

**EFEK PEMBERIAN ASAM ROSMARINAT DAN VITAMIN E
TERHADAP EKSPANSI SEL MESANGIAL DAN HIPERTROPI
GLOMERULUS PADA TIKUS DIABETES**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Muhammad Faiz Fathurahman Ruchiyadi

NIM 155070101111052

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

**EFEK PEMBERIAN ASAM ROSMARINAT DAN VITAMIN E TERHADAP
EKSPANSI SEL MESANGIAL DAN HIPERTROPI GLOMERULUS PADA
TIKUS DIABETES**

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**

Oleh :

**Muhammad Faiz Fathurahman Ruchiyadi
155070101111052**

Pembimbing I,

Pembimbing II,

**dr. Nur Samsu, Sp.PD-KGH
NIP. 196808132003121001**

**Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIK.197511252005012001**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Faiz Fathurahman Ruchiyadi

NIM : 155070101111052

Program Studi : Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Juli 2019

Yang membuat pernyataan,

Muhammad Faiz Fathurahman Ruchiyadi

NIM. 155070101111052

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur penulis sampaikan kehadiran Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya kepada penulis selama menempuh studi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sehingga tugas akhir penulis yang berjudul "Efek Pemberian Asam Rosmarinat dan Vitamin E Terhadap Ekspansi Sel Mesangial dan Hipertropi Glomerulus pada Tikus Diabetes" dapat diselesaikan.

Tugas akhir ini dimaksudkan sebagai syarat untuk dapat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran, serta turut membantu perkembangan ilmu kedokteran, khususnya dalam bidang ilmu penyakit dalam.

Pada kesempatan ini pula, ijin penulis untuk menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua saya yang saya banggakan. Ruchiyadi Tarmadi dan Noerlely Latief atas doa dan dukungan yang terus diberikan, limpahan kasih sayang, dukungan dari banyak sisi, semangat, dan motivasi semenjak kecil hingga saat ini.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K)., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K)., selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. dr. Nur Samsu, Sp.PD-KGH., selaku dosen pembimbing pertama yang telah berkenan untuk meluangkan waktunya dalam membimbing serta mengarahkan penulis dalam penulisan tugas akhir ini.

5. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes., selaku dosen pembimbing kedua yang telah berkenan untuk meluangkan waktunya dalam membimbing serta mengarahkan penulis dalam penulisan tugas akhir ini.
6. dr. Agung Riyanto Budi Santoso, SpOT (K)., selaku penguji atas bimbingan dan arahnya saat seminar hasil sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik.
7. Sahabat saya Bayu Yudha P, M Unzila Rafsi Z, Novel Yourdhan, dan Azmirfani Diti A atas semangat yang selalu diberikan kepada penulis semenjak pertama kali bertemu.
8. Sahabat-sahabat yang saya dapatkan selama perkuliahan di Pendidikan Dokter FKUB. Hafidh Alyza R, Jaya Purna K, Robby A, dan Seto Wahyu P atas kegembiraan selama kuliah pre-klinik.
9. Sahabat sekaligus rekan penelitian saya yang telah memberikan semangat dan motivasinya selama ini.
10. Teman-teman seangkatan Pendidikan Dokter 2015, dan teman PBL 3.01 yang telah memberikan dukungan dan semangatnya.
11. Dan semua pihak yang hadir maupun pernah hadir dalam kehidupan penulis, ataupun telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Akhir kata, penulis menyadari bahwa kesempurnaan hanya milik Allah SWT. Penulis sadar bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang dapat membangun sangat penulis harapkan. Semoga tugas akhir ini dapat diterima dan akan bermanfaat khususnya bagi pembaca yang membutuhkannya.

Malang, Juli 2019

Penulis

ABSTRAK

Ruchiyadi, Muhammad Faiz F. 2019. "*Efek Pemberian Asam Rosmarinat dan Vitamin E Terhadap Ekspansi Sel Mesangial dan Hipertropi Glomerulus pada Tikus Diabetes*" Tugas Akhir, Pendiidkan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing (1) dr.Nur Samsu, Sp.PD-KGH. Pembimbing (2) Dr.Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes.

Diabetik nefropati adalah komplikasi diabetes melitus yang dapat dijumpai pada 35-45% penderita Diabetes. Kondisi ini ditandai dengan albuminuria yang menetap >300 mg/24 jam pada dua kali pemeriksaan dalam rentang waktu tiga sampai enam bulan. Diabetik nefropati menyebabkan hipertropi yang disebabkan karena adanya akumulasi matriks ekstraseluler. Perubahan awal gambaran histologis diawali dengan hipertropi glomerulus, lalu diikuti penebalan membrana basalis, ekspansi mesangial dengan akumulasi protein matriks ekstraselular disertai proliferasi sel mesangial intraglomerular. Perubahan ini diakibatkan stres oksidatif yang diakibatkan peningkatan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) melalui berbagai jalur kompleks sehingga terjadi akumulasi protein ekstraseluler dalam glomerulus. Asam rosmarinat dan vitamin E berfungsi sebagai antioksidan eksogen. yang berperan dalam menangkal efek dari ROS. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh asam rosmarinat dan vitamin E terhadap perubahan sel mesangial dan penurunan hipertropi glomerulus sebagai gejala awal gagal ginjal kronik. Desain penelitian ini merupakan *true experimental*. Pemberian asam rosmarinat dosis 75 mg/BW dan vitamin E dosis 400 mg/BW diberikan selama 8 minggu pada tikus model diabetes tipe II. Berdasarkan hasil ANOVA terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif (DM2) pada presentase mesangial dan volume glomerulus. Pemberian Asam Rosmarinat menurunkan volume glomerulus dan presentase mesangial secara signifikan dibanding dengan kelompok kontrol positif ($P < 0,05$), sedangkan vitamin E tidak menunjukkan penurunan signifikan terhadap presentase mesangial maupun volume glomerulus ($p > 0,05$). Hal yang menarik adalah bahwa pemberian asam rosmarinat mampu menurunkan nilai presentase mesangial mendekati nilai kontrol negatif, namun tidak mampu menurunkan nilai volume glomerulus hingga mendekati nilai kontrol negatif. Hal ini kemungkinan adanya faktor lain yang memengaruhi volume glomerulus belum disertakan dalam penelitian ini. Dapat disimpulkan bahwa pemberian asam rosmarinat lebih baik dari pada vitamin E dalam memberikan proteksi terhadap jaringan ginjal pada kondisi diabetes.

Kata kunci : Asam rosmarinat, Vitamin E, Hipertropi glomerulus, Ekspansi sel mesangial, Diabetik nefropati

ABSTRACT

Ruchiyadi, Muhammad Faiz F. 2019. "*Efek Pemberian Asam Rosmarinat dan Vitamin E Terhadap Ekspansi Sel Mesangial dan Hipertropi Glomerulus pada Tikus Diabetes*" Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Pembimbing (1) dr.Nur Samsu, Sp.PD-KGH. Pembimbing (2) Dr.Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes.

Diabetic nephropathy is one of the diabetes mellitus complication which found in 35-45% patients. This condition marked by continuous albuminuria >300 mg/24 hours with two times examination for three to six months in interval. Diabetic nephropathy causes hypertrophy caused the accumulation of extracellular matrix. Primary change in histological view with glomerular hypertrophy followed by thickening of the basalis membrane, mesangial expansion with accumulation extracellular matrix protein and proliferation of the intraglomerular mesangial cells. This alteration caused by oxidative stress which caused by increasing ROS production (*Reactive Oxygen Species*) through many complex processes so that accumulation of the extracellular matrix happen. Rosmarinic acid and vitamin E as antioxidants to negate the effect of ROS. This research purpose was observed the effect of Rosmarinic acid and vitamin E on mesangial cells and glomerular hypertrophy decrease as early sign of chronic kidney failure. This research designed by true experimental. Given Rosmarinic acid 75mg/kgBW dosage and 400mg/kgBW vitamin E for 8 weeks in diabetic type II rats. Base on ANOVA test there are significant alteration between negative control group and positive control group in glomerular volume and mesangial matrix presentation. Rosmarinic acid decrease matrix presentation and glomerular volume significantly compare to control group ($P<0,05$), while vitamin E didn't significantly decrease mesangial presentation and glomerular volume ($P>0,05$). There is an interesting thing that Rosmarinic acid able to decreased mesangial presentation near the control group, but didn't decrease glomerular volume near control group. This might be another factor that influenced glomerular volume. It could be concluded that Rosmarinic acid better than vitamin E in giving renal protection from diabetic condition.

Keyword : Rosmarinic acid, Vitamin E, Glomerular hypertrophy, Mesangial cell expansion, Diabetic nephropathy

Daftar Isi

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	iv
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xi
Daftar Singkatan	xii
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II.....	6
TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Diabetik Nefropati.....	6
2.2 Anatomi dan Histologi Ginjal	8
2.3 Asam Rosmarinat.....	10
2.4 Vitamin E.....	11
BAB III.....	13
KERANGKA TEORI, KONSEP dan HIPOTESIS PENELITIAN	13

3.1 Kerangka Teori.....	13
3.2 Kerangka Konsep.....	15
3.3. Hipotesis.....	16
BAB IV	17
METODE PENELITIAN	17
4.1 Desain Penelitian.....	17
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	17
4.3 Sampel Penelitian.....	17
4.4 Variabel Penelitian	18
4.5 Definisi Operasional	19
4.6 Bahan dan Alat.....	20
4.7 Prosedur Penelitian	21
4.8 Analisis Data.....	23
4.9 Alur Penelitian.....	24
BAB V HASIL PENELITIAN.....	25
5.1 Statistik Deskriptif.....	25
5.1.1 Uji Normalitas Data.....	25
5.2 Hasil Analisis Pengaruh Asam Rosmarinat dan Vitamin E Terhadap Presentasi Mesangial dan Volume Glomerulus.....	25
5.3 Hasil Analisis Korelasi Antara Perubahan Nilai Matriks Mesangial Terhadap Perubahan Nilai Volume Glomerulus	28
BAB VI	29
Pembahasan Hasil Penelitian	29
6.1 Pengaruh Induksi Streptozotosin (STZ) dan Diet Tinggi Lemak dalam Menyebabkan Diabetik Nefropati.....	29
6.2 Pengaruh Diabetik Nefropati Terhadap Sel Mesangial dan Volume Glomerulus	30
6.3 Pengaruh Asam Rosmarinat Terhadap Sel Mesangial dan Volume Glomerulus	31
6.4 Pengaruh Vitamin E Terhadap Sel Mesangial dan Volume Glomerulus	32
6.5 Korelasi Antara Presentase Mesangial dengan Volume Glomerulus..	33

