

GAMBARAN IMUNOHISTOKIMIA TUMOR NECROSIS FACTOR- alpha (TNF- α) PADA JARINGAN GINJAL TIKUS DIABETIK YANG DIBERIKAN EKSTRAK DAUN *Tithonia diversifolia*

**Sigit Sa'ad Hibatullah¹, Rondius Solfaine², Palestin³, Muhammad Noor
Rahman⁴**

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya
Surabaya email : sigitsaadhibatullah@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine the potential of Tithonia diversifolia leaf extract in reducing TNF- α expression in diabetic rat models. The samples consisted of 18 male Wistar rats, which were divided into three treatment groups, with six replications in each group. The mean values for each group were as follows: the control group without treatment (S1) had a mean of 4.00, the negative control group (S2) had a mean of 7.33, and the positive treatment group (S3) had a mean of 3.67. The results showed that the S2 group exhibited the highest TNF- α expression, as indicated by strong staining intensity and a higher number of immunopositive cells. Meanwhile, the S3 group demonstrated a reduction in TNF- α expression compared to the S2 group, suggesting that Tithonia diversifolia leaf extract has potential in reducing the inflammatory response in the kidneys of diabetic rats. The Kruskal–Wallis test yielded an Asymp. Sig value of 0.136 ($p > 0.05$), indicating that there was no statistically significant difference among the treatment groups. In conclusion, the administration of Tithonia diversifolia leaf extract was able to reduce TNF- α expression in the kidney tissue of diabetic rat models, although the reduction was not statistically significant.

Keywords: Diabetes mellitus, TNF- α , immunohistochemistry, kidney, Tithonia diversifolia.

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada era modern seperti sekarang ini yang didukung dengan kemajuan teknologi, sangat berdampak pada gaya hidup masyarakat yang cenderung menginginkan segala sesuatu serba cepat dan instan. Termasuk dalam hal mengkonsumsi makanan atau minuman instan dalam kemasan, makanan atau minuman instan dipilih karena cara penyajiannya yang mudah, harga yang terhitung murah, dan jenis makanan atau minuman yang bersifat kekinian sehingga dapat menggugah selera masyarakat yang mengkonsumsi (Alfora dkk., 2023).

Akan tetapi dibalik semua keunggulan dari makanan atau minuman instan tersebut mengandung bahan berbahaya apabila dikonsumsi secara berlebihan bagi tubuh. Hal ini karena makanan atau minuman instan mengandung zat aditif seperti penyedap, pengawet, dan pemanis yang apabila dikonsumsi secara berlebihan dapat menimbulkan masalah kesehatan seperti gangguan hati, ginjal, kerusakan sistem syaraf, penyakit gastroenteritis, infertilitas, gangguan pertumbuhan, bahkan kematian (Alfora dkk., 2023).

Selain masalah kesehatan tersebut, makanan atau minuman instan juga menjadi penyebab obesitas dikalangan masyarakat. Menurut *World Health Organization* (WHO). (2016) ada sekitar 1,9 miliar masyarakat dengan usia diatas 18 tahun mempunyai berat badan diatas rata – rata, dan terdapat 600 juta orang mengalami obesitas jumlah ini sama dengan sekitar 13% dari populasi orang dewasa. Hal ini karena gaya hidup yang tidak sehat seperti kurangnya aktivitas fisik, stress berlebih, dan konsumsi makanan atau minuman yang mempunyai kandungan gula berlebih. Sehingga menjadi faktor utama dari berbagai penyakit degeneratif, salah satunya adalah diabetes melitus (Alfora dkk., 2023).

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu gangguan penyakit metabolik kronis, yang ditandai dengan meningkatnya jumlah glukosa yang ada di dalam darah yang disebabkan karena pankreas tidak mampu menghasilkan insulin yang memadai untuk tubuh. Insulin ialah hormon yang dihasilkan oleh pankreas dan berperan dalam mengatur kadar glukosa darah dengan cara mengontrol sintesis serta penyimpanan glukosa. Pada penderita dengan diabetes mellitus (DM), sel – sel tubuh menjadi tidak responsif terhadap insulin atau pankreas berhenti memproduksi insulin, yang dapat menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Penyakit ini merupakan masalah kesehatan global yang diprediksi akan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya, sehingga perlu ada penanganan yang serius dalam menangani penyakit ini (Mustofa, 2022).

Menurut data dari International Diabetes Federation (IDF, 2021) pada tahun 2021 diperkirakan ada sekitar 537 juta orang yang menderita diabetes dan angka ini diperkirakan mencapai 643 juta pada tahun 2030, dan 783 juta pada tahun 2045. Sedangkan di Indonesia penderita diabetes melitus pada tahun 2021 mencapai 19,5 juta dan diprediksi mencapai 28,6 juta pada tahun 2045. Jumlah penderita diabetes melitus diprediksi akan terus mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk. Gaya hidup masyarakat yang tidak sehat menjadi penyebab utama tingginya kasus diabetes melitus di Indonesia (Tandjungbulu dkk., 2023).

Diabetes Melitus (DM) tidak hanya menyebabkan gangguan metabolik, namun apabila tidak ditangani dengan baik dapat menyebabkan beberapa komplikasi serius, salah satunya adalah nefropati diabetik. Nefropati diabetik merupakan komplikasi mikrovaskular yang diakibatkan oleh penyakit diabetes melitus, nefropati diabetik muncul karena adanya kerusakan pada ginjal yang dapat menyebabkan gagal ginjal terminal (Wardhana dkk., 2024).

Komplikasi nefropati diabetik ditandai dengan adanya perubahan morfologi ginjal yang mempengaruhi fungsi dari ginjal diantaranya ialah penebalan membran dasar glomerulus dan sklerosis nodular intraglomerulus. Nefropati diabetik melibatkan banyak aspek, perubahan hemodinamik seperti ketidakseimbangan resistensi arteriola, faktor metabolik yang mengakibatkan stress oksidatif, pensinyalan sel, dan faktor transkripsi, molekul proinflamasi dan lain – lain (Ding dkk., 2021).

Semua ini menjadi penyebab adanya gangguan - gangguan seperti apoptosis, podosit, dan menurunnya laju infiltrasi glomerulus. *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) merupakan sitokin yang berperan penting dalam proses inflamasi, yang diproduksi oleh sel intrinsik ginjal seperti sel mesangial, sel endotel, sel dendritik, dan sel tubulus ginjal. TNF- α bekerja dengan merangsang adhesi molekul pada leukosit dan sel endothel serta mengatur aktivitas makrofag dan respons imun melalui stimulasi faktor pertumbuhan dan sitokin (Ding dkk., 2021).

Sitokin ini menimbulkan berbagai efek pada tubuh, diantaranya adalah respons fase akut di hati dan leukositosis. Leukosit berkaitan erat dengan produksi TNF- α , yang dihasilkan neutrofil, karena neutrofil memiliki peran penting pada kasus diabetes melitus, dengan menunjukkan adanya aktivasi kemotaksis neutrofil yang rendah pada penderita diabetes melitus, kemudian ditemukan adanya penurunan fagositosis leukosit dan aktivitas bakterisidal yang berkaitan dengan tingginya kadar glukosa darah, ditemukan juga adanya infiltrasi eritrosit, peningkatan jumlah diskosit, dan juga adanya anemia ringan normositik pada pasien penderita diabetes melitus tipe 2. Dari berbagai efek yang ditimbulkan oleh TNF- α maka diperlukan adanya terapi yang paling efektif dalam menghambat laju TNF- α (Solfaine dkk., 2024).

Saat ini pengobatan diabetes hanya bergantung pada penggunaan obat – obatan antibiotik saja, akan tetapi penggunaan obat tersebut menimbulkan efek samping pada penderita sehingga perlu terapi alternatif lain sebagai pengganti obat – obatan antibiotik, yaitu dengan beralih pada penggunaan obat herbal atau obat tradisional, yakni dengan menggunakan ekstrak dari daun kembang bulan. Daun Kembang Bulan, atau *Tithonia diversifolia* ialah tanaman liar yang tumbuh di daerah pada ketinggian antara 500 hingga 1.950 meter di atas permukaan laut, tanaman ini berasal dari keluarga *Asteraceae* (Azhari dkk., 2022)

Tanaman ini juga mempunyai senyawa terpenoid dan flavonoid, yang dimana flavonoid memiliki kemampuan dalam menurunkan kadar glukosa darah, oleh sebab itu daun ini disebut juga sebagai daun antidiabetik. *Tithonia diversifolia* bekerja dengan menghambat glomerulus dan tubulus, sehingga dapat mengurangi laju TNF- α . Selain itu *tithonia diversifolia* juga efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah, mengurangi konsentrasi TNF- α , menghambat kerusakan ginjal, dan memulihkan profil hematologis. Dari berbagai reaksi yang ditimbulkan dari ekstrak daun *tithonia diversifolia*, maka penggunaan daun ini dapat menjadi pertimbangan apabila diperlukan sebagai terapi alternatif lain sebagai pengganti obat antibiotik (Solfaine dkk., 2024).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut. Bagaimana gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus diabetik yang diberi ekstrak daun *Tithonia diversifolia*?

1.3. Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini, yaitu :

1. Menganalisis efek ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terhadap ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus model nefropati diabetik..
2. Menganalisis intensitas ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus diabetik yang diberi ekstrak daun *Tithonia diversifolia*.
3. Untuk mengevaluasi luas area TNF- α pada jaringan ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) diabetik yang diberikan ekstrak daun *Tithonia diversifolia*

1.4. Hipotesa

Berdasarkan uraian tersebut, hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

H0 : Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terhadap ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal ginjal tikus diabetik.

H1 : Terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terhadap ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal ginjal tikus diabetik.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini, yaitu :

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai manfaat dari ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terhadap ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus model nefropati diabetik.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pengembangan ilmu kedokteran terkait tanaman herbal sebagai pengobatan alternatif.
3. Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan kepada mahasiswa terkait penerapan imunohistokimia dibidang kedokteran dan mekanisme inflamasi pada tubuh.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu gangguan penyakit metabolik yang sudah kronis, yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah glukosa yang ada di dalam darah yang disebabkan karena pankreas tidak mampu menghasilkan insulin yang memadai untuk tubuh. Insulin ialah hormon yang mengendalikan gula darah dalam tubuh. Kenaikan gula darah merupakan faktor umum dari penyakit diabetes (Tandjungbulu dkk., 2023).

