

**EKSPRESI INTERLEUKIN-1-BETA (IL-1 β) DAN GAMBARAN
HISTOPATHOLOGI GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL RENAL FIBROSIS HASIL INDUKSI
STREPTOKINASE**

SKRIPSI

**Oleh :
RIZKY RAKADANA PUTRA
0911310061**



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

repository.ub.ac.id

**EKSPRESI INTERLEUKIN-1-BETA (IL-1 β) DAN GAMBARAN
HISTOPATHOLOGI GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL RENAL FIBROSIS HASIL INDUKSI
STREPTOKINASE**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

RIZKY RAKADANA PUTRA

0911310061



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**EKSPRESI INTERLEUKIN-1-BETA (IL-1 β) DAN
HISTOPATHOLOGI GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL
RENAL FIBROSIS HASIL INDUKSI STREPTOKINASE**

Oleh :

RIZKY RAKADANA PUTRA
0911310061

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 September 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 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 bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizky Rakadana Putra

NIM : 0911310061

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Eksresi Interleukin-1-Beta (Il-1 β) dan Histopathologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Renal Fibrosis Hasil Induksi Streptokinase

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat 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, 20 September 2013

Yang menyatakan,

(Rizky Rakadana Putra)

NIM. 0911310061

Ekspresi Interleukin-1-Beta (IL-1 β) dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Renal Fibrosis Hasil Induksi Streptokinase

ABSTRAK

Renal fibrosis adalah kegagalan dari respon penyembuhan dan perbaikan karena trauma kronis di ginjal. Patomekanisme renal fibrosis melibatkan banyak proses seperti inflamasi dan penumpukan ECM pada jaringan ginjal. Streptokinase sebagai salah satu jenis *plasminogen activator*, berpotensi menimbulkan renal fibrosis karena memiliki sifat nephrotoxic dan mampu mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin yang berperan penting dalam inisiasi fibrosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek induksi streptokinase terhadap gambaran histopatologi dan ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dibagi dalam empat kelompok, yaitu kelompok A sebagai kontrol, kelompok B yang diberikan streptokinase 6000 IU satu kali injeksi. Kelompok C diinjeksi dua kali dan kelompok D diinjeksi tiga kali dengan jeda waktu pengulangan lima hari setiap pemberian. Hasil penelitian menunjukkan induksi streptokinase menyebabkan kerusakan jaringan berupa fibrosis yang ditemukan pada histopatologi ginjal kelompok B, C dan D dan FSGS yang ditemukan pada kelompok D. Analisis immunohistokimia juga menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-1 β yang signifikan pada kelompok B (147.97%), C (219.38%), dan D (406.96%) dibandingkan dengan kontrol.

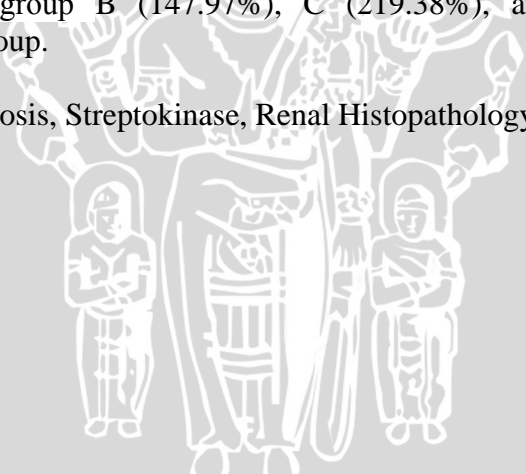
Kata kunci : Renal fibrosis, Streptokinase, Histopatologi ginjal, IL-1 β

**Expression of Interleukin-1-Beta (IL-1 β) and Histopathology of Kidney Rat
(*Rattus Norvegicus*) Animal Model Renal Fibrosis
Induced by Streptokinase**

ABSTRACT

Renal fibrosis is a failed response of tissue healing and repair that caused by chronic wound in kidney. The pathomechanism of renal fibrosis involved several process such as inflammation and ECM accumulation in renal tissues. Streptokinase as one of the plasminogen activator, is potentially able to induce renal fibrosis since it is nephrotoxic and able to activate plasminogen into plasmin which is important in fibrosis initiation. This study was aimed to understand the effect streptokinase on histopathology and IL-1 β expression of rat (*Rattus norvegicus*) kidney. This study using male rats (*Rattus norvegicus*) which divided into four groups: A as the control group, the B group which were given 6000IU of streptokinase once, the C group which were given twice and the D group rats which were given three times with five days period for each induction. The results show that streptokinase induction caused tissue damaged with a form of fibrosis is found on the histopathological image of group B, C and D and FSGS which found on D group. Immunohistochemistry analysis also shown a significant increase on IL-1 β expression in group B (147.97%), C (219.38%), and D (406.96%) compared to control group.

Kata kunci : Renal fibrosis, Streptokinase, Renal Histopathology, IL-1 β



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Ekspresi Interleukin-1-Beta IL-1 β dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase**”. Penelitian ini merupakan payung penelitian hewan model fibrosis ginjal yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. Serta salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya. Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada :

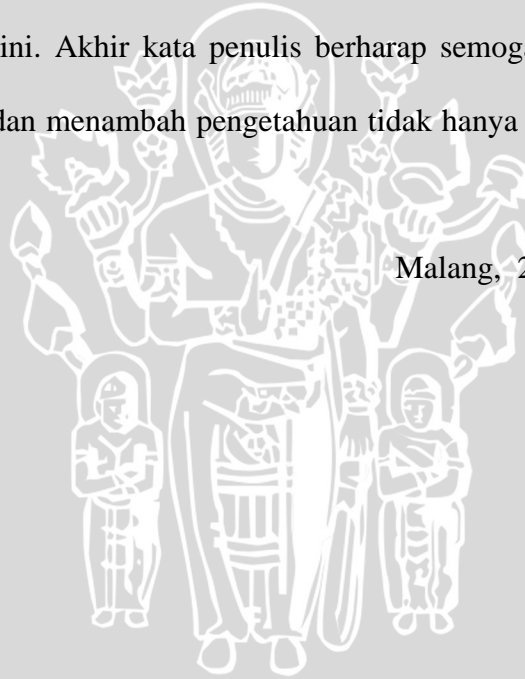
1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan drh. Dyah Ayu Oktaviani, M.Biotech, selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan hingga skripsi ini terselesaikan.
2. drh. Analis Wisnuwardhana, M.Biomed dan drh. Herlina Pratiwi selaku penguji yang telah memberikan masukan, kritik dan saran dalam penyempurnaan skripsi ini
3. Seluruh staf serta asisten laboratorium Biokimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Ayah dan Ibu yang telah memberikan doa dan kasih sayang dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.

5. Tim Penelitian Fibrosis ginjal “Keni, Pascara, Helda, Candra, Rizka, Vindy” atas semangat yang diberikan sehingga penelitian ini terselesaikan.
6. Seluruh Sahabat seperjuangan di Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya angkatan 2009 atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan.
7. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi dan studi yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 20 September 2013

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Renal Fibrosis	5
2.2 IL-1 β	10
2.3 Streptokinase	11
2.4 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	14
3.1 Kerangka Konsep	14
3.2 Hipotesis	16
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	17
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
4.2 Alat dan Bahan	17
4.3 Rancangan Penelitian	18
4.4 Prosedur Kerja	19
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	25
5.1 Pengaruh induksi streptokinase terhadap histopatologi ginjal	25
5.2 Pengaruh induksi streptokinase terhadap ekspresi IL-1 β	28
BAB VI KESIMPULAN	32
6.1 Kesimpulan	32
6.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian.....	19
5.1 Persentase area hasil analisis axiovision dari preparat imunohistokimia IL-1 β	28



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Perbandingan ginjal normal dan renal fibrosis	2
2.2 Perbandingan gambaran histopatologi ginjal normal dan renal fibrosis.....	2
2.3 Skema dasar renal fibrosis	8
3.1 Kerangka konsep.....	13
5.1 Histopatologi ginjal hasil induksi streptokinase	25
5.2 Grafik persentase area hasil analisis axiovision dari preparat immunohistokimia IL-1 β	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rancangan perlakuan	37
2. Pembuatan larutan.....	39
3. Diagram alir penelitian.....	41
4. Data hasil dan uji statistik ekspresi IL-1 β	44
5. Gambaran immunohistokimia ekspresi IL-1 β	45
6. Sertifikat laik etik.....	46



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AngII	Angiotensin II
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BNJ	Beda nyata jujur
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>
CsN	<i>Cyclosporin nephrotoxin</i>
COL4A3	<i>Collagen type IV alpha 3</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
C3	Komplemen 3
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EMT	<i>Epithelial to mesenchymal transition</i>
ESRD	<i>End stage renal disease</i>
ET-1	Endhotelin 1
FSGS	<i>Focal segmental glomerulosclerosis</i>
GNAPS	Glomerulonefritis akut paska streptokokus
IL-1 β	Interleukin 1 beta
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NTN	<i>Nephrotoxic serum nephritis</i>
PCT	<i>Proximal tubular cell</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
ROS	<i>Radical oxigen species</i>
SPSS	<i>Statistical package for social science</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
Toxin	Racun
UUO	<i>Unilateral ureteral obstruction</i>
UPHP	Unit pelayanan hewan percobaan

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Renal fibrosis merupakan gejala dari CKD (*chronic kidney disease*) yang mengindikasikan sudah ada proses terjadinya ESRD (*end stage renal disease*) (Liu, 2006). Angka prevalensi CKD pada hewan kesayangan cenderung meningkat setiap tahunnya. Pada tahun 2006 mencapai 0,8% kemudian terus meningkat menjadi 1.6% pada 2010. Pasien yang sudah mengalami renal fibrosis biasanya tidak bisa disembuhkan seperti semula sehingga disarankan untuk euthanasi (Levebre, 2011).

Secara umum, renal fibrosis adalah bentuk kegagalan sistem penyembuhan jaringan ginjal karena trauma kronis (Pinzani, 2008). Patomekanisme renal fibrosis cukup rumit dan meliputi banyak proses (Cho, 2010). Patomekanisme renal fibrosis diawali trauma kronis jaringan ginjal. Trauma jaringan akan menimbulkan efek inflamasi dan fibrosis yang terus menerus sehingga menimbulkan penumpukan ECM (*extracellular matrix*) pada jaringan ginjal. Penumpukan ECM pada jaringan ginjal menimbulkan renal fibrosis (Liu, 2006).

Inflamasi adalah salah satu proses penting dalam renal fibrosis (Chatziantoniou, 2005). Hal ini dibuktikan dengan adanya infiltrasi sel-sel inflamasi pada renal fibrosis (Liu, 2006). Salah satu faktor terjadinya inflamasi adalah sitokin pro-inflamasi. IL-1 β (interleukin 1 beta) adalah sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag, monosit, sel NK dan neutrofil (Giraldo *et al.*; 2013). IL-1 β sebagai sitokin proinflamasi berperan penting pada patogene-

patogenesis *renal fibrosis* melalui aktivasi sel B dan sel T dan fibroblas sehingga menimbulkan inflamasi (Luo, 2009).

Penelitian mengenai renal fibrosis sudah dilakukan, hal ini dibuktikan dengan adanya beberapa model untuk renal fibrosis. Hewan model untuk renal fibrosis yang sudah dikenal sebelumnya antara lain model NTN (*nephrotoxic serum nephritis*) (Xia *et al.*, 2012), UUO (*unilateral ureteral obstruction*) (Chevalier *et al.*, 2009), CsN (*cyclosporin nephrotoxicity*) (Hyun *et al.*, 2013), dan mencit yang dimanipulasi secara genetik pada gen COL4A3 (Hamano *et al.*, 2002). Hambatan yang ditemui pada penggunaan hewan model di atas antara lain biaya yang mahal dan prosedur yang cukup sulit untuk diterapkan.

