

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis ginjal merupakan hilangnya fungsi ginjal karena terdapat akumulasi fibroblas dan matriks protein pada jaringan ginjal (Liu, 2006). Kerusakan pada fibrosis ginjal secara langsung maupun tidak langsung terjadi melalui stres oksidatif dan dipicu berbagai macam molekul efektor respon seluler seperti: apoptosis, proliferasi limfosit atau makrofag, aktivasi fibroblas, perubahan fenotipik menjadi miofibroblas, *epithel mesenchymal transition* (EMT) dan peningkatan matriks ekstra seluler (Liu, 2005). Fibrosis ginjal merupakan gejala awal *chronic kidney disease* (CKD) yang berkembang menjadi *end-stage renal disease* (ESRD).

Angka prevalensi CKD pada hewan peliharaan cenderung meningkat setiap tahunnya. Pada tahun 2006 mencapai 0,8% kemudian terus meningkat menjadi 1.6% dari 5.496 kasus pada 2010 yang dilaporkan oleh Banfield Pet Hospital di Amerika Serikat. Perubahan permanen yang terjadi pada CKD bersifat *irreversible* sehingga penanganan yang dilakukan bertujuan untuk mengurangi laju filtrasi pada bagian ginjal yang masih berfungsi, mengurangi gejala klinis dan memperlambat laju penyakit. Penanganan yang dapat dilakukan pada ESRD hanya transplantasi dan euthanasia pada hewan (Sebekova *et al.*, 2007).

Penggunaan jangka panjang obat streptokinase dapat menyebabkan fibrosis ginjal. Streptokinase merupakan agen trombolitik yang sering digunakan dalam dunia medis untuk penanganan penyakit arterial thromboembolism (Moore *et al.*,

2007). Streptokinase adalah protein ekstraseluler yang dihasilkan dari bakteri *streptococcus sp.* Streptokinase mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin akan mengaktifasi kaskade komplemen, dan memecah protein matriks ekstraseluler sehingga menyebabkan inflamasi dan meningkatkan produksi radikal bebas (Pardede, 2009). Peningkatan jumlah radikal bebas menghasilkan stres oksidatif sehingga mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel akibat reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut menghasilkan hasil akhir berupa *malondialdehid* (MDA) (Mudassir dkk., 2012). Dengan demikian, MDA dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh. Tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas (Shirpoor *et al.*, 2007).

Aktivitas radikal bebas dapat diturunkan dengan antioksidan. Salah satu sumber antioksidan adalah vitamin E. Vitamin E adalah vitamin yang larut dalam lemak dan berfungsi sebagai antioksidan alami yang membuang radikal bebas dan molekul oksigen. Fungsi vitamin E sebagai antioksidan akan menghambat proses *reactive oksigen spesies* (ROS) dengan cara menurunkan kadar stress oksidatif dan menghambat proses terbentuknya peroksidasi lipid yang menghambat proses radikal bebas sehingga menghambat proses terbentuknya PUFA (Kamiensky, 2006). Mekanisme kerja vitamin E yaitu sebagai donor ion hidrogen yang mampu merubah radikal peroksil (hasil peroksida lipid) menjadi radikal *tokoferol* yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Wati, 2013). Penelitian juga membuktikan bahwa vitamin E berfungsi melindungi senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi, antara lain ikatan rangkap dua pada UFA

(Unsaturated Fatty Acid), DNA dan RNA dan ikatan atau gugus – SH (sulfhidril) pada protein (Slattery, 2005). Sehingga pada penelitian ini dipelajari terapi vitamin E pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal dengan melakukan pengukuran kadar *malondialdehid* (MDA) dan melihat gambaran histopatologi tubulus ginjal.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah terapi Vitamin E dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase ?
2. Apakah terapi Vitamin E memperbaiki gambaran histopatologi tubulus ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase?

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 *strain* Wistar dengan umur 10 minggu dan berat antara 120-170 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dengan No. 254 oleh Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya.
2. Induksi fibrosis ginjal dilakukan dengan injeksi streptokinase yang diinduksikan secara intravena pada vena *coccygea* dengan dosis 1x

6000IU/ekor, 2x 6000 IU/ekor dan 3x 6000 IU/ekor dalam interval pemberian 5 hari.

3. Vitamin E yang digunakan adalah α - tokoferol (sigma) diberikan dengan cara disonde dengan dosis terapi 200mg/ kg, 300mg/ kg dan 400 mg/ kg selama 11 kali dengan selang waktu 1 hari.
4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah kadar *malondialdehid* (MDA) dan gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Haematoksilin Eosin (HE) setelah dilakukan terapi vitamin E.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa pemberian vitamin E mampu menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.
2. Membuktikan bahwa vitamin E memperbaiki gambaran histopatologi tubulus ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai bahan informasi mengenai pengaruh pemberian vitamin E terhadap fibrosis ginjal pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi streptokinase berdasarkan kadar *malondialdehid* (MDA) dan gambaran histopatologi tubulus ginjal.

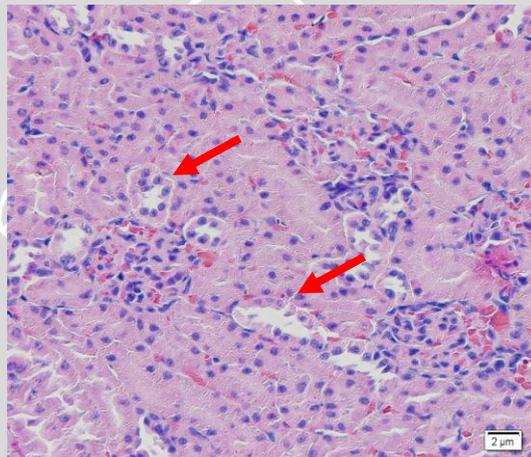
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fibrosis Ginjal

Fibrosis terjadi karena adanya respon tubuh berupa penyembuhan dan perbaikan terhadap trauma (Boor, 2011). Fibrosis ginjal adalah kegagalan dari respon penyembuhan dan perbaikan karena trauma kronis pada ginjal. Fibrosis ginjal merupakan proses terbentuknya CKD (*chronic kidney disease*) yang berkembang menjadi fase ESRD (*end stage renal disease*) (Liu, 2006). Fibrosis ginjal merupakan penyakit ginjal yang ditandai dengan adanya glomerulosklerosis dan jaringan fibrosa pada organ ginjal. *Chronic kidney disease* merupakan salah satu penyakit utama yang menyebabkan kematian pada kucing geriatrik. *Chronic kidney disease* sering terjadi pada kucing ras Maine Coon, Abyssinian, Siamese, Russian Blue dan Burmese dengan jenis kelamin jantan (Reynolds, 2010).

