

**EFEK EKSTRAK KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*)  
TERHADAP JUMLAH SEL GLOMERULUS GINJAL TIKUS GALUR WISTAR  
(*Rattus norvegicus*) PADA BERBAGAI LAMA PAPARAN ASAP  
KENDARAAN BERMOTOR**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh:**

**Hestya Elvasisca Mourend**

**NIM: 105070106111006**

**PRORAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP JUMLAH SEL GLOMERULUS GINJAL TIKUS GALUR WISTAR (*Rattus norvegicus*) PADA BERBAGAI LAMA PAPARAN ASAP KENDARAAN BERMOTOR

Oleh :

Hesttya Elvasisca Mourend  
NIM: 105070106111006

Telah diuji pada :  
Hari : Kamis  
Tanggal : 6 Febuari 2014  
Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. Djoko Santoso, M.Kes, DAHK  
NIK. 0848051

Penguji II / Pembimbing I

Penguji III / Pembimbing II

Dr. drg. Nur Permatasari, MS  
NIP. 19601005 199103 2 001

dr. Mudjiwijono, HE, MS, Sp.PA  
NIP. 19510526 198003 1 003

Mengetahui  
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.Park  
NIP. 19520410 198002 1 001

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi ALLAH SWT karena hanya dengan limpahan rahmat serta karunia-Nya penulis mampu menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Efek Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) Terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) Pada Berbagai Lama Paparan Asap Kendaraan Bermotor” dengan baik.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta jumlah kendaraan bermotor dan konsumsi bensin premium yang terus meningkat dan berdampak pada peningkatan pencemaran udara. Salah satu dampaknya adalah reaksi inflamasi dan hiperselularitas glomerulus ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) akan menurunkan jumlah sel glomerulus ginjal tikus Galur Wistar yang mendapat paparan asap kendaraan bermotor. Penelitian ini pada akhirnya akan membuktikan kemampuan antioksidan dan antiinflamasi dari kacang tunggak.

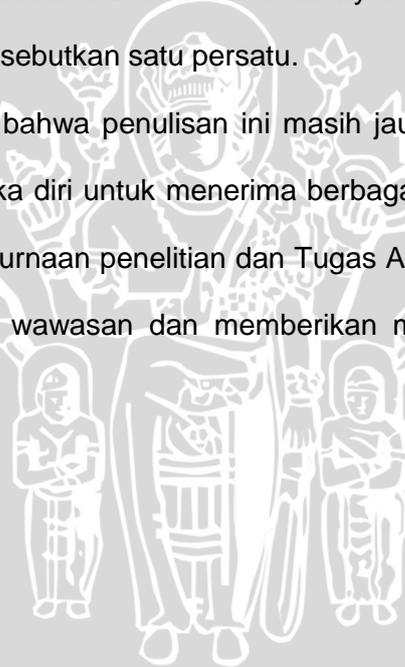
Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA(K) selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. drg. Nur Permatasari, MS selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, saran, serta masukan secara menyeluruh terhadap penelitian ini sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.

3. dr. Mudjiwijono HE, MS, Sp.PA selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan dukungan dan masukan terutama berkaitan dengan teknis pembacaan sediaan histopatologi serta membimbing penulisan Tugas Akhir ini.
4. Prof. Dr. H. Moch. Aris Widodo, MS., Sp.FK, Ph.D yang telah memberi kesempatan saya untuk ikut dalam penelitian beliau tentang ekstrak kacang tunggak ini.
5. Dr. Djoko Santoso, M.Kes, DAHK selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran sehingga penulisan tugas akhir ini menjadi lebih baik.
6. Para staf dan analis Laboratorium Farmakologi FKUB, khususnya Mas Memed, Bu Ferrida, Bu Aminah yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian Tugas Akhir ini
7. Para staf dan analis Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, khususnya Mas Mijan yang telah membantu dalam proses penelitian ini.
8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu dibidang administratif
9. Seluruh staff komisi etik FKUB yang telah membantu dalam proses etik penelitian Tugas Akhir ini.
10. Keluarga penulis, ayahanda Hendra Purnama, ibunda Netty Darlena, adik Herdian Zend Komara, uncu Andriani, tante Misdar serta nenek dan kakek yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, semangat dan doanya.
11. Kekasih tersayang Irsyad Robani Wihardi yang selalu setia menemani dalam suka dan duka.

12. Teman-teman kelompok penelitian: kak Vidi, kak Dhany, kak Mesha, mbak Sakinah, mbak Adhys, kak Obi, Irsyad, dan Rengge yang selalu saling membantu dalam penelitian ini.
13. Keluarga besar AMSA Brawijaya, Icha, Ilem, Mita, Deddy, kak Ayas yang selalu mendukung dan menginspirasi penelitian ini.
14. Teman-teman tercinta PD 2010 terutama Ima, Vinca, Ipe, Adi, yang telah menginspirasi, memotivasi, dan menemani dalam penyelesaian penelitian ini.
15. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk menerima berbagai saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan penelitian dan Tugas Akhir ini. Semoga Tugas Akhir ini dapat membuka wawasan dan memberikan manfaat, terutama bagi pihak yang membutuhkan.



## ABSTRAK

Mourend, Hesttya, Elvaxisca. 2014. **Efek Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) pada Berbagai Lama Paparan Asap Kendaraan Bermotor**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. drg. Nur Permatasari (2) dr. Mudjiwijono, HE, Ms, Sp.PA.

Emisi kendaraan bermotor yang terhirup diterjemahkan oleh sel tubuh sebagai senyawa yang sangat reaktif, dikenal sebagai senyawa reaktif oksigen yang disebut *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan ROS akan berdampak stres oksidatif yang menyebabkan gangguan pada ginjal. Ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) memiliki kandungan genistein yang dapat melindungi jaringan dari stres oksidatif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kacang tunggak terhadap jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Tiga puluh enam tikus wistar jantan dibagi secara acak kedalam 9 kelompok perlakuan, terdiri dari kelompok kontrol negatif (N), kelompok yang diberi oksigen 4 menit (N+O4), kelompok yang diberi ekstrak kacang tunggak (N+G), kelompok yang diberi perlakuan asap 2, 3 dan 4 menit, masing-masing diberikan oksigen 4 menit dengan ekstrak kacang tunggak (A2O4(+)-G, A3O4(+)-G, A4O4(+)-G) dan tanpa ekstrak kacang tunggak (A2O4(-)-G, A3O4(-)-G, A4O4(-)-G). Penelitian eksperimental ini menggunakan metode *randomized post test controlled group design*. Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan jumlah sel glomerulus ginjal antar kelompok yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Hasil analisis statistik *Post Hoc LSD* menunjukkan bahwa jumlah sel glomerulus ginjal kelompok tikus A2O4(+)-G, A3O4(+)-G, A4O4(+)-G turun secara signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus A2O4(-)-G, A3O4(-)-G, A4O4(-)-G. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak kacang tunggak dapat mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar pada berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.

**Kata Kunci** : kacang Tunggak; ROS; emisi kendaraan bermotor; sel glomerulus ginjal

## ABSTRACT

Mourend, Hesttya, Elvasisca. 2014. **The Effect of Cowpea Extract (*Vigna unguiculata*) to the Number of Renal Glomerulus Cell of Strain Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) at Various exposure Time of Motor Vehicle Fumes.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, University of Brawijaya. Supervisors: (1) Dr. drg. Nur Permatasari (2) dr. Mudjiwijono, HE, Ms, Sp.PA.

Inhalation of motor vehicle emissions are translated by the cells as a highly reactive compounds, known as reactive oxygen compounds called reactive oxygen species (ROS). Increased ROS will affect oxidative stress that causes disorders of the kidneys. Extract cowpea (*Vigna unguiculata*) containing genistein can protect the tissues from oxidative stress. The purpose of this study was to determine the effect of cowpea extract to the number of renal glomerulus cell of strain Wistar rat (*Rattus norvegicus*). Thirty- six male Wistar rats were randomly divided into nine treatment groups, consisting of a negative control group (N), the group given 4 minutes oxygen (N+O<sub>4</sub>), the group given extract of cowpea (N+G), the group given 2, 3 and 4 minutes exposure + 4 minutes oxygen, with extract oxygen cowpea A2O<sub>4</sub>(+G), A3O<sub>4</sub>(+G), A4O<sub>4</sub>(+G) and without extract cowpea A2O<sub>4</sub>(-G), A3O<sub>4</sub>(-G), A4O<sub>4</sub>(-G). Experimental study using randomized controlled post-test group design. ANOVA test showed a significant differences in renal glomerulus cell number between all groups ( $p < 0,05$ ). Statistical analysis *Post Hoc* LSD Test showed significant decrease of renal glomerular cell number in A2O<sub>4</sub>(+G), A3O<sub>4</sub>(+G), A4O<sub>4</sub>(+G) compared to A2O<sub>4</sub>(-G), A3O<sub>4</sub>(-G), A4O<sub>4</sub>(-G). The conclusion of this study is cowpea extract can prevent increasing number of renal glomerular cells in the Wistar rat with variety exposure of motor vehicle fumes.

**Keywords:** cowpea; ROS; motor vehicle emissions; renal glomerulus cells

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Persetujuan .....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak .....	vi
Abstract .....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Pencemaran Udara .....	7
2.1.1 Pengertian Pencemaran Udara .....	7
2.1.2 Kandungan Asap dan Efeknya terhadap Kesehatan.....	8
2.1.2.1 Karbon Monoksida (CO) .....	12
2.1.2.2 Sulfur Oksida (SOx) .....	12
2.1.2.3 Nitrogen Oksida (NOx).....	13
2.1.2.4 Hidro Karbon (HC) .....	15
2.2. Radikal Bebas.....	16
2.2.1 Pengertian Radikal Bebas.....	16
2.2.2 Struktur Radikal Bebas .....	18
2.2.3 Sumber Radikal Bebas .....	19

2.2.4 Pembentukan Radikal Bebas Dalam Tubuh.....	23
2.2.5 Reaksi Perusakan oleh Radikal Bebas .....	24
2.3 Stres Oksidatif.....	25
2.4 Ginjal.....	26
2.4.1 Anatomi Ginjal.....	26
2.4.2 Histologi Ginjal .....	27
2.4.3 Fisiologi Ginjal.....	28
2.4.4 Jejas Glomerulus.....	31
2.4.5 Efek Radikal Bebas Terhadap Ginjal.....	32
2.5 Antioksidan .....	34
2.5.1 Pengertian Antioksidan.....	34
2.5.1 Jenis Antioksidan .....	35
2.5.2 Cara Kerja Antioksidan.....	36
2.6 Genistein.....	37
2.6.1 Pengertian Genistein.....	37
2.6.2 Mekanisme Kerja Genistein.....	37
2.7 Kacang Tunggak ( <i>Vigna Unguiculata</i> ).....	42
2.7.1 Taksonomi Kacang Tunggak .....	42
2.7.2 Morfologi Kacang Tunggak.....	43
2.7.3 Penyebaran Kacang Tunggak .....	44
2.7.4 Kandungan Kacang Tunggak.....	45
2.7.5 Manfaat Kacang Tunggak Sebagai antioksidan.....	46

### **BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	47
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep .....	48
3.3 Hipotesis Penelitian.....	50

### **BAB 4 METODE PENELITIAN**

4.1 Jenis/Desain Penelitian.....	51
4.2 Sampel Penelitian .....	52
4.2.1 Kriteria Inklusi.....	53
4.2.2 Kriteria Eksklusi.....	53
4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian.....	54
4.2.4 Estimasi Besar Sampel .....	55
4.3 Variable Penelitian .....	55

4.3.1 Variabel Bebas .....	55
4.3.2 Variabel Tergantung .....	55
4.3.3 Variabel Kendali .....	56
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian .....	56
4.5 Bahan dan Alat Penelitian .....	56
4.5.1 Bahan Penelitian .....	56
4.5.1.1 Bahan Ekstraksi Kacang Tunggak .....	56
4.5.1.2 Bahan Pemaparan Asap Kendaraan Bermotor .....	57
4.5.1.3 Bahan Pengambilan Organ Ginjal Tikus .....	57
4.5.1.4 Bahan Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus .....	57
4.5.2 Alat Penelitian .....	58
4.5.2.1 Alat untuk Membuat Ekstrak Kacang Tunggak.....	58
4.5.2.2 Mesin Pembakar Bensin .....	58
4.5.2.3 Alat Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak pada Tikus..	58
4.5.2.4 Alat Pengambilan Organ Ginjal Tikus.....	58
4.5.2.5 Alat Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus.....	59
4.6 Definisi Operasional .....	59
4.7 Alur Kerja .....	61
4.8 Prosedur Penelitian.....	62
4.8.1 Ekstraksi Kacang Tunggak.....	62
4.8.2 Penentuan Dosis Ekstrak Kacang Tunggak.....	63
4.8.3 Persiapan Hewan Coba.....	64
4.8.4 Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak pada Tikus .....	64
4.8.5 Pemaparan Asap kendaraan .....	64
4.8.6 Pengambilan Organ Ginjal Tikus .....	65
4.8.7 Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus .....	66
4.8.8 Pemeriksaan Jumlah sel Glomerulus.....	67
4.9 Pengumpulan dan Analisis Data .....	68
4.9.1 Pengumpulan Data.....	68
4.9.2 Analisa Data .....	68

## **BAB 5 HASIL DAN ANALISA DATA**

5.1 Hasil Penelitian .....	70
5.2 Analisis Data .....	83

## **BAB 6 PEMBAHASAN**

6.1 Pengaruh Paparan Asap Kendaraan Bermotor terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar .....	89
6.2 Pengaruh Lama Paparan terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar .....	93
6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar .....	94

**BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan .....	96
7.2 Saran .....	96

Daftar Pustaka .....	98
----------------------	----

Lampiran .....	105
----------------	-----

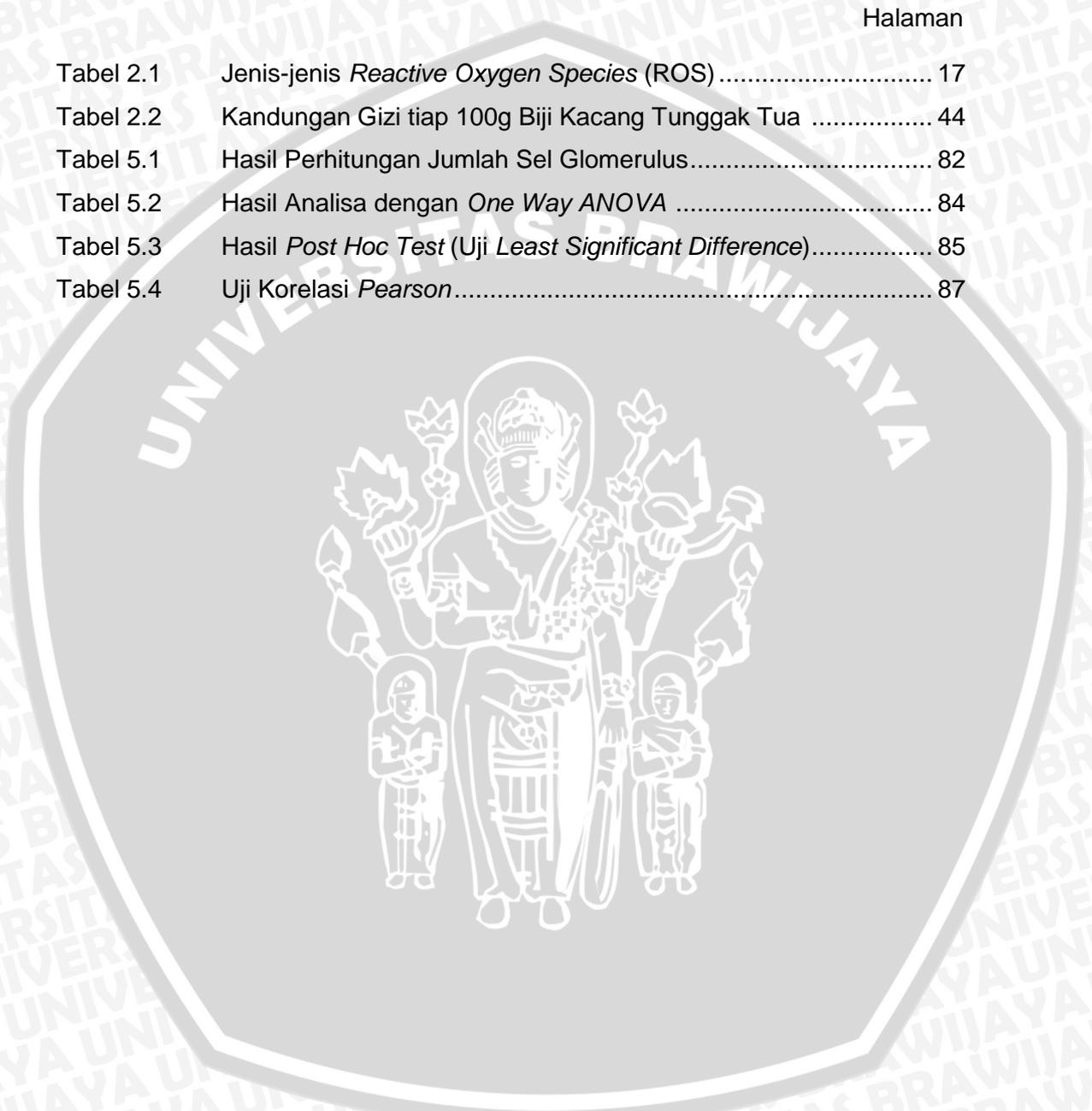


## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Efek Radikal Bebas terhadap Kesehatan ..... 11
Gambar 2.2	Proses Metabolisme Sistemik NOx..... 15
Gambar 2.3	Struktur Kimia Radikal Bebas ..... 19
Gambar 2.4	Sistem Oksigen Aktif ..... 24
Gambar 2.5	Anatomi Ginjal Potongan Coronal..... 27
Gambar 2.6	Histologi Glomerulus Ginjal ..... 28
Gambar 2.7	Proses Netralisasi Radikal Bebas oleh Antioksidan ..... 35
Gambar 2.8	Struktur Genistein..... 38
Gambar 2.9	Pohin dan Biji Kacang Tunggak..... 44
Gambar 4.1	Alur Penelitian ..... 61
Gambar 5.1	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x..... 72
Gambar 5.2	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N+O4 dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 73
Gambar 5.3	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N+G dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 74
Gambar 5.4	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A2O4(-)G dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 75
Gambar 5.5	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A2O4(+)G dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 76
Gambar 5.6	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A3O4(-)G dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 77
Gambar 5.7	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A3O4(+)G dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 78
Gambar 5.8	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A4O4(-) dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 79
Gambar 5.9	Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A4O4(+) dengan Pengecatan HE dan Perbesaran Mikroskop 400x ..... 80
Gambar 5.10	Diagram Batang Rata-rata..... 83

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	Jenis-jenis <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) ..... 17
Tabel 2.2	Kandungan Gizi tiap 100g Biji Kacang Tunggak Tua ..... 44
Tabel 5.1	Hasil Perhitungan Jumlah Sel Glomerulus..... 82
Tabel 5.2	Hasil Analisa dengan <i>One Way ANOVA</i> ..... 84
Tabel 5.3	Hasil <i>Post Hoc Test</i> ( <i>Uji Least Significant Difference</i> )..... 85
Tabel 5.4	Uji Korelasi <i>Pearson</i> ..... 87



## DAFTAR SINGKATAN

AhR	: <i>Aromatic hydrocarbon Receptor</i>
ARDS	: <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATN	: <i>Acute Tubular Necrosis</i>
BHA	: Butylated Hidroxyanisole
CAT	: Catalase
CO	: Karbon Monoksida
CO <sub>2</sub>	: Karbon Dioksida
CO-Hb	: Carboxy-Haemoglobin
Ditjen PPM & PL	: Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
eNOx	: <i>Endogenous Nitrogen Oxide</i>
ERE	: <i>Estrogen Response Element</i>
ERK ½	: <i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
GSH	: <i>Glutathion</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hydrogen Peroxide
Hb	: Haemoglobin
HC	: <i>Hidro Carbon</i>
HE	: Hematoxylin Eosin
HO <sub>2</sub>	: Hidroperoxyl
HOBr	: Asam Hipobromous
HOCL	: Asam Hipoklorit
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IgA	: Immunoglobulin-A

LO <sub>2</sub>	: Radical Peroxyl
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Met-Hb	: Methaemoglobin
mRNA	: <i>MessengerRNA</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO <sub>x</sub>	: Nitrogen Oksida
NO <sub>2</sub>	: Nitrogen Dioksida
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
O <sub>2</sub>	: Oksigen
OlyVIA	: <i>Olympus Viewer for Imaging Applications</i>
ONOO <sup>-</sup>	: Peroxynitrit
Oxy-Hb	: Oxygen Haemoglobin
PAH	: <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
Pb	: Plumbum
PTK	: Protein Tyrosin Kinase
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
RO	: Alkoxy
RO <sub>2</sub>	: Peroxyl
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SNO-Hb	: Nitrosyl-Haemoglobin
SO <sub>x</sub>	: Sulphur Oxides
SO <sub>2</sub>	: Sulphur Dioxide
SOD	: Superoxide Dismutase
SPM	: Suspended Particulate Matter

SPSS : *Statistical Product and Service Solutions*

TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

WHO : *World Health Organization*



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kendaraan bermotor merupakan sumber utama polusi udara di kota-kota besar di Indonesia terutama di Jakarta dan bertanggung jawab untuk sekitar 70% dari terjadinya pencemaran udara yang diakibatkan oleh emisi gas buang kendaraan bermotor. Penyebab utama dari pencemaran udara adalah peningkatan jumlah kendaraan bermotor, infrastruktur lalu lintas yang tidak memadai, formulasi bahan bakar dan harga bahan bakar rendah, kendaraan dengan teknologi tidak memadai, perawatan mesin yang buruk dan sistem transportasi umum tidak memadai (Steckdaub, 2001). Resiko kesehatan yang dikaitkan dengan pencemaran udara di perkotaan secara umum, banyak menarik perhatian masyarakat. Di banyak kota besar, gas buang kendaraan bermotor menyebabkan rasa tidak nyaman pada orang yang berada di tepi jalan dan menyebabkan masalah pencemaran udara. Beberapa studi dapat menyimpulkan adanya hubungan yang erat antara tingkat pencemaran udara perkotaan dengan angka kejadian (prevalensi) gangguan fungsi organ pada manusia.

Emisi gas buang merupakan hasil dari suatu proses pembakaran bahan bakar di dalam mesin. Komposisi emisi gas buang berupa gas karbon monoksida (CO) yang beracun, karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) yang merupakan gas rumah kaca, sulfur (SO<sub>x</sub>), senyawa nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>), senyawa *hidro carbon* (HC) dan partikulat debu termasuk timbel (PB) sebagai akibat dari proses pembakaran yang tidak sempurna (Asyabatina, 2011).

Hasil studi yang dilakukan oleh Ditjen PPM & PL, tahun 1999 pada pusat keramaian di 3 kota besar di Indonesia seperti Jakarta, Yogyakarta dan

Semarang menunjukkan gambaran sebagai berikut : kadar debu (SPM) 280 ug/m<sup>3</sup>, kadar SO<sub>2</sub> sebesar 0,76 ppm, dan kadar NO<sub>x</sub> sebesar 0,50 ppm, dimana angka tersebut telah melebihi nilai ambang batas/standar kualitas udara. Efek yang ditimbulkan oleh polutan udara tergantung pada kadar di udara, lama waktu pemaparan, serta kondisi sistem imun individu yang bersangkutan (Zaini, 2008).

Kandungan emisi gas buang dalam udara yang terhirup akan diterjemahkan oleh sel tubuh sebagai senyawa yang sangat reaktif, dikenal sebagai senyawa reaktif oksigen yang disebut *reactive oxygen species* (ROS). Sebagian ROS berasal dari proses fisiologis (ROS endogen) dan lainnya adalah ROS eksogen, seperti berbagai polutan lingkungan (emisi kendaraan bermotor dan industri, asbestos, asap rokok, dan lain-lain). Senyawa ROS didalam tubuh akan segera menyerang biomolekul yang ada di sekelilingnya (Winarsi 2007).

Efek yang ditimbulkan sangat berbahaya bagi kesehatan manusia disebabkan oleh proses iskemia-perfusi pada jaringan beberapa organ terutama pada sistem pernapasan, pembuluh darah, persarafan, hati dan ginjal (Yusniwati, 2003). Pemaparan tinggi terhadap asap kendaraan bermotor yang bersifat radikal bebas dapat merusak ginjal, yaitu terjadinya glomerulonefritis. Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) memicu terjadinya proses inflamasi pada glomerulus berhubungan dengan hiperselularitas glomerulus yang meliputi salah satu atau kombinasi dari beberapa keadaan diantaranya adalah proliferasi sel dalam glomerulus. Glomerulus ginjal mempunyai area permukaan luas yang memungkinkan terjadinya paparan dengan zat kimia.

Kemampuan ginjal untuk mengkonsentrasikan larutan dan substansi juga menjadikan ginjal rentan terhadap kerusakan oleh zat kimia. Salah satu gangguan pada ginjal akibat produksi radikal bebas yang berlebih adalah *Acute*

*Tubular Necrosis* (ATN) yang menyerang tubulus ginjal dan juga glomerulonefritis yang menyerang glomerulus pada ginjal (Suprpti et al, 2007). Banyak penelitian case-control yang memperlihatkan hasil bahwa sebagian besar pasien dengan glomerulonefritis, sebelumnya sering mengalami paparan polutan dengan jumlah yang besar. Dari data beberapa penelitian disebutkan paparan polutan berasal dari: asap kendaraan, asap pabrik, lem dan larutan organik (Ravnskov, 2000). Dalam penelitian Ravnskov (2000) disebutkan bahwa pada lima belas penelitian eksperimental yang telah dilakukan pada kelinci, guinea pig, kucing, mencit, dan kurang lebih empat galur tikus yang berbeda, dibuktikan bahwa paparan polutan dapat menimbulkan beberapa tipe glomerulonefritis seperti: *minimal change nephropathy*, *IgA glomerular basement nephritis*, mesangial, ekstra kapiler dan *focal proliferative glomerulonephritis*. Resiko terpapar asap kendaraan yang semakin tinggi perlu menjadi dasar pentingnya untuk mengupayakan suatu tindakan pencegahan terjadinya glomerulonefritis. Salah satunya dengan memanfaatkan tanaman herbal yang mempunyai efek sebagai anti oksidan dan anti inflamasi.