Streptokinase merupakan agen thrombolitik paling murah yang ada di pasaran selain tPA (*tissue plasminogen activator*) dan uPA (*urokinase plasminogen activator*). Karena harganya yang murah dan efeknya yang cukup baik sebagai agen thrombolitik, streptokinase menjadi obat pilihan dalam kasus-kasus thromboembolism (Ghosh, 2012). Streptokinase mampu mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin yang penting dalam proses thrombolisis (Boxrud *et al.*, 2001). tPA telah diketahui mampu menginduksi terjadinya renal fibrosis. tPA mampu menyebabkan inflamasi dan mengaktifkan plasmin sehingga menyebabkan terjadinya renal fibrosis (Hu *et al.*, 2008). Streptokinase sebagai agen thrombolitik juga memiliki sifat yang mirip dengan tPA karena kemampuannya mengaktifkan plasmin dalam thrombolisis (Ghosh *et al.*, 2012). Plasmin mampu mengaktifkan TGF- β (Hu *et al.*, 2008) dan bradikinin (Inomata, 2012) yang berperan dalam inisiasi fibrosis dan inflamasi dalam renal fibrosis, karena sifatnya sebagai agen

thrombolitik mampu mengaktivasi plasmin, streptokinase berpotensi menginduksi renal fibrosis pada hewan model.

Renal fibrosis akan menyebabkan perubahan struktural pada jaringan ginjal yang dapat diamati dengan adanya penumpukan ECM pada gambaran histopatologi. Penumpukan ECM pada jaringan ginjal akan menimbulkan gambaran patologis berupa *tubulointerstitial fibrosis* dan glomerulosclerosis (Winbanks, 2006). Selain perubahan struktural, renal fibrosis juga ditanda dengan inflamasi kronis yang dapat diamati dari meningkatnya ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β (Hirschberg, 2005). Berdasarkan penjabaran di atas, maka pada penelitian ini akan diamati histopatologi ginjal tikus dan ekspresi IL-1 β pada tikus model renal fibrosis hasil induksi streptokinase

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah

- 1) Bagaimana efek induksi streptokinase pada ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus model renal fibrosis?
- 2) Bagaimana efek induksi streptokinase gambaran histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) tikus model renal fibrosis?

1.3 Batasan Masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan umur 10 minggu dan berat badan antara 150-250 gram dari unit pelayanan hewan percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sertifikasi

laik etik penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik berdasarkan keputusan KEP No. 132 komisi etik penelitian Universitas Brawijaya.

- 2) Streptokinase yang digunakan diinduksikan secara intravena pada vena *coccygea* dengan dosis optimasi 6000IU/ekor berdasarkan hasil prapenelitian.
- 3) Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah tingkat ekspresi IL-1 β dengan immunohistokimia dan gambaran histopatologi ginjal berupa fibrosis, *glomerulosclerosis* dan *tubulointerstitial fibrosis*.

1.4 Tujuan Penelitian

- 1) Mengetahui pengaruh induksi Streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap tingkat ekspresi IL-1 β
- 2) Mengetahui pengaruh induksi Streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap gambaran histopatologi ginjal.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang potensi induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model renal fibrosis dan efek streptokinase pada ginjal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Renal Fibrosis

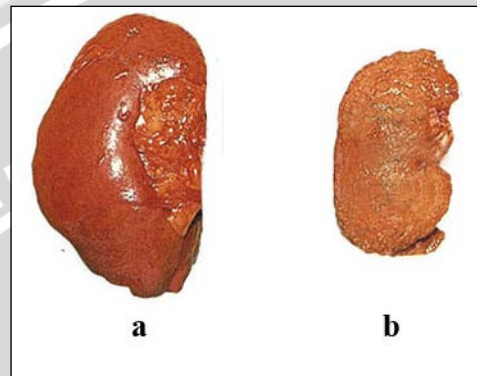
Fibrosis terjadi karena adanya respon tubuh berupa penyembuhan dan perbaikan terhadap trauma (Pinzani, 2008). Renal fibrosis adalah kegagalan dari respon penyembuhan dan perbaikan karena trauma kronis yang berkepanjangan di ginjal. Renal fibrosis merupakan proses terjadinya ESRD (*end stage renal disease*) sebagai bentuk akhir CKD (*chronic kidney disease*) yang *irreversible* (Liu, 2006). Karakteristik utama dari renal fibrosis adalah adanya ECM (*extracellular matrix*) yang berlebihan pada jaringan ginjal (Cho, 2010).

2.1.2 Gejala klinis

Sebagai bentuk kegagalan respon penyembuhan pada ginjal, renal fibrosis biasa ditemukan pada kerusakan pada ginjal yang bersifat kronis (Schnapper, 2005). Gejala klinis yang bisa ditemukan pada penderita renal fibrosis antara lain kurangnya nafsu makan, penurunan PCV (*packed cell volume*), penurunan *urine specific gravity*, peningkatan albumin pada urine, peningkatan BUN (*blood urea nitrogen*), kreatinin dan fosfor dalam darah (Levebre, 2011).

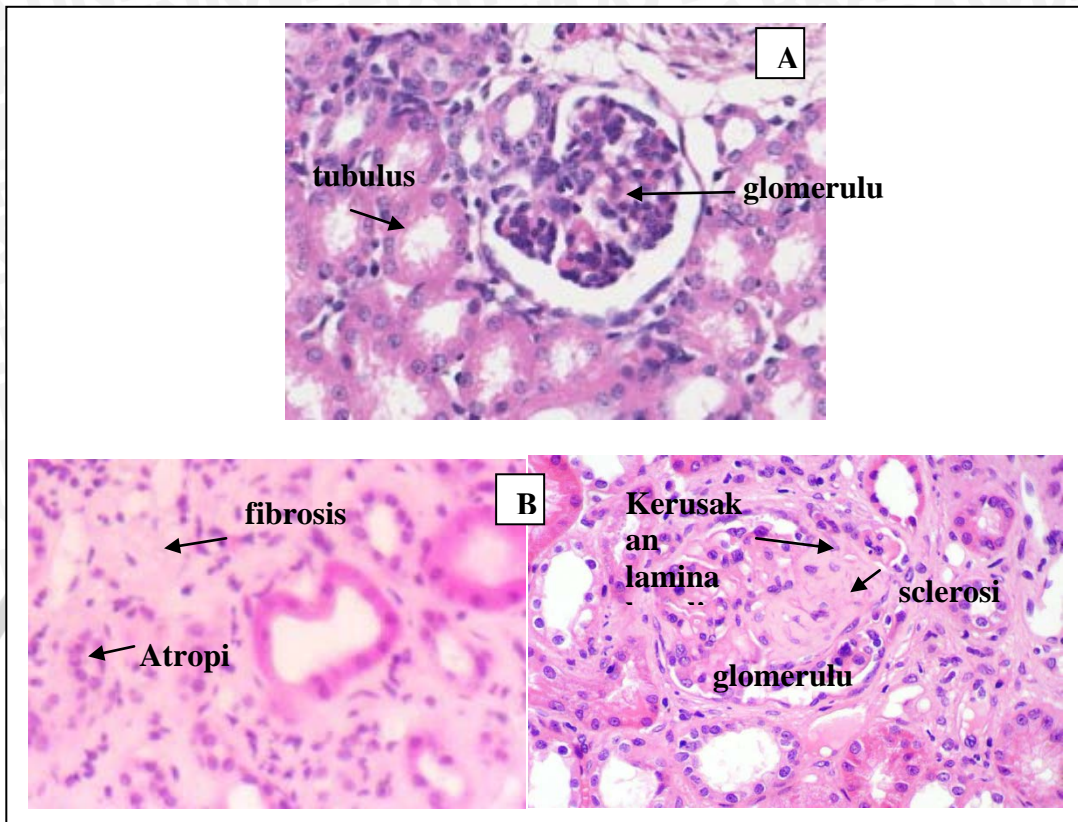
Secara makroskopis, ginjal yang mengalami fibrosis menjadi lebih kecil ukurannya dan kasar seperti pada Gambar 2.1 jika dibandingkan dengan ginjal normal. Secara mikroskopis, yang bisa diamati dari renal fibrosis antara lain *glomerulosclerosis* berupa penumpukan ECM pada jaringan glomerulus, *tubulointerstitial fibrosis* yang ditandai dengan adanya *interstitial fibrosis* dan

atrofi tubulus (Winbanks, 2006) seperti pada Gambar 2.2, kerusakan jaringan parenkim dan inflamasi. Ginjal yang sudah mengalami ESRD tidak bisa lagi diperbaiki lagi dengan terapi dan perlu dilakukan penggantian organ dengan dialisis atau transplantasi organ (Liu, 2006).



Gambar 2.1 Struktur anatomi ginjal
Keterangan : (a) ginjal normal; (b) ginjal yang terkena renal fibrosis mengalami penyusutan (Schaeffer *et al.*, 2013)

Struktur anatomi ginjal terdiri dari korteks, medula dan pelvis. Korteks berfungsi sebagai tempat penyaringan karena terdapat banyak glomerulus. Medula berfungsi mengumpulkan urin hasil penyaringan di korteks karena banyak jaringan tubulus. Pelvis berfungsi menyalurkan urin dari ginjal ke ureter. (Junqueira, 2007). Renal fibrosis akan menyebabkan gangguan pada fungsi penyaringan karena rusaknya glomerulus. Penyaluran urin melalui tubulus juga akan terganggu karena terjadi atrofi (Schnapper, 2005). Kerusakan jaringan parenkim (glomerulus dan tubulus) juga menyebabkan terjadinya penyusutan (atrofi) pada ginjal (Botto *et al.*, 2011).



Gambar 2.2 Histopatologi ginjal.

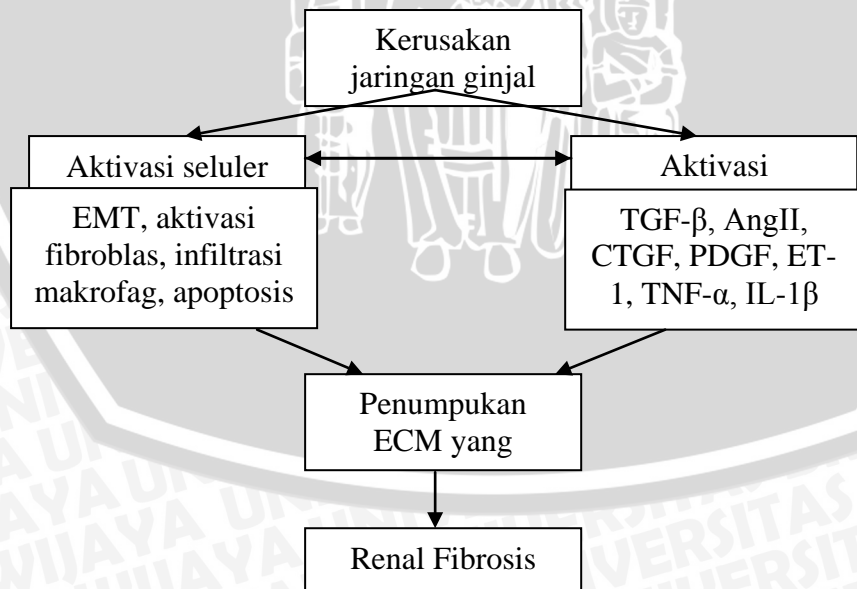
Keterangan : (a) histologi ginjal normal; (b) histopatologi renal fibrosis. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin. perbesaran 100x. (Schaeffer *et al.* 2013)

Pada gambar 2.2 terlihat perbedaan antara ginjal normal dengan renal fibrosis. Struktur glomerulus pada gambaran histopatologi renal fibrosis mengalami glomerulosclerosis. Glomerulosclerosis ditunjukkan dengan adanya penumpukan ECM dan kerusakan struktural jaringan. Selain gambaran histopatologi pada gambar 2.2, glomerulosclerosis digolongkan menjadi *nodular glomerulosclerosis* yang terjadi pada kasus *diabetic nephropathy* dan *FSGS (focal segmental glomerulosclerosis)* yang memiliki beberapa varian seperti *cellular*, *tip lesion*, *perihillar*, *collapsing* dan *not otherwise specific (NOS)* (Arias, 2011). Pada gambar 2.2 juga ditemui atropi tubulus yang ditandai dengan ukuran tubulus yang

lebih kecil dari tubulus normal. *Interstitial fibrosis* pada gambar ditandai dengan perluasan daerah interstisial karena penumpukan ECM (Arias, 2011).

