

PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum gratissimum L.*) PADA MENCIT MODEL GLOMERULONEFRITIS AKUT (GNA) HASIL INDUKSI STREPTOKINASE TERHADAP KADAR IFN γ -GR1 LIMPA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR

SKRIPSI

Oleh:
HAFIZ MAULANA AHMAD
115130101111038



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum
gratissimum L.*) PADA MENCIT MODEL GLOMERULONEFRITIS
AKUT (GNA) HASIL INDUKSI STREPTOKINASE TERHADAP
KADAR IFN γ -GR1 LIMPA DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI HEPAR**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh
HAFIZ MAULANA AHMAD
115130101111038



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) pada Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Hasil Induksi Streptokinase Terhadap Kadar IFN γ -GR1 Limpa dan Gambaran Histopatologi Hepar

Oleh:
HAFIZ MAULANA AHMAD
115130101111038

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 9 Agustus 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes
NIP. 19820127 201504 2 002

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pendidikan Dokter Hewan
Universitas Brawijaya



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



LEMBARAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hafiz Maulana Ahmad

NIM : 115130101111038

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) Pada Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Hasil Induksi Streptokinase Terhadap Kadar IFN γ -GR1 Limpa dan Gambaran Histopatologi Hepar

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 9 Agustus 2018

Saya menyatakan,



(Hafiz Maulana Ahmad)
NIM. 115130101111038



repository.ub.ac.id

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) pada Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Hasil Induksi Streptokinase Terhadap Kadar IFN γ -GR1 Limpa dan Gambaran Histopatologi Hepar

ABSTRAK

Glomerulonefritis akut (GNA) merupakan penyakit yang disebabkan kompleks imun pada ginjal yang menyebabkan kerusakan dinding sel, meningkatnya permeabilitas membran, dan menurunnya filtrasi pada glomerulus. Streptokinase adalah protein *extracellular β -haemolytic streptococci* yang dapat menyebabkan GNA akibat reaksi hipersensitifitas tipe III. Penelitian bertujuan mengetahui kadar IFN γ serta perubahan histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*) model GNA hasil induksi streptokinase yang diterapi ekstrak etanol daun kemangi. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan metode *post test control design only*. Penelitian ini menggunakan mencit jantan 6-8 minggu, berat 20-25 gram yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Kontrol negatif, kontrol positif diinduksi streptokinase secara IM dengan dosis 2500 IU serta kelompok terapi dosis 400, 800 dan 1200 mg/kg BB peroral selama 14 hari. Data yang diamati dalam penelitian ini adalah produksi IFN γ -Gr1 limpa diukur menggunakan *flowcytometry* yang dianalisa secara statistik menggunakan *one way ANOVA* ($\alpha= 0,05$) dan histopatologi hepar dengan pewarnaan HE yang dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan terapi ekstrak etanol daun kemangi dosis 400mg/kg BB dapat menurunkan kadar IFN γ limpa secara signifikan ($p<0,05$) dan dapat menurunkan tingkat kerusakan pada organ hepar yang dilihat dari berkurangnya degenerasi hiropik pada sel-sel hepatosit. Kesimpulan dari penelitian ini pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi dapat digunakan sebagai terapi GNA.

Kata kunci: Glomerulonefritis Akut, Streptokinase, Ekstrak Etanol Daun Kemangi, IFN γ Limpa, Histopatologi Hepar

Effect of Basil Leaves Ethanol Extract (*Ocimum gratissimum L.*) on Mice Model of Acute Glomerulonephritis (GNA) Induced Streptokinase Against Spleen IFN γ -GR1 Levels and Liver Histopathology

ABSTRACT

Acute glomerulonephritis is an immune complex disease in kidney that causes damage to cell walls, increasing membrane permeability, and decreased glomerular filtration. Streptokinase is an extracellular protein β - haemolytic streptococci that can cause acute glomerulonephritis due to type III hypersensitivity reaction. This research aims to determine the level of IFN γ and histopathological changes of liver on mice of GNA model induced by streptokinase treated by basil leaf ethanol extract. This experimental study use a Completely Randomized Design with post test control design only. Using male mice 6-8 weeks old, weight 20-25 grams that was divided into five treatment groups: negative control, positive control induced streptokinase dose 2500 IU and dose therapy group 400, 800 and 1200 mg/kg BW peroral for 14 days. The observed parameters in this research are the production of IFN γ -GR1 of spleen measured using flowcytometry then analyzed statistically using one-way ANOVA ($\alpha= 0,05$) and histopathology of liver by HE staining that analyzed descriptively. The results showed that therapy of basil leaves ethanol extract of 400mg/kg BW could significantly decrease the IFN γ level of spleen ($p<0.05$) and can reduce liver damage rate seen from reduced hydropic change of hepatocytes. The conclusion from this research is that the ethanol extract of basil leaves can be used as therapy of acute glomerulonephritis

Keywords: Acute Glomerulonephritis, Streptokinase, Ethanol Extract of Basil Leaves, Spleen IFN γ , Liver Histopathology

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat, rahmat serta kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) pada Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Hasil Induksi Streptokinase Terhadap Kadar IFN γ -GR1 Limpa dan Gambaran Histopatologi Hepar”.

Penulisan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga pada kesempatan ini penulis dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materil secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini hingga selesai. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP selaku dosen pembimbing satu dan drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku dosen pembimbing dua yang senantiasa sabar dalam memberikan bimbingan maupun arahan yang sangat berguna dalam penyusunan skripsi serta waktunya demi terselesainya skripsi ini
2. drh. Indah Amalia Amri, M.Si dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si dan selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu dan memberi masukan serta sarannya demi penyempurnaan skripsi ini
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH tercinta
4. Dr. drh. Djoko Winarso, MS atas bimbingannya selama pengerjaan skripsi ini



5. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech selaku Ketua Program Studi Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan akademik
6. Keluarga tercinta terutama untuk orang tua yang telah begitu tulus memberikan semangat, dorongan dan doa yang bermanfaat bagi penulis
7. Keluarga Bebeluck yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun skripsi ini
8. Semua pihak yang telah membantu terselesainya skripsi ini yang tidak dapat penulis sebut satu persatu

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini berguna untuk menambah pengetahuan bagi penulis dan pembaca.

Malang, 9 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBARAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Glomerulonefritis Akut (GNA)	6
2.1.2 Pengertian	6
2.1.3 Patofisiologi	6
2.1.4 Peneguhan Diagnosa	8
2.1.5 Terapi	9
2.2 Daun Kemangi (<i>Ocimum gratissimum L</i>)	10
2.2.1 Klasifikasi	10
2.2.2 Deskripsi	11
2.2.3 Kandungan Kimia	12
2.2.3.1 Flavonoid	13
2.2.3.2 Tanin	14
2.2.3.3 Eugenol	15
2.3 Streptokinase	16
2.4 Interferon gamma (IFN γ)	17
2.5 Hepar	18

2.6 Mencit (<i>Mus musculus L.</i>).....	19
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konsep.....	21
3.2 Hipotesis Penelitian	25
BAB 4. METODE PENELITIAN	26
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	26
4.2.1 Alat.....	26
4.2.2 Bahan	27
4.3 Tahapan Penelitian.....	28
4.4 Prosedur Kerja	28
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	28
4.4.2 Rancangan Penelitian	29
4.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi	30
4.4.4 Preparasi Streptokinase	31
4.4.5 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis Akut	32
4.4.6 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Kemangi	33
4.4.7 Pengambilan dan Preparasi Organ Limpa dan Hepar	33
4.4.8 Menentukan produksi IFN γ -GR1 dengan <i>flowcytometry</i>	34
4.4.9 Perhitungan Sel dengan <i>Haemocytometer</i>	35
4.4.10 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar	35
4.4.11 Analisa Data	37
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
5.1 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis Akut Berdasarkan Kadar <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) dan Kreatinin Serum.....	38
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (<i>Ocinum gratissimum L.</i>) Terhadap Produksi IFN γ	41
5.3 Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (<i>Ocinum gratissimum L.</i>).....	45
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	52
6.1 Kesimpulan	52
6.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	60



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Rata-rata \pm SD Kadar BUN & Kreatinin Serum Pasca Induksi Streptokinase....	39
5.2 Rata-rata Kadar IFN γ – GR1 Limpa \pm SD & Hasil Uji Tukey ($\alpha=0,05$)	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Proses terjadinya jejas renal pada GNAPS	7
2.2 Tanaman Kemangi (<i>Ocimum gratissimum L.</i>).....	12
2.3 Struktur kimia flavonoid	13
2.4 Struktur kimia tanin.....	15
2.5 Struktur kimia eugenol.....	16
2.6 Struktur kimia Streptokinase.....	16
2.7 Mus musculus	20
5.3 Histopatologi hepar kontrol negatif perbesaran 400x	46
5.4 Histopatologi hepar kontrol positif perbesaran 400x.....	47
5.5 Histopatologi hepar terapi 1 dosis 400mg/kgBB perbesaran 400x	48
5.6 Histopatologi hepar terapi 2 dosis 800mg/kgBB perbesaran 400x	49
5.7 Histopatologi hepar terapi 3 dosis 1200mg/kgBB perbesaran 400x.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Kerangka Operasional Penelitian	61
2 Pembuatan Larutan Streptokinase	62
3 Perhitungan Dosis Terapi	63
4 Perhitungan Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Kemangi	64
5 Skema Perlakuan	65
6 Pemeriksaan Kadar Interferon Gamma (IFN γ) dengan <i>Flowcytometry</i> ..	66
7 Perhitungan Sel dengan <i>Haemocytometer</i>	67
8 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar	68
9 Surat Keterangan Identifikasi Tanaman Kemangi	70
10 Surat Keterangan Sehat Hewan Coba	71
11 Surat Keterangan Laik Etik Penelitian	72
12 Hasil Pengujian Kadar Bun Dan Kreatinin Serum Pasca Induksi Streptokinase	74
13 Hasil Analisa Statistik IFN γ -GR1	75
14 Perhitungan Persentasi Peningkatan dan Penurunan Kadar IFN γ -GR1....	78
15 Perhitungan Persentasi Peningkatan Kadar BUN dan Kreatinin Serum...	79
16 Gambar <i>Flowcytometry</i> Sel GR1- IFN γ	80



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
α	<i>alfa</i>
β	beta
μ l	mikroliter
$^{\circ}$ C	derajat celcius
%	persen
\pm	kurang lebih
ACE	angiotensin-converting enzyme
ANOVA	<i>analisis of varian</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APSGN	<i>Acute Post-Streptococcal Glomerulonefritis</i>
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
BB	Berat Badan
BW	<i>Body Weight</i>
cm	centimeter
GNA	Glomerulonefritis Akut
GNAPS	Glomerulonefritis Akut Pasca infeksi Streptokokus
Gr1	Granulocyte Receptor-1
HE	Hematoksilin Eosin
ICGN	<i>immune-complex glomerulonephritis</i>
INF- γ	<i>interferon gamma</i>
IM	intramuskular
IU	International Units
kDa	Kilodalton
kg	kilogram
mg	miligram
ml	mililiter
nm	nanometer
pH	<i>potential hydrogen</i>
PO	Peroral
RAL	Rancangan Acak Lengkap

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Glomerulonefritis adalah suatu terminologi umum yang menggambarkan adanya inflamasi pada glomerulus, ditandai oleh proliferasi sel-sel glomerulus (Noer, 2002). Glomerulonefritis akut (GNA) adalah suatu reaksi imunologis pada ginjal terhadap bakteri atau virus tertentu yang ditandai dengan hematuria yang timbul mendadak, hipertensi, edema dan penurunan fungsi ginjal. Penyebab GNA yang paling sering terjadi adalah infeksi bakteri streptokokus β hemolitikus grup A sehingga umumnya disebut glomerulonefritis akut pasca streptokokus (GNAPS) (Hidayah, 2013). Bakteri ini dapat mengeluarkan eksoprotein ekstraseluler aktif salah satunya yaitu streptokinase yang bekerja sebagai toksin sistemik dan berperan dalam patogenesis GNAPS (Pardede, 2009; Hu, 2008).

McWilliam (2007), menyebutkan bahwa streptokinase yang diinduksi pada hewan model dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas tipe III pada organ ginjal dan bersifat toksik pada hepar. Pada patogenesis GNAPS, streptokinase dalam tubuh akan membentuk kompleks imun dan terdeposit di membran basal glomerulus, mengaktifkan sitokin proinflamasi salah satunya $IFN\gamma$ (Pardede, 2009).

Hepar adalah organ yang bertanggung jawab dalam proses sintesis, penyimpanan, dan klirens senyawa endogen (Van Tellingen, 2003). Salah satu fungsi hepar adalah detoksifikasi, sehingga hepar sangat mudah menjadi sasaran utama ketoksikan (Guyton dan Hall, 2008).

Berdasarkan penelitian oleh Schneider *et al.* (2013) dari 501 anjing yang diduga mengidap penyakit glomerular, 241 (48,1%) diantaranya merupakan glomerulonefritis kompleks imun. Kejadian glomerulonefritis akut pasca streptokokus pada hewan lebih banyak terjadi pada anjing dan kucing, yaitu sekitar 55% pada anjing jantan dan rata-rata umur anjing yang rentan terhadap penyakit ini sekitar 4 – 8 tahun dan pada kucing menunjukkan kejadian penyakit tersebut 75% terjadi pada kucing jantan dan rata-rata umur kucing yang rentan terhadap glomerulonefritis akut sekitar 3 – 4 tahun (Brown, 2013).

Pengobatan terhadap *suspect* glomerulonefritis akut menghadapi berbagai kendala yang menyebabkan penyakit ini sulit diatasi antara lain biaya pengobatan yang terlampau tinggi dan fasilitas pengobatan yang kurang memadai sehingga penderita baik manusia maupun hewan yang tidak tertangani dengan baik. Hal ini mendorong peneliti untuk mencari pengobatan alternatif yang lebih mudah dan murah dengan pemberian obat herbal. Daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) yang telah diteliti kandungannya memiliki manfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, antimikroba, antilipidemik, antimalaria, antidiabetes dan imunomodulator (Kalabharathi, *et al.*, 2011).

Daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) memiliki kandungan yang bersifat antioksidan dan antiinflamasi yaitu eugenol, flavonoid, asam askorbat, asam palmitat, tannin, saponin, β - karoten dan β - sitosterol (Mishra, *et al.*, 2011). Zat bioaktif dari daun kemangi yang paling berperan sebagai antiinflamasi (inflamasi akut maupun kronik) yaitu flavonoid, tannin dan eugenol (Liu and Wang, 2011; Li, *et al.*, 2012; Parmar, *et al.*, 2012). Menurut Pattanayak, *et al.*

(2010) bahwa efek antiinflamasi eugenol, flavonoid dan tanin dapat menghambat kerusakan sel dengan cara menghambat akumulasi leukosit di situs inflamasi dan menurunkan aktivasi komplemen serta menghambat degranulasi neutrofil, sedangkan efek antioksidan bekerja dengan cara melindungi sel dari peroksidasi lipid sehingga menghambat pelepasan mediator inflamasi.

Berdasarkan data di atas, penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) dapat berpengaruh pada kadar interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) yang diproduksi oleh sel granulosit dan gambaran histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*) jantan model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terhadap penurunan kadar $\text{IFN}\gamma$ -GR1 pada mencit model GNA hasil induksi streptokinase?
2. Bagaimana pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terhadap gambaran histopatologi hepar mencit model GNA hasil induksi streptokinase?

1.3 Batasan Masalah

1. Penelitian ini menggunakan mencit jantan dimana kondisi biologisnya lebih stabil bila dibandingkan dengan mencit betina yang kondisi biologisnya dipengaruhi oleh masa siklus estrus dan hormon yang mempengaruhi (Muliani, 2011). Mencit sejumlah 20 ekor, usia 6-8 minggu dengan berat badan 20-25 gram (Kusumawati, 2004), yang didapatkan dari Laboratorium

Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan telah mendapat surat keterangan sehat dari Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kabupaten Malang nomor: 518.11/402/421.118/2014. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat layak etik oleh tim Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya nomor: 328-KEP-UB.

2. Streptokinase yang digunakan diinduksi secara intramusukular (IM) dengan dosis 2500 IU/ekor mencit, diberikan pada hari keenam dan hari kesepuluh. Interval pemberian pertama dan kedua yaitu empat hari. Apabila lebih dari lima hari akan meningkatkan kemungkinan resistensi karena adanya antibodi antistreptokinase (Beacon pharmaceuticals, 2009). Penggunaan dosis 2500 IU dapat memberikan efek GNA yang ditandai dengan BUN dan kreatinin meningkat secara signifikan.
3. Daun kemangi (*Ocimum gratissimum* L.) yang didapatkan dari pasar tradisional Blimbing Malang telah mendapatkan keterangan determinasi dari Laboratorium Taksonomi, Struktur, dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.
4. Dosis ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum* L.) dengan dosis bertingkat 400 mg/kg BB, 800 mg/kg BB dan 1200 mg/kg BB diberikan secara per oral (PO) berdasarkan kelompok perlakuan selama 2 Minggu (Gautam dan Goel, 2014).
5. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah ekspresi IFN γ dengan menghitung jumlah sel granulosit (neutrofil) yang mengekspresikan IFN γ

dengan uji *flowcytometry* dan gambaran histopatologi hepar yang dianalisa secara deskriptif.

1.4 Tujuan penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terhadap penurunan kadar IFN γ -GR1 pada mencit model GNA hasil induksi streptokinase.
2. Untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terhadap gambaran histopatologi hepar pada mencit model GNA hasil induksi streptokinase.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terhadap mencit (*Mus musculus*) model Glomerulonefritis Akut hasil induksi streptokinase berdasarkan kadar IFN γ -GR1 limpa dan histopatologi hepar.
2. Manfaat aplikatif
Memberikan informasi tentang penggunaan terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) sebagai referensi atau acuan dalam penelitian selanjutnya terhadap penyakit lainnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Glomerulonefritis Akut (GNA)

2.1.1 Pengertian

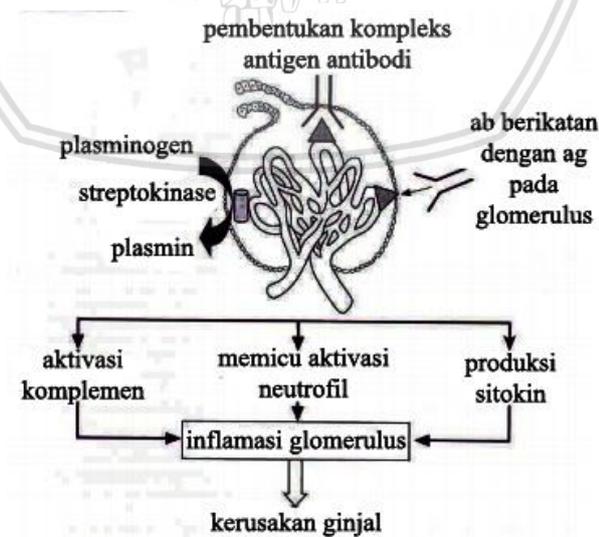
Glomerulonefritis merupakan suatu istilah yang dipakai untuk menjelaskan berbagai jenis penyakit ginjal yang mengalami proliferasi dan inflamasi glomerulus yang disebabkan oleh suatu mekanisme imunologis. Sedangkan istilah akut (glomerulonefritis akut) mencerminkan adanya korelasi klinik selain menunjukkan adanya gambaran etiologi, patogenesis, perjalanan penyakit dan prognosis (Berhman *et al*, 2004)

Glomerulonefritis adalah suatu terminologi umum yang menggambarkan adanya inflamasi pada glomerulus, ditandai oleh proliferasi sel-sel glomerulus akibat proses imunologi. Glomerulonefritis terbagi atas akut dan kronis. Glomerulonefritis merupakan penyebab utama terjadinya gagal ginjal tahap akhir dan tingginya angka morbiditas individu muda ataupun dewasa (Noer, 2002).

2.1.2 Patofisiologi

Menurut Kowalak dkk. (2011), glomerulonefritis akut terjadi karena terjadi reaksi ikatan antara antigen dan antibodi di dalam membran kapiler glomerulus sesudah terjadinya infeksi oleh bakteri *streptococcus beta – hemolyticus group A*. Patofisiologi dari glomerulonefritis akut merupakan reaksi hipersensitivitas tipe III (Subowo, 2010). Streptokinase adalah protein yang disekresikan oleh bakteri streptokokus, terlibat dalam penyebaran bakteri dalam jaringan karena mempunyai kemampuan memecah plasminogen menjadi plasmin (Golan *et al*, 2008).

Streptokinase sebagai antigen akan diikat oleh antibodi tubuh dan akan mengendap pada glomerulus ginjal (Nordstrand *et al.*, 1998). Hal ini diperkuat oleh lanjutan penelitian Nordstrand *et.al* (2000) bahwa peran streptokinase dalam patogenesis APSGN (*Acute Post-Streptococcal Glomerulonefritis*) telah didukung oleh penggunaan model tikus dan turunannya strain NZ131 memungkinkan adanya deposisi komplemen C3a dan C5a yang teraktivasi karena adanya kompleks imun pada glomerulus. Streptokinase yang masuk akan mengendap pada glomerulus ginjal. Kemudian akan diikat oleh antibodi sehingga membentuk kompleks antigen antibodi. Terbentuknya plasmin sebagai akibat pemecahan plasminogen oleh streptokinase yang akan mengaktivasi reaksi kaskade komplemen. Adanya ikatan antigen antibodi pada jaringan akan menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe III. Maka imunitas tubuh akan merespon dengan adanya aktivasi komplemen C3a dan C5a, influks neutrofil serta sitokin akan diproduksi. Ilustrasi proses terdapat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Proses terjadinya jejas renal pada GNAPS (Smith, 2003).

Komplek antigen antibodi ini mengaktifkan mediator biokimiawi inflamasi seperti komplemen, leukosit dan fibrin. Komplemen yang diaktifkan akan menarik sel-sel neutrofil serta monosit untuk memakan kompleks imun dan bersama dengan trombosit yang digumpalkan melepas berbagai bahan seperti protease, kolagenase dan bahan vasoaktif sehingga terjadi perdarahan dan nekrosis jaringan setempat sehingga meningkatkan permeabilitas membran glomerulus dan menimbulkan adanya inflamasi (Pardede, 2009).

Dari patomekanisme tersebut gejala klinis yang sering ditemukan berupa hematuria, kadang dijumpai edema pada daerah sekitar mata atau seluruh tubuh. Gambaran GNAPS yang paling sering ditemukan adalah hematuria, oligouria, edema dan hipertensi. Gejala – gejala umum yang berkaitan dengan permulaan penyakit seperti rasa lelah, anoreksia, demam, mual, muntah dan sakit kepala (Noer, 2002).

2.1.3 Peneguhan Diagnosa

Penegakan diagnosa dapat dilakukan dengan mengetahui anamnesa hewan seperti dari gejala klinis serta beberapa jenis pemeriksaan penunjang.

1. Gejala klinis yang tampak dari hewan yang mengalami glomerulonefritis seperti sakit didaerah punggung hewan, hematuria, proteinuria, hipertensi, edema pada wajah, telapak kaki serta abdomen, hewan lemah, anoreksia dan muntah.
2. Pemeriksaan urinalisis, pemeriksaan urin rutin ditemukan hematuria mikroskopis ataupun makroskopis (*gross*), proteinuria biasanya sesuai dengan derajat hematurai. Pemeriksaan mikroskopis sedimen urin ditemukan eritrosit

dismorfik dan kas eritrosit, kas granular dan hialin (merupakan tanda karakteristik dari lesi glomerulus) serta mungkin juga ditemukan leukosit. Untuk pemeriksaan sedimen urin sebaiknya diperiksa urin segar pagi hari (Smith, 2003).

3. Pemeriksaan darah kadar ureum dan kreatinin serum meningkat dengan tanda gagal ginjal seperti hiperkalemia, asidosis, hiperfosfatemia dan hipokalsemia.
4. Pada USG ginjal terlihat besar dan ukuran ginjal yang biasanya normal. Bila terlihat ginjal yang kecil, mengkerut atau berparut, kemungkinannya adalah penyakit ginjal kronik yang mengalami eksaserbasi akut. Gambaran ginjal pada USG menunjukkan peningkatan echogenisitas yang setara dengan echogenisitas parenkim hepar. Gambaran tersebut tidak spesifik dan dapat ditemukan pada penyakit ginjal lainnya (Smith, 2003).

2.1.4 Terapi

Pengobatan yang ideal untuk glomerulonefritis ditentukan dengan mengidentifikasi adanya infeksi, inflamasi atau penyakit kanker sebagai dasar yang memengaruhi sistem kekebalan tubuh dengan cara membentuk kompleks imun yang terjebak dalam glomeruli (Hilmanto, 2007). Sementara Chen *et al.* (2004) menyatakan berbagai pengobatan telah dilakukan untuk mengatasi proses peradangan glomerulus pada fase akut, termasuk penggunaan obat mikofenolat mofetil (*MMF*), *rapamycin*, anti-adhesi imun dan anti-molekul ko-stimulasi serta obat anti-inflamasi berupa anti-siklooksigenase-2.

Menurut Brown (2013) beberapa pengobatan umum untuk glomerulonefritis termasuk pada anjing maupun kucing yaitu obat immunosupresif

(mycophenolate, azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine) untuk menekan pembentukan kompleks imun. Antitrombic (aspirin) dengan dosis yang rendah sekitar 2.5-5 mg/kg per hari peroral pada anjing tetapi tidak diberikan untuk kucing untuk mencegah pembekuan pada glomerulus. Enzyme (ACE) inhibitor angiotensin-converting seperti benazepril dan enalapril dengan dosis 0.5 mg/kg, PO, 1 kali/hari pada kucing dan anjing untuk meminimalkan kehilangan protein dalam urin dan membantu mengontrol tekanan darah dan suplemen asam lemak omega-3 untuk membantu mengurangi respon inflamasi dan mencegah pembekuan serta diet protein dan fosfor yang tepat.

2.2 Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*)

2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi Tanaman kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) menurut Seidemann (2005) yaitu:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: <i>Ocimum</i>
Spesies	: <i>Ocimum gratissimum L.</i>

2.2.2 Deskripsi

Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) adalah tumbuhan yang daunnya biasa dimakan sebagai lalap. Tumbuhan yang termasuk ke dalam famili Lamiaceae ini memiliki aroma daun yang khas serta kuat, namun lembut dengan sentuhan aroma limau. Di Indonesia, tanaman kemangi banyak ditemukan di daerah Sumatera, Jawa, dan Maluku. Namun, banyak dibudidayakan di daerah Jawa Barat untuk dicari kandungan minyak atsirinya.

Di Indonesia genus *ocimum* yang dikenal adalah *Ocimum gratissimum*. Kemangi merupakan tanaman semak semusim dengan tinggi 30-150 cm batangnya berkayu, segi empat, beralur, bercabang, dan memiliki bulu berwarna hijau (Hadipoentyanti dan Sri, 2008). Menurut Raimo dan Holm (2005) tanaman kemangi memiliki daun tunggal, berwarna hijau, dan memiliki pertulangan menyirip. Letak daun berhadapan, tangkai daun berwarna hijau dan panjangnya antara 0,5 – 2 cm. Helai daun berbentuk bulat telur, ujungnya meruncing dan pangkalnya tumpul, serta tampak menggelombang. Pada sebelah menyebelah ibu tulang daun terdapat 3 – 6 tulang cabang. Tepi daun sedikit bergerigi dan terdapat bintik-bintik serupa kelenjar. Gambar tanaman ini dapat dilihat pada Gambar 2.2 berikut.



Gambar 2.2 Tanaman Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) (Seidemann, 2005)

Bunga kemangi tersusun pada tangkai bunga berbentuk menegak. Bunganya jenis hemafrodit, berwarna putih dan berbau sedikit wangi. Bunga majemuk berkarang dan di ketiak daun ujung terdapat daun pelindung berbentuk elips atau ulat telur dengan panjang 0,5-1 cm. Kelopak bunga berbentuk bibir, sisi luar berambut kelenjar, berwarna ungu atau hijau, dan ikut menyusun buah (Sudarsono dkk., 2002).

2.2.3 Kandungan Kimia

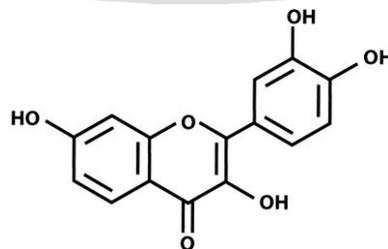
Berdasarkan penelitian-penelitian pada genus *Ocimum*, tanaman ini mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, triterpenoid, dan minyak atsiri (Sahouo *et.al.*, 2003). Menurut Tanko *et.al* (2012) kandungan ekstrak daun kemangi (*Ocimum Gratissimum*) aktifitas antiinflamasi alkaloids, saponins, tannins dan flavonoids pada mencit dan tikus terhadap edema yang disebabkan oleh formalin pada tikus dibandingkan dengan kelompok kontrol mengalami penurunan yang signifikan. Kandungan bioaktif dari daun kemangi

yang paling berperan sebagai antiinflamasi (inflamasi akut maupun kronik) yaitu flavonoid, tannin dan eugenol (Liu *et al.*, 2011). Selain itu, Daun kemangi dapat digunakan untuk mencegah formasi radikal bebas dan telah digunakan dalam pengobatan arthritis, nyeri otot, dan reumatik (Mishra dan Sanjay, 2011).