Sebagian penduduk Indonesia hidup dari hasil bercocok tanam, diantaranya adalah jenis kacang-kacangan. Kacang tunggak atau kacang tolo (*Vigna unguiculata* L.) telah dikenal luas di Indonesia sedangkan pemanfaatannya belum optimal. Kacang tunggak merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang mudah berkembang biak, bahkan di daerah kering sekalipun. Dari segi gizi kacang tunggak setiap 100 gram bahan mengandung protein 22,9 gram, lemak 1,1 gram dan karbohidrat 61,6 gram (Kholis Nur, 2010). Kacang tunggak mengandung salah satu jenis fitoestrogen, yaitu isoflavan, antara lain genistein dan daidzein.

Genistein merupakan salah satu senyawa polifenol golongan isoflavon yang ditemukan pada kacang-kacangan. Beberapa peneliti melaporkan potensi antioksidan genistein yang dapat melindungi jaringan dari Stres oksidatif (Chen *et al.* 2002).

Setelah mengetahui bahaya akumulasi emisi gas buang dari asap kendaraan bermotor akan menyebabkan kerusakan pada ginjal dan ekstrak kacang tunggak memiliki kandungan antioksidan yang mampu memerangkap molekul oksigen radikal bebas, maka perlu diteliti pengaruh antioksidan ekstrak kacang tunggak terhadap jumlah sel glomerulus ginjal tikus galur Wistar (*Rattus novergicus*) yang dipapar asap kendaraan bermotor.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

Apakah pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna Unguiculata*) dapat mencegah peningkatan jumlah sel gromelurus ginjal tikus galur Wistar pada berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka tujuan dari penelitian dalam tugas akhir ini sebagai berikut:

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus galur Wistar pada berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menghitung perbedaan jumlah sel glomerulus ginjal tikus pada kelompok yang diberikan pengasapan pada berbagai lama waktu paparan yang disertai pemberian oksigen murni dengan dan tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.
2. Menentukan hubungan antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel glomerulus ginjal tikus.
3. Membandingkan jumlah sel glomerulus tikus Wistar antara kelompok yang diberikan paparan asap kendaraan bermotor dengan pemberian ekstrak kacang tunggak dan tanpa ekstrak kacang tunggak.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian dalam Tugas Akhir ini adalah:

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap jumlah sel glomerulus ginjal tikus galur Wistar (*Rattus novergicus*) pada berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.

2. Penelitian ini diharapkan dapat menambah referensi bacaan ilmiah yang dapat dijadikan kajian pustaka untuk penelitian atau penulisan karya ilmiah berikutnya yang terkait dengan efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*).

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memperluas pengetahuan masyarakat tentang efek dari ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) sebagai antioksidan dari berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.
2. Mengenalkan kacang tunggak yang dapat digunakan sebagai obat herbal untuk mencegah kerusakan ginjal tikus galur Wistar dari berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.



## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Pencemaran Udara

## 2.1.1 Pengertian Pencemaran Udara

Pencemaran udara adalah kontaminasi udara pada lingkungan yang disebabkan polutan yang mengubah karakteristik alamiah dari atmosfer. Perangkat pembakaran rumah tangga, kendaraan bermotor, fasilitas industri dan kebakaran hutan merupakan sumber umum dari pencemaran udara. Polutan yang menjadi masalah kesehatan masyarakat utama termasuk partikulat, karbon monoksida, ozon, nitrogen dioksida dan sulfur dioksida. Polusi udara di luar ruangan dan dalam ruangan menyebabkan penyakit pernafasan dan lainnya, yang dapat berakibat fatal (WHO, 2012)

Polutan berarti setiap substansi padat, cair, ataupun gas yang hadir dalam atmosfer pada konsentrasi tertentu yang cenderung menjadi berbahaya bagi manusia, tanaman, makhluk hidup lainnya maupun lingkungan pada umumnya. Polutan berasal dari berbagai sumber, sumber tidak bergerak seperti pabrik, pembangkit listrik, smelter dan sumber yang lebih kecil seperti *dry cleaning*, sumber bergerak seperti mobil, bus, pesawat, truk, dan kereta api, kegiatan antropogenik dan sumber alami seperti tertiuap angin debu dan letusan gunung berapi (State of Environment Tamil Nadu, 2005).

Lalu lintas kendaraan bermotor juga dapat meningkatkan kadar partikulat debu yang berasal dari permukaan jalan, komponen ban dan rem. Setelah berada di udara, beberapa senyawa yang terkandung dalam gas buang kendaraan bermotor dapat berubah karena terjadinya suatu reaksi, misalnya dengan sinar matahari dan uap air, atau juga antara senyawa-senyawa tersebut

satu sama lain. Proses reaksi tersebut ada yang berlangsung cepat dan terjadi saat itu juga dilingkungan jalan raya, dan adapula yang berlangsung dengan lambat. Reaksi kimia di atmosfer terkadang berlangsung dalam jangka waktu yang panjang dan rumit, dan menghasilkan produk akhir yang dapat lebih aktif atau lebih lemah dibandingkan senyawa aslinya. Sebagai contoh, adanya reaksi di udara yang mengubah nitrogen monoksida (NO) yang terkandung didalam gas buang kendaraan bermotor menjadi nitrogen dioksida (NO<sub>2</sub>) yang lebih reaktif, dan reaksi kimia antara berbagai oksida nitrogen dengan senyawa hidrokarbon yang menghasilkan ozon dan oksida lain, yang dapat menyebabkan asap awan fotokimia (Tugaswati, 2008).

### 2.1.2 Kandungan Asap dan Efeknya terhadap Kesehatan

Salah satu masalah lingkungan yang paling penting adalah bahwa tingkat polusi udara di beberapa kota besar telah menjadi mengkhawatirkan, terutama dalam beberapa tahun terakhir (Bank Dunia 1994, Resosudarmo dan Thorbecke 1996, Soedomo et al. 1991). Sebagai contoh di kota Jakarta, Surabaya dan Bandung, tingkat konsentrasi polusi udara untuk materi partikulat tersuspensi (SPM), nitrogen dioksida (NO<sub>2</sub>) dan berada jauh di atas standar Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) untuk kualitas udara (Resosudarmo, 2002)

Kendaraan bermotor merupakan sumber utama polusi udara di kota-kota besar di Indonesia terutama di Jakarta dan bertanggung jawab untuk sekitar 70% dari terjadinya pencemaran udara yang diakibatkan oleh emisi gas buang kendaraan bermotor. Penyebab utama pencemaran udara adalah meningkatnya jumlah kendaraan bermotor, infrastruktur yang tidak memadai pengembangan, manajemen lalu lintas tidak baik, formulasi bahan bakar dan harga bahan bakar

rendah, kendaraan dengan teknologi rendah, perawatan mesin yang buruk dan sistem transportasi umum tidak memadai (Steckdaub, 2001). Asap kendaraan bermotor dapat menghasilkan sejumlah besar polusi udara karena bahan bakar yang tidak sempurna terbakar, membakar oli mesin atau terbakar uap bensin. Kendaraan Diesel dapat menghasilkan sejumlah besar PM dan asap hitam melalui pembakaran bahan bakar tidak sempurna, sementara kendaraan bensin akan memancarkan asap biru, putih atau berwarna. Kendaraan juga menghasilkan polusi udara melalui pengisian bahan bakar dan emisi oleh menguapkan (DPI, 2003)

Di antara senyawa oksigen reaktif, yang terbukti berpengaruh pada sistemik adalah gas karbon monoksida (CO) yang beracun, karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) yang merupakan gas rumah kaca, sulfur (SO<sub>x</sub>), senyawa nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>) dan senyawa *hidro carbon* (HC) (Asyabatina, 2011). Efek yang ditimbulkan oleh emisi gas buang kendaraan bermotor yaitu terbentuknya radikal bebas sangat berbahaya bagi kesehatan manusia disebabkan hubungannya dengan proses iskemia-perfusi pada jaringan beberapa organ terutama pada sistem pernapasan, pembuluh darah, persarafan, hati dan ginjal (Yusniwati, 2003).

Sulfur (SO<sub>x</sub>) berperan dalam terjadinya hujan asam dan polusi partikel sulfat aerosol. Nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>) berperan terhadap polusi partikel dan deposit asam dan prekursor ozon yang merupakan unsur pokok dari kabut fotokimia. Hasil studi yang dilakukan oleh Ditjen PPM & PL, tahun 1999 pada pusat keramaian di 3 kota besar di Indonesia seperti Jakarta, Yogyakarta dan Semarang menunjukkan gambaran sebagai berikut : kadar debu (SPM) 280 ug/m<sup>3</sup>, kadar SO<sub>2</sub> sebesar 0,76 ppm, dan kadar NO<sub>x</sub> sebesar 0,50 ppm, dimana

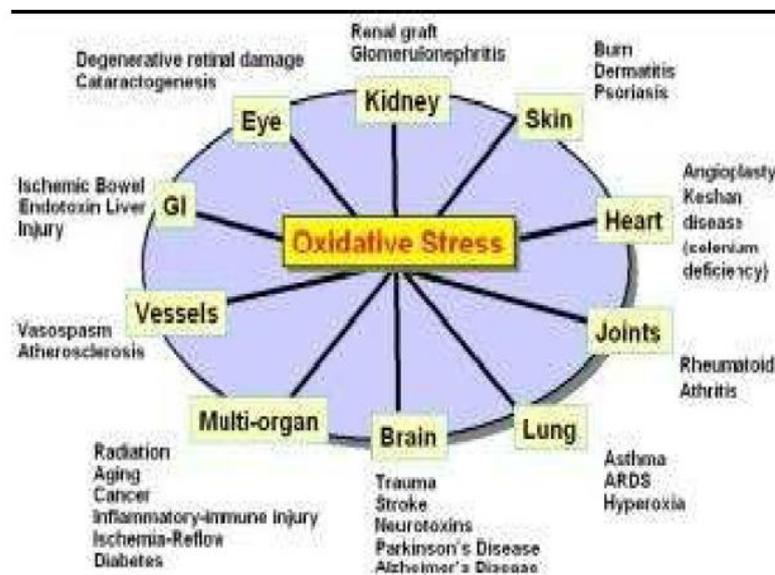
angka tersebut telah melebihi nilai ambang batas/standar kualitas udara (Zaini, 2008).

Emisi gas buang kendaraan bermotor adalah campuran yang kompleks, komposisi tergantung pada kondisi bahan bakar, jenis dan operasi mesin, dan penggunaan perangkat kontrol emisi. Beberapa kelompok mayoritas dari polutan udara memiliki potensi untuk mempengaruhi kesehatan populasi. Polutan dihasilkan baik dari emisi primer atau transformasi atmosfer. Kendaraan bermotor merupakan sumber utama dari sejumlah polutan, khususnya, karbon monoksida, nitrogen oksida, hidrokarbon yang tidak terbakar, timbal, sulfur dioksida dan senyawa organik yang mudah menguap, serta melalui transformasi ozon pada atmosfer (Schwela dan Zali, 1997). Efek yang ditimbulkan oleh polutan udara tergantung pada dosis atau kadar di udara, lama waktu pemaparan, serta kondisi sistem imun individu yang bersangkutan. Selain itu, ukuran polutan menentukan lokasi depositnya dalam tubuh dan efek terhadap jaringan sekitar (Zaini, 2008).

Banyak senyawa kimia dalam gas buang kendaraan bermotor yang dapat menimbulkan pengaruh sistemik karena setelah melewati membran kapiler alveoli di paru, bahan pencemar tersebut dibawa oleh aliran darah ke bagian tubuh lainnya, sehingga dapat membahayakan setiap organ di dalam tubuh. Beberapa pembahasan mutakhir tentang mekanisme terjadinya penyakit degeneratif, mensinyalir bahwa stres oksidatif dan radikal bebas sangat berpengaruh terhadap keberadaannya (Harliansyah, 2001). Ditambahkan oleh Pincemail, et al (1995) dalam Rachmawati (2003) bahwa peningkatan produksi radikal bebas dapat menyebabkan kelainan pada berbagai organ target seperti glomerulonephritis (ginjal), asma dan ARDS (paru-paru), *coronary thrombosis*

(jantung), *solar radiation*, psoriasis dan dermatitis (kulit), dementia, pancreatitis, *endotoxin liver injury* (gastrointestinal), kataraktogenesis reknopati, degenerative retinal damage (mata), atherosclerosis (pembuluh darah), stroke, diabetes dan lain-lain.

Sejak beberapa tahun yang lalu, penelitian eksperimental maupun observasional membuktikan bahwa polutan berupa emisi gas menyebabkan berbagai gangguan ginjal baik akut maupun kronik. Rute absorpsi dari zat-zat dalam emisi gas berdasarkan studi yang sudah dilakukan adalah melalui paru-paru. Ketika zat-zat tersebut telah berada di sirkulasi, maka akan terkonsentrasi di ginjal dan akan berkembang menjadi glomerulonefritis melalui mekanisme mediasi imun (Brautbar, 2013).



Gambar 2.1 Efek Radikal Bebas terhadap Kesehatan (Pincemail. et al, 1995)

Senyawa-senyawa yang masuk ke dalam saluran pernapasan dan ada dalam mukosa bronkial juga dapat terbawa oleh darah atau tertelan masuk tenggorokan dan diabsorpsi masuk ke saluran pencernaan. Diantara senyawa-

senyawa yang terkandung di dalam gas kendaraan bermotor yang dapat menimbulkan pengaruh sistemik antara lain:

#### 2.1.2.1 Karbon Monoksida (CO)

Karbon monoksida (CO) adalah gas yang berpotensi mematikan yang tidak berbau, tidak berwarna, tidak berasa, dan tidak menyebabkan iritasi. Setiap tahun, keracunan CO menyebabkan sekitar 500 kematian yang tidak disengaja di Amerika Serikat. CO dihasilkan selama pembakaran tidak sempurna dari bahan bakar berbasis karbon seperti minyak, gas alam, minyak tanah, batubara, arang, bensin, dan kayu (CDC, 2004).

Karbon monoksida (CO) memiliki afinitas terhadap hemoglobin 250 – 300 kali lebih kuat daripada afinitas oksigen, CO akan membentuk ikatan karboksihemoglobin, sehingga menghambat distribusi oksigen ke jaringan tubuh, maka organ yang sangat sensitif terhadap keracunan karbon monoksida adalah organ-organ dengan kebutuhan oksigen paling banyak, salah satunya adalah ginjal (Anggraeni, 2009).

Kecepatan timbulnya gejala-gejala atau kematian ditentukan oleh konsentrasi CO dalam udara lingkungan dan lamanya inhalasi atau lamanya paparan CO. Selain itu dipengaruhi juga oleh konsentrasi CO dalam udara, ventilasi paru, dan kadar CO-Hb sebelum terkena CO (Anggraeni, 2009).

#### 2.1.2.2 Sulfur Oksida (SOx)

Sulfur Oksida (SOx) adalah agen kerusakan oksidatif sistemik akibat peningkatan yang signifikan dalam proses peroksidasi lipid pada semua organ dan perubahan status antioksidan dalam organ (Meng, 2003). Dalam

penelitiannya, Meng telah membuktikan dampak SO<sub>x</sub> terjadi pada beberapa organ diantaranya otak, paru-paru, jantung, hepar, lambung, intestine, ginjal dan testis.

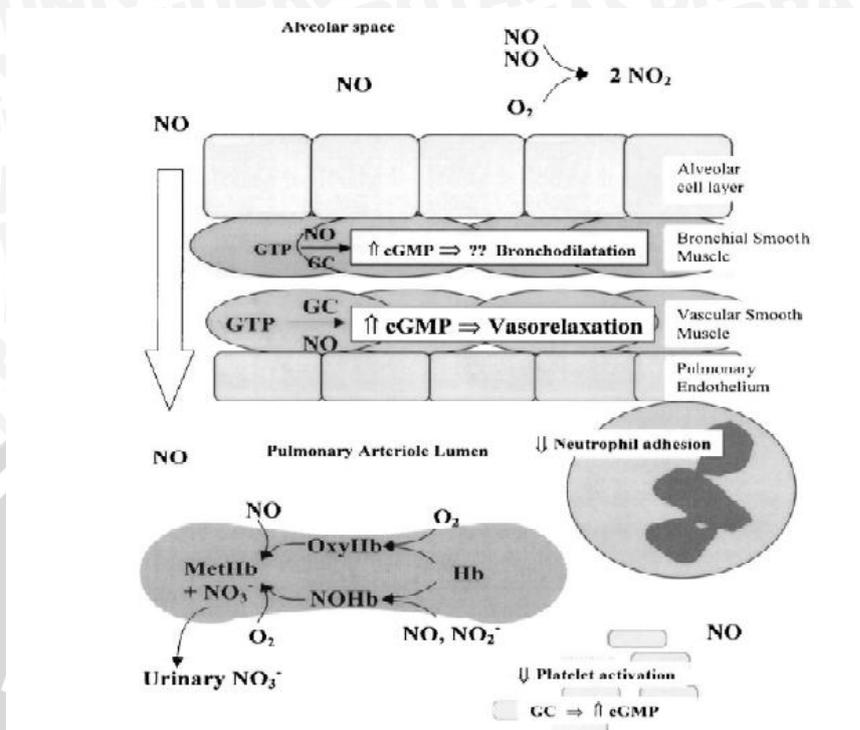
Rute utama sulfur masuk ke tubuh adalah melalui inhalasi dalam bentuk senyawa SO<sub>2</sub>. Oleh karena senyawa SO<sub>2</sub> sangat *soluble* terhadap media *aqueos* maka dapat dengan cepat diserap melalui membran mukosa dari saluran pernapasan atas dan bawah. Setelah SO<sub>2</sub> mampu melewati membran mukosa saluran napas, SO<sub>2</sub> lalu di distribusikan ke dalam darah akibat ikatan SO<sub>2</sub> dengan fraksi alpha-globulin plasma (Petruzzi *et al.*, 1994). SO<sub>2</sub> yang telah masuk aliran darah kemudian diubah menjadi sulfat oleh molibdenum-dependent oksidase sulfit (Frampton *et al.*, 2007). Ginjal memiliki peran penting dalam homeostasis sulfat karena sulfat yang masuk aliran darah akan di ekskresikan secara bebas melalui ginjal. Pada beberapa penelitian yang dilakukan dewasa ini, disebutkan bahwa ditemukan transporter sulfat yaitu NaSi-1 co-transporter dan sulphate-bicarbonate anion exchanger (Sat-1) di ginjal yang bertanggung jawab terhadap keluar dan masuknya sulfat di ginjal. Sulfat akan di filtrasi di glomerulus ginjal dan di reabsorpsi di tubulus ginjal (Silve, 2000).

### 2.1.2.3 Nitrogen Oksida (NO<sub>x</sub>)

Nitrogen oksida yang terinhalasi (iNO<sub>x</sub>) berdifusi dengan cepat melewati sel alveoli dan endotel pembuluh darah menuju ke sirkulasi. Terdapat dua mekanisme reaksi yang terjadi ketika NO<sub>x</sub> berada di sirkulasi. iNO<sub>x</sub> dalam bentuk NO akan berikatan dengan Oxy-Hb (Oxy-haemoglobin) karena afinitas NO terhadap Hb 1500 kali lebih besar dibanding CO, sedangkan iNO<sub>x</sub> dalam bentuk NO<sub>2</sub> dan NO<sub>3</sub> akan berikatan dengan hemoglobin membentuk SNO-Hb

(S-nitrosyl-hemoglobin) yang kemudian akan teroksidasi oleh oksigen bebas di pembuluh darah. Kedua reaksi tersebut akan menghasilkan Met-Hb (Methaemoglobin) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) yang akan di ekskresikan ke ginjal (Hayward et al., 1999). Di ginjal nitrat kemudian direduksi kembali menjadi NO oleh xanthine oxidoreductase, deoxygenated myoglobin, dan proton. Di ginjal juga di produksi *endogenous* NO (eNOx). Struktur NO yang tidak berpasangan akan berikatan dengan ion peroksida ( $\text{O}_2^-$ ) menghasilkan peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) yang pada akhirnya mencetuskan terjadinya stress oksidatif di ginjal (Maruyama et al., 2013).

Keberadaan NO yang terlalu berlebihan dalam tubuh dapat menimbulkan berbagai keadaan patologi termasuk *glomerular injury* dan proses inflamasi, jumlah neurofil dan makrofag semakin meningkat dan terjadi peningkatan mediator inflamasi yang akan merusak sel endotel, menyebabkan oklusi pembuluh darah, mengurangi aliran darah regional dan meningkatkan permeabilitas endotel (Meng, 2003).



Gambar 2.2 Proses Metabolisem Sistemik NOx (Hayward *et al.*, 1999)

#### 2.1.2.4 Hidro Karbon (HC)

Hidrokarbon udara akan bereaksi dengan bahan-bahan lain dan akan membentuk ikatan baru yang disebut polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) yang banyak dijumpai di daerah industri dan padat lalulintas. Senyawa hidrokarbon masuk ke dalam tubuh manusia melalui beberapa rute diantaranya: inhalasi dan absorpsi melalui kulit. PAH beredar di sirkulasi melalui perantara *aromatic hydrocarbon receptors* (AhR) dan sebagian besar di metabolisme oleh Cytochrome p-450 yang ada di ginjal, hati dan organ lainnya. Dalam tulisannya, Germolec *et al.* menyatakan bahwa ekspresi seluler dari AhR selanjutnya akan menginduksi terjadinya stress oksidatif di tingkat seluler melalui interaksi ROS dan enzim mixed-function oxidase. Target utama PAH di sirkulasi adalah ginjal karena dalam satu kali sirkulasi, 25% dari total cardiac output atau sekitar 1200

ml darah/menit melewati ginjal dan metabolisme PAH bergantung pada tekanan parsial dan aliran dalam pembuluh darah. Metabolit dari PAH akan di eliminasi melalui proses ekskresi yang terjadi di ginjal (Brautbar, 2004).

## 2.2 Radikal Bebas

### 2.2.1 Pengertian Radikal Bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai suatu molekul, atom, atau beberapa atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat sangat reaktif. Suatu molekul bersifat stabil bila elektronnya berpasangan, tetapi bila tidak berpasangan (single) molekul tersebut menjadi tidak stabil dan memiliki potensi untuk merusak. Bila molekul tidak stabil ini mengambil satu elektron dari senyawa lain maka molekul tersebut menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil berubah menjadi radikal dan memicu reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya (reaksi berantai) (Yuniastuti 2008).

Radikal bebas oksigen diantaranya superoksida, hidroksil, peroksil ( $\text{RO}_2$ ), alkoxy ( $\text{RO}$ ), dan hydroperoxy ( $\text{HO}_2$ ) radikal. Oksida nitrat dan nitrogen dioksida ( $\text{NO}_2$ ) merupakan radikal bebas nitrogen dua. Oksigen dan nitrogen radikal bebas dapat dikonversi menjadi spesies non-radikal reaktif, seperti hidrogen peroksida, asam hipoklorit ( $\text{HOCl}$ ), asam hypobromous ( $\text{HOBr}$ ), dan peroxy nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Spesies oksigen reaktif (ROS), spesies nitrogen reaktif (RNS), dan spesies klorin reaktif diproduksi pada hewan dan manusia dalam kondisi fisiologis dan patologis. Dengan demikian, ROS dan RNS termasuk spesies radikal dan non-radikal (Fang et al, 2002).

Berbagai jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam tubuh diperlihatkan pada table 2.1, dari tabel tersebut terlihat bahwa diantara berbagai ROS terdapat molekul yang bukan radikal bebas, yaitu  $O_2$  dan  $H_2O_2$ , namun karena sifatnya yang sangat reaktif maka dimasukkan ke dalam kelompok radikal bebas (Kurnani 2001).

Tabel 2.1 Jenis-jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS)

ROS		Keterangan
Anion superoksida	$O_2^*$	Dapat membentuk hydrogen peroksida yang merupakan reduktan logam transisi dalam pembentukan radikalhidroksil.
Radikal hidroksil	$OH^*$	Radikal pengoksidasi yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan hamper seluruh biomolekul.
Radikal peroksil	$LO_2^*$	Dihasilkan antara lain pada proses peroksidasi lipid.
Hydrogen peroksida	$H_2O_2$	Hydrogen peroksida bukan radikal bebas namun dikategorikan sebagai ROS. Molekul ini merupakan sumber radikal hidroksil dalam kondisi jenuh ion logam transisi, juga terlibat dalam pembentukan HOCl
Oksigen singlet	$\uparrow O_2$	Merupakan pengoksidasi yang kuat
Nitrogen oksida	$NO^*$	Radikal bebas dalam bentuk gas
Peroksinitrit	$ONOO^-$	Terbentuk dari reaksi $NO^*$ dengan $O_2^*$
Asam hipoklor	HOCl	Dihasilkan oleh neutrofil pada proses inflamasi. Terbentuk dari $H_2O_2$ dan $Cl^-$ yang dikatalisis oleh mieloperoksidase.