6.6 Keterbatasan Penelitian.....	34
BAB VII	35
PENUTUP	35
7.1 Kesimpulan	35
7.2 Saran.....	35
Daftar Pustaka	36

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Tabel Rata-rata Nilai Presentase Mesangial dan Volume Glomerulus	27
--	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kompleksitas Patogenesis Nefropati Diabetik	7
Gambar 2.2 Histologi Glomerulus	9
Gambar 2.3 Struktur Kimia Asam Rosmarinat	11
Gambar 2.4 Struktur Vitamin E α -tocopherol	12
Gambar 3.1 Skema Patofisiologi Terjadinya Diabetik Nefropati	13
Gambar 3.2 Kerangka Konsep.....	15
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	24
Gambar 5.1 Histologi Jaringan Ginjal dengan Pewarnaan HE	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Uji Normalitas.....	41
Lampiran 2 Uji <i>One Way ANOVA</i>	41
Lampiran 3 Analisis Pearson	41
Lampiran 4 Uji Post Hoc	42
Lampiran 5 Etik.....	43

Daftar Singkatan

AGE	: <i>Advanced Glycation End-product</i>
Ang II	: <i>Angiotensin II</i>
Bcl – 2	: <i>B – cell lymphoma/leukemia</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
ECM	: <i>Extra Cellular Matrix</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
GPX	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
IGF-I	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin 1 alpha</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
JAK/STAT	: <i>The Janus Kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phospate</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PPAR- γ	: <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma</i>

SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGF- β	: <i>Tumor Growth Factor beta</i>
VCAM-1	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Prevalensi komplikasi penyakit diabetes mellitus saat ini terus mengalami peningkatan seiring meningkatnya penderita diabetes di dunia. Pada tahun 2000 diperkirakan sebesar 2,8% atau total penderita sebanyak 171 juta jiwa dan diperkirakan meningkat menjadi 4.4% atau 366 juta jiwa pada tahun 2030 (Wild, 2004). Sementara itu diabetik nefropati menjadi komplikasi terbesar kedua akibat diabetes mellitus setelah komplikasi kardiovaskular (Liu *et al*, 2010). Kondisi ini mendorong perkembangan dunia kesehatan terkait pendekatan penyakit ini salah satunya adalah dengan deteksi dini komplikasi diabetik nefropati dengan teknologi genomik dan proteomik dengan pengenalan *biomarker* (pada urin maupun plasma) dan petanda molekuler (biopsi) yaitu proteinuria. Telah dibuktikan, bahwa pada saat mikroalbuminuria telah terjadi glomerulopati yang lanjut (Caramori *et al*, 2002).

Diabetik nefropati adalah komplikasi Diabetes mellitus pada ginjal yang dapat berakhir sebagai gagal ginjal. Keadaan ini akan dijumpai pada 35-45% penderita diabetes melitus. Kondisi ini ditandai dengan albuminuria menetap > 300 mg/24 jam pada minimal dua kali pemeriksaan dalam kurun waktu 3 sampai 6 bulan pada minimal dua kali pemeriksaan dalam kurun waktu tiga sampai enam bulan (Hendromartono, 2006) atau penurunan kecepatan filtrasi glomerulus dan peningkatan tekanan darah arterial tetapi tanpa penyakit ginjal lainnya atau penyakit kardiovaskuler (Batuman, 2012). Diabetik nefropati juga menyebabkan perubahan struktur histologis pada glomerulus, yaitu adanya hipertrofi yang

disebabkan karena adanya penumpukan matriks ekstraseluler, penebalan membrana basalis glomerulus, dan glomerulosklerosis (Dronavalli *et al*, 2008). Perubahan awal gambaran histologis diawali dengan proliferasi sel mesangial intraglomerular, ekspansi mesangial, hipertrofi glomerular, dan penebalan membrana basalis (Ohshiro *et al*, 2005). Disfungsi sel podosit juga berperan dalam perkembangan diabetik nefropati, podosit adalah sel yang berdiferensiasi paling terakhir sehingga tidak dapat beregenerasi (Pagtalunan *et al*, 1997).

Ekspansi sel mesangial berperan pada diabetik nefropati. Pada diabetes secara *in vitro* terjadi perubahan struktur pada sel mesangial yaitu pembesaran mesangium yang tercermin dalam peningkatan produksi protein extracellular matrix (ECM) oleh sel mesangial pada kondisi glukosa tinggi (Catherwood *et al*, 2002). Sel mesangial terdiri dari komponen matriks kolagen tipe IV, glikosaminoglikan sulfat, fibronectin dan laminin. AGEs merupakan salah satu kontributor dalam diabetik nefropati. AGEs pada konsentrasi tinggi dapat menjadi racun bagi protein intraseluler yang mempengaruhi transkripsi gen. AGEs berdifusi langsung ke ruang matriks ekstraseluler dan merubah protein ekstraseluler seperti laminin dan fibronectin (Shrivastava *et al*, 2013). NADPH oksidase sebagai salah satu turunan ROS menyebabkan proliferasi sel mesangial dan ekspresi fibronectin (Krishan & Chakkarwar, 2011).

Pada kondisi glukosa yang tinggi terjadi peningkatan ekspresi dan aktivitas TGF- β pada sel mesangial dan tubulus proksimal ginjal. ROS juga berperan mengaktifkan TGF- β secara langsung atau tidak langsung melalui aktivitas enzim proteolitik. TGF- β meningkatkan akumulasi matriks ekstraseluler dalam sel. Kondisi hiperglikemi mengakibatkan penetralan terhadap antibodi TGF- β sehingga

terjadi penumpukan matriks ekstraseluler dalam sel yang tidak terkontrol pada sel mesangial (Hyun, 2011).

Angiotensin II berperan dalam perkembangan diabetik nefropati. Konsentrasi glukosa yang tinggi merangsang RAS dalam sel mesangial menyebabkan peningkatan produksi angiotensin II, hal ini disebabkan penyempitan arteri preferensial eferen glomerulus sehingga terjadi peningkatan permeabilitas kapiler terhadap protein, angiotensin II mempengaruhi sintesis glomerulus dan protein mesangial serta fungsi mesangial serta merangsang pembentukan AGEs serta merangsang proliferasi sel mesangial dan akumulasi matrik mesangial dengan menginduksi proinflamasi dan fibrogenic sitokin, kemokin dan GH (Alsaad & Herzengberg, 2007).

Asam rosmarinat (AR), terkenal sebagai antioksidan yang terkandung dalam beberapa jenis tumbuhan, sesuai fungsi utamanya sebagai antioksidan dan anti-inflamasi (Tavafi *et al*, 2011). juga mampu menurunkan NF- κ B, meningkatkan *glutathione transferase*, anti-aktivitas Bcl-2, pemakan peroksinitrit, memperbaiki aktivitas SOD, GPX dan CAT pada ginjal serta mampu menghambat CTGF (Jiang *et al*, 2012).

Fungsi vitamin E sebagai zat yang bersifat lipofilik dan didapatkan langsung dari makanan seperti kacang-kacangan, rumput laut, dan minyak sayur mengandung senyawa *α -tocopherol*. Vitamin E dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan menghambat produksi ROS. Vitamin E dapat berfungsi sebagai pertahanan maksimal terhadap peroksidasi lemak karena ROS. Tidak ada catatan yang menjelaskan toksisitas vitamin E yang dikonsumsi dari makanan, namun dapat bersifat *pro-oxidant* pada dosis suplemen yang tinggi (contoh

1000/mg/hari) (Rizvi *et al*, 2014). Sehingga vitamin E diharapkan dapat berfungsi sebagai pencegah stress oksidatif lebih lanjut pada sel mesangial ginjal.

Berdasar uraian diatas, maka strategi tatalaksana diabetik nefropati dengan penghambatan pada jalur-jalur yang terkait dengan stres oksidatif dan pengendalian ROS dapat menjadi salah satu cara untuk mencegah diabetik nefropati lebih lanjut, karena sudah terbukti bahwa penghambatan diabetik nefropati dengan terapi tunggal sulit atau tidak mungkin. Sehingga dengan menggunakan asam rosmarinat dan vitamin E, diharapkan mempunyai efek sinergis yang dapat menghambat ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus.

1.1. Rumusan Masalah dan Sub Masalah:

Rumusan masalah :

Apa efek pemberian asam rosmarinat dan vitamin E terhadap ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus pada tikus diabetes?

1.2. Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan umum:

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efek pemberian asam rosmarinat dan vitamin E terhadap ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus ginjal pada tikus diabetes.

1.3. Manfaat Penelitian

1.3.1 Manfaat Akademis

Dapat dijadikan dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan.

1.3.2 Manfaat Praktis

Dengan diketahuinya peran asam rosmarinat dan vitamin E diharapkan dapat dikembangkan sebagai terapi yang spesifik pada sel mesangial, baik secara langsung maupun tidak langsung, serta baik sebagai tindakan pencegahan terhadap kerusakan akibat cedera atau pengobatan diabetik nefropati setelah terjadinya kerusakan sehingga tidak berkembang ke proses yang lebih lanjut, yaitu penyakit ginjal kronik dan penyakit ginjal tahap akhir.

BAB II

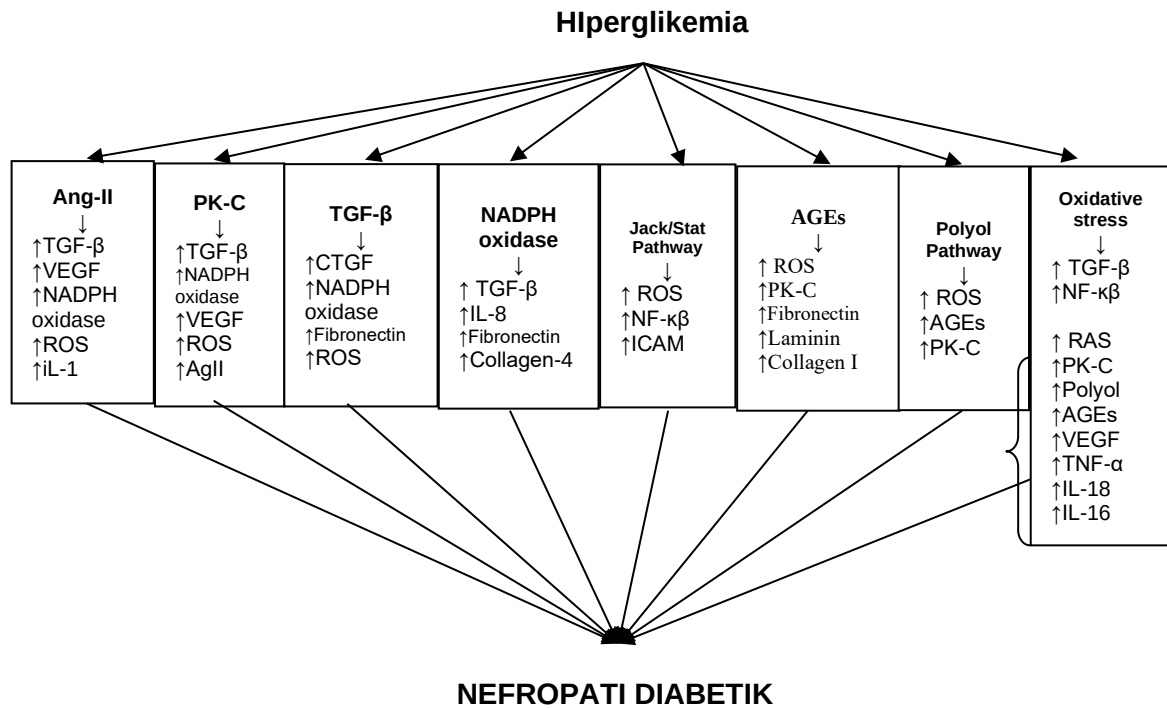
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetik Nefropatik

