

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis ginjal merupakan kerusakan ginjal yang diakibatkan oleh inflamasi akut yang menyebabkan terakumulasinya matriks ekstraseluler pada ginjal (Chatziantoniou, 2005). Fibrosis ginjal merupakan kerusakan ginjal tahap awal yang nantinya akan berujung pada *Chronic Kidney Disease* (CKD). Pada tahun 2010 prevalensi penderita gagal ginjal kronik diperkirakan lebih dari 650.000 dan untuk gagal ginjal kronik stadium awal diperkirakan akan lebih banyak (Sastrawan, *et al.*, 2008). Pada tahun 2010 telah dilaporkan bahwa 9,6% kucing dan 7,6% anjing yang diperiksa di *Purdue Teaching Hospital* mengalami *Chronic Kidney Disease* (CKD). 55% kucing yang terkena CKD rata-rata berumur berumur 15 tahun, dan 51% anjing yang terkena CKD rata-rata berumur 9,9 tahun (Paul, *et al.*, 2010). Tingginya angka kematian akibat penyakit ini perlu dicari tindakan terapi yang khususnya bisa digunakan untuk terapi berbagai hewan.

Penyakit gagal ginjal kronis sering disertai dengan proses inflamasi jaringan ginjal. Awalnya terjadi *injury* pada sel epitel tubulus dan rekrutmen sel-sel inflamasi yang mengakibatkan inflamasi glomerulus. Kemudian terjadi pembentukan jaringan sklerotik dan fibrosis. Penumpukan jaringan fibrosa yang terus menerus akan menyebabkan kerusakan ginjal yang dinamakan fibrosis ginjal (Trihono, 2011).

Patomekanisme fibrosis ginjal terjadi ketika induksi streptokinase yang menyebabkan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) meningkat pada jaringan ginjal

sehingga mengakibatkan inflamasi. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) akan merusak sel dengan cara peroksidasi lipid pada membran sel dan fosfolipid membran sel sehingga menyebabkan perubahan fungsional serta morfologi membran sel serta menyebabkan akumulasi *lipid-derived oxidant*. ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang berlebihan menyebabkan adanya radikal bebas dalam sel dan jaringan, proses inilah yang dinamakan stres oksidatif (Hancock, *et al.*, 2001). Stres oksidatif pada jaringan ginjal akan menyebabkan inflamasi. Inflamasi yang terjadi akan diregulasi oleh sitokin TGF- β dengan mengaktivasi *Ephitelial of Mesenchymal Transtition* (EMT) untuk membentuk matriks ekstraselular. Sehingga pada kejadian fibrosis ginjal ditandai dengan meningkatnya marker *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β). *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) diidentifikasi sebagai pengatur pertumbuhan mesenkimal dan sebagai antimitogen terhadap sel epitel aktivasi fibroblast, *Ephitelial of Mesenchymal Transition* (EMT) dan juga apoptosis sel akan diinduksi oleh sitokin TGF- β .

Tingginya *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dapat ditekan dengan pemberian antioksidan, salah satunya adalah vitamin E. Vitamin E merupakan antioksidan yang larut lemak. Vitamin E berfungsi menangkap aktivitas radikal bebas dengan memutus rantai peroksidasi lipid melalui donor ion hidrogen pada radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil (Weber, *et al.*, 2002). Vitamin E bekerja pada membran epitel sehingga mampu menstabilkan sel epitel yang rusak sehingga dapat menghambat terjadinya fibrosis ginjal. Penelitian ini mempelajari tentang potensi vitamin E sebagai antioksidan untuk mengurangi inflamasi pada kasus fibrosis ginjal berdasarkan ekspresi TGF- β dan histopatologi tubulus ginjal.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

- 1) Bagaimana vitamin E dapat menurunkan ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase ?
- 2) Bagaimana terapi vitamin E dapat memperbaiki histopatologi tubulus ginjal pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini menurut latar belakang yang telah diuraikan yaitu dibatas pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dari unit pelayanan hewan percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan umur 10 minggu dan berat badan antara 120 - 170 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 254-KEP-UB (**Lampiran 6**).
- 2) Streptokinase yang digunakan diinjeksikan secara intravena pada vena *coccygea* dengan dosis optimasi 6000IU/ekor 3x selang 5 hari (William, 2007).
- 3) Vitamin E yang diberikan dengan dosis 200 mg/kg BB, 300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB yang diberikan melalui sonde lambung sebanyak 11 kali selang 1 hari.

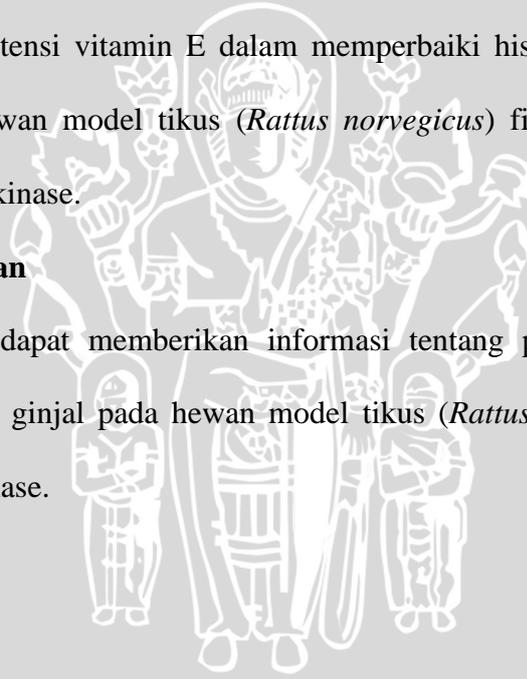
- 4) Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah tingkat ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) dengan teknik immunohistokimia dan histopatologi tubulus ginjal dengan pewarnaan Hematoxilen-Eosin.

1.4 Tujuan Penelitian

- 1) Mengetahui potensi vitamin E terhadap penurunan ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.
- 2) Mengetahui potensi vitamin E dalam memperbaiki histopatologi tubulus ginjal pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang potensi vitamin E sebagai terapi fibrosis ginjal pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi oleh streptokinase.



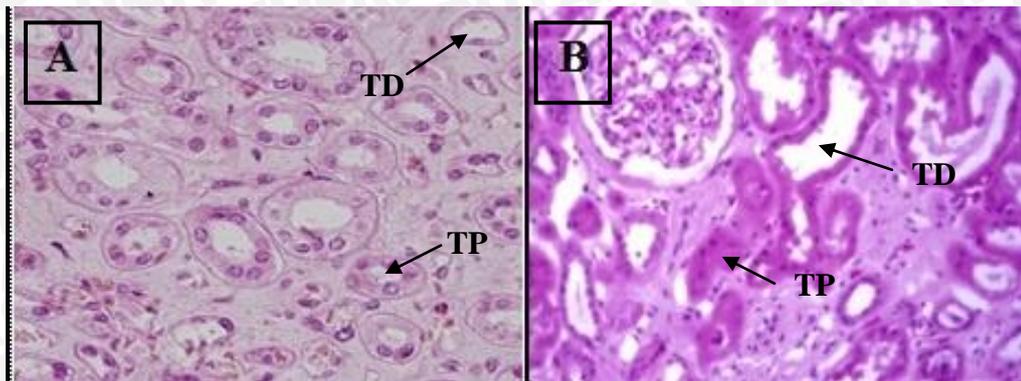
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fibrosis Ginjal

Ginjal merupakan organ yang berfungsi mempertahankan keseimbangan cairan tubuh, mempertahankan keseimbangan kadar asam dan basa dari cairan tubuh. Ginjal mengeluarkan sisa-sisa metabolisme akhir dari protein, ureum, kreatinin dan amoniak. Selain itu, ginjal juga mengontrol tekanan darah, memfiltrasi darah dan membuang zat-zat yang tidak dibutuhkan oleh tubuh serta menahan zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh (Dellmann, 2006; Bijanti, 2010). Ginjal manusia terletak retro-perineal dekat dinding posterior abdomen di kiri kolom vertebralis. Dalam ginjal manusia terdapat sekitar 1,5 juta tubuli uriniferi.

Fibrosis ginjal merupakan kerusakan ginjal karena banyaknya ekstraselular matrik pada ginjal. Fibrosis ginjal diawali dengan adanya kerusakan jaringan ginjal yang disebabkan oleh paparan *toxin*, trauma mekanis, dan faktor genetik. Keadaan patologis pada ginjal yang terkena fibrosis dapat ditunjukkan adanya *glomerusklerosis* dan kemunculan jaringan fibrosa (Chen, 2012; Schnaper, 2005).

Beberapa studi tentang histopatologi pada penyakit fibrosis ginjal pada hewan model memiliki kesamaan yang terjadi pada manusia dengan ciri infiltrasi sel inflamasi, proliferasi tubulus, *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT), akumulasi fibroblas, meningkatnya *Extracellular Matrix* (ECM), atrofi tubulus, dan disertai dengan kerusakan sel-sel epitel pada tubulus dan glomerulus yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Bascand and Schanstra, 2005; Chatziantoniou, 2005).