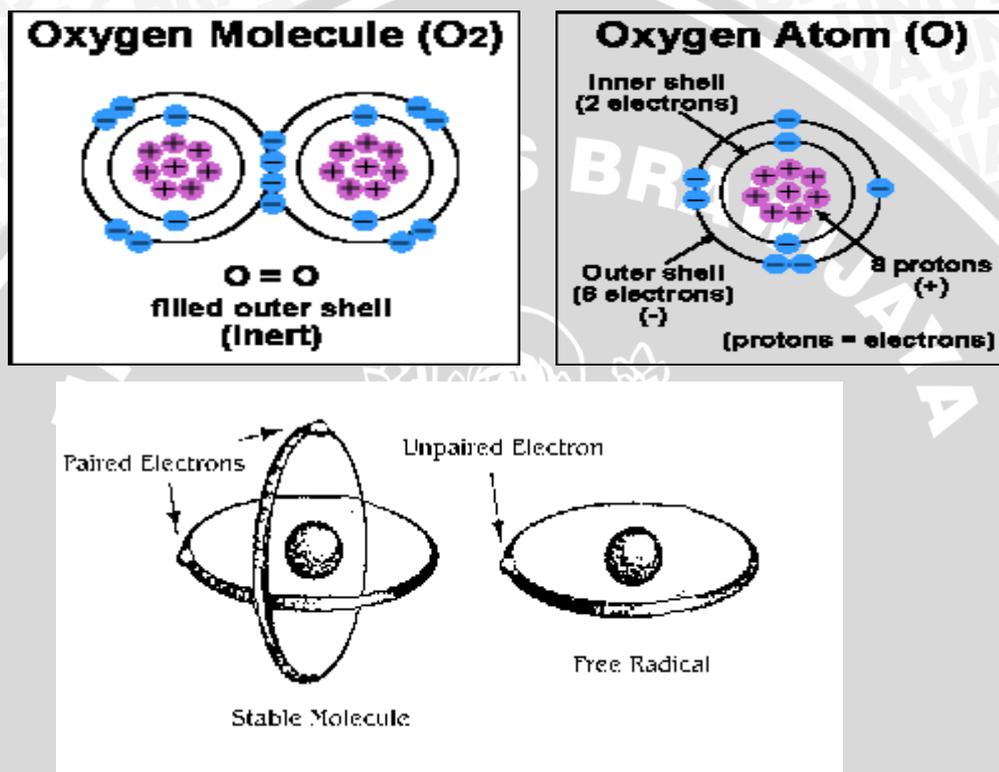
### 2.2.2 Struktur Radikal Bebas

Atom terdiri dari nukleus, proton, dan elektron. Jumlah proton (bermuatan positif) dalam nukleus menentukan jumlah dari electron (bermuatan negatif) yang mengelilingi atom tersebut. Elektron berperan dalam reaksi kimia dan merupakan bahan yang menggabungkan atom-atom untuk membentuk suatu molekul. Elektron mengelilingi, atau mengorbit suatu atom dalam satu atau lebih lapisan. Jika satu lapisan penuh, elektron akan mengisi lapisan kedua. Lapisan kedua akan penuh jika telah memiliki 8 elektron, dan seterusnya. Gambaran struktur terpenting sebuah atom dalam menentukan sifat kimianya adalah jumlah elektron pada lapisan luarnya. Suatu bahan yang elektron lapisan luarnya penuh tidak akan terjadi reaksi kimia. Karena atom-atom berusaha untuk mencapai keadaan stabilitas maksimum, sebuah atom akan selalu mencoba untuk melengkapi lapisan luarnya yaitu dengan Menambah atau mengurangi elektron untuk mengisi maupun mengosongkan lapisan luarnya. Kemudian Membagi elektron-elektronnya dengan cara bergabung bersama atom yang lain dalam rangka melengkapi lapisan luarnya (Arief, 2007).

Atom sering kali melengkapi lapisan luarnya dengan cara membagi elektron-elektron bersama atom yang lain. Dengan membagi elektron, atom-atom tersebut bergabung bersama dan mencapai kondisi stabilitas maksimum untuk membentuk molekul. Oleh karena radikal bebas sangat reaktif, maka mempunyai spesifitas kimia yang rendah sehingga dapat bereaksi dengan berbagai molekul lain, seperti protein, lemak, karbohidrat, dan DNA (Arief, 2007).

Dalam rangka mendapatkan stabilitas kimia, radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan bahan sekitarnya. Radikal bebas akan menyerang molekul stabil yang terdekat

dan mengambil elektron, zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya terjadi kerusakan sel tersebut (Arief, 2007).



Gambar 2.3 Struktur kimia radikal bebas (Arief, 2007)

### 2.2.3 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat diaktivkan secara in-vivo maupun in-vitro melalui mekanisme:

- Pemutusan ikatan kovalen pada hemolytic, dimana pada molekul yang normal mempunyai 2 fragmen yang menjaga electron tetap berpasangan. Pemutusan ikatan ini jarang terjadi pada system biologis karena

membutuhkan tenaga tinggi seperti ultraviolet, pemanasan atau radiasi pengionan.

- Kehilangan 1 elektron dari molekul normal.
- Penambahan elektron pada normal molekul.

Selain karena ultraviolet, pemanasan atau radiasi, radikal bebas juga diproduksi dalam sel, secara umum karena reaksi transfer elektron, baik secara enzimatis maupun nonenzimatis. Produksi radikal bebas dalam sel bisa terjadi secara bebas misalnya *superoxide* yang merupakan hasil dari proses fagositosis (Stubbe, 1990; Reichard dan Ehrenberg, 1983).

Sumber radikal bebas bisa berasal dari dalam tubuh (endogenous) ataupun luar tubuh (exogenous) (Fouad, 2002).

1. Sumber endogenous, yang berasal dari dalam tubuh sendiri

- a. Autoksidasi merupakan produk dari proses metabolisme aerobik. Molekul yang mengalami autoksidasi berasal dari katekolamin, hemoglobin, mioglobin, sitokrom-c yang tereduksi, dan thiol. Autoksidasi dari molekul di atas menghasilkan reduksi dari oksigen diradikal dan pembentukan kelompok reaktif oksigen. Superoksida merupakan bentuk awal radikal. Ion ferrous (Fe II) juga dapat kehilangan elektronnya melalui oksigen untuk membuat superoksida dan Fe III melalui proses autoksidasi (Rusly, 2010).
- b. Oksidasi enzimatis merupakan sistem enzim yang mampu menghasilkan radikal bebas dalam jumlah yang cukup bermakna, meliputi *xanthine oxidase* (*activated in ischemia-reperfusion*), *prostaglandin synthase*, *lipoygenase*, *aldehyde oxidase*, dan *amino acid oxidase*. Enzim *myeloperoxidase* hasil aktivasi neutrofil, memanfaatkan hidrogen peroksida

untuk oksidasi ion klorida menjadi suatu oksidan yang kuat asam hipoklor (Rusly, 2010).

c. *Respiratory burst* merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan proses fagositosis menggunakan oksigen dalam jumlah yang besar. Lebih kurang 70-90% penggunaan oksigen tersebut dapat diperhitungkan dalam produksi superoksida. Sel fagosit tersebut memiliki sistem membran bound flavoprotein cytochrome-b-245 NADPH oxidase. Enzim membran sel seperti NADPH-oxidase keluar dalam bentuk inaktif. Paparan terhadap bakteri yang diselimuti imunoglobulin, kompleks imun, komplemen 5a, atau leukotrien dapat mengaktifkan enzim NADPH-oxidase. Aktifasi tersebut mengawali respiratory burst pada membran sel untuk memproduksi superoksida. Kemudian  $H_2O_2$  dibentuk dari superoksida dengan cara dismutasi bersama generasi berikutnya dari OH dan HOCl oleh bakteri (Arief, 2007).

2. Sumber eksogenous, yang berasal dari luar tubuh

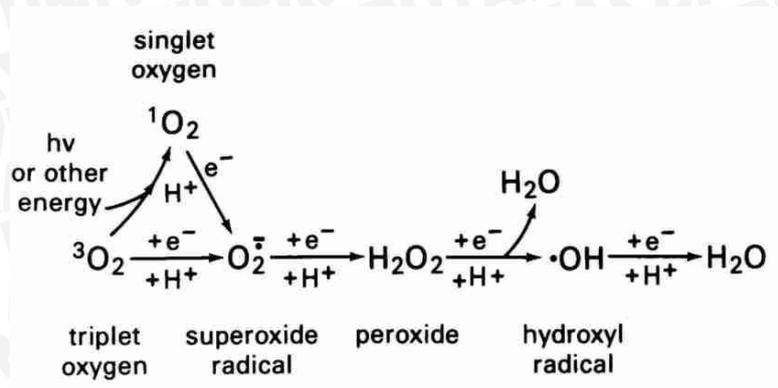
a. Beberapa macam obat dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen. Obat-obatan tersebut bereaksi bersama hiperoksia dapat mempercepat tingkat kerusakan jaringan. Termasuk didalamnya antibiotika kelompok quinoid, obat kanker seperti: bleomycin, anthracyclines (adriamycin) dan methotrexate, yang memiliki aktifitas pro-oksidan. Selain itu, radikal bebas juga berasal dari fenilbutason, asam mefenamat dan komponen aminosalisilat dari sulfasalasin yang dapat menginaktivasi protease, serta penggunaan asam askorbat dalam jumlah banyak yang dapat mempercepat peroksidasi lemak (Arief, 2007).

- b. Radioterapi memungkinkan terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radiasi elektromagnetik (sinar X dan sinar gamma) dan radiasi partikel (partikel elektron, photon, neutron, alfa dan beta) menghasilkan radikal primer dengan cara memindahkan energinya pada komponen seluler seperti air. Radikal primer tersebut dapat mengalami reaksi sekunder bersama oksigen yang terurai atau bersama cairan seluler (Droge, 2002).
- c. Asap rokok mempunyai peranan yang cukup besar untuk terjadinya kerusakan saluran napas. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (in vivo) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap tekanan oksidan. Diperkirakan bahwa tiap hisapan rokok mempunyai bahan oksidan dalam jumlah yang sangat besar, meliputi aldehida, epoxida, peroxida, dan radikal bebas lain yang mungkin cukup berumur panjang dan bertahan hingga menyebabkan kerusakan alveoli. Bahan lain seperti nitrit oksida, radikal peroksil, dan radikal yang mengandung karbon ada dalam fase gas. Juga mengandung radikal lain yang relatif stabil dalam fase tar. Contoh radikal dalam fase tar meliputi *semiquinone moieties* dihasilkan dari bermacam-macam *quinone* dan *hydroquinone*. Ditemukan bahwa perokok mengalami peningkatan netrofil dalam saluran napas bawah yang mempunyai kontribusi pada peningkatan lebih lanjut konsentrasi radikal bebas (Arief, 2007).
- d. Asap kendaraan bermotor mengandung berbagai senyawa kimia. Setelah berada di udara, beberapa senyawa yang terkandung dalam gas buang kendaraan bermotor dapat berubah karena terjadinya suatu reaksi,

misalnya dengan sinar matahari dan uap air atau antara senyawa-senyawa tersebut satu sama lain. Proses reaksi tersebut ada yang berlangsung cepat dan adapula yang berlangsung dengan lambat. Reaksi kimia di atmosfer terkadang berlangsung dalam suatu rantai reaksi yang panjang dan rumit dan menghasilkan produk akhir yang dapat lebih aktif atau lebih lemah dibandingkan senyawa aslinya (Tugaswati, 2008).

#### **2.2.4 Pembentukan Radikal Bebas Dalam Tubuh**

Radikal bebas diproduksi dalam sel yang secara umum melalui reaksi pemindahan elektron, menggunakan mediator enzimatik atau non-enzimatik. Produksi radikal bebas dalam sel dapat terjadi secara rutin maupun sebagai reaksi terhadap rangsangan. Secara rutin adalah superoksida yang dihasilkan melalui aktivasi fagosit dan reaksi katalisa seperti ribonukleotida reduktase. Sedang pembentukan melalui rangsangan adalah kebocoran superoksida, hidrogen peroksida dan kelompok oksigen reaktif (ROS) lainnya pada saat bertemunya bakteri dengan fagosit teraktifasi. Pada keadaan normal sumber utama radikal bebas adalah kebocoran elektron yang terjadi dari rantai transport elektron, misalnya yang ada dalam mitokondria dan endoplasma retikulum dan molekul oksigen yang menghasilkan superoksida. Dalam kondisi yang tidak lazim seperti radiasi ion, sinar ultraviolet, dan paparan energi tinggi lainnya, dihasilkan radikal bebas yang sangat berlebihan (Arief 2007).



Gambar 2.4 Sistem oksigen aktif (Arief, 2007)

### 2.2.5 Reaksi Perusakan Oleh Radikal Bebas

Proses oksidasi sangat penting untuk organisme hidup untuk produksi energi sebagai bahan bakar proses biologi. Namun, produksi oksigen yang tidak terkendali sebagai turunan radikal bebas, memicu berbagai penyakit seperti kanker, sirosis, arthritis, dan arteriosklerosis serta dalam proses degeneratif yang berhubungan dengan penuaan. Zat kimia eksogen, proses metabolisme dari dalam tubuh manusia dan proses pencernaan dapat menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif, radikal bebas terutama berasal dari oksigen, yang mampu mengoksidasi biomolekul, mengakibatkan kematian sel dan kerusakan jaringan. Hampir semua organisme dilindungi dari kerusakan akibat radikal bebas oleh enzim oksidatif seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT), atau dengan bahan kimia seperti tokoferol-, asam askorbat, karotenoid, polifenol, dan glutathione. Ketika proses perlindungan antioksidan menjadi tidak seimbang, kerusakan fungsi fisiologis dapat terjadi, mengakibatkan penyakit dan mempercepat penuaan (Saleh *et al*, 2010).

Jumlah radikal bebas yang melebihi antioksidan endogen akan membuat radikal bebas bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga

terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas.

a. Peroksidasi lemak

Membran sel kaya akan sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA), yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi; proses tersebut dinamakan peroksidasi lemak. Hal ini sangat merusak karena merupakan suatu proses berkelanjutan. Pemecahan hidroperoksida lemak sering melibatkan katalisis ion logam transisi (Arief, 2007).

b. Kerusakan protein

Protein dan asam nukleat lebih tahan terhadap radikal bebas daripada PUFA, sehingga kecil kemungkinan dalam terjadinya reaksi berantai yang cepat. Serangan radikal bebas terhadap protein sangat jarang kecuali bila sangat ekstensif. Salah satu penyebab kerusakan terfokus adalah jika protein berikatan dengan ion logam transisi (Arief 2007).

c. Kerusakan DNA

Seperti pada protein kecil kemungkinan terjadinya kerusakan di DNA menjadi suatu reaksi berantai, biasanya kerusakan terjadi bila ada lesi pada susunan molekul, apabila tidak dapat diatasi, dan terjadi sebelum replikasi maka akan terjadi mutasi. Radikal oksigen dapat menyerang DNA jika terbentuk disekitar DNA seperti pada radiasi biologis (Arief 2007).

### 2.3 Stres Oksidatif

Stres oksidatif (*oxidative stress*) merupakan peningkatan jumlah radikal bebas tanpa bisa diimbangi oleh antioksidan tubuh. Keadaan stress oksidatif tersebut dapat ditimbulkan oleh adanya paparan radikal bebas eksogen yang

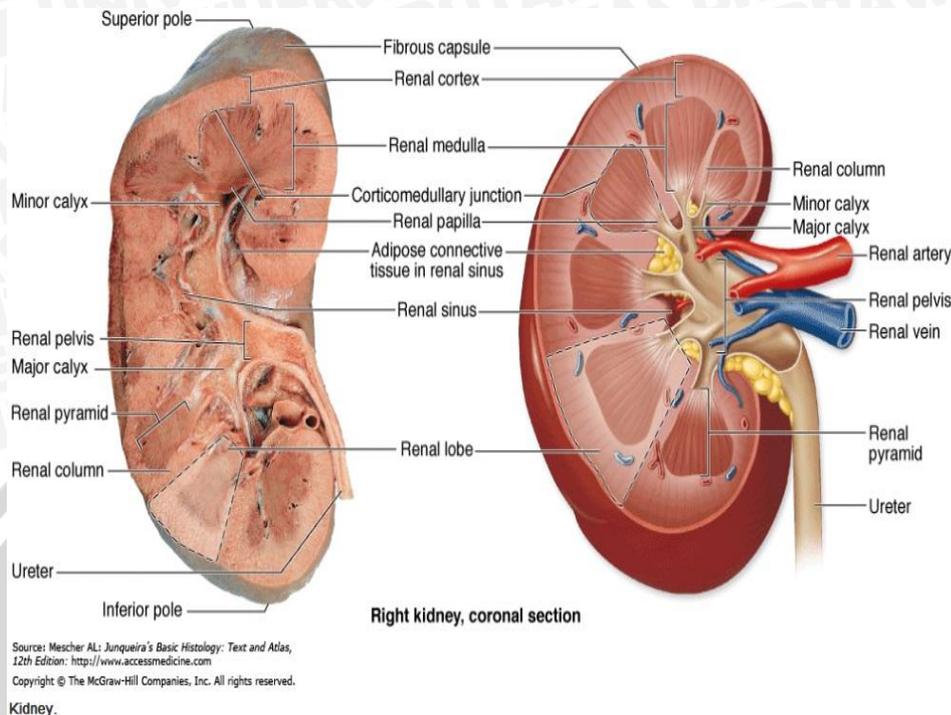
berlebihan. Proses tersebut akan memicu proses destruktif dari radikal bebas secara tidak terkontrol. Keadaan stress oksidatif dapat menyebabkan dampak negatif pada jaringan (Yoshikawa dan Toshikazu, 1996).

## 2.4 Ginjal

### 2.4.1 Anatomi Ginjal

Ginjal terletak di retroperitoneum di kedua sisi tulang punggung. Ginjal adalah organ berbentuk kacang, berukuran kira-kira 11 cm, masing-masing memiliki hilus tempat dimana arteri renalis, vena renalis, dan ureter muncul. Arteri ginjal merupakan percabangan langsung dari aorta, sedangkan aliran darah vena renalis mengalir ke vena cava inferior (Haber *et al*, 2011).

Melalui gerak peristaltik dan gravitasi, urin mengalir dari ginjal turun sampai ureter, yang melintasi rute akhir retroperitoneal ke kandung kemih, di mana disimpan dan dieliminasi dari tubuh melalui uretra. Kandung kemih memiliki dinding otot yang tebal, yang mampu menggelembungkan jauh dengan tetap mempertahankan tekanan internal yang rendah, sehingga kandung kemih dapat menyimpan sejumlah besar urin sebelum berkemih (Haber *et al*, 2011).



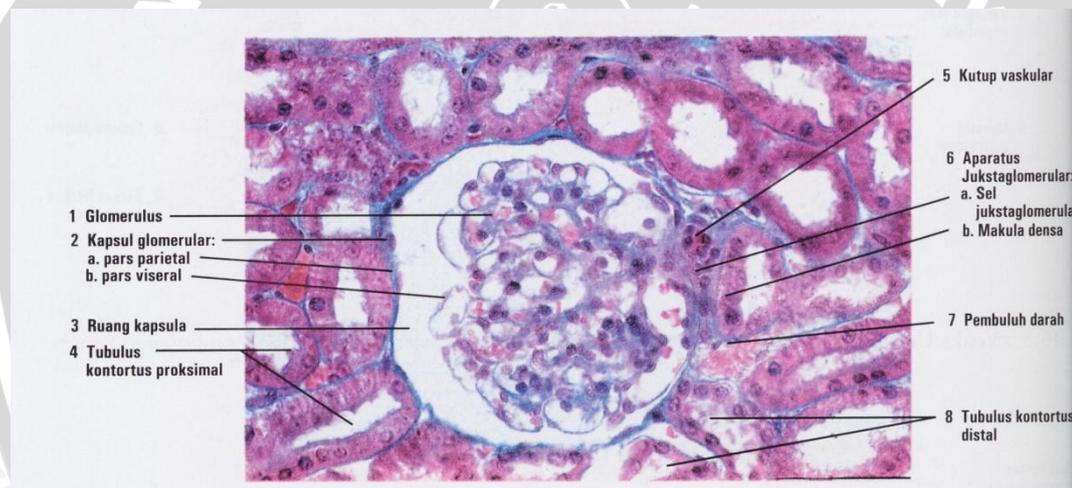
**Gambar 2.5 Anatomi Ginjal Potongan Coronal (Junqueira, 2010)**

### 2.4.2 Histologi Ginjal

Ginjal memiliki sebuah kapsul fibrosa padat dan dikelilingi oleh jaringan adiposa (fascia Gerota), yang menjadi bantalan bagi ginjal sehingga terhindar dari kerusakan. Parenkim ginjal terdiri dari korteks dan medula. Korteks ginjal adalah berkas jaringan tebal yang terdiri dari glomerulus, tubulus proksimal dan tubulus distal. Medula berisi sebagian kecil loop of Henle dan saluran pengumpul, dan terorganisir menjadi sekitar 8 hingga 18 piramida, dinamakan demikian karena berbentuk piramidal.

Unit fungsional dari ginjal adalah nefron, dengan masing-masing ginjal dewasa mengandung sekitar 0,4juta -1,2 juta nefron. Nefron termasuk glomerulus, yang terdiri dari seberkas kapiler dikelilingi oleh sel-sel epitel dan kapsula Bowman. Glomerulus menyaring darah tanpa pandang bulu dengan

kecepatan sekitar 125 mL / menit (laju filtrasi glomerulus, indeks fungsi ginjal yang mungkin akan menurun di negara-negara dengan berbagai penyakit). Filtrat melewati ke ruang Bowman dan kemudian ke tubulus proksimal. Dari sana melewati ke *pars recta* dari tubulus proksimal, melalui lengkung Henle, ke makula densa (yang terletak berdekatan dengan glomerulus), dan menuju ke dalam tubulus distal. Akhirnya, memasuki tubulus pengumpul dan duktus pengumpul. Dalam lebih dari 90% dari filtrat glomerular ini diserap kembali di sepanjang nefron (Haber *et al*, 2011).



**Gambar 2.6 Histologi Glomerulus Ginjal (Di Fiore, 2003)**

### 2.4.3 Fisiologi

Kebanyakan orang telah mengenal salah satu fungsi ginjal yang penting yaitu untuk membersihkan tubuh dari bahan-bahan sisa hasil pencernaan. Namun pada dasarnya ginjal menjalankan fungsi multipel, antara lain:

- a. Ekskresi produk sisa metabolik dan bahan kimia asing

Ginjal merupakan organ utama untuk membuang produk sisa metabolise yang tidak diperlukan lagi oleh tubuh. Produk-produk ini meliputi *urea* (dari metabolisme asam amino), *kreatinin* (dari keratin otot), *asam urat* (dari asam nukleat), *produk akhir pemecahan haemoglobin* (seperti bilirubin) dan *metabolit berbagai hormon*. Produk-produk sisa ini harus dibersihkan dari tubuh secepat produksinya. Ginjal juga membuang sebagian besar toksin dan zat asing lainnya yang diproduksi oleh tubuh atau pencernaan, seperti pestisida, obat-obatan, dan zat aditif makanan (Guyton dan Hall,1997).

b. Pengaturan keseimbangan air dan elektrolit

Untuk mempertahankan homeostasis, ekskresi air dan elektrolit harus sesuai dengan asupanannya. Jika asupan melebihi ekskresi, jumlah zat dalam tubuh meningkat. Jika asupan kurang dari ekskresi, jumlah zat dalam tubuh akan berkurang (Guyton dan Hall,1997).

c. Pengaturan tekanan arteri

Ginjal berperan penting dalam mengatur tekanan arteri jangka panjang dengan mengekskresikan sejumlah natrium dan air. Selain itu, ginjal turut mengatur tekanan arteri jangka pendek dengan menyekresikan faktor atau zat vasoaktif, seperti *renin*, yang menyebabkan pembentukan produk vasoaktif lainnya (misalnya angiotensin II) (Guyton dan Hall,1997).

d. Keseimbangan asam-basa

Ginjal turut mengatur asam-basa, bersama dengan sistem dapar paru dan cairan tubuh, dengan mengekskresi asam dan mengatur penyimpanan dapar cairan tubuh (Guyton dan Hall,1997).

e. Pengaturan produksi eritrosit

Ginjal menyekresikan *eritropoietin*, yang merangsang pembentukan sel darah merah. Salah satu rangsangan penting untuk sekresi *eritropoietin* oleh ginjal ialah hipoksia (Guyton dan Hall,1997).

f. Pengaturan produksi 1,25-Dihidroksivitamin D<sub>3</sub>

Ginjal menghasilkan bentuk aktif vitamin D yaitu 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> (*kalsitriol*). Kalsitriol penting untuk deposit kalsium yang normal dalam tulang dan reabsorpsi kalsium oleh saluran cerna (Guyton dan Hall,1997).

g. Sintesis glukosa

Ginjal menyintesis glukosa dari asam amino dan prekursor lain selama masa puasa yang panjang, proses ini disebut *glukoneogenesis*. Kapasitas ginjal untuk menambahkan glukosa pada darah selama masa puasa panjang dapat menyaingi hati (Guyton dan Hall,1997).

Ginjal melaksanakan berbagai fungsi di atas dengan mekanisme filtrasi plasma yang terjadi di sepanjang kapiler glomerulus, mekanisme reabsorpsi dan sekresi berbagai zat yang berlangsung di sepanjang tubulus. Mekanisme tersebut mengubah komposisi akhir dan volume urin secara drastis apabila dibandingkan dengan cairan yang masuk ke nefron melalui kapiler glomerulus (Bekti, 2009).

Ginjal menerima sekitar 20% hingga 25% dari curah jantung atau sekitar 1000 hingga 1200 ml/menit untuk difiltrasi. Semua elemen akan mengalami filtrasi, termasuk air, elektrolit, dan nonelektrolit, kecuali untuk sel darah merah dan sebagian besar protein. Transport ion dan molekul melalui peristiwa reabsorpsi dan sekresi di sepanjang tubulus melalui mekanisme transport aktif atau pasif. Molekul-molekul air bergerak secara osmosis jika terdapat gradien konsentrasi ion-ion atau molekul yang melewati membran semipermeabel.

Sejumlah dua pertiga dari hasil filtrasi glomerulus diabsorpsi kembali oleh tubulus proksimal, dan hanya sekitar 1% yang diekskresikan ke dalam urin (Bekti, 2009).

