, seperti hipertropi glomerulus, glomerulosklerosis, proteinuria, pembesaran mesangial, sklerosis mesangial dan sel endotel.^{10,22,3} Hipoksia merupakan penyebab utama terjadinya sekresi VEGF. Tikus yang mengalami DM akibat induksi *streptozotosin* (STZ) akan menurunkan pO₂ pada medula ginjal, sehingga mengakibatkan hipoksia yang diinduksi oleh *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF), dimana faktor ini mengatur transkripsi VEGF mRNA.²³

Carica pubescens (CP) adalah tanaman khas yang tumbuh pada dataran tinggi dan kaya dengan kandungan vitamin C yang bermanfaat sebagai antioksidan. Di Indonesia tanaman ini dapat ditemukan di daerah dataran tinggi Dieng.²⁴ Pada buah CP terkandung senyawa flavonoid yang dapat bertindak sebagai antioksidan, seperti kuersetin.²⁵ Selain itu, di dalam buah CP juga mengandung senyawa rutin yang merupakan salah satu golongan flavonoid yang diketahui memiliki efek sebagai anti-inflamasi dan anti-hiperglikemi.²⁶⁻²⁹ Oleh karena itu, buah *Carica pubescens* memiliki potensi untuk dapat menurunkan ekspresi VEGF di ginjal pada penderita DM tipe 2.

Penelitian ini menggunakan 25 blok parafin organ ginjal tikus wistar jantan yang sebelumnya terbagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu: kelompok kontrol negatif (K-) yang merupakan kelompok tikus sehat atau tanpa diberikan HFD-STZ-NA dan intervensi; kelompok kontrol positif (K+) yang merupakan kelompok tikus DM tipe 2 tanpa diberikan intervensi; kelompok X1 yang merupakan kelompok tikus DM tipe 2 dengan intervensi jus buah CP dosis 4 mL/200 g BB/hari; kelompok X2 yang merupakan kelompok tikus DM tipe 2 dengan intervensi jus buah CP dosis 8 mL/200 g BB; kelompok X3 yang merupakan kelompok tikus DM tipe 2 yang diberikan intervensi 10 mg/200 g BB rutin murni.

Tahapan aklimatisasi, intervensi dan terminasi tikus sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Kusuma *et al* (2020). Pada penelitian ini melanjutkan proses yang belum dilakukan pada penelitian sebelumnya yaitu, proses mikrotomi blok parafin, proses pengecatan VEGF dan pengamatan ekspresi VEGF pada sediaan preparat. Rangkaian proses pada penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret. Proses penilaian dilakukan oleh dua orang ahli patologi yang mengamati ekspresi VEGF pada seluruh bagian dan lapang pandang preparat organ ginjal. Penilaian ekspresi VEGF pada penelitian ini menggunakan teknik skoring yang terdiri dari nilai proporsi dan intensitas. Nilai ekspresi VEGF kemudian didapatkan berdasarkan perkalian antara proporsi dan intensitas.

Berdasarkan hasil penilaian didapatkan hasil dengan rerata skor ekspresi VEGF pada kelompok K- adalah 1,8; kelompok K+ adalah 2,8; kelompok X1 adalah 1,6; kelompok X2 adalah 2 dan pada kelompok X3 adalah 2. Hasil ini menunjukkan terjadi penurunan ekspresi VEGF ginjal pada kelompok tikus yang diberikan jus buah CP dan rutin murni dibandingkan dengan kelompok kontrol. Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan hasil yang signifikan, sehingga dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk melihat signifikansi antar kelompok.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan perbedaan ekspresi VEGF di ginjal yang signifikan antara kelompok K- dan kelompok K+, yang mengindikasikan bahwa pemberian HFD-STZ-NA pada tikus kelompok K+ mampu menginduksi tikus untuk mengekspresikan VEGF ginjal yang lebih kuat dibandingkan pada kelompok K- atau tanpa induksi. Selanjutnya, hasil yang signifikan terjadi antara kelompok K+ terhadap kelompok X1 dan X2. Hasil ini bermakna bahwa pemberian jus CP dapat menurunkan ekspresi VEGF pada tikus DM tipe 2. Perbedaan yang signifikan ini dapat terjadi karena pada jus buah CP mengandung berbagai senyawa seperti flavonoid, rutin, kuersetin, vitamin C dan senyawa kompleks lain yang memiliki manfaat untuk menurunkan hiperglikemi, inflamasi dan stres oksidatif yang menjadi faktor pemicu peningkatan ekspresi VEGF pada kondisi DM tipe 2, sehingga berbagai kandungan senyawa yang terdapat dalam jus buah CP mampu bersinergi untuk menurunkan ekspresi VEGF pada ginjal.^{26,29,30,82}