Gambar 2.1 Histopatologi ginjal tikus dengan pewarnaan HE (1000x)

Keterangan : TD : Tubulus Distal; TP : Tubulus Proximal (A) Histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) normal (B) Histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattusnorvegicus*) yang mengalami fibrosis ginjal.

Fungsi tubulus kontortus proksimal adalah mengurangi isi filtrat glomerulus 80-85 persen dengan cara reabsorpsi via transport dan pompa natrium. Glukosa, asam amino dan protein seperti bikarbonat akan diresorpsi. Fungsi dari tubulus kontortus distal adalah untuk pemekatan urin. Jika terjadi kerusakan pada tubulus akan mengakibatkan menurunkan fungsi tersebut.

Patomekanisme terjadinya fibrosis ginjal yaitu pada awalnya terjadi *injury* pada sel epitel tubulus dan rekrutmen sel-sel inflamasi. Banyaknya ROS mengakibatkan jaringan tersebut mengalami inflamasi. Inflamasi akan diregulasi oleh sitokin proinflamatori TGF β . Fibrosis ginjal ditandai dengan meningkatnya level marker fibrosis diantaranya adalah TGF- β . Peningkatan level TGF- β akan menginduksi nekrosis pada sel intrinsik ginjal dan kemudian akan digantikan dengan jaringan fibrotik melalui proses *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT). *Transforming Growth Factor Beta Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) akan mengaktivasi *fibroblas intestinal* dan mendeferensiasi sel tubulus menjadi miofibroblas. Miofibroblas dan fibroblas menghasilkan keluarnya *Extra*

Celular Matrix (ECM), seiring dengan proses ini ECM akan terakumulasi sehingga merusak fungsi fisiologis ginjal dan akhirnya menyebabkan fibrosis ginjal (Hirschberg, 2005).

2.2 *Reactive Oksigen Species* (ROS)

ROS (*Reactive Oksigen Species*) merupakan pengoksidasi yang berasal dari oksigen yang sangat reaktif. ROS adalah senyawa yang mudah membentuk radikal bebas yang reaktif dan berinteraksi senyawa lain. Radikal bebas dapat terbentuk melalui putusnya ikatan kovalen atom atau molekul yang normal, umumnya disebabkan karena paparan sinar UV, radiasi ionisasi. Dalam keadaan normal sel tubuh juga memproduksi radikal bebas sebagai hasil dari metabolisme sel aerob atau metabolisme *xenobiotik* (Kumar, 2007).

Reactive Oksigen Species (ROS) di dalam tubuh berpotensi berikatan dengan jaringan sehingga menimbulkan reaksi berantai yang menyebabkan kerusakan jaringan. Radikal bebas yang bersifat tidak stabil akan sangat reaktif dan dapat merebut elektron dari molekul lain. Molekul yang kehilangan elektron bersifat reaktif pada asam lemak tak jenuh *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Membran sel yang dilapisi lipid bilayer kaya akan PUFA yang mudah dirusak oleh peroksidasi. Terjadinya peroksidasi lipid akan menyebabkan hilangnya integritas dan permeabilitas sel.

Peroksidasi lipid dapat memperburuk stress oksidatif melalui produksi lipid yang diturunkan secara radikal dan dapat bereaksi serta mengubah struktur dan fungsi protein bahkan menyebabkan kerusakan DNA sehingga

mempromosikan apoptosis serta berkontribusi meningkatkan penyakit kanker melalui perubahan ekspresi gen. Peroksidasi lipid ada 3 yaitu, inisiasi merupakan tahap pembentukan radikal bebas, propagasi, terminasi terjadi penggabungan kedua senyawa radikal untuk membentuk senyawa yang stabil.

2.3 *Transforming Growth Factor – Beta (TGF- β)*

Transforming Growth Factor (TGF- β) adalah protein yang disekresikan untuk meregulasi proliferasi, diferensiasi dan kematian dari berbagai jenis sel. TGF- β disekresi oleh sel T, dan sel dendritik serta makrofag. TGF- β merupakan protein sekresi yang terdiri dari tiga isoform yakni TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3 (Abbas, 2005). TGF- β merupakan sitokin yang dilepaskan oleh sel T regulator.

Transforming Growth Factor (TGF- β) merupakan sitokin polipeptida multifungsional yang disekresi oleh berbagai sel dalam tubuh termasuk makrofag, sel *natural killer*, sel B, sel CD4 dan sel CD8. Ekspresi TGF- β dipicu oleh adanya infeksi atau hipoksia dan iskemia jaringan atau sel. TGF- β dapat berperan sebagai sitokin proinflamasi yaitu pada fase akut suatu penyakit TGF- β menginduksi sekresi TNF- α yang akan mengontrol perjalanan penyakit tersebut. TGF- β dapat mengatur ekspresi molekul adhesi, menjadi kemotaktik yang kuat bagi sel lain yang terlibat dalam respon imun dan sebaliknya bisa menghambat bila mereka sudah diaktifkan.

TGF- β 1 disekresi dalam bentuk laten dan akan menjadi aktif ketika TGF- β 1 matur dikeluarkan dari bentuk latennya melalui peptida dimer akibat adanya reaksi inflamasi. TGF- β 1 berperan dalam inhibisi dan stimulasi proliferasi sel,

mengontrol sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler, dan memperantarai respons sel dan jaringan terhadap cedera. Secara umum fungsi TGF- β 1 dalam regenerasi jaringan adalah sebagai faktor kemotaksis dan menstimulasi migrasi sel-sel monosit, limfosit, netrofil, dan fibroblas. TGF- β 1 juga merangsang sintesis matriks ekstraseluler seperti kolagen, fibronectin, tenascin, dan sebagainya. TGF- β 1 muncul dalam tiga fase utama proses penyembuhan luka sebagai mediator dan berperan dalam fase akhir pembentukan matriks dengan menstimulasi terbentuknya fibrosis (Genovese, 2014).

Secara invitro TGF- β merupakan faktor dasar yang dapat menstimulasi sel mesangial, fibroblas intrstisial, dan sel epitel tubular. Ekspresi TGF- β diinduksi oleh kolagen tipe 1 dan 2 yang ada ditubulus ginjal (Lei *et.al.* 2011). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa reseptor mengaktifasi Smad 2 dan Smad 3 sebagai mediator sinyal. TGF- β merupakan mediator fibrosis ginjal dengan mengaktifasi reseptor Smad3. Smad2 merupakan sinyal pathway dari fibrogenesis respon seperti mediator TGF- β (Qin, *et al.*, 2011).

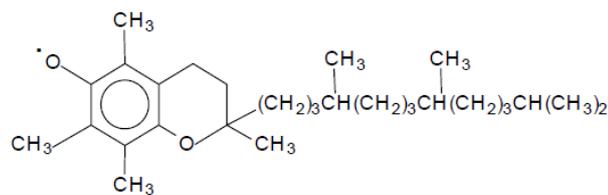
Aktivitas protease, integrins, pH, dan oksigen spesies reaktif adalah faktor-faktor yang dapat mengaktifkan TGF- β . Gangguan faktor pengaktifan ini dapat mengakibatkan TGF- β tidak teratur tingkat sinyalnya dan menyebabkan beberapa komplikasi termasuk peradangan, fibrosis, kanker, gangguan autoimun serta katarak (Paul, 2003).

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) merupakan penginduksi *Epithelial of Mesenchymal Transition* (EMT) baik melalui jalur Smad2/3-dependent dan jalur MAPK-dependen (Kaluri, 2009). Protein Smad, akan

memediasi aksi TGF- β untuk menginduksi EMT melalui ALK-5 reseptor. *Smad-mediated signaling* diinduksi oleh TGF- β untuk memfasilitasi motilitas sel sehingga akan terjadi penurunan level *E-cadherin* yang memegang peranan penting dalam adhesi sel, membentuk *adherens junction* untuk mengikat sel-sel dalam jaringan bersama-sama. Penurunan level E-cadherin akan meningkatkan EMT. *Epithelial of Mesenchymal Transition* (EMT) merupakan proses berdiferensiasinya sel epitel normal menjadi sel fibroblas (Liu, 2004).