#### 2.4.4 Jejas Glomerulus

Adanya jejas glomerulus (*glomerular injury*) menyebabkan berbagai macam bentuk penyakit glomerulus. Identifikasi terhadap perubahan morfologis pada hasil biopsi glomerulus ginjal sangat penting untuk menentukan diagnosa banding pada penyakit glomerulus. Pengetahuan tentang perubahan-perubahan morfologi tersebut sangat penting karena berbagai penyakit glomerulus yang berbeda, ternyata memberikan variasi kombinasi gambaran dasar yang sama (Taylor & Candrasoma, 1995; Cotran et al., 1999)

##### a. Hiperselularitas

Disebutkan bahwa proses inflamasi pada glomerulus berhubungan dengan peningkatan jumlah sel pada rumbai kapiler glomerulus (*glomerular tuft*) (Cotran et al., 1999). Hiperselularitas glomerulus meliputi salah satu atau kombinasi dari beberapa keadaan diantaranya adalah proliferasi sel dalam glomerulus. Menurut Taylor dan Candrasoma (1995) berbagai jenis sel dalam glomerulus dapat mengalami proliferasi antara lain:

- ✓ Proliferasi sel mesangial dikenali dengan peningkatan jumlah nucleus di bagian sentral lobus glomerulus. Sel mesangial adalah bagian dari mekanisme fagositosis glomerulus.
- ✓ Proliferasi sel endotel yang dapat menyebabkan obliterasi lumen kapiler.

- ✓ Proliferasi sel epitel dimana jika terjadi secara extensive, menyebabkan terbentuknya *crescent-shaped mass of cellular* atau jaringan kolagen sehingga terjadi obliterasi *Bowman's space*.

b. Penebalan Membrana Basalis Glomerulus

Peningkatan komponen material membrane basalis dapat dideteksi oleh mikroskop cahaya sebagai penebalan dinding kapiler. Penebalan membran basalis umumnya berhubungan dengan deposisi kompleks imun, immunoglobulin dan komplemen, serta deposit lainnya pada subepitel, subendotel, dan intramembranous (Taylor dan Candrasoma, 1995).

c. Peningkatan Materi Matriks Mesangial

Gambaran patologis ini umumnya dikarenakan deposisi immunoglobulin dan komplemen di mesangium (Taylor dan Candrasoma, 1995).

d. Sklerosis

Sklerosis dapat terjadi pada bagian-bagian glomerulus atau secara global (Taylor dan Candrasoma, 1995).

#### 2.4.5 Efek Radikal Bebas Terhadap Ginjal

Salah satu faktor yang mempengaruhi perubahan struktur dan fungsi dari sel pada ginjal adalah adanya radikal bebas. Karena bersifat reaktif, maka radikal bebas menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak komponen sel hidup seperti protein, lipid, karbohidrat dan asam nukleat (Rachmawati, 2003). Salah satu sumber radikal bebas adalah gas buang kendaraan bermotor.

Emisi gas buang kendaraan bermotor masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan yang merupakan jalan pemajanan terbesar dan melalui saluran pencernaan. Absorpsi emisi gas buang pada saluran pernafasan

adalah sekitar 40% dan pada saluran pencernaan adalah sekitar 5-10%, kemudian gas buang didistribusikan ke dalam darah dan sekitar 95% terikat pada sel darah merah, sedangkan sisanya terikat pada plasma. Sebagian metabolisme gas buang di simpan pada jaringan lunak dan tulang. Ekskresi terutama melalui ginjal dan saluran pencernaan.

Peningkatan konsentrasi Reactive Oxygen Species (ROS) menyebabkan kerusakan jaringan melalui berbagai mekanisme. Efek ROS dalam tingkat seluler dapat menyebabkan perubahan yang substansial dalam komponen, struktur maupun fungsinya. Menurut Gwinner dan Grone (2000) pengaruh ROS terhadap kerusakan ginjal dapat terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain:

- a. Oksidasi lipid yang berakibat terjadinya radikal lipid. Sel dan membrane basalis dapat rusak karena bergantung pada integrasi lipid non-teroksidasi dalam mempertahankan strukturnya.
- b. Reaksi ROS terhadap protein dapat memicu hilangnya komponen penyusun struktur protein, dapat menyebabkan inaktivasi enzim dan akhirnya dapat mengubah proses degradasi.
- c. Oksidasi terhadap purin, pirimidin dan ribosom dapat menyebabkan *cross-linking* atau fragmentasi dari asam nukleat, terutama menyebabkan perubahan ekspresi gen.

Kerusakan pada ginjal tersebut disebabkan oleh beberapa macam faktor yang salah satunya adalah meskipun berat ginjal hanya sekitar 0,5% dari total berat badan, tetapi ginjal menerima darah sebesar 20%- 25% dari curah jantung melalui arteri renalis. Tingginya aliran darah yang menuju ginjal inilah yang menyebabkan berbagai macam obat, bahan kimia, dan logam-logam berat dalam sirkulasi sistemik dikirim ke ginjal dalam jumlah yang besar. Zat-zat toksik

ini akan terakumulasi di ginjal dan menyebabkan kerusakan bagi ginjal itu sendiri.

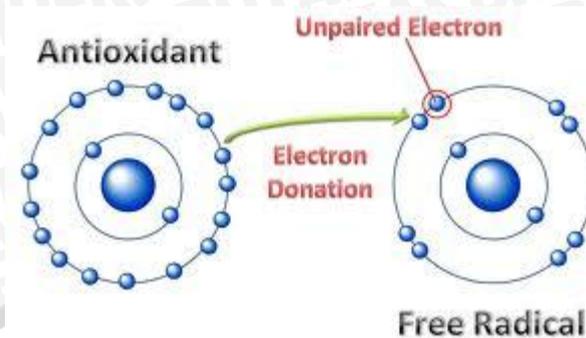
Pada ginjal, ekspresi enzim antioksidan menunjukkan aktivitas lebih tinggi disbanding organ lainnya. Meskipun demikian, kerusakan oksidatif lebih banyak dilaporkan terdapat pada ginjal terutama glomerulus. Terdapat dugaan bahwa glomerulus merupakan salah satu target utama serangan ROS (Gwinner et al., 1998).

## **2.5 Antioksidan**

### **2.5.1 Pengertian Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Antioksidan alami dalam tubuh dapat diperankan oleh beberapa enzim. Antioksidan alami dalam tubuh tersebut digunakan dalam pengendalian kadar radikal bebas endogen yang secara alami juga diproduksi oleh tubuh (Bendich, 2004).



**Gambar 2.7 Proses Netralisasi Radikal Bebas oleh Antioksidan**  
(Shanzezy, 2012)

Selain itu, dapat juga ditemukan antioksidan yang berasal dari luar tubuh seperti antioksidan yang berasal dari makanan. Antioksidan tersebut juga dapat disebut sebagai antioksidan non enzimatik. Secara normal antioksidan non enzimatik tersebut dapat membantu antioksidan enzimatik dalam tubuh sehingga radikal bebas dapat lebih cepat di netralisir ( Jerusha et al., 1993).

### 2.5.2 Jenis Antioksidan

Lubis (2010) mengatakan bahwa ada tiga macam antioksidan yaitu antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri (endogen) yang berupa enzim antara lain superoksida dismutase, glutathione peroxidase, peroxidase dan katalase. Kedua yaitu antioksidan alami yang dapat diperoleh dari tanaman atau hewan, yaitu tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid dan senyawa fenolik. Ketiga adalah antioksidan sintetik dari bahan-bahan kimia yaitu Butylated Hydroxyanisole (BHA) yang ditambahkan dalam makanan untuk mencegah kerusakan lemak.

Antioksidan tubuh superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan enzimatik yang bekerja bila ada mineral-mineral seperti tembaga dan mangan yang bersumber dari kacang-kacangan atau padi-padian. Oleh karena itu, sangat

penting untuk mengonsumsi kacang kedelai, kacang hijau dan hasil olahannya seperti tempe. Kemudian glutathione peroxidase merupakan enzim tubuh yang berperan aktif dalam menghilangkan  $H_2O_2$  dalam tubuh dan mempergunakannya untuk mengubah glutathione (GSH) menjadi glutathione teroksidasi (GSSG). Enzim ini mendukung aktivitas enzim SOD bersama-sama dengan enzim katalase dan menjaga konsentrasi oksigen akhir agar stabil dan tidak berubah menjadi pro-oksidan. Makanan yang kaya glutathione antara lain brokoli, kubis, asparagus, alpukat dan kenari. Sedangkan enzim katalase disamping mendukung aktivitas enzim SOD juga dapat mengkatalisa perubahan berbagai peroksida dan radikal bebas menjadi oksigen dan air. Enzim-enzim tersebut dalam bekerjanya sangat membutuhkan mineral penyusun, seperti *copper*, *zinc*, selenium, mangan dan besi (Lubis, 2010).

### 2.5.3 Cara Kerja Antioksidan

Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorny *et al.*, 2001). Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan siklooksigenase (Halliwell and Gutteridge, 2000).

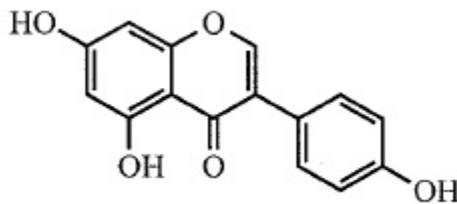
Menurut Halliwell and Gutteridge (1999) antioksidan melindungi molekul target melalui beberapa cara:

- Mengambil oxygen derived species, ini dilakukan dengan menggunakan protein katalis seperti enzim atau secara langsung melalui reaksi kimia.
- Meminimalkan terbentuknya oxygen derived species.
- Mengikat ion logam yang diperlukan untuk membentuk radikal bebas yang lebih reaktif seperti radikal hidroksil.
- Memperbaiki kerusakan sel target.
- Menghancurkan target molekul yang telah rusak dan menggantinya dengan yang baru.

## 2.6 Genistein

### 2.6.1 Pengertian Genistein

Genistein yang juga dikenal dengan (5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenil)-4H-1-benzopyran-4 one,4',5,7-trihydroxyisofavone) merupakan fitoestrogen yang memiliki efek antioksidan. Dalam banyak penelitian yang telah dilakukan sifat estrogenik genistein telah terbukti, dan telah dinyatakan pula bahwa diantara banyak jenis isoflavon, genistein mempunyai aktivitas estrogenik paling kuat. Dalam peranannya sebagai antioksidan, genistein merupakan antioksidan yang kuat (Phytochemicals, 2008). Kerja genistein (isoflavon) sebagai antioksidan adalah menangkap radikal bebas, yaitu dengan cara mengubah  $O_2^-$  (ion superoksida yang merupakan metabolit terinduksi) yang dikatalis oleh reaksi dismutasi.



Genistein  
Mol. Wt.: 270

Gambar 2.8 Struktur genistein (Wu, 1999)

## 2.6.2 Mekanisme Kerja Genistein

### 1) Farmakokinetik

- Absorpsi

Genistein dengan cepat diabsorpsi dan profil kinetik menunjukkan pola satu puncak pada diagram konsentrasi plasma dibandingkan dengan waktu. Pada dosis tertinggi yang diberikan (300 mg) laju absorpsi usus nampak terbatas (Ullmann U. Et al, 2008). Pada penelitian ini, yang menggunakan tikus sebagai subyek percobaan, menunjukkan pola dua puncak pada diagram konsentrasi plasma dibandingkan waktu. Hal ini diduga disebabkan oleh sirkulasi enterohepatik (Joshi et al. 2007).

- Konsentrasi maksimum dalam plasma darah

Konsentrasi maksimum dalam plasma darah tercapai dalam waktu 4 sampai 6 jam setelah pemberian (Ullmann *et al*, 2008). Pada penelitian lain, konsentrasi maksimum dalam plasma tercapai dalam waktu 4 samapai 8 jam setelah pemberian (Joshi et al. 2007).

- Waktu Paruh

Waktu paruh rata rata dari 40 sukarelawan dan pemberian dosis 30-300mg adalah 7,7-10,2 jam (Ullman *et al*, 2008)

- Metabolisme dan ekskresi

Metabolit Genistein yang telah diabsorpsi mengalami siklus enterohepatik dan dapat diekskresikan melalui empedu, didekonjugasi oleh flora usus, direabsorpsi, dan direkonjugasi oleh liver, dan diekskresikan dalam urine. Lignan dan isoflavon dapat diukur dalam urine, plasma, feces, semen, empedu, saliva, dan ASI. Metabolisme genistein terutama ditentukan oleh flora usus, penggunaan antibiotik, serta penyakit usus dan jenis kelamin (murkise *et al.*, 1998)

- Toksisitas

Pada suatu penelitian yang menggunakan genistein sintetik yang dimurnikan mencapai konsentrasi 99,4%, menyatakan bahwa genistein aman dikonsumsi berdasarkan jarak dosisnya yang lebar. Hal ini dibuktikan bahwa pada pemberian dosis oral tunggal 30, 60, 150, atau 300 mg yang diberikan pada 40 sukarelawan yang sehat, tidak terjadi efek samping pada pemberian dosis manapun. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan signifikan pada tanda-tanda vital, EKG, dan tanda-tanda laboratorium klinis (Ullmann *et al*, 2008)

## 2) Farmakodinamik

Berdasarkan penelitian yang ada, diketahui bahwa genistein bekerja melalui dua jalur yaitu genomik dan non-genomik. Mekanisme kerja genomik biasanya membutuhkan waktu lebih dari 30 menit, sedangkan jalur non-genomik biasanya hanya membutuhkan waktu kurang dari 20 menit. Hampir 2/3 kerja dari

hormon estrogen sendiri melewati jalur reseptornya secara genomik, membuat jalur genomik sebagai jalur utama mekanisme kerjanya (Speroff, 2005; Mathewa, 2003). Sedangkan Challem (2005) menyebutkan dua jalur kerja dari genistein, yaitu dengan perantara reseptor estrogen (jalur estrogenik) dan yang tidak diperantarai reseptor estrogen (jalur non-estrogenik). Mekanisme kerja genistein melalui jalur estrogenik bisa menimbulkan efek antioksidan, estrogenik dan antiestrogenik. Sedangkan jalur non-estrogenik berupa inhibisi kanker.

#### a. Jalur Estrogenik

Jalur estrogenik merupakan aksi genistein yang berikatan dengan reseptor estrogen. Sebenarnya efek antioksidan bisa ditunjukkan melalui mekanisme kerjanya secara langsung melalui reaksi kimia dengan radikal bebas, yaitu dengan mengubah  $O_2^-$  (ion superoksida yang merupakan metabolit tereduksi) yang dikatalisa reaksi dismutasi. Hal ini dikarenakan adanya gugus hidroksil pada struktur fenolik genistein yang merupakan reduktor kuat. Posisi gugus hidroksil ini menentukan aktivitas antioksidan dari genistein (Kintono, 2010). Di sisi lain, karena genistein mampu mengikat reseptor estrogen dan bekerja seperti estrogen, maka jalur estrogenik diperoleh dengan mengikat reseptor estrogen dalam tubuh. Kemampuan ini dikarenakan strukturnya mirip dengan estrogen endogen manusia (Adam, 2005).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa efek antioksidan genistein lebih dikarenakan *up-regulasi* ekspresi gen antioksidan endogen yang melibatkan aktivasi *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2). Selain itu, genistein juga telah dibuktikan dapat secara tidak langsung menekan aktivasi NF- $\kappa$ B yang diinduksi oleh ROS dan meningkatkan kadar *glutathion* (GSH). Glutathion (GSH)

adalah antioksidan endogen yang sangat penting dalam melindungi jaringan dari kerusakan akibat radikal bebas (Jeong Sung *et al.*, 2008). Mekanisme kerja klasik dari estrogen dan isoflavon fitoestrogen (seperti genistein) melibatkan reseptor estrogen intrasel. Kompleks hormon-reseptor ini akan berikatan dengan *estrogen response element* (ERE) spesifik pada region promotor dari gen tertentu yang *estrogen-responsive* sehingga menyebabkan aktivasi transkripsional gen target tersebut. Di sisi lain, aktivasi gen target oleh estrogen juga dimediasi oleh faktor transkripsi lain yang independen ERE, seperti *activating protein* (AP)-1 dan NF $\kappa$ B (Borras *et al.*, 2006).

Selain mengaktivasi reseptor estrogen  $\alpha$  atau reseptor estrogen  $\beta$ , genistein mempunyai efek lain dalam hal mempengaruhi sintesa estrogen dan degradasinya. Genistein menghambat aktivitas beberapa enzim yang berpartisipasi dalam metabolisme estrogen. Genistein menghambat enzim yang memecah estrogen (enzim sitokrom P450 (CYP450)). Efek inhibisi ini akan mengakibatkan kadar estrogen tubuh meningkat. Selain itu, efek inhibisi ini dapat menguntungkan karena enzim CYP450 juga dikenal memproduksi metabolit yang bersifat karsinogenik. Genistein juga menghambat enzim lain (sulfotransferase atau SULT), dimana efek enzim ini adalah mengekskresikan estrogen dari dalam tubuh (Adam, 2005).

#### **b. Jalur Non-estrogenik**

Mekanisme kerja genistein yang lain yaitu melalui jalur yang tidak bersangkutan dengan estrogen. Efek-efek antiproliferasi ini pada umumnya terjadi saat genistein terdapat dalam konsentrasi tinggi di dalam tubuh (Adam, 2005). Genistein adalah penghambat reseptor membran untuk sinyal

pertumbuhan (Protein tyrosin kinase atau PTK). Reseptor-reseptor ini menghubungkan sinyal dari growth factor ekstraseluler ke dalam nukleus menuju gen yang mengontrol pertumbuhan sel. Sejumlah studi telah menunjukkan bahwa genistein menghambat reseptor-reseptor membran ini (PTKs), yang menyebabkan efek antiproliferatif (Adam, 2005).

Genistein memediasi 2 gen yang bersangkutan dengan proses kematian sel yang terprogram. Gen *Bcl-2* mencegah kematian sel dan gen *Bax* mengakibatkan kematian sel. Genistein menyebabkan *down regulation* dari gen yang mencegah kematian sel (*Bcl-2*) dan menyebabkan *up regulation* gen yang mengakibatkan kematian sel (*Bax*), sehingga genistein menyebabkan peningkatan eliminasi sel oleh proses kematian sel yang terprogram (Adam, 2005). Terdapat pula gen lain yang dipengaruhi oleh genistein yaitu gen penekan tumor (p21) yang menyebabkan penghentian siklus sel dan menghentikan pembelahan sel. Genistein menyebabkan *up regulation* terhadap aktivitas gen ini dalam percobaan-percobaan *in vitro*. Hal ini kembali mengakibatkan peningkatan kematian sel (Adam, 2005)

Efek antiproliferasi tambahan dari genistein diperkirakan berupa efek inhibisi angiogenesis dan respon stress. Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh-pembuluh darah baru yang penting bagi terjadinya pertumbuhan jaringan, termasuk jaringan tumor. Jadi, efek inhibisi angiogenesis oleh genistein menurunkan kemampuan jaringan tumor untuk tumbuh (Adam, 2005).

Terdapat juga hipotesa mengenai kemampuan genistein untuk menghambat protein stres. Terdapat bukti bahwa protein yang dilepaskan ke dalam tubuh sebagai respon terhadap stres dari lingkungan (seperti protein yang terkait glukosa) dapat melindungi sel dari proses kematian sel yang terprogram,

sehingga hal ini dapat menstimulasi pertumbuhan tumor. Hal ini mengartikan bahwa efek inhibisi genistein terhadap protein-protein stress akan mengurangi perlindungan sel-sel tumor terhadap kematian sel yang terprogram (Adam, 2005).

## 2.7 Kacang Tunggak (*Vigna Unguiculata*)

### 2.7.1 Taksonomi Kacang Tunggak

Kedudukan tanaman kacang tunggak dalam tata nama (taksonomi) menurut Hanum (1997) dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantarum
Phyllum	: Spermatophyte
Kelas	: Angiospermae
Sub kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Leguminales
Famili	: Leguminoceae (papilionaceae)
Genus	: Vigna
Spesies	: Vigna unguiculata
Subspecies	: Vigna Unguiculata subsp. unguiculata

### 2.7.2 Morfologi Kacang Tunggak

Kacang tunggak memiliki ciri polongnya tegak ke atas dan kaku. Penampilan visual kacang tunggak hampir sama dengan tanaman kacang panjang, namun tidak merambat. Batangnya lebih pendek dan berbuku- buku. Daunnya agak kasar, melekat pada tangkai daun yang agak panjang, dengan posisi daun bersusun tiga. Bunga berbentuk seperti kupu-kupu, terletak pada

ujung tangkai yang panjang. Buah kacang tunggak berukuran lebih kurang 10 cm, berbentuk polong berwarna hijau, dan kaku. Biji kacang tunggak berbentuk bulat panjang, agak pipih dengan ukuran 4 mm – 6 mm x 7 mm – 8 mm, dan berwarna kuning kecokelat-cokelatan (Rukmana, 2000).



**Gambar 2.9 Pohon dan biji Kacang Tunggak ( Rukmana, 2000)**

### **2.7.3 Penyebaran Kacang Tunggak**

Kacang tunggak merupakan salah satu hasil panen kacang kacangan yang banyak dijumpai didaerah tropis *semi-arid* yang meliputi Asia, Afrika, Eropa Selatan, Amerika Tengah dan Amerika Latin. Kacang tunggak pertama kali ditemukan di Afrika, kemudian menyebar luas hingga ke Asia, seperti Thailand dan India. Kerabat dekat tanaman kacang tunggak ditemukan pula di Abbissinia, Eritrean, dan Somalia. Dewasa ini penanaman kacang tunggak telah meluas ke daerah-daerah tropis dan subtropis (Rukmana , 2000).

Kacang tunggak merupakan tanaman yang tahan terhadap kekeringan dan musim panas. Kacang tunggak juga memiliki kemampuan untuk mengikat nitrogen dari udara melalui akarnya dan dapat tumbuh dengan baik pada tanah

kering dengan campuran 85% pasir yang mengandung bahan organik kurang dari 0.2% dan kandungan fosfor yang rendah (Imrie, 2004).

#### 2.7.4 Kandungan Kacang Tunggak

Dari segi gizi, biji kacang tunggak yang sudah tua pada pengukuran 100 g mengandung 10 g air, 22 g protein, 1,4 g lemak, 51 g karbohidrat, 3,7 g vitamin, 3,7 g karbon, 104 mg kalsium dan nutrisi lainnya. Energi yang dihasilkannya sekitarnya sekitar 1420 kj/100 g. Pada biji yang masih muda dalam 100 g mengandung 88,3 air, 3 g protein, 0,2 g lemak, 7,9 g karbohidrat, 1,6 vitamin, 0,6 karbon, dan energi yang dihasilkannya sekitar 155 kj/100 g (Van der Maesen dan Somaatmaja, 1993).

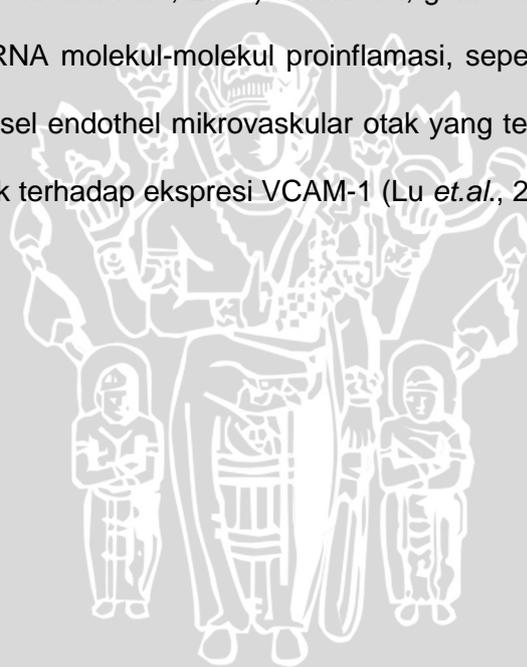
Tabel 2.2 kandungan gizi tiap 100 g biji kacang tunggak tua

No	Kandungan Gizi	Banyaknya
1.	Kalori	1420,00 Kj
2.	Protein	22,00 g
3.	Lemak	1,40 g
4.	Karbohidrat	51,00 g
5.	Kalsium	104,00 g
6.	Karbon	3,70 g
7.	Zat Besi	6,50 mg
8.	Vitamin A	30,00 SI
9.	Vitamin B1	0,92 mg
10.	VitaminC	2,00 mg
11.	Air	10,00 g
12.	Bagian yang dapat dimakan	100%

(Van der Maesen dan Somaatmaja, 1993)

### 2.7.5 Manfaat Kacang Tunggak Sebagai antioksidan

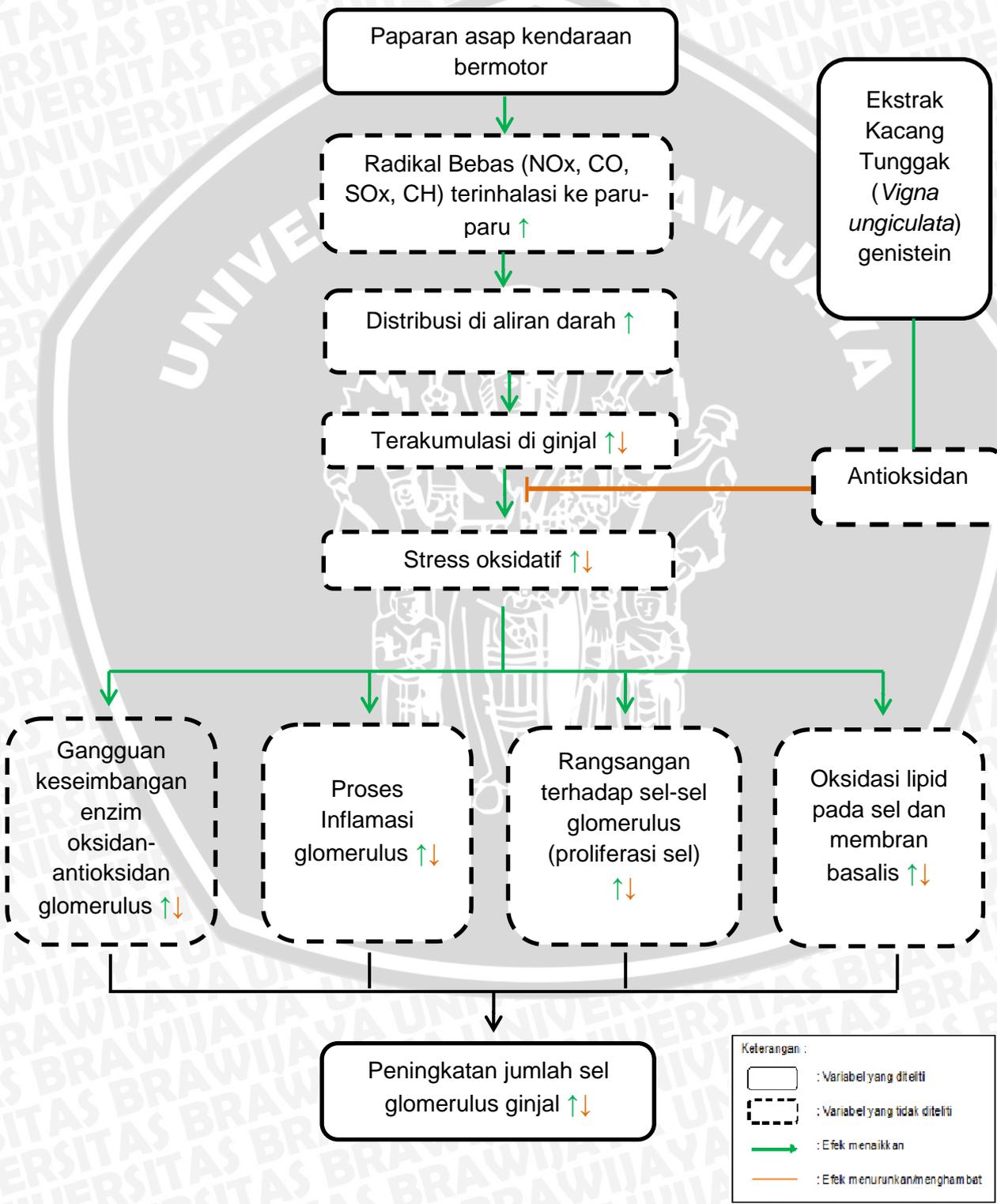
Senyawa flavonoid yang terkandung dalam kacang tunggak berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa flavonoid dalam kacang tunggak diantaranya: genistein, daidzein, kaempferol dan quercetin. Genistein merupakan salah satu antioksidan yang kuat. Sebagai antioksidan, genistein dapat menurunkan kadar lipid peroksidase dan meningkatkan enzim *superoxide dismutase*. Dilaporkan juga bahwa genistein memiliki sifat antioksidan yang disebabkan sifat reaktif terhadap radikal bebas sehingga dapat menghambat perkembangan sel kanker pada fase promosi (Pawiroharsono, 2001). Selain itu, genistein mempunyai efek menekan ekspresi mRNA molekul-molekul proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , MCP-1, dan ICAM-1 pada sel-sel endothel mikrovaskular otak yang terinduksi hemolisis, meskipun tidak berefek terhadap ekspresi VCAM-1 (Lu *et.al.*, 2009).