Diagnosa CKD yang ditemukan pada kucing sering terlambat dimana penyakit sudah mengalami invansif menuju ESRD. Penanganan CKD yang sudah mengalami invansif menjadi ESRD sangat sulit dilakukan dimana penanganan hanya dapat dilakukan dengan *euthanasia*. Mengingat sulitnya penanganan CKD maka diperlukan tindakan pencegahan maupun deteksi dini terhadap kejadian CKD yang dapat dilakukan pada tahap fibrosis ginjal (Roudebush *et al.*, 2009). Pada fibrosis ginjal ada 2 fase kerusakan ginjal yaitu fase *reversible* dan fase *irreversible*. Pada fase *reversible* fungsi ginjal masih dapat kembali ke keadaan normal. Sedangkan pada fase *irreversible* organ ginjal telah mengalami fibrosis sehingga ginjal tidak dapat kembali ke kondisi normal (Zhang, 2008; Fogo, 2007).

Secara mikroskopik ginjal tersusun atas nefron yang merupakan unit fungsional. Setiap nefron pada ginjal berawal dari berkas kapiler yang disebut glomerulus, tiap tubulus ginjal dan glomerulusnya membentuk satu kesatuan, nefron terdiri dari dua bagian, yaitu korpus renalis dimana plasma darah difiltrasi dan tubulus renalis yang mengabsorpsi dan mensekresi cairan yang lewat. Pada histologi ginjal yang bisa diamati dari ginjal antara lain glomerulus dan tubulus-tubulus (Dellman and Eurell, 2006).



Gambar 2.1 Gambaran histologi ginjal normal (400x).
Keterangan: (➡) Tubulus normal (Agnes *et al.*, 2013).

Pada gambaran histologi tubulus ginjal normal susunan sel epitel dan membran basalis nampak tidak mengalami kerusakan (Gambar 2.1). Inti sel tubulus ginjal juga terlihat jelas dan normal. Sel-sel pada tubulus ginjal terlihat kompak dan teratur. Tidak terlihat adanya sel radang dan penumpukan EMT (*epithel mesenchymal transition*). Proses terjadinya fibrosis ginjal diawali dengan aktivasi plasminogen menjadi plasmin oleh streptokinase diikuti oleh aktivasi komplemen, pengendapan kompleks antigen-antibodi dalam glomerulus (Pardede,

2009). Adanya kompleks antigen antibodi mengakibatkan terjadinya inflamasi pada glomerulus diikuti dengan kerusakan pada sel epitel tubulus dan rekrutmen sel sel inflamasi. Sel proinflamasi seperti makrofag menghasilkan sitokin yang diproduksi lokal di jaringan ginjal dapat menyebabkan berbagai reaksi, seperti produksi kemokin, akumulasi matriks ekstraseluler, ekspresi *adhesion molecules* dan produksi komplemen (Gerritsma, 2006). Proses ini meliputi aktivasi sel ginjal, yang kemudian meningkatkan produksi dan sekresi sitokin proinflamatori. Adanya gradien kemotaksis sitokin memberikan signal untuk mengarahkan infiltrasi monosit atau makrofag dan sel T menuju jaringan yang rusak. Pada jaringan yang rusak sel inflamatori menjadi aktif dan memproduksi molekul luka seperti *reaktif oksigen spesies* (ROS) sel fibrogenik dan sitokin inflamatori (Kalluri, 2003).

Reaktif oksigen spesies merupakan radikal bebas yang berasal dari oksigen. Beberapa contohnya yaitu radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^+) dan radikal hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal bebas adalah substansi yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Di dalam tubuh, ROS secara konstan diproduksi dan dieliminasi selama sel masih memiliki pertahanan endogen melawan zat oksidan tersebut. Kadar ROS yang rendah berperan dalam fisiologi *signaling* antar sel secara normal atau untuk memelihara homeostasis. Kadar ROS yang berlebihan akan menimbulkan stress oksidatif sehingga, mengakibatkan terjadinya beberapa kelainan patologis (Reynold *et al.*, 2005). Peningkatan aktivitas ROS pada kerusakan ginjal ditandai oleh glomerulosklerosis, atrofi tubulus dan fibrosis interstisial (white *et al.*, 2000).

Stres oksidasi menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap lemak, protein, dan DNA. *Reaktif oksigen spesies* dapat memicu proses peroksidasi terhadap lipid. Peroksidasi terhadap lipid dalam membran sel akan sangat mengganggu fungsi membran, menimbulkan kerusakan membran sel terhadap fluiditas dan elastisitas membran yang menyebabkan ruptur membran sel (Szocs, 2004). Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) pada membran sel yang menghasilkan radikal peroksida-lipid hidroperoksida dan produk aldehida, misalnya *malondialdehid* (MDA) (Hirschberg, 2005).

2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Penggunaan tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba model fibrosis ginjal telah dilaporkan sebelumnya oleh Borgeson et al., (2011), Alvarino (2012) dan Wati dkk (2013) dengan menggunakan *benzo-lipoxin A4*, *valsatran* dan *Cyclosporine-A*. Studi mekanisme fibrosis ginjal dan perbaikan fungsi ginjal dengan melakukan obstruksi ureter unilateral. Obstruksi ureter unilateral pada tikus menyebabkan berkurangnya aliran darah ginjal dan laju filtrasi glomerulus, hidronefrosis, inflamasi interstisial, dan fibrosis yang menggambarkan infiltrasi makrofag, kematian sel tubular, aktivasi fibroblast dan kemungkinan transisi fenotipik sel ginjal yang merupakan karakteristik terjadinya fibrosis ginjal (Klahr et al., 2002).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan karena mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang cepat dan memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada

manusia (Sihombing, 2011). Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa keunggulan, antara lain: penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih, tenang dan mudah ditangani di laboratorium dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Miller *et al.*, 2010).

Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers dan Armitage (2004) serta Besselen (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar

Rattus norvegicus memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm (Myers dan Armitage, 2004), bobot jantan dewasa berkisar 450-520 gram dan betina 250-300 gram. Tikus disapih hingga usia 21 hari dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Besselen, 2004).

2.3 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi

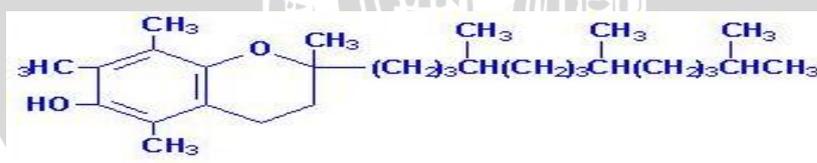
tersebut terjadi secara berantai, hasil akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehid yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya. MDA merupakan produk hasil pemutusan secara endoperoksida pada sedikitnya tiga ikatan ganda asam lemak tak jenuh (Sutari, 2013). Menurut Shirpoor *et al.*, (2007) MDA memiliki berat molekul rendah, bersifat toksik terhadap sel hidup terutama sebagai inisiator penyebab kanker dan mutagenesis. Kadar malondialdehida digunakan sebagai indikator untuk mencerminkan stres oksidatif, ekspresi *nuclear factor* (NF) dan kerusakan sel membran, yang menunjukkan tingkat stress oksidatif. Menurut Sharma *et al.*, (2003) MDA berperan dalam menaikkan permeabilitas vaskuler, kemotaksis leukosit, dan mengubah sintesis prostaglandin serta pelepasan histamine sehingga menimbulkan inflamasi.