Senyawa fenolik seperti flavonoid, dan tannin yang juga terkandung dalam daun kemangi merupakan antioksidan primer maupun sekunder yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi lebih lanjut dengan cara mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas sehingga dapat menghambat terbentuknya radikal peroksida pada tahap propagasi (Grassi *et.al*, 2010).

2.2.3.1 Flavonoid

Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa polifenol tanaman yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan dan dalam berbagai konsentrasi. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon (Ledgard, 2006), struktur kimia dapat dilihat pada Gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3 Struktur kimia flavonoid (Ledgard, 2006)

Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya inflamasi yaitu pada konsentrasi tinggi dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi

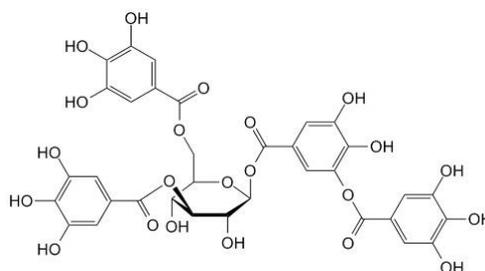
enzim lisosom dari membran dengan memblok jalur siklooksigenase, jalur lipoksigenase, dan fosfolipase A₂, sementara konsentrasi rendah hanya memblok jalur lipoksigenase. Asam arakidonat dari sel inflamasi yang terhambat akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan lipoksigenase, yang akhirnya menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, tromboksan, hidroperoksida dan leukotrin (Sabir, 2003).

Menurut Haryani, dkk (2012) dan Naibaho, dkk (2013) bahwa daun kemangi memiliki kandungan flavonoid bersifat anti inflamasi yang dapat mengurangi rasa sakit apabila terjadi pendarahan atau pembengkakan pada luka. Selain itu, flavonoid bersifat sebagai antibakteri dan antioksidan yang dapat meningkatkan kerja sistem imun dan membantu proses penyembuhan luka.

Gugus fungsi pada senyawa flavonoid dapat berperan sebagai penangkap radikal bebas hidroksi (OH) sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein, dan DNA dalam sel. Kematian sel hepar pun dapat dicegah. Kemampuan flavonoid dalam menangkap radikal bebas ini 100 kali lebih efektif dibandingkan 25 vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibandingkan vitamin E (Shenouda dan Vita, 2007).

2.2.3.2 Tanin

Tanin merupakan senyawa inti berupa glukosa yang dikelilingi oleh lima gugus ester galoil atau lebih dengan inti molekulnya berupa senyawa dimer asam galat, yaitu asam heksahidroksidifenat yang berikatan dengan glukosa (Harborne, 2006) seperti Gambar 2.4 berikut.

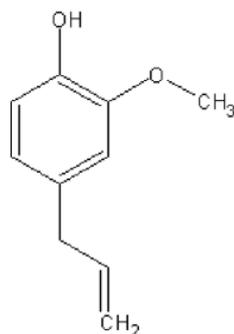


Gambar 2.4 Struktur kimia tanin (Ledgard, 2006).

Tanin mempunyai efek farmakologis dan fisiologis yang berasal dari senyawa kompleks. Pembentukan ini didasari dari rantai hidrogen dan interaksi hidrofobik antara tanin dan protein. Tanin juga mempunyai manfaat sebagai antioksidan yang bisa mencegah berbagai penyakit termasuk kanker. Hal ini karena tannin merupakan bagian dari senyawa fenolik yang bersifat antioksidan (Sumono dan Wulan, 2003).

2.2.3.3 Eugenol

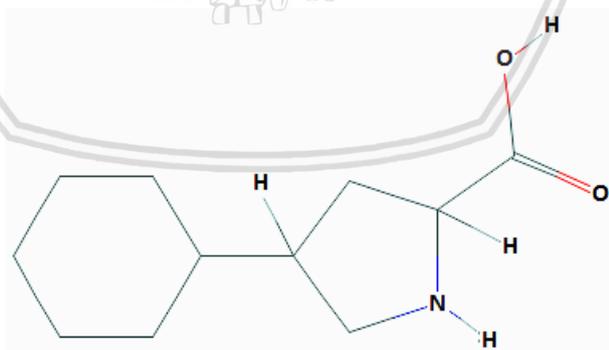
Eugenol adalah fenilpropena, suatu guaiakol rantai-bersubstitusi alil. Eugenol merupakan anggota dari kelas senyawa kimia fenilpropanoid, struktur kimia eugenol dapat dilihat pada Gambar 2.5. Eugenol yang merupakan penyusun minyak atsiri dilaporkan dapat menghambat agregasi platelet dengan cara menghambat pembentukan tromboksan sehingga juga berperan dalam efek antiinflamasi (Srivastava, 2003). Eugenol juga dapat menghambat aktivitas PGH sintase karena berkompetisi dengan asam arakhidonat pada sisi aktif PGH sintase sehingga menghambat pembentukan PG (Thompson dan Eling, 2009).



Gambar 2.5 Struktur kimia eugenol (Ledgard, 2006)

2.3 Streptokinase

Streptokinase adalah protein ekstraseluler yang memiliki berat molekul 46 kDa, terdiri dari 414 asam amino, diproduksi oleh semua strain streptokokus grup A. Seperti yang terlihat pada Gambar 2.6 streptokinase ini memiliki rumus kimia $C_{11}H_{19}NO_2$. Streptokokus grup A dapat memproduksi dua jenis streptokinase imonogenik yaitu streptokinase yang dapat mengubah plasminogen menjadi plasmin dan streptokinase yang mengubah C3 menjadi C3a yang merupakan suatu faktor kemotaktis (Gerber, 2004).



Gambar 2.6 Struktur kimia Streptokinase (Gerber, 2004)

Streptokinase menunjukkan aktivitas maksimum pada pH sekitar 7,5 dan pH isoelektrik pada 4,7, serta protein ini tidak mengandung cystine, sistein, fosfor, terkonjugasi oleh karbohidrat dan lemak (Renzo *et al.*, 2001). Menurut Smith

(2003) beberapa penelitian pada model binatang dan penderita Glomerulonefritis Akut Pasca infeksi Streptokokus (GNAPS) menduga yang bersifat antigenik adalah M protein, endostreptosin, cationic protein, Exo-toxin B, nephritis plasmin-binding protein dan streptokinase.

Streptokinase mengaktivasi plasminogen dengan cara tidak langsung yaitu dengan bergabung terlebih dahulu dengan plasminogen untuk membentuk kompleks aktivator. Selanjutnya kompleks aktivator tersebut mengkatalisis perubahan plasminogen menjadi plasmin. Apabila plasmin telah aktif maka enzim plasmin tersebut dengan mendegradasi (menghancurkan protein pembeku atau penggumpal darah. Streptokinase telah digunakan sebagai obat untuk mengatasi penyakit akibat pembekuan atau penggumpalan darah dalam tubuh (Donnan *et al.*, 2006).

Menurut Nortstrand *et al* (1998), pada ginjal mencit yang diinduksi dengan Streptokokus strain nefritogenik NZ131 dan EF514 terlihat adanya deposisi streptokinase pada glomerulus yang terdeteksi setelah 4 hari setelah infeksi. Sementara pada ginjal mencit yang diinduksi dengan Streptokokus strain nonnefritogenik S84, tidak terlihat adanya deposisi streptokinase. Deteksi streptokinase pada ginjal meningkat sejalan dengan derajat hiperselularitas glomerulus, sehingga semakin banyak deposisi pada glomerulus maka tingkat kerusakan glomerulus semakin besar.

2.4 Interferon gamma (IFN γ)

IFN γ pertama kali diidentifikasi pada tahun 1960 karena aktivitas antivirusnya yang khas terhadap virus Sindbis pada kultur leukosit manusia yang

distimulasi oleh fitohemagglutinin. Gen IFN γ manusia terletak pada kromosom 12 dan gen tikus pada kromosom 10 (Akdis *et al.*, 2011). IFN γ adalah sitokin pleiotropik (satu sitokin bekerja terhadap berbagai jenis sel yang menimbulkan berbagai efek) yang penting dalam imunitas *innate* (bawaan) dan imunitas adaptif. Fungsi IFN γ yaitu sebagai aktifator makrofag yang utama, serta menstimulasi sel NK (natural killer) dan neutrofil. IFN γ juga menginduksi efek antiviral, antiproliferatif, dan immunomodulator pada banyak sel target (Rimoin *et al.*, 2013; Bradshaw dan Dennis, 2009).

2.5 Hepar

Hepar merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh. Hepar mencit terletak pada bagian paling kranial dari abdomen tepat di belakang diafragma (Dyce *et al.*, 2002). Hepar merupakan kelenjar eksokrin karena mensekresi cairan empedu yang dialirkan ke dalam duodenum. Selain itu juga merupakan kelenjar endokrin dan penyaring darah. Hepar mempunyai fungsi antara lain pembentukan dan sekresi empedu, metabolisme kolesterol dan lemak detoksifikasi berbagai macam obat dan racun dan membersihkan bakteri dari dalam darah (Lumongga, 2008).

Hepar mencit terdiri dari 4 lobus yang menyatu pada bagian dorsal, yaitu lobus median yang dibagi menjadi kiri dan kanan, lobus lateral kiri, lobus lateal kanan yang dibagi secara horizontal menjadi anterior dan posterior dan lobus kaudal yang terdiri dari bagian dorsal dan ventral. Organ ini diselubungi oleh kapsula fibrosa yang dilindungi peritoneum visceral (Martini *et al.*, 2014). Lobus hepar terdiri dari banyak unit fungsi hepar yang disebut lobulus. Lobulus berisi sel epitel khusus yang disebut hepatosit yang tersusun tidak teratur, bercabang-

cabang dan selnya saling berhubungan mengelilingi vena sentralis. Pada kapiler terdapat celah garis endotel yang disebut sinusoid yang merupakan tempat perlintasan darah. Pada sinusoid terdapat sel fagositosis yang disebut sel Kuppfer yang berfungsi menghancurkan leukosit dan sel darah merah yang rusak, bakteri dan benda asing lain pada aliran pembuluh darah vena dari traktus gastrointestinalis (Tortora, 2005). Saluran portal dibentuk oleh kira-kira tiga sampai enam lobulus (Frappier dan Eurell, 2006).

Kondisi hepar bergantung pada aliran darah dan susunan empedu. Perbandingan aliran darah ke parenkim sama dengan bagian hepar lainnya. Bila aliran darah dan saluran empedu rusak pada salah satu bagian, parenkim dari bagian tersebut akan mengalami atrofi. Perubahan-perubahan pada hepar terjadi sebagai respon dari kerusakan vaskular atau empedu (Maxie, 2015).

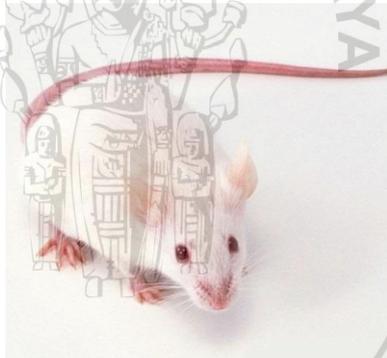
2.6 Mencit (*Mus musculus L.*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan yang paling umum digunakan sebagai hewan coba. Hal ini dikarenakan mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat tinggi dan mudah dalam penanganannya (Muliani, 2011). Jumlah anak per kelahiran mencapai 6-10 ekor dengan masa bunting yang pendek (19-21 hari) sehingga satu mencit betina dapat beranak 5-10 kali per tahun dan harga yang relatif murah (Malole dan Pramono, 2000).

Mencit memiliki variasi genetik yang cukup besar dan struktur organ reproduksi jantan yang hampir sama dengan manusia. Hormon yang berperan dalam sistem reproduksi mencit, juga sama dengan manusia (Smith dan

Mangkoewidjojo, 1998). Menurut Mulyani (2011) Penggunaan mencit jantan sebagai hewan coba dilakukan karena kondisi biologisnya lebih stabil bila dibandingkan dengan mencit betina yang kondisi biologisnya dipengaruhi oleh masa siklus estrus dan hormon yang mempengaruhi.

Mencit tergolong dalam ordo rodentia. Mencit (Gambar 2.7) merupakan mamalia dengan ekor panjang melebihi tubuh. Ukuran panjang ekor pada betina lebih panjang dibandingkan pada jantan. Mencit dewasa jantan umumnya memiliki berat badan 20-40 gram, sedangkan mencit dewasa betina 25-40 gram. Kematangan seksual mencit jantan terjadi pada usia sekitar 5-7 minggu dan usia sekitar 3 minggu pada mencit betina (Muliani, 2011).