Kadar gula darah normal dalam tubuh adalah 50 hingga 135 mg/dL, dapat disebut diabetes apabila kadar gula darah mencapai 150 mg/dL. Penyakit ini merupakan masalah kesehatan global yang diprediksi akan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya, sehingga perlu ada penanganan yang serius dalam menangani penyakit ini (Solfaine dkk., 2021).

Menurut *American Diabetes Association* (ADA) dan *World Health Organization* (WHO) diabetes melitus diklasifikasikan menjadi beberapa tipe, yaitu tipe 1 dan tipe 2. Akan tetapi 85% diantaranya mengalami diabetes melitus tipe 2. Diabetes melitus tipe 1 terjadi karena adanya kerusakan pada sel β pankreas sehingga produksi insulin pada sel β pankreas menjadi terganggu. Kondisi tersebut timbul akibat reaksi autoimun yang ditimbulkan oleh peradangan pada sel β pankreas, yang berakibat munculnya antibodi terhadap sel β pankreas yang disebut dengan Islet Cell Antibody (ICA) reaksi dari antigen sel β dengan antibodi ICA menyebabkan hancurnya sel β pankreas (Sagita dkk., 2021).

Sedangkan diabetes melitus tipe 2 terjadi karena terganggunya reseptor insulin, sehingga insulin tidak dapat berfungsi secara maksimal. Meskipun hormon insulin yang

diproduksi sel β pankreas berada dalam jumlah normal atau meningkat resistensi atau gangguan pada reseptor dipermukaan sel menghambat masuknya glukosa kedalam sel. Akibatnya sebagian glukosa tetap berada didalam aliran darah, sehingga kadar gula yang berada didalam darah meningkat (Sagita dkk., 2021).

Gejala yang dialami oleh penderita diabetes mellitus tipe 2 biasanya mengalami kebas, kesemutan, dan sering buang air kecil, yang tentu saja dapat mengganggu aktivitas sehari-hari. Frekuensi buang air kecil meningkat karena sel-sel tubuh tidak mampu menyerap glukosa, sehingga ginjal berusaha mengeluarkan glukosa sebanyak mungkin. Hal ini menyebabkan penderita lebih sering buang air kecil dibandingkan orang normal. Kehilangan cairan ini membuat penderita merasa haus dan membutuhkan lebih banyak minum, kondisi yang dikenal sebagai polidipsia. Saat kadar gula darah menurun, tubuh mengira belum mendapat asupan makanan sehingga mendorong rasa lapar yang terus-menerus (Anggraini dkk., 2023).

Pada individu dengan kadar gula darah tinggi, tergantung lamanya kondisi ini berlangsung, mereka sering merasa tidak nyaman, cepat lelah, dan mengalami penglihatan kabur akibat gula darah yang tinggi. Selain itu, gejala kesemutan, mati rasa, sensasi terbakar, atau pembengkakan juga dapat muncul, menandakan adanya kerusakan saraf akibat diabetes. Gejala tersebut apabila tidak didapatkan penanganan dengan baik dapat berakibat fatal, seperti resiko kebutaan dan kerusakan saraf permanen akibat dari kadar gula darah yang tidak terkontrol (Anggraini dkk., 2023).

2.1.1. Nefropati Diabetik

Nefropati diabetik (ND) merupakan kelainan degeneratif pada pembuluh darah ginjal yang berhubungan dengan gangguan metabolisme karbohidrat atau intoleransi

glukosa, yang dikenal sebagai diabetes mellitus (DM). Nefropati diabetik merupakan salah satu komplikasi mikrovaskular yang sering terjadi pada penderita diabetes mellitus tipe 1 maupun tipe 2. Kondisi ini menjadi penyebab utama terjadinya penyakit ginjal pada pasien yang menjalani terapi penggantian ginjal, yang ditandai dengan munculnya mikroalbuminuria tanpa adanya kelainan ginjal yang nyata. Selain itu, peningkatan tekanan darah turut mempercepat penurunan laju filtrasi glomerulus, yang pada akhirnya berujung pada gagal ginjal tahap akhir (Saputra dkk., 2023).

Nefropati diabetik sering ditemukan pada penderita yang mengalami diabetes melitus tipe 2. Nefropati diabetik juga menjadi penyebab utama dari gagal ginjal terminal, menurut Wardhana dkk., (2024) 20 – 40% dari pasien diabetes melitus mengalami nefropati diabetik dan menjadi penyebab kematian nomor 6 di negara barat hingga sekarang, 25% pasien penderita gagal ginjal disebabkan diabetes melitus tipe 2. Perubahan fungsi dan morfologi ginjal akan muncul sebelum timbulnya gejala nefropati diabetik (Tandjungbulu dkk., 2023).

Perubahan ini ditandai dengan perubahan pada membran basalis glomerulus serta proliferasi sel-sel mesangial. Akibatnya terjadi glomerulosklerosis dan penurunan aliran darah yang mengubah permeabilitas membran basalis glomerulus, sehingga muncul albuminuria. Peningkatan kadar albumin dalam darah berisiko menyebabkan gagal ginjal, salah satu faktor utamanya adalah diabetes mellitus. Kadar glukosa darah yang tinggi dapat bereaksi dengan protein, mengubah struktur dan fungsi sel, termasuk pada membran basal glomerulus. Hal ini menyebabkan kerusakan pada penghalang protein dan menimbulkan kebocoran protein ke dalam urin (mikroalbuminuria) (Saputra dkk., 2023).

2.2. Ginjal

Ginjal adalah sepasang organ yang berbentuk seperti kacang merah dan mencakup 1% dari berat tubuh secara keseluruhan. Ginjal adalah organ yang sangat penting keberadaannya bagi tubuh, yang dimana gangguan yang terjadi pada ginjal dapat menyebabkan komplikasi yang dapat mengganggu kesehatan tubuh. Ginjal terletak dibelakang abdomen di kedua sisi, yakni dibelakang peritoneum bagian Tengah belakang iga sampai bawah. Ginjal berlokasi di area retroperitoneal bagian atas yaitu pada kedua sisi dari vertebra lumbalis 3 dan menempel pada dinding abdomen (Alwiyah dkk., 2024).

Ginjal dibungkus oleh kapsula fibrosa dan kapsula adiposa, dimana kapsula tersebut dikelilingi oleh fascia renalis yang terbuka pada sisi medial inferior sebagai jalur neurovascular dan ureter. Ginjal tersusun atas korteks renalis dan medulla renalis, dan terdapat 14 batas lobus ginjal yang tidak terlihat. Ginjal mempunyai bagian yang memiliki bentuk medial cekung yang disebut hilus sebagai tempat masuknya saraf, keluarnya pembuluh darah dan pembuluh limfe, dan keluarnya ureter, dia juga mempunyai bagian cembung dimana bagian – bagian tersebut dilapisi suatu simpai fibrosa tipis. Ginjal tersusun atas nefron yang berperan menjalankan fungsi ginjal, selain itu ginjal juga terdiri dari kumpulan kapiler yang disebut glomerulus dan dilapisi oleh dua lapisan sel epitel yakni kapsul glomerulus dan kapsul bowman (Alwiyah dkk., 2024).

Ginjal mempunyai peran penting dalam mengatur jumlah dan konsentrasi elektrolit dan mempertahankan eksistabilitas saraf dan otot. Selain itu ginjal juga berperan dalam mengontrol keseimbangan pH darah dengan mengekskresikan ion hidrogen dan bikarbonat melalui urin. Ginjal juga mempertahankan volume plasma yang sesuai, sehingga berperan penting dalam regulasi jangka panjang tekanan darah, dan juga mengatur keseimbangan air dengan mempertahankan osmolaritas konsentrasi elektrolit

agar tetap stabil. Ginjal juga berfungsi untuk mengekskresikan sisa hasil metabolisme melalui urin (Alwiyah dkk., 2024).

Ginjal juga menghasilkan hormon eritropoietin yang berguna untuk menstimulasi sumsum tulang untuk memproduksi sel darah merah. Selain itu ginjal juga memproduksi renin yakni enzim yang memicu aktivasi sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAAS), aktivasi ini penting untuk mengatur reabsorpsi natrium di tubulus ginjal dan menjaga volume plasma serta tekanan darah arteri dalam jangka panjang. Ginjal juga berperan dalam mengaktivasi vitamin D menjadi bentuk aktifnya yang penting untuk proses penyerapan kalsium di saluran cerna, dimana kalsium berperan sebagai homeostasis tubuh, termasuk kontraksi otot, pembekuan darah, dan transmisi impuls saraf (Alwiyah dkk., 2024).



Gambar 2.1 Organ ginjal (Khasanah dkk., 2023)

2.3. Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan salah satu teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan serta distribusi antigen spesifik pada jaringan dengan memanfaatkan antibodi. Prinsip dasar dari teknik ini adalah interaksi spesifik antara antigen dan antibodi, dimana antibodi yang telah diberikan pewarnaan atau enzim akan berikatan dengan antigen target dalam sampel jaringan. Teknik IHK menggabungkan

antara prinsip imunologi dan histokimia agar dapat memberikan visualisasi distribusi molekuler pada tingkat jaringan (Nurcahyanti dan Kusmardi, 2024).

Dalam bidang patologi dan biomedis, imunohistokimia (IHK) menjadi salah satu metode penting yang digunakan untuk menilai ekspresi berbagai protein hasil evaluasi ini berkontribusi besar dalam proses pengambilan keputusan klinis karena dapat menjadi dasar penentuan strategi terapi, baik terapi hormonal maupun terapi target yang sesuai dengan profil molekuler pasien. Penilaian skor imunohistokimia (IHK) dilakukan dengan mengevaluasi dua parameter utama, yaitu intensitas pewarnaan dan proporsi sel yang menunjukkan pewarnaan positif (Nurcahyanti dan Kusmardi, 2024).

Intensitas pewarnaan biasanya dikategorikan menjadi beberapa tingkat, mulai dari negatif atau tidak ada pewarnaan, lemah, sedang, hingga kuat. Proporsi sel positif dinyatakan dalam persentase, sehingga dapat memberikan gambaran seberapa luas ekspresi antigen dalam jaringan yang diperiksa. Hasil penilaian skor IHK memiliki peran penting dalam praktik klinis karena dapat membantu memprediksi respons terhadap terapi serta menentukan prognosis pasien (Nurcahyanti dan Kusmardi, 2024).