BAB 3

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Emisi kendaraan bermotor akan terinhalasi masuk ke paru-paru dan terdistribusi ke seluruh tubuh melalui aliran darah. Akibat paparan secara terus menerus dari asap kendaraan bermotor berbahan bakar bensin, maka jumlah radikal bebas di tubuh semakin meningkat dan melebihi jumlah antioksidan di dalam tubuh yang disebut stres oksidatif (Machlin, 1987).

Kandungan asap kendaraan yang pertama adalah  $\text{SO}_2$ .  $\text{SO}_2$  mampu melewati membran mukosa saluran napas,  $\text{SO}_2$  lalu di distribusikan ke dalam darah akibat ikatan  $\text{SO}_2$  dengan fraksi alpha-globulin plasma (Petruzzi *et al.*, 1994). Setelah masuk aliran darah kemudian  $\text{SO}_2$  diubah menjadi sulfat oleh molibdenum-dependent oksidase sulfit (Frampton *et al.*, 2007). Sulfat di aliran darah akan diekskresikan secara bebas melalui ginjal akibat adanya transporter sulfat yaitu NaSi-1 co-transporter dan sulphate-bicarbonate anion exchanger (Sat-1) di ginjal yang bertanggung jawab terhadap keluar dan masuknya sulfat di ginjal (Silve, 2000). Sulfat yang terfiltrasi di glomerulus menyebabkan kerusakan oksidatif sistemik akibat gangguan keseimbangan enzim oksidan-antioksidan glomerulus, peningkatan oksidasi lipid pada membrane basalis glomerulus sehingga terjadi rangsangan terhadap proliferasi sel-sel glomerulus (Meng, 2003).

Gas selanjutnya adalah nitrogen oksida ( $\text{NO}_x$ ). Nitrogen oksida yang terinhalasi ( $\text{iNO}_x$ ) berdifusi dengan cepat melewati sel alveoli dan endotel pembuluh darah menuju ke sirkulasi. Terdapat dua mekanisme reaksi yang terjadi ketika  $\text{NO}_x$  berada di sirkulasi.  $\text{iNO}_x$  dalam bentuk NO akan berikatan dengan Oxy-Hb (*Oxy-haemoglobin*) karena afinitas NO terhadap Hb 1500 kali lebih besar dibanding CO, sedangkan  $\text{iNO}_x$  dalam bentuk  $\text{NO}_2$  dan  $\text{NO}_3$  akan

berikatan dengan hemoglobin membentuk SNO-Hb (*S-nitrosyl-hemoglobin*) yang kemudian akan teroksidasi oleh oksigen bebas di pembuluh darah. Kedua reaksi tersebut akan menghasilkan Met-Hb (Methaemoglobin) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) yang akan di ekskresikan ke ginjal (Hayward et al., 1999). Di ginjal nitrat kemudian direduksi kembali menjadi NO. NO yang tidak berpasangan akan berikatan dengan ion peroksida ( $\text{O}_2^-$ ) menghasilkan peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ).

Gas berikutnya adalah karbon monoksida (CO). CO memiliki afinitas terhadap hemoglobin 250 – 300 kali lebih kuat daripada afinitas oksigen, CO akan membentuk ikatan karboksihemoglobin, sehingga menghambat distribusi oksigen ke jaringan tubuh. Komposisi gas emisi yang terakhir adalah hidrokarbon. Hidrokarbon beredar di sirkulasi melalui perantara *aromatic hydrocarbon receptors* (AhR) dan sebagian besar di metabolisme oleh Cytochrome p-450 yang ada di ginjal, hati dan organ lainnya. Ekspresi seluler dari AhR selanjutnya akan menginduksi terjadinya stress oksidatif di tingkat seluler melalui interaksi ROS dan enzim mixed-function oxidase (Germolec et al).

Keberadaan stress oksidatif yang terlalu berlebihan dalam tubuh dapat menimbulkan berbagai keadaan patologi termasuk jejas glomerulus akibat proses inflamasi, gangguan keseimbangan enzim oksidan-antioksidan glomerulus, rangsangan terhadap sel-sel glomerulus (proliferasi sel) dan oksidasi lipid pada sel dan membran basalis (Meng, 2003). Dikatakan bahwa proses inflamasi pada glomerulus berhubungan dengan hiperselularitas glomerulus yang meliputi salah satu atau kombinasi dari beberapa keadaan diantaranya proliferasi sel yang mengakibatkan meningkatnya jumlah sel glomerulus ginjal.

Kacang tunggak memiliki kandungan genistein yang berperan sebagai antioksidan sehingga dapat meminimalkan akibat yang ditimbulkan oleh radikal

bebas. Genistein adalah phytoestrogen yang mampu menghambat aktivitas sel kanker (kemoprotektan) dan Mekanisme kerja genistein adalah dengan memerangkap molekul oksigen radikal bebas sehingga menghambat pembentukan anion superoksida dari xantin oksidase. Pada penelitian yang dilakukan oleh Jeong Sung *et al.* (2008), genistein telah dibuktikan dapat mengontrol proliferasi sel, siklus sel, apoptosis, dan regulasi transkripsi. Dalam penelitian ini juga dibuktikan bahwa genistein secara tidak langsung menekan aktivasi NF-kB yang diinduksi oleh ROS dan meningkatkan kadar *gluthation* (GSH).

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna Unguiculata*) dapat mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus strain Wistar pada berbagai lama paparan asap kendaraan bermotor.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis/Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode Randomized post test controlled group design untuk mengetahui pengaruh genistein dalam ekstrak kacang tunggak terhadap jumlah sel glomerulus ginjal pada sediaan histopatologi ginjal tikus yang dipapar asap kendaraan bermotor bermotor. Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus di mana setiap tikus memiliki probabilitas yang sama untuk mendapatkan perlakuan sehingga dapat menjaga validasi generalisasi ke populasi. Perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak kacang tunggak pada tikus yang terpapar asap kendaraan bermotor dengan waktu yang berbeda - beda. Tikus - tikus yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 9 kelompok dan masing-masing kelompok ada 4 ekor tikus, yaitu:

- Kelompok N : sampel dengan kondisi tidak dipapar asap kendaraan bermotor, tidak diberi oksigen dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak (kontrol negatif).
- Kelompok N+O4 : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap kendaraan bermotor namun diberi oksigen 4 menit.
- Kelompok N+G : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap kendaraan bermotor namun diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A2O4(-)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.

- Kelompok A2O4(+)<sub>G</sub> : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A3O4(-)<sub>G</sub> : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak
- Kelompok A3O4(+)<sub>G</sub> : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A4O4(-)<sub>G</sub> : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak
- Kelompok A4O4(+)<sub>G</sub> : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.

Setelah perlakuan selama 30 hari, maka organ ginjal diambil, dan dibuat sediaan histopatologinya. Setelah itu dilakukan penghitungan jumlah sel glomerulus ginjal dengan pembesaran 400x. Lalu keluar hasil dan hasil tersebut dianalisis.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus novergicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus Jantan.
- b. Usia > 8 minggu.
- c. Berat badan 300-500 gram.
- d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerak yang aktif.

#### 4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Bobot tikus menurun hingga berat badannya kurang dari 150 gram.
- b. Tikus mati dalam masa penelitian.
- c. Tikus cacat

Tikus dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak dan mudah perawatannya. Selain itu alasan penggunaan tikus sebagai hewan coba adalah sebagai berikut (Paget and Barnes, 1971).

- a. Ukurannya kecil
- b. Memiliki sensitivitas yang besar terhadap obat
- c. Lebih terstandarisasi dibanding dengan binatang percobaan lainnya.
- d. Dapat dibiakkan untuk menjamin keaslian dan keseragaman galur.
- e. Tidak bisa muntah karena tidak memiliki pusat muntah.

Dalam Penelitian ini, tikus-tikus dibagi 9 kelompok dengan perhitungan jumlah sampel masing-masing kelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus.

1. Kelompok N : sampel dengan kondisi tidak dipapar asap kendaraan bermotor, tidak diberi oksigen dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak (kontrol negatif).
2. Kelompok N+O<sub>4</sub> : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap kendaraan bermotor namun diberi oksigen 4 menit.

3. Kelompok N+G : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap kendaraan bermotor namun diberi ekstrak kacang tunggak.
4. Kelompok A2O4(-)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.
5. Kelompok A2O4(+)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
6. Kelompok A3O4(-)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.
7. Kelompok A3O4(+)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
8. Kelompok A4O4(-)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.
9. Kelompok A4O4(+)G : sampel dengan paparan asap kendaraan bermotor selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.

#### 4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan menggunakan tehnik *simple random sampling* dan sampel dibagi menjadi sembilan kelompok dengan cara undian.

#### 4.2.4 Estimasi Besar Sampel

Jumlah replikasi (t) pada setiap perlakuan (r) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Hanifah, 2005) dengan r=9 :

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

$$(t-1)(9-1) \geq 15$$

$$(t-1)(8) \geq 15$$

$$8t-8 \geq 15$$

$$8t \geq 23$$

$$t \geq 2.875$$

$$t \cong 3$$

Dari perhitungan didapatkan  $n \geq 2.875$ , jadi dilakukan minimal 3 kali replikasi untuk masing-masing kelompok. Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor tikus sebagai sampel untuk masing-masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 36 ekor tikus.

### 4.3 Variable Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama paparan asap kendaraan bermotor.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah sel glomerulus ginjal.

### 4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variable yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

1. Jenis tikus.
2. Jenis Kelamin tikus : Tikus jantan
3. Usia tikus
4. Berat badan tikus
5. Pemberian diet normal
6. Waktu pengujian : Lama paparan asap kendaraan bermotor bermotor dengan pemberian ekstrak kacang tunggak.
7. Faktor lingkungan laboratorium dan lingkungan kandang.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama 2 bulan dari bulan Januari sampai bulan Maret 2012.

### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 4.5.1.1 Bahan Ekstraksi Kacang Tunggak

Pada proses ekstraksi dengan metode Maserasi digunakan bahan berikut:

1. Biji Kacang Tunggak
2. Etanol 96,5 (pelarut)
3. Aquades

#### 4.5.1.2 Bahan Pemaparan Asap Kendaraan Bermotor

Bahan yang digunakan pada mesin penghasil asap kendaraan bermotor adalah bahan bakar mesin yang berasal dari fosil.

#### 4.5.1.3 Bahan Pengambilan Organ Ginjal Tikus

Untuk pengambilan organ ginjal tikus bahan yang dibutuhkan selain tikus penelitian adalah sebagai berikut:

1. Eter
2. Kapas
3. Formalin 10%

#### 4.5.1.4 Bahan Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam pembuatan sediaan histopatologi ginjal tikus adalah:

1. Alkohol dengan berbagai konsentrasi
2. Xylol
3. *Counter staining*
4. Cat Hematoksilin-Eosin (HE)
5. Parafin lunak
6. Sediaan ginjal tikus penelitian
7. Ammonium
8. Parafin keras
9. Canadian Balsem atau Entellan
10. Alkohol Asam
11. Aquades

#### 4.5.2 Alat Penelitian

##### 4.5.2.1 Alat untuk Membuat Ekstrak Kacang Tunggak

- |                        |   |
|------------------------|---|
| a. Oven                | i. Labu Penampung Etanol (1)                |
| b. Timbangan(1)        | j. Selang Water Pump                        |
| c. Blender             | k. Pendingin Spiral / Rotary Evaporator (1) |
| d. Gelas Erlenmeyer(2) | l. Water Bath                               |
| e. Corong Gelas (1)    | m. Water Pump                               |
| f. Labu Evaporator (1) | n. Botol Hasil Ekstrak                      |
| g. Kertas Saring (1)   | o. Vacuum Pump (1)                          |
| h. Evaporator (1)      |   |

##### 4.5.2.2 Mesin Pembakar Bensin

Mesin pembakar bensin yang ada di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat ini terdiri dari beberapa komponen: kotak tempat tikus, mesin pembakar bensin, tabung kompresor, ban dalam mobil, Tabung O<sub>2</sub> dan alat pengatur tekanan udara.

##### 4.5.2.3 Alat Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak pada Tikus

Pemberian ekstrak kacang tunggak pada tikus digunakan alat spuit atau sonde. Sonde di pasang di ujung spuit lalu dimasukkan kedalam gaster tikus.

##### 4.5.2.4 Alat Pengambilan Organ Ginjal Tikus

Pengambilan organ ginjal tikus dibutuhkan alat - alat sebagai berikut:

1. Tabung sementara pengawetan organ
2. Kotak tertutup

3. Alat bedah minor
4. Parafin untuk memfiksasi tikus saat dibedah

#### 4.5.2.5 Alat Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus

Dalam pembuatan sediaan histopatologi ginjal tikus dibutuhkan alat - alat sebagai berikut:

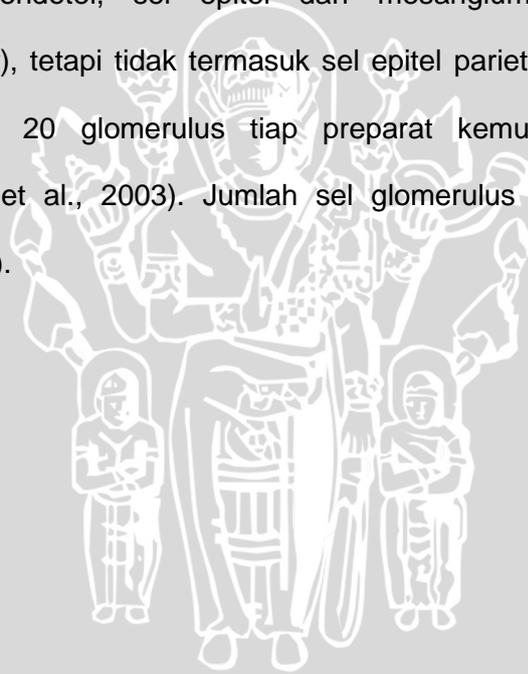
1. Mikrotom
2. *Cover glass*
3. *Object glass*

#### 4.6 Definisi Operasional

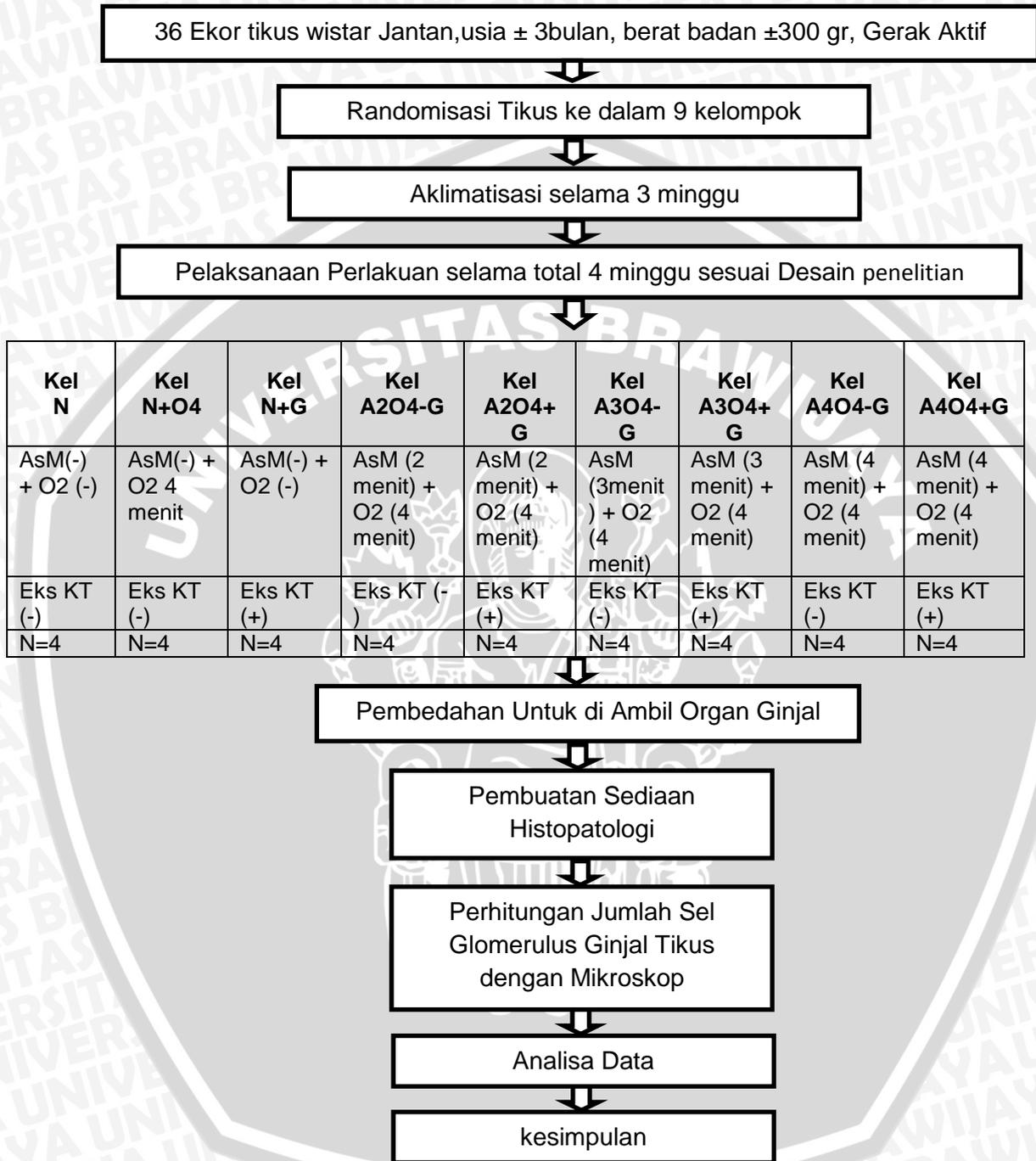
- a. Hewan coba tikus : yang digunakan adalah tikus puth galur Wistar (*Rattus novergivus*) jantan berumur lebih dari 8 minggu dengan berat badan 300-500 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB. Tikus yang sudah disiapkan dibagi menjadi 9 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Penelitian menggunakan tikus ini juga dimintakan sertifikat laik etik penelitian menggunakan hewan coba.
- b. Paparan asap kendaraan bermotor: pemaparan dengan menggunakan alat bantu mesin pembakar yang dapat menyalurkan asap hasil pembakaran bahan bakar mesin ke dalam kotak tempat tikus perlakuan.
- c. Ekstrak kacang tunggak : diperoleh dari kacang tunggak KT-6 yang telah melalui proses ekstraksi metode Maserasi yang hasilnya kemudian diluapkan dari pelarutnya (etanol 96 %) menggunakan rotary evaporator. Hasil yang didapat adalah ekstrak kasar kacang tunggak. Kacang tunggak yang dipakai adalah kacang tunggak KT-6 karena jenis kacang

tunggak yang tersedia di wilayah malang dan sekitarnya hanya kacang tunggak KT-6 (Balitkabi Malang, 2012)

- d. Glomerulus : Glomerulus berada di korteks ginjal. Glomerulus adalah sekumpulan kapiler yang terbentuk dari arterioler aferen dan dibatasi oleh kapsul glomerular (Bowman) dan ruang kapsular.
- e. Sel pada glomerulus : pada pewarnaan hematoksilin-eosin (HE), di dapatkan sel berinti satu, atau lebih, berwarna ungu di dalam glomerulus, yang terdapat dalam kapsula bowman. Sel tersebut dapat berupa sel radang, sel endotel, sel epitel dan mesangium (sel mesangial intraglomerular), tetapi tidak termasuk sel epitel parietal. Sel glomerulus dihitung pada 20 glomerulus tiap preparat kemudian di rata-rata (Budisavijevic et al., 2003). Jumlah sel glomerulus normal yaitu  $\pm 17$  (Culhaci, 2005).



#### 4.7 Alur Kerja



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan :

- AsM : Asap kendaraan bermotor
- Eks KT : Ekstrak Kacang Tunggak

## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Ekstraksi Kacang Tunggak

Untuk mendapatkan kandungan zat aktif genistein dalam kacang tunggak diperlukan suatu proses pengekstrakan. Dalam penelitian ini dilakukan dengan metode Maserasi. Cara kerjanya adalah sebagai berikut:

#### A. Proses pengeringan

1. Kacang tunggak (sample basah) dicuci bersih sebelum dikeringkan
2. Selanjutnya dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)

#### B. Proses Ekstraksi

1. Setelah kering, dihaluskan dengan blender sampai halus
2. Ditimbang sebanyak 100 gram (sample kering)
3. Dimasukkan 100 gram sample kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ±1L
4. Kemudian direndam dengan etanol sampai volume 900 mL
5. Dikocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit)
6. Didiamkan 1 malam sampai mengendap
7. Diambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).
8. Proses perendaman ini dilakukan sampai 3 kali.

#### C. Proses Evaporasi

1. Hasil dari proses ekstraksi dimasukkan dalam labu evaporasi
2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator
3. Water bath diisi dengan air sampai penuh
4. Semua rangkaian alat dipasang termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (diatur sampai 90°C atau sesuai dengan Titik Didih Pelarut), kemudian disambungkan dengan aliran listrik.

5. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
6. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetas pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk 1 labu)  $\pm 900$  ml.
7. Hasil yang diperoleh kira-kira  $\frac{1}{4}$  dari bahan kering.
8. Kemudian disimpan dalam freezer.

#### 4.8.2 Penentuan Dosis Ekstrak Kacang Tunggak

Perhitungan didasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak kacang tunggak yaitu:

$$=140.7 \text{ ppm}$$

$$=140.7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$=140.7 \text{ mg/1000ml}$$

Dalam penelitian ini dosis ekstrak bukan variabel bebas yang bisa diubah-ubah karena variabel bebas adalah lama waktu paparan terhadap asap kendaraan bermotor. Oleh karena itu, digunakan dosis tunggal dalam penelitian ini. Dosis efektif genistein yang dapat menimbulkan efek antioksidan ekstrak adalah 0,5 ml/kgBB. Hal ini didasarkan pada penelitian Christina dan Kintono (2010). Rata-rata berat badan tikus pada kelompok tikus bulan pertama adalah 370 gram.

Genistein yang diperlukan:

$$\frac{370}{1000} \text{ kg} \times 0.5 \text{ mg/kgBB} = 0.185 \text{ mg/tikus/hari}$$

Dosis kacang tunggak:

$$\frac{0.185}{140.7} \text{ mg} \times 1000 \text{ mg} = 1.3 \text{ mg/tikus/hari} \text{ Dijadikan } 2 \text{ ml} \rightarrow \text{ditambah air } 0.7 \text{ ml}$$

#### 4.8.3 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan yang ditempatkan pada suhu ruang 20-25°C, sekam yang diganti tiap 2 hari, tempat makan dan minum, serta makanan berbentuk pelet dengan kebutuhan perhari 50 gram/ekor. Tikus-tikus penelitian dibagi menjadi 9 kelompok yang masing - masing terdiri dari 5 ekor, yaitu kelompok normal kontrol negatif, N+O4, N+G, A2O4(+),G, A3O4(+),G, A4O4(+),G, A2O4(-),G, A3O4(-),G dan A4O4(-),G.