Diabetik nefropati adalah komplikasi Diabetes mellitus pada ginjal yang dapat berakhir sebagai gagal ginjal. Keadaan ini akan dijumpai pada 35-45% penderita diabetes melitus. Kondisi ini ditandai dengan albuminuria menetap > 300 mg/24 jam pada minimal dua kali pemeriksaan dalam kurun waktu 3 sampai 6 bulan pada minimal dua kali pemeriksaan dalam kurun waktu tiga sampai enam bulan atau penurunan kecepatan filtrasi glomerulus dan peningkatan tekanan darah arterial tetapi tanpa penyakit ginjal lainnya atau penyakit kardiovaskuler (Hendromartono, 2006; Batuman, 2012). Diabetik nefropati juga menyebabkan perubahan struktur histologis pada glomerulus, yaitu adanya hipertrofi yang disebabkan karena adanya proliferasi sel mesangial, penumpukan matriks ekstraseluler, penebalan membrana basalis glomerulus, dan glomerulosklerosis (Dronavalli *et al*, 2008). Perubahan awal gambaran histologis diawali dengan hipertrofi glomerular dan renal, lalu diikuti dengan penebalan membrana basalis, ekspansi mesangial dengan akumulasi protein matriks ekstraselular disertai proliferasi sel mesangial intraglomerular (Ohshiro *et al*, 2005). Disfungsi sel podosit juga berperan dalam perkembangan diabetik nefropati, podosit adalah sel yang berdiferensiasi paling terakhir sehingga tidak dapat beregenerasi. Kehilangan sel podosit menyebabkan perubahan permanen pada proses barrier filtrasi ginjal (Pagtalunan *et al*, 1997).

Mekanisme terjadinya diabetik nefropati adalah suatu proses multifaktor dan kompleks (gambar 2.1) (Tavafi, 2013). Melibatkan banyak jalur meliputi SRAA (Sistem Renin, Angiotensin, Aldosteron), PKC, TGF- β , NADPH oxidase, JAK/STAT, AGEs, TNF- β , stres oksidatif, PPAR- γ , Adenosin dan poliol. Setiap

jalur menginduksi kerusakan melalui beberapa mediator atau berinteraksi dengan jalur lainnya.



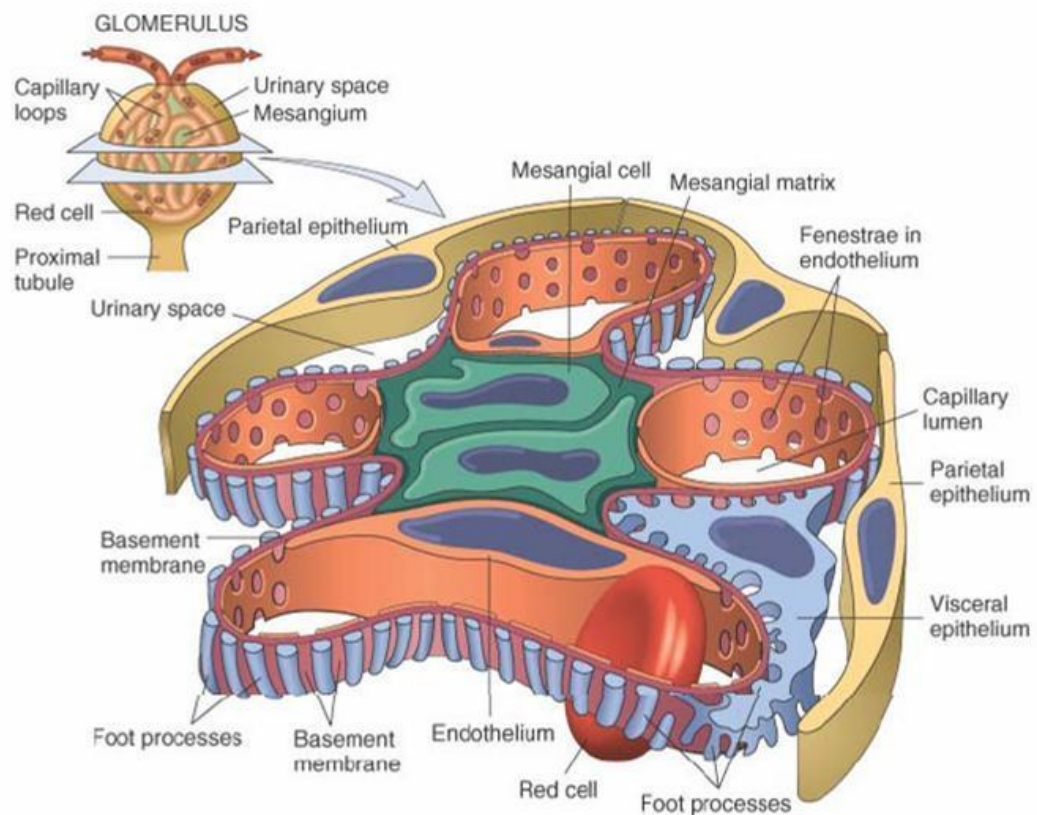
Gambar 2.1. Kompleksitas Patogenesis Nefropati Diabetik . patogenesis diabetik nefropati disebabkan oleh berbagai jalur meliputi pembentukan radikal bebas dan peningkatan produksi matriks ekstraseluler (Tavafi, 2013).

2.2 Anatomi dan Histologi Ginjal

Ginjal berbentuk mirip dengan bentukan kacang yang terletak di retroperitoneal dinding posterior cavum abdomen. Pada bagian superior ginjal terdapat kelenjar adrenal yang terikat dengan jaringan ikat. Tepi medial ginjal adalah hilus, arteri (renalis), vena renalis, dan pelvis renalis yang mengarah ke ureter. Bila ginjal diiris dengan irisan sagital, bagian luar merupakan korteks, bagian dalam merupakan medula, medula sendiri terdiri atas piramid renal. Dasar setiap piramid menyatu dengan korteks, apeks berbentuk bulat pada setiap piramid disebut papila renalis yang dikelilingi kaliks minor berbentuk seperti pipa kerucut. Kaliks minor bergabung membentuk kaliks mayor, dan akhirnya bergabung membentuk pelvis renalis pada bagian terminal. Setiap pelvis renalis keluar sebagai ureter lalu mengarah menuju vesika urinaria (Guyton dan Hall, 1995 ; Eroschenko, 2000).

Nefron merupakan unit fungsional terkecil pada ginjal. Setiap ginjal terdapat kurang lebih satu juta nefron (Guyton dan Hall, 1995; Eroschenko, 2000). Tiap nefron terdiri dari korpuskula renal yang terdiri dari glomerulus berupa untaian kapiler dan dibungkus oleh kapsula Bowman dan bagian tubular yang terdiri dari tubulus kontortus proksimal, ansa henle, dan tubulus kontortus distal.

Glomerulus lalu kemudian berlanjut menuju tubulus kontortus proksimal masih berada di bagian korteks ginjal, selanjutnya berubah menjadi ansa henle yang turun ke medulla, menyambung tubulus distal yang terletak di korteks kemudian ke tubulus koligens yang berakhir menuju ureter (Guyton dan Hall, 1995; Eroschenko, 2000).



Gambar 2.2. Histologi glomerulus. Penampang skematis glomerulus memperlihatkan struktur dan matriks penyusun glomerulus (Eroschenko, 2000)

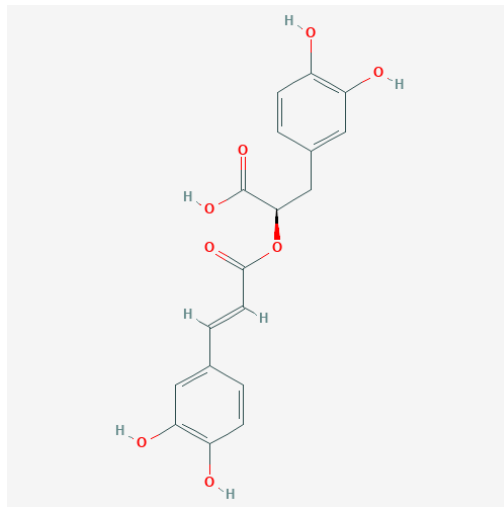
Bila glomerulus dipotong dengan potongan melintang akan tampak gambaran endotel vaskular dengan Fenestrae sebagai lubang untuk filtrasi, sel mesangial terletak di bagian sentral membentuk matriks mesangium, sel visceral yang berbatasan dengan endotels secara langsung serta dibatasi dengan membrana basalis. Tepi dari sel visceral membentuk kaki yang disebut podosit. Kaki podosit dengan dinding endotel membentuk Fenestrasi. Bagian luar sel visceral terdapat parietal (Robbins dan Cotran, 2005).

Sel mesangial merupakan diferensiasi sel ginjal yang membentuk mesangium glomerulus bagian sentral. Sel mesangial dengan matriksnya

membentuk kutub vaskular renal. Sel mesangial meliputi sepertiga dari total sel di glomerulus. Fungsi utama sel mesangial adalah mengeluarkan residu yang terperangkap di membrana basalis sehingga menjaga penyaringan (filter) agar tetap bersih. Sel mesangial dibatasi oleh ruang interseluler yang mengandung matriks ekstraseluler atau disebut matriks mesangial. Matriks mesangial menjadi penyokong struktur untuk mesangium. Matriks mesangial tersusun atas protein matriks glomerulus.