Metode pengukuran kadar MDA di dalam jaringan pada umumnya dapat ditentukan dengan menggunakan metode *thiobarbituric Acid* (TBA) (Edyson, 2003). Pembentukan MDA-TBA terjadi melalui proses nukleofilik yang melibatkan karbon-5 dari TBA dan karbon-1 dari MDA diikuti dengan dehidrasi dan reaksi yang sama dengan molekul TBA yang kedua menghasilkan warna merah muda. Intensitas warna merah muda yang terbentuk dari kondensasi MDA-TBA mengindikasikan besarnya peroksidasi lipid (Edyson, 2003).

2.4 Vitamin E

Vitamin E ditemukan pada tahun 1922, oleh Evans dan Bishop, dengan istilah tokoferol (dari bahasa Yunani, *tocos* berarti kelahiran anak dan *phero*

berarti mengasuh). Vitamin E adalah nama umum untuk semua metil-tokol, jadi istilah *tokoferol* bukan sinonim dari vitamin E, namun pada praktek sehari-hari, kedua istilah tersebut disinonimkan. *Tokoferol* terdiri atas struktur cincin 6-kromanol dengan rantai samping jenuh panjang 16 karbon fitol. Perbedaan antar jenis *tokoferol* terletak pada jumlah dan posisi gugus metil pada struktur cincin. *Tokotrienol* mempunyai tiga ikatan rangkap pada rantai samping. Perbedaan struktur ini mempengaruhi tingkat aktivitas vitamin E secara biologik. *Tokotrienol* tidak banyak terdapat di alam dan kurang aktif secara biologik (Kamiensky, 2006). α -*tokoferol* adalah bentuk vitamin E paling aktif, yang digunakan pula sebagai standar pengukuran vitamin E dalam makanan. Jumlah Vitamin E dalam bentuk lain dinyatakan dalam bentuk *tokoferol ekuivalen* (TE). Bentuk sintetik vitamin E mempunyai aktivitas biologik 50% daripada α -*tokoferol* yang terdapat di alam (Edyson, 2003). Struktur kimia α -*tokoferol* diperlihatkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia α -*tokoferol* (Edyson, 2003).

Vitamin E adalah vitamin yang larut dalam lemak dan dapat melindungi jantung, arteri, dan komponen selular untuk tetap melakukan oksidasi dan mencegah lisis sel darah merah. Vitamin E juga berfungsi mencegah penyakit hati, mengurangi kelelahan, membantu memperlambat penuaan karena vitamin E

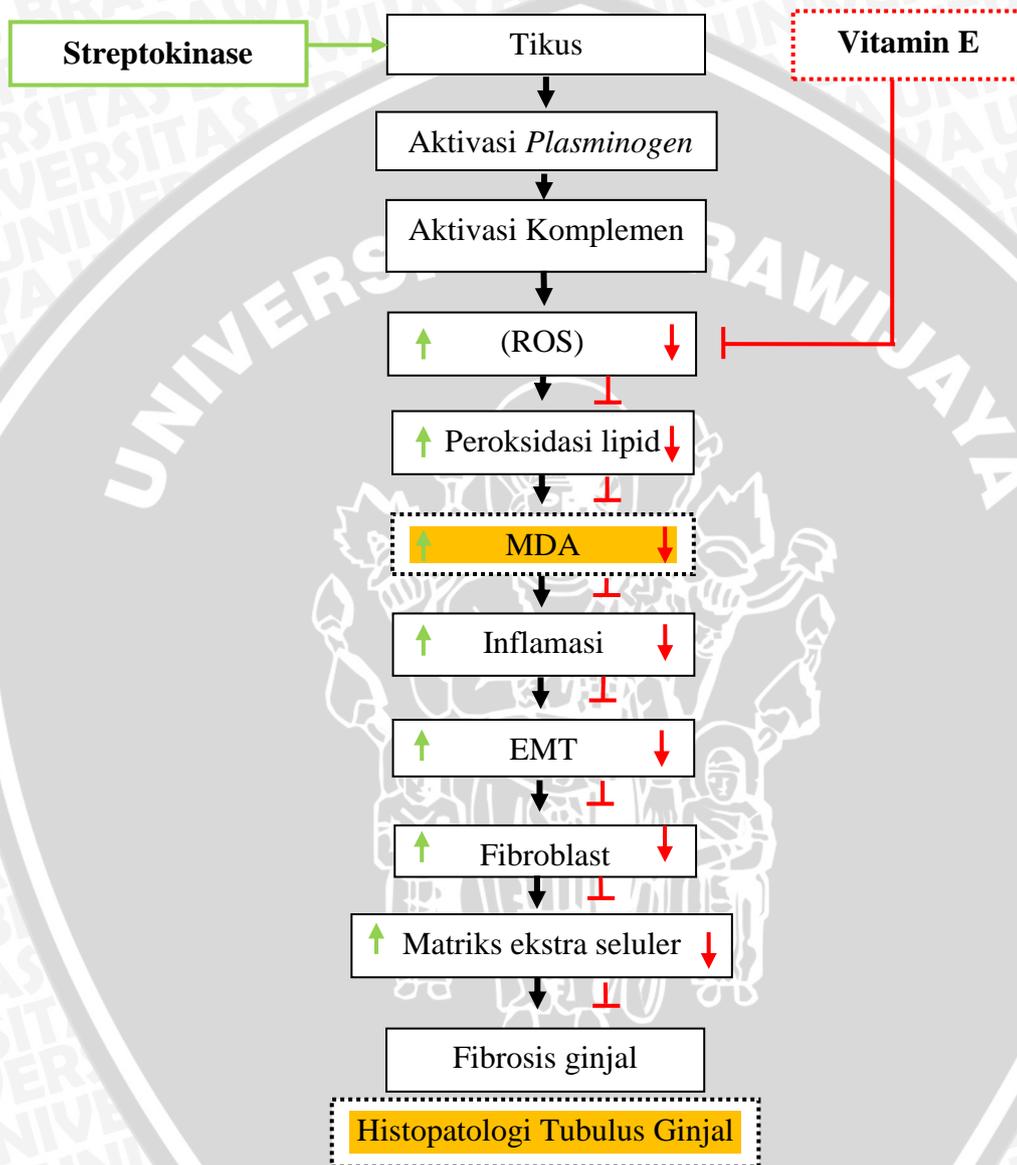
berperan dalam suplai oksigen ke darah sampai dengan ke seluruh organ tubuh. Vitamin E melindungi asam lemak tak jenuh pada membrane fosfolipid. Vitamin E juga menguatkan dinding pembuluh kapiler darah dan mencegah kerusakan sel darah merah akibat racun. Vitamin E diabsorpsi di saluran pencernaan dan disimpan di seluruh jaringan, terutama liver, otot, dan jaringan lemak. Di dalam hati α -tokoferol diikat oleh α -TPP (α -tokoferol transfer protein). Tujuh puluh lima persen dari jumlah vitamin E diekskresi di empedu dan sisanya melalui urin setelah diubah lebih dahulu menjadi asam *tokoferonat* dan *tokoferonalakton* yang dapat berkonjugasi dengan *glukoronat* (Dewoto, 2007).