Sedangkan, antara kelompok K+ dan X3 tidak menunjukkan perbedaan ekspresi VEGF yang signifikan. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena

pemberian rutin murni dengan dosis 10 mg/200 g BB masih belum mampu untuk menimbulkan efek yang signifikan terhadap kelompok K+. Perbedaan yang tidak signifikan juga terjadi antara kelompok X1 dan X2, yang menandakan bahwa pemberian jus CP dengan dosis 4 mL/200 g BB memiliki manfaat yang setara dengan pemberian jus CP dosis 8 mL/200 g BB. Hasil tersebut dapat terjadi karena peningkatan dosis tidak selalu akan disertai dengan peningkatan efek terapeutik. Kondisi ini memungkinkan untuk terjadi pada aktivitas obat yang menggunakan bahan alam yang masih mengandung multisenyawa, dimana komponen senyawa yang terkandung di dalamnya dapat saling berinteraksi secara sinergis ataupun antagonis. Sehingga, pemberian dengan dosis tinggi juga akan disertai dengan peningkatan zat lain yang memiliki efek berlawanan dalam jumlah cukup untuk mengakibatkan tidak terjadinya efek terapeutik atau bahkan mampu memperparah suatu kondisi.^{84,86}

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Kusuma *et al* (2020), menunjukkan bahwa pemberian jus buah CP atau rutin murni dapat menurunkan kadar GDP dan TNF- α pada tikus DM tipe 2. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa pemberian jus CP dengan dosis 8 mL/200 g BB memiliki kemampuan yang setara dengan pemberian rutin murni dosis 10 mg/200 g BB dalam menurunkan kadar GDP dan TNF- α , serta memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan dengan dengan dosis 4 mL/200 g BB.²⁸

Uji korelasi *Kendall-Tau* kemudian dilakukan untuk melihat bagaimana hubungan antara ekspresi VEGF ginjal dengan kadar GDP dan TNF- α .

Berdasarkan hasil uji, didapatkan hasil bahwa antara ekspresi VEGF ginjal dan kadar GDP pada pemberian jus buah CP atau rutin murni tidak memiliki hubungan yang signifikan. Hal ini diduga disebabkan karena ekspresi VEGF dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor pada kondisi DM seperti kadar glukosa darah, proses inflamasi dan stres oksidatif, sehingga memungkinkan bagi jus buah CP untuk memiliki derajat efektivitas yang berbeda terhadap kadar GDP dan VEGF.^{1,16} Kandungan berbagai senyawa yang terdapat pada buah CP yang bermanfaat sebagai antioksidan, anti-inflamasi dan anti-hiperglikemi mungkin mengakibatkan efek pemberian jus CP lebih kuat dalam menurunkan ekspresi VEGF dibandingkan efek jus CP dalam menurunkan kadar GDP.^{26-29,82}

Hubungan antara ekspresi VEGF ginjal dengan TNF- α pada hasil uji *Kendall-Tau* menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan dengan arah hubungan yang searah. Hal ini berarti, pada pemberian jus buah CP, penurunan ekspresi VEGF ginjal akan disertai dengan penurunan TNF- α dan sebaliknya. Kondisi ini mungkin disebabkan karena proses inflamasi berkaitan erat dengan proses angiogenesis, serta keduanya memiliki beberapa jalur aktivasi yang sama seperti NF- κ B dan MAPK. Senyawa anti-inflamasi dan antioksidan yang terkandung di dalam jus buah CP diduga berperan dalam mencegah terjadinya kerusakan sel akibat inflamasi ataupun radikal bebas yang rentan terjadi pada kondisi DM. Sehingga pada kondisi ini, penurunan kadar TNF- α yang merupakan sitokin pro-inflamasi akan disertai dengan penurunan ekspresi VEGF di ginjal ataupun sebaliknya.^{18,93,94}