2.4 Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E merupakan suatu zat pembersih radikal bebas yang banyak antioksidan didalamnya. Terdapat 8 jenis senyawa yang mengandung vitamin E yaitu : *d alfa tokoferol*, *d β tokoferol*, *d gama tokoferol*, *d delta tokoferol*, *d alfa tokotrienol*, *d β tokotrienol*, *d gama tokotrienol*, *d delta tokotrienol*. Vitamin E jenis *d alfa tokoferol* merupakan jenis vitamin E yang mempunyai biopotensi yang terbesar dan menunjukkan aktivitas biologis vitamin E yang asli (Eitenmiller, 2010). Sifat vitamin E adalah larut lemak, vitamin ini tidak dapat disintesa oleh tubuh sehingga harus dikonsumsi melalui makanan maupun suplemen. Berikut adalah struktur kimia dari *alfa tokoferol* :



Gambar 2.2 Struktur Kimia α -Tokoferol (Eitenmiller, 2013)

Fungsi vitamin E dalam tubuh adalah sebagai antioksidan dengan melindungi senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi antara lain ikatan rangkap dua pada PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*). Apabila senyawa ini tersebut teroksidasi maka akan terbentuk radikal bebas. Vitamin E berperan sebagai *scavenger* akan bertindak sebagai reduktor dan menangkap radikal bebas. Dosis akut dari vitamin E adalah >4000 mg/hari. Vitamin E disimpan terutama dalam jaringan adiposa, otot dan hati. Dalam keadaan normal, kadar vitamin E dalam plasma darah berkisar antara 0,5 mg/ml sampai dengan 1,2 mg/ml (Eitenmiller, 2013). Asupan α -tokoferol harian yang dibutuhkan untuk mempertahankan kadar α -tokoferol dalam darah adalah sebesar 10-30 mg. Batas konsumsi α -tokoferol yang dianjurkan adalah 8-10 IU. Dosis 100-400 IU adalah dosis yang dibutuhkan untuk keuntungan yang optimal dimana berbagai penelitian menggunakan dosis tersebut untuk mengurangi resiko penyakit kronis (Brigelius, 2003). Dosis dari lebih 800 IU perhari dapat menimbulkan efek toksik dengan gejala mual, muntah, sakit kepala dan penglihatan kabur.

Vitamin E diserap di bagian atas usus halus dalam bentuk misel. Garam empedu dan lipase pankreas membantu pembentukan misel yang mengandung vitamin E. Mekanisme transport vitamin E dimulai dari mukosa usus halus, masuk

ke dalam sistem limfa, dan selanjutnya dibawa menuju kehati. Bentuk alfatokoferol dibawa oleh VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) masuk ke dalam membran plasma. Vitamin E diakumulasikan dibagian sel dengan radikal bebas yang paling banyak, yaitu di mitokondria dan retikulum endoplasma.

Jenis radikal bebas yang banyak dalam sistem biologi tubuh adalah radikal bebas dari oksigen, dikenal sebagai *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) menyebabkan kerusakan dengan mekanisme melalui peroksidasi lipid yang terjadi apabila radikal bebas seperti *hydrocyl radikal* (OH) berdekatan dengan membran fosfolipid sehingga menyerang rantai lipid tersebut dan mengambil elektron lipid dan akan membentuk *peroxyl radikal* yang mengakibatkan kerusakan sel (Chadenas, 2002). *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) juga merangsang proses inflamasi dengan mengeluarkan sitokin proinflamatori dari monosit dan makrofag sehingga menstimulasi inflamasi terus menerus yang akan menyebabkan peradangan pada ginjal.

Vitamin E berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran. Vitamin E merupakan antioksidan pemutus rantai yaitu molekul kecil yang dapat menerima atau memberi elektron dari atau ke radikal bebas, sehingga membentuk senyawa baru yang stabil (Iranloye, 2011). Dibandingkan vitamin yang bersifat antioksidan lainnya seperti vitamin c adalah vitamin e lebih mudah diserap oleh sel karena yang sifatnya larut lemak sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel. Penyerapan α -tokoferol pada sel melalui difusi pasif. Selain itu jika ada paparan ROS enzim yang digunakan oleh sel dalam perthanan awal adalah glutathion dan vitamin e. Vitamin E sebagai *scavenger* akan melindungi

Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) dari *peroxil oksidative* pada membran sel. Ketika radikal bebas bereaksi dengan PUFA reaksi berantai mendorong terbentuknya radikal bebas dalam jumlah yang banyak. Vitamin E akan menyumbangkan ion hidrogen yang merubah radikal peroksil menjadi radikal tokoferil yang kurang aktif sehingga tidak mampu merusak asam lemak (Webber, 2002).

2.5 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Ginjal

Menurut Sihombing (2011) menyatakan bahwa hewan yang sering kali digunakan sebagai hewan percobaan guna penelitian yaitu tikus. Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara sempurna, mudah dipelihara, sehat, dan cocok untuk beberapa penelitian. Morfologi dari tikus (*Rattus norvegicus*) antara lain berat badan antara 150-600 gram, hidung tumpul dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, telinga dengan ukuran 20-33mm.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini memiliki kelebihan sebagai hewan laboratorium misalnya, lebih mudah ditangani, memiliki ukuran yang cukup besar, sehingga memudahkan untuk pengamatan. Tikus putih wistar dipilih sebagai hewan coba sebagai model fibrosis ginjal karena histologi ginjal tikus tidak jauh beda dengan histologi ginjal manusia (Cho, 2010).

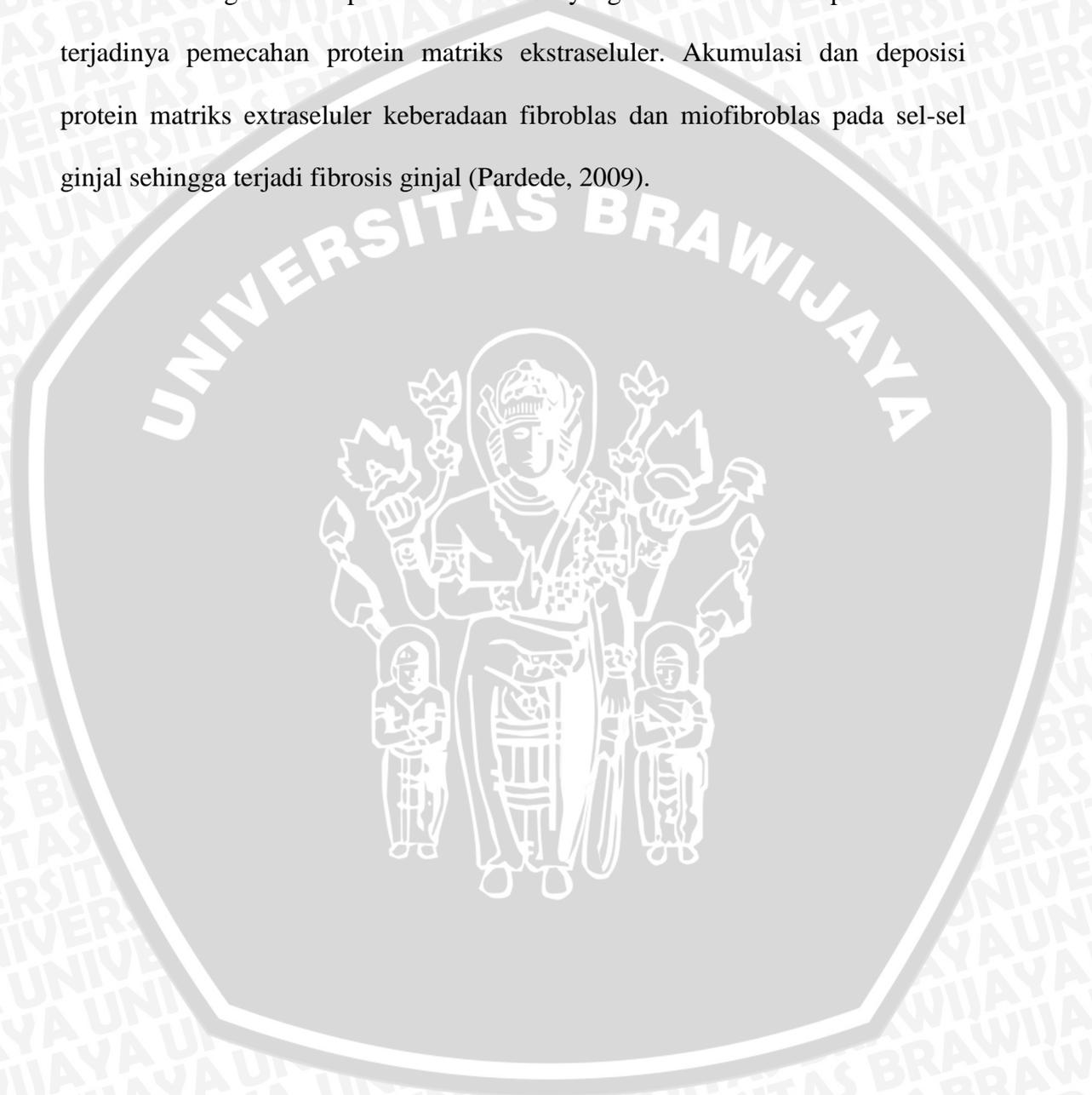
Menurut Armitage 2004, tikus yang digunakan dalam penelitian memiliki taksonomi sebagai berikut ini :

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

Hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal telah dipelajari dalam penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan *Streptokinase*. Menurut penelitian sebelumnya mengatakan bahwa induksi streptokinase sebanyak 3x dengan dosis 6000 IU secara intravena mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal (Steiner *et.al.*, 2002). Streptokinase merupakan suatu zat obat yang digunakan untuk terapi penyakit jantung yang dikonsumsi secara berlebihan akan menimbulkan efek samping pada ginjal salah satunya adalah fibrosis ginjal (Hu, 2008).