2.3 Asam Rosmarinat

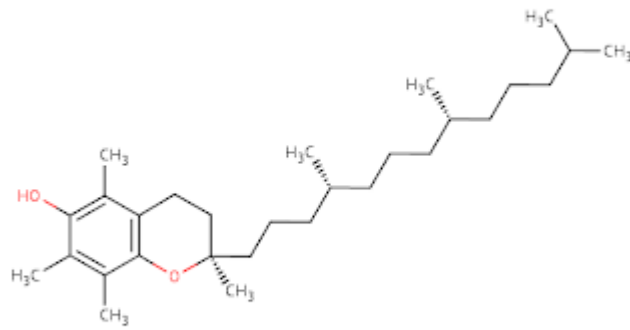
Asam rosmarinat adalah senyawa ester dari asam kafeat dan asam 3,4-dihidroksifenilaktik yang merupakan salah satu senyawa asam flavonoid. Asam rosmarinat banyak dijumpai pada tanaman spesies *Boraginaceae* dan subfamily *Nepetioideae* dari family *Lamiaceae*. Namun, dapat juga ditemukan pada family tanaman tingkat tinggi lainnya. Asam rosmarinat banyak terkandung dalam tanaman obat seperti kumis kucing. Anti inflamasi dan antioksidan merupakan efek dominan dari asam rosmarinat (Ede *et al*, 2013). Asam rosmarinat terbukti memiliki efek antioksidan yang baik. Belum didapatkan laporan mengenai interaksi dengan obat lain sehingga dapat dikombinasikan dengan penggunaan antioksidan lainnya, suplemen asam lemak esensial maupun derivat senyawa dari tanaman lainnya (Jill, 2014). Menurut penelitian yang dilakukan Lamaison *et al* bahwa asam rosmarinat sudah banyak diteliti dan dibuktikan memiliki efek antioksidan dan anti inflamasi (Lamaison *et al*, 1991).



Gambar 2.4. Struktur kimia Asam Rosmarinat . Berfungsi sebagai anti oksidan dan anti inflamasi (anti fibrinolitik)

2.4 Vitamin E

Vitamin E memiliki peran sebagai antioksidan dalam metabolisme semua jenis sel tubuh. Vitamin E adalah sebutan umum bagi seluruh derivat senyawa *tocopherol* dan *tocotrienol*, namun lebih umum merujuk kepada derivat senyawa α -*tocopherol*. sumber utama vitamin E didapatkan dari konsumsi minyak sayur, tanaman biji-bijian seperti kacang, dan tanaman gandum sejenisnya. Vitamin E bersifat lipofilik dan berfungsi sebagai antioksidan dengan mencegah peroksidasi lipid akibat efek radikal bebas (ROS). Vitamin E dapat memiliki efek anti inflamasi dan berfungsi sebagai regulator enzim serta ekspresi gen (Combs and McClung, 2017). Penelitian yang dilakukan Rohmatussolihat mengatakan bahwa vitamin E (α -tokoferol) dipercaya sebagai sumber antioksidan yang bekerja dengan mencegah lipid peroksidasi dari asam lemak tak jenuh di dalam membran sel dan membantu oksidasi vitamin A serta mempertahankan kesuburan (Rohmatussolihat, 2009).

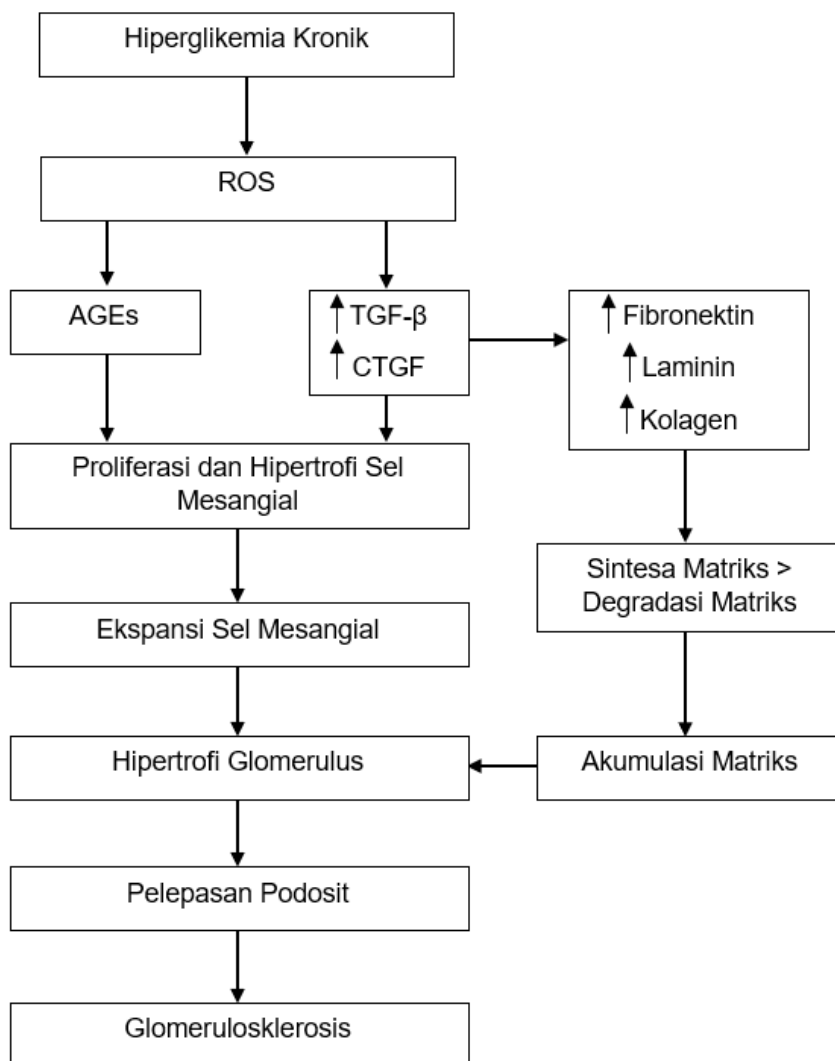


Gambar 2.3. Struktur Vitamin E α -tocopherol. Bentuk senyawa aktif vitamin E dalam tubuh manusia.

BAB III

KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



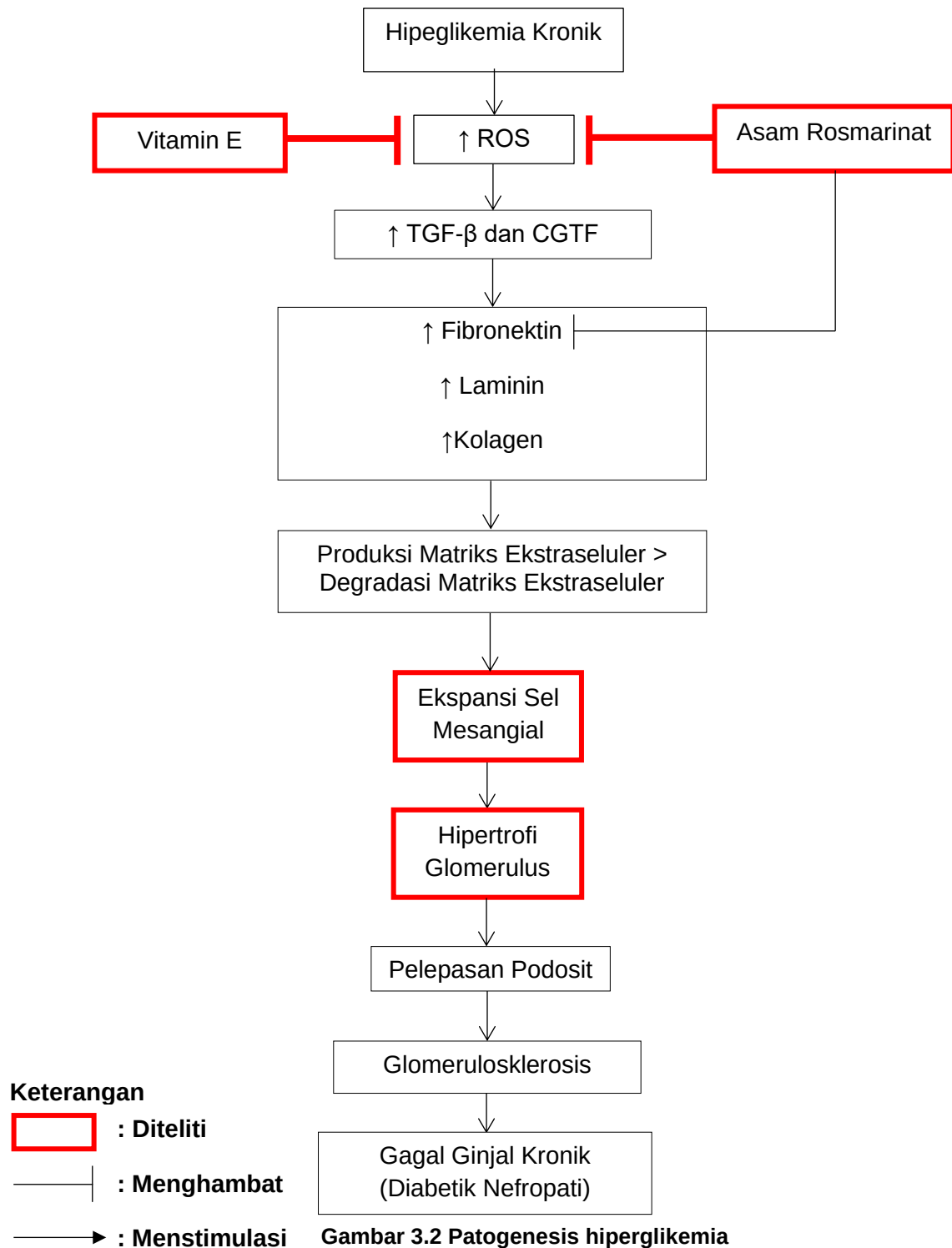
Gambar 3.1. Skema patofisiologi terjadinya diabetik nefropati

Hiperglikemia kronik menyebabkan peningkatan ROS melalui berbagai macam jalur enzimatik maupun non-enzimatik yang ada dalam tubuh sehingga menimbulkan stress oksidatif. Sumber utama ROS pada diabetes salah satunya

dengan enzim NADPH oxidase. NADPH oksidase adalah komponen penting dari makrofag dan neutrofil tetapi juga ditemukan pada mesangial, podosit dan sel endotel. Di samping itu peningkatan aktivitas TGF- β juga meningkatkan ROS. Di sini terbagi 2 jalur dimana TGF- β nantinya meningkat bersamaan dengan CTGF sehingga terjadi peningkatan sintesa matrik ekstraseluler dan di jalur yang lain terjadi proliferasi dan hipertrofi sel mesangial.

Pada penelitian ini akan diamati ekspansi mesangial dan hipertrofi glomerulus sebagai tahapan menuju glomerulosklerosis. Upaya yang dapat dilakukan agar mencegah terjadinya ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus sehingga mencegah glomerulosklerosis yang merupakan komplikasi menuju diabetik nefropati merupakan target penting untuk diamati pada penelitian ini.

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Patogenesis hiperglikemia kronik menyebabkan kondisi nefropati

3.3. Hipotesis

Pemberian asam rosmarinat dan vitamin E dapat mencegah progresifitas ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus pada tikus diabetes.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *true experimental laboratory* dan metode *randomized posttest only controlled group design* untuk mengetahui efek pemberian asam rosmarinat dan vitamin E terhadap pencegahan ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus pada tikus diabetes.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB, pembedahan dan pemeriksaan ELISA albuminuria dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, pengecatan dan pengukuran variabel spesimen dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan pada tahun 2017.