2.1.1 Patomekanisme

Renal fibrosis diawali dengan adanya kerusakan jaringan ginjal. Kerusakan jaringan bisa disebabkan berbagai faktor seperti trauma mekanis, paparan *toxin* dan faktor genetik (Schnapper, 2005). Secara molekuler, sitokin proinflamasi seperti IL-1 β akan diproduksi oleh makrofag lokal sebagai respon awal kerusakan jaringan. IL-1 β akan memicu aktivitas seluler berupa infiltrasi makrofag dan sel T ke dalam jaringan ginjal, sehingga menimbulkan radang. Jaringan yang diinfiltrasi akan melepaskan senyawa perusak seperti ROS (*radical oxygen species*) kemudian menyebabkan aktivasi fibroblas. Aktivasi ini menyebabkan diproduksinya ECM (*extracellular matrix*) dalam jumlah besar (Hirschberg, 2005).



Gambar 2.3 Skema dasar renal fibrosis (Cho, 2010)

Berdasarkan skema dasar renal fibrosis pada gambar 2.3, renal fibrosis terjadi karena adanya aktivasi secara seluler dan molekuler. Aktivasi seluler meliputi EMT dan aktivasi fibroblas yang berfungsi memproduksi ECM (Lee dan Nelson, 2012), infiltrasi makrofag yang berfungsi dalam terjadinya inflamasi (Fujiwara and Kobayashi, 2005) dan apoptosis yang berdampak pada kerusakan jaringan. Aktivasi seluler dan molekuler saling mempengaruhi dalam patogenesis renal fibrosis. Aktivasi molekuler meliputi TGF- β (*transforming growth factor beta*) yang berfungsi dalam aktivasi fibroblas dan terjadinya EMT (Cho, 2010), ET-1 (endotelin 1) yang berfungsi dalam proliferasi fibroblas (Kambas *et al.*, 2011), AngII (angiotensin II) yang berfungsi mengatur TGF- β dan CTGF (*connective tissue growth factor*) (Ortega *et al.*, 2006), CTGF yang berfungsi menguatkan efek TGF- β dan menghambat MMP-9 (*matrix metalloproteinase*) (Olav *et al.*, 2008), PDGF (*platelet-derived growth factor*) yang berfungsi sebagai mitogen dan *chemoattractant* sel-sel mesenkim (Trojanowska, 2008), TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) dan IL-1 yang berfungsi dalam inflamasi (Liu, 2006).

Aktivitas molekuler yang cukup penting antara lain adalah TGF- β dan IL-1 β . TGF- β yang diaktivasi oleh plasmin dan memiliki peran penting untuk menginduksi terjadinya EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) (Cho, 2010). EMT merupakan proses perubahan fenotip dari jaringan epitel ke jaringan mesenkim (dalam hal ini myofibroblas). Seperti fibroblas, myofibroblas juga mampu menghasilkan ECM (Lee, 2012). Berubahnya epitel menjadi EMT menyebabkan kerusakan jaringan tubulus karena hilangnya sel penyangga jaringan. Kerusakan tubulus bisa menyebabkan atropi tubulus dan *interstitial*

fibrosis (Cho, 2010). IL-1 β adalah salah satu sitokin proinflamasi yang terlibat dalam inflamasi. Sebagai protein proinflamasi, IL-1 β berfungsi meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi lain (Liu, 2006), meningkatkan ekspresi MCP (*monocyte chemotactic protein*) yang berfungsi dalam migrasi makrofag (Gao, 1999) dan sebagai zat pirogenik (Dinarello, 2006).

Inflamasi kronis yang berkepanjangan direspon dengan aktivasi fibroblas dan ekspresi TGF- β yang terus menerus sehingga berakibat pada banyaknya EMT dan myofibroblas (Liu, 2006). Fibroblas yang diaktivasi oleh makrofag juga mengekspresikan sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL-1 β sehingga inflamasi terus terjadi (Lonneman *et al.*, 1995). Seiring dengan proses tersebut, ECM semakin banyak menumpuk sehingga merusak fungsi fisiologis ginjal dan akhirnya menyebabkan renal fibrosis (Hirschberg, 2005).

2.2 IL-1 β (Interleukin 1 beta)

2.2.1 Definisi IL-1 β

IL-1 β (interleukin 1 beta) adalah sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag, monosit, sel NK, neutrofil (Giraldo *et al.*, 2013) dan pada kasus fibrosis, IL-1 β juga diproduksi oleh fibroblas (Lonnemann *et al.*, 1995). IL-1 β memiliki panjang 268 asam amino dan termasuk tipe monomer berdasarkan strukturnya (Feaser dan Freimark, 1992). Pada keadaan normal, IL-1 β dihasilkan oleh leukosit, tetapi belum termaturasi atau dilepaskan dari sitosol. IL-1 β akan dilepaskan setelah adanya respon dari luar seperti *bacterial endotoxin* dan gangguan lain (Dinarello, 2006).

2.2.2 IL-1 β dalam patomekanisme renal fibrosis

IL-1 β ikut terlibat dalam *renal fibrosis*, dibuktikan dengan adanya inflamasi dan IL-1 β pada jaringan ginjal yang mengalami fibrosis. Luas jaringan fibrotik pada ginjal berbanding lurus dengan konsentrasi IL-1 β (Ji *et al.*, 2008). Peran utama IL-1 β adalah inflamasi kronis jaringan karena sifatnya sebagai sitokin proinflamasi. Pada inisiasi inflamasi, IL-1 β diproduksi oleh makrofag sebagai respon kerusakan jaringan. Peningkatan ekspresi dan pelepasan IL-1 β menimbulkan reaksi dari sel-sel proinflamasi seperti infiltrasi neutrofil ke jaringan, migrasi makrofag dan produksi sitokin proinflamasi yang lain (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Selain inflamasi, dalam renal fibrosis IL-1 β berperan dalam regulasi respon PCT (*proximal tubular cell*) terhadap TGF- β . Respon PCT terhadap TGF- β penting dalam terbentuknya EMT (Luo, 2009). IL-1 β juga berperan sebagai *growth factor* fibroblas yang dihasilkan akibat renal fibrosis (Lonneman *et al.*, 1995).

2.3 Streptokinase

Streptokinase adalah protein ekstraselular dengan berat molekul 46-kDa, terdiri dari 414 asam amino yang diproduksi semua strain *Streptococcus* grup A (Pardede, 2009). Streptokinase yang digunakan untuk keperluan medis maupun riset diproduksi dengan purifikasi dari isolat bakteri *Streptococcus sp* (Babashamsi *et al.*, 2009). streptokinase dalam dunia medis digunakan sebagai agen thrombolitik untuk kasus seperti *cardiac infarct* dan *thromboembolism* (Ghosh *et al.*, 2012).

Sebagai obat, streptokinase berpotensi menyebabkan *acute allergic interstitial nephritis*. Gejala klinis yang dapat ditemukan dalam *acute allergic interstitial nephritis* antara lain ditemukannya leukosit dan eritrosit pada urin karena kerusakan pada ginjal (Guo and Nzerue, 2002). Hal ini menunjukkan potensi streptokinase dalam merusak jaringan ginjal. Streptokinase diketahui mampu mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin (Boxrud *et al.*, 2001). Aktivasi plasminogen menjadi plasmin berperan penting dalam patogenesis *renal fibrosis* karena plasmin mampu mengaktifasi TGF- β yang menyebabkan apoptosis dan EMT (Hu *et al.*, 2008). Plasmin juga mampu mengaktifasi bradikinin (Inomata, 2012). Bradikinin mampu menginisiasi inflamasi melalui pelepasan sitokin melalui makrofag (Böckman and Pagelow, 2000).

2.4 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan karena hewan ini mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang cepat, memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi, dan harganya relatif murah (Sihombing, 2011). Tikus telah digunakan secara luas dalam riset biomedik. Penggunaan tikus meliputi 21% dari seluruh hewan coba. Tikus biasa digunakan pada riset toksikologi dan neoplasia (Rand, 2011).

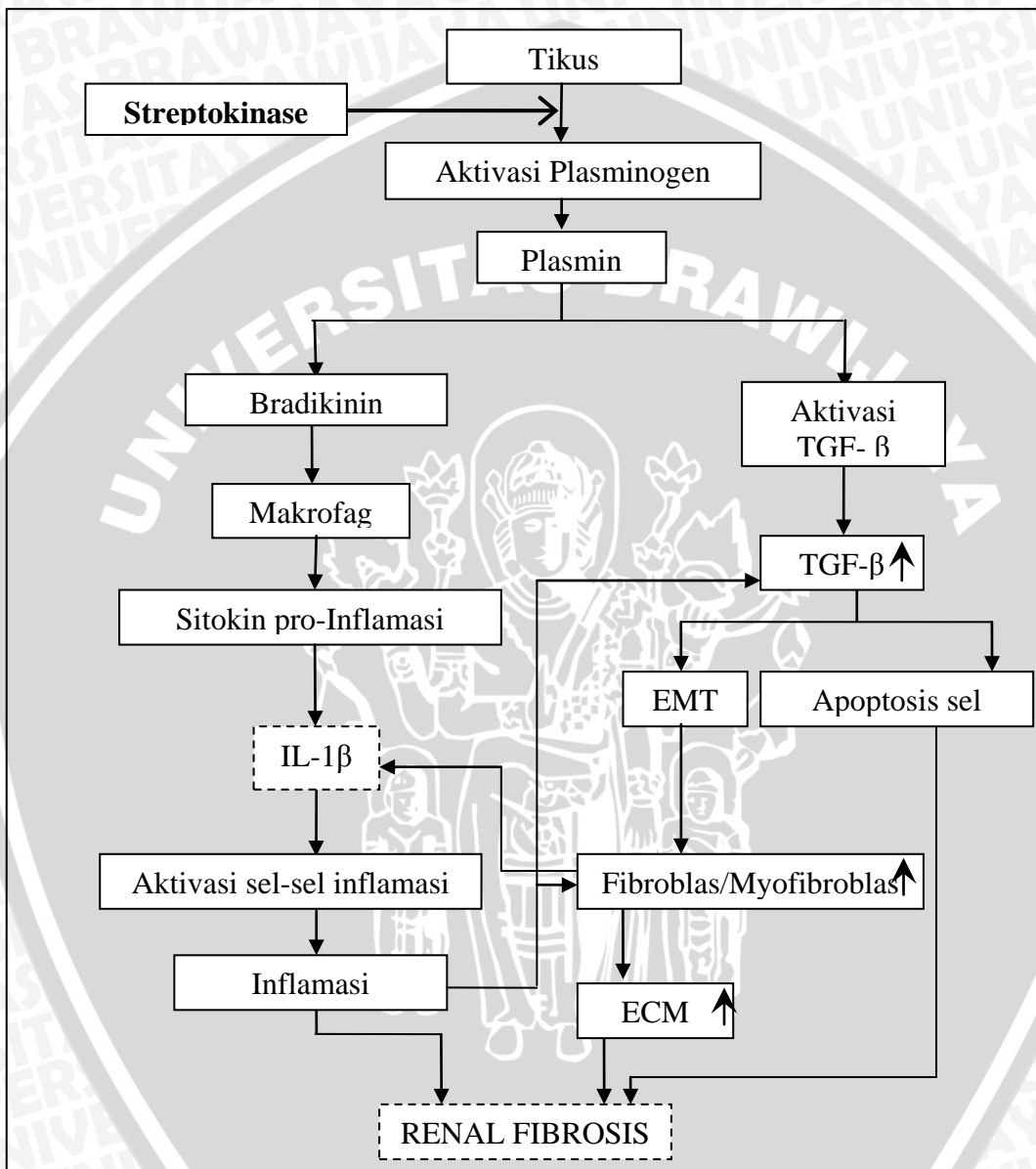
Rattus norvegicus strain Wistar memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004):