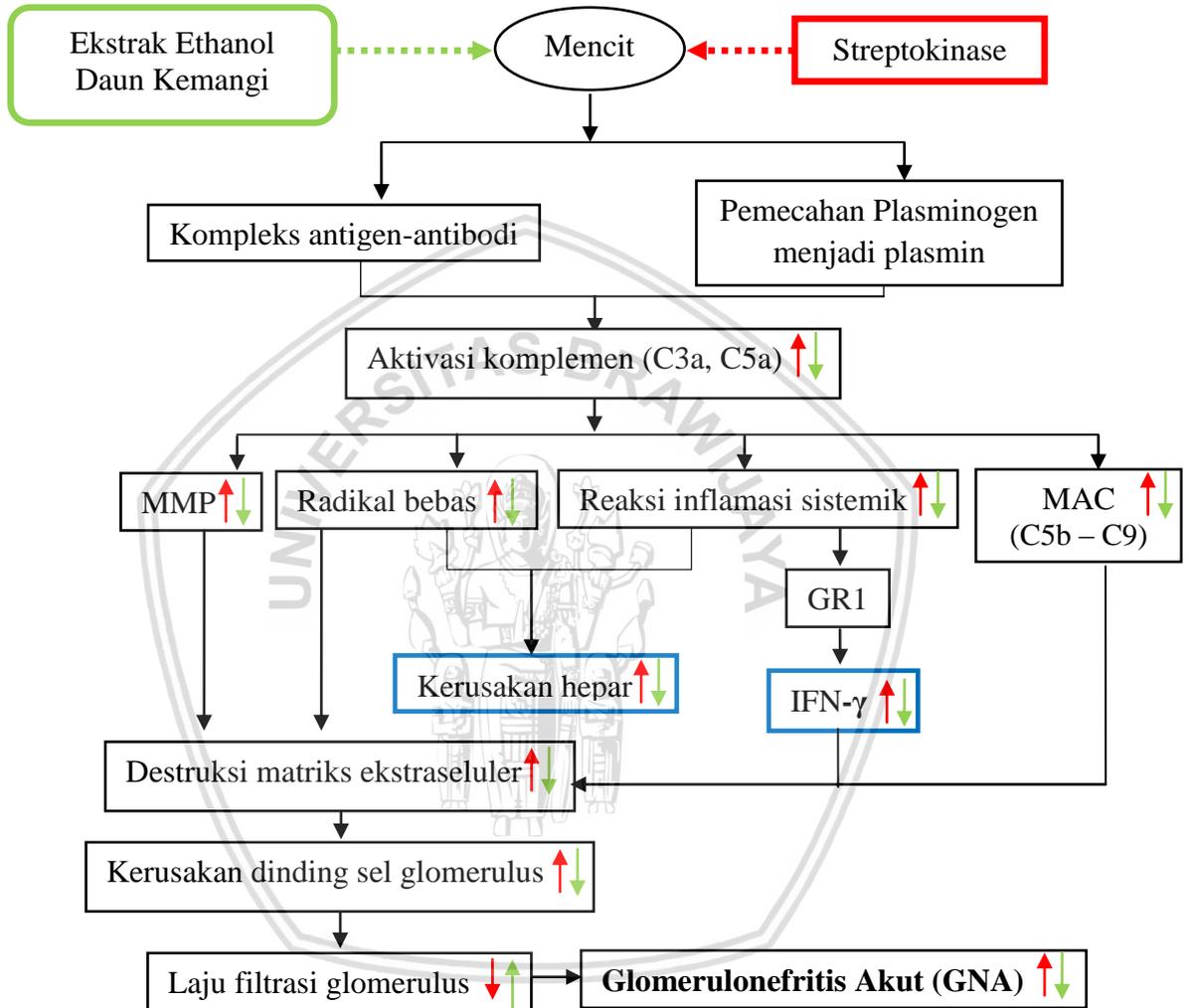


Gambar 2.7 Mencit (Hau dan Gerald, 2002)

Penggunaan mencit sebagai hewan coba pada penelitian kasus Glomerulonefritis akut sebelumnya pernah dilakukan oleh Nordstrand *et al.* (1998) bahwa deposisi streptokinase dalam glomeruli terdeteksi segera setelah 4 hari setelah infeksi. Selain itu penggunaan streptokinase pada mencit (*Mus musculus*) sebagai model hewan glomerulonefritis akut juga pernah dilakukan oleh Murwani dkk. (2014).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

- ▶ : Proses
-▶ : Jalur induksi
-▶ : Jalur terapi
- : Variabel yang diteliti
- ↑↓ : Peningkatan-penurunan akibat

Mencit jantan normal diinduksi streptokinase secara intramuskular. Pada ginjal mekanisme terjadinya glomerulonefritis akut merupakan bentuk reaksi hipersensitivitas tipe III (kompleks imun). Streptokinase yang berperan sebagai antigen dalam jumlah yang besar dan ukuran yang kecil masuk ke dalam sirkulasi darah. Pada hewan yang hipersensitif, akan memproduksi antibodi dalam jumlah yang berlebih sehingga membentuk deposit kompleks antigen - antibodi. Kompleks antigen - antibodi dalam darah akan masuk ke dalam glomerulus ginjal dan mengendap kemudian melalui aktivasi komplemen jalur klasik sistem imun tubuh akan mengaktifkan komplemen C3a dan C5a (anafilatoksin), dimana komplemen tersebut berfungsi sebagai faktor kemotaktik. Komplemen yang teraktivasi akan menarik sel – sel neutrofil serta monosit untuk melepaskan radikal bebas dan menginduksi enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) dalam jumlah besar sehingga menyebabkan destruksi atau kerusakan matriks ekstraseluler pada glomerulus. Selain itu, pada tahap akhir dari aktivasi komplemen, dimana berperan untuk mengeliminasi antigen pada kompleks antigen – antibodi yang mengendap di glomerulus menghasilkan C5b – C9 (*membrane attack complex*) yang kemudian melekat pada membran sel glomerulus sehingga menyebabkan kerusakan pada sel target. Kerusakan tersebut dimediasi oleh sitokin proinflamasi yang ditandai dengan peningkatan produksi IFN- γ oleh sel granulosit (neutrofil). Perubahan jumlah dari sitokin tersebut menandakan terjadi peningkatan reaksi inflamasi sistemik pada glomerulus ginjal. Semakin meningkat reaksi inflamasi sistemik, maka kerusakan dinding sel glomerulus ginjal juga meningkat. Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya

peningkatan permeabilitas membran glomerulus yang berdampak pada kehilangan muatan negatif pada membran glomerulus. Peningkatan permeabilitas membran glomerulus akan menurunkan laju filtrasi glomerulus. Selain itu, meningkatnya respon inflamasi secara langsung akan menurunkan laju filtrasi glomerulus dan keadaan ini menyebabkan retensi cairan serta penurunan urinasi. Kejadian tersebut menandakan adanya glomerulonefritis akut (GNA).

Kerusakan organ hepar yang disebabkan streptokinase terjadi karena streptokinase akan berikatan dengan molekul plasminogen yang akan dikonversi menjadi plasmin yang dinamakan kompleks plasmin streptokinase. Mekanisme imun yang terjadi yaitu aktivitas kompleks plasmin streptokinase akan menyebabkan terjadinya proteolitik yang tidak selektif pada protein lain diluar fibrin seperti fibrinogen yang akan dipecah menjadi peptida-peptida yang tidak dapat dibekukan. Adanya peptida tersebut akan memungkinkan terjadinya aktivasi dari sistem komplemen C3a dan C5a (anafilatoksin), dimana komplemen tersebut berfungsi sebagai faktor kemotaktik. Komplemen yang teraktivasi akan menarik sel – sel neutrofil serta monosit untuk melepaskan radikal bebas. Radikal bebas menginduksi terjadinya peroksidasi lipid pada fosfolipid membran sel pada hepar yang menyebabkan kerusakan jaringan yang berupa degenerasi sel yang menyebabkan perubahan gambaran histopatologi hepar.

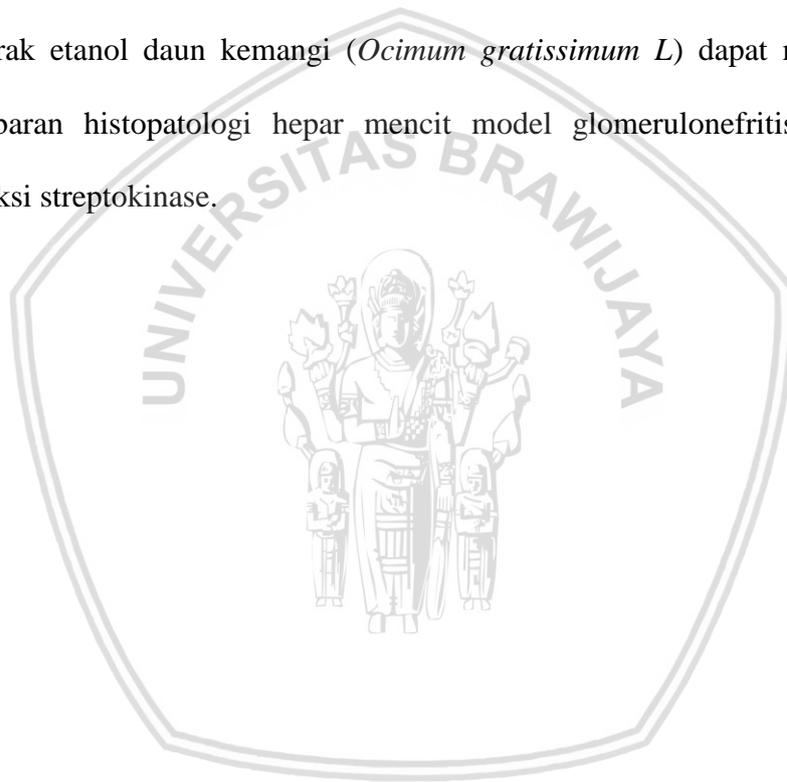
Ekstrak etanol daun kemangi yang mengandung flavonoid, eugenol dan tanin sebagai antiinflamasi dan antioksidan dimana masing – masing senyawa bioaktif tersebut bekerja dengan cara yang berbeda. Eugenol bekerja dengan cara menghambat pelepasan prostaglandin oleh enzim siklooksigenase – 2 (COX - 2)

yang berperan dalam proses inflamasi dan sebagai antioksidan bekerja dengan cara menghambat peroksidasi lipid. Flavonoid bekerja dengan cara mengurangi aktivasi komplemen sehingga menurunkan adhesi leukosit ke endotel yang secara langsung akan menurunkan respon inflamasi tubuh serta menghambat pelepasan asam arakhidonat oleh neutrofil dan flavonoid sebagai antioksidan (menekan jumlah radikal bebas) dapat menangkap radikal bebas dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya sehingga radikal bebas menjadi stabil. Tanin bekerja dengan cara menghambat pelepasan mediator inflamasi dan memiliki kemampuan dalam menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Efek antiinflamasi dan antioksidan dari senyawa tersebut diharapkan dapat menekan terjadinya kompleks antigen dan antibodi di dalam membran kapiler glomerulus, aktivasi komplemen tahap akhir melalui jalur klasik yang menghasilkan komponen C5b – C9 (MAC) dan sel – sel efektor inflamasi meliputi sel-sel neutrofil serta monosit menurun sehingga aktivitas radikal bebas dan enzim *matrix metalloproteinase* juga menurun. Penurunan aktivitas tersebut dapat memperbaiki kerusakan matriks ekstraseluler glomerulus dengan menunjukkan terjadinya penurunan reaksi inflamasi sistemik yang ditandai oleh penurunan produksi IFN- γ sebagai sitokin proinflamasi oleh sel granulosit (neutrofil) dan perbaikan histopatologi hepar.

3.2 HIPOTESIS PENELITIAN

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L*) dapat menurunkan kadar IFN γ -GR1 pada mencit model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.
2. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L*) dapat memperbaiki gambaran histopatologi hepar mencit model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu Dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Desember 2014 hingga bulan Februari 2015. Pelaksanaan penelitian terdiri atas beberapa tahapan meliputi tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan ekstrak daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.
2. Tahapan perawatan, perlakuan, dan pembedahan dilaksanakan di Klinik Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
3. Pengukuran kadar BUN dan kreatinin serum di Laboratorium Sentral Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.
4. Tahapan pengukuran kadar IFN gamma organ limpa menggunakan teknik *flowcytometry* dilaksanakan di Laboratorium Analisa Fisiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan (FMIPA) Universitas Brawijaya Malang .
5. Pembuatan histopatologi hepar di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri dari kandang kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, rak tempat meletakkan kandang, tempat pakan dan minum, lampu dan sekam. Alat preparasi

dan pemberian streptokinase pada hewan coba terdiri atas mikrotube, mikro pipet, yellow tip, blue tip, spuit insulin 1 ml, *ice box*, kapas, *glove* dan *masker*. Alat preparasi dan pemberian ekstrak etanol daun kemangi pada hewan coba terdiri atas timbangan analitik, plastik klip, aluminium foil, botol 50 ml, sonde lambung dan spuit 1 ml *Terumo*. Alat pembedahan mencit setelah perlakuan dan preparasi organ terdiri atas gunting, pinset dan papan pembedahan hewan coba. Alat untuk persiapan organ limpa untuk pengujian *flowcytometry* terdiri dari cawan petri *pyrex*, spuit 5 mL *Terumo*, spuit 1 mL *Terumo*, *sentrifuge tube*, mikropipet 1000 mikroliter *Corning*, mikropipet 10 mikroliter *Corning*, tabung *appendof*, rak *appendof*, sentrifus, masker, sarung tangan, dan *tissue*. Alat pada pengujian *flowcytometry* terdiri atas tabung propilen, *microtube*, kuvet, *BD FACS Calibur TMflowcytometer* dan *Software Cell Quest ProTM*. Alat untuk pembuatan perparat histopatologi hepar antara lain mortar, tabung polipropilen, sentrifus, spektrofotometer, *Tissue Tex Processor*, *microtome*, oven, bak celup kaca, objek gelas, *coverglas* dan mikroskop OLYMPUS CX22.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan pemeliharaan hewan coba berupa mencit jantan usia 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram, pakan, air minum, sekam. Bahan preparasi streptokinase berupa streptokinase, ringer laktat dan alkohol 70%. Bahan pembuatan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L*) terdiri atas daun kemangi dan etanol. Bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit setelah perlakuan dan bahan preparasi organ limpa untuk pengujian *flowcytometry* terdiri atas alkohol 70% dan PBS steril.

Bahan pada uji *flowcytometry* terdiri atas PBS steril, antibodi *cell surface molecule* (Gr - 1), antibodi intraseluler (IFN gamma). Bahan pembuatan preparat histopatologi hepar terdiri atas alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, Ringer Laktat, aquades, formalin 10%, *paraffin*, larutan xylol, pewarna *Harris Haematoxylen*, pewarna *Eosin 1%*.

4.3 Tahapan Penelitian

Berikut ini adalah tahapan penelitian yang dilakukan:

1. Persiapan hewan coba dan Rancangan penelitian
2. Pembuatan ekstrak etanol daun kemangi
3. Pembuatan hewan model glomerulonefritis akut
4. Pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi
5. Pengambilan organ limpa dan hepar
6. Preparasi dan penghitungan kadar IFN gamma organ limpa
7. Pembuatan preparat histopatologi hepar
8. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram dalam keadaan sehat, diadaptasikan selama lima hari (Kusmawati, 2004) di Klinik Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan kondisi tubuh terhadap lingkungan baru. Pemberian pakan berupa *pellet* konsentrat Susu Pap dan dan minum air mineral secara *ad libitum* pada semua mencit. Mencit

dikandangkan dalam bak plastik yang diberi penutup kawat dan diberi alas berupa serat kayu atau sekam.