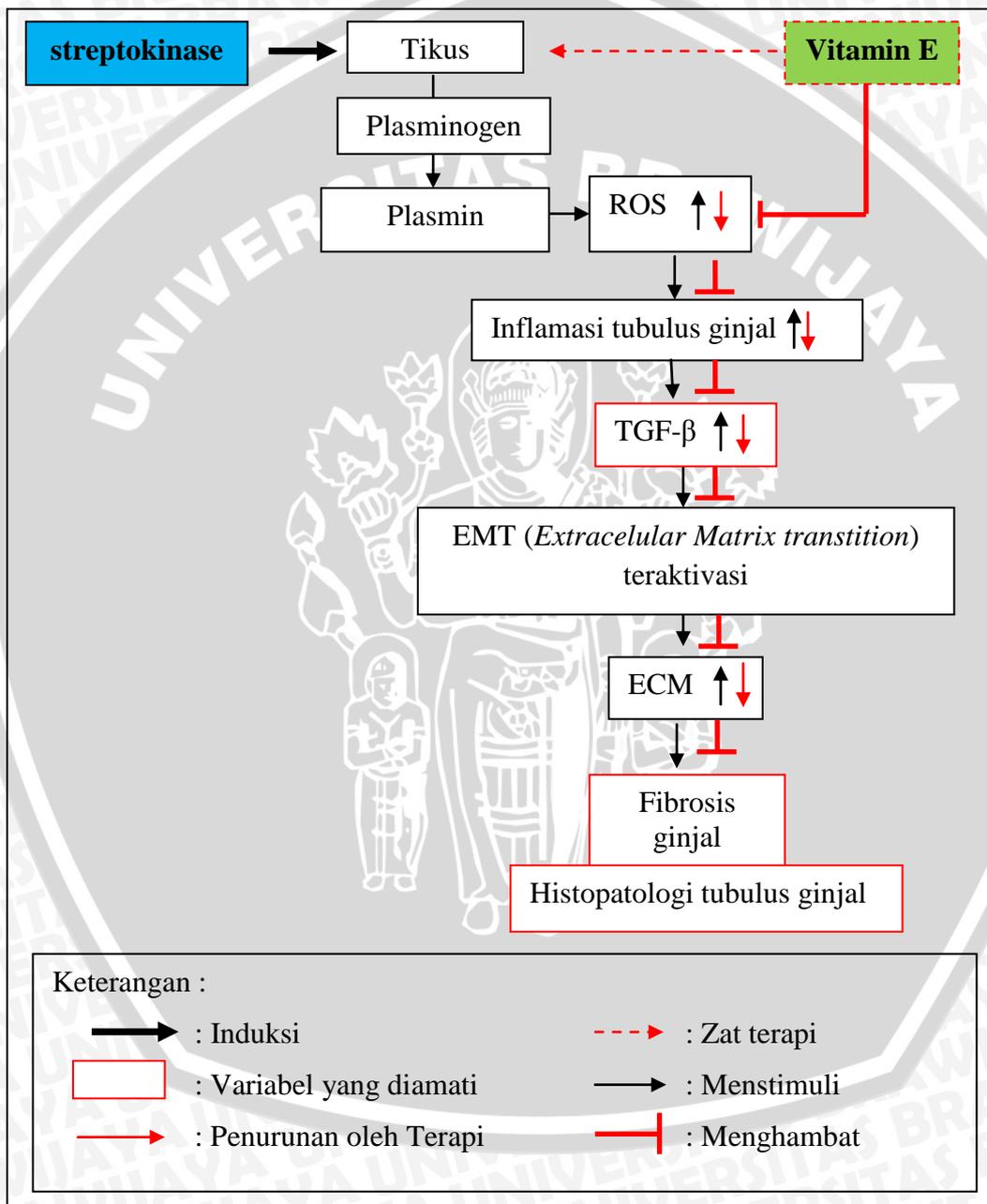
Streptokinase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan dari bakteri *Streptococcus haemolytic*, dengan berat molekul 47-kDa dan terdiri dari 414 asam

amino (Sulyok, 2004). Mekanisme kerja streptokinase adalah sebagai plasminogen aktivator dan menginduksi terjadinya fibrinolisis. Plasminogen aktivator mengaktifkan plasmin. Plasmin yang berlebihan mampu memicu terjadinya pemecahan protein matriks ekstraseluler. Akumulasi dan deposisi protein matriks ekstraseluler keberadaan fibroblas dan miofibroblas pada sel-sel ginjal sehingga terjadi fibrosis ginjal (Pardede, 2009).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Induksi streptokinase pada tikus melalui intravena *coccygea*, selanjutnya masuk kedalam aliran darah. Dalam aliran darah streptokinase akan berikatan dengan plasminogen. Plasminogen akan membentuk ikatan kompleks aktif yang akan mengubah plasminogen menjadi plasmin dan akan memicu terjadinya inflamasi. Keberadaan plasmin dalam vaskular ginjal mengakibatkan terjadinya pengaktifan komplemen, akibatnya neutrofil dan makrofag keluar untuk melakukan fagositosis dan mengakibatkan keluarnya ROS.

Reaktif Oksigen Spesies (ROS) akan berikatan dengan PUFA pada membran sel. Sel yang terpapar ROS akan mengaktifkan sistem imun untuk mensekresikan sitokin proinflamasi sebagai respon inflamasi. Inflamasi akan direspon oleh sitokin yaitu TGF- β . *Transforming Growth Factor* (TGF- β) merupakan sitokin profibrosis dan proinflamasi yang memicu munculnya *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT). *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) tersebut merupakan proses diferensiasi dari sel yang rusak menjadi fibroblas. Munculnya sel fibroblas memicu produksi matriks ekstraseluler yang berlebihan berupa kolagen, sehingga pada sel ginjal banyak ditemukan jaringan ikat fibrosa sebagai penyebab fibrosis ginjal.

Tingginya ROS pada jaringan akan ditekan oleh vitamin E. Terapi Vitamin E yang diberikan berfungsi sebagai antioksidan. Vitamin E berperan dalam memecah reaksi rantai radikal bebas dengan menghambat oksidasi asam lemak tak jenuh *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) di membran sel dengan menyumbangkan atom H⁺ dan menangkap radikal bebas yang akan menstabilkan ROS. *Reactive Oksigen Spesies* (ROS) dihambat oleh vitamin E sehingga

mencegah kerusakan membran sel sehingga inflamasi berkurang. Berkurangnya inflamasi ditandai dengan menurunnya sitokin TGF- β , menyebabkan terjadinya penghambatan proliferasi fibroblas pada ginjal, sehingga fibrosis ginjal dapat dihambat. Penghambatan yang terjadi membantu kerja vitamin E untuk memperbaiki kerusakan tubulus ginjal.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Vitamin E mampu menurunkan ekspresi TGF- β pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase.
2. Vitamin E mampu memperbaiki histopatologi tubulus ginjal pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal yang di induksi streptokinase.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2014-Lulus di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang dan di Laboratorium Patologi RS. Dr. Soetomo Surabaya untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 10 minggu. Berat badan tikus antara 120-170 gram. Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n-4 \geq 15$$

$$5n \geq 19$$

$$n \geq 19/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok negatif (kontrol), kelompok positif, Kelompok terapi I, kelompok terapi II, Kelompok terapi III (**Tabel 4.1**). Terapi vitamin E diberikan sebanyak 11x selang 1 hari yaitu pada hari ke-16, ke-18, ke-20, ke-22, ke-24, ke-26, ke-28, ke-30, ke-32 dan dilakukan pembedahan pada hari ke-33. Skema pemberian perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Perlakuan	Deskripsi
Kontrol Negative (P0)	Kelompok tikus sehat tanpa induksi Streptokinase dan tanpa terapi vitamin E
Kontrol Postif (fibrosis ginjal) (P1)	Kelompok tikus sakit hasil induksi Streptokinase dengan dosis 6000 IU pada hari pertama, ke-6, ke-11
Terapi 1 200 mg/kg BB	Kelompok tikus fibrosis ginjal yang mendapatkan terapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg BB
Terapi 2 300 mg/kg BB	Kelompok tikus fibrosis ginjal yang mendapatkan terapi vitamin E dengan dosis 300 mg/kg BB
Terapi 3 400 mg/kg BB	Kelompok tikus fibrosis ginjal yang mendapatkan terapi vitamin E dengan dosis 400 mg/kg BB

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Dosis vitamin E (*α -tokoferol*), dan dosis Streptokinase

Variabel tergantung : Ekspresi *Transforming growth Factor Beta* (TGF- β) dan histopatologi tubulus ginjal.

Variabel kendali : Jenis tikus, berat badan, umur, kandang, ruang penelitian, suhu, kelembaban, ventilasi dan jenis kelamin tikus.