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Sub filum	: <i>Vertebrata</i>
Klass	: <i>Mammalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Sub Ordo	: <i>Sciurognathi</i>
Familia	: <i>Muridae</i>
Sub Familia	: <i>Murinae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Pada penelitian mengenai renal fibrosis, tikus banyak digunakan sebagai hewan model. Induksi renal fibrosis banyak dilakukan pada tikus seperti model NTN (*nephrotoxic serum nephritis*) (Xia *et al.*, 2012), UUU (*unilateral ureteral obstruction*) (Chevalier *et al.*, 2009) dan CsN (*cyclosporin nephrotoxicity*) (Hyun *et al.*, 2013). Metode induksi seperti UUU memerlukan hewan model yang cukup besar seperti tikus karena prosedurnya yang cukup sulit dilakukan. Kekurangan dari CsN dan NTN adalah harga bahan yang cukup mahal. (Xia *et al.*, 2012).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.

Keterangan :

- : Induksi
- : Sel, mediator dan proses
- (dashed) : Variabel yang diamati
- ↑ : Peningkatan

Streptokinase diberikan pada tikus akan mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin kemudian mengaktivasi bradikinin (Inomata, 2012). Bradikinin kemudian menstimulasi makrofag untuk mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi seperti IL-1 β . Sel-sel proinflamasi seperti neutrofil kemudian teraktivasi oleh sitokin yang dikeluarkan makrofag sehingga terjadi inflamasi (Hu, 2008). Inflamasi juga menyebabkan adanya aktivasi fibroblas melalui TGF- β (Cho, 2010).

Plasmin juga mengaktivasi TGF- β (*transforming growth factor*) sehingga menyebabkan terjadinya apoptosis dan adanya EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) di jaringan ginjal. Apoptosis menyebabkan deplesi sel-sel podosit dan kerusakan jaringan (Cho, 2010), sedangkan EMT menyebabkan dihasilkannya fibroblas dan myofibroblas. Fibroblas dan myofibroblas menghasilkan banyak ECM (*extracellular matrix*). Fibroblas, myofibroblas dan ECM akan mengisi jaringan yang rusak. Fibroblas juga menghasilkan IL-1 β yang memperpanjang terjadinya inflamasi (Hirschberg, 2005). Penumpukan ECM yang berlebihan karena inflamasi dan kerusakan jaringan yang kronis akhirnya menyebabkan terjadinya renal fibrosis. ECM yang menumpuk pada jaringan interstisial akan menyebabkan interstitial fibrosis. Interstitial fibrosis menyebabkan meluasnya jaringan interstisial, sehingga menekan tubulus yang ada di sekitarnya. Tubulus yang tertekan akhirnya mengalami atropi. Atropi tubulus juga terjadi karena adanya apoptosis dan EMT pada sel epitel (Schnapper, 2005). Penumpukan ECM pada glomerulus akan menyebabkan penebalan yang disebut sclerosis. Sclerosis

yang semakin banyak akan mengakibatkan kerusakan struktural dan fungsional glomerulus yang disebut glomerulosclerosis (Arias, 2011)

3.2 Hipotesis

1. Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptokinase mengalami peningkatan ekspresi IL-1 β pada organ ginjal.
2. Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptokinase mengalami kerusakan jaringan ginjal dan fibrosis yang bisa diamati dengan adanya *glomerulosclerosis* dan *tubulointerstitial fibrosis* pada gambaran histopatologi ginjal.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2013 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang dan laboratorium Patologi, unit Histopatologi, Rumah sakit dr Soetomo.

4.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 10 minggu dengan berat antara 150-250 gram, Streptokinase, Aquades, NaCl-fisiologis, Formaldehid, Xylol, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, H₂O₂, antibodi anti-rat IL-1 β , Dako LSAB (labeled streptavidin biotin) system-HRP (berisi *anti rabbit IgG biotin labeled* dan Strepto-avidin peroksidase) (LOT 10047843), larutan PBS, PFA 4%, H₂O₂, Mayer Hematoxylin, Hematoxylin, Eosin, Entellan, Gliserin, Parafin dan larutan PBS Azida.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas objek, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, mikro pipet, mikrotip, rak tabung reaksi, penangas air, eppendof 1,5mL, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, pisau mikrotom, neraca analitik, oven, vortex, mikroskop Olympus BX51, dan *autoclave*.

4.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan penelitian ditunjukkan dalam tabel 4.1. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol (sehat) tanpa perlakuan, kelompok B tikus di induksi streptokinase satu kali dengan dosis 6000IU, kelompok C tikus di induksi streptokinase dua kali dengan dosis 6000IU dan kelompok D tikus di induksi streptokinase tiga kali dengan dosis 6000IU dengan periode pengulangan induksi masing-masing kelompok 5 hari. 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(terdiri dari empat macam perlakuan)

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.

Tabel 4.1. Rancangan penelitian

Kelompok	Perlakuan
Kelompok A	Kontrol
Kelompok B	Induksi streptokinase Dosis 6000IU satu kali
Kelompok C	Induksi streptokinase Dosis 6000IU setiap 5 hari dengan total dua kali induksi
Kelompok D	Induksi streptokinase Dosis 6000IU setiap 5 hari dengan total tiga kali induksi

4.3.1 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

1. Variabel Bebas : Jumlah pemberian streptokinase 6000 IU.
2. Variabel tergantung : Ekspresi Interleukin 1 beta dan gambaran histopatologi ginjal
3. Variabel kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, umur 10 minggu, strain wistar, berat badan 150-250 gram.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 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. Kandang terbuat plastik dengan tutup terbuat dari rangka kawat. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Preparasi streptokinase

Streptokinase sediaan 1.500.000 IU dilarutkan dengan ringer laktat sampai 2 mL kemudian dihomogenkan (stok I). Diambil 1mL dari stok I dan dilarutkan dengan ringer laktat sampai 5 mL dengan kandungan 750.000IU (stok II).

Selanjutnya diambil 1mL dari stok II untuk dijadikan stok III dengan kandungan 150.000IU. Dosis injeksi per tikus, dari stok III diambil sejumlah 40 μ L sehingga mengandung 6000 IU kemudian ditambahkan ringer laktat sampai 100 μ L, diulang sejumlah tikus. Perhitungan dosis bisa dilihat pada **Lampiran 2**.

4.4.3 Induksi Streptokinase

Perlakuan pada tikus dilakukan pada hari pertama dengan injeksi streptokinase dengan dosis 6000IU yang sudah dilarutkan dalam ringer laktat sebanyak 60 mL secara intravena pada vena *coccygea dorsal* tikus kelompok B,C dan D. Injeksi streptokinase kedua dilakukan pada hari ke-6 pada kelompok perlakuan C dan D, terakhir pemaparan Streptokinase selanjutnya dilakukan pada hari ke-11 pada kelompok perlakuan D saja. Injeksi intravena dilakukan agar streptokinase yang masuk ke dalam ginjal tidak berkurang banyak. Injeksi intravena melalui vena *coccygea* dipilih karena merupakan jalur paling baik untuk induksi organ (Staszuk *et al.*, 2003).

4.4.4 Pengambilan Ginjal

Pengambilan ginjal pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Langkah awal yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan dengan posisi *dorsal recumbent* pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuat sayatan pada bagian abdomen kemudian ginjal dipotong dan diisolasi. Ginjal dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin dan dimasukkan dalam larutan formaldehide 10% untuk pembuatan preparat histopatologi.

4.4.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Ginjal yang direndam dalam larutan formaldehide 10%. Kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam, dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit dan etanol absolut selama 20 menit, langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya organ ginjal dipindahkan ke larutan xilol selama 20 menit sebanyak 2 kali. Parafin dicairkan pada suhu 60-63°C. Ginjal dimasukkan dalam parafin cair yang dituang ke dalam wadah selama 30 menit. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ ginjal berada dalam blok parafin. Langkah selanjutnya adalah proses pemotongan dengan ketebalan 5 μm . Irisan jaringan yang telah berbentuk pita kemudian ditempelkan pada gelas objek.

4.4.6 Pewarnaan Hematoksilin – Eosin

Pewarnaan Hematoksilin – Eosin dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru pada inti sel serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Preparat ginjal direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), dan aquadest secara berurutan, masing-masing direndam selama 5 menit. Preparat ginjal dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan

alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I, II dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup (Dewi, 2011). Preparat kemudian diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x. Hasil pengamatan difoto pada 5 bidang pandang.

4.4.7 Ekspresi IL-1 β dengan pewarnaan imunohistokimia

Preparat ginjal direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), dan aquadest secara berurutan, masing-masing direndam selama 5 menit. Dicuci dalam PBS selama 3x 5 menit. Ditetesi H₂O₂ 3% selama 20 menit, dicuci dengan PBS selama 3x 5 menit. Direndam dalam 5% BSA dalam PBS selama 30 menit dan dicuci dalam PBS selama 3x 5 menit. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti rat IL-1 β*) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x 5 menit. Berikutnya direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*) selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS selama 3x 5 menit. Ditambahkan *SA-HRP* selama 40 menit dan dicuci dengan PBS 3x 5menit. Substrat *DAB* ditambahkan dan inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS 3x 5menit. *Counterstaining* dilakukan dengan *Hematoxylen* selama 5 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan air, dikering anginkan dan terakhir *mounting* dengan entellan dan pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x. Hasil pengamatan kemudian difoto pada 5 bidang pandang. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan

software axiovision untuk mengamati peningkatan konsentrasi IL-1 β yang ditandai dengan peningkatan persentasi luas daerah yang terwarnai.

