

**EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ )  
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) RENAL  
FIBROSIS PASCA INDUKSI  
STREPTOKINASE**

**SKRIPSI**

Oleh :

**SRI HELDA WULANDARI**

**0911313035**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ )  
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) RENAL  
FIBROSIS PASCA INDUKSI  
STREPTOKINASE**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**SRI HELDA WULANDARI**

**0911313035**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Dan Gambaran Histopatologi Ginjal  
Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) *Renal Fibrosis* Pasca Induksi Streptokinase

Oleh :

**SRI HELDA WULANDARI**

**0911313035**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 16 juli 2013  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 1898802 2 001

**Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P.,M.Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Ketua Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan  
Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS**  
NIP. 19480615 197702 2 001

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Sri Helda Wulandari

NIM : 0911313035

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor (TNF- $\alpha$ )* Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) *Renal Fibrosis* pasca Induksi Streptokinase.

Dengan ini menyatakan bahwa`:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 16 Juli 2013  
Yang Menyatakan,

**Sri Helda Wulandari**  
NIM. 0911313035

repository.ub.ac

EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ ) DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
RENAL FIBROSIS PASCA INDUKSI STREPTOKINASE

ABSTRAK

Streptokinase adalah protein ekstraselluler  $\beta$ -hemolytic *streptococci* yang digunakan untuk mengatasi permasalahan penyakit jantung dan sumbatan pembuluh darah. Streptokinase bersifat toksik dan menyebabkan kerusakan diberbagai organ tubuh diantaranya kerusakan ginjal yang dapat menyebabkan renal fibrosis. Renal Fibrosis terjadi karena adanya jaringan fibrosa yang banyak mengandung serat kolagen akibat dari kerusakan sel-sel epitel pada organ ginjal. Berkembangnya kerusakan ginjal dari fase akut menjadi fibrosis ginjal ditandai dengan adanya *glomerulosclerosis* dan fibrosis tubulointerstitial serta peningkatan ekspresi *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus *renal fibrosis* yang diinduksi dengan Streptokinase. Dalam penelitian ini, tikus dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol (A), Streptokinase 1 x 6000 IU (B), Streptokinase 2 x 6000 IU dengan interval waktu lima hari (C), Streptokinase 3 x 6000 IU dengan interval waktu lima hari (D). Induksi pada tikus dilakukan dengan induksi Streptokinase sebanyak 6000 IU pada bagian ekor secara intravena pada vena *coccygea*. Data yang diamati dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi dan ekspresi TNF- $\alpha$  yang diamati dengan metode immunohistokimia. Hasil penelitian pada gambaran histopatologi ginjal pasca induksi Streptokinase menunjukkan adanya perubahan *epithelial mesenchymal transtition* (EMT) menjadi fibroblas dan myofibroblas yang mengindikasikan terjadinya renal fibrosis. Hasil analisis statistika terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  berbeda nyata secara signifikan ( $P > 0,05$ ) dan persentase ekspresi TNF- $\alpha$  yang meningkat sebesar 350% pada kelompok D yang diinjeksikan 3 x 6000 IU dengan interval waktu lima hari dibandingkan dengan kontrol.

**Kata kunci :** *Renal fibrosis*, Streptokinase, *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ), histopatologi ginjal.

## Expression of *Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )* and Renal Histopathological Appearance in Rats (*Rattus norvegicus*) Renal Fibrosis Post Induced Streptokinase

### ABSTRACT

Streptokinase is the  $\beta$ -hemolytic streptococci extracellular protein that is used to overcome the problems of heart disease and blood vessel blockage. Streptokinase is toxic to various organs especially renal that can lead to renal fibrosis. Renal fibrosis is a fibrotic tissue condition in renal that contains collagen fibers that caused epithelial cells damaged. The development of kidney damage from the acute phase to renal fibrosis is characterized by glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis and also highly expression of TNF- $\alpha$ . The purpose of this study was to determine the expression of TNF- $\alpha$  and histopathology appearance of renal fibrosis on streptokinase induced rats. In this study, rats were divided into 4 groups: control (A), 1 x 6000 IU streptokinase induced (B), 2 x 6000 IU streptokinase induced with five days interval (C), 3 x 6000 IU streptokinase induced five in days intervals (D). The rats were injected with streptokinase on vena coccygea. The histopathology of kidney were confirmed microscopically and TNF- $\alpha$  expression were determine by immunohistochemistry. The renal histopathology of rat induced Streptokinase showed the transformation of epithelial mesenchymal transition (EMT) into fibroblast and myofibroblast which indicates the occurrence of renal fibrosis. Statistic analisis showed that TNF- $\alpha$  expression were significantly different between groups ( $P > 0,05$ ). The TNF- $\alpha$  expression rats that induced by 3 x 6000 IU in five days interval could increase 350% compar with control.

Keywords: *Renal fibrosis*, Streptokinase, *Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )*, Renal histopathology .



## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Renal Fibrosis Pasca Induksi Streptokinase”. Penelitian ini dibawah payung penelitian yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES yang bertujuan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini :

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES., selaku Dosen Pembimbing 1 dan selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu.
2. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P.,M.Biotech selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing dengan kesabaran, koreksi dan waktu.
3. Dyah Kinasih Wuragil S.Si., MP., MS dan drh. Handayu Untari selaku Dosen penguji atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu.
4. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan PKH UB.
5. Analis Staf Laboratorium Biokimia, dan Asisten di Jurusan Kimia, Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Malang dan Laboratorium Biosain Universitas Brawijaya, yang telah membantu penulis dalam penelitian.
6. dr.Rachmad Sarwo Bekti, S.Ked atas bimbingan dan arahan dalam menyelesaikan penulisan skripsi.

7. Teman-teman Renal Fibrosis-Streptokinase “Pascara, Rizka, Keni, Candra, Raka, Vindi” yang telah berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Teman-teman 2009 yang selalu memberikan dorongan, semangat, inspirasi dan keceriaan.
9. Keluarga penulis, Bapak dan Ibu tercinta yang senantiasa memberikan semangat dan doa. Saudara yang memberikan dukungan dan Nealvin yang selalu senantiasa menemani dengan setia pengerjaan skripsi ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan.

Malang, 16 Juli 2013

Penulis



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	4
1.5 Manfaat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Streptokinase .....	5
2.2 Renal Fibrosis .....	7
2.3 <i>Tumor Necrosis Faktor</i> (TNF- $\alpha$ ) .....	11
2.4 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus Norvegicus</i> ) .....	13
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b> .....	<b>16</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	16
3.2 Hipotesis .....	17
<b>BAB IV METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>18</b>
4.1 Tempat dan Waktu .....	18
4.2 Bahan dan Alat Penelitian .....	18
4.2.1 Bahan Penelitian .....	18
4.2.2 Alat Penelitian .....	18
4.3 Rancangan Penelitian .....	19
4.4 Variabel Penelitian .....	20
4.5 Metode Penelitian .....	20
4.5.1 Persiapan Hewan Coba .....	20
4.5.2 Preparasi Streptokinase .....	21
4.5.3 Injeksi Streptokinase Pada Bagian Ekor Tikus .....	22
4.5.4 Pengambilan Jaringan Pada Bagian Ginjal .....	22
4.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Dengan Pewarnaan Hematoxilin Eosin (HE) .....	22
4.5.6 Uji Imunohistokimia (Ekspresi TNF- $\alpha$ ) .....	23

4.5.5 Analisis Data ..... 24

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 25

    5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Pada Ginjal Renal Fibrosis. 25