DAFTAR PUSTAKA

1. Shi G-J, Shi G-R, Zhou J-y, Zhang W-j, Gao C-y, Jiang Y-p, et al. Involvement of growth factors in diabetes mellitus and its complications: a general review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;101:510-27.
2. Kizer JR, Umans JG, Zhu J, Devereux RB, Wolfert RL, Lee ET, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and risk of cardiovascular disease in a population with high prevalences of obesity and diabetes: the strong heart study. *Diabetes Care*. 2012;35(4):840-7.
3. Khairoun M, van den Heuvel M, van den Berg BM, Sorop O, De Boer R, van Ditzhuijzen NS, et al. Early systemic microvascular damage in pigs with atherogenic diabetes mellitus coincides with renal angiotensin dysbalance. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121555.
4. Braysh KH. Mechanism of diabetic nephropathy: Role of VEGF-A. Italy: Universita Degli Studi di Palermo; 2017.
5. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2008;4(8):444-52.
6. Hakrroush S, Moeller MJ, Theilig F, Kaissling B, Sijmonsma TP, Jugold M, et al. Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease. *The American Journal of Pathology*. 2009;175(5):1883-95.
7. Uljević MV, Bočina I, Restović I, Kunac N, Mašek T, Kretzschmar G, et al. Reabsorption in the proximal tubuli—ultrastructural evidence for a novel aspect of renal VEGF trafficking. *Cell and Tissue Research*. 2018;374(1):189-201.
8. Vallon V, Komers R. Pathophysiology of the diabetic kidney. *Comprehensive Physiology*. 2011;1(3):1175.
9. Sawatpanich T, Petpiboolthai H, Punyarachun B, Anupunpisit V. Effect of curcumin on vascular endothelial growth factor expression in diabetic mice

- kidney induced by streptozotocin. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet Thangphaet*. 2010;93:S1-8.
10. Makled AFA, Salem EHM, El-Khayat AHA, Emara MMA, El Shohady SIM. Interleukin-18 and vascular endothelial growth factor as predictors for end-stage renal disease. *Menoufia Medical Journal*. 2017;30(4):1014.
 11. Stevens M, Neal CR, Craciun EC, Dronca M, Harper SJ, Oltean S. The natural drug DIAVIT is protective in a type II mouse model of diabetic nephropathy. *PloS one*. 2019;14(3):e0212910.
 12. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part III: biomarkers of oxidative stress and angiogenic growth factors. *Circulation*. 2006;113.
 13. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation*. 2005;111.
 14. Zhang A, Fang H, Chen J, He L, Chen Y. Role of VEGF-A and LRG1 in abnormal angiogenesis associated with diabetic nephropathy. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:1064.
 15. Majumder S, Advani A. VEGF and the diabetic kidney: More than too much of a good thing. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2017;31(1):273-9.
 16. Atabaki Z, Winarto W, Kristina TN. Efek ekstrak etanol daun salam terhadap ekspresi vegf podosit glomerulus tikus diabetes melitus. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2015;28(4):263-8.
 17. Zafar MI, Mills K, Ye X, Blakely B, Min J, Kong W, et al. Association between the expression of vascular endothelial growth factors and metabolic syndrome or its components: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2018;10(1):1-17.
 18. Maloney JP, Gao L. Proinflammatory cytokines increase vascular endothelial growth factor in alveolar epithelial cells. *Hindawi*. 2015.

19. Kota SK, Meher LK, Jammula S, Kota SK, Krishna S, Modi KD. Aberrant angiogenesis: The gateway to diabetic complications. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012;16(6):918.
20. Sabir M. Ekspresi gen TNF- α Individu dengan hipertensi. *Medika Tadulako: Jurnal Ilmiah Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan*. 2014;1(3):35-47.
21. Indrayani UD, Soffan M. The effect of alium satium extract on the glomerular diameter of STZ-induced *Sprague dawley* rats. *Sains Medika*. 2013;5(1):11-6.
22. Tanabe K, Wada J. VEGF-Targeting Strategies against diabetic nephropathy: obsolete or still promising?. *Biomedical Journal*. 2018;2:3.
23. Mironidou-Tzouveleki M, Tsartsalis S, Tomos C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus. *Current Drug Targets*. 2011;12(1):107-14.
24. Rahayu ES, Pribadi P. Kadar vitamin dan mineral dalam buah segar dan manisan basah karika dieng (*Carica pubescens* Lenne&K. Koch). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 2012;4(2).
25. Minarno EB. Skrining fitokimia dan kandungan total flavonoid pada buah carica pubescens lenne & k. koch di kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *el-Hayah*. 2015;5(2):73-82.
26. Uribe E, Delgadillo A, Giovagnoli-Vicuña C, Quispe-Fuentes I, Zura-Bravo L. Extraction techniques for bioactive compounds and antioxidant capacity determination of Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*. 2015.
27. Simirgiotis MJ, Caligari PD, Schmeda-Hirschmann G. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2009;115(2):775-84.