2.4. TNF- α

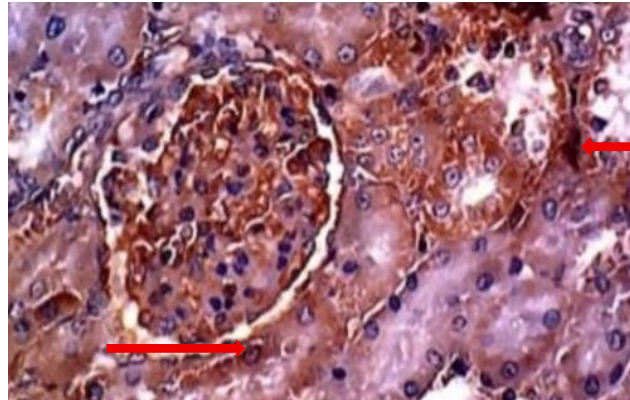
Respons inflamasi dalam tubuh ditandai oleh aktivasi berbagai mediator, termasuk sitokin proinflamasi seperti IL-1, *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Interferon* (INF)- γ , IL-6, IL-12, dan IL-18, serta sitokin antiinflamasi seperti IL-1Ra, IL-35Ra, IL-37, IL-38, dan lain-lain. Mediator tersebut memicu rangkaian proses biologis yang kompleks, termasuk aktivasi berbagai enzim, pelepasan mediator tambahan, migrasi sel-sel imun, ekstrasvasasi cairan, peningkatan denaturasi protein, serta perubahan pada

struktur dan permeabilitas membran sel, yang secara keseluruhan berkontribusi terhadap perkembangan reaksi inflamasi (Fратиwi dkk., 2022).

TNF- α atau *Tumor Necrosis Factor–alpha* merupakan sitokin proinflamasi multifungsi yang dihasilkan oleh sel hematopoietik seperti monosit, makrofag, dan sel T, dan juga oleh sel ginjal intrinsik termasuk sel mesangial, endotel, dendritik, dan sel tubulus ginjal. Sitokin ini berperan dalam memicu apoptosis dan nekrosis sel melalui mekanisme langsung maupun autokrin, serta mempengaruhi permeabilitas sel endotel (Ding dkk., 2021).

Selain itu, TNF- α berhubungan dengan produksi spesies oksigen reaktif pada berbagai jenis sel, termasuk sel mesangial glomerulus, yang dapat mengganggu fungsi sawar kapiler glomerulus dan meningkatkan permeabilitas albumin. Kadar TNF- α dalam darah dan urin penderita yang mengalami nefropati diabetik jauh lebih tinggi dibandingkan dengan penderita yang tidak memiliki riwayat diabetes (Ding dkk., 2021).

TNF- α juga berperan dalam menurunkan perfusi darah antar glomerulus, yang merupakan salah satu mekanisme penting dalam patogenesis nefropati diabetik, TNF- α diketahui dapat meningkatkan reabsorpsi natrium melalui aktivasi kanal natrium pada epitel tubulus distal, sekaligus memicu pelepasan TGF- β yang menginduksi hipertrofi ginjal. TNF- α memiliki peran krusial, khususnya pada fase awal kerusakan ginjal, dan berhubungan erat dengan berbagai penyakit imun kronis seperti artritis rheumatoid, penyakit crohn, lupus eritematosus sistemik, penyakit inflamasi usus, serta penyakit neurodegeneratif (Ding dkk., 2021).



Gambar 2.2 Gambaran Histopatologi Ginjal dengan TNF- α (tanda panah) (Sasongko dkk., 2023)

2.6. *Tithonia Diversifolia*

Daun Kembang Bulan, daun yang memiliki nama latin *Tithonia diversifolia* ialah tanaman liar yang tumbuh di daerah seperti perairan atau tepi sungai yang memiliki kelembapan tinggi. Umumnya, *Tithonia diversifolia* tumbuh pada ketinggian antara 550 hingga 1.950 meter di atas permukaan laut, dengan suhu antara 15–31°C. Tanaman ini merupakan tanaman semak atau pohon berukuran besar yang memiliki pertumbuhan cepat serta bunga yang menyerupai bunga matahari. Tanaman ini, juga dikenal sebagai bunga matahari liar, berasal dari Amerika Tengah dan kini telah menyebar ke berbagai wilayah tropis seperti Kenya, India, dan Indonesia (Sirait dan Simanihuruk, 2021).

Tanaman ini memiliki klasifikasi kingdom plantae, subkingdom tracheobionta, super divisi spermatophyta, divisi magnoliophyta, kelas magnoliopsida, subkelas asteridae, ordo asterales, famili asteraceae, genus tithonia, dan spesies *Tithonia diversifolia*. Kembang bulan secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat untuk mengatasi kembung, sakit perut, diare, serta memiliki efek antiinflamasi. Bagian tanaman

yang digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif meliputi batang, buah, biji, daun, dan akar (Azhari dkk., 2022).

Daun kembang bulan diketahui mengandung berbagai senyawa penting, seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, serta senyawa golongan seskuiterpen. Tanaman ini mengandung senyawa flavonoid, yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan lebih kuat dibandingkan senyawa lainnya. Pada tanaman ini, flavonoid banyak terdapat pada bagian daun dan batang. *Tithonia diversifolia* (kembang bulan) yang dikenal memiliki sifat antidiabetes karena mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti saponin, steroid, flavonoid, glikosida, dan tanin (Solfaine dkk., 2024).

Ekstrak air dari daun kembang bulan diketahui memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, dan tanin. Dimana saponin mampu menghambat transporter GLUT-1 sehingga dapat mengurangi penyerapan glukosa. Tanin berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan glikogenesis. Sementara itu, flavonoid yang bersifat antioksidan dapat melindungi sel β pankreas dari kerusakan progresif akibat stres oksidatif, sehingga membantu menurunkan risiko terjadinya diabetes melitus tipe 2 (Solfaine dkk., 2021).



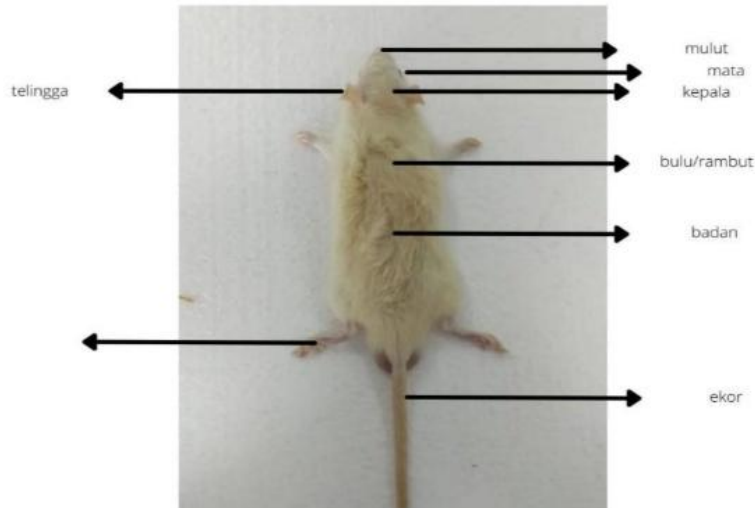
Gambar 2.3 Daun *Tithonia diversifolia* (Amanatie dan Sulistyowati, 2015)

2.7. Tikus Wistar

Tikus putih dengan spesies *Rattus norvegicus* Galur Wistar merupakan salah satu hewan yang sering digunakan dalam penelitian praklinis. Tikus wistar diklasifikasikan sebagai berikut, kingdom animalia, filum chordata, sub filum vertebrata, kelas mammalia, ordo rodentia, famili murinae, genus rattus, spesies *rattus norvegicus* (Aisyah dkk., 2023).

Selain itu, secara morfologis tikus wistar ditandai dengan bentuk hidung yang tumpul, berat badan yang berkisar antara 150 – 600 gram, dan tubuh berukuran besar dengan panjang 18 – 25 cm. Bagian kepala, ekor, serta telinganya berukuran kecil dibandingkan tubuh, dengan panjang telinga sekitar 20 – 23 mm. Tikus memiliki kemampuan penglihatan yang terbatas serta bersifat buta warna. Kekurangan ini diimbangi oleh indra penciuman, peraba, dan pendengaran yang sangat baik. Aktivitas pada malam hari sebagian besar dipandu oleh kumis (vibrissae) dan bulu tubuhnya (Aisyah dkk., 2023).

Tikus putih umumnya mencapai kematangan reproduksi pada usia 1,5 – 5 bulan. Tikus wistar pertama kali dikembangkan pada tahun 1906 di Wistar Institute, dan sejak saat itu menjadi salah satu model hewan yang ideal untuk berbagai studi praklinis hingga saat ini. Penggunaan tikus wistar dalam penelitian didasarkan pada beberapa keunggulan, antara lain ketersediaannya yang mudah, kemudahan dalam penanganan, serta kemiripan fisiologis dengan manusia. Selain itu, tikus Wistar merupakan model non-genetik yang mampu merepresentasikan patogenesis penyakit secara serupa dengan kondisi pada manusia, sehingga menjadikannya pilihan yang relevan untuk penelitian praklinis (Munjiati dkk., 2021).



Gambar 2.4 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Aisyah dkk., 2023)

III. MATERI DAN METODE

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tiga tempat yaitu di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk melakukan nekropsi pengambilan organ pada hewan coba, Laboratorium Riset Terpadu Gedung Dental Learning Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta digunakan sebagai tempat pembuatan preparat jaringan dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada digunakan sebagai tempat pewarnaan imunohistokimia. Penelitian ini sudah berjalan sejak bulan September 2025 hingga Januari 2026.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, scalpel, pinset, blade, gunting, nampan, pot urin, jarum lancet, strip tes, glukometer, toples, sonde, selang, spuit 1ml, *humid chamber*, *tissue cassette*, *microtome*, *paraffin embedding station*, *staining jar*, *automatic tissue processor*, *slide warmer*, *microwave* atau *pressure cooker*, *micropipette* dan *tip*, *water bath*, dan mikroskop.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 18 ekor tikus wistar jantan dengan usia 2-3 bulan, bnf 10%, Nacl 0,9%, aloksan 120 mg/kg BB, ekstrak daun kembang bulan 100 mg/kg BB, tissue, CMC-NA 0,1%, xylene, paraffin, tris-EDTA pH 9.0, sistem deteksi ScyTek UltraTek, dan antibody primer TNF- α Rabbit pAb.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah true experimental yang dirancang menggunakan rancangan Post Test Only Control Group Design dan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen, menurut Hastjarjo, (2019) eksperimen merupakan jenis penelitian yang dilakukan dengan cara memanipulasi variabel independen, mengendalikan variabel luar (extraneous), serta menilai pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen. Secara umum, desain penelitian eksperimen terbagi menjadi tiga kelompok utama, yaitu true experimental design, quasi experimental design, dan pre-experimental design. Desain true experiment dianggap memiliki tingkat kontrol paling tinggi karena menerapkan randomisasi, yakni pengacakan subjek ke dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Salah satu contoh desain ini adalah pretest–posttest control group design, yang mencakup pengukuran sebelum serta setelah perlakuan diberikan, kemudian hasilnya dibandingkan antara kedua kelompok tersebut (Selvira dan Albina, 2025).