    5.2 Histopatologi Ginjal Renal Fibrosis Dengan Pewarnaan HE ..... 29

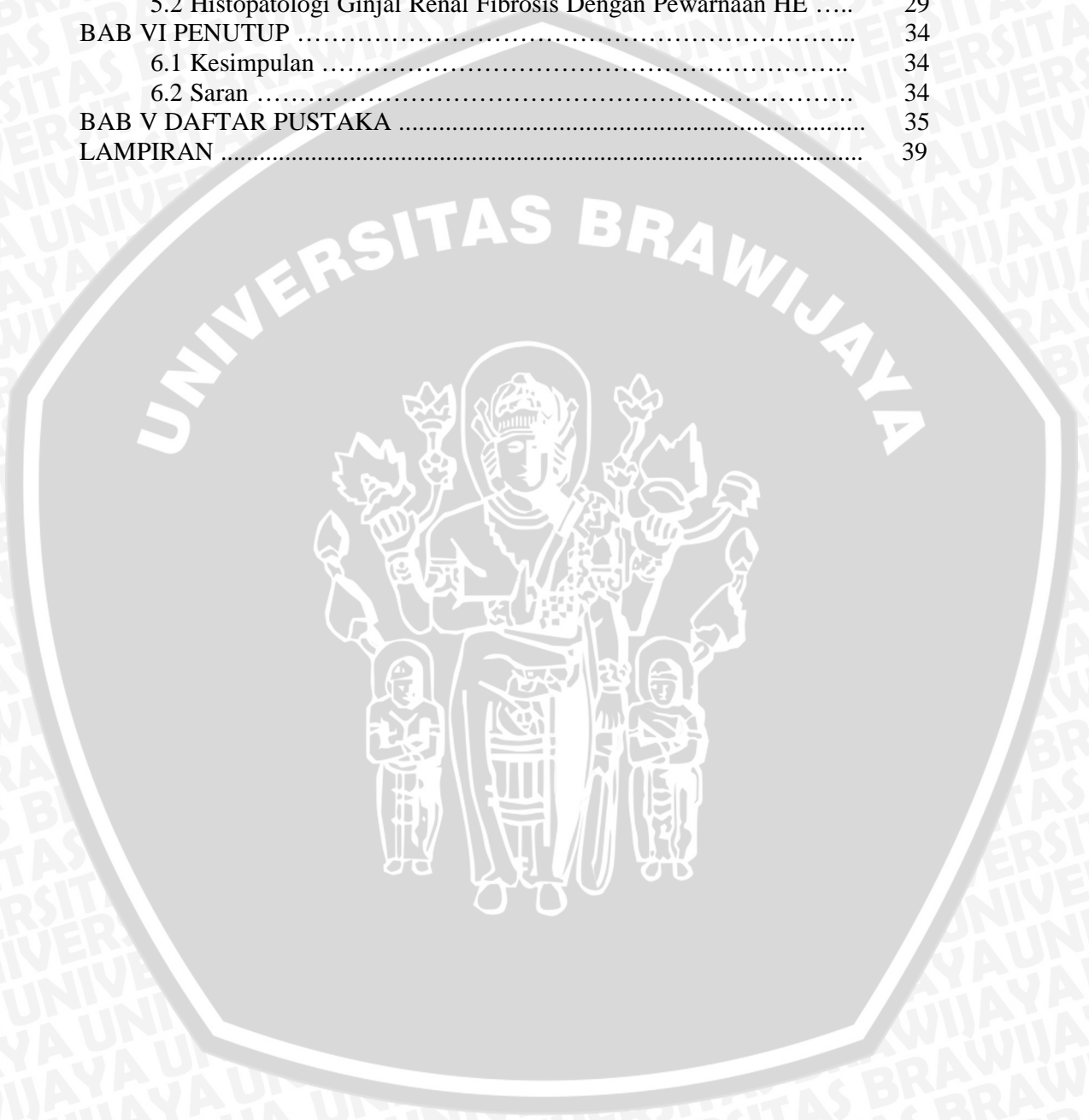
BAB VI PENUTUP ..... 34

    6.1 Kesimpulan ..... 34

    6.2 Saran ..... 34

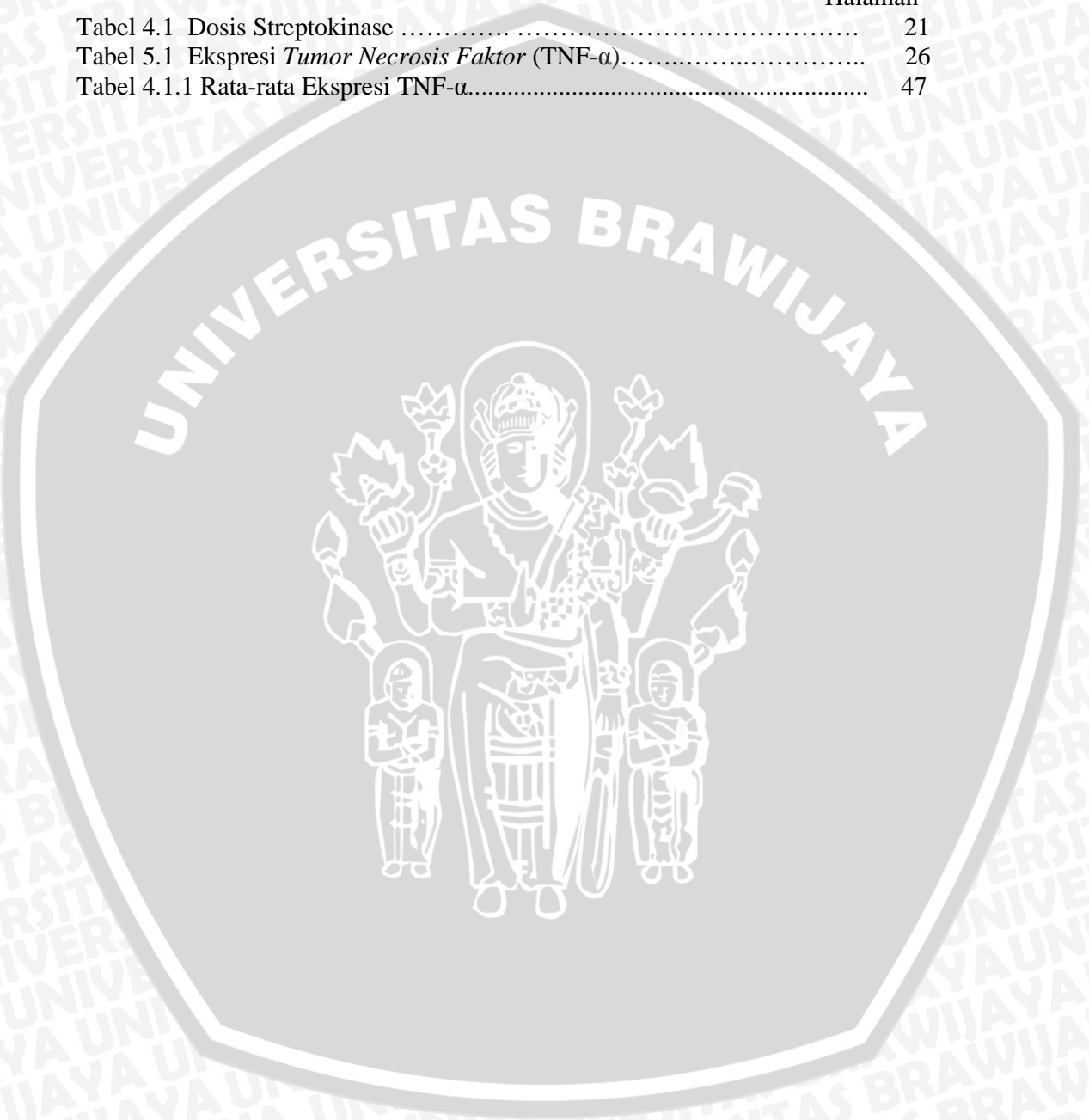
BAB V DAFTAR PUSTAKA ..... 35

LAMPIRAN ..... 39



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Dosis Streptokinase .....	21
Tabel 5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Faktor</i> (TNF- $\alpha$ ).....	26
Tabel 4.1.1 Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	47





## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Gambar Histogi Ginjal Glomerulus.....	8
Gambar 2.2 Gambar Histopatologi Ginjal Glomerulosclerosis .....	8
Gambar 2.3 Gambar Histopatologi Ginjal Fibrosis Di Tubulus Interstitial.....	9
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	16
Gambar 5.1 Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) Pada Renal Fibrosis ..	25
Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan HE Pada Ginjal Renal Fibrosis .....	30
Gambar 4.1.1 Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	47



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Konsep Penelitian .....	40
1.1 Rancangan Perlakuan .....	40
1.2 Kerangka Operasional .....	41
Lampiran 2 Pembuatan Larutan .....	42
2.1 Pembuatan Larutan Phospate Buffer Saline pH 7,4 .....	42
2.2 Pembuatan PBZ Azida .....	42
2.3 Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9% .....	42
2.4 Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4% .....	42
2.5 Pembuatan Larutan Streptokinase .....	43
Lampiran 3 Diagram Alir Penelitian .....	44
3.1 Pengambilan Organ Pada Hewan Coba .....	44
3.2 Pembuatan Preparat Untuk Pemeriksaan Histologi .....	44
3.3 Metode Immunohistokimia (TNF- $\alpha$ ) .....	46
Lampiran 4 Hasil Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	47
4.1 Jumlah sel Yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ .....	47
4.2 Perhitungan Persentase Peningkatan Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	47
4.3 Grafik Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	47
4.4 Hasil Uji ANOVA .....	48
4.5 UJI BNJ .....	48
Lampiran 5 Sertifikat Keterangan Identifikasi .....	50

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
AOAC	<i>Association Of Analytical Communities</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
DAB	<i>Diamino Benzidine</i>
EMT	<i>Epithel Mesenchymal transition</i>
ECM	Ekstra Celluler Matriks
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen Peroksida
HCl	Asam klorida
HE	Hematoksin-Eosin
IFN	<i>Interferon</i>
IHK	Imunohistokimia
IL	<i>Interleukin</i>
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Iniative
LFG	Laju Filtrasi glomerulus
MHC	<i>Major Histoncompability Complex</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
NaCl	Natrium klorida
NO	Nitrit Oksida
OH	Radikal Hidroksil
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PBS	<i>Phospate Buffer Saline</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
SA-HRP	<i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Fibrosis merupakan jaringan fibrosa yang banyak mengandung serat kolagen akibat dari kerusakan sel-sel epitel pada organ ginjal. Fibrosis ginjal terjadi karena inflamasi pada sel-sel epitel tubulus dan glomerulus. Fibrosis ginjal ini merupakan awal dari kejadian *Chronic Kidney Disease* (CKD), dimana CKD sendiri merupakan penyakit kerusakan ginjal kronis yang sifatnya *irreversible* menjadikan penanganan yang dilakukan selama ini menjadi kurang efektif (Chatziantoniou, 2005).

Di Amerika Serikat berdasarkan data dari *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) didapat 8,3 juta orang menderita penyakit ginjal kronik (Slattery, 2005). Indonesia pada tahun 1995, dilaporkan adanya 170 pasien yang dirawat di rumah sakit pendidikan dalam 12 bulan. Sedangkan di Amerika Serikat pada hewan, prevalensi dari penyakit tersebut diestimasi sebesar 1,6 - 20% untuk pet animal. Anjing umur < 7 tahun beresiko terkena penyakit ini sebesar 0.3% dan pada anjing dengan umur > 7 tahun sebesar 0.7 - 2.9%. Pada kucing, untuk yang berumur < 7 tahun resiko terkena penyakit ini sebesar 0.2 - 0.6% dan untuk kucing > 7 tahun resiko kejadiannya meningkat hingga 1.8 - 8.6% (Francey dan Ariane, 2008; Kirk, 2000).

Penanganan kasus kerusakan ginjal yang masih dimungkinkan dapat tertangani dengan efektif dan baik adalah pada fase awal, dimana kerusakan yang terjadi masih bersifat *reversibel* sehingga masih terdapat kemungkinan jaringan

ginjal dapat kembali seperti pada keadaan normalnya. Namun, sampai dengan saat ini pemeriksaan untuk CKD sendiri baru dapat terdeteksi pada saat penyakit tersebut sudah dalam fase kronis.

Pada penelitian terdahulu telah dirancang penyiapan hewan model renal fibrosis dengan menggunakan induksi *Cyclosporine-A* (CsA) dengan pengukuran level TGF- $\beta$ , ekspresi E-caderin dan aktivitas enzim protease (Wati dkk., 2013). Namun pembuatan hewan model fibrosis ginjal dengan menggunakan *cyclosporin-A* dibutuhkan waktu selama 28 hari dan biaya yang dibutuhkan relatif mahal sedangkan streptokinase relatif lebih murah dan lebih mudah untuk didapatkan.

Streptokinase merupakan protein ekstraseluler  $\beta$ -hemolytic *streptococci* yang diekstraksi dari filtrat kultur yang diproduksi oleh semua strain *Streptococcus* Grup C. Streptokinase digunakan untuk mengatasi permasalahan seputar penyakit jantung seperti *myocardiac infark* dan mampu mengatasi masalah yang ditimbulkan akibat sumbatan pada pembuluh darah (Tjay, 2007). Streptokinase berpotensi untuk digunakan untuk induksi hewan model fibrosis ginjal. Streptokinase diduga memiliki efek samping berupa nefrotoksik, selain itu bila dibandingkan dengan penggunaan *cyclosporin-A* pada penelitian sebelumnya (Liu, 2010). Streptokinase merupakan aktivator plasminogen yang tidak selektif, sehingga mampu menyebabkan terjadinya fibrinolisis dan pemecahan protein *extraceluler matrix* di seluruh sistem peredaran darah kemudian terakumulasi di ginjal, hal ini akan memicu terjadinya fibrosis pada ginjal (Sacher, 2004).

Penelitian yang dilakukan sejauh ini belum memberikan informasi mengenai tanda-tanda kemunculan fibrosis ginjal dari ekspresi TNF- $\alpha$  dan perbandingan tingkat keparahan kerusakan ginjal melalui pengamatan gambaran histopatologi glomerulus dan tubulus interstitial pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca induksi streptokinase sangat penting dilakukan untuk memberikan informasi terjadinya progresifitas tersebut.

### 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana perubahan ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) pada tikus (*Rattus norvegicus*) renal fibrosis pasca induksi streptokinase ?
2. Bagaimana perubahan gambaran histopatologi ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) renal fibrosis pasca induksi streptokinase?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan umur 10 minggu dan berat badan antara 150-250 gram. Penggunaan hewan coba pada penelitian ini telah mendapatkan persetujuan sertifikat laik etik yang diperoleh berdasarkan keputusan No.132-KEP-UB (Lampiran 5).
2. Optimasi pembuatan keadaan renal fibrosis pada hewan model dilakukan dengan injeksi streptokinase dosis 6000 IU dibagian ekor vena *coccygea*



dengan dosis 1 x 6000 IU, 2 x 6000 IU dan 3 x 6000 IU dalam interval lima hari.

3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) dengan uji Imunohistokimia (IHK) dan kerusakan jaringan ginjal ditandai dengan adanya *epithelial mesenchymal transtition* (EMT) pada tubulus ginjal, adanya lesi, serta penebalan glomerulus pada gambaran histopatologi ginjal dengan pewarnaan Hematoksilen Eosin (HE).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui terjadinya perubahan ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) pada tikus (*Rattus norvegicus*) *renal fibrosis* pasca induksi streptokinase.
2. Untuk mengetahui terjadinya perubahan gambaran histopatologi ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) *renal fibrosis* pasca induksi streptokinase.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberi informasi tentang persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) *renal fibrosis*.
2. Menjelaskan dosis efektif induksi streptokinase untuk menyiapkan hewan model fibrosis.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Streptokinase

Streptokinase adalah protein bakteri murni yang diekstraksi dari filtrat kultur yang diproduksi oleh strain  $\beta$ -hemolitik streptokokus Grup C yang merupakan glikoprotein rantai tunggal dengan berat molekul 45.000-50.000Da dan sangat rendah kandungan karbohidrat (<10%). Streptokinase memiliki berat molekul 47 kDa dan terdiri dari 414 residu asam amino. Protein menunjukkan aktivitas maksimum pada pH 7,5 dan isoelektrik pH 4,7 (Taylor dan Botts, 1968).

*Streptococcus* adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat yang secara khas membentuk pasangan atau rantai selama masa pertumbuhannya. Merupakan golongan bakteri yang heterogen. Lebih dari 90% infeksi *Streptococcus* pada manusia disebabkan oleh *Streptococcus*  $\beta$ -hemolitik group A dan C. Kumpulan ini diberi nama spesies *Streptococcus pyogenes* (Nelson, 2000).

Menurut Starr C (2006) *Streptococcus sp* melepaskan sejumlah protein, termasuk beberapa faktor virulensi, kepada inangnya:

- a. Streptolisin O dan S : adalah toksin yang merupakan dasar sifat beta-hemolisis organisme. Streptolisin O ialah racun yang berpotensi mempengaruhi banyak tipe sel termasuk neutrofil, platelet, dan organella subse.
- b. Eksotoksin *Streptococcus pyogenes* A dan C : Keduanya adalah superantigen yang disekresi oleh sejumlah strain *Streptococcus pyogenes*.

- c. Streptokinase : Secara enzimatik mengaktifkan plasminogen, enzim proteolitik, menjadi plasmin yang akhirnya mencerna fibrin dan protein lain.

Streptokinase merupakan enzim yang diproduksi oleh  $\beta$ -hemolitik bakteri *streptococcus* kelompok C yang dapat mengubah plasminogen menjadi plasmin. Streptokinase merupakan agen trombolitik banyak digunakan untuk melarutkan trombus pembuluh darah. Efek trombolitik mengikat secara khusus dan kuat untuk plasminogen dengan memicu adanya perubahan dalam molekul plasminogen yang menjadikan enzim tersebut menjadi proteolitikaktif. Kompleks plasminogen streptokinase merubah enzim proteolitik dari plasminogen menjadi plasmin yang aktif (Ryan dan Ray, 2004).

Streptokinase mengubah plasminogen menjadi plasmin yang kemudian akan mengaktifasi kaskade komplemen, menyebabkan pemecahan protein *extraceluler matrix* dan menginduksi pelepasan vasoaktif bradikinin. Hasilnya akan terjadi inflamasi jaringan dan menyebar ke struktur glomerulus yang normal, menyebabkan munculnya *glomerulosclerosis* dan fibrosis ginjal (Pardede, 2009).

Aktivasi plasminogen yang berlebihan mampu memicu terjadinya terjadinya akumulasi dan deposisi dari EMT (*epithelial mesenchymal transtition*). Hal ini dikarenakan ketika plasminogen teraktivasi dan berubah menjadi plasmin, maka kemudian plasmin akan mengaktifasi kaskade komplemen, menyebabkan pemecahan protein *extracelular matrix*. Pemecahan protein *extracelular matrix* ini kemudian akan terakumulasi dan terdeposisi dan akan menginduksi keberadaan



fibroblas dan myofibroblas pada sel-sel ginjal, sehingga terbentuk jaringan fibrosa pada ginjal (Pardede, 2009).