28. Kusuma TU, Rachmawati SN, Anjani G, Muniroh M. *Carica pubescens* fruit juice reduces tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and fasting blood glucose (FBG) levels in type 2 diabetes mellitus wistar rats. *Food Research*. 2020;4.
29. Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;96:305-12.
30. Luo H, Jiang B-H, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutrition and cancer*. 2008;60(6):800-9.
31. Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic effect of rutin and its regulatory effect on the production of VEGF, IL-1 β and TNF- α in tumor associated macrophages. *J Biol Sci*. 2007;7:1511-9.
32. Niture NT, Ansari AA, Naik SR. Anti-hyperglycemic activity of rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: an effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. *Indian Journal Of Experimental Biology*. 2014;52.
33. Pinto MDS, Ranilla LG, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using *in vitro* models. *Journal of Medical Food*. 2009;12(2):278-91.
34. Evy S, Setiawati S. *Phaleria macrocarpa* reduces glomerular growth factor expression in alloxan-induced diabetic rats. *Universa Medicina*. 2013;32(2):71-9.
35. Rachmawati SN. Pengaruh jus buah karika (*Carica pubescens*) terhadap kadar SOD dan profil lipid (trigliserida dan high density lipoprotein) studi pada tikus wistar diabetes melitus tipe 2. Semarang: Diponegoro University; 2019.
36. Yudina MS, Gumay AR, Muniroh M. Efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah limfosit tikus *Sprague dawley* yang diinduksi *azoxymethane*: studi di laboratorium penelitian dan pengujian terpadu 4 Universitas Gadjah Mada. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 2019;8(1).

37. Blezeinsky FN, Gumay AR, Hardian. Efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* Terhadap jumlah neutrofil tikus *Sprague dawley* yang diinduksi *azoxymethane*. Jurnal Kedokteran Diponegoro. 2019;8(3).
38. Sugeng EM, Gumay AR, Bakri S. Efek Pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah leukosit tikus *Sprague dawley* yang diinduksi *azoxymethane*: studi di laboratorium penelitian dan pengujian terpadu 4 Universitas Gadjah Mada. Jurnal Kedokteran Diponegoro. 2019;8(1).
39. Sasongko H, Lestari RG, Yugatama A, Farida Y. Antidiabetic and antioxidant effect combination *Vasconcellea pubescens* and *Momordica charantia L.* extract in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy Journal. 2020;12(2).
40. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care Amerika Serikat. 2020.
41. PERKENI. Konsensus pengendalian dan pencegahan diabetes mellitus tipe 2 di Indonesia: PB Perkeni; 2011.
42. Fatimah RN. Diabetes melitus tipe 2. Jurnal Majority. 2015;4(5).
43. Bano G. Glucose homeostasis, obesity and diabetes. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2013;27(5):715-26.
44. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Medical Clinics. 2004;88(4):787-835.
45. Deepthi B, Sowjanya K, Lidiya B, Bhargavi R, Babu P. A modern review of diabetes mellitus: an annihilatory metabolic disorder. Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology. 2017;3(1):1-14.
46. Indonesia PE. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia PB Perkeni. 2015.
47. Decroli E. Diabetes Melitus Tipe 2. Pusat penerbit bagian ilmu penyakit dalam Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang. 2019.
48. Johnson RJ, Nangaku M. Endothelial dysfunction: the secret agent driving kidney disease. Am Soc Nephrol; 2016.

49. Nasution Z. Nefropati diabetik pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang terkontrol dan tidak terkontrol: kajian terhadap mikroalbumin urin sebagai marker nefropati diabetes. 2013.
50. Setiati S, Alwi I, Sudoyo A, Simadibrata M, Setiyohadi B, Syam A. Buku ajar ilmu penyakit dalam edisi keenam jilid II. Jakarta: Interna Publishing. 2015.
51. Semadi IN. Efek terapi adjuvan oksigen hiperbarik terhadap penyembuhan ulkus kaki diabetik wagner 3-4 penderita diabetes mellitus tipe-2 dengan penanda Cd34, VEGF, dan TNF- α . Bali: Universitas Udayana; 2017.
52. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
53. Carranza K, Veron D, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A, et al. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrología (English Edition)*. 2015;35(2):131-8.
54. Haller H, Ji L, Stahl K, Bertram A, Menne J. Molecular Mechanisms and treatment strategies in diabetic nephropathy: new avenues for calcium dobesilate—free radical scavenger and growth factor inhibition. *BioMed Research International*. 2017.
55. Tini K. VEGF reseptor signalling. Denpasar: Universitas Udayana; 2017.
56. Bus P, Scharpfenecker M, Van Der Wilk P, Wolterbeek R, Bruijn JA, Baelde HJ. The VEGF-A inhibitor sFLT-1 improves renal function by reducing endothelial activation and inflammation in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(9):1813-21.
57. Tufro A, Veron D, editors. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology*; 2012: Elsevier.
58. Gnudi L, Benedetti S, Woolf AS, Long DA. Vascular growth factors play critical roles in kidney glomeruli. *Clinical Science*. 2015;129(12):1225-36.
59. Sharma V, Sharma P. Role of different molecular pathways in the development of diabetes-induced nephropathy. *Diabetes & Metabolism*. 2013;9:1-7.

60. Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard CJ, Long DA. Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy. *Diabetes Journal*. 2009;58(7):1471-8.
61. Sakellarios AI, Siogkas P, Exarchos T, Stefanou K, Bourantas CV, Athanasiou L, et al. Modelling LDL accumulation in the case of endothelial dysfunction. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*. 2011;5.
62. Nardi GM, Ferrara E, Converti I, Cesarano F, Scacco S, Grassi R, et al. Does diabetes induce the vascular endothelial growth factor (vegf) expression in periodontal tissues? a systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17.
63. Putra A, Hutagalung A, Hasanah IH, Cahyono EB, Trisnadi S, Intan YSN. Peran induksi TNF- α serial doses dalam peningkatan VEGF dan PDGF mesenchymal stem cells. *Majalah Kedokteran Bandung*. 2018;50.
64. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2(1):1-9.
65. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(7):4015-23.
66. Murnah M. pengaruh ekstrak etanol mengkudu (*Morinda citrifolia* L) terhadap diabetik nefropati pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi streptozotocin (STZ) dengan kajian vegf dan mikroalbuminuria (mau): Diponegoro University; 2011.
67. Gunantara IBC. Ekspresi vascular endothelial growth factor berhubungan positif dengan kedalaman invasi pada adenokarsinoma kolorektal tipe tidak spesifik. Denpasar: Universitas Udayana; 2016.
68. Ceausu AR, Gaje PN, Cimpean AM. Immunohistochemical detection of the vascular endothelial growth factor: value, limits, scoring, and technical approaches. *Research and Clinical Medicine*. 2020;IV.

69. Schlüter A, Weller P, Kanaan O, Nel I, Heusgen L, Höing B, et al. CD31 and VEGF are prognostic biomarkers in early-stage, but not in late-stage, laryngeal squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2018;18(1):272.
70. Gunantara IBC. Ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) berhubungan positif dengan kedalaman invasi pada adenokarsinoma kolorektal tipe tidak spesifik. Denpasar: Universitas Udayana; 2016.
71. Sholeh FF. Perbedaan ketinggian tempat terhadap kandungan flavonoid dan beta karoten buah karika (*Carica pubescens*) daerah Dieng Wonosobo. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta; 2017.
72. B-Pikiran. Mengenal Tanaman Buah Carica [Internet] [3 September 2020]. Available from: <https://b-pikiran.cekkembali.com/carica/>.
73. Hidayati TK, Susilawati Y, Muhtadi A. Kegiatan farmakologis dari begbarai bagian *Carica papaya* Linn. ekstrak: buah, daun, benih, uap, kulit dan akar. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*. 2020;2(3):211-26.
74. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017;25(2):149-64.
75. Han CS, Liu K, Zhang N, Li SW, Gao HC. Rutin suppresses high glucose-induced ACTA2 and p38 protein expression in diabetic nephropathy. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(1):181-6.
76. Aini N, Latifah S, Muhammad F, Harjana T, editors. Pengaruh pemberian carica dieng (*Carica pubescens*) terhadap profil lipid dan histopatologi sel beta pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia. *Biokonservasi: Peran dan Pembelajaran Biologi dalam Pemanfaatan Biodiversitas Indonesia di Era Keterbukaan dan Pengetahuan*; 2019; Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
77. Kusnadi K, Tivani I, Amananti W. Analisa kadar vitamin dan mineral buah karika dieng (*Carica pubescens* lenne) dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS dan AAS. *Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2016;5(2).