4.4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengukuran parameter IFN gamma dan histopatologi hepar dilakukan *post test control design only*. Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, antara lain:

1. Kelompok kontrol negatif adalah mencit jantan sehat dan tanpa diinduksi streptokinase.
2. Kelompok kontrol positif adalah mencit jantan model GNA (glomerulonefritis akut) yang diinduksi streptokinase dengan dosis 2500 IU.
3. Kelompok terapi 1 adalah mencit jantan model GNA (glomerulonefritis akut) yang diinduksi streptokinase dengan dosis 2500 IU kemudian diterapi ekstrak daun kemangi dengan dosis 400 mg/kg BB.
4. Kelompok terapi 2 adalah mencit jantan model GNA (glomerulonefritis akut) yang diinduksi streptokinase dengan dosis 2500 IU kemudian diterapi ekstrak daun kemangi dengan dosis 800 mg/kg BB,
5. Kelompok terapi 3 adalah mencit jantan model GNA (glomerulonefritis akut) yang diinduksi streptokinase dengan dosis 2500 IU kemudian diterapi ekstrak daun kemangi dengan dosis 1200 mg/kg BB.

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain variabel bebas yaitu dosis terapi ekstrak etanol daun kemangi dan dosis streptokinase. Variabel tidak bebas (Variabel tergantung) yaitu kadar IFN gamma dan histopatologi hepar, dan

variabel kontrol yaitu hewan model glomerulonefritis akut, jenis kelamin, umur, berat badan dan pakan.

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$, dimana (p) adalah banyaknya perlakuan dan (n) adalah banyaknya ulangan (Kusriningrum, 2010), perhitungan banyaknya ulangan sebagai berikut:

$p(n-1) \geq 15$	Keterangan:
$5(n-1) \geq 15$	p= jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)
$5n-5 \geq 15$	n= jumlah ulangan yang diperlukan
$5n \geq 15+5$	
$5n \geq 20$	
$n \geq 20/5$	
$n \geq 4$	

Berdasarkan perhitungan jumlah ulangan di atas, maka perlakuan sebanyak empat macam membutuhkan paling sedikit empat kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Daun kemangi didapatkan dari pasar tradisional Karangploso Malang dan telah mendapatkan keterangan determinasi dari Laboratorium Taksonomi, Struktur, dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Menurut Gennaro (2002), pembuatan ekstrak etanol daun kemangi ini dengan menggunakan metode maserasi, tahapannya dimulai dengan mencuci bersih daun kemangi dan kemudian dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C

hingga daun kering. Tahapan selanjutnya yaitu proses ekstraksi, daun kemangi yang telah kering dihaluskan dengan blender, ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Daun kemangi kering tersebut ditambahkan dengan etanol 96% sampai menjadi 1 liter dan dikocok hingga benar – benar tercampur. Rendaman daun kemangi dan etanol didiamkan selama satu hari hingga mengendap, kemudian diambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Larutan campuran etanol dan zat aktif kemangi tersebut kemudian dievaporasi menggunakan penangas air dengan suhu 80°C hingga ekstrak menjadi kental, kemudian di evaporasi kembali dengan menggunakan oven untuk menghilangkan etanol yang tersisa. Evaporasi dengan oven dengan suhu 70°C. Ekstrak daun kemangi yang telah dievaporasi diencerkan dengan akuades agar mudah untuk disondekan.

4.4.4 Preparasi Streptokinase

Streptokinase didapatkan dari Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang berupa serbuk didalam vial yang berisi 1.500.000 IU. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2500 IU. Pengenceran streptokinase untuk mendapatkan dosis 2500 IU dilakukan dengan cara yaitu streptokinase yang berjumlah 1.500.000 IU berbentuk serbuk dalam vial diencerkan dengan larutan laktat ringer sebanyak 2 ml dan dihomogenkan. Larutan streptokinase kemudian diambil sebanyak 53.34 µl dimasukkan dalam mikrotube sehingga konsentrasi 40000 IU. Dari sediaan tersebut ditambahkan pengencer laktat ringer sebanyak 346,66 µl hingga volumenya menjadi 400 µl sehingga konsentrasinya menjadi 100 IU/µl

dan dihomogenkan. Sediaan streptokinase ini kemudian diambil masing-masing 25 μ l dan dimasukkan kedalam 16 mikrotube. Dari sediaan tersebut kemudian ditambahkan pengencer laktat ringer sebanyak 75 μ l hingga volumenya menjadi 100 μ l sehingga konsentrasinya menjadi 2500 IU/ μ l pada masing-masing mikrotube. Penceraan hanya untuk sekali induksi, untuk induksi kedua dilakukan pengenceran baru (Murwani, dkk., 2014)

4.4.5 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis Akut

Seminggu pasca adaptasi hewan coba dilakukan injeksi streptokinase pada 16 ekor mencit, empat ekor lainnya tidak diinjeksi dengan streptokinase karena sebagai kontrol negatif. Injeksi streptokinase dengan dosis 2500 IU/ekor dilakukan sebanyak dua kali dengan rute intramuscular (IM) pada hari keenam dan kesepuluh dengan selang 4 hari. Apabila lebih dari lima hari akan meningkatkan kemungkinan resistensi karena adanya antibodi antistreptokinase sehingga efek streptokinase menjadi tidak efektif (Beacon pharmaceuticals, 2009).

Selama pengondisian proses glomerulonefritis akut, dilakukan pengukuran terhadap kadar BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin dengan metode kolorimetri menggunakan fotometer pada hari ke-14 (setelah induksi kedua) untuk memastikan mencit telah mengalami kenaikan kadar BUN dan kreatinin serum. Sampel yang digunakan yaitu darah yang diambil dari masing - masing kelompok. Apabila kadar BUN dan kreatinin serum meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (A) maka dipastikan bahwa mencit tersebut telah menderita glomerulonefritis akut. Hal ini sesuai dengan pendapat Vajpayee *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa apabila kadar ureum

dan kreatinin dalam darah meningkat dapat diketahui bahwa fungsi ginjal terganggu.

Menurut penelitian Stevens dan Levey (2004), kadar kreatinin serum normal pada mencit berkisar antara 0,5 – 1,4 mg/dL dan kadar BUN normal pada mencit yaitu 17 - 28 mg/dL. Kadar BUN dan kreatinin serum digunakan sebagai indikator tes fungsi ginjal yang meliputi kerusakan ginjal pada tubulus, glomerulonefritis, dan dapat menentukan kemampuan filtrasi glomerulus (Alpers, 2006). Kreatinin serum sangat berguna untuk mengevaluasi fungsi glomerulus (Vajpayee, *et al.*, 2006).

4.4.6 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Pemberian terapi dimulai pada hari ke-14 setelah pemberian streptokinase yang terakhir. Terapi daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) diberikan pada kelompok terapi 1, 2 dan 3. Pemberian terapi dilakukan secara peroral melalui sonde lambung dengan dosis ekstrak daun kemangi yang berbeda pada ketiga kelompok tersebut yaitu 400 mg/kg BB untuk kelompok terapi 1, 800 mg/kg BB untuk kelompok terapi 2, dan 1200 mg/kg BB untuk kelompok terapi 3. Pemberian terapi dilakukan satu kali per hari (Gautam dan Goel, 2014).

4.4.7 Pengambilan dan Preparasi Organ Limpa dan Hepar

Pengambilan organ limpa pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) kelompok kontrol negatif, kontrol positif, terapi 1, terapi 2 dan terapi 3 dilakukan pada hari ke-28 setelah pemberian terapi terakhir. Organ limpa digunakan untuk pemeriksaan *flowcytometry*. Langkah awal yang dilakukan yaitu mencit dimatikan dengan cara dislokasi *cervicalis*. Kemudian, mencit disayat bagian abdomen

sebelah kiri dengan menggunakan gunting bedah. Organ hepar diambil dari tubuh mencit kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% dan disimpan dalam larutan formalin 10% didalam pot kecil untuk pembuatan preparat histopatologi. Sedangkan organ limpa diangkat dan dibilas dengan PBS, lalu diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 mL PBS, digerus menggunakan pangkal spuit. Kemudian cawan petri dimiringkan, lalu diambil cairannya menggunakan spuit dan dimasukkan dalam tabung propilen, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C, kemudian diambil peletnya.

4.4.8 Menentukan Produksi IFN γ -Gr1 dengan *flowcytometry*

Organ limpa yang telah disentrifus didapatkan pelet kemudian ditambahkan PBS 1 mL, lalu dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Setelah itu diambil 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* baru. Selanjutnya ditambahkan 500 μ l PBS, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian ditambahkan antibodi *cell surface molecule* yang digunakan untuk *staining* molekul permukaan sel (Gr1) sebanyak 50 μ l, lalu diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 4⁰C. Setelah itu ditambahkan *cytofix cytofperm* sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C, lalu ditambahkan *washperm* 1 mL dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Setelah didapatkan pelet hasil sentrifugasi ditambahkan antibodi intraseluler (IFN γ) 50 μ l, kemudian ditambahkan 300 μ l PBS, lalu dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry* untuk *dirunning* (Rifa'i, 2013).

4.4.9 Perhitungan Sel dengan *haemocytometer*

Metode ini bertujuan untuk mengetahui jumlah sel absolut pada organ limpa terhadap produksi IFN gamma – Gr1. Pemeriksaan produksi IFN gamma – Gr1 menggunakan *flowcytometry* hanya diketahui jumlah sel relatif dalam bentuk persentase sel, maka untuk mengetahui jumlah sel absolut digunakan perhitungan *haemocytometer*. Prosedur yang dilakukan yaitu pelet yang sudah didapatkan dari organ limpa, diambil sebanyak 5 μ l dan ditambahkan 95 μ l *Trypan blue*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam konikel sebanyak 15 mL kemudian dihomogenkan sehingga sel yang mati akan terwarnai sedangkan sel hidup dihitung menggunakan *haemocytometer*. Hasil dari perhitungan sel akan digunakan dalam analisis *flowcytometry*.

4.4.10 Pembuatan preparat histopatologi hepar

Menurut Jusuf (2009) pembuatan preparat histopatologi jaringan hewan dengan pewarnaan Hematoksin eosin (H&E) sebagai berikut:

Tahapan pertama yang dilakukan dalam pembuatan preparat histopatologi dengan melakukan fiksasi organ pada larutan formalin 10%. Organ selanjutnya dipotong menggunakan pisau *scalpel* dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (basket). Tahapan kedua yaitu dehidrasi yang bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan dimasukkan dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% selama satu hari. Tahapan ketiga *Clearing* yaitu suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan. Setelah jaringan

dikeluarkan dari cairan dehidrasi (alkohol) jaringan dimasukkan kedalam xylol I selama 1 jam dan jaringan kemudian dipindahkan ke cairan xylol II selama 30 menit. Jaringan kemudian direndam dalam parafin cair di dalam oven selama kira-kira 30 menit. Setelah itu jaringan siap untuk dimasukkan kedalam blok parafin. Tahapan keempat yaitu *embedding* yaitu proses untuk mengeluarkan cairan *clearing*. Jaringan dibenamkan ke dalam parafin/paraplast I selama 2 jam, setelah pembedaan proses dapat dilanjutkan dengan *bloking* dengan menggunakan parafin. Kemudian dilakukan pemotongan (*mounting*) dimana pemotongan blok preparat dengan menggunakan microtome dengan ketebalan 5-7 μm . Pita parafin yang mengandung jaringan lalu dipindahkan secara hepar-hepar dengan menggunakan kuas, pita parafin ditempelkan pada kaca objek.

Tahapan selanjutnya yaitu pewarnaan (*staining*). Hidrasi dalam larutan alkohol dengan gradasi yang menurun dari 100%, 95%, 90%, 80% dan 70%. Inkubasi dalam larutan hematoksilin selama 15 menit. Kemudian dibilas dalam air mengalir dalam waktu yang singkat dan mencelup dalam campuran asam-alkohol secara cepat 3-10 celupan. Kemudian dibilas dalam air mengalir secara singkat dan dicelupkan sebanyak 3-5 kali dalam larutan ammonium atau lithium karbonat hingga potongan berwarna biru cerah. Kemudian dicuci dalam air mengalir selama 10-20 menit. Selanjutnya inkubasi dalam eosin selama 15 detik hingga 2 menit. Kemudian dehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat secara perlahan, masing-masing selama 2 menit lalu inkubasi dalam xylol 2x2 menit kemudian ditutup dengan kaca penutup.

4.4.11 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kuantitatif statistik *One Way ANOVA* terhadap jumlah IFN gamma – GR1 karena skala pengukuran merupakan numerik, jenis hipotesis komparatif dan jumlah kelompok perlakuan lebih dari 2 kelompok. Analisa *One Way ANOVA* didahului dengan uji distribusi data menggunakan Shapiro – Wilk karena jumlah sampel < 50 (Dahlan, 2011). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak dengan menggunakan *Levene's test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata - rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan secara keseluruhan dari kelompok perlakuan. Apabila diperoleh hasil yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Tukey* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan (signifikan atau tidak). Analisis statistik ini menggunakan $\alpha = 0,05$. Gambaran histopatologi hepar dianalisa secara deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis dengan Induksi Streptokinase

Streptokinase yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *Streptococcus β haemolyticus* yang diberikan secara lokal melalui injeksi melalui intramuskular (IM) dengan interval pemberian pertama dan kedua yaitu empat hari yang mampu memberikan efek sistemik, dan mengendap pada ginjal terutama bagian glomerulusnya. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Nordstrand (1998) bahwa streptokinase terdeposit pada glomerulus dan menyebabkan glomerulonefritis setelah 4 hari setelah infeksi dari paparan infeksi yang berkepanjangan

Gejala klinis yang tampak dari kelompok mencit yang diinduksi streptokinase pada penelitian ini adalah hewan lemah dan anoreksia. Menurut Lumbanbatu (2003) lebih dari 50 % kasus GNAPS adalah asimtomatik. Gejala klinis seperti hematuria dapat timbul berupa *gross hematuria* maupun mikroskopik. Variasi lain yang tidak spesifik bisa dijumpai seperti demam, malaise, nyeri, nafsu makan menurun, atau lesu. Dapat pula dijumpai hipertensi pada hampir semua kasus GNAPS, biasanya ringan atau sedang.

Penetapan diagnosa mencit glomerulonefritis akut (GNA) tidak dapat dilakukan secara patognomonis akan tetapi dapat dilihat dengan mengetahui adanya gangguan gejala klinis seperti hematuria, proteinuria, polydipsia, polyuria, anoreksia dan nausea, serta melakukan pemeriksaan pendukung seperti

pemeriksaan laboratorium (Brown, 2013). Salah satunya dengan pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin serum untuk mengetahui apakah ada gangguan fungsi ginjal. Berikut ini adalah hasil pemeriksaan BUN dan kreatinin serum pasca induksi streptokinase.