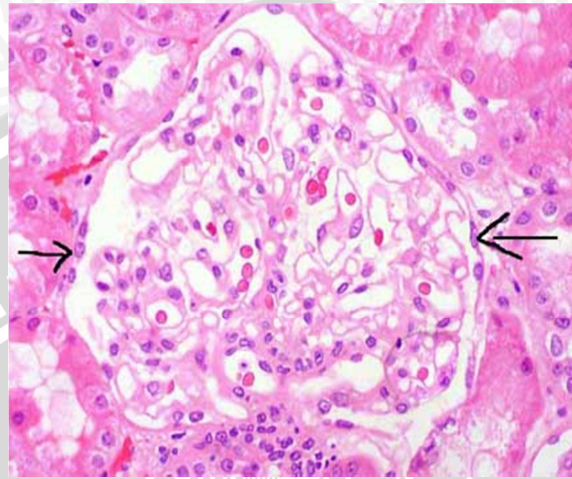
Hasil penyelidikan klinis – imunologis dan percobaan pada hewan coba menunjukkan adanya proses imunologis sebagai penyebab terbentuknya kompleks antigen-antibodi yang melekat pada membran basalis glomerulus dan kemudian merusaknya, proses auto-imun bakteri *streptococcus*  $\beta$ -hemolitik yang nefrotoksik dalam tubuh menimbulkan autoimun yang merusak glomerulus dan streptokokus nefritogen dan membran basalis glomerulus mempunyai komponen antigen yang sama sehingga terbentuk zat anti yang langsung merusak membran basalis ginjal yang menyebabkan terjadinya *renal fibrosis* (Nelson, 2000).

## 2.2 Renal Fibrosis

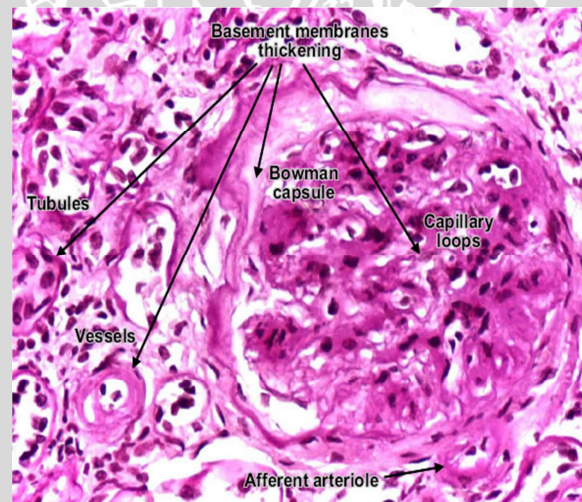
*Renal fibrosis* ditandai dengan adanya *glomerulosclerosis* dan fibrosis tubulointerstitial merupakan tahap akhir dari berbagai penyakit ginjal kronis (CKD). Pada penderita penyakit ginjal kronis ditemukan lesi pada jaringan yang menyebabkan perkembangan jaringan organ banyak ditemukan lesi dan bersifat *reversible*. Ciri fibrosis adalah terdapatnya *glomeronecrosis* dan tidak ditemukannya *tubulointestinal space*, pada kondisi tersebut terjadi sintesis protein *extracelullar matrix* (Vergoulas, 2009).

Kerusakan pada glomerulus berperan penting dalam mendeteksi penyakit gagal ginjal, walaupun masih belum diketahui penyebab secara jelas kerusakan glomerulus yang terjadi akibat luka atau karena penyakit *renal fibrosis* (Perrella and Noll, 1996). Secara histologi tubulointestinal fibrosis menjadi prediksi

prognosis berbagai penyakit utama dan sekunder dari penyakit yang terjadi di glomerulus (Border,1998 dan Pintavorn,1997).



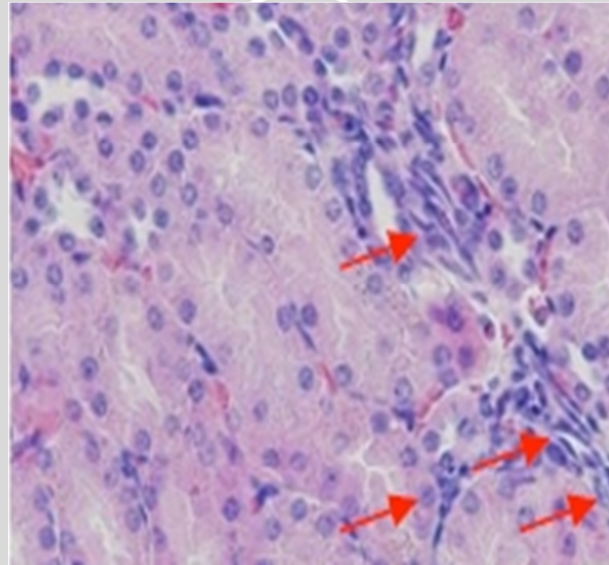
**Gambar 2.1** Glomerulus Normal. Tanda panah menunjukkan inti sel epitel parietal yang meliputi kapsul Bowman (Hematoksilin Eosin) (perbesaran 300x) (Bariety *et al.*, 2006).



**Gambar 2.2** *Glomerulosclerosis* ditandai dengan adanya penebalan pada membran kapiler glomerulus (↑), membran tubulus dan arteriol (Hematoksilin Eosin) (perbesaran 40x) (Wendt *et al.*, 2003).  
Ket: Penebalan pada membran tubulus, *vessels*, kapsula bowman, *capillary loops*



*Renal fibrosis* berperan pada pathogenesis penyakit ginjal stadium awal pada struktur tubulus interstitial. Kapiler peritubuler merupakan lanjutan dari arteriol eferen glomerulus. Gangguan pada kapiler glomerulus normal menyebabkan terjadinya *glomerulosclerosis*, secara otomatis mengakibatkan penurunan fungsi tubulus dari aliran darah peritubuler berhubungan dengan *renal fibrosis interstitial*, mengakibatkan fibrosis tubulointerstisial dan hilangnya kapiler peritubuler secara histopatologi pada Gambar 2.3 (Matsumoto *et al.*, 2004).



**Gambar 2.3** Histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal pada inti sel epitel tubulus (↑) (Perbesaran 220x) (Wati dkk., 2013).  
Ket :Sel epitel berubah menjadi fibroblas dan kehilangan inti.

Proses fibrosis ginjal yang menyebabkan penurunan fungsi ginjal menyebabkan kerusakan glomerulus dan tubulus sehingga terjadi *renal fibrosis* yang ditandai dengan adanya inflamasi pada ginjal sel intrinsik. Proses fibrosis ginjal dibagi menjadi dua tahap (Benigni, 1996).



1. Tahap *reversibel* yaitu peningkatan fibrosis akibat faktor patogen yang menyebabkan kerusakan sel pada ginjal. Sel yang mengalami kerusakan menghasilkan sitokin, seperti interleukin-1 dan *tumor nekrosis faktor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Sitokin ini menarik serangkaian sel inflamasi dalam darah seperti trombosit, limfosit dan makrofag ke sel mesangial, infiltrasi interstitial ginjal, dan pelepasan hasil mediator inflamasi terjadi pada sel yang melekat pada ginjal (Blasi, 2003). Faktor sitokin menyebabkan proliferasi fibroblast dan aktivasi sintesis *extracelular matrix* (ECM) pada sel-sel ginjal intrinsik, sel mesangial, glomerulus, sel epitel tubulus diubah menjadi myofibroblas. Struktur dan fungsi ginjal yang rusak melakukan perbaikan dari sel yang rusak dengan mengembalikan fungsi sel epitel normal dengan menahan sel yang rusak ke myofibroblas yang merupakan tahap awal terjadinya *renal fibrosis* (Ando dkk., 1999).
2. Tahap pembentukan *renal fibrosis* ketika sel mengalami inflamasi menghasilkan sitokin menyebabkan kerusakan pada ginjal. Sel epitel normal berubah menjadi myofibroblas sehingga terjadi percepatan sintesis pada *extracelular matrix* (ECM). Akumulasi *extraceluler matrix* menyebabkan ketidakseimbangan dalam sintesis menghasilkan jaringan fibrosa sehingga terjadi *glomerulosclerosis*, tubulus ginjal mengalami fibrosis tubulointerstitial dan pembuluh darah di ginjal membentuk fibrosis permanen. Pada tahap pembentukan fibrosis fungsi ginjal secara bertahap mengalami penurunan yang dapat menyebabkan gagal ginjal. Secara klinis dikenal sebagai gagal ginjal stadium akhir. Meskipun pencegahan *renal fibrosis* dapat diterapi tetapi

*renal fibrosis* yang telah mencapai tahap klinis gagal ginjal sulit diperbaiki (Ando dkk., 1999).

Peran *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dalam *renal fibrosis* sebagai mediator respon imun inflamasi dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, sehingga merekrut neutrofil menghasilkan makrofag dan ke tempat infeksi yang menyebabkan pembekuan darah terjadi infeksi (Kasuga, 2001). *Renal fibrosis* merupakan proses dimana peristiwa seluler banyak terjadi secara bersamaan. Peristiwa ini meliputi peningkatan produksi *extracellular matrix*, penghambatan degradasi *extracellular matrix* dapat menyebabkan reseptor matriks mengaktivasi mesangial dan fibroblast, *epitel mesenchymal transisi tubular*, infiltrasi sel monosit dan limfosit, dan apoptosis sel. Secara luas pada peran *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dalam perkembangan *renal fibrosis* memiliki peran penting dalam jaringan yang menyebabkan *renal fibrosis*. Oleh karena itu TNF- $\alpha$  mempunyai efek pada sel pembuluh darah, mengaktivasi endotel pada terjadinya adhesi leukosit dan aktivasi prokoagulan yang dapat meningkatkan kerusakan lemak serta mengaktifkan neutrofil. Peningkatan leukosit pada endotel dan adhesi leukosit pada pembuluh darah (Suk *et al.*, 2001).

### **2.3 Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )**

*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimers yang stabil dengan berat molekul 51 kDa. TNF- $\alpha$  adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag dan sel T. Ekspresi dan sintesa dari TNF- $\alpha$  dihasilkan oleh sel-sel hematopoetik dan sel intrinsik ginjal, termasuk sel mesangial, glomerulus,

endotel, dendrit, sel tubulus ginjal menghasilkan sitokin ini. Penelitian pada saat ini memperlihatkan bahwa, TNF- $\alpha$  dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF- $\alpha$  secara cepat dapat meningkatkan kadar TNF- $\alpha$  yang aktif (Gonzalez dan Fernandez, 2008). Meningkatnya kadar TNF- $\alpha$  terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

*Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) memiliki banyak fungsi bermanfaat bagi organisme. Hal ini sangat penting, baik dalam kekebalan bawaan dan untuk respon awal terhadap patogen, tetapi juga membantu untuk mempromosikan Th1 kekebalan. Peradangan adalah sebagian besar proses yang bermanfaat, misalnya, dalam penyembuhan luka dan penyembuhan tumor. TNF- $\alpha$  juga penting dalam induksi respon fase akut dalam mengatur metabolisme energi (Palladino, 2003).

Sitokin TNF- $\alpha$  mempunyai efek biologis sebagai protein imuno modulator (memodulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel B dalam produksi antibodi), mengaktifkan netrofil dan makrofag, merangsang hematopoiesis, sitotoksik dan sitostatik langsung terhadap berbagai tahap pertumbuhan sel tumor. TNF- $\alpha$  juga memiliki kemampuan untuk menginduksi ekspresi sitokin-sitokin lain (IL-1, IL-6, IL-8 dan IFN- $\beta$ ) dan sebagai mediator yang mempromosikan inflamasi sehingga disebut sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi memainkan peranan fundamental dalam pertahanan imun. Diantara sitokin proinflamasi yang paling berperan adalah TNF- $\alpha$  dan dapat dipakai sebagai indikator bahwa sel mengalami stres oksidatif, apoptosis atau nekrosis (Parks *et al.*, 1994). Model hewan TNF- $\alpha$  efektif pada pengobatan penyakit sindrom genetik yang disebabkan oleh mutasi



pada reseptor TNF- $\alpha$  dan peningkatan TNF- $\alpha$  dapat mempercepat fibrosis tubulointerstisial ginjal (Palladino dkk., 2003).

#### 2.4 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Renal Fibrosis

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara yang digunakan untuk sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan penelitian. Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diinduksi streptokinase dosis 6000 IU mampu menyebabkan terjadinya fibrinolisis dan pemecahan fibrinogen di seluruh sistem peredaran darah sehingga mampu menyebabkan terjadinya fibrosis ginjal. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umum digunakan sebagai hewan model *renal fibrosis* dikarenakan memiliki beberapa keunggulan yaitu kadar asam amino dan sistem metabolismenya yang hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam melakukan penelitian (Miller *et al*, 2010). *Rattus norvegicus* memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot *Rattus norvegicus* pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram (Potter, 2007).

Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Sharp dan La Regina (1998) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Wistar

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan spesies ideal untuk uji toksikologi dan memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia (Kusumawati, 2004). Hewan model *renal fibrosis* telah dipelajari setelah induksi *aminonucleoside*, *cyclosporine*, *angiotensin converting enzyme* (Klahr and Morrissey, 2002). *Aminonucleoside* atau yang biasa disebut dengan *Puromycin Aminonucleoside* merupakan antibiotik yang bersifat *antineoplastic* dan menyebabkan *glomerulosclerosis* pada *nephrosis* di tikus. Induksi *Aminonucleoside* untuk mendapatkan hewan model fibrosis ginjal sangat cepat yaitu 15 hari setelah di induksi *Aminonucleoside* dan membutuhkan biaya yang besar (Caufield *et al.*, 1976).

*Cyclosporin-A* merupakan immunosupresan yang banyak dipergunakan untuk bermacam macam penyakit misalnya autoimun yaitu lupus eritematosus sistemik, reumatik, penyakit dermatologi misalnya psoriasis dan penyakit ginjal antara lain sindrom nefrotik resisten

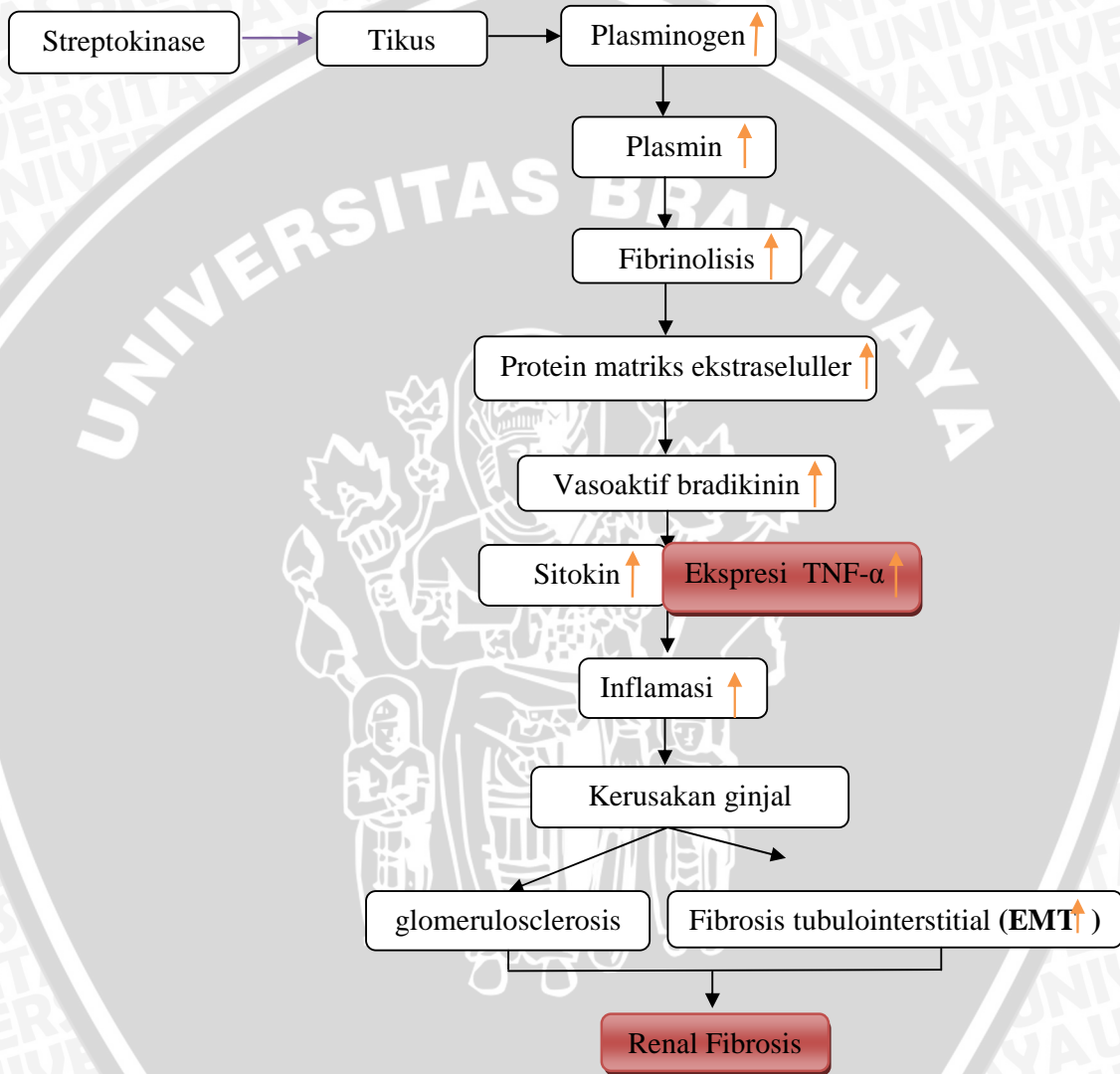
steroid. Penggunaan *Cyclosporin A* ini dibatasi efek toksik yang terjadi pada ginjal, yaitu terjadinya kematian sel yang lebih lanjut dapat terjadi fibrosis ginjal. Diduga oksigen reaktif (ROS) berperan terhadap terjadinya efek toksik pada ginjal (Sarro, 2008). Pembuatan hewan model fibrosis ginjal menggunakan *Cyclosporine* sebagai *immunosupresant* membutuhkan biaya yang besar dan memerlukan waktu yang lama (Davidson and Plumb, 2003). Sesuai dengan penelitian Bobadilla and Gerando (2007) memerlukan waktu 28 hari untuk membuat hewan model fibrosis ginjal hasil induksi *cyclosporine*.

*Angiotensin converting enzyme-inhibition* (ACE inhibition) merupakan obat yang sering digunakan pada penyakit hipertensi. Pembuatan hewan model dengan ACE inhibition sangat cepat yaitu sekitar satu minggu (Klahr and Morrissey, 2002). ACE inhibition akan menimbulkan efek *nefrotoxic* apabila dikombinasikan dengan aspirin sehingga menyebabkan *glomeronephritis* (Hall *et al.*, 1994).



### BAB 3 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

#### 3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :   
→ Injeksi   
↑ Efek pemberian Streptokinase   
  Parameter yang diamati

**GAMBAR 3.1** Kerangka konsep penelitian

Streptokinase merupakan plasminogen activator yang mengubah plasminogen menjadi plasmin (Smith, 2003). Plasmin mengaktifasi kaskade komplemen, menyebabkan pemecahan protein *extracelular matrix*, mendegradasi fibrin yang menginduksi pelepasan vasoaktif bradikinin pada jaringan yang memicu aktivitas makrofag. Aktivasi makrofag tersebut merangsang terbentuknya sitokin TNF- $\alpha$  (*tumor nekrosis factor- $\alpha$* ) yang dihasilkan pada proses inflamasi dengan mengaktifasi sel intrinsik ginjal yang menyekresi peningkatan sitokin. TNF- $\alpha$  menyebabkan agregasi (perpindahan) dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim proteolitik sehingga berperan dalam kerusakan jaringan fibroblas sehingga menyebabkan peningkatan proliferasi dan *extracelular matriks* (Boyer *et al.*, 2000). Akumulasi ECM (*extracelullar matrix*) ditubulus dan terjadinya aktivasi fibroblasts di interstitium menyebabkan myofibroblast berubah menjadi sel epitel sendiri yaitu dengan membentuk *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) yang merupakan ciri fibrosis ginjal (Rastaldiet *al.*, 2002). Streptokinase dalam darah berikatan dengan plasminogen sehingga glomerulus yang menyaring darah saat melewati ginjal terinflamasi menghasilkan jaringan parut yang menyebabkan terjadinya *glomerulosclerosis* yang ditandai dengan adanya lesi dan penebalan pada glomerulus (Vergoulas, 2009).

### 3.2 Hipotesis

Injeksi streptokinase dapat meningkatkan perubahan ekspresi TNF- $\alpha$  dan menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi pada tikus (*Rattus norvegicus*) renal fibrosis.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya Malang dan pembuatan preparat di RS. Dr. Soetomo Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai Juni 2013.

### 4.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain hewan coba yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 10 minggu, berat badan tikus antara 150-250 gram, streptokinase, aquades, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, NaCl – fisiologis, antibodi primer (Rat Anti TNF- $\alpha$ ), antibodi sekunder berlabel biotin (Goat Anti Rat *biotin labeled*), larutan PBS, PBS-Azida, PFA 4%, 3% Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *fetal bovine serum* (FBS), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *diamino benzidine* (DAB), *Hematoxilen*, *Eosin*, Entellan, *Parafin* dan Xylol.

#### 4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas (gelas objek, cawan petri, labu takar, gelas ukuran 100 ml), pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, tabung polipropilen, vortex, autoclave, mikropipet, eppendorf, *disposable syringe*,



oven, mikroskop cahaya, tabung reaksi, timer, tabung mikro, lemari pendingin, pengaduk kaca, mikropipet, corong dan inkubator.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena penelitian bersifat homogen. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol (sehat) tanpa perlakuan, kelompok B tikus di induksi streptokinase 1 x 6000 IU, kelompok C tikus diinduksi streptokinase 2 x 6000 IU dan kelompok D tikus diinduksi streptokinase 3 x 6000 IU. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan. Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 kelompok diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok.

Sehingga diperlukan 20 hewan coba.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

1. Variabel Bebas : Jumlah Pemberian streptokinase 6000 IU.
2. Variabel tergantung : Ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi jaringan ginjal
3. Variabel Kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, umur 10 minggu, strain Wistar, berat badan 150-250 gram.

#### 4.5 Metode Penelitian

##### 4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari *stainless steel*. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

#### 4.5.2 Preparasi Streptokinase

Dosis streptokinase yang digunakan untuk induksi *renal fibrosis* sebanyak 6000 IU. Streptokinase memiliki kandungan sebanyak 1.500.000 IU dilarutkan dengan ringer laktat sebanyak 2 ml kemudian dihomogenkan. Selanjutnya diambil 1 ml yang mengandung 750.000 IU dan kemudian dilarutkan dengan ringer laktat sampai 5 ml. Selanjutnya diambil 1 ml yang berisi kandungan 150.000 IU untuk mendapatkan streptokinase dengan dosis 6000 IU dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Stok awal} = 1.500.000 / 2\text{mL} = 750.000 \text{ IU/mL}$$

$$750.000 \text{ IU} / 5\text{mL} = 150.000 / \text{mL}$$

$$\text{Pengunaan} = 150.000 \sim 1\text{mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= \frac{6000 \text{ IU}}{150 \text{ IU}/\mu\text{l}} \\ = 40 \mu\text{l}$$

Selanjutnya diambil 40  $\mu\text{l}$  dari larutan stok III sesuai dengan perhitungan larutan pada Tabel 4.1. Masing-masing larutan ditambahkan ringer laktat sampai dengan 100 $\mu\text{l}$  dengan penjelasan dosis streptokinase pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Dosis Streptokinase

Persediaan	Volume	Dosis	Keterangan
Stok I	2 mL	1.500.000 IU	Per 1 mL kandungan 750.000 IU
Stok II	5 mL	750.000 IU	Per 1 mL kandungan 150.000 IU
Stok III	1 mL	150.000 IU	Digunakan sebagai <i>stock</i> untuk pemberian dari perlakuan



#### 4.5.3 Injeksi Streptokinase Pada Bagian ekor Tikus

Streptokinase ini diinduksi pertama kali dengan dosis 6000 IU dibagian ekor vena *coccygea* sebanyak 100 $\mu$ L pada kelompok B, C dan D. Kemudian lima hari berikutnya diinduksi streptokinase pada kelompok C dan D, dan lima hari kemudian diinduksi streptokinase pada kelompok D. Tikus putih diinduksi secara intravena pada vena *coccygea* dengan perhitungan dosis streptokinase dapat dilihat di lampiran 2.5. Setelah dilakukan injeksi terakhir ditunggu selama lima hari lagi untuk dilakukan pembedahan untuk mengetahui perbedaan efek dari induksi tersebut pada setiap kelompok.

#### 4.5.4 Pengambilan Jaringan Pada Bagian Ginjal

Pengambilan organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke lima setelah diinduksi terakhir. Langkah awal yang dilakukan dengan mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan dengan posisi terlentang diatas papan pembedahan. Kemudian dibedah pada bagian abdomen kemudian diambil organ ginjal, diisolasi dan dipotong. Organ ginjal mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Kemudian ginjal dimasukkan dalam larutan *paraformaldehid* 4% (PFA).

#### 4.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Dengan Pewarnan *Hematoxylin Eosin*

(HE)

Proses pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan beberapa tahap yaitu pemotongan organ, isolasi, fiksasi, dehidrasi, embedding, blok paraffin dan pewarnaan HE (lampiran 3).