78. Suketi K, Poerwanto R, Sujiprihati S, Widodo WD. Karakter fisik dan kimia buah pepaya pada sadia kematangan berbeda. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 2010;38(1).
79. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*. 2014;101.
80. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva. 2000.
81. Gunantara IC, Dewi ISM, Artha IGA. Ekspresi vascular endothelial growth factor berhubungan positif dengan kedalaman invasi pada adenokarsinoma kolorektal. *Majalah Patologi Indonesia*. 2019;28(2):44-9.
82. Minarno EB. skrining fitokimia dan kandungan total flavanoid pada buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *el-Hayah*. 2015;5(2):73-82.
83. Beu SW. Uji Efektivitas ekstrak etanol tunas pisang goroho (*Musa acuminata* L.) terhadap penurunan kadar gula darah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi sukrosa. *Pharmacon*. 2014;3(2).
84. Kurniawan B, Carolia N. THE effectiveness of binahong leaf extract (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) and mefenamic acid as anti inflammation to white male rat induced by karagenin. *JUKE*. 2014;4(8):151-7.
85. McCormack JP, Allan GM, Virani AS. Is bigger better? an argument for very low starting doses. *Cmaj*. 2011;183(1):65-9.
86. Sasmita FW, Susetyarini E, Husamah, Pantiwati Y. Efek ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap kadar glukosa darah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi alloxan. *Biosfera*. 2017;34(1).
87. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2013;7(5):e330-e41.

88. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease*. 2018;9(2):1-9.
89. Dhungyal B, Koirala P, Sharma C, Jha D. Caffeic acid a potent phytochemical against diabetes mellitus-a review. *SMU Med J*. 2014;1:152-60.
90. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
91. Yang WS, Jeong D, Yi Y-S, Park JG, Seo H, Moh SH, et al. IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. *Mediators of Inflammation*. 2013.
92. Liang W, Zhang D, Kang J, Meng X, Yang J, Yang L, et al. Protective effects of rutin on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;107:721-8.
93. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clinical cancer research*. 2007;13(10):2825-30.
94. Yoo S-A, Kwok S-K, Kim W-U. Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. *Mediators of inflammation*. 2008;2008.
95. Gonzalez Y, Herrera MT, Soldevila G, Garcia-Garcia L, Fabián G, Pérez-Armendariz EM, et al. High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. *BMC immunology*. 2012;13(1):1-14.
96. Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF- κ B: a potential target in the management of vascular complications of diabetes. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:798.
97. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204.
98. Zhao Y, Liu J, Liu C, Zeng X, Li X, Zhao J. Anti-inflammatory effects of p-coumaric acid in LPS-stimulated RAW264. 7 cells: Involvement of NF- κ B and MAPKs pathways. *J Med Chem*. 2016;6:327-30.

99. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*(Discontinued). 2009;8(3):229-35.
100. Yulinta NMR, Gelgel KTP, Kardena IM. Efek toksisitas ekstrak daun sirih merah terhadap gambaran mikroskopis ginjal tikus putih diabetik yang diinduksi aloksan. *Buletin Veteriner Udayana*. 2013;5(2):114-21.
101. Wirawan W. Uji ekstrak etanol daun ciplukan terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus putih jantan diinduksi streptozotocin. *Farmakologika: Jurnal Farmasi*. 2018;15(2):124-33.

LAMPIRAN

1. SURAT DAN PERIZINAN PENELITIAN

ETHICAL CLEARANCE

	KOMISI PENELITIAN KESEHATAN HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE UNIVERSITAS DIPONEGORO FAKULTAS KEDOKTERAN	Sekretariat : Kantor Dekanat Lama FK UNDIP Lt. 1 Jl. Dr. Soetomo 18 Semarang, Telp. 024-769280010; 769280011 pswt 7820, email : komisietik@gmail.com
	<hr/> <p>ETHICAL CLEARANCE No. 24/EC/H/FK-UNDIP/III/2021</p>	
<p>Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, setelah membaca dan menelaah Usulan Penelitian dengan judul :</p>		
<p>Pengaruh Jus Buah <i>Carica pubescens</i> terhadap Ekspresi <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i> pada Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2</p> <p><i>Effect of Carica pubescents fruit juice on VEGF expression in type 2 Diabetes Mellitus Wistar rats kidney</i></p>		
<p>Nama Peneliti : <i>Oktadio Erikardo</i></p>		
<p>Pembimbing : 1. dr. Muflihatul Muniroh, MSI,Med, PhD 2.Dr. dr. Nyoman Suci Widyastiti, M.Kes, Sp.PK(K)</p>		
<p>Institusi : Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang</p>		
<p>Penelitian : Dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia</p>		
<p>Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, yang diamandemen di Seoul 2008 dan Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI 2011.</p>		
<p>Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi hewan coba dan melaporkan ke KEPK bahwa penelitian sudah selesai dilampiri Abstrak Penelitian.</p>		
<p>Semarang, 09 Maret 2021</p>		
<p>Komis Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Undip, Ketua,</p> 		
<p>Prof. Dr. dr. Banundari Rachmawati, Sp.PK(K) NIP. 19600606 198811 2 002</p>		

SURAT PENELITIAN



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS SEBELAS MARET SURAKARTA
FAKULTAS KEDOKTERAN
BAGIAN PATOLOGI ANATOMI
Jl. Ir. Sutami 36A. Surakarta. Telp. (0271) 632494, Fax. (0271) 632494

SURAT KETERANGAN

No. ...37.../UN27.06.6.1/PP/2021

Bersama ini kami menerangkan bahwa :

Nama : Oktadio Erikardo

NIM : 22010119410011

Telah selesai melakukan pengecatan imunohistokimia dan intepretasi hasil penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta dalam rangka tugas akhir Tesis bidang Ilmu Biomedik FK UNDIP dengan judul "Pengaruh Jus Buah *Carica pubescens* Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 2".