Radikal peroksil bereaksi 1000 kali lebih cepat dengan vitamin E daripada dengan asam lemak tak jenuh dan membentuk radikal *tokoferoksil*. Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi melindungi senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi, antara lain ikatan rangkap dua pada UFA (*Unsaturated Fatty Acid*), DNA dan RNA dan ikatan atau gugus –SH (*sulphidril*) pada protein. Apabila senyawa-senyawa tersebut teroksidasi, maka akan terbentuk radikal bebas, yang merupakan hasil proses peroksidasi. Radikal bebas yang terjadi akan mengoksidasi senyawa-senyawa protein, DNA, RNA dan UFA. Setelah menjalankan fungsinya sebagai antioksidan, vitamin E *tokoferol* dapat teroksidasi menjadi *tokoferil* (*tokoferol* bentuk radikal) bentuk radikal ini dapat direduksi kembali menjadi tokoferol oleh kerja sinergi dari antioksidan yang lain, misalnya vitamin C dan *glutation*. β -lipoprotein mengikat vitamin E dalam darah dan mendistribusikan ke semua jaringan (Kamiensky, 2007).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan	
↑	: Peningkatan akibat induksi Streptokinase
▭ (green border)	: Induksi Streptokinase
▭ (yellow fill, dotted border)	: Variabel yang diamati
⊥ (red)	: Menghambat
→ (black)	: Menstimulasi
↓ (red)	: Penurunan karena pemberian Vit E
▭ (red dotted border)	: Terapi Vit E

Induksi Streptokinase pada tikus menginduksi terjadinya perubahan *plasminogen* (zimogen) menjadi *plasmin* (enzim aktif) yang terdapat pada sirkulasi maupun pada jaringan. *Plasmin* adalah enzim yang berperan dalam penguraian *fibrinogen* dan *fibrin* pada jaringan. Adanya molekul besar berupa *plasmin* akan memicu proses aktivasi komplemen. Aktivasi komplemen menyebabkan proses fagositosis oleh makrofag terhadap substansi asing. Semakin meningkatnya proses fagositosis oleh makrofag maka akan menyebabkan lepasnya berbagai mediator sekunder seperti ROS (Pradede, 2009).

Radikal bebas merupakan senyawa reaktif hasil metabolisme sel normal. Semakin tinggi radikal bebas maka ROS juga akan meningkat. Peningkatan produk radikal bebas akan memicu peningkatan ROS endogen dalam tubuh seperti radikal hidroksil (OH), radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) mengakibatkan timbulnya stress oksidatif. Stress oksidatif adalah tidak seimbangannya antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas akan berikatan dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan atau disebut sebagai proses peroksidasi lipid yang akan menghasilkan produk akhir berupa *malondialdehid* (MDA) (Hirschberg, 2005).

Kerusakan membran akibat peroksidasi lipid menimbulkan respon inflamasi. Secara tidak langsung menginduksi terjadinya pelepasan sitokin proinflamasi serta aktivasi sel-sel inflamasi. Aktifnya sel inflamasi mengaktifkan makrofag, untuk melepaskan enzim protease dan radikal bebas yang mampu merusak sel epitel tubulus ginjal (Redon, 2014). Tubulus ginjal yang mengalami kerusakan pada sel epitel akan menyebabkan pembentukan *Epithelial to*

Mesenchymal Transition (EMT) yang merupakan proses diferensiasi sel epitel normal menjadi sel fibroblas. Fibroblas adalah sel yang memproduksi kolagen dan memberi bentuk dari struktur jaringan. Semakin parah inflamasi maka EMT juga akan meningkat. EMT akan berdeferensiasi menjadi fibroblas. Selanjutnya fibroblas akan berproliferasi menyebabkan pembentukan matriks ekstra seluler pada ginjal. Banyaknya matriks ekstra seluler mengakibatkan terbentuknya jaringan fibrosa pada ginjal atau dapat disebut sebagai fibrosis ginjal (Cho, 2010).

Fibrosis ginjal dapat diterapi vitamin E *α-tokoferol* yang merupakan antioksidan dan anti inflamasi yang potensial karena Vitamin E didalam tubuh menjaga integritas membran sel. Vitamin E bekerja memperbaiki membran sel dengan cara membantu regenerasi sel, dan menghambat terbentuknya *Reactive oxygen spesies* (ROS) yang merupakan proses awal terbentuknya radikal bebas. Mekanisme kerja vitamin E dengan cara menyumbangkan atom H⁺ pada reaksi propagasi rantai (ROO^{*}). Reaksi antara *α tokoferol* dengan rantai (ROO^{*}) akan menghasilkan produk radikal *α tokoferoksil* yang setabil didalam tubuh. Vitamin E didalam tubuh berfungsi sebagai penghambat radikal peroksil yang kuat. Radikal peroksil (ROO^{*}) bereaksi 1000 kali lebih baik dengan (*α-tokoferol*). Gugus *hidroksil fenolik* yang terdapat pada *tokoferol* bereaksi dengan *peroksil* organik radikal untuk membentuk hidroperoksida organik yang sesuai (ROOH) dan radikal *tokoferolxyl* (Vit E-O), yang tidak berbahaya bagi tubuh, sehingga radikal bebas dalam tubuh jumlahnya menurun (Freyer, 2000).

Kadar radikal bebas yang berkurang menyebabkan stres oksidatif didalam sel maupun jaringan kembali pada keadaan normal. Dimana proses peroksidasi

lipid yang dihambat kerjanya oleh vitamin E akan mengalami penurunan sehingga kadar MDA juga akan berkurang. Vitamin E yang juga merupakan anti inflamasi akan menghambat sitokin proinflamasi dimana enzim proteolitik akan dihambat sehingga kerusakan epitel tubulus ginjal dapat berkurang. Dengan sistem kerja tersebut vitamin E dapat digunakan sebagai terapi pada fibrosis ginjal (Saran, 2002).

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Terapi vitamin E mampu menurunkan kadar *malondialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.
2. Terapi vitamin E mampu memperbaiki gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan februari-juni 2014 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Patologi RS. Dr. Soetomo Surabaya untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain spuit 1ml, bak pemeliharaan hewan coba, *dispossable syringe*, *scalpel*, gunting, gelas objek, gelas cover, timbangan, mortar, *mikro tube*, *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet, pipet tetes, *vortex*, pipet, *waterbath*, lemari pendingin, gelas ukur 250ml, tabung 100ml, kertas saring, spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* dan mikroskop Olympus BX51.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 10 minggu, berat badan tikus antara 120-170 gram, *Streptokinase*, kurva standar MDA, TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4, *Paraformaldehid* 4% (PFA), Pewarna hematoksilin eosin, xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%).

4.3 Tahapan penelitian

4.3.1 Persiapan sampel

Hewan model menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar*. Tikus berumur 10 minggu dengan berat badan tikus antara 120-170 gram. Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008).

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas penelitian ini menggunakan hewan coba tikus sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan pengulangan 4 kali setiap kelompok. Penentuan hewan coba didasarkan pada kriteria purposif.