Penelitian disusun menggunakan RAL atau Rancangan Acak Lengkap, RAL merupakan salah satu jenis rancangan percobaan yang diterapkan pada kondisi atau lokasi yang bersifat homogen. Disebut acak karena setiap percobaan memiliki kesempatan yang sama untuk memperoleh perlakuan. Keunggulan RAL terletak pada sifatnya yang fleksibel, mudah dianalisis, serta memberikan derajat bebas estimasi maksimum pada komponen error (Hasdar dkk. 2021).

Pada penelitian yang dilakukan menggunakan sebanyak 18 ekor tikus yang kemudian dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, sehingga setiap kelompok ada 6 ekor tikus. Sehingga setiap perlakuan terdapat 6 kali pengulangan. Jika jumlah perlakuan adalah 3, maka dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Penentuan jumlah pengulangan diperoleh berdasarkan rumus Federer, yaitu :

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

Karena terdapat 3 perlakuan, maka diperoleh jumlah ulangan adalah 6. Berikut kelompok perlakuan yang digunakan pada penelitian :

1. Kelompok kontrol tanpa perlakuan : Tikus diberikan air minum tanpa dilakukan perlakuan.
2. Kelompok perlakuan negatif : Tikus diberikan induksi aloksan tanpa diberi ekstrak daun kembang bulan.
3. Kelompok perlakuan positif : Tikus diberikan induksi aloksan dan ekstrak daun kembang bulan.

Dasar dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak daun kembang bulan atau *Tithonia diversifolia* terhadap ekspresi TNF- α dan IL-6 pada organ ginjal tikus wistar model nefropati diabetik.

3.3.2. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 3 variabel yang digunakan, yakni variabel kontrol, variabel bebas, dan variabel terikat.

1. Variabel kontrol : Menggunakan tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, berat badan, umur, jenis pakan dan minum, dan juga cara perawatan serta pemeliharaan.
2. Variabel bebas : Menggunakan ekstrak daun kembang bulan atau *Tithonia diversifolia*.
3. Variabel terikat : Ekspresi dari TNF- α pada organ ginjal tikus wistar.

3.3.3. Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah metode *simple random sampling*, menurut Subhaktiyasa, (2024) metode ini adalah metode pengambilan sampel di mana setiap individu dalam populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih. Tikus wistar yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 18 ekor dengan jenis kelamin jantan, berat badan antara 200 hingga 250 gram, dan berusia 2 sampai 3 bulan. Tikus wistar digunakan karena kemampuannya dalam merepresentasikan patogenesis penyakit secara serupa dengan kondisi pada manusia, sehingga menjadikannya pilihan yang relevan untuk penelitian praklinis (Munjiati dkk., 2021). Kemudian tikus dikelompokkan menjadi 3 kelompok perlakuan dan setiap kelompok mendapat 6 ekor tikus.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Adaptasi Tikus

Sebelum digunakan untuk penelitian, tikus wistar dilakukan proses adaptasi atau penyesuaian selama 1 minggu atau 7 hari di laboratorium. Dalam 1 minggu itu tikus diberikan pakan dan minum sesuai standar atau kebiasaan sebelumnya, dengan suasana kandang dalam pemantauan dengan kondisi terang dan gelap mengikuti jam kerja atau jam operasional laboratorium, dengan suhu antara 20 sampai 25°C. Tikus dilakukan adaptasi dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan yang baru (Mutiarahmi dkk., 2020).

3.4.2. Pembuatan Ekstrak Daun *Tithonia diversifolia*

Pada proses pembuatan ekstrak daun *Tithonia diversifolia* dilakukan untuk mendapatkan ekstrak yang kemudian digunakan untuk perlakuan pada tikus wistar. Pembuatan ini dilakukan dengan cara mengambil daun yang akan digunakan, lalu dicuci sampai bersih pada air mengalir, setelah itu disaring, lalu dipotong menjadi beberapa bagian, setelah itu dikeringkan di tempat teduh untuk menghindari paparan sinar matahari secara langsung (Solfaine dkk., 2024).

Setelah daun kering daun direndam dengan menggunakan etanol 70% hingga terendam dengan baik. Setelah itu diaduk perlahan dan penggantian pelarut dengan cara disaring selama kurang lebih 24 jam. Sisa air dari rendaman daun yang didapatkan kemudian direndam lagi menggunakan etanol 70%. Perendaman dilakukan hingga pelarut warnanya tidak berubah menjadi jernih kembali. Ekstrak yang sudah diperoleh diuap menggunakan alat *rotary evaporator* hingga mendapatkan ekstrak cair, setelah itu disimpan didalam toples atau wadah kedap udara dan jauh dari paparan sinar matahari secara langsung (Fitri dkk., 2024).

3.4.3. Induksi Diabetes Pada Tikus Wistar

Induksi diabetes diberikan kepada tikus kelompok P1 dan P2 diberikan induksi diabetes aloksan dengan dosis 120 mg/kg BB dengan cara injeksi secara intraperitoneal. Pemberian aloksan diberikan agar menimbulkan kondisi diabetes melitus pada tikus sehingga dapat memberikan gambaran keadaan pada penderita yang mengalami diabetes melitus. Tikus dapat disebut diabetes apabila kadar gula darah mencapai 150 mg/dL (Solfaine dkk., 2021).

3.4.4. Pemberian Ekstrak Daun *Tithonia Diversifolia*

Pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* pada kelompok P2 dengan dosis 100 mg/kg BB secara oral dengan menggunakan sonde selama 7 hari. Pemberian ekstrak tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap tingkat ekspresi TNF- α pada tikus yang dilakukan percobaan.

Pemberian ekstrak *Tithonia diversifolia* diberikan setelah tikus dikatakan mengalami diabetes melitus. Pemberian ekstrak dengan dosis 100 mg/kg BB ini dilakukan karena beberapa literatur menyebutkan bahwa pemberian ekstrak *Tithonia diversifolia* dapat terbukti efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah, mengurangi konsentrasi TNF- α , menghambat kerusakan histomorfologis ginjal, dan memulihkan profil hematologi pada tikus yang diinduksi diabetes (Solfaine dkk., 2024).

3.4.5. Euthanasia Dan Pengambilan Organ Ginjal

Setelah dilakukan perlakuan selama 1 minggu atau 7 hari, tikus yang digunakan pada penelitian dilakukan euthanasia untuk diambil sampelnya. Euthanasia dilakukan dengan menggunakan metode dislokasi servikal. Metode ini merupakan metode umum yang digunakan untuk membunuh hewan tanpa adanya rasa sakit secara cepat dan tepat.

Metode dislokasi servikal pada tikus dilakukan dengan cara meletakkan benda tumpul atau ibu jari telunjuk di setiap sisi leher tikus untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor lalu ditarik dengan cepat, sehingga terjadi pemisahan tulang belakang dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak (Aini. 2021).

Setelah dilakukan euthanasia tikus dinekropsi untuk diambil sampel jaringan, dengan menggunakan blade dengan cara membelah area dada hingga pangkal ekor setelah itu diambil sampel organ ginjal yang akan digunakan penelitian. Setelah sampel organ sudah diambil, sampel dicuci menggunakan NaCl fisiologis 0,9%, setelah itu dilakukan fiksasi menggunakan BNF 10% selama 24 jam. Fiksasi bertujuan untuk menjaga morfologi jaringan agar tetap sesuai dengan kondisi aslinya, yaitu serupa dengan jaringan hidup tanpa mengalami perubahan bentuk maupun ukuran (Nadifah dkk., 2022).

3.4.6. Pemrosesan Jaringan

Setelah dilakukan fiksasi jaringan, selanjutnya jaringan masuk dalam tahap pemotongan jaringan. Jaringan atau organ yang telah dilakukan fiksasi dipotong memanjang dengan ketebalan di 3 mm. Setelah dilakukan pemotongan jaringan, dilakukan pemrosesan dengan cara jaringan dilakukan dehidrasi, clearing, dan infiltrasi. Dehidrasi bertujuan untuk menarik kadar air yang ada pada jaringan, hal ini karena paraffin tidak dapat larut dalam air. Clering bertujuan untuk membersihkan jaringan atau organ. Infiltrasi bertujuan untuk mengeluarkan xilen dari dalam jaringan atau organ (Nadifah dkk., 2022).

Pada pemrosesan jaringan digunakan alat sebanyak 12 tabung yang sudah diisi dengan reagen, setiap tabung mendapat masa inkubasi berbeda – beda, tahap dehidrasi

tabung 1 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 70% dengan masa inkubasi 1,5 jam, tahap dehidrasi tabung 2 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 80% dengan masa inkubasi 1,5 jam, tahap dehidrasi tabung 3 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 80% dengan masa inkubasi 2 jam, tahap dehidrasi tabung 4 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 95% dengan masa inkubasi 1,5 jam, tahap dehidrasi tabung 5 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 95% dengan masa inkubasi 2 jam, tahap dehidrasi tabung 6 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 100% dengan masa inkubasi 1 jam, tahap dehidrasi tabung 7 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 100% dengan masa inkubasi 1,5 jam, tahap dehidrasi tabung 8 diisi dengan reagen etanol dengan konsentrasi 100% dengan masa inkubasi 2 jam, selanjutnya tahap clearing tabung 9 diisi dengan reagen Xylene tanpa konsentrasi dengan masa inkubasi 1,5 jam, tahap clearing tabung 10 diisi dengan reagen Xylene tanpa konsentrasi dengan masa inkubasi 2 jam, selanjutnya tahap infiltrasi tabung 11 diisi dengan reagen parafin cair tanpa konsentrasi dengan masa inkubasi 1 jam, tahap infiltrasi tabung 12 diisi dengan reagen parafin cair tanpa konsentrasi dengan masa inkubasi 2,5 jam,

3.4.7. Embedding Jaringan

Setelah semua jaringan sudah mengalami pemrosesan, selanjutnya adalah tahap embedding jaringan. Menurut Ilham dkk. (2024) embedding jaringan merupakan metode pembuatan preparat dengan menanam jaringan ke dalam blok parafin agar diperoleh irisan jaringan yang tipis. Pada tahap ini jaringan ditaruh didalam kaset berbahan plastik atau logam untuk membentuk blok akhir yang siap dipotong. Alat yang dipakai ialah parafin cair dengan suhu tidak boleh lebih dari 58°C, apabila suhu terlalu tinggi dapat mengakibatkan jaringan menjadi rapuh dan mudah robek ketika dilakukan pemotongan.