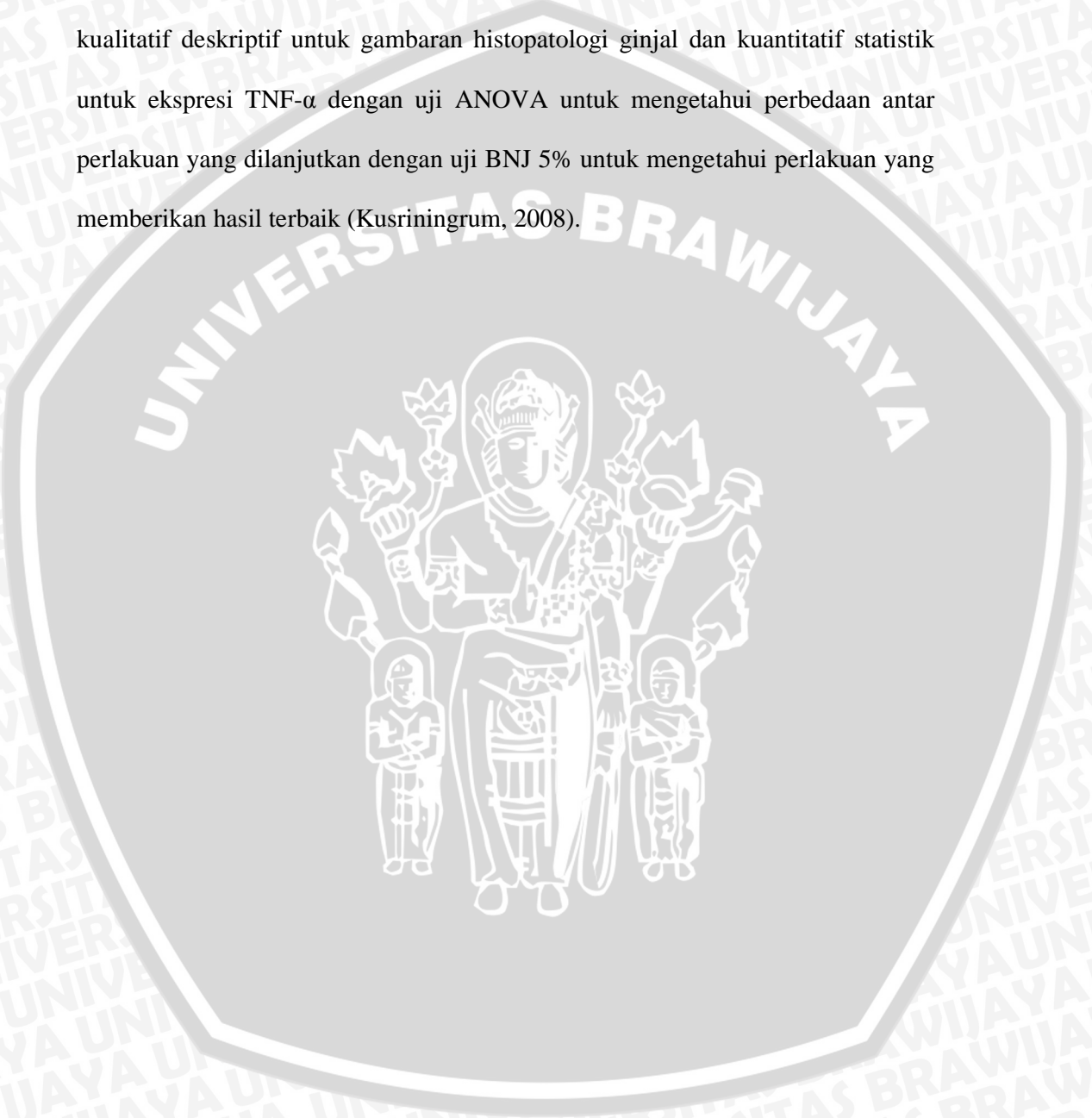
#### 4.5.6 Uji Imunohistokimia

Langkah-langkah dalam metode pewarnaan Imunohistokimia yaitu dengan pembuatan preparat dapat dilihat pada lampiran 3. Preparat direndam kedalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), aquadest selama 1 x 5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit selanjutnya ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit selama 3 kali dan diblok dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer (Rat Anti TNF- $\alpha$ ) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Berikutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin (Goat Anti Rat IgG biotin labeled) selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Hematoxylen* selama 5 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil diamati menggunakan mikroskop (Calnek, 1997).

#### 4.5.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi ginjal dan kuantitatif statistik untuk ekspresi TNF- $\alpha$  dengan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang dilanjutkan dengan uji BNJ 5% untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil terbaik (Kusriningrum, 2008).

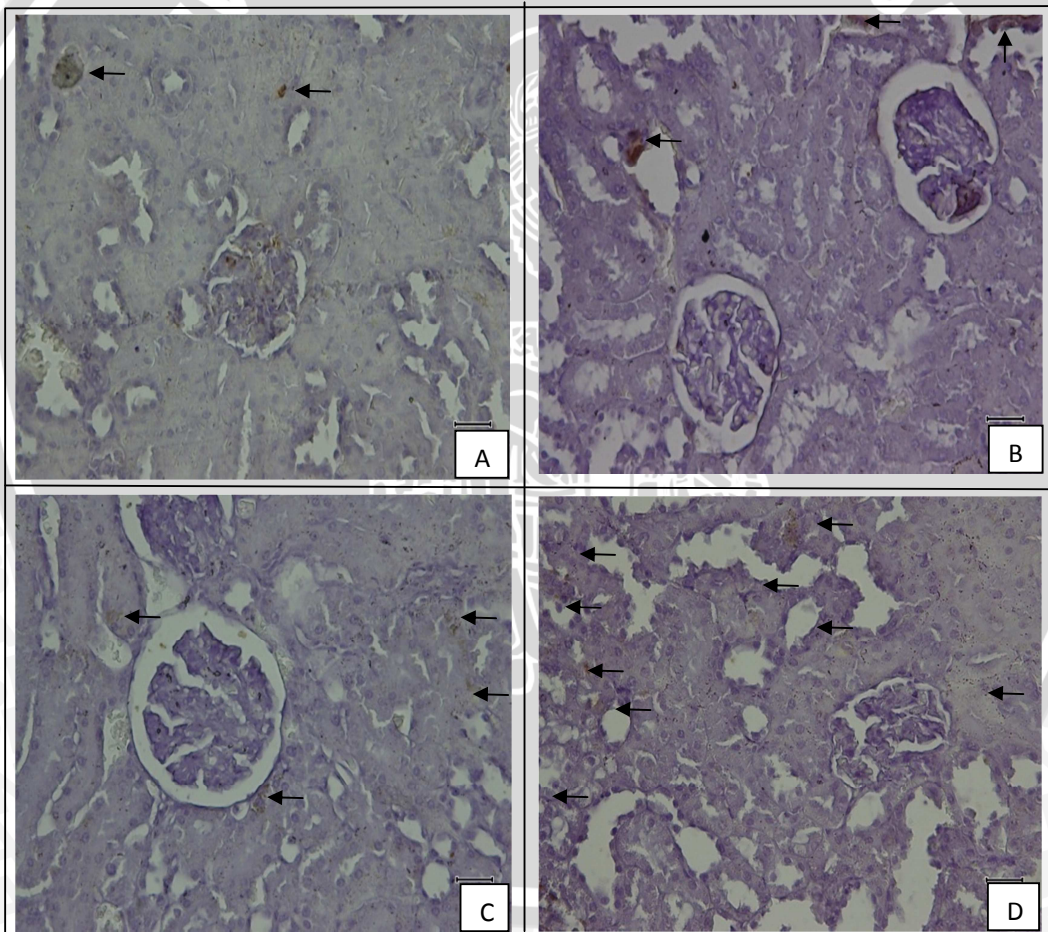




## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Pada Ginjal Renal Fibrosis

Ekspresi *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) pada ginjal renal fibrosis setelah dilakukan injeksi dengan streptokinase menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara tikus kontrol tanpa pemberian streptokinase dengan tikus yang mendapat perlakuan streptokinase ditunjukkan pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1:** Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) pada Renal Fibrosis (Perbesaran 400x).

Keterangan: A = ginjal tikus kontrol; B = ginjal tikus renal fibrosis dosis 1 x 6000 IU; C = ginjal tikus renal fibrosis dosis 2 x 6000 IU dan D = ginjal tikus renal fibrosis dosis 3 x 6000 IU. (↑) ekspresi TNF- $\alpha$ .

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ ginjal ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada gambaran Imunohistokimia (IHK) ginjal yang ditunjukkan dengan tanda panah ( $\uparrow$ ). Hasil Ekspresi TNF- $\alpha$  menunjukkan adanya warna coklat pada bagian sitoplasma seperti ditunjukkan Gambar 5.1 dengan jumlah rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Ekspresi Tumor Necrosis Faktor(TNF- $\alpha$ ) Pada Tikus Perlakuan**

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$	Peningkatan Ekspresi TNF- $\alpha$ terhadap kontrol (%)
Kontrol (A)	0,60 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0
Streptokinase 1 x 6000 IU (B)	1,08 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	80
Streptokinase 2 x 6000 IU (C)	1,83 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	204
Streptokinase 3 x 6000 IU (D)	2,72 $\pm$ 0,20 <sup>d</sup>	350

Ket : Angka dengan *superscript* (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan antar perlakuan dengan uji BNJ 5%.

Hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji BNJ yang menunjukkan hasil berbeda nyata antar perlakuan secara signifikan ( $p > 0,05$ ). Persentase peningkatan rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  (Tabel 5.1) tertinggi didapatkan pada perlakuan streptokinase 3 x 6000 IU (D) sebesar 350%.

Kelompok tikus kontrol (A) tanpa perlakuan terdapat sedikit warna coklat pada organ ginjal dikarenakan dalam keadaan normal sitokin pasti terdapat didalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Menurut Baratawidjaja (2004) TNF- $\alpha$  merupakan suatu protein yang dihasilkan leukosit untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon



inflamasi, dimana dalam keadaan normal membantu patogen pada sistem kekebalan tubuh untuk memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik. Timbulnya warna coklat disebabkan dalam proses pewarnaan Imunohistokimia (IHK) antigen dalam ginjal berikatan dengan antibodi primer (Rat Anti TNF- $\alpha$ ) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (Goat Anti Rat *biotin labeled*), setelah semua berikatan dilakukan penambahan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) yang bertujuan untuk menghasilkan warna coklat pada sitokin (TNF- $\alpha$ ). Menurut Goer (1993) Penambahan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) akan memberikan warna coklat terhadap antigen yang berikatan dengan antibodi primer yang dilabeli antibodi sekunder.

Semua kelompok tikus yang diinduksi streptokinase 1x6000 IU (B), 2 x 6000 IU (C), 3 x 6000 IU (D) menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  (Tabel 5.1). Hal ini berarti bahwa streptokinase mampu mengaktifasi plasminogen menjadi plasmin menyebabkan pemecahan *extracellular matrix* sehingga terjadi degradasi fibrin serta pelepasan vasoaktif bradikinin yang terakumulasi pada ginjal. Proses tersebut mengakibatkan terjadinya inflamasi, kemudian makrofag mengaktifasi sel intrinsik ginjal untuk mensekresi sitokin sehingga terjadi peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$ . Ekspresi TNF- $\alpha$  pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada Imunohistokimia (IHK) ginjal tepatnya pada sitoplasma dikarenakan saat streptokinase masuk kedalam tubuh membentuk kompleks antigen yang dikenali oleh antibodi yang melekat pada membran basalis glomerulus dan tubulus ginjal sehingga antigen menjadi indikator terjadinya proses inflamasi, selanjutnya dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) berupa



makrofag sehingga antigen tersebut terfagosit menjadi kecil-kecil yang akan berikatan dengan MHC (*Major Histocompatibility Complex*) dan antigen tersebut dibawa kepermukaan sitoplasma yang selanjutnya berikatan dengan sel intrinsik ginjal sehingga menghasilkan TNF- $\alpha$  (Green and Flavell, 2000). Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  yang dihasilkan pada preparat IHK ginjal dihitung menggunakan program *Axio vision* dan dikonversikan ke dalam persentase area untuk mengetahui peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$ .

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus yang diinduksi streptokinase mengalami peningkatan terhadap kontrol, seperti tampak pada Tabel 5.1, ditunjukkan dengan adanya peningkatan persentase antar kelompok yang mengalami perbedaan yaitu pada kelompok kontrol (A) 0%, kelompok (B) mengalami kenaikan yaitu 80% sedangkan kelompok (C) dan kelompok (D) mengalami peningkatan yang tinggi yaitu 204% dan 350% sesuai hasil persentase peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada lampiran 4.2. Nilai persentase dalam setiap kelompok diperoleh dari lima foto dalam satu perlakuan. Pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada masing-masing ulangan dilakukan dengan penilaian pada lima bidang pandang antar kelompok dengan demikian diperoleh rata-rata dari lima bidang pandang sesuai lampiran 4.1. Hasil perhitungan persentase peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pasca induksi streptokinase ditunjukkan pada Gambar 5.1 sesuai pernyataan Calnek (1997) bahwa nilai persen area dapat diperoleh dari hasil foto sesuai bidang pandangnya yang ditentukan dari banyaknya ulangan dalam 1 perlakuan. Hasil yang diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persentase yang dapat menandai suatu kenaikan maupun

penurunan sel dalam suatu penyakit dan dilakukan penghitungan secara persentase (Calnek, 1997).