#### 4.8.4 Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak pada Tikus

Pemberian ekstrak kacang tunggak pada kelompok tikus yang akan diberi perlakuan dilakukan melalui alat sonde sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan secara per oral. Sonde dipasang pada ujung spuit kemudian dimasukkan ke dalam mulut tikus Wistar sehingga mencapai esophagus bahkan sampai lambung.

#### 4.8.5 Pemaparan Asap kendaraan bermotor

Pemaparan asap kendaraan bermotor dilakukan selama 4 minggu.

Cara pemaparan :

1. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca Ohaus sebelum pemaparan.
2. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap.
3. Peralatan yang akan digunakan untuk pemaparan diperiksa terlebih dahulu dan dipastikan dapat berfungsi dengan baik

4. Kelompok perlakuan paparan 2 menit, 3 menit dan 4 menit, sebelum dilakukan pemaparan tikus diberikan ekstrak kacang tunggak 30 menit sebelumnya.
5. Selanjutnya tiga ekor tikus (satu kelompok perlakuan) dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup. Dalam penelitian ini, satu kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 tahap pemaparan, masing - masing 3 ekor tikus.
6. Pemaparan asap kendaraan bermotor dilakukan dengan cara menyalakan mesin dan kran penyalur asap dan O<sub>2</sub> sesuai dengan waktu yang telah ditentukan untuk masing - masing kelompok perlakuan (hingga maksimal 4 menit)
7. Setelah itu mesin dan kran penyalur dimatikan, lalu tutup kotak dibuka dan tikus dipindahkan ke kandang semula.
8. Setiap pemaparan asap kendaraan bermotor berikutnya, kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap mesin sebelumnya.
9. Perlakuan ini berulang ulang untuk kelompok perlakuan berikutnya.

#### 4.8.6 Pengambilan Organ Ginjal Tikus

Dalam penelitian ini organ tikus yang akan diambil adalah ginjal, dimana akan dibuat sediaan histopatologinya untuk diamati dan dihitung jumlah sel glomerulusnya. Cara kerja pengambilannya adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba tikus dianastesi dengan cara dimasukkan ke dalam kotak yang di dalamnya berisi kapas yang telah dituangi eter.
2. Tikus dibiarkan lemas dan tidak bergerak lagi
3. Lalu dilakukan pembedahan dan diambil organ ginjalnya.

4. Ginjal yang telah diambil, diletakkan dalam tabung sementara dan difiksasi dengan formalin 10%.
5. Masing - masing tabung diberi identitas sesuai dengan kelompok perlakuan.
6. Organ ginjal selanjutnya siap untuk dibuat preparat histologi.

#### 4.8.7 Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal Tikus

Pembuatan sediaan histopatologi ginjal tikus dilakukan di Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Cara kerja pembuatan sediannya sebagai berikut:

1. Setelah direndam, jaringan ginjal didehidrasi dengan merendamnya pada alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu konsentrasi 30%, 50%, 70%, 95%, dan dua kali alkohol absolut. Semua perendaman pada fase dehidrasi ini dilakukan masing - masing 30 menit.
2. Setelah semua proses perendaman selesai, dilanjutkan dengan proses clearing, yaitu dengan merendam sediaan pada xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 jam.
3. Lalu dilakukan proses infiltrasi dengan parafin lunak pada suhu 42-46°C selama dua kali satu jam.
4. Dilakukan *blocking* dengan parafin keras pada suhu 46-52°C selama 1 jam.
5. Kemudian disliding pada mikrotom rotary dengan suhu 4-6 mm.
6. Dipanaskan dengan suhu 60°C.
7. Dilakukan deparafinasi dengan perendaman jaringan pada cairan xylol selama dua kali lima menit.

8. Selanjutnya dilakukan perendaman dalam alkohol bertingkat dengan ukuran konsentrasi terbalik mulai dari alkohol 95%, 85%, 75%, 50%, 30% dan terakhir dengan aquades selama 3 menit.
9. Terakhir dilakukan pewarnaan dengan HE sebagai berikut:
  - a. Pemberian HE 15 menit
  - b. Drendam pada alkohol asam selama 3-10 detik
  - c. Diberi cairan ammonium selama 3-10 detik
  - d. Pemberian *counter staining* selama 15-20 detik
  - e. Dehidrasi pada alkohol bertingkat (50%, 70%, 85%, 90%, dua kali alkohol bebas)
  - f. Pemberian xylol 5 menit
  - g. Dilakukan *mounting* menggunakan entellan
10. Sediaan sel diamati dengan mikroskop dan dibuat dokumentasi dengan kamera.

#### 4.8.8 Pemeriksaan Jumlah Sel pada Glomerulus

Perhitungan jumlah sel pada glomerulus dilakukan dengan menghitung jumlah sel dengan inti sel berwarna ungu, tanpa membedakan jenis sel tersebut, karena penelitian ini berfokus pada peningkatan jumlah sel pada glomerulus. Pengambilan gambaran glomerulus dilakukan menggunakan *software Olyvia* dengan pembesaran 400x mikroskop digital dot slide, pada setiap glomerulus dari masing-masing tikus sebanyak 20 glomerulus kemudian di rata-rata.

## 4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

### 4.9.1 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok tikus normal kontrol negatif, normal+O4, normal+G, A2O4(+G), A3O4(+G), A4O4(+G) A2O4(+G), A3O4(-)G dan A4O4(-)G. Setelah 1 bulan perlakuan dengan pemaparan asap kendaraan bermotor pada tikus wistar dengan dan tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak, maka dilakukan evaluasi berupa pengecatan, pengamatan, perhitungan, dan pencatatan hasil dari evaluasi.

### 4.9.2 Analisis Data

Hasil perhitungan sel glomerulus ginjal tikus control dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan bantuan software *SPSS 16.00 for Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal atau tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
2. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan

memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

3. Uji *One-way ANOVA* : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda secara signifikan.
4. Post hoc test (uji *Least Significant Difference*) : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji LSD dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ).
5. Uji korelasi Pearson : bertujuan untuk mengetahui kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala parametrik. Uji korelasi Pearson memiliki kriteria:

Nilai korelasi 0 : Tidak ada korelasi antar dua variabel

Nilai korelasi  $>0,0,25$  : Lemah

Nilai korelasi  $>0,25-0,5$  : Sedang

Nilai korelasi  $>0,5-0,99$  : Kuat

Nilai korelasi 1 : Sempurna

Korelasi dapat positif atau negatif. Korelasi negatif menunjukkan arah yang berbeda antar variabel sedangkan korelasi positif berarti menunjukkan arah yang berbanding lurus. Signifikansi hubungan dua variabel dapat dianalisis dengan ketentuan jika signifikansi  $<0,05$ , hubungan antar kedua variabel signifikan.

## BAB 5

### HASIL DAN ANALISA DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode Randomized post test controlled group design terhadap 36 ekor tikus yang terdiri dari 9 kelompok yaitu :

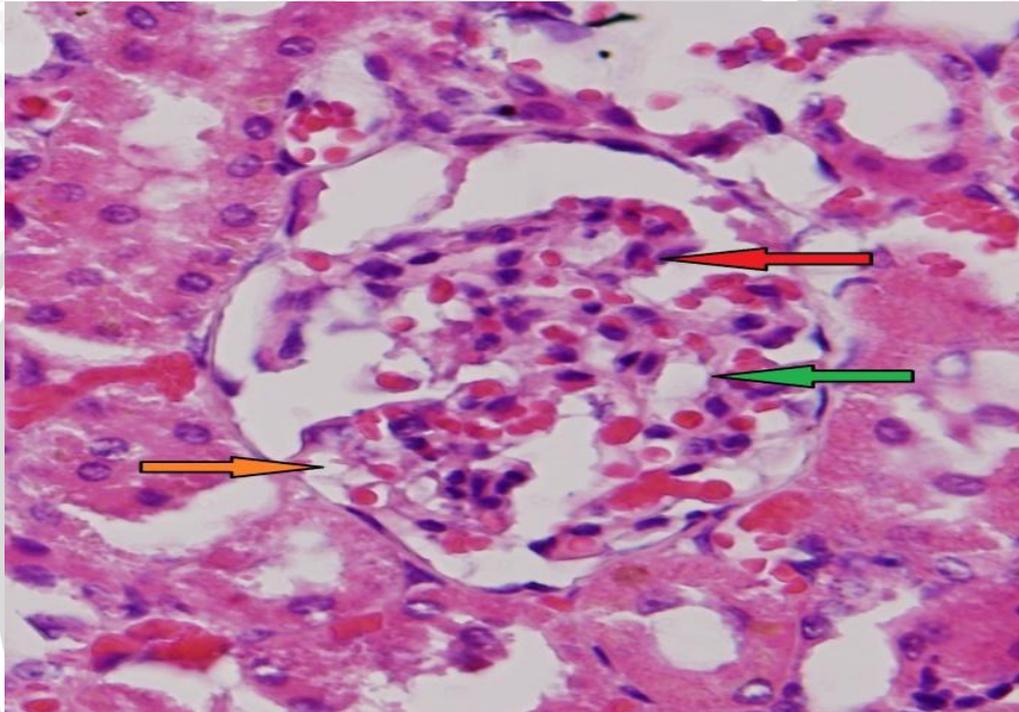
- Kelompok N : kelompok yang tidak dipapar asap kendaraan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak (kontrol negatif).
- Kelompok N+O4 : kelompok yang hanya diberi oksigen 4 menit.
- Kelompok N+G : kelompok yang tidak dipapar asap kendaraan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A2O4(-)G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A2O4(+)G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A3O4(-)G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak.
- Kelompok A3O4(+)G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.

- Kelompok A4O4(-)G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak
- Kelompok A4O4(+ )G : kelompok yang dipapar asap kendaraan selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak kacang tunggak.

Dosis ekstrak kacang tunggak yang diberikan kepada tikus setelah disesuaikan dengan berat rata-rata tikus yaitu 2ml ekstrak kacang tunggak yang telah diencerkan. Pemberian ekstrak kacang tunggak dilakukan sejak awal perlakuan, 30 menit sebelum dilakukan pengasapan setiap harinya. Dalam penelitian ini oksigen juga diberikan dengan tujuan untuk mengatasi keadaan hipoksia akibat paparan asap kendaraan bermotor. Untuk melihat adakah pengaruh langsung terhadap peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus, maka dilakukan pemaparan dengan oksigen murni saja pada kelompok normal+O4.

Setelah 30 hari perlakuan, dilakukan pembedahan dan pengambilan organ ginjal tikus pada seluruh sampel. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap struktur histopatologi glomerulus ginjal dengan menggunakan *software Olyvia* dengan pembesaran 400x pada mikroskop digital dot slide. Hasil pengamatan diperoleh data kuantitatif yaitu dengan cara menghitung jumlah sel yang terdapat dalam glomerulus tanpa membedakan jenis selnya (baik berupa sel podosit, sel endotel, sel mesangial, maupun infiltrasi sel inflamasi).

Gambaran histopatologi dari masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada gambar 5.1, gambar 5.2, gambar 5.3, gambar 5.4, gambar 5.5, gambar 5.6, gambar 5.7, gambar 5.8 dan gambar 5.9

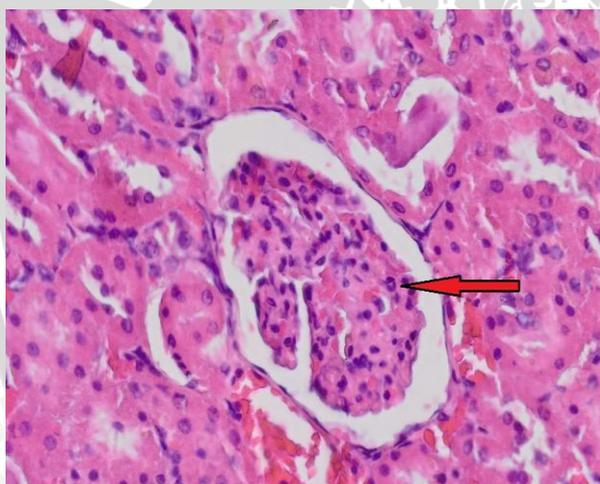
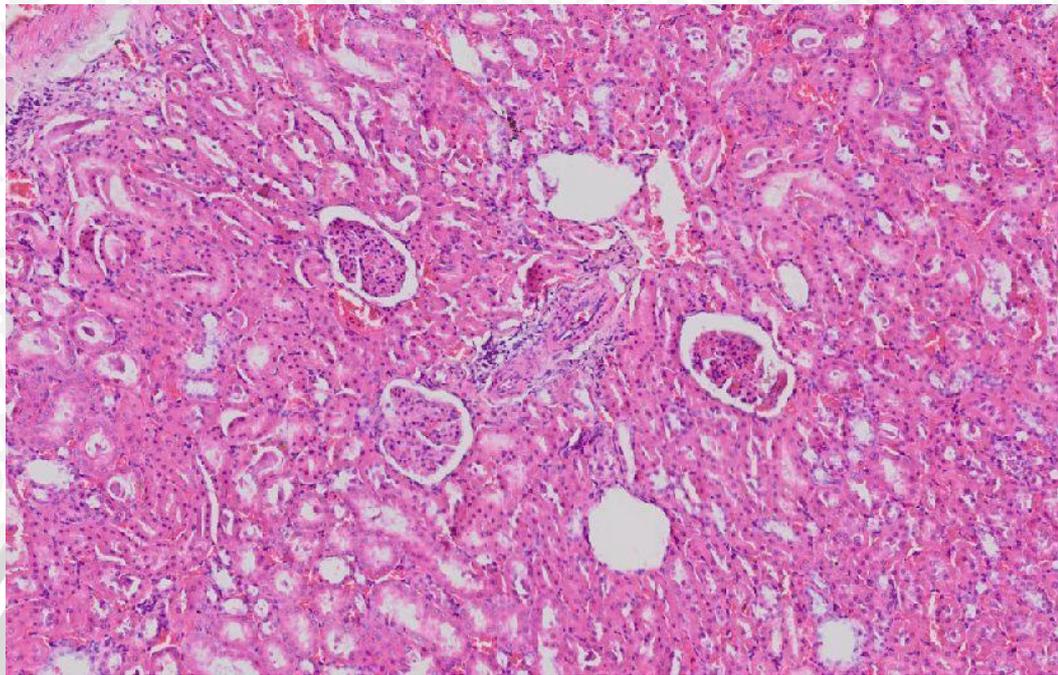


**Gambar 5.1 Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N (Kontrol Negatif) dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x**

Keterangan:

-  : Sel Glomerulus
-  : Lumen Kapiler
-  : *Capillary Tuft*

Pada kelompok N, sel-sel glomerulus tampak jelas seperti pada gambar 5.1. Selain itu, *capillary tuft* dan lumen kapiler glomerulus juga tampak. Rata-rata jumlah sel dalam glomerulus kelompok ini 43.74



**Gambar 5.2** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N+O4 dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

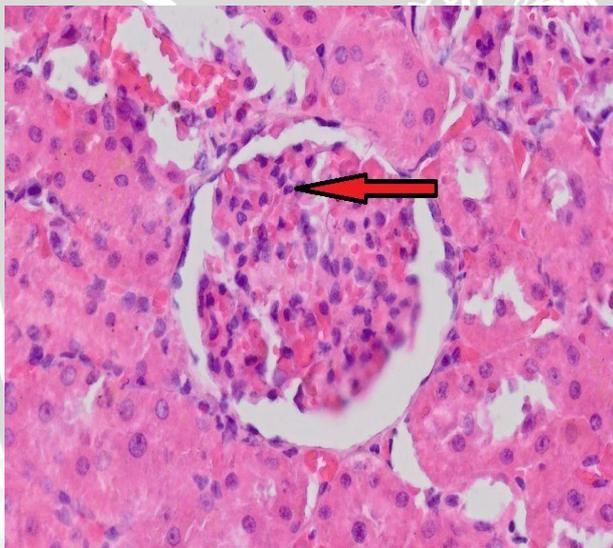
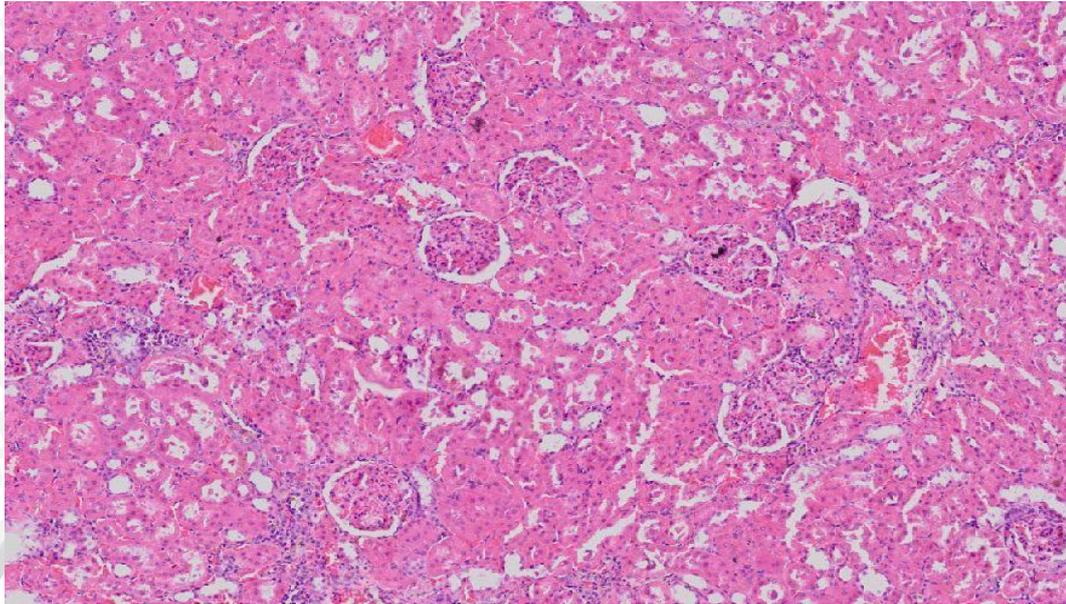
Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Pada kelompok N+O4, sel-sel glomerulus tampak jelas seperti pada gambar 5.2. Rata-rata jumlah sel dalam glomerulus kelompok ini  $51.43 \pm 8.23$ .

Jumlah ini lebih tinggi dibandingkan dengan normal kontrol negatif.



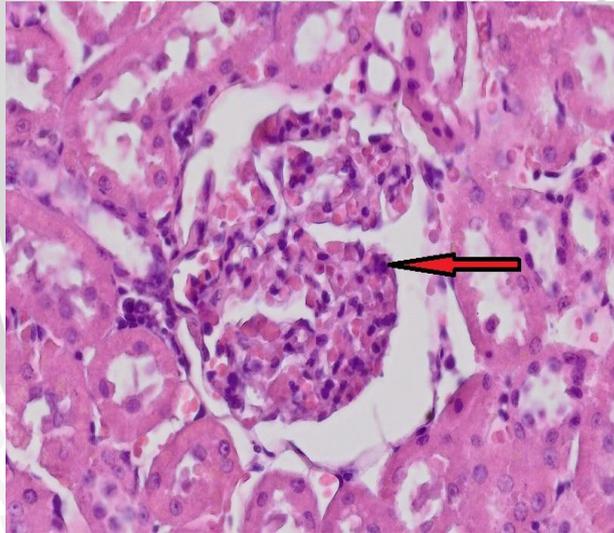
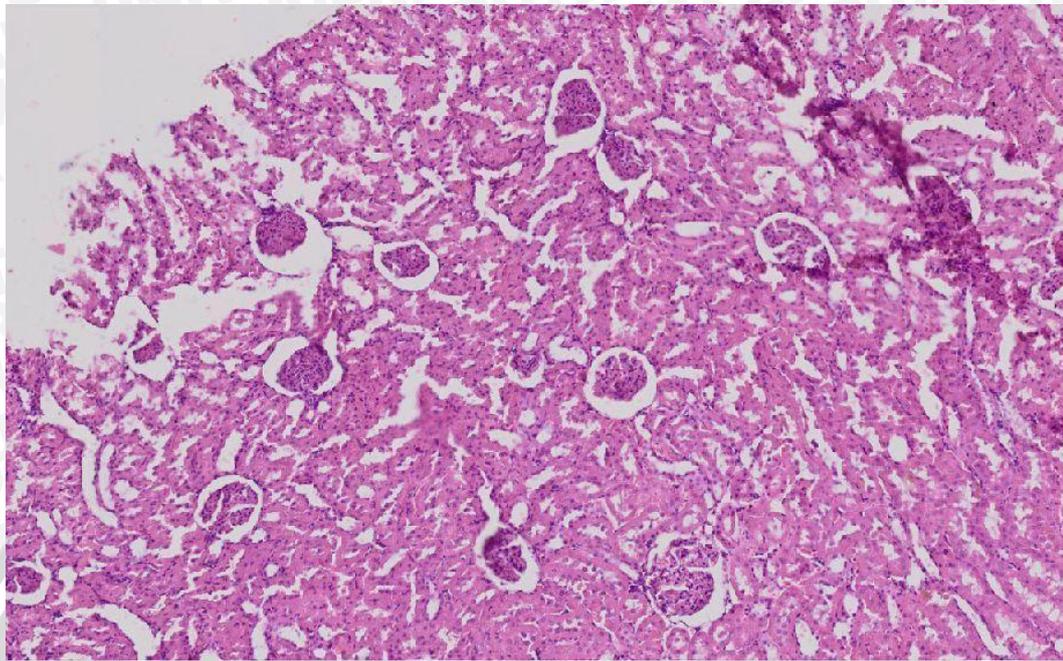


**Gambar 5.3** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok N+ G dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Pada kelompok N+G, gambaran sel glomerulus nampak jelas dan memiliki rata-rata jumlah sel dalam glomerulus sebanyak  $48.74 \pm 8.78$ . Jumlah rata-rata sel glomerulus pada kelompok ini tidak terlalu berbeda jauh dibanding normal kontrol negatif.

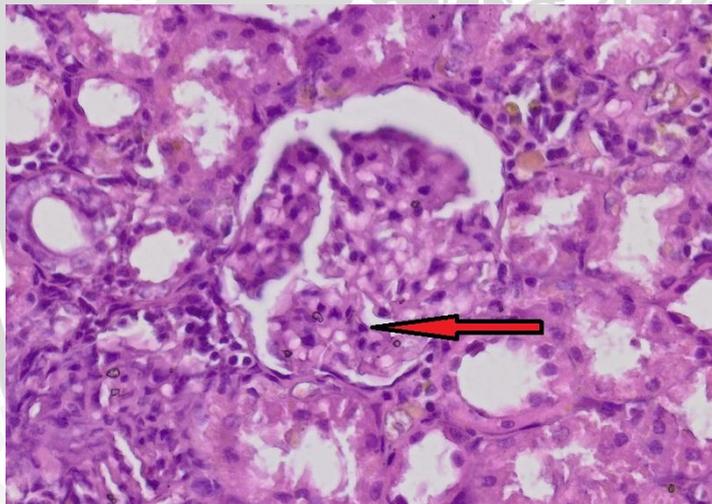
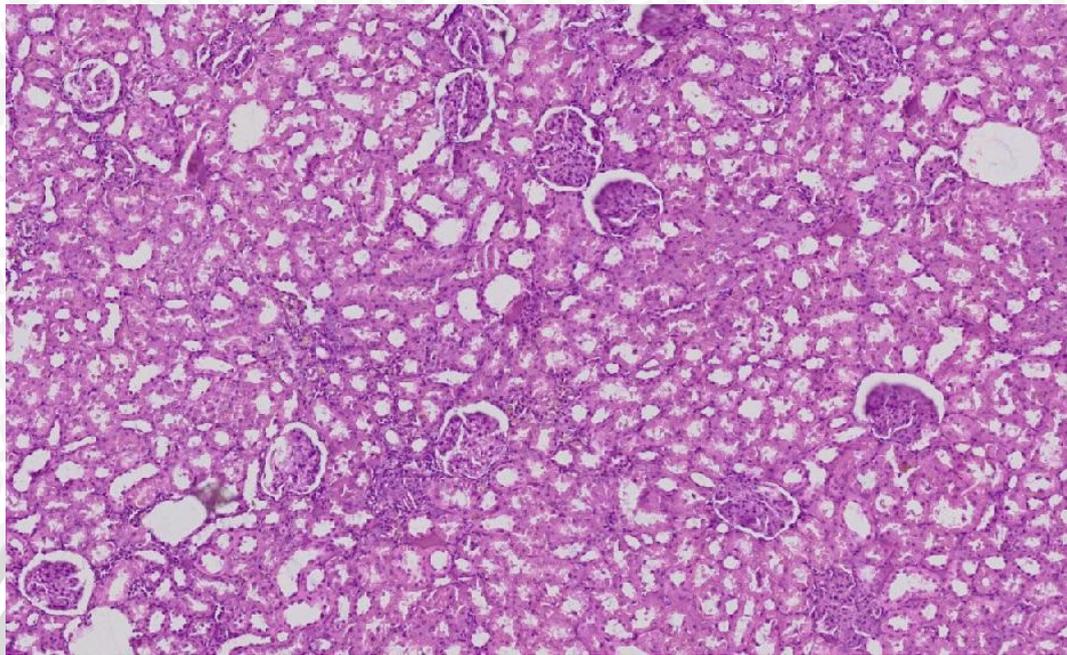


**Gambar 5.4** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A2O4(-)G dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambaran mikroskopis kelompok A2O4(-)G yang dipapar asap kendaraan selama 2 menit + oksigen 4 menit yaitu sel-sel terlihat padat dan secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus meningkat menjadi 81.53.