3.4.8. Pengirisan Jaringan

Setelah dilakukan proses embedding, jaringan lalu dipotong menggunakan mikrotom. Pada tahap pengirisan, jaringan dipotong dengan ketebalan 3 μm , menurut Ilham dkk. (2024) Ketebalan irisan disesuaikan dengan jenis jaringan yang akan diproses. Setelah pita parafin sudah terbentuk, jaringan yang sudah diiris ditaruh didalam water bath dengan suhu 40 - 44°C. Setelah itu dilakukan proses *mounting*, yakni dengan menempelkan jaringan pada kaca objek bening lalu dianalisis menggunakan mikroskop. Selanjutnya preparat hasil mounting tersebut ditaruh diatas slide warmer selama 15 menit dengan suhu 50°C, ketika waktu sudah 20 menit suhu 58°C.

3.4.9. Staining (Pewarnaan) Imunohistokimia

Setelah dilakukan pengirisan jaringan, selanjutnya dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Proses ini menggunakan metode indirect imunohistochemistry dengan sistem deteksi polymer-HRP. Sebelum dilakukan pewarnaan, preparat jaringan masuk kedalam tahap deparafinisasi dengan direndam secara berurutan pada xylene secara 3 kali dengan waktu masing – masing 5 menit), lalu direhidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi absolut, 96%, dan 70%, dengan waktu masing – masing 4 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.

Selanjutnya dilakukan proses *antigen retrieval* menggunakan buffer Tris-EDTA dengan pH 9,0. Setelah itu preparat dipanaskan dengan suhu 95°C selama 10 menit dengan bantuan *microwave* atau *water bath*, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang, lalu dibilas menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing – masing selama 3 menit. Selanjutnya dilakukan blokade peroksidase endogen menggunakan peroxide block selama 10 menit, lalu dicuci dengan PBS.

Selanjutnya preparat dilakukan inkubasi menggunakan antibodi primer, antibodi primer yang digunakan pada TNF- α adalah TNF- α Rabbit polyclonal antibody (pAb). Abclonal kode A11534 Abclonal Technology, USA. Masa inkubasi antibodi primer ialah 30 menit pada suhu ruang, lalu dibilas menggunakan PBS. Selanjutnya diinkubasi dengan UltraTek Anti-Polyvalent selama 10 menit. Lalu dicuci dengan PBS, kemudian diinkubasi ulang menggunakan UltraTek HRP selama 10 menit, lalu dicuci menggunakan PBS. Pewarnaan dilakukan menggunakan DAB Substrate Chromogen yang sudah disiapkan dengan masa inkubasi 1 – 5 menit atau hingga sel target tampak berwarna coklat, lalu preparate dicuci menggunakan air mengalir.

Counter staining dilakukan menggunakan hematoxylin mayer selama 5 menit, lalu dicuci menggunakan air mengalir, lalu direndam pada bluing reagent selama 2 – 3 menit lalu dicuci kembali menggunakan air mengalir, kemudian didehidrasi menggunakan alcohol bertingkat lalu dibersihkan dengan xilol. Setelah semua selesai preparat ditutup dengan mounting medium permanen dan cover glass, lalu dikeringkan hingga siap dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop.

3.4.10. Skoring Ekspresi TNF- α

Hasil pewarnaan imunohistokimia biasanya dianalisis secara semi-kuantitatif dengan menghitung jumlah area yang menunjukkan pewarnaan pada setiap satuan luas jaringan secara manual. Evaluasi hasil pewarnaan imunohistokimia berdasarkan pada dua aspek, yakni indeks ekspresi (sel positif) dan Tingkat intensitas pewarnaan seperti lemah, sedang, atau kuat. Ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal dilihat dengan metode skoring kombinasi dan dievaluasi secara semi-kuantitatif. Penilaian dilakukan dengan melihat 5 lapang pandang secara acak pada setiap preparat dengan pembesaran 400x dengan menggunakan alat bantu mikroskop.

Skoring imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode Allred, metode ini digunakan untuk menilai imunohistokimia dengan didasarkan pada dua parameter utama, yaitu tingkat persentase sel dan intensitas pewarnaan sel. Persentase sel mencerminkan jumlah atau persentase sel yang mengalami pewarnaan, sedangkan intensitas pewarnaan menggambarkan derajat kekuatan warna pada sel yang terdeteksi positif, sedangkan (Prakoso dkk.,2020).

Penilaian skoring ditentukan dengan menentukan jumlah persentase sel positif (S1) yang didasarkan dari persentase sel yang menunjukkan pewarnaan positif pada area lapang pandang. Skor 0 tidak ada sel yang diwarnai, skor 1 kurang dari 1% sel yang diwarnai, skor 2 1-10% sel yang diwarnai, skor 3 11-33% sel yang diwarnai, skor 4 34-66% sel yang diwarnai, skor 5 67-100% sel yang diwarnai.

Selanjutnya berdasarkan skor intensitas (S2) berdasarkan warna agregat imunoreaktif skor 0 tidak ada pewarnaan, skor 1 pewarnaan lemah, skor 2 pewarnaan sedang, dan skor 3 pewarnaan kuat. Untuk menentukan nilai akhir ekspresi dihitung dengan cara mengkalikan antara skor imunopositif (S1) dan skor intensitas (S2).

3.4.11. Analisis Data

Data yang digunakan dalam menentukan hasil penelitian merupakan skor kombinasi ekspresi imunohistokimia yang dianalisis menggunakan metode statistik untuk mengevaluasi adanya perbedaan antar kelompok perlakuan. Analisis deskriptif yang digunakan dilakukan dengan menghitung nilai rata-rata (mean) dan standar deviasi pada setiap kelompok, lalu hasilnya disajikan dalam bentuk tabel atau grafik. Karena data yang digunakan bersifat semi parametrik, diambil dengan uji Kruskal Wallis.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui gambaran ekspresi sitokin pro-inflamasi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) pada jaringan ginjal tikus Wistar yang diberikan induksi diabetes dan ekstrak daun *Tithonia diversifolia*. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia dengan sistem penilaian skoring secara semi-kuantitatif dengan melihat intensitas pewarnaan dan jumlah sel imunopositif.

Pengamatan preparat dilakukan dengan melihat lima lapang pandang yang sudah dipilih secara random dengan menggunakan bantuan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pengamatan reaksi imunohistokimia pada jaringan ginjal hanya difokuskan pada area glomerulus seperti sel mesangial dan podosit, dan juga pada area sekitar epitel tubulus. Reaksi dari imunohistokimia dinyatakan positif apabila terlihat warna coklat pada area tersebut, hal ini menunjukkan adanya ekspresi TNF- α pada area sel tersebut.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan tiga kelompok perlakuan berbeda, yakni **P0** (tanpa perlakuan) tikus diberikan air minum tanpa dilakukan perlakuan. **P1** (kelompok perlakuan negatif) tikus diberikan induksi aloksan tanpa diberi ekstrak daun kembang bulan. **P2** (kelompok perlakuan positif) tikus diberikan induksi aloksan dan ekstrak daun kembang bulan.

4.1.1. Skoring Imunohistokimia Ekspresi TNF-a Pada Jaringan Ginjal

Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa adanya perbedaan ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan. Kelompok P0 (tanpa perlakuan), tikus Wistar diberi air minum tanpa perlakuan, didapati ekspresi TNF- α menunjukkan angka relatif sedang, dibandingkan dengan kelompok P1. Warna coklat terlihat tersebar di beberapa jaringan ginjal, terutama di beberapa bagian di area glomerulus dan sel epitel tubulus.

Sedangkan pada P1 (kelompok perlakuan negatif), tikus Wistar yang diinduksi aloksan tanpa diberikan ekstrak. Didapati bahwa ekspresi TNF-a relatif tinggi, dimana intensitas pewarnaan juga lebih kuat dan lebih merata, sedangkan jumlah sel imunopositif juga lebih banyak dibanding kelompok P0 dan P2. Hal ini dikarenakan tikus mengalami diabetes sehingga memicu inflamasi kronis sangat kuat di ginjal, sehingga ekspresi TNF-a mengalami peningkatan secara signifikan dibanding kelompok tikus tanpa perlakuan P0.

Sementara, pada kelompok P2 (kelompok perlakuan positif), tikus Wistar diberikan induksi aloksan dan ekstrak daun. Didapati bahwa ekspresi TNF-a menunjukkan angka relatif rendah dibanding kelompok P0 dan P1. Intensitas pewarnaan dan jumlah sel imunopositif juga lebih rendah dibanding kelompok P0 maupun kelompok P1.

Dari hasil penelitian yang sudah dijelaskan diatas, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* efektif dalam menurunkan ekspresi TNF-a. Hal ini dikarenakan kandungan senyawa bioaktif yang dimiliki oleh daun *Tithonia*

diversifolia, sehingga dapat menghambat peningkatan ekspresi TNF-a pada tikus yang mengalami diabetes mellitus.

Tabel 4.1 Rata – rata skor IRS ekspresi TNF-a.

Kelompok	N	Mean ($\pm$ Standar Deviasi)
S1	3	5,33* ($\pm$ 1,15)
S2	3	7,33** ($\pm$ 1,15)
S3	3	4,66*** ($\pm$ 2,30)
Total	9	5,77

Keterangan : * : Kelompok kontrol tanpa perlakuan (S1), ** : Kelompok perlakuan negatif (S2), *** : Kelompok perlakuan positif (S3).