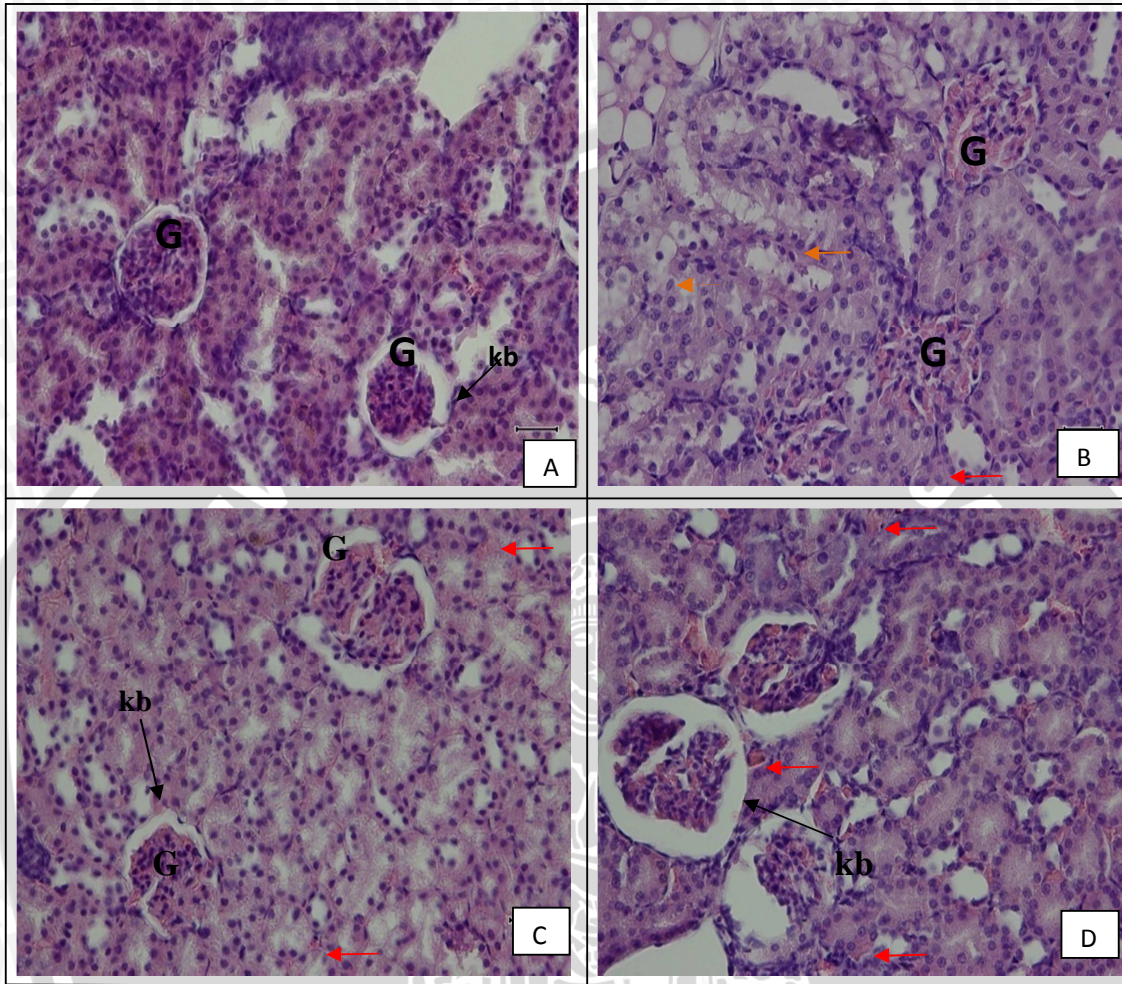
Persentase diatas menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  akibat induksi streptokinase yang mengaktivasi makrofag untuk menghasilkan sitokin yang menstimulasi inflamasi pada sel intrinsik ginjal dengan mensekresi sitokin sehingga menyebabkan *agregasi* (perpindahan) dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim proteolitik dalam kerusakan ginjal. Sitokin mengaktifasi jaringan fibroblas pada tubulus ginjal serta peningkatan proliferasi *extracelular matrix* (Boyer *et al.*, 2000).

## 5.2 Histopatologi Ginjal Renal Fibrosis Dengan Pewarnaan *Hematoxylin*

### *Eosin* (HE)

Hasil pengamatan gambar histopatologi ginjal menunjukkan perbedaan antar perlakuan dimana kelompok A kontrol tanpa induksi sehat dan induksi streptokinase dengan dosis 6000 IU pada tikus secara intravena kelompok B (1 x 6000 IU), kelompok C (2 x 6000 IU) dan kelompok D (3 x 6000 IU) dengan interval waktu lima hari. Berdasarkan perlakuan didapatkan gambaran histopatologi pada jaringan ginjal tikus seperti pada Gambar 5.2





**Gambar 5.2:** Hasil Pewarnaan HE pada Ginjal Renal Fibrosis (Perbesaran 400x).

Keterangan: A = ginjal tikus kontrol; B = ginjal tikus renal fibrosis dosis 1 x 6000 IU; C = ginjal tikus renal fibrosis dosis 2 x 6000 IU dan D = ginjal tikus renal fibrosis dosis 3 x 6000 IU. Anak panah menunjukkan terjadinya perubahan antar perlakuan, (↑) fibrosis, (↗) EMT (*epithel mesenchymal transition*), kb (kapsula Bowman), G (Glomerulus).

Hasil pengamatan histopatologi ginjal (Gambar 5.2) pada kelompok B, C, dan D yang mendapatkan induksi streptokinase sebanyak 1 x 6000 IU, 2 x 6000 IU, 3 x 6000 IU telah terjadi fibrosis atau pembentukan jaringan fibrosa yang ditunjukkan dengan tanda panah berwarna merah (↑). *Renal fibrosis* terjadi akibat



proses peradangan kronis dan luka pada jaringan serta penurunan fungsi organ ginjal. Pemberian streptokinase ini ternyata dapat menginduksi *renal fibrosis* yang ditandai dengan adanya lesi dan penebalan glomerulus yang menyebabkan terjadinya *glomerulosclerosis* dan terdapatnya EMT yang berubah menjadi fibroblas ke myofibroblas yang menunjukkan terjadinya fibrosis tubulointerstitial yang diinterpretasikan pada masing-masing perlakuan.

Hasil gambaran histopatologi pada Gambar 5.2 menunjukkan adanya perbedaan antara tikus kontrol dengan tikus yang mendapat perlakuan dengan streptokinase. Pada tikus kontrol (A) yang tidak diperlakukan dengan streptokinase menunjukkan gambaran histopatologi dari glomerulus dan jaringan atau sel-sel di sekitarnya masih normal ditunjukkan ada banyaknya sel yang masih berinti dan tubulus ginjal yang masih normal ditunjukkan dengan sel epitel yang berbentuk kuboid. Tikus yang diperlakukan dengan streptokinase (B) menunjukkan gambaran histopatologi ginjal yang telah mengalami kerusakan pada glomerulus, seperti ditunjukkan oleh huruf (G) berupa adanya lesi pada glomerulus yang menyebabkan *glomerulosclerosis* berupa penebalan membran basalis sampai menutupi kapsula bowman dan terdapatnya EMT (*epithel mesenchymal transition*) yang di tunjukkan dengan tanda panah berwarna kuning (↑) yang telah menghasilkan fibrosis ginjal (Gambar 5.2 kelompok B). EMT ini merupakan proses deferensiasi sel epitel normal menjadi fibroblas. Ciri-ciri dari sel fibroblas ini memiliki bentuk runcing (Kaluri, 2009). Terbentuknya EMT ditandai dengan terjadinya degradasi membran basal dan terbentuknya sel mesenkim yang bermigrasi dari lapisan sel epitel menuju interstisial. Sel

mesenkim, merupakan sel progenitor yang dapat berubah menjadi bermacam sel penunjang termasuk sel epitel pada saat embriologi tergantung kondisi lingkungannya. Perubahan ini sangat penting saat embriogenesis dan pembentukan organ. Proses terjadinya EMT ditemukan pada beberapa keadaan patologi yaitu terjadinya jaringan fibrosis akibat luka pada ginjal. Kerusakan ginjal terjadi oleh karena sel mesenkim akan berubah menjadi fibroblas, selanjutnya fibroblas akan menghasilkan *extracelular matrix* di interstisial ginjal sehingga terjadi fibrosis ginjal. Sebaliknya bila mesenkim kembali membentuk sel epitel melalui proses *mesenchym epithelial transition* (MET) maka akan terjadi perbaikan *renal fibrosis* (Kaluri, 2009). *Renal fibrosis* dapat dilihat dengan tampaknya kerusakan struktur tubulus, kerusakan komponen basal membran tubulus (BMT) ginjal, kerusakan kapiler interstitial dengan peningkatan matrik ekstraselular dan sel myofibroblas (Zeisberg, 2008).

Kelompok (C) menunjukkan gambaran histopatologi ginjal yang telah mengalami kerusakan pada glomerulus yang tampak pada kapsula bowman semakin melebar dari normalnya dan terjadi hasil peningkatan *renal fibrosis* yang ditandai dengan panah berwarna merah (↑) dan kelompok (D) menunjukkan gambaran histopatologi ginjal yang mengalami pelebaran lebih luas pada kapsula bowman dan terjadinya peningkatan fibrosis ginjal yang lebih banyak yang ditandai dengan panah berwarna merah (↑).

Hasil gambaran histopatologi (Gambar 5.2) pada kelompok (B) (C) dan (D) menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan pada bagian glomerulus seperti yang ditunjukkan oleh huruf (G), yaitu berupa lepasnya sel epitel dari membran basal

serta hilangnya inti sel epitel. Hasil tersebut menunjukkan adanya proses neprotoksik dari streptokinase yang menimbulkan sel-sel epitel pada organ ginjal mengalami *glomerulosclerosis*, yang terlihat dengan terjadinya penebalan membrana basalis, sklerosis mesangial yang difus. Secara histopatologi, gambaran utama yang tampak adalah penebalan membran basalis, ekspansi mesangium yang kemudian menimbulkan *glomerulosclerosis* noduler atau difus (Dellman and Eurell, 2006).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

- 1) Induksi streptokinase dengan injeksi 1 x 6000 IU, 2 x 6000 IU, 3 x 6000 IU menyebabkan terjadinya *renal fibrosis* dengan meningkatnya ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ).
- 2) Hasil pengamatan histopatologi menunjukkan perbedaan antara tikus kontrol A tidak terjadi kerusakan histopatologi ginjal, terbukti masih banyak sel yang masih berinti dan glomerulus yang normal. Kerusakan histopatologi organ ginjal terjadi pada tikus B, C dan D terdapat lesi pada glomerulus dan menghasilkan EMT yang berubah menjadi fibroblas ke myofibroblas menyebabkan renal fibrosis.

### 6.2 Saran

Perlu dikaji lebih lanjut efek induksi streptokinase terhadap munculnya renal fibrosis pada sitokin-sitokin proinflamasi lainnya dan dilakukan penelitian lanjutan menggunakan bahan terapi herbal untuk terapi *renal fibrosis* pasca induksi streptokinase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ando, Y., T. Moriyama, K. Oka, K. Takatsuji, M. Miyazaki, Y. Akagi, N. Kawada, Y. Isaka, M. Izumi, K. Yokoyama, A. Yamauchi, M. Horio, A. Ando, N. Ueda, K. Sobue, E. Imai, and M. Hori. Enhanced interstitial expression of caldesmon in IgA nephropathy and its suppression by glucocorticoid-heparin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1408–1417, 1999.
- Baratawidjaja K.G. 2004. *Imunologi Dasar: Sitokin*. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta. 128-131
- Bariety J, C. Mandet, GS. Hill, P. Bruneval. 2006. Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol*. Oct;17:2770-80
- Blasi, E.R. R.A.E. Rudolph, E.A. Blomme, M.L. Polly and E. Mahon. 2003. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int*. 63: 1791–1800.
- Boyer, B., A.M Valles and N. Edme. 2000. Induction and Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Biochem Pharmacol*. 60:1091–1099.
- Calnek, B. 1997. *Immunohistokimia*. Ames : Iowa State University Press.
- Carlton, W.W dan M.c. Gavin M.D. 1995. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Ed ke-2. USA: Mosby.
- Caulfield, J.P., J.J. Reid and M.G. Farquhar. 1976. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Journal of Technical Methods and Pathology*. 34(1):43-59.
- Chatziantoniou, C., J.J. Boffa, R. Ardaillou. 1998. Dussaule JC: Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice: Role of endothelin. *J Clin Invest* 101: 2780–2789.
- Davidson, G and D.C. Plumb. 2003. *Veterinary Drugs Handbook Client Information Edition*.
- Dellmann H.D, J.A. Eurell. 2006. *Textbook of Veterinary Histology*. Ed ke-6. USA: Blackwell Publishing

- Francey and A. Schweighauser. 2008. Clinical Epidemiology Of Kidney Diseases In The Cat. 2 // *Veterinary Focus* // Vol 18 No 2 // 2008.
- Goer, J., 1993, *Immunochemical Techniques Laboratory Manual*, Academic Press, Harcourt Brace Javanovich Publisher, San Diego, California
- Green E. A and R.A Flavell. 2000. The temporal importance of TNF- $\alpha$  expression in the development of arthritis reumatoid. *Journal Immunity*, 12: 459-469.
- Hall, D and W. Rudolph. 1994. Adverse effect of aspirin on water metabolism in severe heart failure treated with enalapril. *J Am Coll Cardiol*. Vol. 23:213A.
- Junquiera, L.C., and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies.
- Kalluri, R., E.G. Neilson. 2009. Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis. *J Clin Invest*. 112 (12):1776-84
- Kasuga, H., Y. Ito, S. Sakamoto, H. Kawachi, F. Shimizu, Y. Yuzawa, and Matsuo. 2001. S. Effects of anti-TGF- $\beta$  type II receptor antibody on experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 60: 1745-1755.
- Kirk, C.A. and M.A. Hickman. 2000. Dietary protein requirement of cats with spontaneous renal disease. *J Vet Intern Med* 13:351.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press Surabaya. Hal 21.
- Liu, Y. 2006. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*;69:213-7.
- Matsumoto, M.T. Tanaka, T. Yamamoto, E. Noiri, T. Miyata, R. Inagi, T. Fujita, M. Nangaku. 2004. *Hypoperfusion of capillaries induced chronichypoxia* prior to progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*;15:1574-81.
- Miller, S.D, J.C. Russel, H.E MacInes, J. Abdelkrim and R.M. Fewste. 2010. *Multiple peternity in wild population of invasive Rattus species*. *New Zeland Journal of Ecology* 34(3): 360-362.
- Navarro-Gonzalez, J.F., and C. Mora-Fernandez, 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19: 433-442.