4.3. Sampel Penelitian

4.3.1 Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 7-9 minggu, berat badan 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.
2. Kriteria eksklusi: tikus yang mengalami gangguan kesehatan (bulu tidak mulus, gerak tidak lincah) dan berat badan kurang dari 150 g.

3. Kriteria drop out : tikus yang tidak mencapai kondisi hiperglikemia dan mati selama perlakuan

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung dengan rumus:

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

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 6, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 2 kelompok perlakuan:

$$6(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel untuk tiap perlakuan adalah minimal 4. Total tikus yang digunakan adalah 4 ekor untuk tiap kelompok. Angka keberhasilan terjadinya diabetes dengan metode yang digunakan pada penelitian ini adalah lebih 80%, ditambah kemungkinan tikus mati maka sampel keseluruhan yang digunakan adalah 42 ekor.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

1. Induksi diabetes menggunakan streptozotocin (40 mg/kg)
2. Asam Rosmarinat (75 mg/kg)
3. Vitamin E (400 mg/kg)

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Ekskresi Albumin urin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
2. Ekspansi mesangial (%)
3. Hipertrofi glomerulus (μm^3)

4.5 Definisi Operasional

1. Streptozotocin (STZ): adalah zat yang digunakan untuk menginduksi diabetes (hiperglikemia) dan selanjutnya menginduksi nefropati diabetik dari efek hiperglikemia yang ditimbulkan pada tikus. STZ yang digunakan dalam penelitian ini adalah merk *Sigma-Aldrich* (Cat.No S0130-1GÂ Â).
2. Nefropati diabetik: Induksi nefropati diabetik dilakukan melalui induksi diabetes dengan STZ. Nefropati diabetik ditandai dengan adanya peningkatan albuminuria, ekspansi mesangeal, dan hipertrofi glomerulus yang diukur pada akhir perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Albuminuria adalah didapatkannya albumin dalam urin yang digunakan sebagai salah satu indikator nefropati diabetik. Albumin urin diukur dengan metode ELISA (Cat.No E1276Ra).
4. Asam rosmarinat (AR) mempunyai fungsi sebagai antioksidan yang multiproperti, serta antifibrotik. Dosis sebagai antioksidan yang direkomendasikan 50 sampai 100 mg/kg/hari dosis tunggal. Pada penelitian ini digunakan asam rosmarinat dengan merk *Sigma-Aldrich* (Cat.No BP1224) diberikan dengan sonde dengan dosis 75mg/Kg/hari .
5. Volume glomerulus (GV) adalah volum glomerulus yang didapatkan dari perhitungan area glomerulus (GA) pada hasil pengecatan HE jaringan ginjal yang dimasukkan dalam formula hitung $GV=1.2545 (GA)^{1.5}$,

digunakan sebagai salah satu indikator evaluasi nefropati diabetes (hipertrofi glomerulus), dan dinyatakan dalam satuan μm^3 .

6. Ekspansi mesangial adalah area matrik mesangial pada hasil pengecatan HE jaringan ginjal yang dinyatakan dalam presentase area matriks mesangial dibagi area glomerulus total dinyatakan dalam satuan persen. Area glomerulus total dan area matriks mesangial diukur dengan aplikasi *ImageJ* 1.48. menggunakan menu *Freehand selection* yang telah dikalibrasi dengan perbandingan 1:1 (1 pixel=1 mikrometer).

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian :

1. Streptozotocin
2. Asam Rosmarinat
3. Vitamin E
4. Insulin
5. Alkohol 70%
6. Ketamine
7. Media transfer *Buffer Neutral Formaline* (BNF) 10%
8. Pakan tinggi lemak

4.6.2 Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian :

1. Peralatan pemeliharaan tikus seperti kandang, anyaman kawat, botol minum, dan sekam
2. Papan paraffin
3. Pin

4. Peralatan bedah seperti gunting bedah, pisau bedah, dan pinset
5. Spuit 20 ml
6. Tabung 15 ml

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat pakan, pakan tinggi lemak, alkohol 70%, hewan coba tikus (*Rattus norvergicus*), dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus dikandangkan individual, mendapatkan pakan dengan komposisi kalori 60% lemak, dan akses minum bebas. Tikus diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi FKUB selama tujuh hari sebelum eksperimen.

4.7.2. Induksi Diabetes

Tikus diberikan diet tinggi lemak selama 3 minggu. Pada hari ke 22, tikus dipuaskan selama 6 sampai 8 jam (mulai jam 07.00 sampai 13.00 – 15.00) sebelum pemberian STZ. Air minum tetap diberikan. Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dosis tunggal 40 mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) (Furman, 2015). Diberikan diet tinggi lemak hingga akhir penelitian. Evaluasi status diabetes dengan mengukur gula darah pada hari ke-3 pasca injeksi STZ. Tikus berkembang menjadi diabetes bila gula darah lebih 200 mg/dl.

4.7.3. Pemberian Asam Rosmarinat dan Vitamin E

Tikus diberikan asam rosmarinat dosis 75 mg/kg dengan menggunakan sonde setiap hari pada pukul 16.00. pemberian vitamin E dosis 400 mg/kg dilarutkan dalam *olive oil* dengan perbandingan 100 mg vitamin E dilarutkan dalam 1 cc *olive oil*, diberikan menggunakan sonde setiap hari pada pukul 16.00.

4.7.3. Pengorbanan Tikus

Disiapkan media *Buffer Neutral Formaline* (BNF) 10%. Ditimbang berat badan tikus. Tikus dieuthanasia menggunakan ketamine 100 mg/mL (CAS Number 1867-66-9). Tikus diposisikan pada papan bedah dan difiksasi pada papan menggunakan pin. Dilakukan insisi lapisan terluar kulit tikus dengan gunting lurus dan pisau bedah. Dilakukan insisi lapisan peritoneal dari daerah abdominal hingga toraks. Dibuat lubang pada vena cava untuk drainase darah. Dilakukan perfusi jantung dengan 12 ml HBSS dingin melalui spuit 20 ml hingga warna ginjal berubah dari coklat kemerahan menjadi coklat pudar. Dilakukan pengambilan ginjal kanan dan kiri dengan memotong arteri dan vena ginjal. Dipastikan bahwa lemak tidak ikut terambil. Spesimen ginjal dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml media transfer (pH 7) dingin dan dilakukan penimbangan berat ginjal (Liu et al, 2013).

4.7.4. Pewarnaan Spesimen Ginjal

Jaringan ginjal difiksasi dalam buffer formalin 10%, *diembedded* dalam parafin, dipotong dengan ketebalan 4 μ m, dan dicat dengan *hematoxylin eosin* (HE). Slide jaringan diamati dengan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 400x. Sepuluh glomerulus tiap sampel difoto secara acak

4.7.5. Pengukuran Ekspansi Mesangial dan Hipertrofi Glomerulus

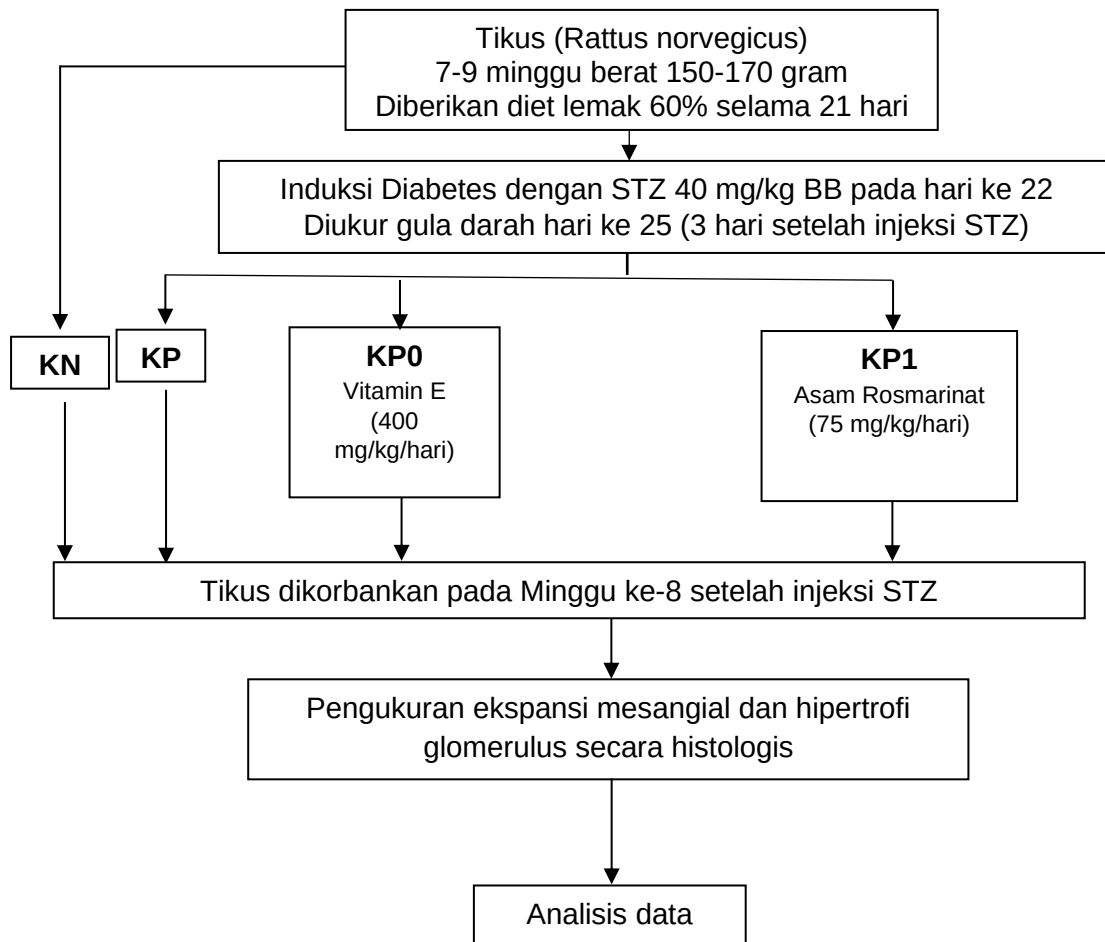
Ekspansi mesangial dihitung dengan mengukur luas area mesangial menggunakan *software ImageJ 1.48*. Lalu, area mesangial dibagi dengan luas area keseluruhan glomerulus dan disajikan dalam satuan persen (%). Hipertrofi

glomerulus diukur dengan menghitung volume glomerulus. Volume glomerulus dihitung dengan rumus: $GV=1.2545 (GA)^{1.5}$ (Rangan & Tesch, 2007).

4.8 Analisis Data

Seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, dan *Post hoc test* (*uji Least Significant Difference*).