Demikian surat keterangan ini dibuat agar dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Surakarta,

Kepala,

Brian Wasita, dr., SpPA, PhD
NIP. 197907222005011003

2. HASIL PENELITIAN

KELOMPOK	NO. SAMPEL	EKSPRESI VEGF				KADAR GDP	KADAR TNF- α
		P	I	P x I	SKOR AKHIR		
Kontrol Negatif (K-)	1	3	1	3	1	69.42	47.78
	2	3	2	6	2	76.62	47.78
	3	3	2	6	2	75.54	45.39
	4	3	2	6	2	74.82	44.74
	5	3	2	6	2	69.78	48.22
Kontrol Positif (K+)	1	3	3	9	3	283.09	124.74
	2	3	3	9	3	280.58	116.70
	3	3	3	9	3	278.78	120.39
	4	3	2	6	2	267.27	112.78
	5	3	3	9	3	276.98	117.35
Jus CP 4 mL/200 g BB (X1)	1	3	2	6	2	122.30	74.74
	2	2	2	4	2	116.55	71.48
	3	1	1	1	1	118.71	70.17
	4	2	1	2	1	119.78	77.78
	5	3	2	6	2	117.99	74.09
Jus CP 8 mL/200 g BB (X2)	1	3	2	6	2	101.08	54.09
	2	3	2	6	2	98.56	51.04
	3	3	2	6	2	104.32	53.00
	4	3	2	6	2	89.57	57.13
	5	3	2	6	2	88.13	52.35
Rutin Murni 10 mg/200 g BB (X3)	1	3	2	6	2	98.20	50.83
	2	2	2	4	2	94.60	49.74
	3	2	2	4	2	93.53	52.35
	4	3	3	9	3	85.25	54.74
	5	2	1	2	1	94.24	51.26

Keterangan:

- P: Proporsi; I: Intensitas
- P x I :
 - 1-3 = 1 (Imunoreaktif Lemah)
 - 4-6 = 2 (Imunoreaktif Sedang)
 - 7-9 = 3 (Imunoreaktif Kuat)

3. DOKUMENTASI PENELITIAN



Blok parafin organ ginjal tikus



Preparat imunohistokimia (VEGF) organ ginjal

4. UJI STATISTIK

Case Processing Summary

KelompokPerlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Skor Akhir VEGF						
Kelompok Negatif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kelompok Positif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kelompok X1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kelompok X2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kelompok X3	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Descriptives

KelompokPerlakuan	Statistic	Std. Error	
Skor Akhir VEGF	Mean	1.80	
Kelompok Negatif	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	1.24	
	Upper Bound	2.36	
	5% Trimmed Mean	1.83	
	Median	2.00	
	Variance	.200	
	Std. Deviation	.447	
	Minimum	1	
	Maximum	2	
	Range	1	
	Interquartile Range	1	
	Skewness	-2.236	.913
	Kurtosis	5.000	2.000
	Mean	2.80	.200
Kelompok Positif	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	2.24	
	Upper Bound	3.36	
	5% Trimmed Mean	2.83	
	Median	3.00	
	Variance	.200	
	Std. Deviation	.447	
	Minimum	2	
	Maximum	3	
	Range	1	
	Interquartile Range	1	
	Skewness	-2.236	.913
	Kurtosis	5.000	2.000
	Mean	1.60	.245
Kelompok X1	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	.92	
	Upper Bound	2.28	
	5% Trimmed Mean	1.61	
	Median	2.00	
	Variance	.300	
	Std. Deviation	.548	
	Minimum	1	
	Maximum	2	
	Range	1	
	Interquartile Range	1	
	Skewness	-.609	.913
	Kurtosis	-3.333	2.000
	Mean	2.00	.000
Kelompok X2	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	2.00	
	Upper Bound	2.00	
	5% Trimmed Mean	2.00	
	Median	2.00	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.000	
	Minimum	2	
	Maximum	2	
	Range	0	
	Interquartile Range	0	
	Skewness	.	.
	Kurtosis	.	.
	Mean	2.00	.316
Kelompok X3	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	1.12	
	Upper Bound	2.88	
	5% Trimmed Mean	2.00	
	Median	2.00	
	Variance	.500	
	Std. Deviation	.707	
	Minimum	1	
	Maximum	3	
	Range	2	
	Interquartile Range	1	
	Skewness	.000	.913
	Kurtosis	2.000	2.000