4.4.8 Analisis data

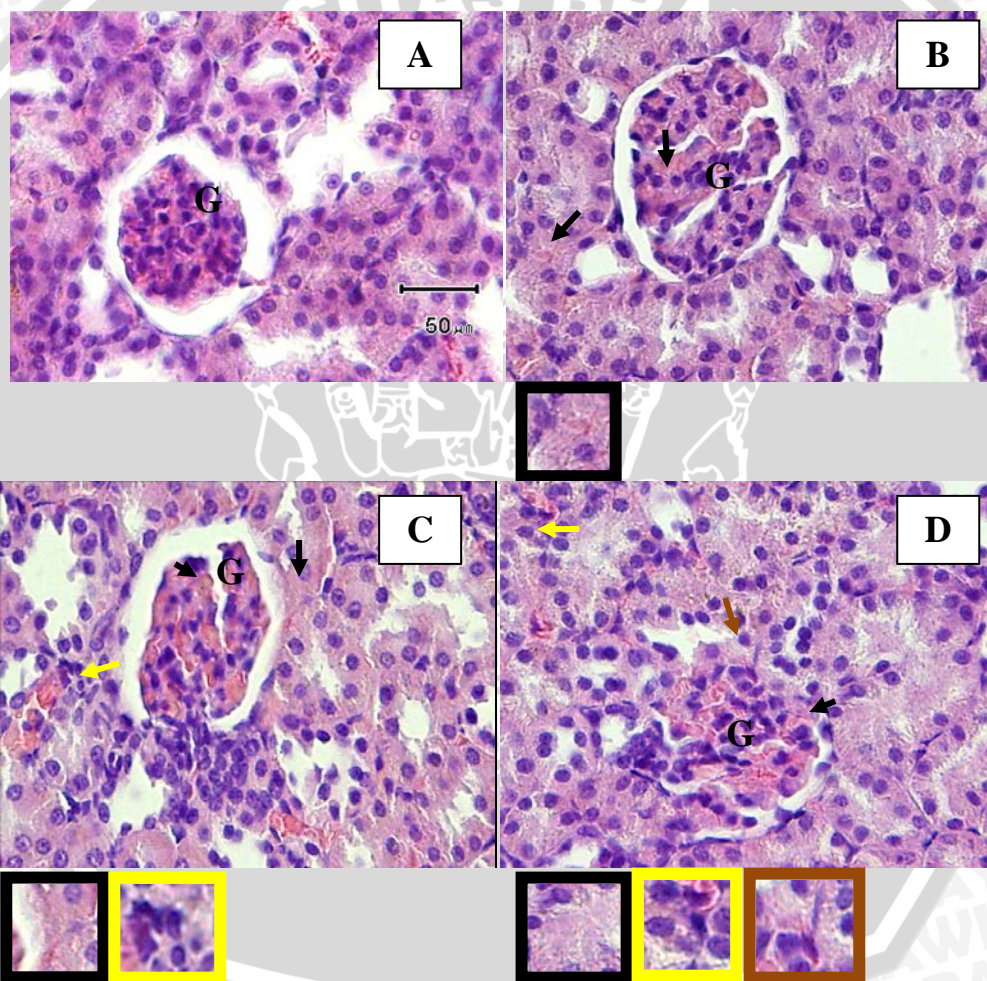
Hasil pengamatan histopatologi dianalisis secara deskriptif. Data ekspresi IL-1 β yang diperoleh dari software axiovision dianalisis dengan menggunakan analisis ragam ANOVA (*analysis of variance*) dan uji lanjutan BNJ (beda nyata jujur) (Kusriningrum, 2008). ANOVA dan BNJ digunakan untuk menguji apakah kadar IL-1 β pada tikus model yang diinduksi streptokinase meningkat secara nyata jika dibandingkan tikus kontrol.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Induksi Streptokinase Terhadap Histopatologi Ginjal

Induksi streptokinase pada tikus menimbulkan perubahan pada gambaran histopatologi ginjal. Kelompok yang diinduksi streptokinase menunjukkan adanya kerusakan jaringan dan fibrosis (gambar 5.1).



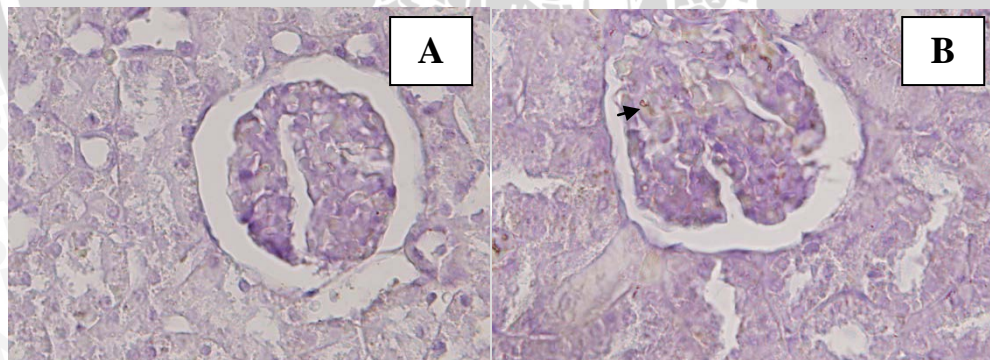
Gambar 5.1 Histopatologi ginjal tikus induksi streptokinase (Perbesaran 400x). Keterangan: A= kontrol; B= streptokinase dosis 6000 IU 1x; C= streptokinase dosis 6000 IU 2x; D= streptokinase dosis 6000 IU 3x. Keterangan: (G) glomerulus (↔)fibrosis/penumpukan ECM, (↔)atrofi tubulus, (↔) kerusakan lamina basalis

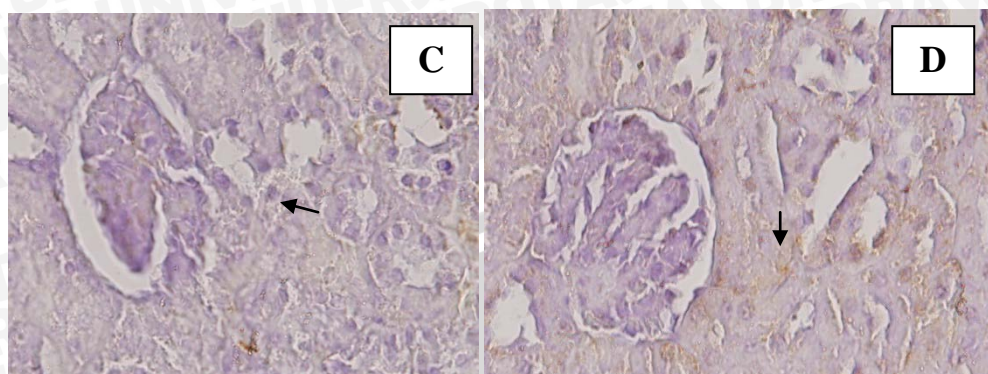
Kelompok A menunjukkan gambaran histologi ginjal normal. Pada kelompok A tidak ditemukan penumpukan ECM yang berlebihan pada jaringan. Struktur tubulus yang ada pada gambaran histopatologi kelompok A belum mengalami atrofi yang ditandai dengan lumen yang masih cukup besar dan epitel yang berbentuk kubus selapis. Glomerulus pada gambaran histologi kelompok A memiliki struktur yang masih kompak. Kapsula bowman di sekitar glomerulus juga masih terlihat jelas dan tidak rusak hal ini sesuai dengan Junquiera (2007) yang menyebutkan bahwa keadaan normal tubulus ditunjukkan dengan sel epitel kubus selapis dan lumen yang utuh, sedangkan glomerulus yang normal memiliki struktur yang lengkap dan kapsula bowman yang utuh. Gambaran histopatologi pada kelompok B yang diinduksi streptokinase dengan dosis 6000IU sebanyak 1 kali menunjukkan adanya fibrosis pada tubulus dan glomerulus yang ditandai dengan adanya penumpukan ECM. Kerusakan jaringan dapat terlihat pada beberapa bagian tubulus, tetapi atrofi tubulus belum terjadi. Glomerulus masih terlihat kompak tetapi sudah mengalami fibrosis. Pada kelompok C yang diinduksi streptokinase dengan dosis 6000IU sebanyak 2 kali, selain adanya fibrosis, atrofi tubulus dapat diamati pada beberapa tempat. Sel epitel pada tubulus terlihat mengalami perubahan. Fibrosis pada glomerulus sudah cukup luas tetapi belum bisa dikategorikan sebagai *glomerulosclerosis*. Kelompok D yang diinduksi streptokinase dengan dosis 6000IU sebanyak 3 kali memiliki tingkat keparahan yang cukup tinggi. Lamina basalis mengalami kerusakan, ditunjukkan dengan tidak adanya batas yang jelas antara glomerulus dengan tubulus. Fibrosis dan atrofi tubulus juga ditemukan pada gambaran histopatologi kelompok D.

Berdasarkan hasil pengamatan pada gambaran histopatologi, kelompok B, C dan D memiliki ciri-ciri dari jaringan ginjal yang mengalami fibrosis. Secara mikroskopis, yang bisa ditemui pada renal fibrosis adalah *glomerulosclerosis* dan *tubulointerstitial fibrosis* (Winbanks, 2006). *Glomerulosclerosis* belum terjadi secara jelas pada kelompok A, B dan C, tetapi pada kelompok B dan C sudah ada fibrosis yang terjadi dalam glomerulus. Fibrosis pada glomerulus kelompok B dan C belum dapat dikategorikan sebagai *glomerulosclerosis* karena secara struktur belum mengalami perubahan yang signifikan seperti banyaknya penebalan (*sclerosis*), kerusakan lamina basalis, dan mengecilnya *bowman interspace* (Schnaper, 2005). Ciri spesifik lain dari *glomerulosclerosis* dalam hal ini FSGS (*focal segmental glomerulosclerosis*) antara lain ditemukan satu glomerulus dengan lebih dari 50% bagian mengalami fibrosis untuk tipe perihilar, 25% untuk tipe *cellular*, kurang dari 50% dengan penempelan pada kapsula bowman untuk tipe *tip lesion*, kolaps secara global maupun segmental untuk tipe *collapse*, penumpukan jaringan fibrosis yang tidak merata dan kerusakan lamina basalis untuk tipe NOS (*not otherwise specific*). Fibrosis yang terjadi di dalam glomerulus Kelompok D mengalami FSGS tipe NOS karena lamina basalis mengalami kerusakan tetapi tidak ada penumpukan sel podosit (Arias, 2011). Pada FSGS NOS *variant*, ciri utama yang ada adalah hilangnya sebagian *glomerular lamina* karena fibrosis di dalam glomerulus dan rusaknya lamina basalis pada glomerulus. Ciri lain dari FSGS NOS adalah sering ditemukannya *tubulointerstitial fibrosis* pada jaringan yang sama (D'Agatti, 2003).

Selain *glomerulosclerosis*, renal fibrosis juga ditandai dengan *tubulointerstitial fibrosis*. Ciri *tubulointerstitial fibrosis* adalah *interstitial fibrosis* dan atrofi tubulus. Pada kelompok B, C dan D ditemukan *interstitial fibrosis* yang cukup banyak. *Interstitial fibrosis* ditandai dengan daerah interstisial yang lebih luas dari normalnya. Daerah interstisial ini akan menekan tubulus sehingga menyebabkan mengecilnya ukuran lumen tubulus (atrofi tubulus) (Winbanks, 2006). *Tubulointerstitial fibrosis* dipengaruhi beberapa faktor, antara lain penumpukan ECM, protease jaringan (*plasminogen activator*), inflamasi dan fibroblas (Zeisberg dan Neilson, 2010). Fibroblas yang ditemukan pada fibrosis berasal dari fibroblas laten dan epitel tubulus melalui proses EMT (Iwano *et al.*, 2002). Adanya EMT juga menunjukkan adanya peningkatan populasi sel penghasil ECM sehingga penumpukan ECM bisa terjadi (Lee dan Nelson, 2012).

5.2 Pengaruh induksi streptokinase terhadap ekspresi IL-1 β





Gambar 5.2 Gambaran immunohistokimia IL-1 β pada ginjal tikus induksi streptokinase, perbesaran 400x. Ket: (←) ekspresi IL-1 β

Ekspresi IL-1 β ditunjukkan oleh warna coklat pada preparat immunohistokimia yang merupakan hasil dari ikatan antibodi IL-1 β dengan antigen IL-1 β pada jaringan (Gambar 5.2). Luas area yang berwarna coklat pada preparat kemudian dihitung dengan axiovision sebagai persentase area. Persentase area merepresentasikan ekspresi IL-1 β pada preparat immunohistokimia. Berdasarkan Tabel 5.1, rata-rata persentase area pada kelompok yang diinduksi streptokinase lebih besar dibandingkan dengan kontrol. Persentase area berbanding lurus dengan pengulangan induksi.