4.3.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 4 kali. Desain kelompok penelitian ini yang pertama adalah kelompok kontrol negatif, merupakan tikus tanpa perlakuan. Kelompok tikus yang ke-2 adalah kelompok kontrol positif, kelompok tikus yang diinduksi streptokinase tiga kali pada hari ke-1, ke-6 dan ke-11 dengan dosis 6000 IU tanpa dilakukan terapi vitamin E. Kelompok tikus yang ke-3

merupakan kelompok terapi (T1), kelompok tikus yang diinduksi streptokinase tiga kali pada hari ke-1, ke-6 dan ke-11 dengan dosis 6000 IU. Kelompok terapi (T1) pasca induksi streptokinase kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 200mg/kg BB. Kelompok tikus yang ke-4 merupakan kelompok terapi (T2), kelompok tikus yang diinduksi streptokinase tiga kali pada hari ke-1, ke-6 dan ke-11 dengan dosis 6000 IU. Kelompok terapi (T2) pasca induksi streptokinase kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 300mg/kg BB. Kelompok tikus yang ke-5 merupakan kelompok terapi (T3), kelompok tikus yang diinduksi streptokinase tiga kali pada hari ke-1, ke-6 dan ke-11 dengan dosis 6000 IU. Kelompok terapi (T3) pasca induksi streptokinase kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 400mg/kg BB. Pemberian vitamin E dilakukan selama 11 kali dengan rentang waktu 1 hari. Seluruh kelompok dibedah pada hari ke- 33 untuk pengambilan sampel histopatologi dan pengukuran kadar MDA.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

- Variabel Bebas : Vitamin E dengan dosis 200, 300 dan 400 mg/kg BB.
- Variabel tergantung : Gambaran histopatologi tubulus ginjal dan kadar MDA.
- Variabel kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, umur 10 minggu, strain *Wistar*, kandang, pakan, kondisi lingkungan dan berat 120-170 gram.

4.4 Prosedur penelitian

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 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 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%. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan dari komisi etik UB No: 254- KEP-UB

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari polutan. Lantai kandang diberi alas sekam sehingga 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*

Preparasi dosis *streptokinase* yaitu sebagai berikut : Stok I diperoleh dari 1.500.000 IU *streptokinase* yang ditambah laktat ringer sampai 2 ml, kemudian diambil 1 ml *streptokinase* yang mengandung 750.000 IU untuk dijadikan stok II. Stok III diperoleh dari stok II yang mengandung 750.000 IU yang ditambahkan dengan laktat ringer sampai 5ml, kemudian dihomogenkan dan diambil 1ml. Sehingga stok III mengandung 150.000 IU *streptokinase* dalam 40 µl untuk diinjeksi ke tikus (Lampiran 3).

4.4.3 Induksi *Streptokinase* dan Terapi Vitamin E

Induksi *streptokinase* dilakukan sebanyak 3 kali dengan dosis 6000 IU secara intravena melalui vena *coxygea* diberikan kepada kelompok I, II, dan III. Induksi *streptokinase* dilakukan pada hari ke-1, hari ke -6, dan hari ke-11. Terapi vitamin E diberikan dengan cara di sonde lambung. Perlakuan pada tikus kelompok I dilakukan terapi T1 vitamin E dengan dosis 200mg/kg BB. Perlakuan pada tikus kelompok II dilakukan terapi T2 vitamin E dengan dosis 300mg/kg BB. Perlakuan pada tikus kelompok III dilakukan terapi T3 vitamin E dengan dosis 400mg/kg BB. Pemberian terapi vitamin E diberikan pada hari ke-12 sampai hari ke-32 pasca induksi *streptokinase*. Terapi vitamin E diberikan sebanyak 11 kali dengan selang waktu 1 hari.

4.4.4 Pengambilan Organ Ginjal

Pengambilan organ ginjal hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-33 setelah seluruh terapi diberikan. Euthanasia dilakukan dengan dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Pembedahan dibuat pada sayatan rongga abdomen sampai ke rongga *thorax* dan organ ginjal diambil. Organ ginjal dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Selanjutnya ginjal dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan *paraformaldehid* 4% (PFA) Lampiran 2 (Agnes, 2013).

4.4.5 Pembuatan Kurva Baku *Malondialdehid* (MDA)

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/dL diambil masing-masing 100 μ L, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian

ditambah 550 μL aquades. Masing-masing tabung tersebut ditambah 100 μL TCA 100%, 250 μL HCl 1N dan 100 μL Na-Thio 1%, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu larutan standar MDA didinginkan pada suhu ruangan. Selanjutnya larutan standar siap untuk dilakukan pengukuran kadar MDA menggunakan spektrofotometer (Lampiran 5) (Sutari, 2013).

4.4.6 Pengukuran Kadar *Malondialdehid*

Organ ginjal seberat 1,8 gr yang telah difiksasi dengan larutan PBS dimasukkan ke dalam mortar dingin dan digerus. Kemudian ditambah 500 μL NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam *microtube*. Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit, Supernatan diambil dan dipindah ke *microtube* baru. Homogenat sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil, ditambah 550 μL akuades, 100 μL TCA dihomogenkan dengan vortex. Homogenat ditambah 250 μL HCl 1 N dihomogenkan kembali dengan vortex, serta ditambahkan 100 μL Na-Thio 1% dihomogenkan kembali. Mulut tabung ditutup dengan plastik *wrap* dan dipanaskan dalam *waterbath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, *mikrotube* disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit dan dipindah ke tabung reaksi baru. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (533 nm). Kurva standar MDA dibuat dengan membuat persamaan regresi antara absorbansi dan konsentrasi MDA (Lampiran 5) (Sutari, 2013).

4.4.7 Pembuatan Preparat Histopatologi (Junquiera ,2004)

Tahapan pembuatan preparat histopatologi ginjal terdiri dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi paraffin, embedding, dan sectioning, penempelan di gelas objek serta menggunakan pewarnaan HE (Lampiran 6) (Junquiera, 2004).

Organ ginjal difiksasi dalam larutan PFA 4% kemudian dibuat preparat histologisnya. Proses dehidrasi dilakukan dengan perendaman organ ginjal menggunakan etanol 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90 % selama 20 (diulang 3 kali), lalu dengan etanol absolut selama 20 menit sebanyak 2 kali. Tahap selanjutnya adalah proses penjernihan yang dilakukan dengan merendam organ ginjal yang telah didehidrasi kedalam larutan xylol I selama 30 menit pada suhu ruang, larutan xylol II selama 30 menit pada suhu 60-63°C, larutan xylol II selama 30 menit pada suhu inkubator. Tahap selanjutnya adalah proses embedding dilakukan dengan merendam organ ginjal kedalam parafin cair selama 3 kali 60 menit pada suhu 56-58 °C. Kemudian blok dibiarkan mengeras dan dikeluarkan dari cetakan untuk selanjutnya siap dipotong dengan mikrotom. Tahap selanjutnya adalah proses pemotongan yang digunakan dalam preparasi histologi. Mikrotom diatur pada ketebalan 5 -7 µm, jaringan lalu dipotong.