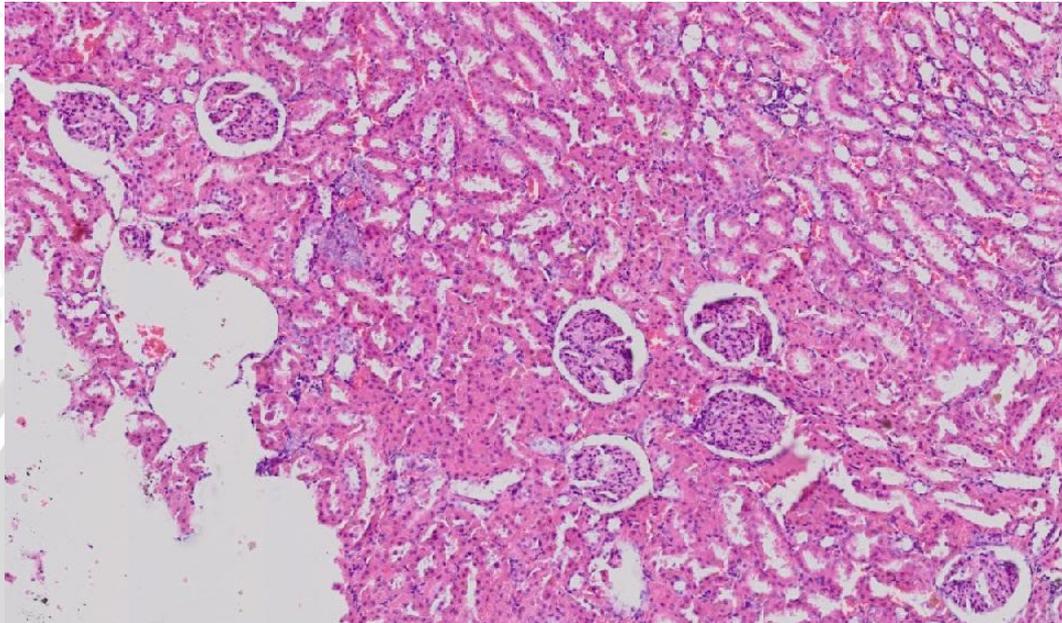
**Gambar 5.5** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A2O4(+)**G** dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambaran mikroskopis kelompok A2O4(+)**G** yang dipapar asap kendaraan selama 2 menit + oksigen 4 menit dan diberi ekstrak kacang tunggak

masih terlihat padat seperti kelompok A2O4(-)G namun secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus menurun menjadi 57.93.

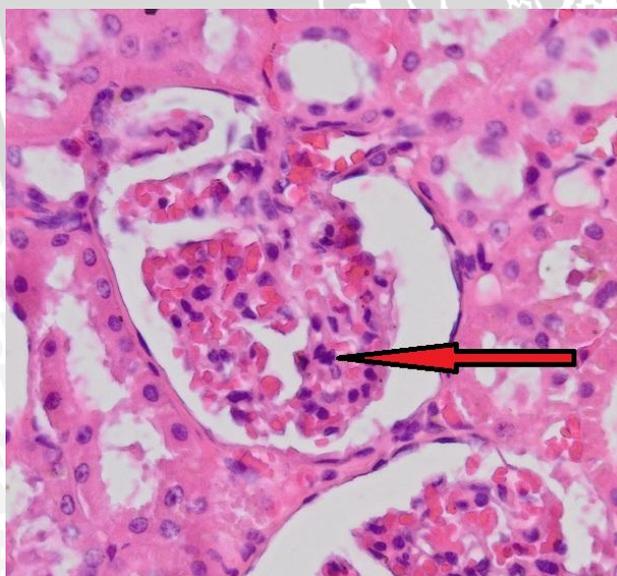
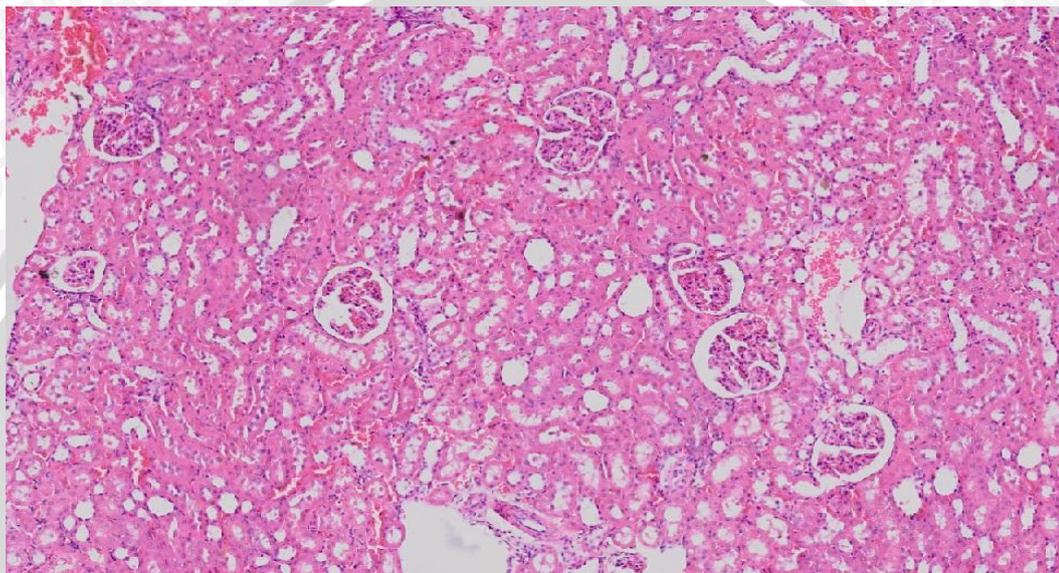


**Gambar 5.6** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A3O4(-)G dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambaran mikroskopis kelompok A3O4(-)G yang dipapar asap kendaraan selama 3 menit + oksigen 4 menit terlihat peningkatan kepadatan sel-sel glomerulus. *Capillary tuft* dan lumen kapiler tidak terlihat jelas dan secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus meningkat menjadi 86.40.

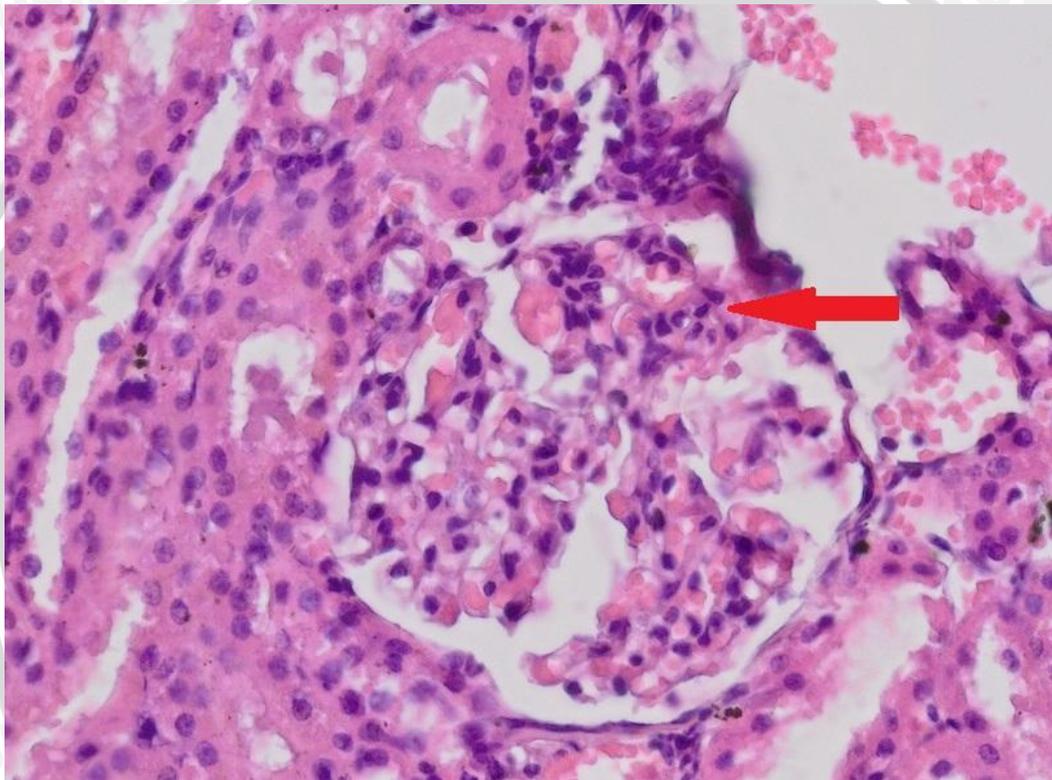


**Gambar 5.7 Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A3O4(+)<sub>G</sub> dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x**

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambar 5.7 memperlihatkan gambaran mikroskopis kelompok A3O4(+)<sub>G</sub> yang dipapar asap kendaraan selama 3 menit + oksigen 4 menit dan diberi ekstrak kacang tunggak. Terlihat penurunan kepadatan sel-sel glomerulus dibandingkan kelompok A3O4(-)<sub>G</sub>. Secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus meningkat menjadi 63.13.

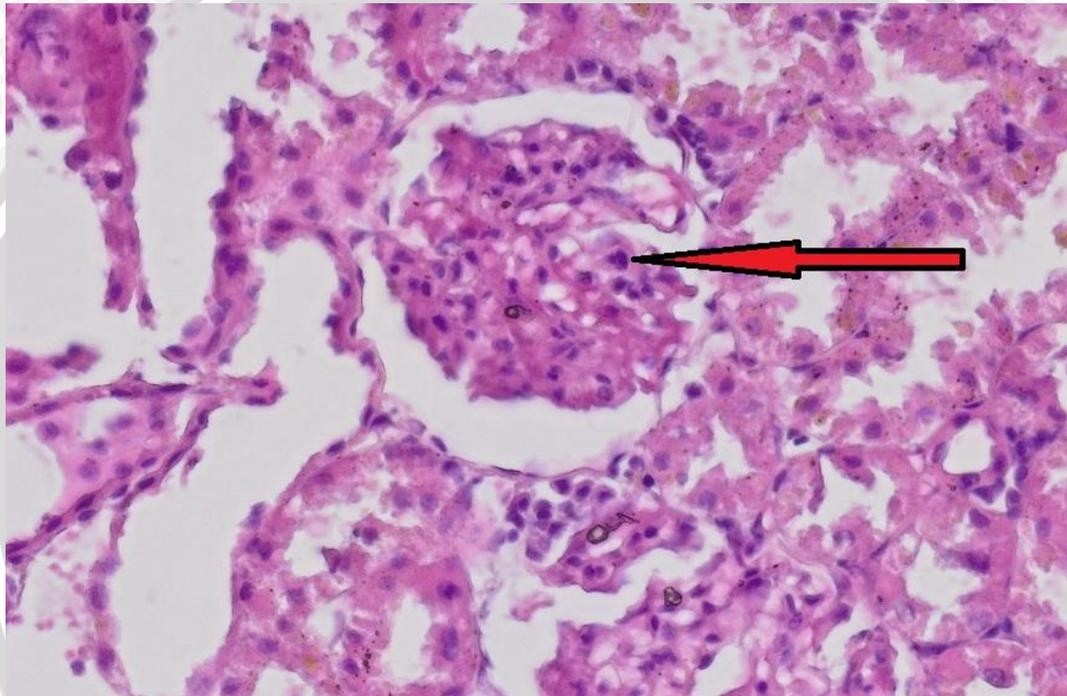


**Gambar 5.8 Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A4O4(-)<sub>G</sub> dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x**

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambar 5.8 memperlihatkan gambaran mikroskopis kelompok A4O4(-)<sub>G</sub> yang dipapar asap kendaraan selama 4 menit + oksigen 4 menit. Terlihat sel-sel glomerulus sangat padat dibandingkan kelompok perlakuan yang lain. Secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus meningkat menjadi 94.21.



**Gambar 5.9** Gambaran Mikroskopis Glomerulus Tikus Kelompok A4O4(+)  
dengan pengecatan HE dan perbesaran mikroskop 400x

Keterangan:

 : Sel Glomerulus

Gambar 5.8 memperlihatkan gambaran mikroskopis kelompok A4O4(+)  
yang dipapar asap kendaraan selama 4 menit + oksigen 4 menit dan diberi  
ekstrak kacang tunggak. Terlihat sel-sel glomerulus menurun dibandingkan  
kelompok A4O4(-)G. Secara kuantitatif rata-rata jumlah sel glomerulus  
meningkat menjadi 77.67.

Penghitungan jumlah sel glomerulus dilakukan dengan menggunakan *software Olyvia* dengan pembesaran 400x pada mikroskop digital dot slide pada slide ginjal tikus yang diwarnai dengan *Hematoxylin-Eosin ( HE )*, sebanyak 20 glomerulus setiap satu tikus. Penghitungan ini dimaksudkan untuk melihat aktivitas sel glomerulus apakah terjadi hiperselularitas akibat adanya proses *oxidative injury* pada glomerulus yang berasal dari radikal bebas dengan paparan asap kendaraan bermotor.

Dari hasil perhitungan masing-masing kelompok didapatkan hasil rata-rata jumlah sel dalam glomerulus pada tiap kelompok tikus yang disajikan dalam tabel

5.1

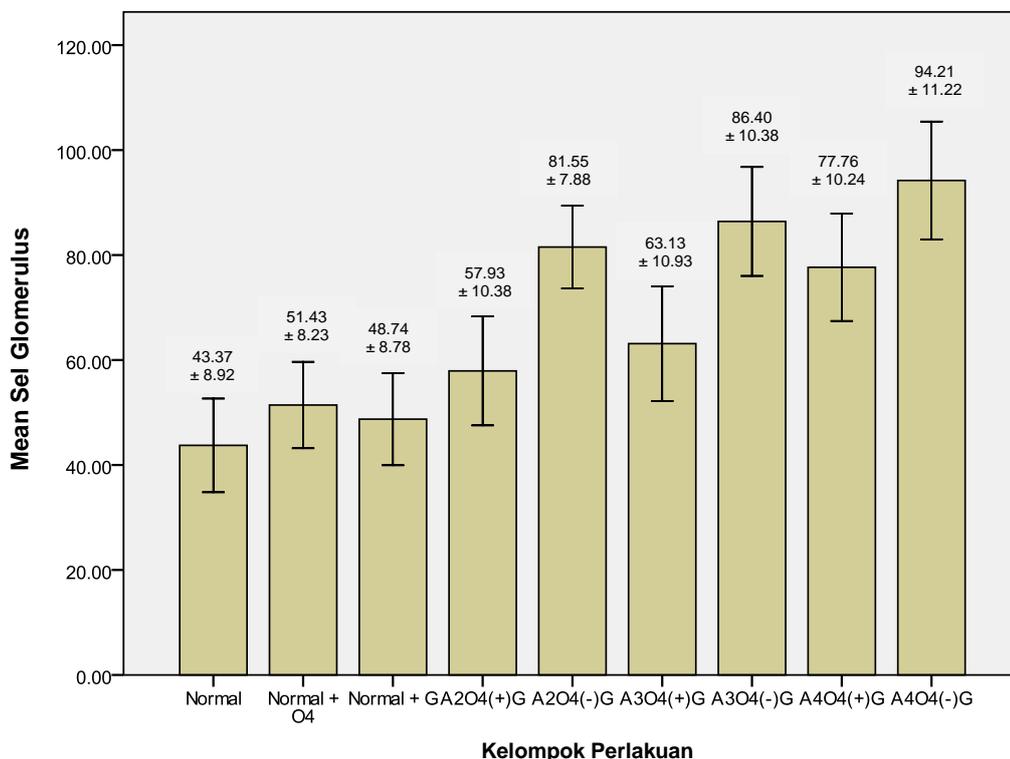


**Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Jumlah Sel Glomerulus**

Kelompok	Rata-rata Jumlah Sel Glomerulus dari 20 Lapangan Pandang				Mean ± Standar
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Deviasi
N	45.5	41.85	44.25	43.35	43.74 ± 8.92
N+O <sub>4</sub>	53.3	51.6	50.7	50.1	51.43 ± 8.23
N+G	50.95	49.1	49.05	45.85	48.74 ± 8.78
A <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (-)G	82.5	80.85	81.95	80.8	81.53 ± 7.88
A <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (+)G	59.65	58.95	58.5	54.6	57.93 ± 10.38
A <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (-)G	86.15	87.2	86.8	85.45	86.40 ± 10.38
A <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (+)G	68.2	60.25	62.4	61.65	63.13 ± 10.93
A <sub>4</sub> O <sub>4</sub> (-)G	91.85	97.6	91.9	95.5	94.21 ± 11.22
A <sub>4</sub> O <sub>4</sub> (+)G	82.85	78.15	77	72.7	77.67 ± 10.24

**Keterangan:**

- N = Tidak dipapar asap kendaraan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak
- N+O<sub>4</sub> = Oksigen 4 menit
- N+G = Ekstrak Kacang Tunggak
- A<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit
- A<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak
- A<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 3 menit + oksigen 4 menit
- A<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 3 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak
- A<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 4 menit + oksigen 4 menit
- A<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak



**Gambar 5.10 Diagram Batang Rata-Rata**

Keterangan:

- N = Tidak dipapar asap kendaraan dan tidak diberi ekstrak kacang tunggak
- N+O<sub>4</sub> = Oksigen 4 menit
- N+G = Ekstrak Kacang Tunggak
- A2O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit
- A2O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak
- A3O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 3 menit + oksigen 4 menit
- A3O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 3 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak
- A4O<sub>4</sub> (+) G = Asap Kendaraan 4 menit + oksigen 4 menit
- A4O<sub>4</sub> (-) G = Asap Kendaraan 2 menit + oksigen 4 menit + Ekstrak Kacang Tunggak

## 5.2 Analisa Data

Proses analisa data dan pengolahan data dilakukan dengan program SPSS 16.0 for Windows. Analisa data jumlah sel glomerulus tikus wistar

menggunakan uji korelasi *One Way ANOVA*, karena pada penelitian ini skala pengukuran variabel yang digunakan adalah numerik dengan lebih dari 2 kelompok yang tidak berpasangan. Syarat dilakukannya uji ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan adalah sebaran data harus normal dan varians data harus sama (Dahlan, 2004). Pada uji normalitas didapatkan hasil yaitu distribusi normal.

Pada hasil uji homogenitas varian pada berbagai waktu pengamatan dengan menggunakan metode *Levene*, didapatkan  $p = 0,069$  ( $p > 0,05$ ), maka hipotesis  $H_0$  diterima yaitu bahwa variabel yang diamati memiliki ragam konstan (homogen) dengan peluang melakukan kesalahan sebesar 5%.

Pada uji *One Way ANOVA* dihasilkan nilai signifikansi lebih kecil dari alpha 5% yaitu  $p = 0,000$  (table 5.2) maka hipotesis  $H_0$  ditolak dan dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah sel glomerulus pada berbagai perlakuan yang diamati.

**Tabel 5.2 Hasil analisa dengan *One Way ANOVA***

ANOVA					
Jumlah Sel Glomerulus					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	212486.475	8	26560.809	280.493	.000
Within Groups	67326.912	711	94.693		
Total	279813.388	719			

Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan dilakukan analisa *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*). Pada *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*) dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan apabila nilai  $p < 0,05$ . Hasil *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*) ditampilkan pada tabel berikut :

**Tabel 5.3 Hasil *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*)**

Nilai p	N	N+O4	N+G	A2O4 (-)G	A2O4 (+)G	A3O4 (-)G	A3O4 (+)G	A4O4 (-)G	A4O4 (+)G
N	-	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
N+O4	0,000	-	0,081	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
N+G	0,001	0,081	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A2O4(-)G	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,002	0,000	0,000	0,013
A2O4(+)G	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,001	0,000	0,000
A3O4(-)G	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	-	0,000	0,000	0,000
A3O4(+)G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	-	0,000	0,000
A4O4(-)G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000
A4O4(+)G	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	-

Keterangan :

- N = Normal (kontrol negatif).
- N+O4 = oksigen 4 menit.
- N+G = ekstrak kacang tunggak.
- A2O4(-)G = asap 2 menit + oksigen 4 menit.
- A2O4(+)G = asap 2 menit + oksigen 4 menit + ekstrak kacang tunggak.
- A3O4(-)G = asap 3 menit + oksigen 4 menit
- A3O4(+)G = asap 3 menit + oksigen 4 menit + ekstrak kacang tunggak.
- A4O4(-)G = asap 4 menit + oksigen 4 menit
- A4O4(+)G = asap 4 menit + oksigen 4 menit + ekstrak kacang tunggak.
- Nilai  $p < 0,05$  = terdapat perbedaan yang signifikan antara dua kelompok
- Nilai  $p > 0,05$  = tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara dua kelompok

Pada hasil uji *Post-hoc* jumlah sel glomerulus didapatkan bahwa:

- Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok normal (Kontrol negatif) dengan kelompok perlakuan asap 2 menit + oksigen 4 menit ( $p=0.000$ ), kelompok perlakuan asap 3 menit + oksigen 4 menit ( $p=0.000$ ) dan kelompok perlakuan asap 4 menit + oksigen 4 menit ( $p=0.000$ ).
- Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan asap 2 menit + oksigen 4 menit dengan kelompok perlakuan asap 2 menit + oksigen 2 menit + ekstrak kacang tunggak ( $p=0.000$ ).
- Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan asap 3 menit + oksigen 4 menit dengan kelompok perlakuan asap 3 menit + oksigen 4 menit + ekstrak kacang tunggak ( $p=0.000$ ).
- Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan asap 4 menit + oksigen 4 menit dengan kelompok perlakuan asap 4 menit + oksigen 4 menit + ekstrak kacang tunggak ( $p=0.000$ ).
- Kelompok normal + oksigen 4 menit tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok normal + ekstrak kacang tunggak ( $p=0.081$ ).

Setelah melakukan uji *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*) diantara sampel, selanjutnya dilakukan uji korelasi untuk mengetahui kekuatan hubungan antara perbedaan lama paparan dengan jumlah sel glomerulus ginjal tikus. Uji korelasi yang digunakan adalah metode Pearson.

Tabel 5.4 Uji Korelasi Pearson

		Correlations	
		Sel	Paparan
Sel	Pearson	1	.464**
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	240	240
Paparan	Pearson	.464**	1
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	240	240

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Hasil dari perhitungan korelasi Pearson terhadap data penelitian adalah sebagai berikut:

1. Korelasi ( $r$ ) = 0,464, berdasarkan hasil korelasi tersebut terdapat korelasi yang sedang antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar.
2. Arah korelasi positif sehingga semakin lama paparan asap kendaraan bermotor maka proses proliferasi sel menjadi lebih tinggi sehingga jumlah sel glomerulus semakin meningkat.
3. Nilai  $P$  = 0,000, dengan demikian terdapat korelasi yang signifikan antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kacang tunggak yang mengandung zat antioksidan dalam mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap kendaraan bermotor pada berbagai lama paparan sebagai pemicu terjadinya radikal bebas. Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah sel glomerulus ginjal tikus. Jumlah sel glomerulus ginjal tikus dijadikan sebagai parameter untuk mengetahui efek antioksidan yang terkandung dalam ekstrak kacang tunggak terhadap aktivitas radikal bebas dalam asap kendaraan bermotor yang terinhalasi pada berbagai kadar tertentu. Radikal bebas dalam beberapa teori mengenai penyakit di glomerulus dipercaya sebagai salah satu penyebab terjadinya jejas di glomerulus (Gwinner *et al.*, 1998).

Dalam penelitian ini, hewan coba tikus kelompok perlakuan diberi paparan asap kendaraan bermotor selama 4 minggu sebagai induksi proses jejas glomerulus akibat radikal bebas. Radikal bebas tersebut bersifat sebagai oksidan yang masuk ke tubuh tikus melalui saluran pernapasan yang kemudian menembus membran kapiler alveoli menuju ke sistemik dan diekskresikan melalui ginjal. Maka ginjal diambil untuk dihitung jumlah sel glomerulusnya oleh karena ginjal merupakan tempat berlangsungnya ekskresi. Selanjutnya beberapa kelompok dengan lama paparan yang berbeda juga diberi ekstrak kacang tunggak dengan dosis yang sama sebelum pengasapan untuk mengetahui efek ekstrak kacang tunggak dalam mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus pada berbagai kadar asap yang berbeda. Dosis ekstrak kacang tunggak yang diberikan berdasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak

kacang tunggak sebagai antioksidan kuat. Pada penelitian sebelumnya oleh Christina (2010) dan Kintono (2010) yang juga meneliti efek ekstrak kacang tunggak dalam meningkatkan kadar SOD dan menurunkan MDA serum tikus yang diovarektomi, dosis efektif yang diteliti adalah 0,5 mg/kgBB. Oleh karena itu, pemberian ekstrak kacang tunggak pada penelitian ini dihitung berdasarkan dosis efektif penelitian sebelumnya dan kandungan genistein dalam ekstrak yang sekarang digunakan.

#### **6.1 Pengaruh Paparan Asap Kendaraan Bermotor terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar**

Pada preparat histologi ginjal tikus dengan pengecatan HE dan pembesaran 400x didapatkan hasil penghitungan rata-rata glomerulus yang menunjukkan kelompok kontrol negatif memiliki jumlah sel glomerulus sebesar  $43.74 \pm 8.92$ , jumlah lebih sedikit dibandingkan dengan dengan kelompok perlakuan yang lain terutama kelompok perlakuan asap 2 menit, 3 menit dan 4 menit. Kelompok paparan asap kendaraan selama 2 menit tanpa diberi ekstrak kacang tunggak memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus sebesar  $81.53 \pm 7.88$ . Kelompok paparan asap kendaraan selama 3 menit tanpa diberi ekstrak kacang tunggak memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus  $86.40 \pm 10.38$ . Kelompok paparan asap kendaraan selama 4 menit tanpa diberi ekstrak kacang tunggak memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus  $94.21 \pm 11.22$ .

Keadaan ini diduga disebabkan oleh komponen asap kendaraan bermotor berupa gas karbon monoksida (CO), sulfur (SO<sub>x</sub>), senyawa nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>) dan senyawa hidro karbon (CH) (Asyabatina, 2011). Komponen asap kendaraan bermotor tersebut dapat dengan mudah terdeposit dalam unit terkecil

saluran napas (alveoli) bahkan dapat masuk ke sirkulasi darah (sistemik) yang pada akhirnya menimbulkan aktivitas radikal bebas pada sel-sel glomerulus ginjal (Tornqvst *et al.*, 2007).