Berdasarkan hasil Immunoreactive Score (IRS), didapatkan bahwa nilai rata – rata tertinggi didapatkan kelompok perlakuan S2 dengan nilai 7,33, sedangkan kelompok perlakuan S3 mendapatkan nilai rata – rata terendah yakni 4,66. Sementara pada kelompok perlakuan S1 didapatkan nilai rata – rata 5,33, hasil ini tentu lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan S2, sedangkan lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan S3.

Data dari tabel ini didapati bahwa kelompok tikus yang mengalami diabetes mellitus menunjukkan adanya peningkatan respon inflamasi TNF-a pada jaringan ginjal. Sedangkan pada kelompok yang diberikan ekstrak daun *Tithonia diversifolia*, menunjukkan adanya penurunan nilai IRS secara signifikan, hal ini dapat dikatakan bahwa ekstrak daun *Tithonia diversifolia* efektif dalam menghambat meningkatnya respon inflamasi TNF-a.

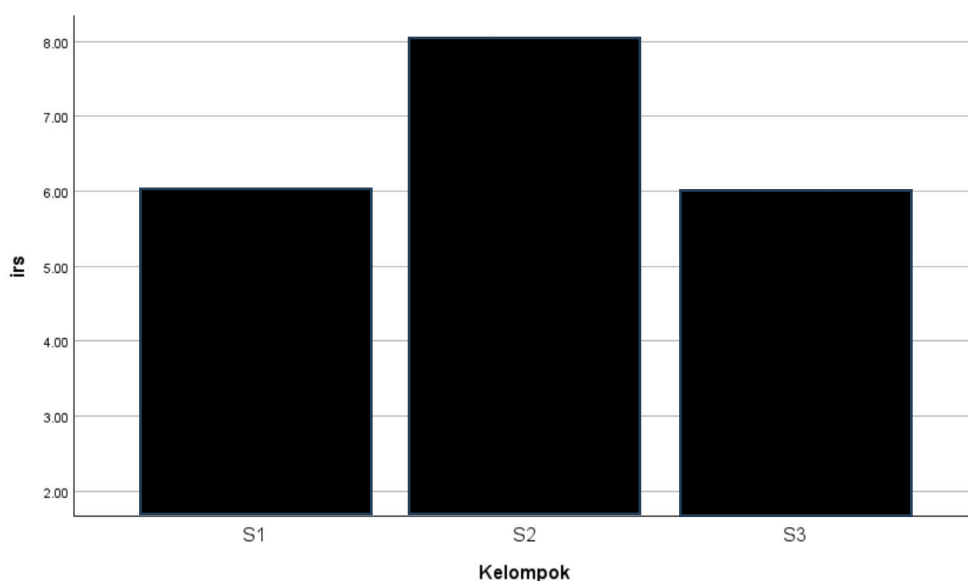
4.1.2. Hasil Analisis Uji Kruskal-Wallis

Uji Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar pada ketiga kelompok perlakuan. Hasil pada uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai signifikansi (Asymp. Sig) sebesar 0.136, dengan nilai Chi-square sebesar 3.987, dan derajat kebebasan (Df) sebesar 2. Nilai signifikansi tersebut menunjukkan bahwa $p = 0.136$ ($p > 0,05$), sehingga secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar diantara kelompok perlakuan.

Maka dari itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian perlakuan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perbedaan ekspresi TNF-a pada masing – masing kelompok perlakuan. Karena hasil dari uji Kruskal-Wallis menunjukkan hasil tidak adanya perbedaan yang signifikan, maka uji post hoc atau uji Mann-Whitney tidak dilakukan.

4.1.3. Grafik Ekspresi TNF-a

Berikut ini merupakan grafik imunohistokimia ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan. Dengan keterangan sebagai berikut : S1 : Kelompok kontrol tanpa perlakuan, S2 : Kelompok perlakuan negatif, dan S3 : Kelompok perlakuan positif.



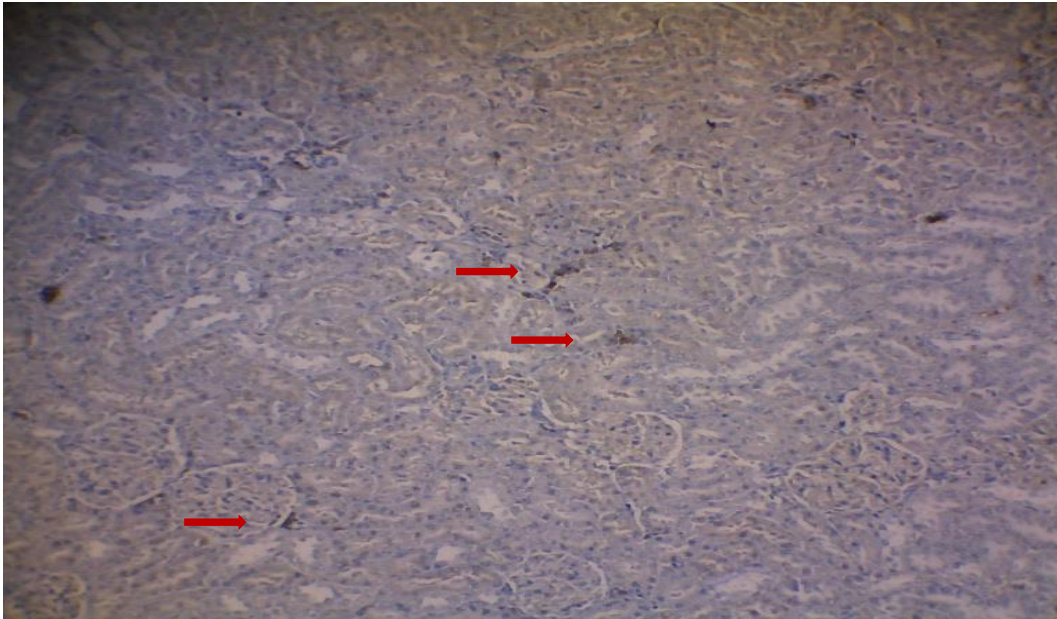
Gambar 4.1 Grafik rata – rata ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar setiap kelompok perlakuan. Keterangan : S1 : Kelompok kontrol tanpa perlakuan, S2 : Kelompok perlakuan negatif, S3 : Kelompok perlakuan positif.

Berdasarkan grafik rata – rata skor IRS diatas, menunjukkan bahwa kelompok S2 didapatkan hasil ekspresi TNF-a tertinggi dibanding kelompok lain, sedangkan pada kelompok S1 menunjukkan adanya penurunan ekspresi TNF-a. Sementara kelompok S3 menunjukkan penurunan ekspresi TNF-a paling rendah berbeda dengan kelompok perlakuan S1 dan S2.

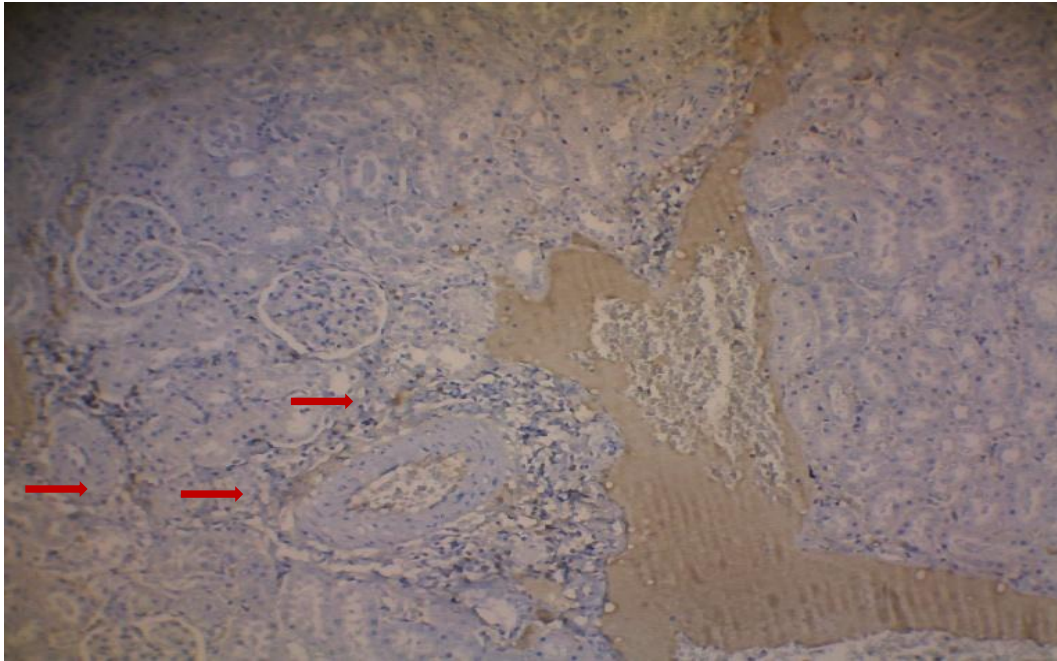
Grafik diatas menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Tithonia diversifolia* efektif dalam menurunkan ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar yang diinduksi diabetes mellitus.

4.1.4. Gambaran Imunohistokimia Pada Setiap Kelompok Perlakuan

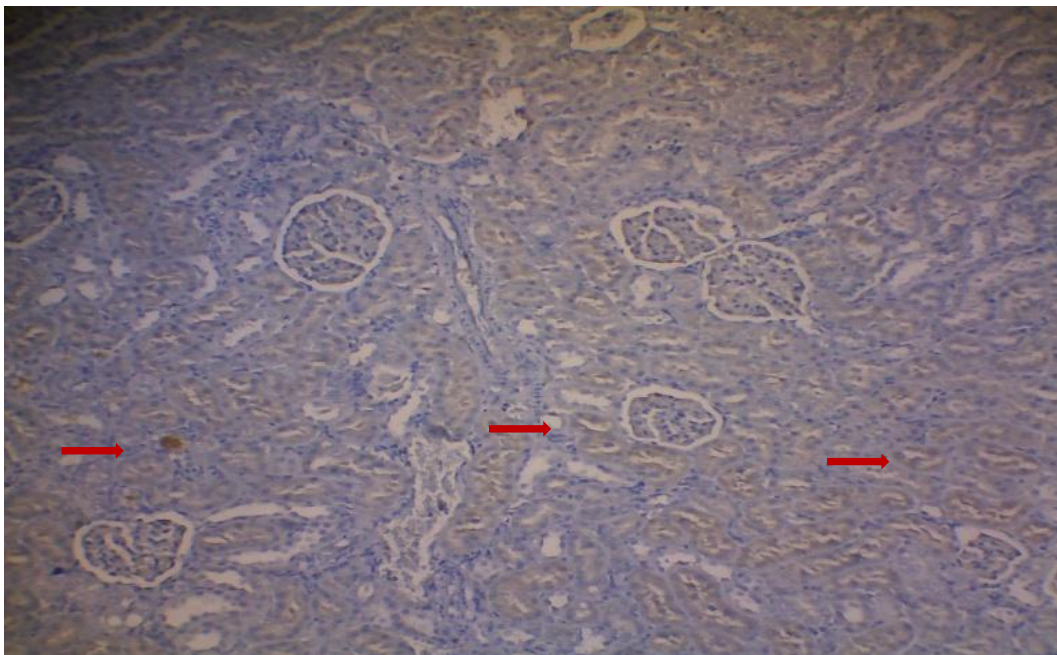
Berikut ini merupakan gambaran imunohistokimia ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan. Ekspresi positif TNF-a ditandai dengan adanya pewarnaan coklat pada sitoplasma sel, di ginjal ekspresi TNF-a sering ditemukan pada sel epitel tubulus dan sebagian sel glomerulus.