4.9. Alur Penelitian



Keterangan:

KN : Kontrol negatif (tikus normal, tidak didiabeteskan)

KP : Kontrol positif (tikus diabetes tanpa asam rosmarinat dan atau telmisartan)

KP0 : Tikus diabetes mendapatkan vitamin E

KP1 : Tikus diabetes mendapatkan asam rosmarinat

BAB V

HASIL PENELITIAN

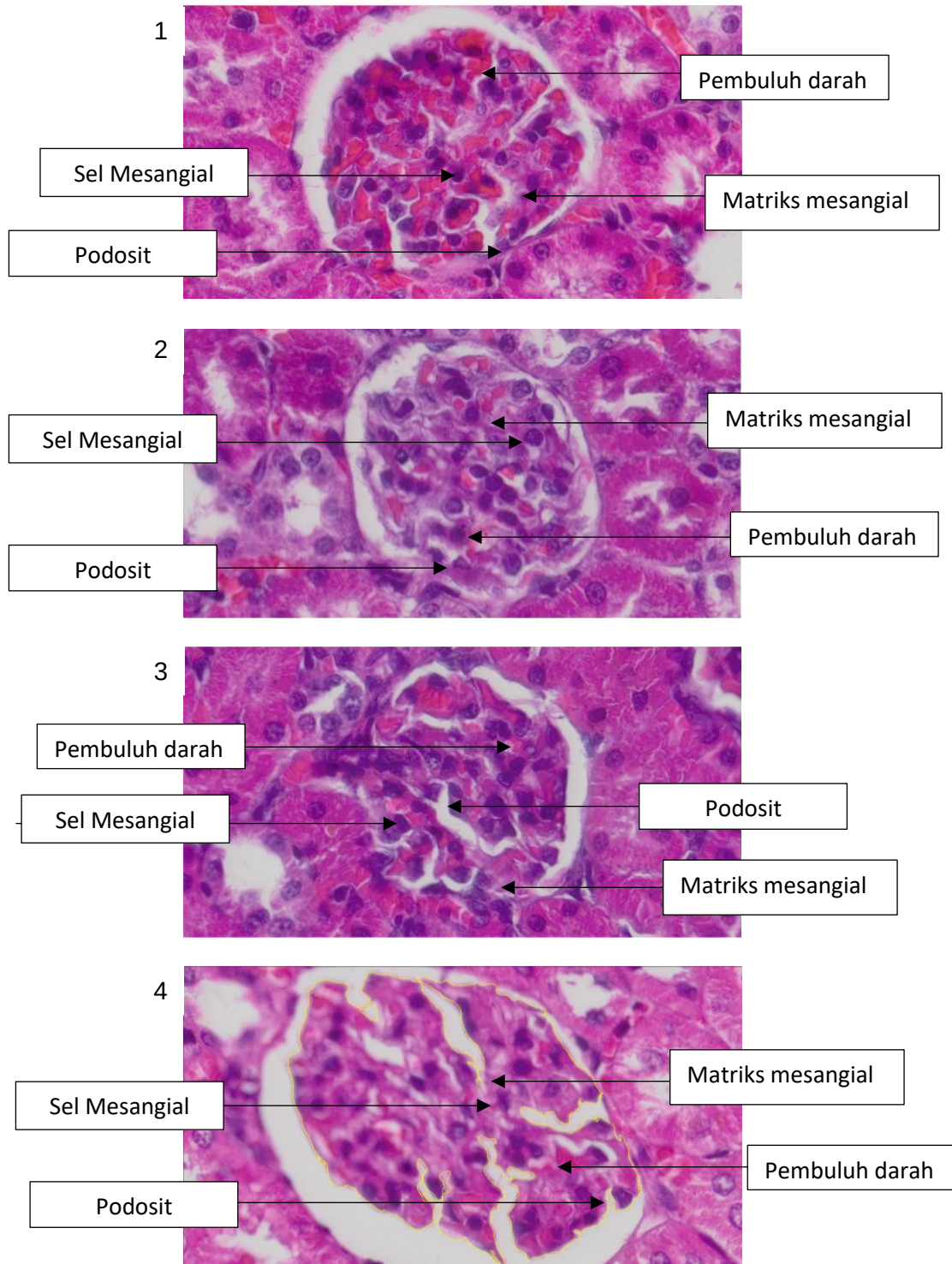
5.1 Statistik Deskriptif

5.1.1 Uji Normalitas Data

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data presentasi matriks mesangial dan volume glomerulus untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi semua data telah terbukti terdistribusi normal sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik.

5.2 Hasil Analisis Pengaruh Asam Rosmarinat dan Vitamin E Terhadap Presentasi Mesangial dan Volume Glomerulus

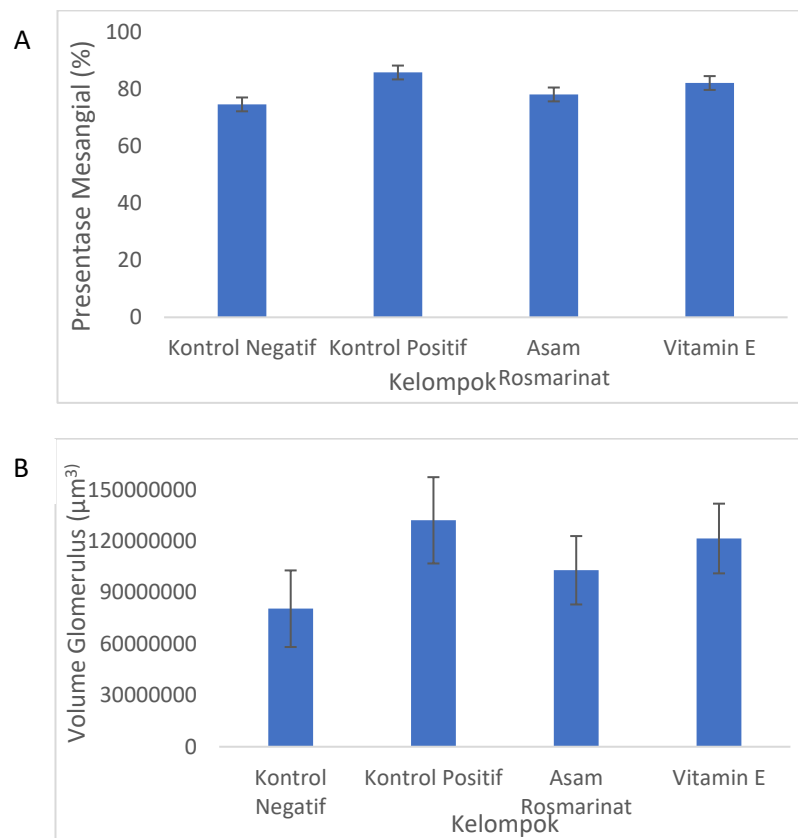
Hasil pewarnaan Hematoxilen Eosin (HE) jaringan ginjal disajikan pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Histologi jaringan ginjal dengan pewarnaan HE.

Keterangan: Pada gambar 1 kontrol negatif, gambar 2 kontrol positif tanpa pemberian asam rosmarinat maupun vitamin E, gambar 3 dengan pemberian asam rosmarinat, dan gambar 4 dengan pemberian vitamin E (pewarnaan Hematoxylin-Eosin , perbesaran 400x). Pada kelompok pemberian Asam rosmarinat dan kelompok pemberian vitamin E tampak anyaman pembuluh darah dan sel mesangial lebih dominan dibandingkan kontrol positif. Pada kelompok kontrol positif tampak matriks mesangial mulai memenuhi ruang glomerulus.

Hasil rata-rata penghitungan nilai glomerulus dan presentase mesangial disajikan pada table 5.1



Tabel 5.1 Diagram rata-rata nilai presentase mesangial (A) dan volume glomerulus (B).

Keterangan : Pada kelompok perlakuan dengan pemberian asam rosmarinat dan kelompok pemberian vitamin E tampak terjadi penurunan baik dalam presentase mesangial maupun volume glomerulus, namun tidak mencapai nilai normal (kontrol negatif).

Data yang sudah dianalisis menggunakan *software ImageJ 1.48* selanjutnya data diuji dengan uji homogenitas, normalitas, ANOVA, dan *Post hoc test* menggunakan uji *Least Square Differences*.

Dilakukan uji komparasi menggunakan uji ANOVA satu jalur. Hasil uji ANOVA satu jalur diperoleh bahwa ada perbedaan yang bermakna pada nilai volume glomerulus ($p=0,000$), serta terdapat perbedaan bermakna pada nilai presentasi matriks mesangial ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian asam rosmarinat dan vitamin E akan memberikan pengaruh yang berarti terhadap perubahan volume glomerulus maupun presentasi matriks mesangial.

5.3 Hasil Analisis Korelasi Antara Perubahan Nilai Matriks Mesangial Terhadap Perubahan Nilai Volume Glomerulus

Berdasarkan hasil uji korelasi antara kelompok variabel presentasi matriks mesangial dengan kelompok variabel volume glomerulus di atas menunjukkan nilai koefisien korelasi (koefisien untuk menilai hubungan linier antara 2 atau lebih variabel) sebesar 0,257 dengan $p=0,088$ ($p>0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang lemah dimana kecenderungan kenaikan nilai presentase matriks mesangial akan diikuti oleh kenaikan nilai volume glomerulus, demikian sebaliknya.

BAB VI

PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN

6.1 Pengaruh Induksi Streptozotosin (STZ) dan Diet Tinggi Lemak dalam Menyebabkan Diabetik Nefropati

Diet tinggi lemak diberikan selama 21 hari sebelum injeksi STZ. Pada hari ke 22 dilakukan injeksi STZ dan diukur glukosa darah 3 hari setelah injeksi STZ (hari ke 25). Hasil injeksi STZ menunjukkan tikus mengalami diabetes sebanyak 71,42% dari total sampel. Hal ini sesuai dengan mekanisme streptozotocin dalam menyebabkan diabetes pada tikus coba. STZ memasuki sel beta pankreas melalui transpoter glukosa (GLUT2) dan menyebabkan alkilasi DNA. Alkilasi DNA mencegah proses perbaikan sel-sel yang rusak akibat reaksi kimia akibat paparan zat dari luar tubuh termasuk diet yang dikonsumsi. Kerusakan DNA menginduksi aktivasi dari poli ADP-ribosilasi yang menjadi proses penting dalam mekanisme STZ menginduksi diabetes. Poli ADP-ribosilasi menyebabkan deplesi NAD⁺ dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP setelah pemberian STZ menyebabkan pembentukan radikal superoksida dengan substrat xantin oksidase. Maka dari itu terbentuklah hydrogen peroksida dan radikal hidroksil. Selanjutnya, STZ melepaskan toksin yang menyebabkan kerusakan DNA. Akibatnya, kerusakan sel beta pankreas akibat nekrosis sehingga mengurangi produksi insulin (Szkudelski, 2001).