UJI NORMALITAS SHAPIRO-WILK

Tests of Normality

KelompokPerlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	.473	5	.001	.552	5	.000
	Kelompok Positif	.473	5	.001	.552	5	.000
	Kelompok X1	.367	5	.026	.684	5	.006
	Kelompok X2	.	5	.	.	5	.
	Kelompok X3	.300	5	.161	.883	5	.325

a. Lilliefors Significance Correction

UJI KRUSKAL-WALLIS

Ranks

KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	5	10.50
	Kelompok Positif	5	20.90
	Kelompok X1	5	8.50
	Kelompok X2	5	12.50
	Kelompok X3	5	12.60
Total	25		

Test Statistics^{a,b}

Skor Akhir VEGF	
Kruskal-Wallis H	11.342
df	4
Asymp. Sig.	.023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
KelompokPerlakuan

UJI MANN-WHITNEY

KELOMPOK (K-) – (K+)

Ranks

KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	5	3.40	17.00
	Kelompok Positif	5	7.60	38.00
Total	10			

Test Statistics^a

Skor Akhir VEGF	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.425
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable:
KelompokPerlakuan

b. Not corrected for ties.

KELOMPOK (K-) – (X1)

Ranks

KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	5	6.00	30.00
	Kelompok X1	5	5.00	25.00
Total	10			

Test Statistics^a

Skor Akhir VEGF	
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable:
KelompokPerlakuan

b. Not corrected for ties.

KELOMPOK (K-) – (X2)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	5	5.00	25.00
	Kelompok X2	5	6.00	30.00
	Total	10		

Test Statistics^a

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

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

KELOMPOK (K-) – (X3)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok Negatif	5	5.10	25.50
	Kelompok X3	5	5.90	29.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Skor Akhir VEGF
Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.516
Asymp. Sig. (2-tailed)	.606
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

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

KELOMPOK (K+) – (X1)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok Positif	5	7.70	38.50
	Kelompok X1	5	3.30	16.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Skor Akhir VEGF
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

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

KELOMPOK (K+) – (X2)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok Positif	5	7.50	37.50
	Kelompok X2	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics^a

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

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

KELOMPOK (K+) – (X3)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok Positif	5	7.10	35.50
	Kelompok X3	5	3.90	19.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Skor Akhir VEGF
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	19.500
Z	-1.848
Asymp. Sig. (2-tailed)	.065
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 ^b

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

KELOMPOK (X1) – (X2)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok X1	5	4.50	22.50
	Kelompok X2	5	6.50	32.50
	Total	10		

Test Statistics ^a		Skor Akhir VEGF
Mann-Whitney U		7.500
Wilcoxon W		22.500
Z		-1.500
Asymp. Sig. (2-tailed)		.134
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.310 ^b

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

KELOMPOK (X1) – (X3)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok X1	5	4.70	23.50
	Kelompok X3	5	6.30	31.50
	Total	10		

Test Statistics ^a		Skor Akhir VEGF
Mann-Whitney U		8.500
Wilcoxon W		23.500
Z		-.956
Asymp. Sig. (2-tailed)		.339
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.421 ^b

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

KELOMPOK (X2) – (X3)

Ranks				
	KelompokPerlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Akhir VEGF	Kelompok X2	5	5.50	27.50
	Kelompok X3	5	5.50	27.50
	Total	10		

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

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

UJI KORELASI *KENDALL-TAU*

KORELASI EKSPRESI VEGF DENGAN KADAR GDP

Correlations			Skor Akhir VEGF	Kadar Glukosa Darah
Kendall's tau_b	Skor Akhir VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.289
		Sig. (2-tailed)	.	.078
		N	25	25
	Kadar Glukosa Darah	Correlation Coefficient	.289	1.000
		Sig. (2-tailed)	.078	.
		N	25	25

KORELASI EKSPRESI VEGF DENGAN KADAR TNF- α **Correlations**

			Skor Akhir VEGF	Kadar TNF- α
Kendall's tau_b	Skor Akhir VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.348 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	.034
		N	25	25
	Kadar TNF- α	Correlation Coefficient	.348 [*]	1.000
		Sig. (2-tailed)	.034	.
		N	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).