Gambar 4.2 Ekspresi imunohistokimia TNF-a organ ginjal tikus kelompok (P0) terlihat endapan coklat pada area sekitar sel epitel tubulus dan glomerulus (panah merah) (IHK, 400x).



Gambar 4.3 Ekspresi imunohistokimia TNF-a organ ginjal tikus kelompok (P1) terlihat endapan coklat pada area sekitar sel epitel tubulus dan glomerulus (panah merah) (IHK, 400x).



Gambar 4.4 Ekspresi imunohistokimia TNF-a organ ginjal tikus kelompok (P2) terlihat endapan coklat pada area sekitar sel epitel tubulus dan glomerulus (panah merah) (IHK, 400x).

Pada saat dilakukan pengamatan imunohistokimia, terlihat bahwa ekspresi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-a) pada jaringan ginjal ditandai dengan adanya endapan berwarna coklat pada beberapa sel seperti di glomerulus dan sel epitel tubulus.

Pada pemeriksaan imunohistokimia pada kelompok kontrol normal, terlihat jumlah sel imunopositif dan intensitas pewarnaan yang terjadi pada jaringan ginjal relatif sedang. Ini menunjukkan bahwa ekspresi TNF-a yang terjadi pada kelompok kontrol normal jaringan ginjal relatif lebih normal dibanding kelompok tikus yang mengalami diabetes.

Pada pemeriksaan imunohistokimia pada kelompok tikus yang diinduksi alokan tanpa diberikan ekstrak, terlihat peningkatan jumlah sel imunopositif dibandingkan dengan kelompok kontrol normal, dengan intensitas pewarnaan yang relatif lebih kuat. Hal ini menunjukkan bahwa tikus yang mengalami diabetes mellitus menandakan adanya peningkatan respons inflamasi TNF-a lebih meningkat dibandingkan kelompok kontrol normal.

Sementara pada kelompok tikus diabetes yang diberikan ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terlihat jumlah sel imunopositif yang lebih sedikit dengan intensitas pewarnaan sedang hingga lemah, dibandingkan kelompok kontrol normal dan kelompok perlakuan negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* efektif dalam menurunkan ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus yang diinduksi diabetes.

4.2. Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa ekspresi yang dihasilkan oleh sitokin pro-inflamasi *Tumor Necrosis Factor-alpha* yang

telah diamati menggunakan metode imunohistokimia menunjukkan adanya perbedaan ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal tikus disetiap kelompok perlakuan. Pengamatan pada penelitian dilakukan dengan fokus dengan melihat intensitas pewarnaan dan jumlah sel imunopositif yang kemudian hasil ekspresinya dihitung menggunakan metode Immunoreactive score (IRS). Immunoreactive score (IRS) adalah nilai yang diperoleh dari hasil perkalian antara skor persentase sel yang menunjukkan imunopositif dengan skor intensitas pewarnaan pada sel tersebut dalam pemeriksaan imunohistokimia (Resti dkk., 2022).

Ekspresi TNF-a pada jaringan ginjal ditandai adanya endapan berwarna coklat yang menempel pada sitoplasma sel. Pewarnaan coklat terjadi karena adanya reaksi antara antibodi dengan antigen dari TNF-a pada jaringan ginjal. Ekspresi dari TNF-a teramati pada area sekitar sel glomerulus yakni mesangial dan podosit, dan juga disekitar sel epitel tubulus. Hal ini karena TNF-a diproduksi oleh sel ginjal intrinsik seperti sel mesangial, endotel, dendritik, dan sel tubulus ginjal (Ding dkk., 2021).

4.2.1. Ekspresi TNF-a Pada Jaringan Ginjal Tikus Normal

Pada kelompok kontrol normal tanpa perlakuan (SI), ekspresi TNF-a pada kelompok S1 banyak ditemukan pada sitoplasma sel epitel tubulus dan beberapa ditemukan di sel glomerulus. Ekspresi TNF-a pada kelompok S1 relatif rendah, hal ini terlihat dari jumlah sel imunopositif yang lebih sedikit dengan rata – rata persentase tertinggi di angka 25%, dan intensitas pewarnaan cenderung lemah hingga sedang dengan rata – rata tertinggi di angka 1,8. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tinggi rendahnya kadar TNF-a dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti respon imun yang lambat dan pertambahan usia (Sunarto dan Restami, 2024).

4.2.2. Ekspresi TNF- α Pada Jaringan Ginjal Tikus Yang Diinduksi Aloksan

Pada kelompok perlakuan negatif (S2) tikus yang diinduksi aloksan terlihat adanya peningkatan ekspresi TNF- α yang ditandai dengan tingginya persentase jumlah sel yang imunopositif dengan rata – rata persentase tertinggi di 57,6% dan juga intensitas pewarnaan yang juga lebih kuat dengan rata – rata tertinggi di 2,4. Tentu nilai rata – rata ini lebih tinggi jika dibandingkan kelompok perlakuan S1 maupun S2.

Kadar TNF- α yang meningkat pada penderita diabetes dipicu oleh tingginya glukosa intraseluler akibat kondisi hiperglikemia. Dimana TNF- α berperan dalam respon inflamasi sistemik serta berhubungan dengan perkembangan resistensi insulin, obesitas, dan diabetes. Dalam mekanisme resistensi insulin, TNF- α dapat meningkatkan pelepasan asam lemak bebas dari jaringan adiposa, dengan menekan sintesis adiponektin yang berfungsi meningkatkan sensitivitas insulin, serta menghambat proses fosforilasi pada residu tirosin di substrat reseptor insulin yang penting dalam transduksi sinyal intraseluler (Sunarto dan Restami, 2024).

TNF- α juga mengaktivasi NF- κ B, yang memicu peningkatan ekspresi molekul adhesi pada permukaan sel endotel dan sel otot polos vaskular. Proses ini berkontribusi terhadap terjadinya inflamasi pada jaringan adiposa, disfungsi endotel, hingga akhirnya memicu proses aterosclerosis. Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa kadar TNF- α dalam darah dan urin pasien penderita diabetes secara signifikan lebih tinggi dibandingkan pasien yang tidak mengalami diabetes. Perubahan khas yang terjadi pada penderita diabetes adalah hipertrofi ginjal dan peningkatan filtrasi. Perubahan ini berkaitan erat dengan proses inflamasi, terutama sitokin pro-inflamasi TNF- α (Ding dkk., 2021).

4.2.3. Ekspresi TNF- α Pada Jaringan Ginjal Tikus Yang Diinduksi Aloksan dan Diberikan Ekstrak Daun *Tithonia diversifolia*

Pada kelompok perlakuan positif (S2) tikus yang diinduksi aloksan dan diberikan ekstrak daun *Tithonia diversifolia*, terlihat adanya penurunan nilai ekspresi TNF- α pada jumlah sel yang imunopositif dengan rata – rata persentase tertinggi di angka 12,8% dan juga intensitas pewarnaan yang cenderung sedang dengan rata – rata tertinggi di 2,2.

Daun kembang bulan atau *Tithonia diversifolia* dikenal memiliki sifat antidiabetes karena mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti saponin, steroid, flavonoid, glikosida, dan tanin. Dimana saponin mampu menghambat transporter GLUT-1 sehingga dapat mengurangi penyerapan glukosa. Tanin berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan glikogenesis. Sementara itu, flavonoid yang bersifat antioksidan dapat melindungi sel β pankreas dari kerusakan progresif akibat stres oksidatif, sehingga membantu menurunkan risiko terjadinya diabetes melitus tipe 2 (Solfaine dkk., 2021).

Pada beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa *Tithonia diversifolia* dinilai mampu menurunkan konsentrasi glukosa pada tikus yang menderita diabetes. *Tithonia diversifolia* juga mengandung senyawa fenolik dan bersifat antioksidan. Dimana senyawa fenolik memiliki sifat terapeutik terhadap berbagai penyakit karena aktivitas antiinflamasi dan antioksidanya. Sedangkan antioksidan dalam daun *Tithonia diversifolia* melindungi dari stres oksidatif, sehingga dapat meningkatkan kadar adiponektin (Muniroh dkk., 2022).

4.2.4. Keterkaitan Hasil Imunohistokimia dengan Analisis Statistik

Berdasarkan hasil pengamatan imunohistokimia yang telah dilakukan, pada kelompok S2 menunjukkan adanya intensitas pewarnaan dan jumlah sel imunopositif yang relatif tinggi dibandingkan kelompok S1 dan S3. Hal ini mengindikasikan bahwa ekspresi TNF-a pada kelompok S2 lebih meningkat, ini menandakan aktivitas inflamasi yang lebih masif pada jaringan ginjal tikus yang menderita diabetes. Sebaliknya, kelompok S3 menunjukkan intensitas pewarnaan dan jumlah sel imunopositif yang lebih rendah, sehingga pada kelompok ini mengalami penurunan ekspresi TNF-a yang disebabkan oleh adanya pengaruh dari ekstrak *Tithonia diversifolia*.