Tabel 5.1 Rata-rata \pm SD Kadar BUN dan Kreatinin Serum Pasca Induksi Streptokinase

Kelompok	Rata-rata kadar Kreatinin \pm SD	Rata-rata kadar BUN \pm SD
Kontrol negatif	0,51 \pm 0,50	24,00 \pm 2.94
Kontrol positif	2,42 \pm 0,75	32,75 \pm 6.18
Terapi 1	2,2 \pm 0.63	33,75 \pm 4.78
Terapi 2	2,22 \pm 0.77	34,75 \pm 5.37
Terapi 3	2,37 \pm 0.94	35,5 \pm 3.41

Berdasarkan hasil pengukuran kadar BUN dan kreatinin serum didapatkan hasil bahwa kadar BUN dan kreatinin serum kelompok kontrol positif, Terapi 1 ekstrak kemangi dosis 400 mg/kgBB, Terapi 2 ekstrak kemangi dosis 800 mg/kgBB dan Terapi 3 ekstrak kemangi dosis 1200 mg/kgBB yang diinduksi dengan streptokinase mengalami peningkatan (Lampiran 15) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (mencit sehat) yang tidak diinduksi dengan streptokinase dan telah melewati kadar normal BUN dan kreatinin normal pada mencit yaitu 17-28 mg/dL untuk kadar BUN dan 0,5-1,4 mg/dL untuk kadar kreatinin serum (Stevens and Levey, 2004). Menurut Alpers (2006), kadar ureum (BUN) dan kadar kreatinin digunakan sebagai indikator tes fungsi ginjal yang meliputi kerusakan ginjal pada tubulus, glomerulonefritis, serta dapat menentukan kemampuan filtrasi glomerulus. Menurut Okaiyeto *et al.*, (2013) juga menyatakan glomerulonefritis akut akan mengalami

peningkatan kadar BUN dan kreatinin serum disertai adanya leukositosis akibat adanya inflamasi akut. Sehingga berdasarkan hasil yang diperoleh, mencit tersebut mengalami glomerulonefritis akut.

Streptokinase yang masuk akan mengendap pada glomerulus ginjal. Kemudian akan diikat oleh antibodi sehingga membentuk kompleks antigen antibodi. Adanya ikatan antigen antibodi pada jaringan akan menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe III. Maka imunitas tubuh akan merespon dengan adanya aktivasi komplemen C3a dan C5a (anafilatoksin), influks neutrofil serta sitokin akan diproduksi. Komplek antigen antibodi ini mengaktifkan mediator biokimiawi inflamasi seperti komplemen, leukosit dan fibrin. Komplemen yang diaktifkan akan menarik sel-sel neutrofil serta monosit untuk memfagosit kompleks imun dan bersama dengan trombosit yang digumpalkan melepas berbagai bahan seperti protease, kolagenase dan bahan vasoaktif sehingga terjadi hemoragik dan nekrosis jaringan setempat sehingga meningkatkan permeabilitas membran glomerulus dan menimbulkan adanya inflamasi (Pardede, 2009). Peningkatan kadar BUN dan kreatinin merupakan bagian dari respon terhadap laju filtrasi ginjal yang mengalami penurunan akibat adanya inflamasi pada glomerulus.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) Terhadap Produksi IFN γ -GR1

Hasil uji normalitas dan uji homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogenitas ($p > 0,05$) (lampiran 13) sehingga dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) dapat menurunkan produksi IFN γ – GR1 secara signifikan ($p < 0,05$) (lampiran 13). Rata-rata jumlah absolut sel granulosit yang memproduksi IFN γ dapat dilihat pada Tabel 5.2 di bawah ini:

Tabel 5.2 Rata-rata Kadar IFN γ – GR1 Limpa \pm SD & Hasil Uji Tukey ($\alpha=0,05$)

Kelompok	Rata-rata Kadar IFN γ – GR1 \pm SD
Kontrol negatif	198125 \pm 69762,042 ^a
Kontrol positif	618875 \pm 72477,921 ^c
Terapi 1 400 mg/kg BB	348250 \pm 70248,202 ^b
Terapi 2 800 mg/kg BB	473100 \pm 47712,891 ^{bc}
Terapi 3 1200 mg/kg BB	484725 \pm 72278,783 ^{bc}

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

Hasil analisis statistik *flowcytometry* menggunakan organ limpa menunjukkan produksi IFN γ – GR1 meningkat pada kelompok kontrol positif (mencit diinjeksi streptokinase) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (mencit sehat) yang ditandai dengan adanya peningkatan rata-rata jumlah absolut sel granulosit yang memproduksi IFN γ . Kelompok kontrol positif memiliki peningkatan produksi IFN γ – GR1 sebesar 212,365% dibandingkan kontrol negatif (Lampiran 14).

Kadar IFN γ -GR1 limpa pada kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diinduksi streptokinase) tetap ada, hal ini terjadi karena dalam keadaan normal sitokin (IFN γ -GR1) selalu terdapat didalam tubuh walau dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Menurut Lehner (2001) pada umumnya antigen yang masuk dalam tubuh baik yang disebabkan oleh bakteri, virus, parasit, fungi, prion dan viroid akan selalu memicu sistem kekebalan tubuh dimulai dari sistem pertahanan tubuh non spesifik dengan cara memusnahkan antigen serta sistem pertahanan tubuh spesifik dengan membentuk pertahanan yang lebih kompleks melalui produksi antibodi yang lebih spesifik terhadap antigen yang masuk kedalam tubuh.

Hasil *post hoc* dengan uji Tukey menunjukkan bahwa kelompok Terapi 1 (dosis 400 mg/kg BB) memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$) (lampiran 13). Hasil pada kelompok Terapi 2 (dosis 800 mg/kg BB) dan kelompok Terapi 3 (dosis 1200 mg/kg BB) terjadi penurunan produksi IFN γ oleh sel granulosit (neutrofil) tetapi secara statistik tidak signifikan ($p > 0,05$) dibandingkan kontrol positif (lampiran 13). Kelompok Terapi 1 merupakan kelompok terapi terbaik hal ini dapat dilihat dari tanda notasi yang berbeda dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan kadar rata-rata IFN γ -GR1 pada kelompok terapi ini dapat disebabkan adanya kandungan flavonoid, eugenol dan tanin yang terdapat pada ekstrak daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*). Ketiga kandungan biokimia ini diketahui memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Liu *et.al.*, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) yang mengandung zat aktif berupa flavonoid, eugenol dan tannin memberikan efek antiinflamasi dan antioksidan yang ditandai dengan adanya penurunan produksi IFN γ – GR1 pada dosis 400 mg/kg BB sebesar 43,728%, dosis 800 mg/kg BB sebesar 23,554%, dan dosis 1200 mg/kg BB sebesar 21,676% dibandingkan dengan kontrol positif (Lampiran 14). Terdapat peningkatan produksi IFN γ – GR1 secara signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan streptokinase dibandingkan kelompok kontrol negatif (lampiran 13). Hal ini sesuai dengan pendapat Pardede (2009) bahwa pada kejadian glomerulonefritis akut yang diinduksi oleh streptokinase ditandai dengan adanya peningkatan produksi IFN γ sebagai respon terhadap antigen glomerular nefritogenik.

Streptokinase merupakan produk ekstraseluler *Streptococcus β haemolyticus* grup A nefritogenik yang dapat menyebabkan proses imunopatologis yang menimbulkan glomerulonefritis akut. Hewan yang hipersensitif akan memproduksi antibodi dalam jumlah banyak sehingga terjadi deposit kompleks antigen-antibodi dalam glomerulus. Kompleks imun ini akan mengaktivasi komplemen. Aktivasi komplemen akan menarik sel-sel neutrofil dan monosit untuk melepaskan radikal bebas dan enzim proteolitik yang akan merusak integritas membran kapiler glomerulus sehingga menyebabkan reaksi inflamasi yang ditandai oleh adanya peningkatan jumlah IFN γ . Menurut Baratawidjaja dan Rengganis (2010), akhir aktivasi komplemen melalui jalur klasik yang berperan untuk mengeliminasi antigen pada kompleks imun di glomerulus akan

menghasilkan komponen komplemen berupa C5b-C9 yang merupakan *membrane attack complex* (MAC). Aktivasi komplemen juga akan mengaktifkan sel-sel neutrofil dan makrofag di glomerulus. Sel-sel ini akan berikatan dengan kompleks antibodi atau dengan komponen komplemen C5b-C9 yang melekat pada permukaan glomerulus. Sel-sel makrofag dan neutrofil ini akan teraktivasi dan mengeliminasi sel-sel target yang berikatan dengan kompleks imun.

Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) terbukti dapat menurunkan produksi IFN γ oleh sel granulosit (neutrofil). Hal ini sesuai dengan penelitian Vats *et al.* (2004), bahwa kandungan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) yaitu zat aktif berupa eugenol, flavonoid, dan tannin dapat menghambat inflamasi akut maupun kronik. Pattanayak *et. al* (2010) menyatakan bahwa efek antiinflamasi eugenol bekerja dengan cara menghambat kerusakan sel melalui aktivitas penghambatan enzim COX – 2 yang melepaskan prostaglandin E2 sebagai penyebab inflamasi. Efek antioksidan dari eugenol bekerja dengan menghambat peroksidasi lipid (Rao *and* Kumari, 2014).

Flavonoid bekerja sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat akumulasi leukosit di situs inflamasi dan mengurangi aktivasi komplemen sehingga menurunkan adhesi leukosit ke endotel yang secara langsung menurunkan respon inflamasi tubuh. Flavonoid juga menghambat degranulasi neutrofil melalui aktivitas penghambatan terhadap pelepasan asam arakhidonat oleh neutrofil (Tanko *et. al*, 2008). Menurut Priyambodo dan Ari (2010), flavonoid sebagai antioksidan bekerja menangkap radikal bebas dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya sehingga radikal bebas

menjadi stabil, dengan stabilnya radikal bebas maka tidak akan merusak lipida, protein dan DNA yang menjadi target kerusakan sel. Abdelmoaty (2010) menyatakan bahwa tannin sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara menghambat pelepasan mediator inflamasi dan bekerja sebagai antioksidan dengan menghentikan reaksi rantai radikal bebas dan mendonasikan elektron ke radikal bebas sehingga menjadi stabil.

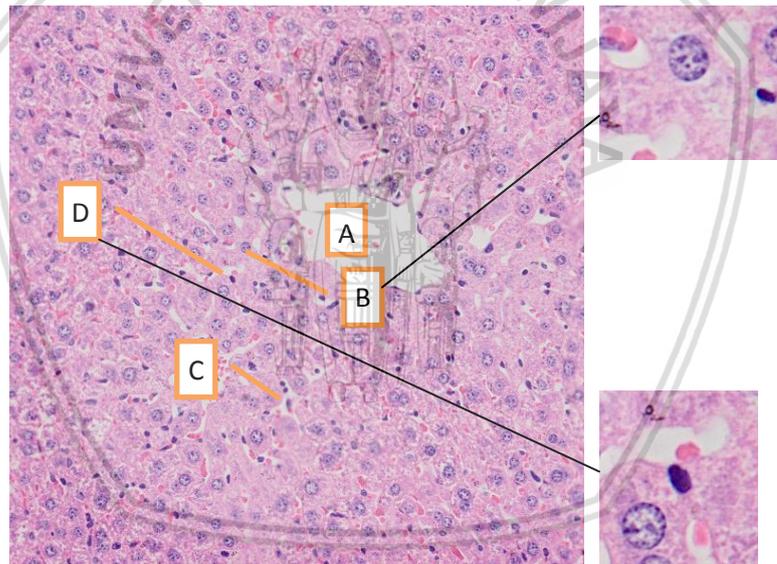
Di antara tiga kelompok terapi, kelompok terapi 1 dengan dosis terapi 400 mg/kg BB merupakan dosis optimum, sedangkan dosis 800 mg/kg BB dan 1200 mg/kg BB secara statistik tidak memberikan efek terapi secara signifikan (lampiran 13) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Menurut Pattanayak *et. al.* (2010) pada penelitiannya mengenai daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) sebagai antiinflamasi dan antioksidan bahwa dosis rendah dari ekstrak etanol daun kemangi diketahui lebih efektif daripada dosis yang lebih tinggi karena menurut Bouayed and Bond (2010) *intake* senyawa polifenol (tanin dan flavonoid) pada dosis tinggi pada tubuh akan bertindak sebagai prooksidan.

5.3 Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Model Glomerulonefritis Akut (GNA) Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum gratissimum L.*)

Induksi streptokinase dan pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi selain memengaruhi kadar IFN γ , juga berdampak pada gambaran histopatologi hepar karena efek dari streptokinase tidak spesifik pada satu target organ, melainkan berefek dimanapun didalam darah diseluruh tubuh sehingga dapat menyebabkan fibrinolitik diseluruh pembuluh darah (Taylor and Triggle, 2006). Pengamatan histopatologi organ hepar dilakukan dengan mengamati preparat

pada perbesaran 400x. Bagian yang diamati adalah lobulus hepar, yang didalamnya terdapat vena sentralis, hepatosit dan sinusoid.

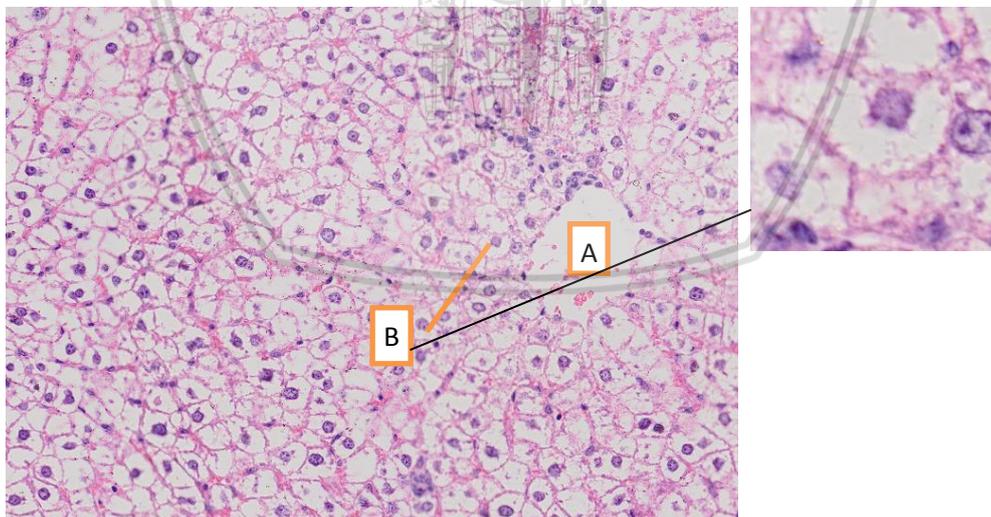
Gambar 5.3 merupakan gambaran mikroskopis organ hepar pada kelompok kontrol negatif atau kelompok yang tidak mendapat induksi streptokinase dan tidak diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi. Pada gambaran mikroskopis tersebut terlihat hepatosit normal berbentuk kuboid, tersusun radial mengelilingi vena sentralis, intinya bulat terletak ditengah, ruang antar hepatosit (sinusoid) terlihat jelas dan sel Kupfer terlihat di dalam sinusoid.