4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 10 minggu dengan berat 150-250 gram, Streptokinase (Streptase), vitamin E (α -tokoferol) (Sigma Aldrich), Aquades, NaOH, HCl pekat, larutan PBS, NaCl-fisiologis, Formaldehid, Xylol, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, H₂O₂, antibodi primer menggunakan *rabbit anti-rat TGF- β* , dan antibodi sekunder *Goat anti rabbit Ig G biotin labeled*, Strepto Avidin Horse Peroksidase (SAHRP), *Diaminobenzinedine* (DAB), PFA 10%, *Tap Water*, Hematoxyllin, Eosin, Entellan, Parafin.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang pemeliharaan hewan coba, peralatan bedah (gunting dan pinset), gelas objek, pipet tetes, gelas ukur 100 ml, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), spuit 1 ml, rak tabung reaksi, penangas air, tabung *appendof*, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, mitokrom, neraca analitik, oven, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), mikroskop dan *autoclave*.

4.6 Metode Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus sebelum diberikan perlakuan untuk penelitian dilakukan aklimatisasi 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%.

Tikus ditempatkan dalam kandang pemeliharaan yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang terbuat dari bak plastik dan ditutupi dengan penutup berbahan kawat. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Preparasi Streptokinase

Streptokinase sediaan 1.500.000 IU dilarutkan dengan *ringer laktat* sebanyak 2 ml kemudian dihomogenkan (Stock I). Selanjutnya, diambil 1ml dan dilarutkan dengan ringer laktat sampai 5 ml dengan kandungan 750.000 IU (Stock II). Selanjutnya diambil 1ml dari Stock II untuk dijadikan stock III dengan kandungan 150.000 IU dalam 1 ml. Dosis yang diperlukan sebanyak 6000 IU maka, dalam 1 μ L terdapat kandungan streptokinase 150 IU, Sehingga didapatkan 40 μ L dengan kandungan 6000IU. Perhitungan larutan pada Lampiran 2.

4.6.3 Persiapan Vitamin E

Vitamin E yang dipakai adalah vitamin E yang diproduksi oleh SIGMA dengan sediaan 10 mg/ml. Vitamin E dengan dosis 200 mg/kg diambil sebanyak 20 μ L, vitamin E dengan dosis 300 mg/kg sebanyak 40 μ L, dan vitamin E dengan dosis 400 mg/kg sebanyak 50 μ L. Perhitungan dosis vitamin E pada lampiran 3.

4.6.4 Induksi Streptokinase dan Terapi Vitamin E

Perlakuan pada tikus dilakukan pada kelompok kontrol positif dengan induksi streptokinase sebanyak 6.000 IU secara intravena *coccygea* pada hari pertama, ke-6 dan ke-11. Pada kelompok terapi 1 induksi streptokinase secara intravena *coccygea* dengan dosis 6.000 IU pada hari pertama, ke-6 dan ke-11 kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg selama 22 hari selang 1hari, kelompok terapi II diinjeksi Streptokinase dosis 6.000 IU pada hari pertama, ke-6 dan ke-11 kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 300 mg/kg selama 22 hari selang 1 hari. Kelompok terapi III diinjeksi Streptokinase dengan dosis 6.000 IU diberikan hari pertama, ke-6 dan ke-11 kemudian diterapi vitamin E dengan dosis 400 mg/kg selama 22 hari selang 1 hari. Pemberian terapi vitamin E melalui sonde lambung.

4.6.5 Pengambilan Organ Ginjal

Pengambilan organ ginjal pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-33 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Langkah awal yang harus dilakukan adalah mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan posisi dorso ventral pada papan pembedahan, pembedahan dilakukan dengan membuka bagian abdomen.

Kemudian bagian ginjalnya secara keseluruhan diisolasi. Organ ginjal dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Kemudian ginjal dimasukkan dalam larutan *formaldehide* 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan immunohistokimia.

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Tubulus Ginjal

Semua kelompok dari tiap perlakuan, dibedah pada hari ke-16. Organ ginjal dicuci menggunakan NaCl fisiologis 0,9% untuk membersihkan organ dari sisa darah. Organ ginjal kemudian direndam dalam larutan PFA 10%. dengan cara organ ginjal direndam dalam larutan fiksatif paraformaldehid 10% kemudian dilakukan proses dehidrasi. Setelah itu sampel kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol untuk proses *clearing* selama semalam. Proses selanjutnya adalah infiltrasi menggunakan parafin xylol dan parafin dengan perbandingan 1 : 1 selama 30 menit. Jaringan kemudian diselubungi dengan parafin untuk membentuk blok parafin, kemudian jaringan dimasukkan ke dalamnya dan ditunggu sampai parafin memadat. Langkah selanjutnya adalah proses pemotongan dengan ketebalan 4 μ m. Irisan jaringan yang telah berbentuk pita kemudian ditempelkan pada gelas objek yang telah dilapisi Mayer Albumin. Proses selanjutnya yaitu deparafinasi. Preparat siap diwarnai dengan menggunakan pewarnaan HE. Skema kerja pembuatan preparat histologi terdapat pada Lampiran 4.

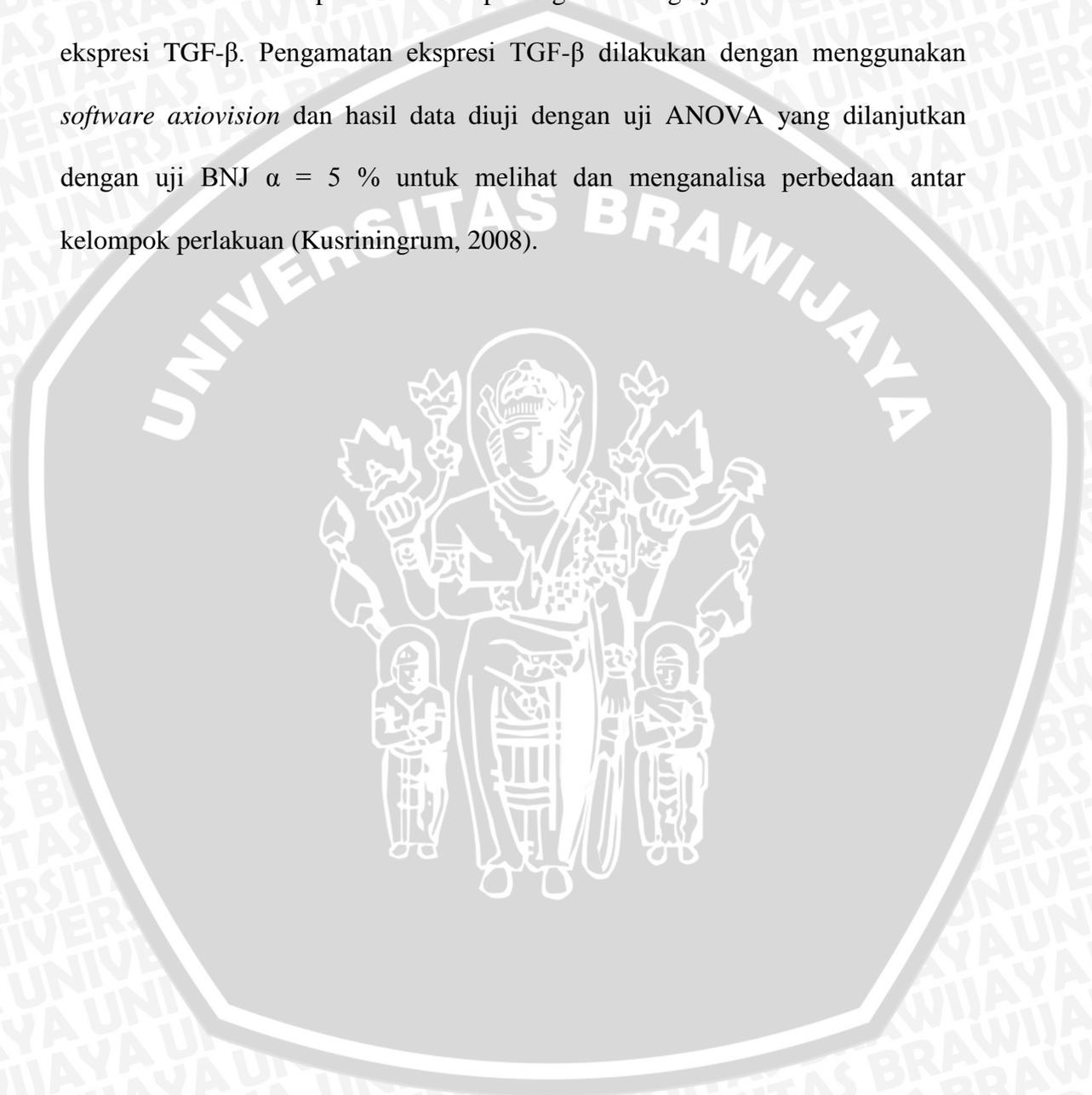
4.6.7 Menentukan Ekspresi TGF- β dengan Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah teknik untuk mendeteksi adanya antigen pada jaringan dengan menggunakan antibodi yang terikat enzim sehingga presipitat terwarnai dan lokasi sapat dilihat dibawah mikroskop. Preparat yang sudah diparafinasi 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 3x5 menit. Ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% selama 20 menit, dicuci dengan PBS selama 3x5 menit. Direndam dalam 5% BSA dalam PBS selama 30 menit dan dicuci dalam PBS selama 3x5 menit.

Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti rat TGF- β*) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Berikutnya direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*) selama 1 jam pada suhu 26°C. Dicuci kembali dengan PBS selama 3x5 menit. Ditambahkan SA-HRP selama 40 menit dan dicuci dengan PBS 3x5menit. Substrat DAB ditambahkan dan inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS 3x5 menit. Selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *hematoxylin* selama 5 menit pada suhu 26°C, lalu dicuci dengan air, dikering anginkan dan terakhir *mounting* dengan *entellan* dan pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Skema pembuatan preparat imunohistokimia TGF- β terdapat pada Lampiran 5.

4.7 Analisis Data

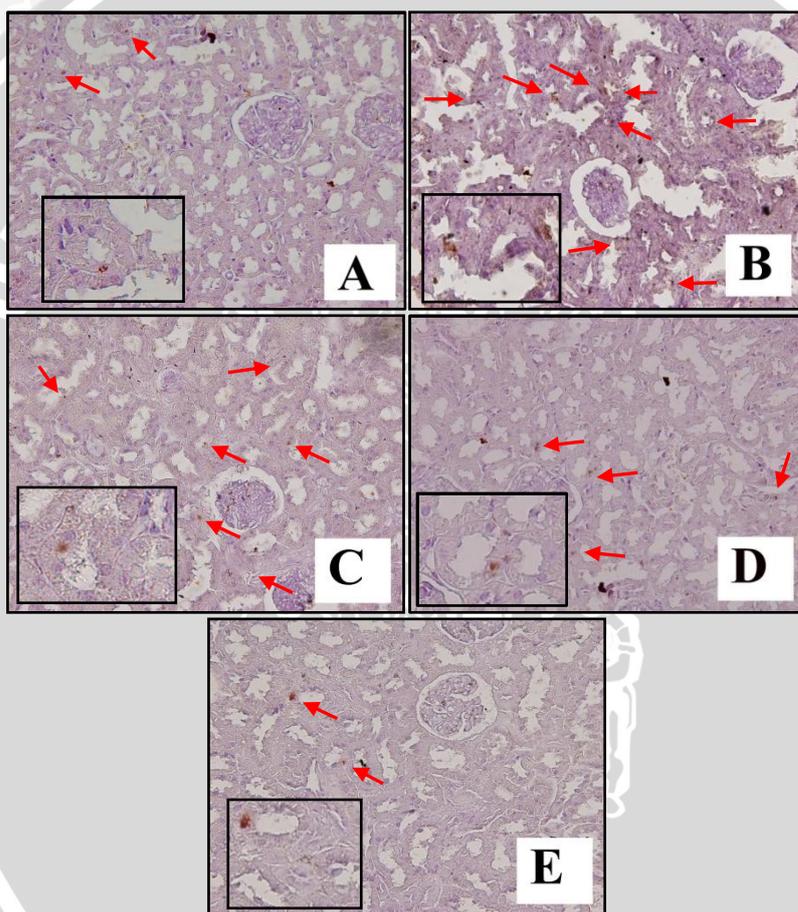
Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk histopatologi tubulus ginjal dan kuantitatif untuk ekspresi TGF- β . Pengamatan ekspresi TGF- β dilakukan dengan menggunakan *software axiovision* dan hasil data diuji dengan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji BNJ $\alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (Kusriningrum, 2008).



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase yang Diterapi dengan Vitamin E

Hasil Ekspresi TGF- β pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis ginjal setelah mendapat terapi vitamin E (**Gambar 5.1**)



Gambar 5.1 Ekspresi TGF- β pada tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal yang diterapi vitamin E (perbesaran 400x) dengan teknik imunohistokimia.

Keterangan : A = kelompok kontrol sehat; B = kelompok fibrosis ginjal; C = kelompok fibrosis ginjal terapi vitamin E dosis 200 mg/kg; D = kelompok fibrosis ginjal terapi vitamin E dosis 300 mg/kg; E = kelompok fibrosis ginjal terapi vitamin E dosis 400 mg/kg. (↑) ekspresi TGF- β

Pemberian streptokinase dengan dosis 6000 IU dapat menyebabkan fibrosis ginjal yang ditandai dengan tingginya ekspresi *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) pada preparat histologi hasil imunohistokimia (**Gambar 5.1**). *Transforming Growth Factor-Beta* merupakan sitokin proinflamatori yang meregulasi kerusakan sel dengan cara mengaktivasi EMT untuk mensintesis matriks ekstraseluler. *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) banyak ditemukan dalam sitoplasma tubulus ginjal.

Kelompok tikus kontrol menunjukkan ekspresi TGF- β yang sedikit. Kelompok tikus fibrosis ginjal menunjukkan ekspresi TGF- β yang paling banyak diantara kelompok perlakuan. Kelompok tikus terapi 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB menunjukkan ekspresi TGF- β yang lebih sedikit daripada kelompok tikus fibrosis ginjal. Kelompok tikus fibrosis yang diterapi vitamin E dosis 400 mg/kg BB menunjukkan ekspresi TGF- β yang lebih sedikit daripada kelompok tikus 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB. Ekspresi TGF- β pada kelompok tikus fibrosis yang diterapi vitamin E dosis 400 mg/kg BB mendekati kelompok tikus kontrol.

Timbulnya warna kecokelatan diakibatkan oleh proses pewarnaan imunohistokimia (IHK). Antigen pada jaringan ginjal akan berikatan dengan antibodi primer dan dilabeli antibodi sekunder yang berlabel biotin diikuti dengan penambahan SA-HRP dan kromagen berupa DAB. *Diaminobenzidine* (DAB) merupakan substrat yang menghasilkan warna kecokelatan. Warna coklat menandakan bahwa pada jaringan tersebut terdapat ekspresi TGF- β (Ramos, 2005). Hasil analisa ekspresi TGF β didapatkan dengan perhitungan rata-rata

persen area dari 5 kali lapang pandang yang dihitung menggunakan software *Axiovision* (**Tabel 5.1**). Perhitungan hasil peningkatan dan penurunan ekspresi TGF- β dapat dilihat pada Lampiran 8.

Tabel 5.1 Rata-Rata Ekspresi *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β)

Perlakuan	Rata-rata ekspresi TGF- β	Ekspresi TGF- β (%)	
		Peningkatan terhadap kelompok sehat(%)	Penurunan terhadap kelompok sakit(%)
Kontrol (Sehat)	0,34 \pm 0,15 ^a	-	-
Fibrosis ginjal (Sakit)	1,86 \pm 0,11 ^c	81,72	-
Terapi 1 (200mg/kg BB)	1,30 \pm 0,21 ^b	-	30,11
Terapi 2 (300mg/kg BB)	0,93 \pm 0,14 ^b	-	49,73
Terapi 3 (400mg/kg BB)	0,49 \pm 0,11 ^a	-	73,82

Keterangan : notasi yang berbeda menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Peningkatan ekspresi TGF- β berdasarkan pada kelompok negatif
Penurunan ekspresi TGF- β berdasarkan pada kelompok positif.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian vitamin E dapat menurunkan ekspresi TGF- β dengan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan. Kelompok fibrosis ginjal menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok sehat dan terapi. Hasil uji BNP menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap ekspresi TGF- β antara kelompok kontrol sehat dengan kelompok terapi 400 mg/kg BB (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan bahwa terapi vitamin E dengan dosis 400 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dan optimum sebagai terapi fibrosis ginjal.

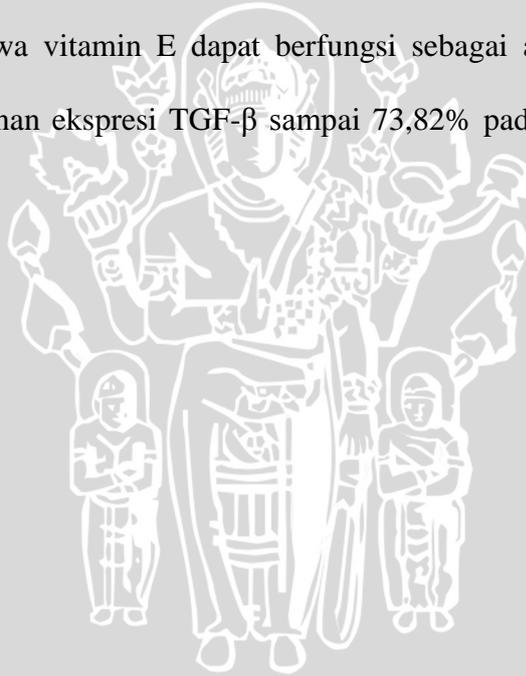
Ekspresi TGF- β meningkat pada kelompok fibrosis ginjal dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan induksi streptokinase memicu terjadinya inflamasi. Streptokinase yang induksikan akan berikatan dengan

plasminogen aktivator sehingga mengubah plasminogen menjadi plasmin. Adanya plasmin memicu teraktivasinya komplemen yang berperan sebagai respon terhadap inflamasi (Cho, 2010). Aktivasi komplemen merangsang makrofag untuk melakukan fagositosis. Hasil samping dari fagositosis adalah *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Produksi radikal bebas yang berlebih dibanding dengan antioksidan dapat mengakibatkan inflamasi yang berujung pada kerusakan jaringan (Hancock, 2001). Menurut Chen (2012) peningkatan ekspresi TGF- β pada ginjal mengindikasikan terjadinya proses inflamasi dan fibrosis pada daerah tersebut. TGF- β merupakan sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrosis yang mampu mengaktifkan patomekanisme biomolekuler yang mendasari progresifitas penyakit fibrosis ginjal, melalui mekanisme *Ephithel Mesenchimal Transition* (EMT) (Chen, 2012).