- Nelson. 2000. vol 3, ed Wahab, A. Samik, Ed 15, Glomerulonefritis akut pasca streptokokus,1813-1814, EGC, Jakarta.
- Palladino, A. 2003. Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in *chronic haemodialysis patients*. *Nephrol Dial Transplant* 18: 113–119.
- Pardede, O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus. Jakarta : Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM.
- Parks, R, S.D. Yan, C. Huang. 1994. *Tumor Necrosis Factor* alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*.104.
- Perrella, M.A., A. Pellacani, M.D. Layne. 1996. Absence of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Prevents the Development of Accelerated Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*; 15(10): 1774-1776.
- Popa, C., M.G. Netea, M. V. Riel., M. van der Meer J.W, A. Stalenhoef, 2007. The role of TNF-a in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 48: 751–762.
- Potter, W.P. 2007. *Rats and Mice :Introduction and use In Research*. Health Sciences Center for Educational Resources University of Washington.
- Rastaldi, M.P., F. Ferrario., L. Giardino., G. D. Antonio and C. Grillo. 2002. Epithelial-mesenchymal Transition of Tubular Epithelial Cells in Human Renal Biopsies. *Kidney Int*. 62:137-146.
- Ryan, K.J and C.G. Ray editors. 2004. *Sherrie Medical Microbiology* edisi ke-4th ed. McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
- Sacher, A. 2004. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium Ed:11*. Jakarta : EGC.
- Sarro E, O. Tornavaca, M. Plana, A. Meseguer, E.Itarte. 2008. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney Int*.73:77-85.
- Sharp, P.E, and M.C. La Regina. 1998. *The Laboratory and Sensitivity Arthritis Rheumatoid Rat*. America: CRC Press LLC.

- Slattery, Campbell, M.c. Morrow, and P. Michael. 2005. *Cyclosporine A-Induced Renal Fibrosis A Role for Epithelial- Mesenchymal Transition*. Dublin : University College Dubli.
- Smith J.M, M.K. Faizan, A.A. Eddy. 2003. The child with acutenephritic syndrome. Dalam: Webb N, Postlethwaite RJ, penyunting. Clinical paediatric nephrology. Edisi ke-3. New York: Oxford University Press. h.367-80.
- Starr, C., N. Engleberg. 2006. "Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus". *Infect Immun* 74 (1): 40-8. PMID 16368955.
- Suk, K., S. Kim, Y-H. Kim, K-A. Kim, I. Chang, H. Yagita, M. Shong and M-S Lee. 2001. IFN-g/TNF-a synergism as the final effector in autoimmune arthritis rheumatoid. *Journal of Immunology*, 166: 4441-4489.
- Taylor, D.G, E.R. Johnson, R. Priyanto. 1996. The accuracy of rump P8 fat thickness and twelfth rib fat thickness in predicting beef carcass fat content in threebreed types. In: *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. The University of Queensland, Brisbane. Pp 193-195.
- Tjay, T. Hoan and K. Rahardja. 2007. *Obat-obat Penting: Kasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Ed:VI*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo.
- Vergoulas, G. 2009. *Renal Fibrosis*. Review Article. Organ Transplant Unit. Aristotle University. Hippokration Hospital. Thesaloniki. Grace.
- Wati, I.P, Aulanni'am dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Kimia. Studentjournal, Vol. 1, No. 2*, Pp. 257-263 Universitas Brawijaya Malang.
- Wendt., T.M., N. Tanji, J. Guo, T.R. Kislinger, W. Qu, Y. Lu, L. Bucciarelli, L. Rong, B. Moser, G. Markowitz, G. Stein, A. Bierhaus, B. Liliensiek, B. Arnold, P.P. Nawroth, D. Stern, V.D'Agati, and A.M Schmidt. 2003. RAGE Drives the Development of Glomerulosclerosis and Implicates Podocyte Activation in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *7 American Journal of Pathology, Vol. 162, No. 4*.
- Zeisberg, E.M., S.E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg, R. Kalluri. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 19:2282-7.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



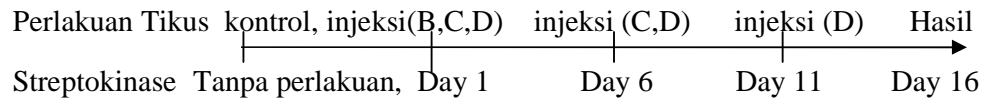
LAMPIRAN





## Lampiran 1 Konsep Penelitian

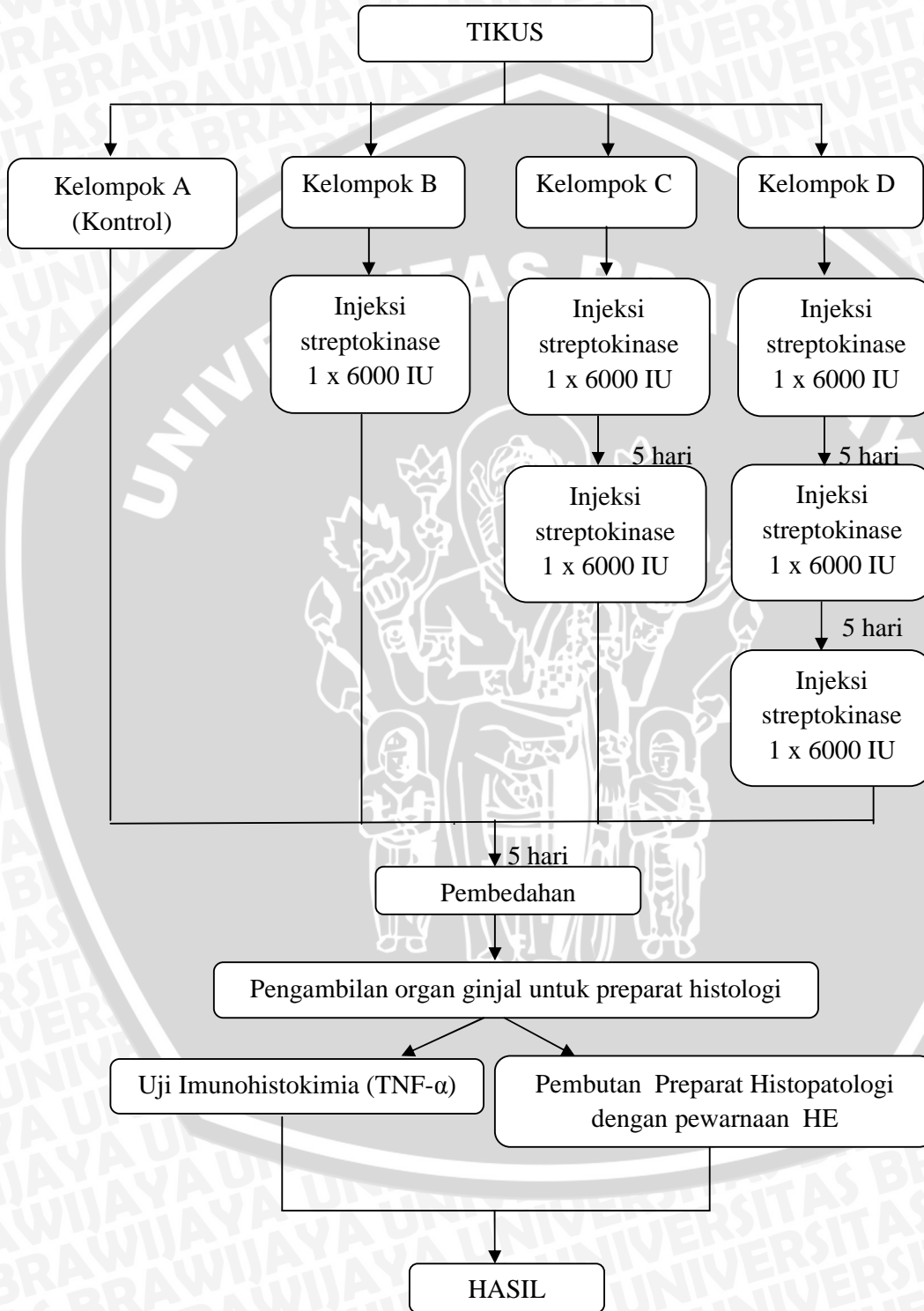
### 1.1 Rancangan Perlakuan



#### Keterangan:

1. Hari 1 dilakukan injeksi pada bagian ekor secara intravena sebanyak 6000 IU dengan menggunakan Streptokinase pada kelompok B, C, dan D.
2. Hari 6 dilakukan injeksi pada bagian ekor secara intravena sebanyak 6000 IU dengan menggunakan Streptokinase pada kelompok C dan D.
3. Hari 11 dilakukan injeksi pada bagian ekor secara intravena sebanyak 6000 IU dengan menggunakan Streptokinase pada kelompok D.
4. Hari 16 dilakukan pembedahan untuk memperoleh hasil yaitu ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) dan gambaran Histopatologi ginjal.

1.2 Kerangka Operasional



## Lampiran 2 Pembuatan Larutan

### 2.1 Pembuatan larutan phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  sebanyak 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 ml aquades steril dan dihomogengkan menggunakan magnetik stirrer dalam gelas kimi 500 ml pH larutan diatur hingga mencapai 7,4 dengan larutan NaOH 1 M menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan kedalam labu ukur 500 ml dan ditambahkan aquades steril hingga batas.

### 2.2 Pembuatan PBS-Azida

Diambil 200 ml larutan PBS dengan pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. Kemudian ditambah 8 tetes larutan azida 1 % ( $\text{NaN}_3$ ) dengan menggunakan pipet tetes. Dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirrer.

### 2.3 Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

Rumus NaCl-fis 0,9% =  $(0,9/100) \times 500 \text{ ml} = 4,5 \text{ g}$

Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades steril hingga tanda batas.

### 2.4 Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$V1M1 = V2M2$$

$$V1 \times 37 \% = 100 \text{ mL} \times 4 \%$$

$$V1 = 10,8 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl Fisiologis 0,9% sebagai pelarutnya yaitu ditimbang NaCl sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL aquades dan distirrer. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan NaCl Fisiologis sampai tanda batas.



## 2.5 Pembuatan Larutan Streptokinase

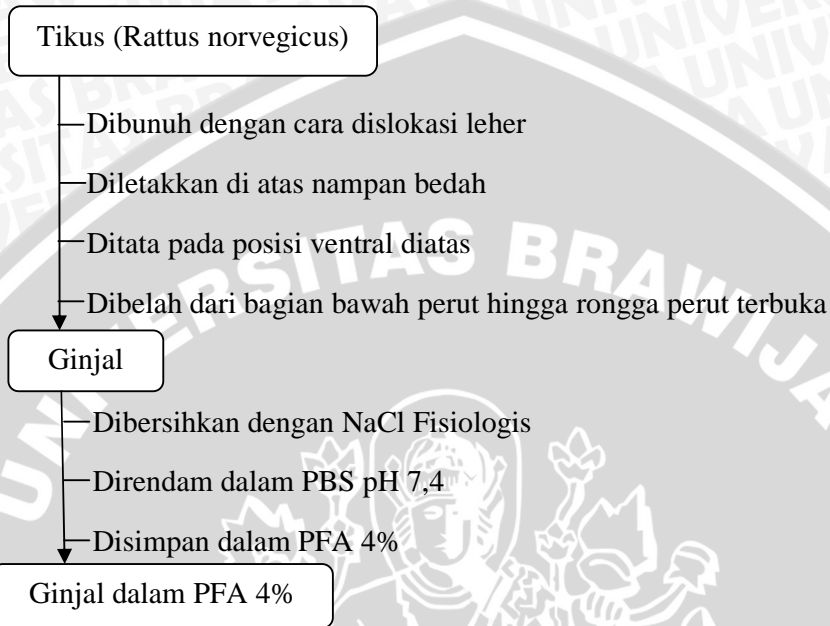
Streptokinase sebanyak 1.500.000 IU ditambahkan larutan ringer laktat sebanyak 2 mL dan dihomogenkan dengan vortex kemudian dibagi dengan 2 stock streptokinase yang mengandung 750.000 IU dalam 1 mL kemudian ditambahkan lagi ringer laktat hingga 5 mL kemudian dihomogenkan lagi dengan menggunakan vortex. Diambil 1 mL dari larutan akhir yang mengandung 150.000 IU. Untuk menyiapkan larutan streptokinase dengan dosis 6000IU per ekor tikus dihitung kedalam konversi sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{Streptokinase yang diberikan} &= \text{Streptokinase (IU)} \sim \text{isi larutan (mL)} \\ &= \text{Dosis / streptokinase yg diberikan} \\ \text{Streptokinase yang diberikan} &= 750.000 \text{ IU} \sim 5 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l} \\ &= 6000 \text{ IU} / 150 \text{ IU} / \mu\text{l} \\ &= 40 \mu\text{l}\end{aligned}$$