Gambar 5.3 Histopatologi hepar kontrol negatif perbesaran 400x.
Keterangan : (A) Vena sentralis, (B) Hepatosit normal, 1200x (C) Sinusoid, (D) Sel Kupfer, 1200x.

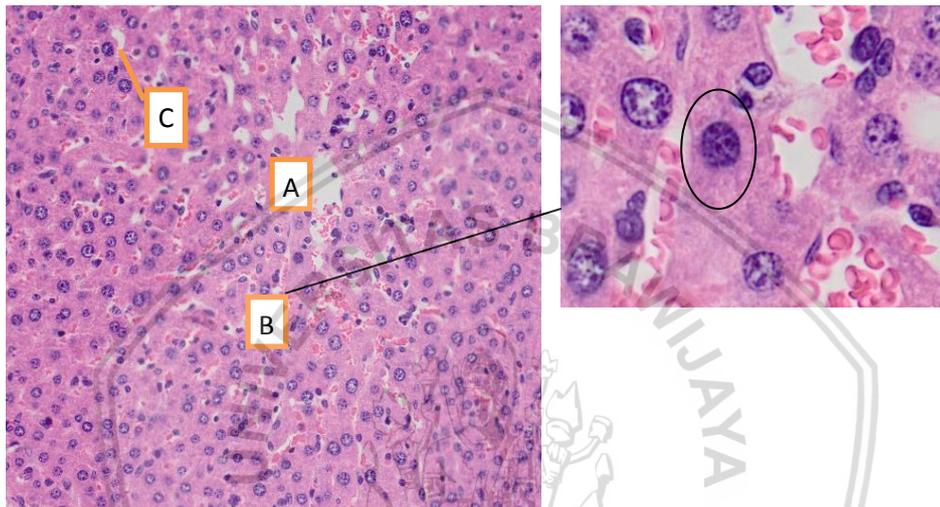
Pada histopatologi hepar mencit kontrol positif atau yang diinduksi streptokinase secara IM (Gambar 5.4) hepatosit terlihat mengalami degenerasi hidropik yang merata pada seluruh lobulus. Sitoplasma terlihat pucat, inti tetap di tengah, ukuran hepatosit membesar (*ballooning*) sehingga tersusun tidak teratur

dan sinusoid tidak terlihat jelas. Perubahan gambaran histopatologi hepar pada kelompok mencit kontrol positif merupakan akibat induksi streptokinase. Pada hepar streptokinase akan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin, plasmin akan menginduksi terjadinya reaksi komplemen. Reaksi komplemen akan membentuk kompleks imun dan terbawa aliran darah ke hepar untuk difagositosis oleh sel Kupfer. Fagositosis oleh sel Kupfer akan melepaskan senyawa radikal bebas seperti enzim matriks metalloproteinase (MMP). Senyawa radikal bebas tersebut akan mengoksidasi asam lemak tak jenuh pada membran sel yang menyebabkan hilangnya integritas dan permeabilitas membran hepatosit. Karena permeabilitas membran menurun maka terjadi kebocoran membran yang menyebabkan air dan sodium masuk dan terakumulasi dalam hepatosit (Henryk, 2010).



Gambar 5.4 Histopatologi hepar kontrol positif perbesaran 400x.
Keterangan : (A) Vena sentralis, (B) Hepatosit degenerasi hidropik, 1200x.
Sitoplasma terlihat pucat karena terisi air, sinusoid tidak terlihat jelas karena hepatosit mengalami pembengkakan (*ballooning*).

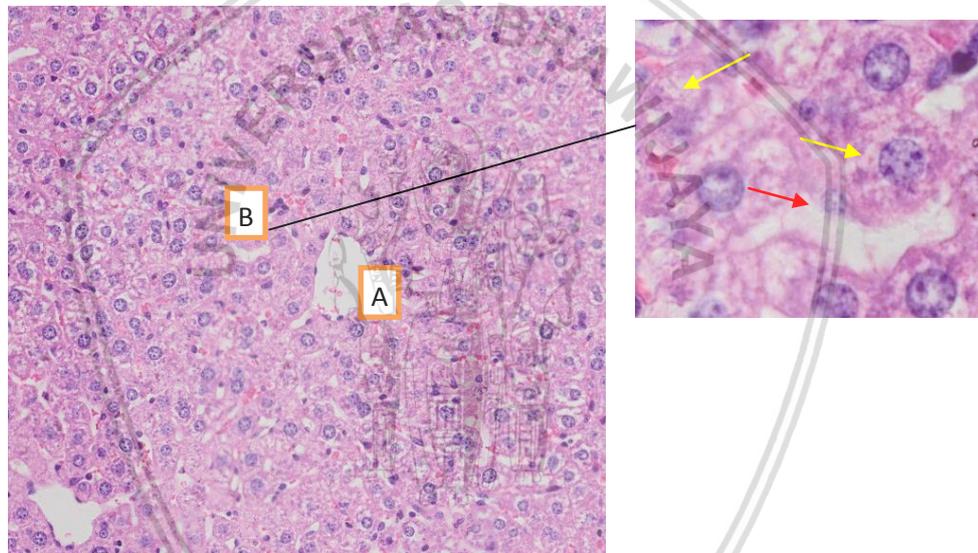
Gambar 5.5 adalah histopatologi mencit kelompok terapi 1 dosis 400mg/kgBB. Pada kelompok ini ruang antar hepatosit (sinusoid) terlihat jelas sehingga hepatosit tersusun radial, mengelilingi vena sentralis. Hepatosit terlihat normal berbentuk kuboid dengan intinya bulat terletak ditengah.



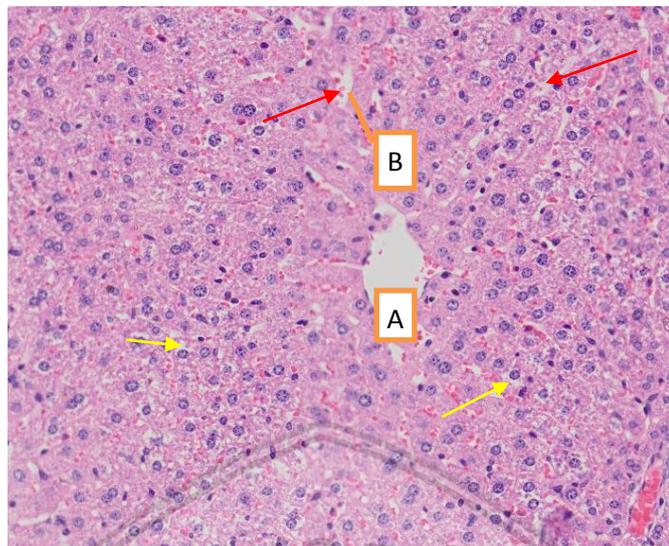
Gambar 5.5 Histopatologi hepar terapi 1 dosis 400mg/kgBB perbesaran 400x.
Keterangan : (A) Vena sentralis, (B) Hepatosit normal, 1200x (C) Sinusoid.
Sinusoid terlihat jelas dan tidak terlihat hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik.

Gambar 5.6 dan 5.7 merupakan gambaran histopatologi hepar mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi dengan dosis 800mg/kg dan 1200mg/kg berat badan. Pada gambar masih terlihat hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik, dan sinusoid terlihat jelas. Pada kelompok terapi dosis ini terlihat ada perbaikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Perbaikan histopatologi terlihat dari berkurangnya vakuola-vakuola degenerasi hidropik yang berisi cairan ekstraseluler pada sitoplasma hepatosit. Berkurangnya degenerasi hidropik menyebabkan berkurangnya pembengkakan sel sehingga sinusoid dapat terlihat dengan jelas. Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak

etanol daun kemangi yang mengandung flavonoid, eugenol dan tannin dapat menekan radikal bebas agar tidak berikatan dengan asam lemak tak jenuh pada membran sel dengan mendonorkan atom hidrogen yang akan berikatan dengan radikal bebas yang dapat mengurangi peroksidasi lipid pada membran sel sehingga mengurangi kerusakan permeabilitas membran yang menyebabkan degenerasi hidropik.



Gambar 5.6 Histopatologi hepar terapi 2 dosis 800mg/kgBB perbesaran 400x.
 Keterangan : (A) Vena sentralis, (B) Sinusoid terlihat jelas. Tanda (→) menunjukkan sinusoid yang terlihat jelas, tanda (→) menunjukkan vakuola degenerasi hidropik pada hepatosit



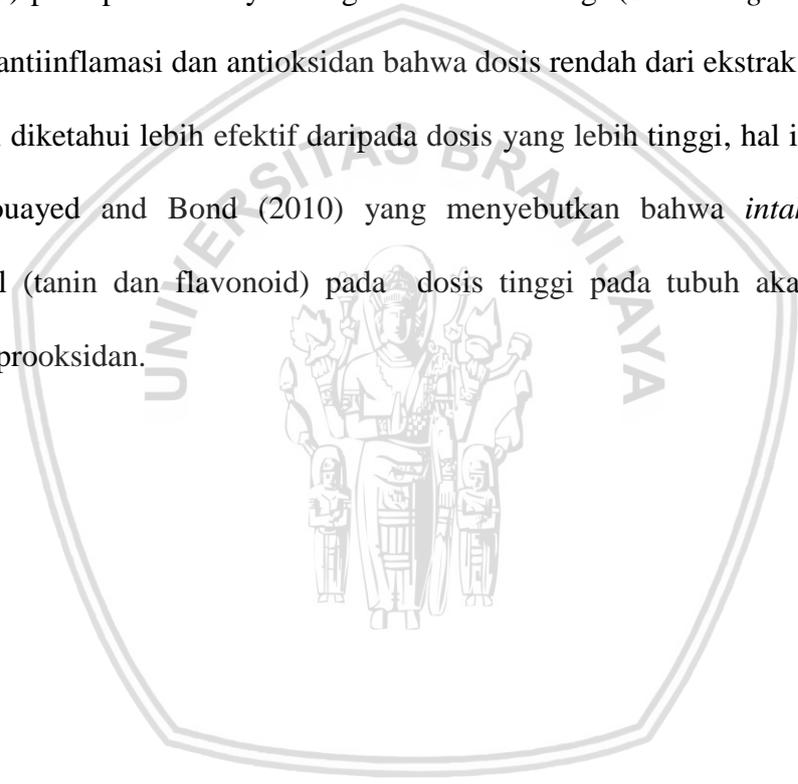
Gambar 5.7 Histopatologi hepar terapi 3 dosis 1200mg/kgBB perbesaran 400x.

Keterangan : (A) Vena sentralis, (B) Sinusoid terlihat jelas. Tanda (→) menunjukkan sinusoid yang terlihat jelas, tanda (→) menunjukkan vakuola degenerasi hidropik pada hepatosit

Terapi ekstrak etanol daun kemangi dengan dosis terapi 400mg/kg BB, 800mg/kg BB dan 1200mg/kg BB menunjukkan penurunan tingkat degenerasi hidropik, tetapi penurunan degenerasi hidropik yang paling tinggi terlihat pada terapi dosis 400mg/kg BB. Menurut Mansour (2013), senyawa polifenol (flavonoid dan tannin) berperan sebagai antioksidan, aktivitas antioksidan tersebut bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kemangi tersebut, mampu mempertahankan rantai asam lemak pada sel membran dengan menghambat aktifitas lipid peroksidase. Aktivitas antioksidan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kemangi akan menyumbangkan ion hidrogen dari gugus hidroksil sehingga ikatan ion radikal bebas menjadi lengkap dan menyebabkan sifat radikal bebas menjadi kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Shah,

2007). Radikal bebas yang kurang reaktif akan menekan dampak lipid peroksidase, sehingga kerusakan pada jaringan hepar akan menurun.

Terapi ekstrak etanol daun kemangi dengan dosis terapi 400mg/kg BB merupakan dosis optimal karena gambaran histopatologi pada dosis ini serupa dengan gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif. Menurut Pattanayak *et al.* (2010) pada penelitiannya mengenai daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) sebagai antiinflamasi dan antioksidan bahwa dosis rendah dari ekstrak etanol daun kemangi diketahui lebih efektif daripada dosis yang lebih tinggi, hal ini didukung oleh Bouayed and Bond (2010) yang menyebutkan bahwa *intake* senyawa polifenol (tanin dan flavonoid) pada dosis tinggi pada tubuh akan bertindak sebagai prooksidan.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) memberikan efek terhadap penurunan kadar IFN γ dan perbaikan gambaran histopatologi organ hepar pada mencit jantan model glomerulonefritis akut (GNA) hasil induksi streptokinase. Dosis 400 mg/kg BB dalam penelitian ini merupakan perlakuan terbaik.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) sebagai terapi glomerulonefritis akut dari dosis optimum hasil penelitian.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*)
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum gratissimum L.*) sebagai pengobatan dan pencegahan glomerulonefritis akut pada hewan kesayangan terutama anjing dan kucing.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmoaty, M.A., M.A. Ibrahim, N.S. Ahmed, and M.A. Abdelaziz. 2010. Confirmatory Studies on the Antioxidant and Antidiabetic Effect of Quercetin in Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25(2):188-192.
- Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, C.A. Akdis. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:701-21.
- Alpers, A. 2006. *Buku Ajar Pediatri Rudolph. Edisi 20*. Jakarta: EGC.
- Baratawidjaja, K. G. Dan I. Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar: Edisi ke-9*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Behrman, R.E., R.M. Kliegman and H.B. Jenson. 2004. *Nelson Textbook of pediatrics. 17th Ed*. Philadelphia: Saunders; h.1740.
- Beacon Pharmaceuticals. 2009. *Streptokinase*. <http://www.medicines.org.uk/emcmobile/medicine/26903/spc>. Diakses Pada Tanggal 7 Maret 2018.
- Bouayed, J. and T. Bohn. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Vol. 3 No. 4, pp. 228-237.
- Bradshaw, R. and E. Dennis. 2009. *Handbook of Cell Signaling 2nd Ed*. Cambridge: Academic Press
- Brown, S.C. 2013. *Glomerular Disease In Small Animals; Noninfectious Diseases Of The Urinary System In Small Animals*. Review October 2013.
- Chen, N., J.J. Weening, P. Ronco, and G. Remuzzi. 2004. *New Insights Into Glomerulonephritis: Pathogenesis And Treatment*. Switzerland: Bosch Druck
- Donnan, G.A., S.M. Davis, B.R. Chambers, P.C. Gates, G.J. Hankey, J.J. McNeil, E.G. Stewart-Wynne and R.R. Tuck. 2006. Streptokinase For Acute Ischemic Stroke With Relationship To Time Of Administration. *Jama*; 276: 961-966
- Dyce, K.M., W.O. Sack and C.J.G. Wensing. 2002. *Textbook of Veterinary. Edisi ke-3*. Philadelphia: Saunders.