Terapi vitamin E dosis 200 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi TGF- β (**Tabel 5.1**). Hasil ini menunjukkan bahwa vitamin E sebagai antioksidan mampu mempengaruhi penghambatan fibrosis ginjal dengan menekan inflamasi. Peran *alfatokoferol* sebagai antioksidan mampu memecahkan rantai dari reaksi oksidatif sehingga membantu untuk menjaga dan melindungi membran sel dari kerusakan yang diakibatkan karena ROS. Dosis terapi 400 mg/kg BB adalah dosis efektif pada pemulihan fibrosis ginjal, karena secara statistik menunjukkan notasi yang sama dengan kelompok kontrol sehat dan mengalami penurunan ekspresi TGF- β sebesar 73,82%.

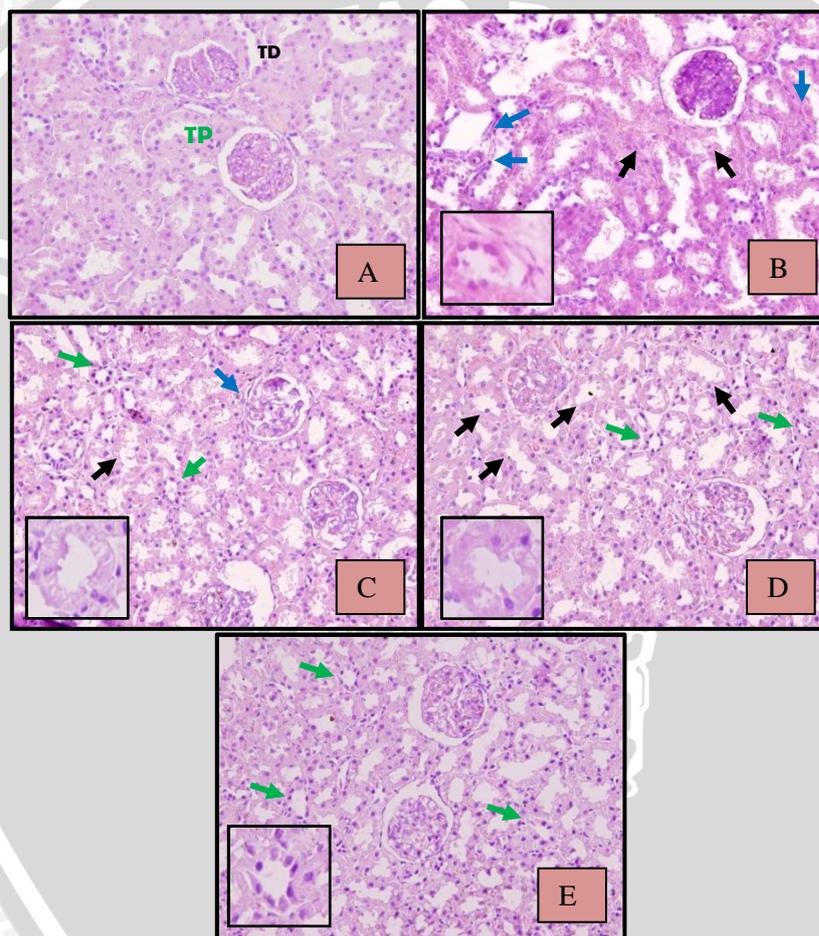
Vitamin E merupakan antioksidan primer yaitu senyawa yang mengakhiri rantai reaksi radikal bebas dengan mendonorkan ion atau elektron kepada radikal

bebas dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil (Iranloye, 2011). Vitamin E berfungsi sebagai *scavenger* radikal peroksil lipid yang dapat mencegah propagasi berantai. Vitamin E terletak di membran lipid dan akan berinteraksi cepat dengan hidroperoksida. Vitamin E bertindak sebagai antioksidan pemutus rantai dengan menyumbangkan hidrogen fenolik pada reaksi propagasi pada rantai ROO* dan menghasilkan radikal α -tokofereroksil. Selanjutnya radikal α -tokofereroksil bebas dengan mudah bereaksi dengan ROO* untuk mengakhiri peroksidasi lipid dengan membentuk produk non radikal. Hal ini membuktikan bahwa vitamin E dapat berfungsi sebagai antiinflamasi yang diikuti dengan penurunan ekspresi TGF- β sampai 73,82% pada terapi dosis 400 mg/kg BB.



5.2 Histopatologi Tubulus Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase yang Diterapi dengan Vitamin E

Hasil histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase yang diterapi oleh vitamin E dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin menunjukkan adanya perubahan pada setiap kelompok perlakuan (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2. Histopatologi tubulus ginjal tikus model fibrosis ginjal hasil terapi vitamin E dengan pewarnaan HE (400x)

Keterangan: (A) tikus kontrol sehat; (B) Tikus sakit; (C) tikus dengan dosis 200mg/kg; (D) Tikus dengan dosis 300mg/kg; (E) Tikus dengan dosis 400mg/kg. (TP)Tubulus Proksimal; (TD) Tubulus Distal; (↑) menunjukkan kerusakan pada sel; (↑) peningkatan *Extracellular Matrix*; (↑) perbaikan sel.

Kelompok tikus kontrol (A) menunjukkan gambar tubulus yang normal. Menurut Junquera (2007) tubulus kontortus proksimal dilapisi oleh epitel selapis kuboid. Apiks sel memiliki mikrovili dengan panjang ± 1 mikromili yang membentuk *brush border*. Tubulus kontortus distal dilapisi oleh epitel selapis kuboid. Sel sel tubulus proksimal lebih besar daripada tubulu distal. Lumen tubulus distal lebih besar karena sel tubulus distal lebih pipih.

Hasil Histopatologi kelompok fibrosis ginjal (B) menunjukkan adanya perubahan patologis dibandingkan terhadap kelompok kontrol (A). Terlihat adanya kerusakan sel epitel pada tubulus yang mengarah pada nekrosis. Nekrosis yang terlihat pada tubulus adalah inti sel sudah banyak menghilang, lumen tubulus terlihat lebih membesar dan sel tubulus proksimal tidak memiliki *brush border*. Nekrosis yang terjadi diakibatkan oleh tingginya radikal bebas yang tidak dapat dikontrol oleh antioksidan endogen. Radikal bebas yang tinggi pada jaringan mengakibatkan kerusakan membran sel sehingga mengakibatkan inflamasi pada sel. Menurut Davey (2005) nekrosis pada tubulus juga dapat terjadi karena pemberian bahan yang bersifat nefrotoksik. Proses patologis tersebut menunjukkan adanya fibrosis ginjal, menurut Eddy (2000) fibrosis ginjal ditandai dengan adanya *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT) yang secara histopatologis pada jaringan ginjal sel epitel akan tergantikan dengan sel yang berbentuk pipih dan runcing yaitu fibroblast. Fibroblast akan aktif memproduksi matrik ekstraseluler. Inflamasi yang berkelanjutan akan meningkatkan sintesis matriksekstra seluler. Deposisi matriks tersebut yang menyebabkan terjadinya penebalan terhadap sel (Hewitson, 2012).

Induksi streptokinase mengakibatkan plasminogen aktif menjadi plasmin di dalam darah ketika jumlah plasmin meningkat, ekspresi TGF- β juga meningkat. Peningkatan TGF- β secara langsung akan menekan dan menurunkan ekspresi E-cadherin, E-cadherin bertanggung jawab atas adhesi antar sel. Terjadinya penurunan E-cadherin maka mengakibatkan kerusakan sel tubulus ginjal. *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT) ini akan mendeferensiasi sel epitel yang rusak dengan fibroblas sehingga banyak ditemukan matriks ekstraseluler (Galluzzi, 2014)..

Hasil histopatologi tubulus ginjal tikus yang diterapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg BB (Gambar 5.1 D) dan dosis 300 mg/kg BB (Gambar 5.1 E) tidak ada perbedaan yang begitu terlihat. Kelompok terapi vitamin E 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB menunjukkan terjadi penurunan *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT). *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT) merupakan proses diferensiasi sel epitel rusak menjadi sel fibroblas (Lee, 2012). Pemberian terapi vitamin E dengan dosis 200 mg/kg BB dan 300 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.

Kelompok terapi dosis 400 mg/kg BB (**Gambar 5.2 E**) menunjukkan adanya penurunan EMT maupun kerusakan sel. Hal ini menunjukkan bahwa terapi vitamin E dengan dosis 400 mg/Kg BB yang mampu menghasilkan histopatologi tubulus ginjal yang mendekati kelompok kontrol sehat (A). Perbaikan histopatologi berupa regenerasi sel dan sel tubulus terlihat kompak.