Tabel 5.1 Persentase area hasil analisis axiovision dari preparat immunohistokimia IL-1 β

Kelompok	Mean \pm SD Ekspresi IL-1 β	Peningkatan Ekspresi IL-1 β terhadap kontrol
A (Kontrol)	2.407 \pm 0.441 ^a	0.00%
B (induksi 6000IU 1x)	5.969 \pm 0.310 ^b	147.97%
C (induksi 6000IU 2x)	7.688 \pm 0.395 ^c	219.38%
D (induksi 6000IU 3x)	12.204 \pm 0.374 ^d	406.96%

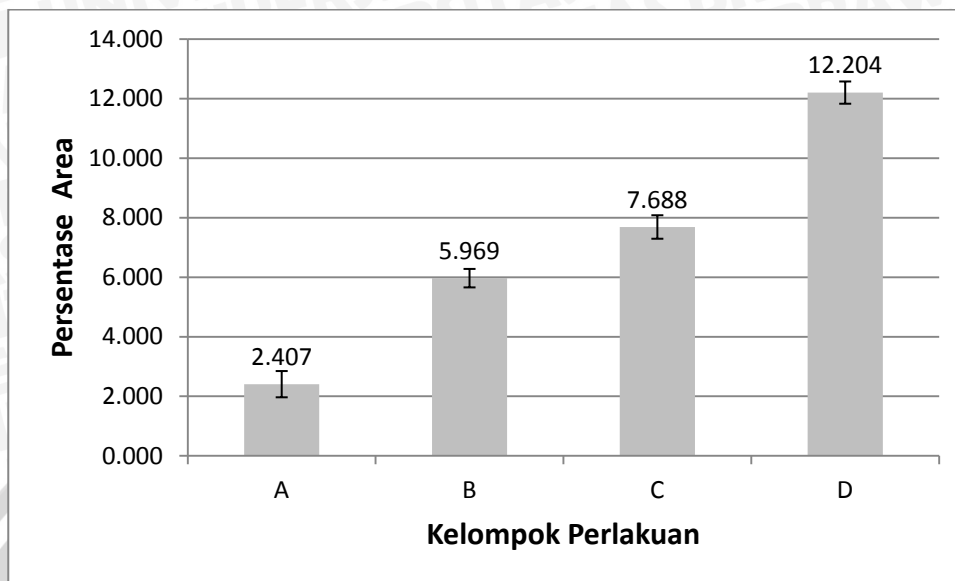
Keterangan: Notasi menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P<0,005)

Seperti ditunjukkan Tabel 5.1, rata-rata persentase area dari preparat immunohistokimia menunjukkan peningkatan pada kelompok perlakuan B, C dan D. Peningkatan persentase area menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-1 β .

Hasil analisis statistik dengan ANOVA dan uji lanjutan BNJ menunjukkan adanya peningkatan secara nyata ($p < 0.05$) pada kelompok pelakuan B, C dan D seperti ditunjukkan pada lampiran 4. Hal di atas menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-1 β yang signifikan pada ginjal tikus yang diinduksi streptokinase.

Peningkatan ekspresi IL-1 β yang signifikan pada ginjal tikus yang diinduksi streptokinase menunjukkan kemampuan streptokinase untuk menginduksi terjadinya inflamasi pada ginjal. Streptokinase menginduksi terjadinya inflamasi melalui plasmin. Plasminogen yang telah teraktivasi oleh streptokinase menjadi plasmin mengaktivasi bradikinin yang berfungsi sebagai mediator dalam proses inflamasi. Bradikinin berinteraksi dengan reseptor B1 pada makrofag. Interaksi ini kemudian menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-1 β (Bockmann and Pagelow, 2000). Pelepasan sitokin proinflamasi menyebabkan aktivasi sel inflamasi. Peningkatan dosis streptokinase menyebabkan peningkatan aktivasi plasminogen sehingga terjadi peningkatan kerusakan jaringan ginjal. Peningkatan kerusakan jaringan ginjal sehingga menyebabkan meningkatkan ekspresi IL-1 β . Berdasarkan Gambar 5.2, kelompok D dengan dosis induksi tertinggi memiliki tingkat persentase area paling tinggi dibandingkan kelompok lain.

Tingkat persentase area pada kelompok D adalah yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lain. Hal ini sesuai dengan tingkat kerusakan pada gambaran histopatologi kelompok D. Kerusakan yang teramati pada gambaran histopatologi dan tingkat persentase area menunjukkan korelasi. Histopatologi kelompok D memiliki kerusakan paling parah jika dibandingkan



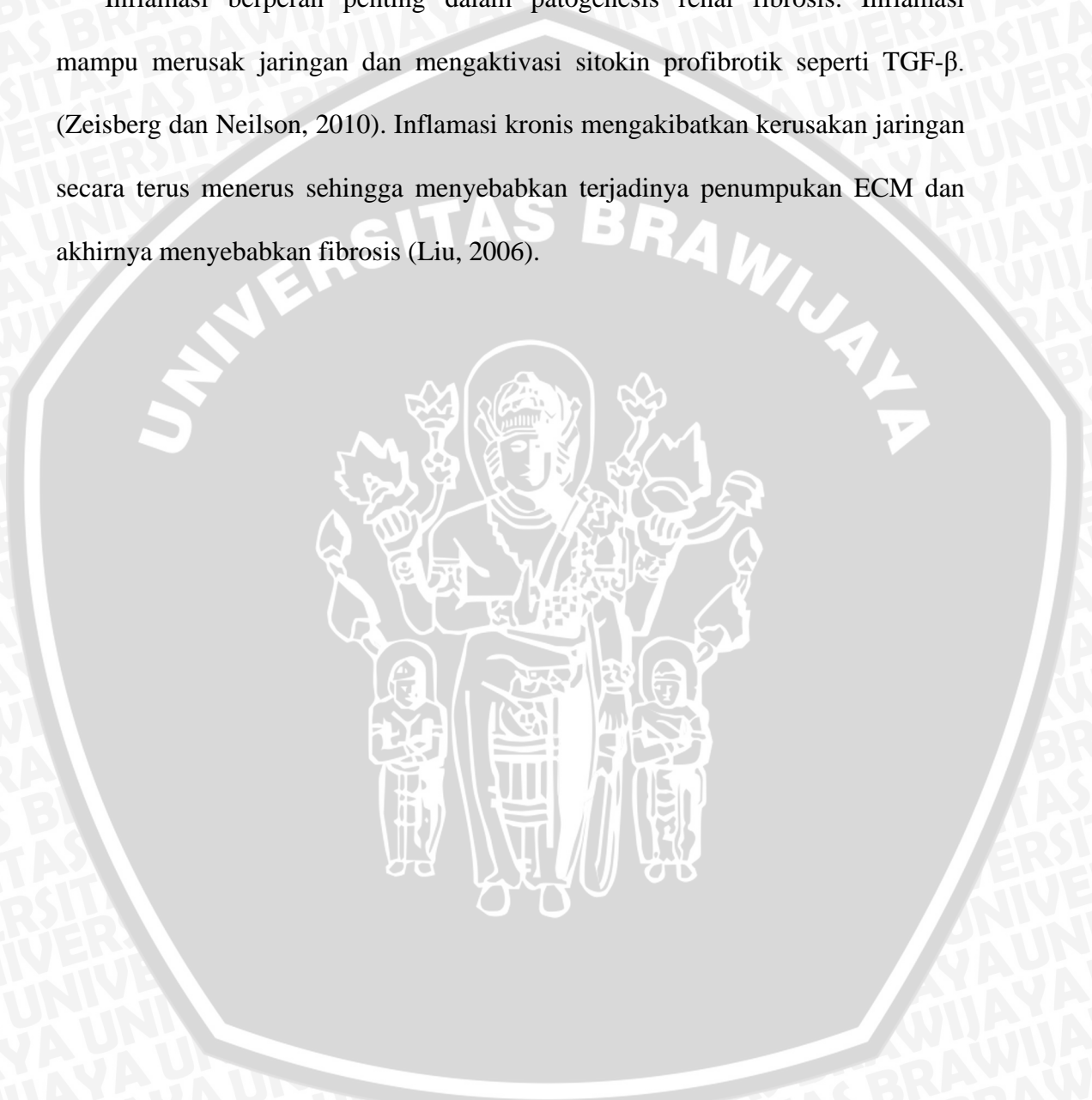
Gambar 5.2 Grafik persentase area ekspresi IL-1 β hasil analisis axiovision.

dengan kelompok lain, dan persentase area yang merepresentasikan ekspresi IL-1 β pada kelompok D menunjukkan rata-rata yang paling tinggi. Korelasi tersebut membuktikan adanya hubungan antara ekspresi IL-1 β dengan tingkat kerusakan pada histopatologi renal fibrosis. Semakin tinggi dosis streptokinase maka semakin tinggi tingkat keparahan kerusakan pada histopatologi renal fibrosis.

Peningkatan ekspresi IL-1 β juga menunjukkan adanya inflamasi yang terjadi pada jaringan karena perannya sebagai sitokin proinflamasi (Ren and Torres, 2009). Inflamasi biasa terjadi pada renal fibrosis dan ikut berperan dalam kerusakan jaringan dan stimulasi fibrosis. IL-1 β dan sitokin proinflamasi yang lain berperan penting dalam stimulasi inflamasi. Sitokin proinflamasi mengaktifasi leukosit seperti monosit dan PMN (*polimorfonuclear*) sehingga menimbulkan reaksi inflamasi (Cohen *et al.*, 2011). Adanya peningkatan IL-1 β

pada ginjal tikus yang diinduksi dengan streptokinase menunjukkan adanya inflamasi yang terjadi.

Inflamasi berperan penting dalam patogenesis renal fibrosis. Inflamasi mampu merusak jaringan dan mengaktivasi sitokin profibrotik seperti TGF- β . (Zeisberg dan Neilson, 2010). Inflamasi kronis mengakibatkan kerusakan jaringan secara terus menerus sehingga menyebabkan terjadinya penumpukan ECM dan akhirnya menyebabkan fibrosis (Liu, 2006).