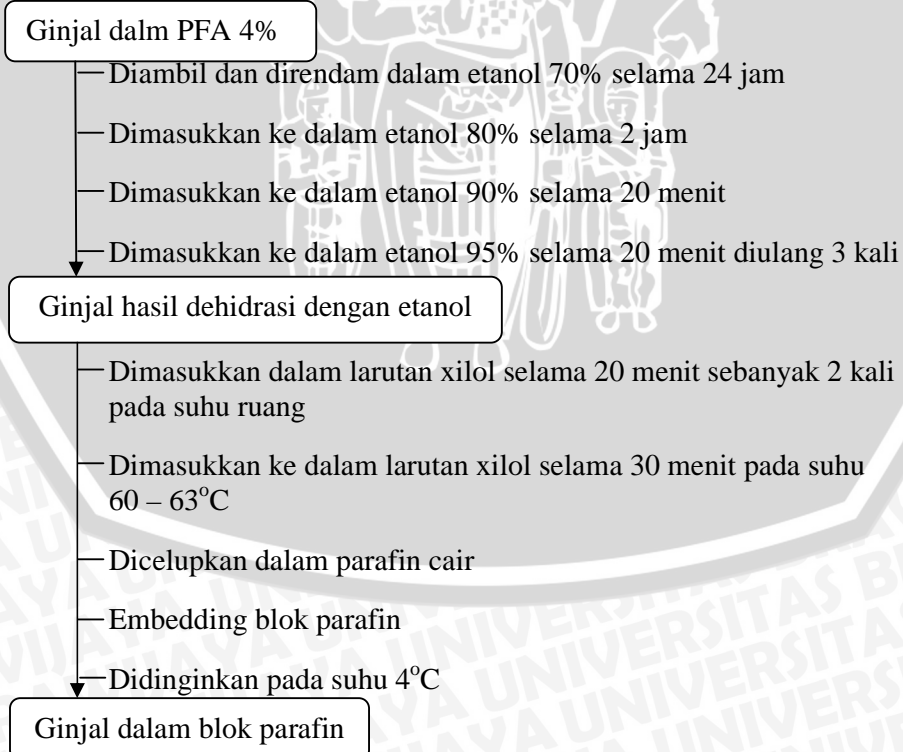


### Lampiran 3 Diagram Alir Penelitian

#### 3.1 Pengambilan organ pada hewan coba



#### 3.2 Pembuatan preparat untuk pemeriksaan histologis



**Ginjal dalam blok**

- Diiris seukuran 5  $\mu\text{m}$
- Dimasukkan ke dalam air hangat dengan suhu 38 – 40°C
- Diambil dengan objek glass
- Dikeringkan diatas hot plate dengan suhu 38 – 40°C
- Diinkubasi pada suhu 38 – 40°C selama 24 jam

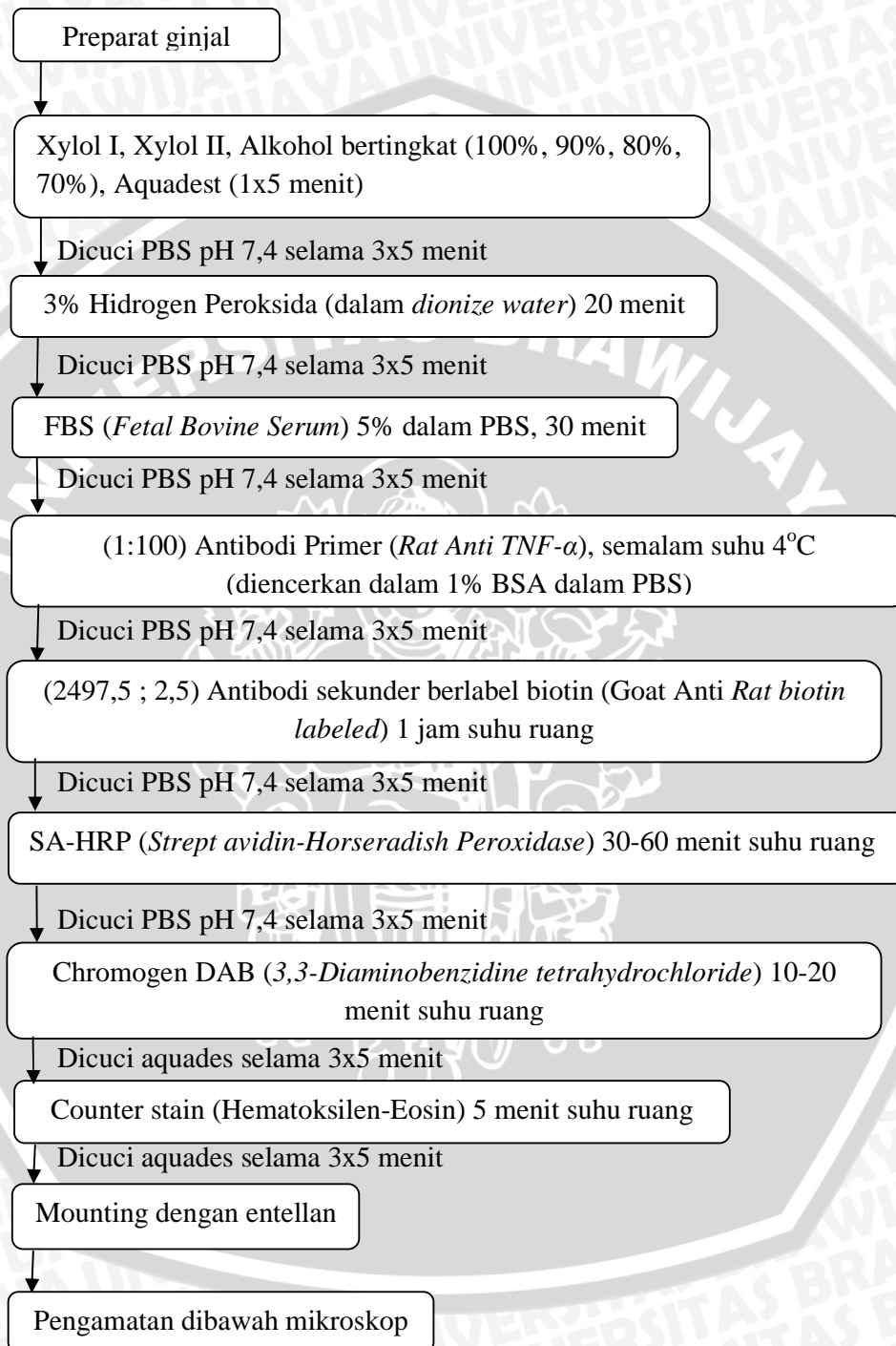
**Preparat**

- Dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan ke dalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) selama 5 menit lalu direndam dalam aquades
- Diwarnai dengan Hematoksilen selama 10 menit atau hingga diperoleh hasil yang terbaik
- Dicuci air mengalir dan dibilas dengan aquades
- Diwarnai dengan Eosin 5 menit lalu direndam dalam aquades
- Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan ke dalam xilol selama 5 menit (2 kali)
- Dikering anginkan
- Dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup cover glass

**Preparat HE**



### 3.3 Metode Imunohistokimia (TNF- $\alpha$ )



## Lampiran 4 Hasil Ekspresi TNF- $\alpha$

### 4.1 jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$

**Tabel 4.1.1 Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$**

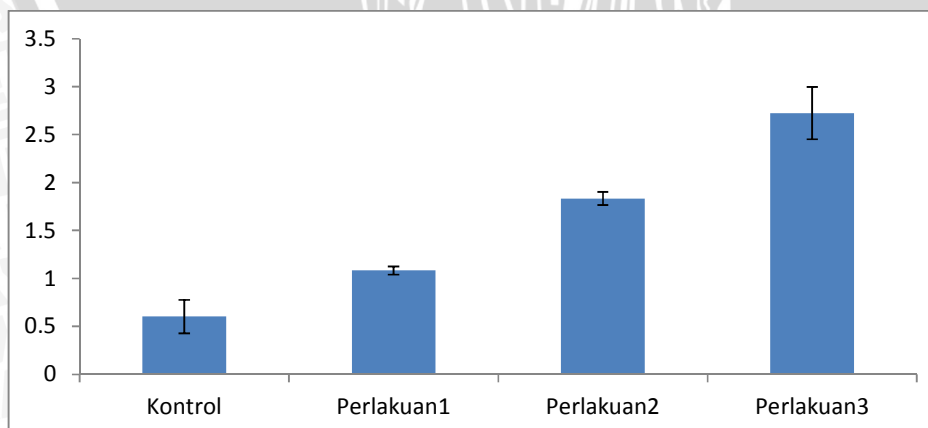
Nama sampel	Persentase area					Rata-rata
	1	2	3	4	5	
Kontrol (A)	0,475989583	0,533125	0,802517361	0,584391	0,623359	0,603877
Streptokinase 1x6000IU (B)	1,041284722	1,081423611	1,126770833	1,074519761	1,091801073	1,08316
Streptokinase 2x6000IU (C)	1,900711805	1,838402778	1,763072917	1,729542117	1,938585383	1,834063
Streptokinase 3x6000IU (D)	2,429947917	2,771267361	2,96921875	2,83568193	2,611274042	2,723478

### 4.2 Perhitungan persentase peningkatan untuk perlakuan streptokinase

Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  =  $\frac{\text{rata-rata ekspresi TNF-}\alpha \text{ (streptokinase)} - \text{rata-rata ekspresi TNF-}\alpha \text{ (kontrol)}}{\text{rata-rata ekspresi TNF-}\alpha \text{ (kontrol)}} \times 100\%$

1. Kontrol Sehat (A) =  $\frac{(0,603877 - 0,603877)}{0,603877} \times 100\% = 0\%$
2. Streptokinase (B) =  $\frac{(1,08316 - 0,603877)}{0,603877} \times 100\% = 80\%$
3. Streptokinase (C) =  $\frac{(1,834063 - 0,603877)}{0,603877} \times 100\% = 204\%$
4. Streptokinase (D) =  $\frac{(2,723478 - 0,603877)}{0,603877} \times 100\% = 350\%$

### 4.3 Ekspresi TNF- $\alpha$ pada tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol (A) dan perlakuan Streptokinase 1x6000IU (B), 2x6000IU (C), 3x6000IU (D)



**Gambar 4.1.1 Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$**

#### 4.4 Hasil Uji ANOVA

Sumber keragaman	Derajat bebas	JK	KT	F HIT	F5%
Perlakuan	3	12,85025363	4,283417877	253,13**	2,120
Acak	17	0,2707441	0,016921506		
Total	20	13,12099773			

$F_{\text{Hitung}} (253,13) > F_{5\% (a/2.16)} (2,120)$  maka  $H_0$  ditolak. Dengan tingkat kesalahan 5% sudah cukup bukti untuk menyatakan terdapat pengaruh antar perlakuan dengan pemberian Streptokinase 1 x 6000 IU, 2 x 6000 IU, 3 x 6000 IU, dianalisis lanjutan menggunakan uji (BNJ 5%) untuk mengetahui perlakuan mana yang memberikan hasil yang berbeda.

#### 4.5 UJI BNJ

$$BNJ_{\alpha} = q_{(\alpha, p, db \text{ galat})} \cdot \sqrt{\frac{1}{2} KTG \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

q tabel            4.53  
 KTG                0.028  
 BNJ (0,05)       0.338994

$\alpha = 0,05$   
 $v = db \text{ galat}$   
 $n = \text{banyak pengamatan}$

A            0.60387    a  
 B            1.08316    b  
 C            1.83403    c  
 D            2.72348    d



### Interpretasi

berdasarkan uji BNJ, dapat disimpulkan bahwa:

1. perlakuan A dan B mempunyai pengaruh yang berbeda
2. perlakuan A dan C mempunyai pengaruh yang berbeda
3. perlakuan A dan D mempunyai pengaruh yang berbeda
4. perlakuan B dan C mempunyai pengaruh yang berbeda
5. perlakuan B dan D mempunyai pengaruh yang berbeda
6. perlakuan C dan D mempunyai pengaruh yang berbeda

Jika nilai lebih kecil atau sama dengan uji BNJ 5% (0,338994) maka perlakuan tersebut tidak memberikan beda yang nyata. Hal ini ditunjukkan dengan pemberian notasi yang sama. Jika hasil nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNJ 5% (0,338994) maka perlakuan tersebut mempunyai pengaruh yang berbeda. Hal ini ditunjukkan dengan pemberian notasi yang berbeda.

## Lampiran 5. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 132-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI PAPARAN STREPTOKINASE TERHADAP  
MUNCULNYA FIBROSIS GINJAL : UPAYA  
MENDAPATKAN HEWAN MODEL TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) FIBROSIS GINJAL DAN MEMPELAJARI  
PATOMEKANISMENYA.

PENELITI : PASCARA FAJAR LUKITO

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : KIMIA/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 April 2013  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001