Tahap selanjutnya adalah proses affiksasi atau proses pelekatan, diperlukan berbagai persiapan, antara lain : kaca preparat bersih, akuades, dan meja pemanas (*hot plate*). Dengan kaca objek yang bersih (sudah direndam dalam alkohol 70°C) jaringan diangkat dari dalam air. Kaca objek dengan jaringan di atasnya diinkubasi pada suhu 38-48 °C selama 24 jam.

Preparat jaringan ginjal sebelum diwarnai harus melalui proses deparafinasi dan rehidrasi. Proses deparafinasi untuk mengeluarkan parafin dan siap untuk dilakukan pewarnaan. Deparafinasi adalah proses untuk menghilangkan parafin dalam jaringan dengan cara merendam jaringan ke dalam larutan xylol selama 15 menit. Proses rehidrasi dilakukan dengan menggunakan etanol 100% selama 15 menit, lalu menggunakan etanol bertingkat (90%, 80%, 70%) secara berurutan, dimana masing-masing direndam selama 5 menit. Kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan direndam dalam aquades selama 15 menit.

Tahap selanjutnya adalah proses pewarnaan dengan larutan *Hematoxylin* selama 10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Selanjutnya preparat ginjal diwarnai dengan larutan *Eosin* selama 5 menit, lalu direndam dengan aquades selama 5 menit. Kemudian preparat ginjal dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 5 detik, lalu dimasukkan ke dalam etanol absolut 2 menit dan xylol selama 3 menit masing-masing sebanyak 3 kali. Kemudian preparat dikeringkan lalu dilakukan tahapan *mounting* menggunakan entellan dan ditutup dengan cover glass. Selanjutnya pengujian sampel dapat diamati dibawah mikroskop transmisi cahaya dengan perbesaran yang dapat diatur sesuai kebutuhan.

4.5 Analisis Data

Data penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif diperoleh dari gambaran histopatologi tubulus ginjal yang dianalisis secara

deskriptif. Data kuantitatif berupa perubahan kadar MDA yang dianalisis menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*. Data kemudian ditabulasi dengan menggunakan Microsoft Office Excel dan dilakukan analisis ragam ANOVA dengan SPSS for Windows. Kemudian dilanjutkan lagi dengan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$) (Kusriningrum, 2008).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kadar *Malondialdehid* (MDA) Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase Setelah Diterapi Vitamin E.

Penelitian ini menunjukkan hasil pengukuran kadar MDA dengan *spektrofotometer* pada tikus fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase yang diterapi vitamin E dan dianalisa statistik menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan uji *Tukey* (BNJ) dengan $\alpha = 5\%$ (Tabel 5.1 dan Lampiran 8).

Tabel 5.1. Rata-rata Kadar *Malondialdehid* pada ginjal tikus

Perlakuan	Rata-rata kadar MDA(mg/dL)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol (sehat)	$0,317 \pm 0,75^a$	-	-
Fibrosis ginjal (sakit)	$2,502 \pm 0,017^c$	689,27	-
T1 Dosis 200mg/kg BB	$1,195 \pm 0,22^b$	-	52,23
T2 Dosis 300mg/kg BB	$0,77 \pm 0,043^{ab}$	-	69,22
T3 Dosis 400mg/kg BB	$0,485 \pm 0,064^{ab}$	-	80,61

Keterangan : Perbedaan notasi a,b,c, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.

Hasil analisa statistik SPSS 21 menggunakan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan, yang ditandai dengan menurunnya kadar MDA. Hasil analisis dengan uji *Tukey* (BNJ) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan dengan notasi yang berbeda.

Kelompok kontrol (sehat) berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus sakit. Perbedaan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Kelompok tikus sehat digunakan untuk mengetahui keberhasilan terapi yang

dilakukan. Hasil produk MDA dari kelompok sehat merupakan hasil samping proses metabolisme sel secara normal.

Pada kelompok fibrosis ginjal terdapat peningkatan kadar MDA yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok sehat yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Induksi streptokinase menyebabkan peningkatan kadar MDA sebesar 689,27 %. Kadar MDA meningkat sebagai respon tubuh terhadap stres oksidatif yang akan menyebabkan proses peroksidasi lipid pada membran sel. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai radikal bebas yang sangat reaktif dengan membran lipid, dimana hasil reaksi akan membentuk Malondialdehida (MDA) (Mudassir, 2012).

Kelompok T1 vitamin E (dosis 200 mg/kg BB) menunjukkan penurunan kadar MDA sebesar 52,23% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok sakit, yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda dari hasil uji *tukey* (beda nyata jujur). Penurunan kadar MDA pada T1 dikarenakan vitamin E merupakan antioksidan yang dapat berikatan dengan radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga terbentuk molekul yang stabil dan mengakhiri reaksi radikal bebas. Semakin tinggi dosis terapi vitamin E pada penelitian ini membuktikan semakin menurunnya kadar MDA dan pada dosis terapi (300 dan 400 mg/kg BB) secara statistik dengan uji *tukey* berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus sehat.

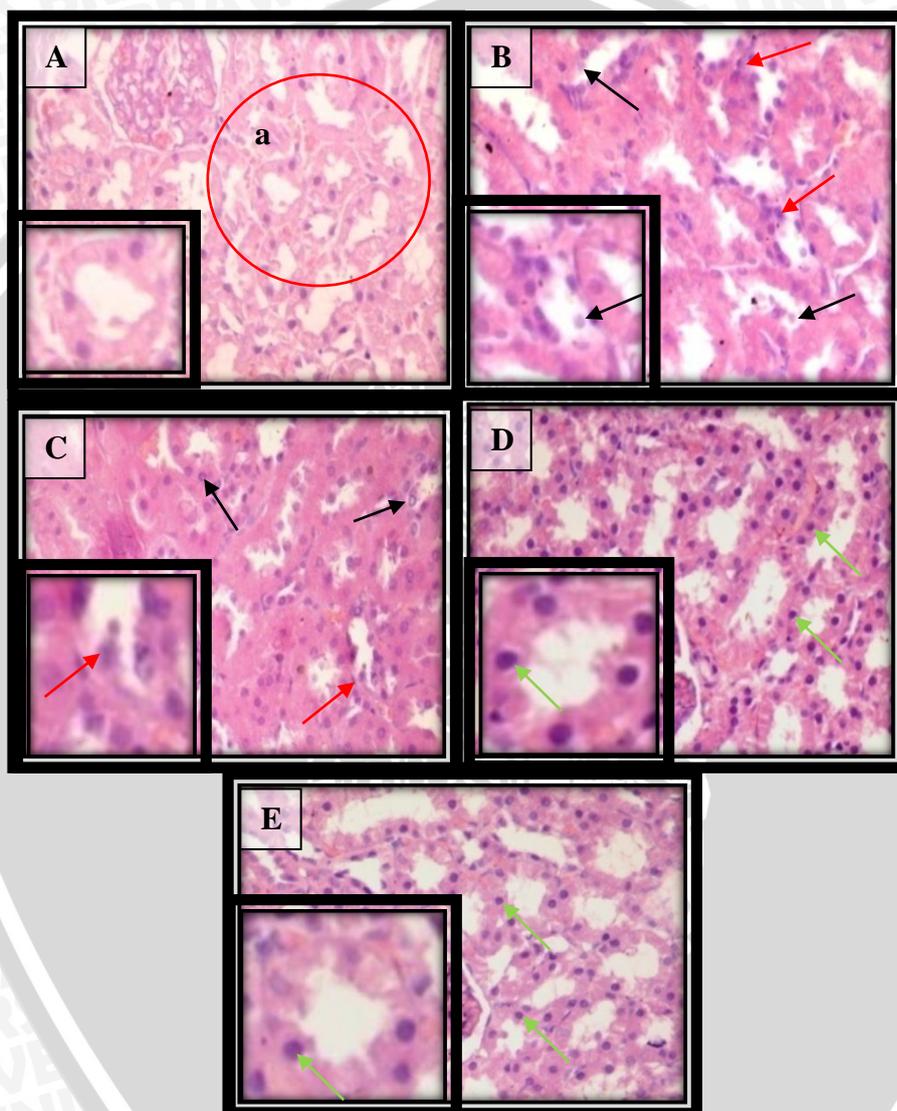
Kelompok T2 dan T3 (dosis 300 dan 400 mg/kg BB) memberikan penurunan kadar MDA sebesar 69,22% dan 80,61 %. Kelompok T2 dan T3 terapi vitamin E dosis 300 dan 400 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan yang nyata