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Induksi streptokinase pada tikus dengan dosis 6000IU dan kelompok induksi satu kali, dua kali dan tiga meningkatkan ekspresi IL-1 β yang menunjukkan adanya inflamasi. Induksi streptokinase sebanyak 3x dengan dosis 600IU menunjukkan ekspresi IL-1 β mengalami kenaikan yang paling tinggi.
2. Induksi streptokinase pada tikus dengan dosis 6000IU dan kelompok induksi satu kali, dua kali dan tiga menimbulkan kerusakan jaringan ginjal (glomerulus dan tubulus) pada gambaran histopatologi. Induksi streptokinase sebanyak 3x dengan dosis 600IU menunjukkan tingkat kerusakan ginjal paling parah.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan induksi streptokinase dengan metode lain dalam menghasilkan hewan model renal fibrosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Arias L. F. 2011. Morphologic patterns of focal and segmental glomerulosclerosis: controversial aspects and prognostic implications. *6th Congress of Nephrology in Internet* diakses dari <http://cin2011.uninet.edu/> pada Juli 2013
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Babashamsi M, M. H. Razavian and M. R. Nejadmoghaddam. 2009. Production and Purification of Streptokinase by Protected Affinity Chromatography. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2009 Apr-Jun; 1 (1): 47-51
- Balaguer J.M, C Yu, J.G. Byrne, S.K. Ball, M.R. Petracek, N.J. Brown and M Pretorius. 2012. Contribution of endogenous bradykinin to fibrinolysis, inflammation, and blood product transfusion following cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Apr;93(4):326-34.
- Böckmann S. and I. Paegelow. 2000. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 68 no. 5 587-592
- Botto, N. R Azoulay M Peuchmaur A. and El Ghoneimie. 2011 Renal Parenchymal Fibrosis and Atrophy are not Correlated With Upper Tract Dilatation: Long-Term Study of Partial Unilateral Ureteral Obstruction in Neonatal Mice. *Journal of Pediatric Urology* 7 310-312
- Boutet. A, C.A. De Frutos, P.H. Maxwell, M.J. Mayol, J. Romero and M.A. Nieto. 2006. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J*: 25 (2006), pp. 5603–5613
- Boxrud P. D, I. M. A. Verhamme, W. P. Fay and P. E. Bock. 2001. Enzyme Catalyst and Regulation: Streptokinase Triggers Conformational Activation of Plasminogen through Specific Interactions of the Amino-terminal Zymogen Conformation Sequence and Stabilizes the Active. *The Journal of Biological Chemistry*
- Calnek B. W. 1997. *Immunohistochemistry*. Ames : Jowa State University Press

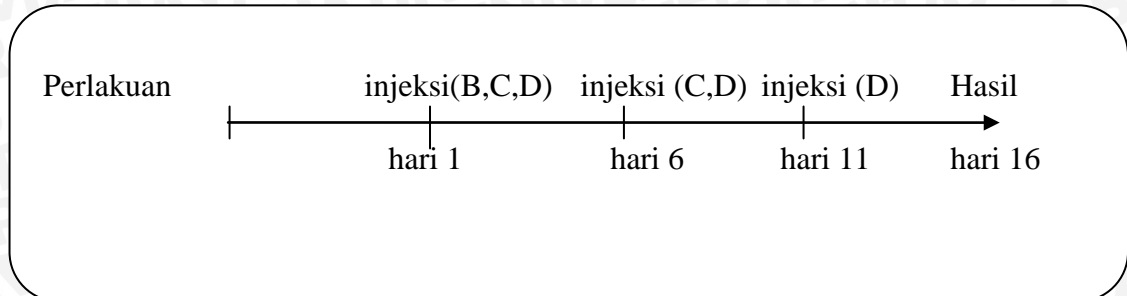
- Chatziantoniou, 2005. Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression?. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Aug; 289(2): F227-34.
- Cho, M. H. 2010. Renal Fibrosis. 2010. Daegu: Kyungpook National University School of Medicine. *Korean J Pediatr* Hal 735-740
- Dewi, S. 2011. *Fraksi Air Bunga Kecubung (Datura metel L.) Memicu Aktivitas Imunokompeten Subset Sel T Pada Mencit Balb/C Model Asma* [Skripsi] Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.
- Dinarelo C. A. 2006. Interleukin 1 And Interleukin 18 as Mediators Of Inflammation and The Aging Process. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb;83(2):447S-455S
- Feeser W and B.D. Freimark. 1992. *IL-1B*. Uniprot Protein Catalog. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q63264> diakses pada Mei 2013
- Fogo A. B., A. H. Cohen, J. C. Jennette, J. A. Bruijn and R. B. Colvin. 2011. *Fundamentals of Renal Pathology*. Springerlink
- Gao Y, L Luo and F He. 1999. Effect of IL-1 beta and TNF-alpha on the expression of monocyte chemotactic protein-1 in endometriotic cells. *J Tongji Med Univ*. 1999;19(3):212-4.
- Ghosh M, K. Pulicherla, V.P.B. Rekha, G. V. Rao and K. S. Rao. 2012. A Review On Successive Generations Of Streptokinase Based Thrombolytic agents. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences vol 4, suppl 3*
- Giraldo S, J. Sanchez, Q. Felty, and D. Roy. 2008. *IL1B (interleukin 1, beta)*. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematology*. diakses pada 2013 di <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/IL1BID40950ch2q13.html>
- Guo X. Q and C Nzerue. 2002. *How to Prevent, Recognize, and Treat Drug-Induced Nephrotoxicity*. Cleveland Clinical Journal of Medicine
- Hirschberg R. 2005. Wound Healing in the Kidney: Complex Interactions In Renal Interstitial Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 9–11.
- Hu K, W. M. Mars, and Y Liu. 2008. Novel Actions Of Tissue-Type Plasminogen Activator in Chronic Kidney Disease: A Paradigm Shift. *Front Bioscience*. 2008 May 1; 13: 5174–5186.

- Inomata N. 2012. *Recent Advances in Drug-Induced Angioedema*. Advances in Consensus, Pathogenesis and Treatment of Urticaria and Angioedema. *Allergology International*. 2012;61:545-557
- Ji Y. Y, H. Y. Chi, H. K. Jong and H. S. Jung. 2008. Effects of T Lymphocytes, Interleukin-1, and Interleukin-6 on Renal Fibrosis in Canine End-Stage Renal Disease. *J VET Diagn Invest* 2008 20: 585. Diakses di <http://vdi.sagepub.com/> pada 2013
- Junqueira L. C. 2007. *Basic Histology Text and Atlas*. The McGraw-Hill Companies.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lefebvre S. 2011. *Literature Review – Epidemiology of Feline Chronic Kidney Disease*. Banfield Applied Research and Knowledge (BARK) Team
- Liu, Y. 2004. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1–12, 2004
- Liu, Y. 2006. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213–217, 2006
- Lonnemann G, L. Siwiro, G. Engler-Blum, G. A. Muller, K.M. Koch, and C. A. Dinarello. 1995. Cytokines In Human Renal Interstitial Fibrosis. I. Interleukin-1 is A Paracrine Growth Factor For Cultured Fibrosis-Derived Kidney Fibroblasts. *Kidney International*, Vol. 47 (1995), pp. 837—844
- Luo, D. D, C. Fielding, A. Phillips and D. Fraser. 2009. Interleukin-1 Beta Regulates Proximal Tubular Cell Transforming Growth Factor Beta-1 Signalling. *Nephrol Dial Transplant* hal. 2655-2665
- Oldfield M.D, L.A. Bach, J.M. Forbes, D. Nikolic-Paterson, A. McRobert and Thallas V. 2001. Advanced Glycation End Products Cause Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation Via The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *J Clin Invest* 2001;108:1853-63
- Pardede, S. O. 2009. *Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pasca streptokokus*. Jakarta: Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM.

- Pinzani, M. 2008. *Fibrogenesis Tissue Repair*. Biomedcentral
- Ren K and R. Torres. 2009. *Role of interleukin-1beta during pain and inflammation*. Department of Neural and Pain Sciences, Dental School & Program in Neuroscience, University of Maryland
- Schnaper H. W. 2005. *Renal Fibrosis*. Fibrosis Research: Methods and Protocols hal. 117
- Schuster N and K. Kriegstein. 2002. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002;307:1-14.
- Sihombing, M dan S Tuminah. 2011. Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal Veteriner vol. 12 No. 1: 58-64*.
- Staszyk, C, W. Bohnet, H. Gasse and H. Hackbarth. 2003. *Blood Vessels of the Rat Tail: A Histological Re-Examination With Respect to Blood Vessel Puncture Methods*. School of Veterinary Medicine, Hannover
- Sulyok E. 2004. *Acute Proliferative Glomerulonephritis*. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P. Pediatric nephrology. Edisi ke-5. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.h.601-13.
- Winbanks C. E.2006. *Novel Aspects of Renal Tubulointerstitial Fibrosis*. School of Medical Sciences RMIT University
- Zheng, G and David C.H. Harris. 2004. Plasmin in Renal Interstitial Fibrosis: Innocent or Guilty?. *Kidney International, Vol. 66 (2004), pp. 455-456*

Lampiran 1. Konsep Penelitian

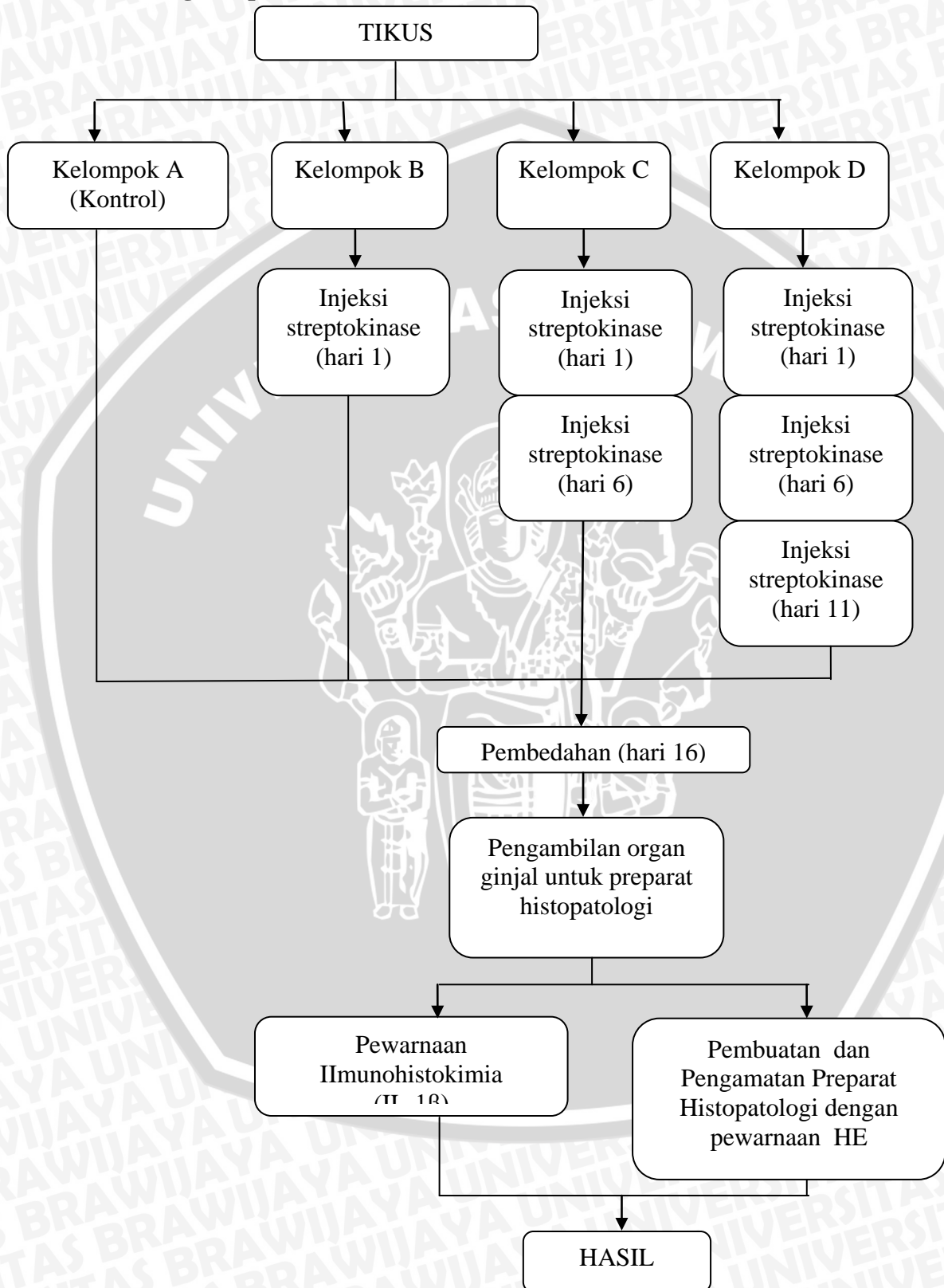
1. Rancangan Perlakuan



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 *Interleukin 1 beta* (IL-1 β) dan gambaran Histopatologi ginjal.