Selain itu, konsumsi diet tinggi lemak berdampak terhadap kenaikan berat badan, gangguan metabolisme glukosa, dan sensitifitas insulin (Panchal *et al*, 2011). Konsumsi diet tinggi lemak menstimulasi terjadinya sindroma metabolik yang ditandai dengan gangguan toleransi glukosa, dislipidemia, hiperinsulinemia,

dan peningkatan kadar plasma leptin. Diet tinggi lemak dalam jangka panjang dapat menyebabkan penurunan kepadatan sel beta pankreas akibat hiperinsulinemia. Kombinasi diet tinggi lemak dengan pemberian STZ secara sinergis akan menyebabkan kondisi diabetes. Kondisi diabetik berkepanjangan akan mengarah kepada komplikasi kronik yaitu diabetik nefropati yang ditandai peningkatan albumin pada urin.

6.2 Pengaruh Diabetik Nefropati terhadap Sel Mesangial dan Volume Glomerulus

Hiperglikemia kronik akibat diabetes melitus menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan keadaan yang ditandai oleh ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh. Munculnya stres oksidatif terjadi karena secara struktur kimia oksidan memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluar yang mana pada kondisi normal oksidan dengan antioksidan, oksidan diikat oleh antioksidan sehingga memiliki pasangan elektron. Oksidan yang tidak memiliki pasangan elektron akan bereaksi dengan sel-sel tubuh termasuk glomerulus sehingga terjadinya kondisi stres oksidatif. Perubahan status oksidatif itu ditandai dengan perubahan aktivitas antioksidan endogen serta meningkatnya kerusakan biomolekul secara oksidatif (Levy *et al*, 2002).

Stres oksidatif yang terus-menerus menyebabkan perubahan glomerulus dengan peningkatan produksi matriks ekstraseluler. Kelainan nefrologik awal pada diabetik nefropati adalah adanya penebalan dari *glomerular base membrane* dan ekspansi dari mesangium akibat penumpukan dari matriks ekstraseluler. Ukuran glomerulus dan ginjal pada awalnya normal atau meningkat, namun mengalami peningkatan seiring menumpuknya matriks ekstraseluler dan proliferasi sel mesangial. Gambaran histologi glomerulus pada nefropati diabetik

memperlihatkan adanya penebalan *glomerular base membrane*, ekspansi mesangial glomerulus yang akhirnya menyebabkan glomerulosklerosis (Dronavalli *et al*, 2008). Pada penelitian tampak ekspansi mesangial yang ditandai peningkatan presentase area mesangial dibagi area glomerulus total. Lalu, terjadi hipertrofi glomerulus ditandai peningkatan nilai volume glomerulus secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menandakan bahwa dalam kondisi hiperglikemia klinik akibat diabetes akan terjadi peningkatan matriks ekstraseluler seperti laminin, fibronektin, dan kolagen disertai proliferasi sel mesangial intraglomerular (Ohsiro *et al*, 2005). Ekspansi mesangial menyebabkan peningkatan tekanan intraglomerular yang dapat meningkatkan volume glomerulus sehingga terjadi hipertrofi sehingga berakhir kepada pelepasan podosit yang ditandai albumin pada urin.

6.3 Pengaruh Asam Rosmarinat Terhadap Sel Mesangial dan Volume Glomerulus

Pada penelitian ini pemberian asam rosmarinat memberikan rata-rata nilai volume glomerulus dan presentase mesangial lebih rendah walaupun tidak mencapai nilai normal (kontrol negatif). Hal ini disebabkan mekanisme asam rosmarinat sebagai antioksidan dalam menangkal efek samping radikal bebas. Penelitian serupa menggunakan asam rosmarinat dalam mencegah glomerulosklerosis dengan melihat volume glomerulus menunjukkan bahwa asam rosmarinat dapat mencegah hipertrofi glomerulus dengan mengurangi efek stres oksidatif akibat radikal bebas lebih lanjut. Glomerulus mengalami hipertrofi yang lebih besar pada tikus kontrol dibandingkan pemberian asam rosmarinat (Tavafi, 2011). Namun, efek ini tidak memberikan nilai yang sama atau mendekati nilai volume glomerulus pada tikus normal (kontrol negatif).

Radikal bebas dalam hal ini ROS menyebabkan stres oksidatif pada sel mesangial dengan membentuk NADPH oksidase. NADPH oksidase menyebabkan proliferasi sel mesangial dan ekspresi fibronectin. Proliferasi sel mesangial yang konstan menyebabkan peningkatan matriks ekstraselular yang berasal dari proliferasi sel mesangial dan ekspresi fibronectin sehingga terjadi ekspansi sel mesangial (Catherwood, 2002). Asam rosmarinat berperan sebagai antioksidan sekaligus anti fibrinolitik dalam mencegah proliferasi sel mesangial dan mengurangi penumpukan fibronectin (Makino *et al*, 2002).

6.4 Pengaruh Vitamin E Terhadap Volume Glomerulus dan Sel Mesangial

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh signifikan pemberian vitamin E terhadap rata-rata nilai volume glomerulus. Vitamin E merupakan vitamin terlarut lemak yang berperan sebagai antioksidan. Bentuk aktif vitamin E yang paling aktif dalam tubuh manusia adalah α -tocopherol. Vitamin E terbukti berperan sebagai antioksidan dengan memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas, salah satunya vitamin E dapat memecah rantai inhibisi dari lipid peroksidase (Levy *et al*, 2002). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplemen vitamin E dosis tinggi (lebih dari 400 mg/kg) dapat menimbulkan efek renal protektif (Koya *et al*, 2003). Beberapa penelitian mengatakan bahwa pemberian vitamin E sebagai antioksidan tidak memberikan hasil yang signifikan terhadap diabetik nefropati bahkan dilaporkan ada perburukan. Penelitian yang dilakukan Tavafi tentang penggunaan antioksidan pada diabetik nefropati mengatakan bahwa pemberian antioksidan vitamin E bukan merupakan strategi ideal dalam terapi diabetik nefropati. Namun, beberapa studi mengatakan bahwa pemberian kombinasi antioksidan dengan anti inflamasi

menunjukkan adanya peningkatan perbaikan dari kadar albuminuria, HbA1C, dan Malonaldehid (MDA) pada pasien diabetes (Du *et al*, 2008).

6.5 Korelasi antara Presentase Mesangial dengan Volume Glomerulus

Perubahan histologi glomerulus pada ginjal diabetes meliputi penebalan *Glomerular Base Membrane* dan ekspansi mesangial sebagai akibat peningkatan matriks mesangial dan ukuran sel mesangial karena hipertrofi sehingga menyebabkan menyempitkan area permukaan filtrasi yang menyebabkan menurunnya kecepatan filtrasi glomerulus. Pada diabetes secara *in vitro* terjadi perubahan struktur histologi pada sel mesangial berupa pembesaran mesangium yang terlihat dari peningkatan produksi protein matriks ekstraseluler (ECM) oleh sel mesangial pada kondisi glukosa tinggi (Catherwood *et al*, 2002).

Sel mesangial dikelilingi oleh matriks mesangial. Komponen dalam matriks mesangial terdiri dari kolagen tipe IV, fibronektin, glikosaminoglikan sulfat, dan laminin. Matriks mesangial berfungsi sebagai regulator migrasi pada sel, pembelahan sel, penyaring serta sebagai penyimpan *growth factor*. Sel mesangial merupakan perisit dengan fungsi utamanya menyokong struktur, mengatur aliran darah kapiler glomerulus serta mengatur pergantian matriks mesangial, mensintesis dan produksi TGF- β yang merupakan *key factor* dalam perkembangan penyakit ginjal, serta mengekspresikan reseptor untuk merespon substansi vasoaktif termasuk angiotensin II (Hyun, 2011). Pada kondisi penyakit ginjal seperti diabetes, komponen matriks seperti laminin dan fibronektin mengalami produksi berlebih sehingga mengalami deposisi yang mengakibatkan terjadinya ekspansi mesangial dan hipertrofi sel mesangial. Daerah mesangial yang mengalami ekspansi dan hipertrofi akan menekan laju filtrasi sehingga pada

tahap akhir menyebabkan pelepasan podosit. Pelepasan podosit akan menyebabkan albuminuria yang menandakan kerusakan glomerulus.

Pada kondisi diabetes, produksi matriks ekstraseluler meningkat dan tidak seimbang dengan degradasinya sehingga terjadi ekspansi. Hal ini terlihat pada pengukuran secara histologi bahwa glomerulus pada tikus diabetes akan mengalami perbesaran dibandingkan tikus tanpa perlakuan diabetes. Peningkatan area glomerular termasuk sel mesangial, matriks mesangial, dan podosit secara keseluruhan akan menyebabkan hipertrofi glomerulus dan hipertrofi ginjal secara keseluruhan diamati dengan mengukur area glomerulus (Sourris *et al*, 2008).

6.6 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan berupa tidak adanya rentang nilai standar presentase mesangial dan volume glomerulus normal pada hewan coba sehingga penelitian menggunakan kelompok kontrol negatif sebagai standar nilai presentase mesangial dan volume glomerulus normal. Pada penelitian ini pula belum menyertakan faktor lain yang mempengaruhi nilai volume glomerulus dan mesangial.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Efek pemberian asam rosmarinat dan vitamin E terhadap ekspansi sel mesangial dan hipertrofi glomerulus, dapat disimpulkan :

1. Pemberian asam rosmarinat maupun vitamin E dapat menurunkan ekspansi mesangial secara signifikan, namun tidak mencapai nilai yang setingkat dengan keadaan normal.
2. Pemberian asam rosmarinat maupun vitamin E mampu menurunkan hipertrofi glomerulus secara signifikan, namun tidak dapat mencapai nilai yang setara dengan nilai normal

7.2 Saran

Perlunya dilakukan penelitian dan kajian lebih lanjut mengenai pemberian asam rosmarinat dan vitamin E secara *in vivo* terhadap beberapa marker molekuler terkait kerusakan ginjal.

Guna mengetahui pengaruh asam rosmarinat dan vitamin E sebagai antioksidan dalam mencegah stres oksidatif akibat radikal bebas dan kajian lebih lanjut mengenai penggunaan asam rosmarinat dan vitamin E dengan dosis lainnya serta pemberian kombinasi asam rosmarinat dan vitamin E.