dengan kelompok tikus sehat, Hal tersebut menunjukkan bahwa terapi vitamin E memberikan efek perbaikan fibrosis ginjal berupa penurunan kadar MDA. Dosis terapi 300 adalah dosis optimum untuk terapi fibrosis ginjal. Dosis 300 mg/kg BB mempunyai respon kesembuhan fibrosis ginjal yang sama secara signifikan dengan dosis 400 mg/kg BB. Pada penelitian ini terapi T2 (dosis 300 mg/kg BB) dipilih sebagai dosis efektif terapi fibrosis ginjal. Hal ini karena dengan dosis yang lebih kecil mampu memberikan respon sama dengan kelompok tikus sehat.

Penurunan kadar MDA karena Vitamin E α *tokoferol* mampu berikatan dengan radikal bebas dengan cara menyumbangkan atom H^+ pada reaksi propagasi rantai (ROO*). Reaksi antara α *tokoferol* dengan rantai (ROO*) akan menghasilkan produk radikal α *tokoferoksil* yang kemudian dapat didaur ulang kembali dengan antioksidan lain atau antioksidan dalam tubuh (Agnes, 2013). Kandungan antioksidan vitamin E memiliki kemampuan untuk menstabilkan radikal bebas sehingga mampu menurunkan kadar MDA. Hasil ini diperkuat dengan penelitian Zhang, *et al.* (2008) bahwa vitamin E mampu menghambat proses oksidasi atau menstabilkan radikal bebas. Vitamin E α -*tokoferol* berfungsi sebagai *scavenger* dari radikal bebas dan juga sebagai terminator reaksi berantai daur ulang radikal (PUFA) yang dihasilkan oleh oksidasi lipid. Hilangnya efek radikal bebas mengakibatkan penurunan stres oksidatif sehingga mengakibatkan penurunan kadar *malondialdehid* (MDA) (Yustika, 2013).

5.2 Gambaran Histopatologi Tubulus Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase Setelah Diterapi Vitamin E.

Hasil penelitian ini menunjukkan terapi vitamin E pada tikus fibrosis ginjal memperbaiki gambaran histopatologi tubulus ginjal pewarnaan HE (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Gambaran histopatologi ginjal tikus model fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase dan yang telah diterapi Vitamin E dengan pewarnaan HE (400x).

Keterangan : (A) tikus kontrol sehat; (B) tikus sakit; (C) tikus dengan dosis terapi 200 mg/kg BB; (D) tikus dengan dosis 300mg/kg BB; (E) tikus dengan dosis 400mg/kg BB, (a) Tubulus normal. (↗) Perubahan histopatologi sel epitel tubulus, (↖) Nekrosis (kariolisis) sel epitel tubulus (↗) Peningkatan *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT).

Gambar 5.2 menunjukkan adanya perbedaan gambaran histopatologi tubulus ginjal yang ditunjukkan pada setiap kelompok perlakuan. Kelompok tikus sehat (Gambar 5.1 A) terlihat gambaran sel epitel tubulus normal. Pada gambaran tersebut tidak ditemui sel inflamasi dan EMT. Lapisan sel epitel masih terlihat kompak dan normal. Sel epitel tubulus ginjal masih berinti yang menandakan tidak adanya kerusakan sel. Pada keadaan normal tubulus ginjal tidak ada penumpukan matrik ekstra selluler.

Gambaran histopatologi tubulus ginjal kelompok tikus sakit (Gambar 5.1 B). Terdapat kerusakan sel dan pembentukan sel *Epithel to Mesenchymal Transition* (EMT) yang terjadi pada tubulus ginjal. *Epithel to Mesenchymal Transition* (EMT) adalah proses diferensiasi sel epitel normal menuju sel epitel yang memiliki sel fibroblas. Sel fibroblas ini akan berbentuk runcing. Sel fibroblas merupakan sel penghasil serat fibril atau kolagen yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis ginjal (Wati *et al.*, 2013). Kerusakan sel mengarah pada nekrosis atau kematian sel. Nekrosis pada histopatologi fibrosis ginjal yaitu kematian inti sel dimana inti sel atau nukleus mengalami lisis, sehingga terdapat ruang kosong akibat lisisnya nucleus (kariolisis). Nekrosis yang terjadi pada jaring fibrosis merupakan kematian sel yang mengalami kariolisis. Kematian sel diakibatkan karena tingginya radikal bebas dalam membran sel yang tidak dapat dikontrol oleh antioksidan dalam tubuh atau antioksidan endogen. Pengaruh radikal bebas pada membran sel tubulus ginjal menyebabkan perubahan sel dan abnormalitas struktur sel sehingga terjadi inflamasi. Proses inflamasi ini

akan mengaktifkan enzim proteolitik protease yang mengakibatkan kerusakan sel pada sel epitel tubulus ginjal (Ika, 2013).

Gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus yang mendapatkan terapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg BB (Gambar 5.1 C). Menunjukkan bahwa terdapat penurunan kerusakan sel epitel tubulus ginjal. Penurunan ditunjukkan dengan menurunnya jumlah sel *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT). Pemberian terapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg BB belum mampu menyeimbangkan jumlah radikal bebas dan menurunkan efek inflamasi sehingga masih menimbulkan kerusakan sel. Kerusakan sel epitel pada tubulus ginjal karena reaksi radikal bebas dan inflamasi belum berhenti.