2. Kerangka Operasional



Lampiran 2. Pembuatan Larutan

1. Pembuatan larutan phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_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 dihomogenkan 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. Pembuatan PBS-Azida

Diambil 200 ml larutan PBS dengan pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. Kemudian ditambah 8 tetes larutan azida 1 % (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirrer.

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.

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.

5. Pembuatan Larutan Streptokinase

Streptokinase sebanyak 1.500.000 IU ditambahkan larutan ringer laktat sebanyak 2 mL dan dihomogengkan 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 dihomogengkan lagi dengan menggunakan vortex. Diambil 1 mL dari larutan akhir yang mengandung 150.000 IU. Untuk menyiapkan larutan streptokinase dengan dosis 6000 IU per ekor tikus dikonversikan dalam perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Streptokinase yang diberikan} = \text{streptokinase (IU)} \sim \text{isi larutan (mL)}$$

$$= \text{Dosis} / \text{streptokinase yg diberikan}$$

$$\text{Streptokinase yang diberikan} = 750.000 \text{ IU} \sim 5 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

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

$$= 40 \mu\text{l}$$

$$\text{Optimasi dosis S1} = 150.000 \text{ IU} \sim 1 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

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

$$= 40 \mu\text{l}$$

$$\text{Optimasi dosis S2} = 150.000 \text{ IU} \sim 1 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= 4000 \text{ IU} / 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= 26 \mu\text{l}$$

$$\text{Optimasi dosis S3} = 150.000 \text{ IU} \sim 1 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= 2000 \text{ IU} / 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= 13 \mu\text{l}$$

Lampiran 3 Diagram Alir Penelitian

1. Pengambilan organ pada hewan coba

Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dibunuh dengan cara dislokasi leher
- Diletakkan diatas nampan bedah
- Ditata pada posisi ventral diatas
- Dibelah dari bagian bawah perut hingga rongga perut terbuka

Ginjal

- Bersihkan dengan NaCl Fisiologis
- Direndam dalam PBS pH 7,4
- Disimpan dalam PFA 4%

Ginjal bersih

2. Ginjal bersih **alat untuk pemeriksaan histologis**

2.1 Embedding Ginjal

Ginjal dalm PFA 10%

- Diambil dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dimasukkan kedalam etanol 80% selama 2 jam
- Dimasukkan kedalam etanol 90% selama 20 menit
- Dimasukkan kedalam etanol 95% selama 20 menit diulang 3 kali

Ginjal hasil dehidrasi dengan etanol

- Didinginkan selama 20 menit sebanyak 2 kali pada suhu ruang
- Dimasukkan kedalam larutan xilol selama 30 menit pada suhu 60 – 63°C
- Dicelupkan dalam parafin cair
- Embedding blok parafin
- Didinginkan pada suhu 4°C

Ginjal dalam blok parafin

Ginjal dalam blok

- Didinginkan pada suhu ruang
- Dimasukkan kedalam 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

Ginjal hasil dehidrasi dengan etanol

Preparat

- Didinginkan dengan xilol selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan kedalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan kedalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) selama 5 menit lalu direndam dalam aquades
- Diwarnai dengan Hematoxylen 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 kedalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 10 menit
- Dimasukkan kedalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan kedalam xilol selama 5 menit (2 kali)
- Dikering anginkan
- Dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup cover glass

Preparat HE

2.4 Metode Imunohistokimia (IL-1 β)

Preparat ginjal

Xylol I, Xylol II, Alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), Aquadest (1x5 menit)

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

3% Hidrogen Peroksida (dalam dionize water) 20 menit

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5% dalam PBS, 30 menit

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

(1:100) Antibodi Primer (Anti IL-1 β), semalam suhu 4°C (diencerkan dalam 1% BSA dalam PBS)

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

Antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti rabbit IgG biotin labeled*) 1 jam suhu ruang

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

SA-HRP (Strepta avidin-Horseradish Peroxidase) 30-60 menit suhu ruang

Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 10-20 menit suhu ruang

D

Counter stam (Hematoxylen-Eosin) 5 menit suhu ruang

Dicuci aquades selama 3x5 menit

Mounting dengan entellan

Pengamatan dibawah mikroskop

Lampiran 4 Data Hasil dan Uji Statistik Ekspresi IL-1 β

1. Persentase area hasil analisis axiovision dari preparat immunohistokimia IL-1 β

Kelompok	Mean \pm SD Ekspresi IL-1 β	Peningkatan Ekspresi IL-1 β terhadap kontrol
A (Kontrol)	2.407 \pm 0.441 ^a	0.00%
B (induksi 6000IU 1x)	5.969 \pm 0.310 ^b	147.97%
C (induksi 6000IU 2x)	7.688 \pm 0.395 ^c	219.38%
D (induksi 6000IU 3x)	12.204 \pm 0.374 ^d	406.96%

2. Uji ANOVA

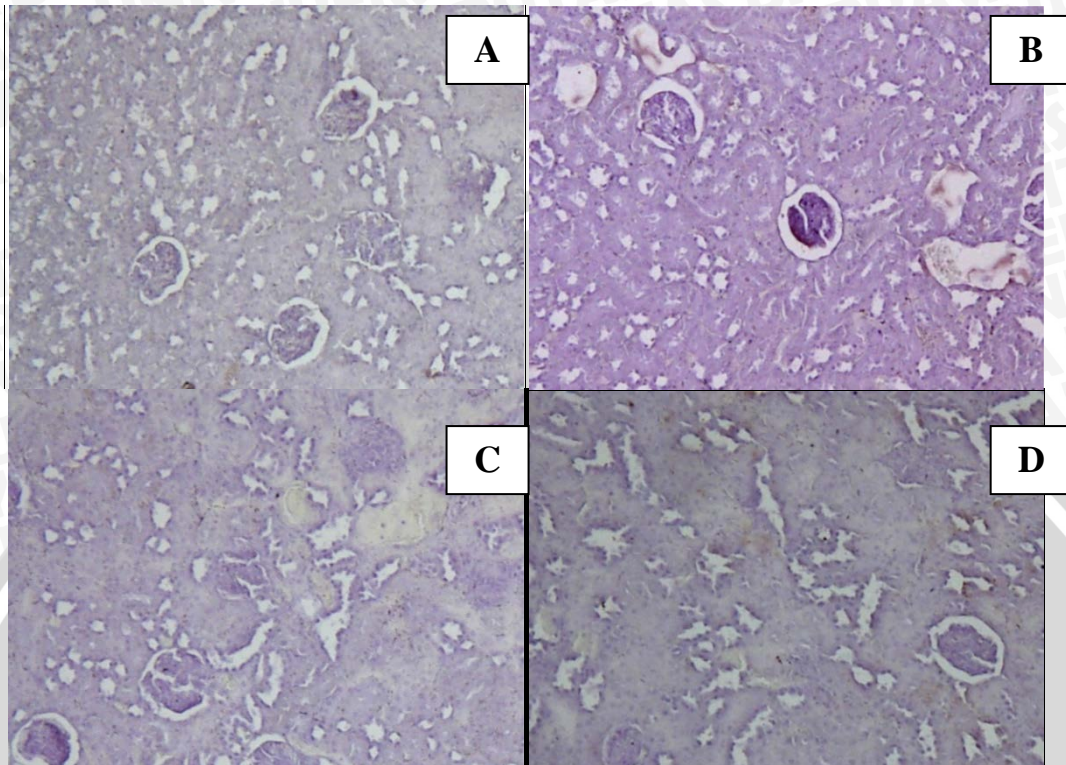
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	248.447	3	82.816	565.164	.000
Within Groups	2.345	16	.147		
Total	250.791	19			

3. Uji lanjutan BNJ

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	5	2.40719			
2	5		5.96907		
3	5			7.68813	
4	5				12.20356
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

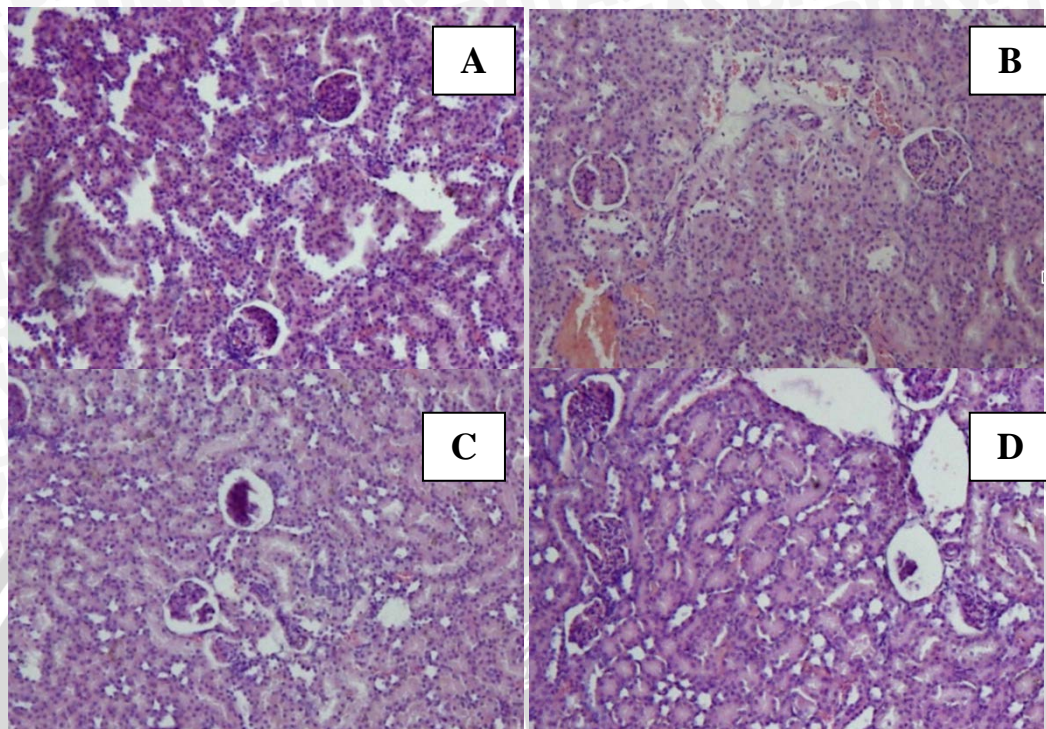
Lampiran 5 Gambaran Immunohistokimia Ekspresi IL-1 β



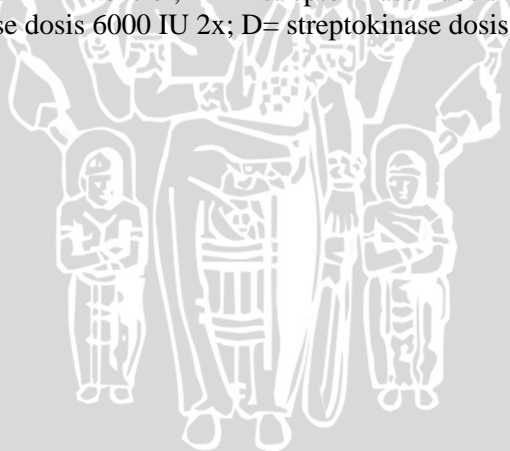


Gambar 5. Gambaran immunohistologi ekspresi Il-1 β (Perbesaran 100x).
 Keterangan: A= kontrol; B= streptokinase dosis 6000 IU 1x; C= streptokinase dosis 6000 IU 2x; D= streptokinase dosis 6000 IU 3x.

Lampiran 6 Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus



Gambar 6. Gambaran Histopatologi ginjal tikus (Perbesaran 100x).
 Keterangan: A= kontrol; B= streptokinase dosis 6000 IU 1x; C= streptokinase dosis 6000 IU 2x; D= streptokinase dosis 6000 IU 3x.



Lampiran 7. 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