Daftar Pustaka

- Alsaad K.O. and Herzengberg A.M. 2007. *Distinguishing Diabetes Nephropathy from Other Causes of Glomerulosclerosis: an Uptade*. J Clin Pathol. 2007;60: 1-9.
- American Diabetic Association. 2010. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care. 33: S62-S69.
- Batuman, V. 2013. *Diabetic Nephropathy*, <http://emedicine.medscape.com/article/238946-overview> , Diakses pada 1 Mei 2016.
- Caramori M.L., Kim Y., Huang C., et al. 2002. *Cellular basis of diabetic nephropathy: Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type-1 diabetes*. Diabetes 2002; 51:506-515.
- Catherwood M.A., Powell L.A., Anderson P., McMaster D., Sharpe P.C., Trimble E.R. 2002. *Glocose-induced oxidative stress in mesangial cells*. Kidney Intr. 2002;61:599-608.
- Combs, Gerald F and McClung, James P. 2017. *The Vitamins : Fundamental Aspects in Nutrition and Health (Fifth Edition)*. Academic Press.
- Dronavalli, S., Duka, I., Bakris, G.L. 2008. *The Pathogenesis of Diabetic Nefropathy*. Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism. Vol 4 : 445-452.
- Du X, Edelstein D, Brownlee M . 2008. *Oral benfotiamine plus alpha-lipoic acid normalises complication-causing pathways in type 1 diabetes*. Diabetologia. 2008;51:1930-2.

- Ede, Gil., Enache., Oliveira-Brett. 2013. *Redox Behaviour of Verbascoside and Rosmarinic Acid. Combinatorial chemistry & high throughput screening* 16, 92-97.
- Hendromartono. 2006. *Neftopati diabetika*. In A. W. sudoyo, B. Setiyohadi, I. Alwi, M. S. K & S. Setiati (Eds.), Buku ajar ilmu penyakit dalam jilid III edisi IV. Jakarta: Penerbit FK UI.
- Hendromartono. 2009. *Nefropati Diabetik dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi IV. Jakarta : Interna Publishing.
- Jiang, W.L., Xu, Y., Zhang, S.P., Hou, J., Zhu, H.B. 2012. *Effect of Rosmarinic Acid on Experimental Diabetic Nephropathy. Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 110, 4 : 390–395.
- Koya, D., Hayashi, K., Kitada, M., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., and Haneda, M. (2003). *Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats*. J. Am. Soc. Nephrol. 14(8 Suppl. 3), S250–S253. doi:10.1097/01.ASN.0000077412.07578.44.
- Krishan P. and Chakkarwar V.A. 2011. *Diabetic nephropathy : aggressive involment of oxidative stress*. J Pham Educ Res . 2011 June : 35-41.
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A. 1991. *Medicinal lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid*. Pharm Acta Helv. 1991;66(7):185–8.
- Lee H.S. 2011. *Role of TGF- β in Mesangial Matrix Accumulation in Chronic Progressive Glomerular Disease, An Update on Glomerulopathies-Etiology and Pathogenesis*. Prabhakar S, editor. Europe : ISBN, 2011. 124P.

Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, Howard BV. 2002. *Haptoglobin Phenotype is an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease in Individuals with Diabetes: The Strong Heart Study*. J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1984-1990 [PMID: 12475459].

Liu Z., Fu C., Wang W., Xu B. 2010. *Prevalence of chronic complications of type 2 diabetes mellitus in outpatients - a cross-sectional hospital based survey in urban China*. Health and Quality of Life Outcomes.;8:62.

Makino, Toshiaki., Ono, Takahiko., Liu, Ning., Nakamura, Tomoko., Muso, Eri., Honda, Gisho. 2002. *Suppressive Effects of Rosmarinic Acid on Mesangioproliferative Glomerulonephritis in Rats*. Nephron 2002;92:898–904.

Ohshiro, Y., Lee, Y., King, G.L. 2005. *Mechanism of Diabetic Nephropathy : Role of Protein Kinase-C Activation*. Advanced Studies in Medicine. Vol 5(1A) : S5-19.

Pagtalunan M.E., Miller P.L., JumpingEagle S., Nelson R.G., Myers B.D., Rennke H.G. et al. 1997. *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes*. J Clin Invest. 1997; 99:342–8.

Panchal SK, Poudyal H, Arumugam TV, Brown L. 2011. *Rutin Attenuates Metabolic Changes, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Cardiovascular Remodeling in HighCarbohydrate, High-Fat Diet-Fed Rats*. The Journal of Nutrition. 2011;141(6):1062-9.

Rizvi S., Raza S.T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F. 2014. *The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases*. Sultan Qaboos Univ Med J. 2014 May; 14(2): e157–e165.

- Rohmatussolihat. 2009. Antioksidan Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia, Bio Trends. 4 (1).
- Saleh M.A. 2010. *Role of endothelial-1(ET-1) in glomerular inflammation and glomerular permeability in normal and diabetic kidneys*. Proquest. 2010 : 1-213.
- Scrijvers B.F., Vriese A.S., Flyvbjerg A., 2004. *From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines*. *Endocrine Reviews* 25: 971-1010.
- Shrivastava S.A., Shrivastava P.S., Ramasamy J. 2013. *Role of self-care in management of diabetes mellitus*. *J Diab Met*. 2013 : 1-5.
- Sourris KC and Forbes JM. 2008. *Pathology RAGE Drives the Development of Glomerulosclerosis and Implicates Podocyte Activation in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy Interactions Between Advanced Glycation End-Products (AGE) and their Receptors in the Development and Progression of Diabetic Nephropathy*. *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 4, 2008
- Stansbury, Jill. 2014. *Rosmarinic Acid as a Novel Agent in the Treatment of Allergies and Asthma*. *Journal of Restorative Medicine*, Volume 3, Number 1, 4 January 2014, pp. 121-126(6)
- Szkudelski. 2001. *The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas*. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.
- Tavafi, M., 2013. *Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations*. *J Renal Inj Prev*;.2:59-62.

Tavafi, M., Ahmadvand, H., Khalatbari, A., Tamjidipoor, A. 2011. *Rosmarinic acid ameliorates diabetic nephropathy in unienphrectomized diabetic rats. Iran J Basic Med Sci* 14:275-283.

Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. 2004. *Global Prevalence of Diabetes, 14 Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care.*;27:1047– 53.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Uji Normalitas

Tests of Normality				
Shapiro-Wilk				
	Kelompok	Statistic	df	Sig.
Matriks Mesangial	Kontrol Negatif	.235	10	0.214
	Kontrol Positif	.121	15	0.772
	Rosmarinic Acid	.226	10	0.245
	Vitamin E	.213	10	0.130
Volume Glomerulus	Kontrol Negatif	.195	10	0.388
	Kontrol Positif	.210	15	0.050
	Rosmarinic Acid	.126	10	0.950
	Vitamin E	.200	10	0.185

Lampiran 2 : Uji *One Way* ANOVA

ANOVA			
		Mean Square	Sig.
Matriks Mesangial	Between Groups	.028	0.000
	Within Groups	.004	
	Total		
Volume Glomerulus	Between Groups	5,896E+18	0.000
	Within Groups	5,043E+17	
	Total		

Lampiran 3 : Uji Analisis Pearson

Correlations			
Matriks Mesangial	Pearson Correlation	0,257	1
	Sig. (2-tailed)	0,088	
	N	45	45
Volume Glomerulus		Volume Glomerulus	Matriks Mesangial
	Pearson Correlation	1	0.257
	Sig. (2-tailed)		0.088
	N	45	45

Lampiran 4 : Uji Post Hoc

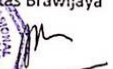
Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 % Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
GV	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-5.15826E7*	9.1680E6	.000	-7.0098E7	-3.3067E7
		Rosmarinic Acid	-2.24387E7*	1.0043E7	.031	-4.2721E7	-2.1561E6
		Vitamin E	-4.09723E7*	1.0043E7	.000	-6.1255E7	-2.0690E7
	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	5.15826E7*	9.1680E6	.000	3.3067E7	7.0098E7
		Rosmarinic Acid	2.91439E7*	9.1680E6	.003	1.0629E7	4.7659E7
		Vitamin E	1.06103E7	9.1680E6	.254	-7.9051E6	2.9126E7
	Rosmarinic Acid	Kontrol Negatif	2.24387E7*	1.0043E7	.031	2.1561E6	4.2721E7
		Kontrol Positif	-2.91439E7*	9.1680E6	.003	-4.7659E7	-1.0629E7
		Vitamin E	-1.85337E7	1.0043E7	.072	-3.8816E7	1.7489E6
	Vitamin E	Kontrol Negatif	4.09723E7*	1.0043E7	.000	2.0690E7	6.1255E7
		Kontrol Positif	-1.06103E7	9.1680E6	.254	-2.9126E7	7.9051E6
		Rosmarinic Acid	1.85337E7	1.0043E7	.072	-1.7489E6	3.8816E7
MM	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-.11163*	.02482	.000	-.1617	-.0615
		Rosmarinic Acid	-.03495	.02718	.206	-.0899	.0199
		Vitamin E	-.07070*	.02718	.013	-.1256	-.0158
	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	.11163*	.02482	.000	.0615	.1617
		Rosmarinic Acid	.07667*	.02482	.004	.0266	.1268
		Vitamin E	.04092	.02482	.107	-.0092	.0910
	Rosmarinic Acid	Kontrol Negatif	.03495	.02718	.206	-.0899	.0899
		Kontrol Positif	-.07667*	.02482	.004	-.1268	-.0266
		Vitamin E	-.03575	.02718	.196	-.0906	.0192
	Vitamin E	Kontrol Negatif	.07070*	.02718	.013	.0158	.1256
		Kontrol Positif	-.04092	.02482	.107	-.0910	.0092
		Rosmarinic Acid	.03575	.02718	.196	-.0192	.0906

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5 : Etik

	
KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"	
No: 982-KEP-UB	
KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA	
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:	
PENELITIAN BERJUDUL	: EFEK ASAM ROSMARINAT TERHADAP PENGHAMBATAN PROGRESIVITAS GLOMERULOSKLEROSIS MELALUI PENCEGAHAN LEPASNYA PODOCIT PADA TIKUS DIABETES YANG MENDAPAT TELMISARTAN
PENELITI	: NUR SAMSU
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Malang, 10 Juli 2018 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya  Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001	

NB: Nama yang tercantum pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti

DAFTAR ANGGOTA PENELITIAN**MAHASISWA S1**

No	Nama	Nim
1	IZZAH WAHIDIAH ROCHMAH	155070107111002
2	DEDY BUDI KURNIAWAN	155070107111042
3	WAHYU PRIMA E	155070101111022
4	YURIKE PUTRI	155070101111078
5	FATMA HANIF FADILA RACHIM	155070101111066
6	MUHAMMAD UNZILA RAFSI ZUKFIKRI	155070101111090
7	LUCKY WIHDA MUSTAKIMAH	155070101111090
8	MUHAMMAD FAIZ FATHURAHMAN RUCHIYADI	155070101111052

MAHASISWA PPDS

No	Nama	Nim
1	MOHAMAD FCHRUREZA	148070200011006
2	CAMELIA DWI JAYANTI	148070200011010
3	RAKHMİ TİKA PUTRI	148070200011008
4	RENNY ARI SOETEDJO	148070200011007
5	RINA YUNIARTI	148070200011004
6	METİ METİANA	158070200011003
7	RACHMAD ARI IRAWAN	158070200011006