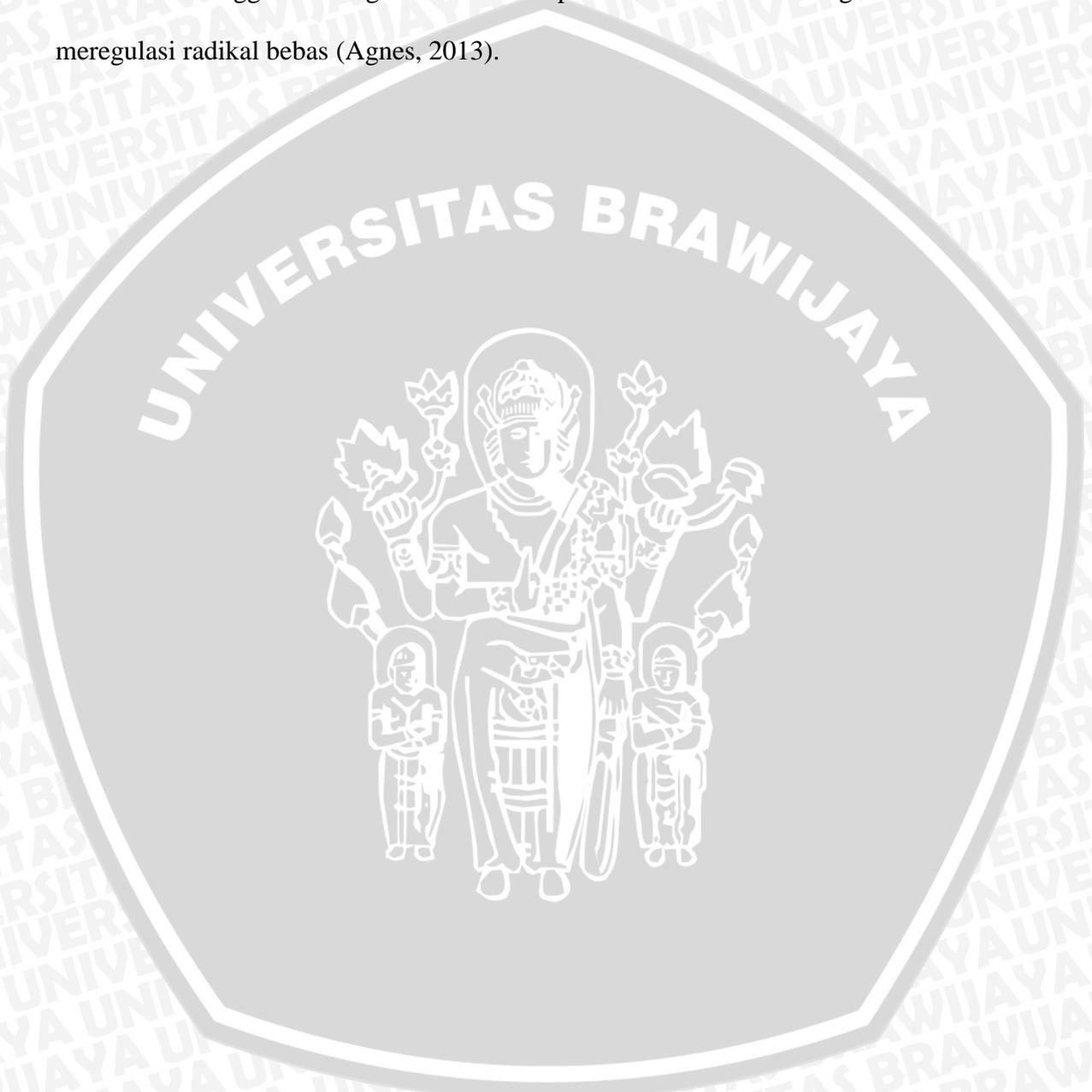
Gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus yang diterapi vitamin E dengan menggunakan dosis 300 mg/kg BB (Gambar 5.1 D), tidak ada perbedaan yang begitu terlihat dengan dosis 400 mg/kg BB (Gambar 5.1 E). Terapi pemberian vitamin E menunjukkan adanya regenerasi sel pada sel epitel tubulus ginjal. Terapi dengan dosis 300 mg/kg BB memberikan perbaikan sel epitel yang sama dengan dosis terapi 400 mg/kg BB. Terapi vitamin E dengan dosis 300 dan 400 mg/Kg BB memberikan perbaikan gambaran histopatologi yang signifikan dan mendekati kelompok tikus kontrol (A). Perbaikan sel ditunjukkan kembalinya struktur normal sel epitel tubulus ginjal. Perbaikan sel ditandai dengan adanya penurunan jumlah sel nekrosis. Perbaikan sel epitel pada tubulus ginjal karena antioksidan vitamin E mampu membantu regenerasi sel dengan cara melindungi jaringan ginjal dari radikal bebas (Kalluri, 2003).

Histopatologi organ ginjal yang mengalami fibrosis ginjal terdapat perubahan sel dan abnormalitas struktur sel karena terjadi inflamasi. Pada hewan model fibrosis ginjal telah terjadi peningkatan infiltrasi sel inflamatori sehingga menyebabkan tingginya produksi radikal bebas. Induksi streptokinase akan memicu aktivasi plasminogen menjadi plasmin memicu aktivasi komplemen yang lama kelamaan menyebabkan inflamasi (Redon, 2014). Sel inflamasi menyebabkan aktivasi makrofag sehingga antigen melepaskan bahan yang bersifat oksidan reaktif seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan enzim protease yang merupakan molekul sitotoksik dan dapat menyebabkan kerusakan sel epitel. Pelepasan enzim proteolitik protease menyebabkan membran basalis tidak mampu menyokong sel epitel sehingga terjadi pelepasan silia epitel tubulus (Miller, 2010).

Target utama radikal bebas adalah ikatan ganda karbon-karbon dari PUFA sehingga melemahkan ikatan karbon hidrogen, yang menyebabkan atom hidrogen tersebut terpisah dan terbentuklah radikal lipid peroksil. Radikal lipid peroksil ini mampu bereaksi dengan PUFA lainnya, yang secara terus menerus mampu menyebabkan kerusakan membran basalis dan sel epitel tubulus. Hal ini diperkuat dengan penelitian Agnes (2013) mengatakan pada penelitian tersebut struktur sel ginjal mengalami kerusakan, sel kehilangan inti dan terjadi penumpukan sel *Epithelial to Mesenchymal Transition*. Gambaran histopatologi ginjal tikus terdapat banyak rongga sebagai visualisasi terputusnya sel *junction* (penghubung antar sel) karena adanya inflamasi.

Perbaikan sel pada tubulus ginjal dikarenakan terapi vitamin E α -tokoferol yang berfungsi sebagai *scavenger* mampu menyeimbangkan jumlah radikal bebas

sebagai terminator reaksi berantai daur ulang radikal (PUFA) yang dihasilkan oleh oksidasi lipid. Hilangnya efek radikal bebas mengakibatkan penurunan stres oksidatif sehingga meningkatkan kemampuan antioksidan endogen untuk meregulasi radikal bebas (Agnes, 2013).



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Terapi vitamin E menurunkan kadar MDA pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase. Dosis terapi 300 mg/Kg BB merupakan dosis terapi efektif dengan memberikan penurunan kadar MDA sebesar 69,22% terhadap tikus sakit.
2. Terapi vitamin E mampu memperbaiki gambaran histopatologi sel epitel tubulus ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.

6.2 Saran

Perlunya penelitian lebih lanjut potensi terapi vitamin E α -tokoferol sebagai terapi penyakit ginjal yang lain.