- Eicken, S, M. Gugger and H.P. Marti. 2012. Glomerulonephritis and vasculitis as causes of arterial hypertension. *Therapeutische Umschau*. 2012 May. 69 (5):283-94
- Frappier, B.L. and J.A. Eurell. 2006. *Dellmann Textbook of Veterinary Histology* 6th Ed. Maryland: Lippincott Williams and Wilkins. hlm. 164-202.
- Gautam, M.K. and R.K. Goel. 2014. Toxicological Study Of Ocimum Sanctum Linn Leaves: Hematological, Biochemical, And Histopathological Studies. *Journal of toxicology*; 2: 14 s– 22
- Gennaro, A.R. 2002. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition*. New York: Lippincott Wiliams and Wilkins.
- Gerber, M.A. 2004. *Group A Streptococcus*. Dalam: Behrman, R.E., R.M. Kliegman and H.B. Jenson. *Nelson Textbook of pediatrics*. Edisi-17. Philadelphia: saunders.
- Golan, D.E., A.H. Tashjian, E. Armstrong, J.M. Galanter, A.W. Armstong, R.A. Arnaout and H.S. Rose. 2008. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy Second Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins
- Grassi, D., G. Desideri, and C. Ferri. 2010. Flavonoid: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*; 2: 889-902.
- Guyton, A.C. dan J.E. Hall. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 12*. EGC: Jakarta.
- Hadipoentyanti, E. dan S. Wahyuni. 2008. Keragaman Selasih (*Ocimum Spp.*) Berdasarkan Karakter Morfologi, Produksi Dan Mutu Herba. *Jurnal Littri*; 14: 141 – 148
- Harborne, J.B. 2006. *Metode fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Haryani, A., R. Grandiosa, I.D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji Efektivitas Daun Papaya Untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Pada Ikan Mas Koki. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*; 3: 215-221.
- Hau, J. and G.L. Van Hoosier, Jr. 2002. *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume II, Second Edition: Animal Models*. New York: Taylor and Francis Group.
- Henryk, D. 2010. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. *Springer Vol. 10*. Pp. 5174.
- Hidayah, S.N. 2013. Studi Penggunaan Obat pada Kasus Glomerulonefritis Akut Anak (Penelitian Dilakukan di Instalasi Rawat Inap Anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.

- Hilmanto, D. 2007. Pandangan Baru Pengobatan Glomerulonefritis. *Sari Pediatri*, 9(10):1-6.
- Hu, K., M.M. Wendy and L. Youhua. 2008. Novel Actions of Tissue - Type Plasminogen Activator in Chronic Kidney Disease. *Frontiers in Bioscience* 13: 5174-5186.
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar Bagian Histologi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kalabharathi, H.L., R.N. Suresha, B. Pragathi, V.H. Pushpa, and A.M. Satish. 2011. "Anti-inflammatory Activity of Fresh Tulsi Leaves (*Ocimum sanctum*) in Albino Rats". *International journal of pharma and bio sciences*, 2(4) : 0975-6299.
- Kowalak, J.P., W. Welsh dan B. Mayer. 2011. *Buku Ajar Patofisiologi*. Alih bahasa oleh Andry Hartono. Jakarta: EGC.
- Kusriningrum. 2008. *Rancangan Percobaan*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Lehner, M.D., J. Ittner, D.S. Bundschuh, N. Van Rooijen, A. Wendel, T. Hartung. 2001. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 69: 463-471.
- Ledgard, J. 2006. *Kings Chem Guide: Edition 2*. USA: UvkChem.
- Liu, J.Y., W.H. Wang, Y.H. Chen, Y.W. Chiu, J.C. Shyu, L.H. Hsuesh, C.C. Hung and J.M. Hwang. 2011. Protective Effects of *Ocimum gratissimum* Polyphenol Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats. *Chinese Journal of Physiology*; 58: 1-9
- Li, L., X. Zhang, L. Cui, L. Wang, H. Liu, H. Ji, and Y. Du. 2012. Ursolic Acid Promotes the Neuroprotection by Activating Nrf2 Pathway After Cerebral Ischemia in Mice. *J. Brain Research* 25: 2497-2499.
- Liu, X., and J. Wang. 2011. "Anti-inflammatory Effects of Iridoid Glycosides Fraction of *Folium Syringae* Leaves on TNBS - Induced Colitis in Rats". *Journal Ethnopharmacol*, 133(2): 780-787.
- Lumbanbatu, S. M. 2003. Glomerulonefritis Akut Pasca Streptokokus pada Anak. *Sari Pediatri*, Vol.5, No.2, September 2003:58-63
- Lumonga, F. 2008. *Apoptosis*. Universitas Sumatra Utara. Medan. 1-14.

- Malole, M.M.B. dan Pramono. 2000. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan Laboratorium*. Bogor: IPB. DitJen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi.
- Mansour, N.A.A. 2013. Antioxidant Activity of Crude Extract from Mangosteen Pericarp on The Lung of Rat Which Exposure by Cigarette [Thesis] Master of Agriculture Product Thecnology. Fagulty of Agricultural Technology. Brawijaya University.
- Martini, F.H., J.L. Nath and E.F. Bartholomew. 2014. *Fundamentals of Anatomy dan Physiology*. 10th Ed. New York: Pearson Education.
- Maxie, M.G. 2015. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2 (6th Ed)*. London: Academic Press. hlm. 319-406.
- McWilliam, L.J. 2007. Drug-induced renal disease. *Current Diagnostic Pathology (2007) 13*, 25-31
- Mishra, P. and M. Sanjay. 2011. Study of Antibacterial Activity of *Ocimum sanctum* Extract Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *American Journal of Food Technology*, 6 (4): 336 – 341.
- Muliani, H. 2011. *Pertumbuhan Mencit (Mus Musculus) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (Jatropha Curcas)*. Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol. XIX No.1.
- Murwani, S., G. Christiyane, A.K. Primaden, L.Z.G Monteiro, M.R. Ramadhani dan H.M. Ahmad. 2014. *Hewan Model Glomerulonefritis Akut (Hipersensitif Type III)*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Naibaho, O.H., P.V.Y. Yamlean dan W. Wiyono. 2013. Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum L.*) Pada Kulit Punggung Kelinci Yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus Aureus*. *Journal Ilmiah Farmasi*;2(2): 28.
- Noer, M.S. 2002. *Patofisiologi Kedokteran*. Surabaya: Gramik FK Universitas
- Nortsrand, A., M. Norgren., J.J. Ferretti and S.E. Holm. 1998. Streptokinase as a Mediator of Acute Post-Streptococcal Glomerulonephritis in an Experimental Mice Model. *Infect. Immun.*; 66: 315-321
- Nordstrand, A., W.M. McShan, J.J. Ferretti, S.E. Holm and M. Norgren. 2000. Allele Substitution of the Streptokinase Gene Reduces the Nephritogenic Capacity of Group A Streptococcal Strain NZ131. *J Infect Immun* 68; 1019-1025.
- Okaiyeto, S.O., B.Y. Kaltungo, I.I. Onoja and L.K. Okoro. 2013. A Case Of Glomerulonephritis In A 4-Year-Old Kano Brown Doe. *J Vet Advances*, 3(9) : 256-260.

- Pardede, S.O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascarastreptokokus. *Sari Pediatri*, Vol. 11 (1): 56-65
- Parmar, S.K., T.P. Sharma, V.B. Airao, R. Bhatt, R. Aghara, S. Chavda, S.O. Rabadiya and A.P. Gangwal. 2013. Neuropharmacological Effects of Terpenoids. *Journal of Phytopharmacology* 4(2): 354-372.
- Pattanayak, P., P. Behera, D. Das, and S.K. Panda. 2010. Ocimum sanctum Linn A Reservoir Plant for Therapeutic Applications: An Overview. *Journal Pharmacogn Rev*, 4(7): 95-105.
- Priyambodo, W.C dan Y. Ari. 2010. *Efektifitas Ekstrak Daun Kemangi Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Hiperglikemia*. Semarang : Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang.
- Raimo, H. and Y. Holm. 2005. *Basil: The Genus Ocimum*. Amsterdam: Harwood Publishers
- Rao, N.B. and O.S. Kumari. Phytochemical Analysis of *Ocimum gratissimum* L. (Clove Tulasi) Leaf Extract. *An International Journal of Advances in Pharmaceutical Science*, 5(6) : 2532 – 2535.
- Rifa'i, M. dan A. Soewondo. 2013. Peran Penting Sel T Regulator CD8+CD25+FOXP3+. Menjaga Homeostasis sel T Pada Transplantasi Alogenik. *Jurnal Veteriner*, 14(4) : 417-423.
- Rimoin, D.L., R.E. Pyeritz and B.R. Korf. 2013. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics 6th Ed.* Cambridge: Academic Press.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid Di Bidang Kedokteran Gigi. *Maj Ked Gigi (Dental Journal)*. Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III 7: 81–89.
- Sahouo, G.B., Z.F. Tonzibol, B. Boti, C. Chopard, J.P. Mahyo and T. Yao. 2003. Anti-Inflammatory And Analgesic Activities: Chemical Constituents Of Essential Oils Of *Ocimum Gratissimum*, *Eucalyptus Citriodora* And *Cymbopogon Giganteus* Inhibited Lipoxigenase L-1 And Cyclooxygenase Of Pghs. *Bull. Chem. Soc. Ethiop*; 17(2): 191-197.
- Sanyal, A.J. 2002. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 123(5):1705-1725.
- Seidemann, J. 2005. *World Sipce Plants Economic Usage, Botany, Taxonomy*. Postdam: Springer Science
- Schneider, S.M., R.E. Cianciolo, M.B. Nabity, F.J. Clubb Jr., C.A. Brown and G.E. Lees. 2013. Prevalence of Immune-Complex Glomerulonephritides in Dogs Biopsied for Suspected Glomerular Disease: 501 Cases (2007–2012). *J Vet Intern Med* 2013;27;S67-S75

- Shah, A. 2007. Ilmu Penyakit Dalam. Buku Ajar Kedokteran Edisi 11. Jakarta: EGC, pp.249.
- Shenouda, S.M. and J.A. Vita. 2007. Effect of Flavonoid Containing Beverages and EGCC on Endothelial Function. *Journal of the American College of Nutrition*. 26(4): 366-372.
- Smith, J.B. dan S. Mangkoewidjojo. 1998. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Tikus Laboratorium (Rattus norvegicus)*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Smith J.M., M. K. Faizan and A. A. Eddy. 2003. *The child with acute nephritic syndrome*. Postlethwaite RJ and Webb NJA (Eds). In: Clinical Paediatric Nephrology, 3rd Edition. New York: Oxford University Press, 2003, p. 374
- Stevens, L.A. and A.S. Levey. 2004. Clinical Implications for Estimating Equations For Glomerular Filtration Rate, *Ann. Intern. Med*, 141: 959-961
- Subowo. 2010. *Imunologi Klinik: Hipersensitivitas. Edisi ke-2*. Jakarta: Sagung Seto
- Sudarsono, G.D., S. Wahyuono, I.A. Danatus, dan Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II*. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional
- Sudoyo, A.W., B. Setiyohadi, dan I. Alwi. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi ke - 4*. Jakarta: Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam FK UI.
- Sumono, A dan A. Wulan. 2008. The Use Of Bay Leaf (*Eugenia Polyantha Wight*) In Dentistry. *Dental Jurnal* ; 41(3): 18-25.
- Srivastava, K.C. 2003. Antiplatelet Principles From A Food Spice Clove (*Syzygium Aromaticum L.*). *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*. 48 (5): 363-372.
- Tanko, Y., A.H. Yaro, K.A. Mohammed and A. Mohammed. 2008. Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Methanol Leaves Extract of *Ocimum Gratissimum* in Mice and Rats. *J Pharmacology*; 4 (5): 01-05.
- Taylor, J.B. and D.J. Triggle. 2006. *Comprehensive Medicinal Chemistry II, Volume 6 Therapeutic Areas I Central Nervous System, Pain, Metabolic Syndrome, Urology, Gastrointestinal and Cardiovascular*. New York: Elsevier. 767-768.
- Thompson, D. and T. Eling. 2009. Mechanism Of Inhibition Of Prostaglandin H Synthase By Eugenol And Other Phenolic Peroxidase Substrates. *Molecular. J Pharmacology* 36(5): 809- 817.
- Tortora, G.J. 2005. *Principles of Human Anatomy*. 10th Ed. USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Trihono, P.P. 2011. Peran *Transforming Growth Factor Beta – 1* pada Penyakit Ginjal. *Sari Pediatri*, 13(1) : 49 – 54.
- Vajpayee, N., S.S. Graham and S. Bem. *Basic Examination Of Blood And Bone Marrow*. In: Henry's Clinical Diagnosis And Management By Laboratory Methods. 21st ed. Editor: McPherson RA, Pincus MR. China: Saunders Elsevier; 2006. hal. 9-20.
- Van Tellingen, C. 2003. *Organphysiology from Phenomenological Point of View*. Driebergen: Lous Bolk Institute.
- Vats, V., S.P. Yadav, and J.K. Grover. 2004. Ethanollic Extract of *Ocimum sanctum* Leaves Partially Attenuates Streptozotocin-Induced Alteration in Glycogen Content and Carbohydrate Metabolism in Rats. *Journal ethnopharmacol* 90(1): 155-60.
- Vinen, C.S. and D.B. Oliveira 2003. Acute glomerulonephritis. *Postgrad Med J*. 2003 Apr. 79(930):206-13; quiz 212-3. a