Akan tetapi hasil tersebut tidak didukung oleh hasil analisis statistik yang telah dilakukan, ketika data Immunoreactive score (IRS) dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis, diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,136 > 0,05$. Hasil uji yang didapatkan ini menunjukkan bahwa perbedaan tersebut tidak signifikan secara statistik. Hal ini berarti bahwa meskipun secara nyata terlihat adanya perbedaan ekspresi TNF-a pada setiap kelompok, namun perbedaan tersebut tidak signifikan secara statistik.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan terkait ekspresi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-a) pada jaringan ginjal tikus wistar yang dianalisis menggunakan metode imunohistokimia dan penilaian Immunoreactive Score (IRS) dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* terbukti berpengaruh nyata dalam menurunkan respon inflamasi TNF- α pada ginjal tikus Wistar yang mengalami diabetik. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Tithonia diversifolia* memiliki aktivitas biologis yang berperan dalam modulasi respon inflamasi pada jaringan ginjal.
2. Ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus Wistar yang diberikan perlakuan ekstrak daun *Tithonia diversifolia* menunjukkan adanya perubahan intensitas dibandingkan dengan kelompok kontrol, yang mencerminkan adanya perbaikan kondisi inflamasi jaringan akibat pemberian ekstrak.
3. Luas area ekspresi TNF- α pada jaringan ginjal tikus Wistar yang mengalami diabetik juga mengalami perubahan setelah pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia*, yang mengindikasikan adanya penurunan distribusi respon inflamasi pada jaringan ginjal.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka bagi peneliti selanjutnya disarankan untuk meneliti lebih lanjut terkait mekanisme kerja dari ekstrak daun *Tithonia diversifolia* dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada ginjal tikus yang mengalami diabetes, sehingga dapat diketahui potensi penggunaannya sebagai agen terapi atau protektif terhadap kerusakan ginjal. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode analisis yang lebih kuantitatif, seperti ELISA atau PCR, untuk mengukur kadar TNF- α secara lebih akurat dan objektif. Disarankan untuk melakukan evaluasi tambahan terhadap parameter lain yang berhubungan dengan kerusakan ginjal, seperti marker stres oksidatif, sitokin inflamasi lain seperti IL-6, IL-12, dan sitokin pro-inflamasi lainnya, dengan pemeriksaan histopatologi yang lebih detail.

DAFTAR PUSTAKA

- Agi , Y. A.;& Titrawani. (2021). Gambaran Histologi Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769) Akibat Pemberian Kopi Putih. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 60-67.
- Aini, A. N. (2021). Pre-Screening Profil Protein Daging Sebagai Pengaruh Variasi Metode Penyembelihan Hewan. *Warta Akab*, 9-13.
- Aisyah, S.;Gumelar, A. S.;Maulana, M. S.;& Amalia, R. A. (2023). Identifikasi Karakteristik Hewan Vertebrata Mamalia Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Berdasarkan Morfologi dan Anatominya. *Prosiding Semnas Bio 2023*, 484-493.
- Alfora, D.;Saori, E.;& Fajriah, L. N. (2021). Pengaruh konsumsi makanan cepat saji terhadap gizi remaja. *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 43-49.
- Alwiyah, F.;Rudiyanto, W.;Anggraini, D. I.;& Indri Windarti. (2024). Anatomi dan Fisiologi Ginjal: Tinjauan Pustaka. *Medula*, 285-289.
- Amanatie;& Sulistyowati, E. (2015). Structure Elucidation of the Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Jurnal Sains dan Matematika*, 101-106.
- Anggraini, D.;Widiani, E.;& Budiono. (2021). Gambaran Tanda Gejala Diabetes Mellitus Tipe II Pada Pasien Sebelum dan Sesudah Pemberian Terapi Air Putih (Hydrotherapy): Studi Kasus. *Indonesian Journal of Nursing and Health Sciences* , 131-140.
- Asyikin, A.;Nurisyah;& Dewi , R. (2024). Edukasi Hidup Sehat Untuk Pencegahan Diabetes Dengan Pemanfaatan Serbuk Instan Kayu Secang, Kayu Manis, Jahe, Dan Sereh Bagi Warga Kelurahan Sambung Jaya Kota Makassar. *Jurnal Pengabdian Kefarmasian*, 5-10.

- Azhari, M.;Nuraida;& Hasrizart, I. (2022). Efektivitas Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) Dan Babadotan (*Ageratum Conyzoides*) Terhadap Mortalitas Kumbang Tanduk (*Oryctes Rhinoceros*) Di Laboratorium. *Jurnal Agrofolium*, 51-55.
- D'azzuri, B. M.;Susianti;& Karima, N. (2023). Minyak Nabati sebagai Pengganti Bahan Kimia Toksik pada Proses Clearing Jaringan Histopatologi. *Medula*, 1080-1083.
- Ding, Z.;Jiang, H.;Fan, Y.;& Sun, G. (2021). Protective Effect of Adalimumab on Diabetic Nephropathy by Regulating TNF- α Signal Pathway. *Iran J Public Health*, 2536-2545.
- Fitri, D. R.;Fajar, I. R.;& Syafei , D. (2024). Formulasi Ekstrak Bunga Kembang Bulan *Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A. Gray Dalam Sediaan Serum Sunscreen. *Jurnal Kesehatan Perintis*, 98-109.
- Fратиwi, N.;Saranani, S.;Agastia, G.;& Isrul, M. (2022). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dan Pengaruhnya Terhadap Kadar Interleukin 6 (IL-6) Pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*, 54-67.
- Hasdar, M.;Wadli;& Meilani, D. (2021). Rancangan Acak Lengkap Dan Rancangan Acak Kelompok Pada pH Gelatin Kulit Domba Dengan Pretreatment Larutan NaOH. *Journal of Technology and Food Processing*, 17~23.
- Hastjarjo, T. D. (2019). Rancangan Eksperimen-Kuasi. *Buletin Psikologi*, 187-203.
- Ilham, M.;Ernayunita;& Rahmadi, H. Y. (2024). Pendekatan Histologi Dalam Studi Morfogenesis Embrio Somatik Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Dalam Kultur Jaringan. *Warta Ppks*, 161-170.
- Khasanah, N.;Santoso, H. B.;& Nurliani, A. (2023). Studi morfologi jantung, paru, limpa, ginjal, dan ovarium musang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) dari Kalimantan, Indonesia. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 158-165.
- Muniroh, L.;Mahmudah ;& Solfaine, R. (2022). Effect of *Tithonia diversifolia* Leaf Extract on Leptin, Adiponectin, and Insulin Receptor Levels in Diabetic Rats. *Journal Of Preventive Nutrition and Food Science*, 63-69.
- Munjiati, N. E.;Sulistiyowati, R.;& Kurniawan. (2021). Pengaruh Pemberian Streptozotocin Dosis Tunggal Terhadap Kadar Glukosa Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). *Meditory*, 62-67.
- Mustofa, E. E.;Purwono, J.;& Ludiana. (2022). Penerapan Senam Kaki Terhadap Kadar Glukosa Darah Pada Pasien Diabetes Melitus di Wilayah Kerja Puskesmas Purwosari Kec. Metro Utara Tahun 2021. *Jurnal Cendikia Muda*, 78-86.

- Mutiarahmi, C. N.;Hartady, T.;& Lesmana, R. (2020). Kajian Pustaka: Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan. *Indonesia Medicus Veterinus*, 418-428.
- Prakoso, T. I.;Arifin, M. T.;Sadhana, U.;Puspasari, D.;& Astuti, M. D. (2020). Ekspresi Reseptor Estrogen, Reseptor Progesteron, Dan Digit Ratio Pada Pasien Meningioma. *Journal Of Clinical Medicine*, 439-446.
- Resti, N.;Djannah, F.;& Habib, P. (2022). Hubungan antara Umur dengan Ekspresi MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) pada Penderita Limfadenitis Tuberkulosis. *Jurnal Kedokteran Unram*, 1162-1168.
- Sagita, P.;Apriliana, E.;Mussabiq, S.;& Soleha, T. U. (2021). Pengaruh Pemberian Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Penyakit Diabetes Melitus. *Jurnal Medika Hutama*, 1266-1272.
- Saputra, S. I.;Berawi, K. N.;Susianti;& Hadibrata, E. (2023). Hubungan Diabetes Melitus dengan Kejadian Gagal Ginjal Kronik. *Medula*, 787-791.
- Sasongko, H.;Nugroho, A. E.;Nurrochmad, A.;& Rohman, A. (2023). Nephroprotective Effect of Milkfish, Patin, and Snakehead Fish Oil by Suppressing Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 372–382.
- Selvira;& Albina, M. (2025). Model Penelitian Eksperimental Dalam Pendidikan: Jenis, Tujuan, dan Aplikasinya. *Jurnal Media Akademik*, 1-14.
- Sirait, J.;& Simanihuruk, K. (2021). Pemanfaatan *Tithonia diversifolia* sebagai Pakan Ruminansia. *WARTAZOA*, 137-146.
- Solfaine, R.;Hamid, I. S.;& Desiandura, K. (2024). Therapeutic potential of *Tithonia diversifolia* extract: Modulating IL-35, TNF- α , and hematology profile in streptozotocin-induced rat model. *Open Veterinary Journal*, 2250-2255.
- Solfaine, R.;Sari, D. A.;Wati, A. N.;& Roeswandono. (2021). Efektifitas Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Gambaran Histopatologi Pankreas Pada Tikus Yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Vitek Bidang Kedokteran Hewan*, 15-24.
- Subhaktiyasa, P. G. (2024). Menentukan Populasi dan Sampel: Pendekatan Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. *Jurnal Ilmiah Profesi Pendidikan*, 2721 – 2731.
- Sunarto;& Restami, D. N. (2024). Analisis Kadar Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF-Alpha) Pada Pasien Tuberkulosis Dengan Diabetes Melitus Dan Pasien Tuberkulosis Tanpa Diabetes Melitus Di RSP UNHAS Makassar. *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 11-24.

- Tandjungbulu, Y. F.;Virgiawan, A. R.;Rahman;Luthfi, M. A.;& Haerani. (2023). Hasil Pemeriksaan Biomarker Fungsi Ginjal Pada Penderita Diabetes Melitus Ditinjau Dari Lama Menderita dan Hasil Pemeriksaan HbA1c. *Media Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar*, 249-262.
- Wardhana, A.;Mahmuda, I. N.;Sulistiyani;Ermawati, S.;Metana Puspitasari, M.;& Binuko, R. S. (2024). Hubungan HbA1c, Mikroalbuminuria dan Kolesterol Dengan Estimasi Glomerular Filtration Rate (GFR) Pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2. *Journal of Innovation Research and Knowledge*, 775-786.