Perbaikan sel oleh terapi antioksidan vitamin E mampu berikatan dengan radikal bebas sehingga proses peroksidasi *lipid bilayer* terhenti. Terhentinya peroksidasi *lipid bilayer* menghambat inflamasi yang terjadi sehingga mampu memperbaiki histopatologi tubulus ginjal.

Perbaikan jaringan tubulus pada ginjal terlihat setelah terapi vitamin E. Hal ini membuktikan bahwa vitamin E sebagai antioksidan berpotensi menghambat kerusakan ginjal. Vitamin E berperan sebagai *scavenger* dari *peroxyl radical* yang secara khusus melindungi PUFA dengan menghambat aktivitas *lipid peroxidase*. Vitamin E mendonorkan ion hidrogen dari gugus hidroksil (OH) yang mampu mengubah radikal peroksil menjadi radikal tokoferil yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Shah, 2007). *Reactive Oxygen Species* (ROS) dihambat oleh antioksidan sehingga kerusakan jaringan akan berkurang. Berkurangnya inflamasi ditandai dengan menurunnya sitokin TGF- β , menyebabkan terjadinya penghambatan proliferasi fibroblas pada ginjal, sehingga fibrosis ginjal dapat dihambat. Penghambatan yang terjadi membantu kerja vitamin E untuk memperbaiki kerusakan tubulus ginjal. Vitamin E diketahui menyebabkan apoptosis, metode tubuh normal dari penempatan sel yang rusak, sehingga vitamin E dapat membantu proses regenerasi sel yang rusak menjadi sel yang baru.

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terapi vitamin E pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal menurunkan ekspresi TGF- β . Dosis terapi 400 mg/kg BB adalah dosis efektif untuk terapi fibrosis ginjal.
2. Terapi vitamin E pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal dapat memperbaiki histopatologi tubulus ginjal yang ditandai dengan berkurangnya kerusakan epitel tubulus ginjal.

6.2 Saran

Perlu diadakan studi lanjutan tentang aplikasi penggunaan vitamin E untuk terapi atau pencegahan fibrosis ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. and A.H. Litchman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Saunder. Philadelphia.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington DC
- Bascands, J.L. and J. P. Schanstra. 2005. *Obstructive Nephropathy Insights From Genetically Engineered Animals*. *Kidney Int.* 68:925-937.
- Brigelius, F.R. 2003. Vitamin E and Drug Metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (3): 737 – 740.
- Bijanti, R., M.G.A. Yuliani, R.S. Wahjuni dan R.B. Utomo. 2010. *Patologi Klinik Veteriner*. 1st edition. Airlangga University Press. Surabaya : 59-62
- Chadenas and Packer. 2002. *Handbook of Antioxidants*, Second Edition Revised and Expanded. USA: Marcel Dekker Inc Calnek, B. 1997. *Immunohistokimia*. State university press, Ames
- Cho, M. H. 2010. Renal Fibrosis. *Korean Journal Nephrology*, 207: 737 – 740.
- Chatziantoniou, C. 2005. Insights Into The Mechanisms Of Renal Fibrosis: Is It Possible To Achieve Regression? *Am J Physiol Renal Physiol* 34 (2): 227-289.
- Chen and Jianchun. 2012. EGFR Signaling Promotes TGF β -Dependent Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23:215–224.
- Dellmann, H.D. and J.A. Eurell. 2006. *Textbook of Veterinary Histology*. Edition 6th. Blackwell Publishing. USA.
- Davey, P. 2005. *At A Glance Medicine*. Erlangga. Jakarta
- Eddy, A.A. 2000. *Molecular Basis of Renal Fibrosis*. *Pediatric Nephrology*. 15(3-4): 290-30.
- Eitenmiller R and Lee. J. 2012. *Vitamin E*. marcel dekker inc. 203-233
- Ramos-V, J.A. 2005. Technical Aspect of Imuhistochemistry. *Veterinary Pathology*, vol.42, no.4, pp. 405-426.

- Galluzzi, L., O. Kepp, S. Krautwald, and G. Kroemer. 2014. Molecular Mechanism Of Regulated Necrosis. Review Seminars In Cell And Developmetal Biology. Volume 35:24-32.
- Genovese, F., A. A. Manresa, D.J. Leeming, M.A. Karsdal and B. Petter. 2014. The Extracellular Matrix In The Kidney: A Source Of Novel Non-Invasive Biomarker of Kidney Fibrosis. International Review Of Fibrogenesis And Tissue Repair. BioMed central Ltd.
- Hancock, JT., R Desikin, and S.J. Neil. 2001. Role Of Reactive Oxygen Species In Cell Signalling Pathways.//<http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/11356180> [diakses 12 Juni 2013]
- Hirschberg, R. 2005. Wound Healing in the Kidney: Complex Interactions In Renal Interstitial Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 16: 9–11.
- Hewitson, D. 2009. Renal Tubulointestinal Fibrosis Common But Never Simple. *American Journal of Physiology* – Vol. 296 no. 6
- Hu, Kebin, M.M. Wendy and L. Youhua. 2008. *Novel actions of tissue-type plasminogen activator in chronic kidney disease*. *Frontiers in Bioscience* 13: 5174-5186.
- Iranloye, B.O. 2011. Garlic and Vitmain E Provide Antioksidant Defence In Tissue Of Female Rats Treates With Nikotine. *NIG. Journal Phisiol Science*. 26 : 103-107
- Kalluri, R. and R.A. Weinberg. 2009. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Invest*.119(6):1420–1428.
- Kalluri, R. and E.G. Neilson. 2003. Epithelial-Mesenchymal Transition And Its Implications. *J Clin Invest*.112:1776-1784.
- Kumar, V., S. Ramzi, C. Stanley, and L. Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins, Ed.7, Vol.1*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Junquiera and Carneiro. 2007. Text Book and Atlas Histology. Blackwell Science Ltd., USA. 1- 35, 250-489.
- Lee, K and C.M. Nelson. 2012. New Insights Into the Regulation Of Epithelial Mesenchymal Transtition and Tissue Fibrosis. *International Review of Cell and Molecullar Biology* 294:171-202.

- Lei, W., S. Doi, O. Togao, J.V. Pastor, G.B. John, R. Gotschall, S. Schiavi, and N. Yorioka. 2011. Klotho Inhibits Transforming Growth Factor-1 (TGF-1) Signaling and Suppressed Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286, No. 10.pp.8655-8665.
- Liu, Y. 2004. Epithelial To Mesenchymal Transition In Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, And Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1–12.
- Neuzil J, Tobias W, Andreas S, Min L, Georg O, Nina G, Goerge C. M, Robert J. C and Chistian W. 2001. Induction of cancer cell Apoptosis by α -tocopheryl succinate : Molecular Pathways and structural Requirements. *Jurnal FASEB*. Vol 15: 403-415
- Paul, C., W. James and C. Zhou. 2010. Case-Control Study of Risk Factors Associated with Feline and Canine Chronic Kidney Disease. *Journal America, Vet Med Int*.2010:957570
- Paul, W.E. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincot Williams and Wilkins Publisher. New York
- Pardede, S.O. 2009. *Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascaraestreptokokus*. Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM. Jakarta.
- Qin, W., A.C.K. Chung, X.R. Huang, X. Meng, D.S.C. Hui, C.Yu, J.J.Y. Sung, and H.Y. Lan. 2011. TGF- β /Smad3 Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol*. 22:1462-1474, 2011. Doi: 10.1682/ASN.2010121308.
- Sastrawan, P. I. G. dan K. Suwitra. 2008. Peran Hipoksia Pada Patogenesis Penyakit Ginjal. *Jurnal Penyakit Dalam*, Volume 9(1):75-84.
- Shah, A. 2007. *Ilmu Penyakit Dalam*. Buku Ajar Kedokteran Edisi 11. Jakarta: EGC, pp.249
- Schnaper, H. W. 2005. *Renal Fibrosis*. *Fibrosis Research: Methods and Protocols* 117-220
- Sihombing, M. dan S. Tuminah. 2011. Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal Veteriner* 12 (1): 58-64.
- Steiner, K. M and J. Horst. 2002. Dual Control Of Streptoknase And Streptolysin S Productionn By The Corv And Fascax Two –Component Regulator In

Streptococcus Dysgalactiae Subsp. *Equimilis*. *American society for microbiology*70 (7) : 3627-3636.

Sulyok, E. 2004. Acute Proliferative Glumeronephritis. Pada Avner ED, Harmor WE, Niadet p.Pediatric Nephrology. Edisi ke 5 Lippncot Williams and Wilkins Philadelphia : 601-613

Trihono, P.P. 2011. Peran Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Pada Penyakit Ginjal. *Jurnal Ilmu Kesehatan Anak* 13(1): 49-53.

Weber, M.L., V. Breitreutz and B. Rimbach. 2002. *Vitamin E Inhibits CD95 Ligand Expression and Protects T Cells from Activation - Induced Cell Death*. *J Clin Invest* 110:681-690.

William, Mc. 2007. Drug induced renal disease. *Elsevier Journal*. 15 : 1-11.