Karbon monoksida (CO) akan membentuk ikatan karboksihemoglobin, sehingga menghambat distribusi oksigen ke jaringan tubuh, maka organ-organ dengan kebutuhan oksigen paling banyak seperti ginjal akan sangat sensitif terhadap keracunan CO (Anggraeni, 2009). Sulfur oksida merupakan gas reaktif yang cepat larut dalam lapisan epitel dan akan cenderung melukai sel epitel. Setelah SO<sub>2</sub> mampu melewati membran mukosa saluran napas, SO<sub>2</sub> lalu di distribusikan ke dalam darah akibat ikatan SO<sub>2</sub> dengan fraksi alpha-globulin plasma (Petruzzi *et al.*, 1994). Transporter sulfat yaitu NaSi-1 co-transporter dan sulphate-bicarbonate anion exchanger (Sat-1) di ginjal yang bertanggung jawab terhadap keluar dan masuknya sulfat di ginjal. Sulfat akan di filtrasi di glomerulus ginjal dan di reabsorpsi di tubulus ginjal (Silve, 2000). iNOx dalam bentuk NO akan berikatan dengan Oxy-Hb (Oxy-haemoglobin) karena afinitas NO terhadap Hb 1500 kali lebih besar dibanding CO, sedangkan iNOx dalam bentuk NO<sub>2</sub> dan NO<sub>3</sub> akan berikatan dengan hemoglobin membentuk SNO-Hb (S-nitrosyl-hemoglobin) yang kemudian akan teroksidasi oleh oksigen bebas di pembuluh darah. Kedua reaksi tersebut akan menghasilkan Met-Hb (Methaemoglobin) dan nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) yang akan di ekskresikan ke ginjal (Hayward *et al.*, 1999).

Keberadaan ROS dari komposisi asap kendaraan bermotor yang terlalu berlebihan dalam tubuh dapat menimbulkan berbagai keadaan patologi termasuk glomerular injury dan proses inflamasi, jumlah neurofil dan makrofag semakin meningkat dan terjadi peningkatan mediator inflamasi (McMahon and Allan, 2006). Stres oksidatif timbul karena pembentukan langsung ROS dari permukaan

partikel, senyawa *soluble* seperti logam transisi atau senyawa organik yang mengubah fungsi mitokondria atau NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) dan aktivasi sel inflamasi yang mampu menghasilkan *reactive Oxygen Species* (ROS) dan *reactive nitrogen spesies* (RNS). Sifat kereaktifan radikal bebas dapat menyebabkan perubahan kimiawi dan merusak komponen sel hidup seperti protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat (Suryana, 2004).

Paparan asap kendaraan bermotor secara berulang akan meningkatkan jumlah radikal bebas eksogen didalam tubuh, sedangkan jumlah antioksidan yang ada di dalam tubuh tidak dapat mengimbangnya sehingga terjadi stress oksidatif yang berakibat pada kerusakan sel. Glomerulus merupakan salah satu target utama dari radikal bebas (Gwinner *et al.*, 1998). Stres oksidatif mengakibatkan perubahan densitas glomerulus, diantaranya hiperselularitas dan peningkatan matriks mesangial. Hiperselularitas sel glomerulus salah satunya adalah proliferasi sel-sel glomerulus (Taylor and Chandrasoma, 1995 ; Cotran *et al.*, 1999). Peningkatan matriks mesangial diperantarai oleh mediator inflamasi TGF-1 (*Transforming Growth Factor-1*) di glomerulus yang menstimulasi proliferasi sel mesangial sehingga memicu ekspansi matriks mesangial. Radikal bebas yang terakumulasi di glomerulus akan mengaktivasi MAP-k (*Mitogen Activated Protein-Kinase*) dan NF-Kb (*Nuklear factor-kappa B*). Bila terjadi aktivasi maka akan terjadi translokasi di nukleus, yang akan menekan apoptosis serta menginduksi transformasi sel, proliferasi dan inflamasi (Hartono, 2009).

Untuk kelompok normal (+) O<sub>2</sub>, didapatkan rata-rata jumlah sel glomerulus ginjal tikus sebanyak 51.43 ± 8.23. Pada kelompok ini tikus hanya mendapat paparan oksigen murni 10mmHg selama 4 menit sesuai dengan lama perlakuan

dari kelompok lainnya. Bila dibandingkan dengan kelompok normal kontrol (-), maka jumlah sel glomerulus ginjal tikus pada kelompok normal (+) O<sub>2</sub> lebih tinggi namun berdasarkan uji *Post Hoc* perbandingan jumlah sel glomerulus ginjal tikus pada kedua kelompok tidak signifikan. Hal ini berarti O<sub>2</sub> yang diberikan pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh langsung terhadap peningkatan sel glomerulus ginjal tikus.

Oksigen merupakan faktor penting sebagai sumber energi tubuh, namun oksigen juga dapat memiliki sifat radikal bebas yang merusak tubuh. Dwipayana, et.al, (2010) dalam penelitiannya mengatakan bahwa pemberian oksigen murni dapat meningkatkan kadar oksigen terlarut dalam plasma dan tekanan parsial oksigen pada jaringan sehingga dapat mengatasi efek hipoksia pada daerah luka dan memperbaiki kualitas jaringan baru. Namun pemberian oksigen secara terus menerus dapat meningkatkan kadar senyawa radikal bebas yang justru akan merusak jaringan dan menyebabkan nekrosis jaringan. Dalam penelitian ini, oksigen yang diberikan memiliki tujuan untuk mengatasi keadaan hipoksia akibat paparan asap kendaraan bermotor. Untuk melihat adakah pengaruh langsung terhadap peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus, maka dilakukan pemaparan dengan oksigen murni saja pada kelompok normal (+) O<sub>2</sub>. Pada kelompok ini terlihat bahwa, jumlah sel glomerulus ginjal tikus lebih tinggi dibandingkan kelompok normal kontrol (-). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian oksigen murni 10mmHg belum mencapai batas minimum untuk menjadi bersifat radikal bebas. Pada penelitian lain disebutkan bahwa oksigen dapat meracuni tubuh apabila tekanan oksigen mencapai 1 bar atau setara dengan 750 mmHg (Kusno, 2011).

## 6.2 Pengaruh Lama Paparan terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar, diketahui terdapat peningkatan jumlah sel glomerulus dimana semakin lama waktu paparan maka semakin tinggi rata-rata jumlah sel glomerulus. Kelompok paparan asap kendaraan selama 2 menit memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus sebesar  $81.53 \pm 7.88$ . Kelompok paparan asap kendaraan selama 3 menit memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus  $86.40 \pm 10.38$ . Kelompok paparan asap kendaraan selama 4 menit memiliki jumlah rata-rata sel glomerulus  $94.21 \pm 11.22$ . Sedangkan untuk kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kacang tunggak, paparan 2 menit memiliki rata-rata sel glomerulus  $57.93 \pm 10.38$ , paparan 3 menit memiliki rata-rata sel glomerulus  $63.13 \pm 10.93$  dan paparan 4 menit memiliki rata-rata sel glomerulus  $77.67 \pm 10.24$ .

Pada uji korelasi pearson didapatkan hasil korelasi bernilai positif yang kuat antara lama paparan dengan jumlah sel glomerulus ginjal tikus dengan ( $r = 0,464$ ). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan lama paparan asap kendaraan bermotor menyebabkan peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus secara signifikan. Menurut AHA tingkat mortalitas akibat paparan meningkat sebanding dengan lama paparan (Brook *et al*, 2010). Lama paparan merupakan faktor resiko terhadap kadar ROS yang beredar di sirkulasi. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Anggraeni (2009) bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap peningkatan lama paparan asap kendaraan oleh karena semakin lama paparan berlangsung maka semakin besar konsentrasi radikal bebas dalam udara yang terhirup. Hal ini membuktikan

bahwa tikus yang terpapar asap kendaraan bermotor lebih lama dapat mengalami peningkatan jumlah sel glomerulus secara signifikan.

### **6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Jumlah Sel Glomerulus Ginjal Tikus Wistar**

Berdasarkan hasil uji analisis *Post Hoc* LSD diketahui terdapat perbedaan jumlah sel glomerulus yang signifikan antara kelompok perlakuan A2O4(-)G, A3O4(-)G dan A4O4(-)G dibandingkan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kacang tunggak yaitu A2O4(+)G, A3O4(+)G dan A4O4(+)G dengan nilai ( $p < 0.05$ ). Dengan demikian dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kacang tunggak yang mengandung genistein pada tikus wistar bersamaan dengan paparan asap kendaraan bermotor mampu menghambat kerusakan ginjal dan peningkatan jumlah sel glomerulus (hiperselularitas).

Genistein yang dikandung kacang tunggak diduga mampu berperan sebagai antioksidan yang menghambat peningkatan jumlah sel glomerulus. Genistein menurunkan ROS melalui regulasi eNOS serta menekan ekspresi ROS-producing enzymes, genistein juga dapat secara tidak langsung menekan aktivasi NF- $\kappa$ B yang diinduksi oleh ROS dan meningkatkan kadar *glutathion* (GSH) (Wassmann *et al.*, 2004). Hasil percobaan ini sejalan dengan penelitian lain yaitu pada ginjal tikus yang di induksi cisplatin, genistein dilaporkan mampu menurunkan produksi ROS secara signifikan, mengurangi translokasi NF- $\kappa$ B terhadap nukleus, dan menurunkan apoptosis sel glomerulus ginjal melalui regulasi terhadap induksi p53 di ginjal sehingga pemberian genistein pada tikus mampu menurunkan proses inflamasi dan proliferasi sel-sel pada ginjal (Sung *et.al*, 2008). Akan tetapi karena penelitian ini menggunakan ekstrak kacang

tunggak, maka tidak menutup kemungkinan efek yang ditimbulkan merupakan peran senyawa aktif dalam kacang tunggak yang lain seperti quercetin dan myricetin.



**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan dari hasil penelitian mengenai efek ekstrak kacang tunggak terhadap gambaran histopatologi glomerulus ginjal tikus wistar yang dipapar asap kendaraan bermotor, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hipotesis terbukti bahwa pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna Unguiculata*) dapat mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus Wistar pada berbagai lama waktu paparan asap kendaraan bermotor.
2. Semakin lama paparan asap yang diberikan maka semakin tinggi jumlah sel glomerulus pada ginjal tikus Wistar.
3. Terdapat korelasi positif (berbanding lurus) dan signifikan antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel glomerulus ginjal, semakin meningkatnya lama waktu paparan, semakin tinggi jumlah sel pada glomerulus ginjal tikus Wistar.

**7.2 Saran**

Beberapa hal yang perlu dilakukan sebagai tindak lanjut berdasarkan hasil penelitian adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi waktu paparan asap yang lebih lama disertai modifikasi alat dengan tekanan stabil dan variasi model pengasapan agar tikus tahan terpapar dalam waktu yang cukup lama.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme molekular kacang tunggak dalam menghambat penurunan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar yang dipapar asap kendaraan bermotor.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui lama waktu perlakuan dan dosis optimum ekstrak kacang tunggak yang paling efektif dalam mencegah peningkatan jumlah sel glomerulus ginjal.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai berbagai jenis ekstrak kacang tunggak yang efektif terhadap penghambatan jumlah sel glomerulus ginjal tikus wistar yang dipapar asap kendaraan bermotor serta meningkatkan penggunaannya di masyarakat untuk mencegah dampak penyakit akibat polusi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adam B. D, dan McCauley L, 2005. Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors.
- Anggraeni N I Setyowati, 2009. Pengaruh Lama Asap Knalpot dengan Kadar CO 1800ppm Terhadap Gambaran Histopatologi Jantung pada Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Arief, S, 2007. Radikal Bebas. <http://www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf>. Diakses tanggal 19 November 2012
- Asyabatina, 2011 . Emisi Gas Buang Kendaraan Bermotor Dan Material Pereduksinya. <http://teknologi.kompasiana.com/terapan/2011/03/03/emisi-gas-buang-kendaraan-bermotor-dan-material-pereduksinya/>. Diakses tanggal 19 November 2012.
- Bendich A, 2004. what have we learned about the "biological actions of beta-carotene". Medical Affairs, GlaxoSmithKline, 1500 Littleton Rd, Parsippany, NJ 07054, USA J Nutr 134:225S-230S.
- Bekti C G. 2009. Pengaruh Pemberian Kopi Dosis Bertingkat Peroral selama 30 Hari terhadap Gambaran Histologi Ginjal Tikus Wistar.
- Bian Ka and Murad Ferid, 2003. Nitric Oxide (NO) – Biogeneration, Regulation and Relevance to Human Disease. Department of Integrative Biology and Pharmacology. The Institute of Molecular Medicine. The University of Texas-Houston Medical School.
- Borras, Consuelo et al, 2006. Genistein, A soy Isoflavone, Up-regulates Expression of Antioxidant Genes: Involvement of Estrogen Receptors, ERK1/2, and NF- $\kappa$ B. The FASEB journal. 2006;20:2136-2138;cPublished as Doi 10.1096/fj.05-5522fje.
- Brautbar, Nachman, MD. 2004. Industrial Solvent and Kidney Disease.
- CDC, 2004. Carbon monoxide poisoning: what's the problem? Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services.

<http://www.cdc.gov/nceh/airpollution/carbonmonoxide/cofaq.htm>. Diakses tanggal 30 November 2012.

Challem, jack, 2005. Soy\_isoflavones\_for\_womens\_Health. <http://www.chiro.org/phpadsnew/adclick.php?bannerid=17&>. Diakses tanggal 17 november 2012

Chen CY, Holtzman GI, Bakhit RM, 2002. High-genistin isoflavone supplementation modulated erythrocyte antioxidant enzymes and increased running endurance in rats undergoing one session of exhausting exercise – a pilot study. *Pakistan J Nutr* 1:1-7.

Cotran R. S., Kumar, V., Collins, T. 1999, Cellular Pathology I: Cell injury and cell death. In: pathologic basis of disease. 6 th. Edition, II. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.

Department for Planning and Infrastructure (DPI), 2003. Clean the Air: New exhaust emissions requirement for Western Australian vehicles. [Http://www.dpi.wa.gov.au/mediaFiles/lic\\_clean.pdf](Http://www.dpi.wa.gov.au/mediaFiles/lic_clean.pdf). Diakses tanggal 29 November 2012.

Droge W, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function.

Fang Y, Yang S, Wu G, 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Department of Biochemistry and Molecular Biology. Beijing.

Fouad T, 2002. Types of Free Radicals. <Http://www.doctorslounge.com/primary/articles/antioxidants/index.htm>. Diakses tanggal 17 November 2012.

Frampton, M. W. and Utell, M. J, 2007. Sulfur Dioxide. Environmental and Occupational Medicine. Rom, W. M. and Markowitz, S. B. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins: 1480-1486.

Germolec D.R, Adams N.H., Luster M.I. 1995. Comparative Assessment of Metabolic Enzyme Levels in Macrophage Populations of F344 Rat. *Biochem. Pharmacol.* p: 1495–1504.

Guyton M.D, Hall J E, 1997. Buku ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta:EGC.

Gwinner W. Grone HJ, 2000. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 15(8):1127-32.

Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M & Olbricht CJ (1998). Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. *J Physiol* 509, 599–606.

*Haber M.H, Blomberg D, Galagan K, Glassy E.F, Ward P.C.J, 2011. Color Atlas of the Urinary Sediment: An Illustrated Field Guide Based on Proficiency Testing. Amerika Serikat:CAP*

Halliwell B, Gutteridge J.M.C, 2000. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.

Harliansyah. 2001. Mengunyah Halian Menyah Penyakit Dalam: Paksi Jurnal Indonesian Student Association in Malaysia. Selangor. Jabatan Biokimia. Fakultas Perubatan University Kebangsaan Malaysia.

Hartono Nani W B, 2009. Pengaruh Alpinia galangal (Lengkuas) Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dan Indeks Apoptosis pada Adenokarsinoma Mamma Mencit H3H. Universitas Diponegoro. Semarang.

Hanum, F, 1997. *Plant Resources of South East Asia*. Prosea. Bogor.

Hayward, Christopher S. et.al, 1999. *Inhaled Nitric Oxide in Cardiology Practice*. Elsevier.

Imrie, B, 2004. *Vigna Unguiculata*. [http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/Vigna\\_unguiculata.html](http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/Vigna_unguiculata.html) diakses tanggal 24 januari 2012.

Jeong Sung Mi, Duk Hoon Kim, Yu Jin Jung, Kyung Pyo Kang, Ae Sin Lee, Sik Lee, Won Kim, Munkhtugs Davaatseren, Jin-Taek Hwang, Hyun-Jin Kim, Myung Sunny Kim, Dae Young Kwon and Sung Kwang Park, 2008. *Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury*. Food Function Research Center. Korea.

Jerusha L Nelson, Paul S Bernstein, Matthew C Schmidt, Mark S Von Tress, E Wayne Askew, 2000. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older humans.

Joshi, J. V, et al, 2007. Plasma Levels of genistein following a single dose of extract capsule in indian women.

Kholis, Nur, 2009. Optimalisasi Pemanfaatan Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L.) Dalam Pembuatan Tempe. Universitas Negeri Sebelas Maret. Solo.

Kurnani TB, 2001. Radikal bebas dalam polutan lingkungan. Dalam seminar nasional dan lokakarya penelitian konsep radikal bebas dan peran antioksidan dalam meningkatkan kesehata menuju Indonesia sehat 2010. Bandung: pusat penelitian kesehatan lembaga penelitian UNPAD.

Lu, Hua, Ji-Xin Shi, Dong-Mei Zhang, Hui-Lin Chen, Meng Qi And Hong-Xia Yin, 2009. Genistein, A Soybean Isoflavone, Reduces The Production Of Pro-Inflammatory And Adhesion Molecules Induced By Hemolysate In Brain Microvascular Endothelial Cells. *Acta Neurol. Belg.*, 2009, 109, 32-37

Maruyama, Junko. et.al, 2013. Nitric Oxide in Pathophysiology and Treatment of Pulmonary Hypertension.

Mayes P.A., 1987. Biokimia Harper. Edisi 20. Jakarta: EGC.

McMahon T J and Allan Doctor, 2006. Extrapulmonary Effects of Inhaled Nitric Oxide: Role of Reversible S-Nitrosylation of Erythrocytic Hemoglobin. Duke University Medical Centers. Durham. North Carolina.

Meng Ziqiang, 2003. Oxidative Damage of Sulfur Dioxide on Various Organs of Mice: Sulfur Dioxide Is a Systemic Oxidative Damage Agent. Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University. Taiyuan, China.

Murkise, A.L.et al, 1998. Phytoestrogens. The journal of clinical Endocrinology & Metabolism vol 83, No. 2 297-303.

Paget GE, Barnes JM, 1971. In MN Ghost (Ed), *Fundamentals of Experimental Pharmacology*. Scientific Book Agency. Calcuta

Peterson, T.G., Kim H. dan Barnes S, 1997. Mechanism of action of the soy isoflavone genestein at the cellular level. Second International Symposium on the Role of Soybean in Preventing and Treating Chronic Diseases. Brussel, Belgique.

Petruzzi, S., Musi, B. and Bignami, G, 1994. "Acute and chronic sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) exposure: an overview of its effects on humans and laboratory animals." *Ann Ist Super Sanita* 30(2): 151-6.

Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, 2001. *Antioxidant in Food; Practical Applications*. CRC Press. New York.

Rachmawati, Yulia. 2003. Efek Pemberian Dekok Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap Glomerulus Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>. *Skripsi Tidak Dipublikasikan*. Malang: FKUB

Ravnskov U, DR. 2000. *Hydrocarbon Exposure may Cause Glomerulonephritis and Worsen Renal Function: Evidence Based on Hill's Criteria for Causality*. Association of Physician. Sweden.

Resosudarmo, Budy, 2002. *Indonesia's clean air program*. Australian National University.

Rukmana, Rahmat dan Y. Y. Oesman, 2000. *Kacang Tunggak Budi Daya dan Prospek Usaha Tani*. Yogyakarta: Kanisius.

Saleh M A, Clark S, Woodard B, Deolu-Sobogun SA, 2012. *Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Essential Oils*.

Schwela D, Zali O, Schwela P, 1997. Motor Vehicle Air Pollution Public Health Impact and Control Measures. World Health Organization. Geneva. Switzerland.

Shanze D Ayub, 2012. *Free Radicals and Antioxidants*. <http://www.about-pharmacology.com/2012/12/free-radicals-and-antioxidants.html>. Diakses pada tanggal 8 Januari 2013.

Silve, Caroline. 2000. *Tubular Handling and Regulation of Sulphate*. Faculte de Medecine Xavier Bichat. Paris. France.

Speroff L, Fritz M.A. 2005. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams and Wilkins. 7<sup>th</sup> Edition.

State of Environment Tamil Nadu, 2005. *Pollution. Evaluation and Applied Research Department*. Tamil Nadu. <http://www.environment.tn.nic.in/SoE/images/Pollution.pdf>. Diakses tanggal 29 November 2012.

Steckdaub M, Sekartini R, 2001. *Environmental Policy & Vehicles Inspection in Indonesia*.

Stubbe J, 1990; Reichard P, Ehrenberg A, 1983. *Free Radicals Mekanism*. <http://www.doctorslounge.com/primary/articles/antioxidants/index.htm>. Diakses tanggal 8 Januari 2013

Taylor CR, Chandrasoma P, 1995. *The Liver: II. Toxic & Metabolic Disease; Neoplasms*. In *Concise Pathology* ed. 3. Appleton & Lange. United States Of America.

Tornqvst, H., Mills, N.L., Gonzalez, M., Miller, M.R., Robinson, S.D., Megson, M.L., et al. 2007. *Persistent Endothelial dysfunction in Humans after Diesel Exhaust Inhalation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 176:395-400.

Tugaswati A. Tri, 2008. *Emisi Gas Buang Kendaraan. Bermotor Dan Dampaknya Terhadap Kesehatan*.

Ullmann U, et al, 2008. Safety. Tolerability, and pharmacokinetics of single ascending doses of synthetics geneistein (BonisteinTM) in healthy volunteers. <http://www.springerlink.com/content/19259367151x0wn7/>. Diakses tanggal 24 November 2012.

Van der Maesen, L, J, G. dan Somaatmadja S, 1993. Sumber Daya Nabati Asia Tenggara I. Kacang kacang. Prosea. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. 2004. *Modulation of oxidant and antioxidant enzymes Expression and Function in Vascular Cells Circulation*, 44:381-386.

Wei H, Bowen R, Cai Q, 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:124-130.

WHO, 2012. Air Pollution. [http://www.who.int/topics/air\\_pollution/en/](http://www.who.int/topics/air_pollution/en/). Diakses tanggal 29 november 2012.

Winarsi, H. 2007. Antoksidan dan Radikal Bebas. Kanisius. Yogyakarta.

Yoshikawa T, Naito Y, Kondo M, 1997. Free radicals and diseases. Di dalam Hiramatsu M, Yoshikawa T, Inoue M, editor. Food and Free Radicals. Proceedings of the First Symposium on Food and Free Radicals; Yamagata, 16 Jun 1994. New York. Plenum Press.

Yuniastuti A, 2008. Gizi dan Kesehatan. Graha Ilmu, Yogyakarta.

Yusniwati, Yusad, 2003. Polusi Udara Dikota-kota Besar Dunia.

Zaini, Jamal, 2008. Dampak Polusi Udara Terhadap Kesehatan. [Http://lo.Ppijepang.Org/V2/Index.Php?Option=Com\\_K2&View=Item&Id=268:Dampak-Polusi-Udara-Terhadap-Kesehatan](http://lo.Ppijepang.Org/V2/Index.Php?Option=Com_K2&View=Item&Id=268:Dampak-Polusi-Udara-Terhadap-Kesehatan). Diakses tanggal 24 Januari 2012

## LAMPIRAN 1

### PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hesttya Elvasisca Mourend

NIM : 105070106111006

Program Studi : Program Studi Kedokteran Umum

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan,

(Hesttya Elvasisca Mourend)

NIM. 105070106111006

## LAMPIRAN 2

### Data Berat Badan Tikus

Berat rata-rata saat penelitian (gram)

Penimban gan ke-	Kelompok								
	A2O4 (-)G	A2O4 (+)G	A4O4 (-)G	A4O4 (+)G	N	N+O4	N+G	A3O4 (-)G	A3O4 (+)G
1	341.2	337	359.6	356.2	400.33	412.75	400.25	399.25	392.25
2	344.6	346.2	363.2	374.8	410.28	422.31	406.75	407.3	403.5
3	356.6	355	380.5	370					

Berat pada hari pembedahan

No. Tikus	Kelompok								
	A2O4 (-)G	A2O4 (+)G	A4O4 (-)G	A4O4 (+)G	N	N+O4	N+G	A3O4 (-)G	A3O4 (+)G
1	347	422	348	431		418	437	416	438
2	423	345	313	383	385		412	345	433
3	326	374	391	310	408		379	384	378
4	410	391	349	396	398	435	439	430	385

### LAMPIRAN 3

#### Perhitungan Dosis Ekstrak Kacang Tunggak

Perhitungan didasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak kacang tunggak yaitu:

$$=140.7 \text{ ppm}$$

$$=140.7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$=140.7 \text{ mg/1000ml}$$

Dosis efektif genistein dalam ekstrak kacang tunggak berdasarkan penelitian tentang efek antioksidan ekstrak kacang tunggak pada tikus yang di ovarektomi adalah 0,5mg/kgBB.

Rata-rata berat badan tikus kelompok dengan pemberian ekstrak kacang tunggak pada bulan pertama adalah 370 gram.

Untuk 10 tikus perhari

$$\frac{3700}{1000} \text{ kg} \times 0.5 \text{ mg/kgBB} = 1.8 \text{ mg/hari}$$

Untuk 10 tikus per 30 hari

$$1.8 \text{ mg/hari} \times 30 = 55.5 \text{ mg genistein}$$

$$\frac{55.5 \text{ mg}}{140.7 \text{ mg}} \times 1000 \text{ mg} = 394.4 \text{ mg kacang tunggak}$$

Untuk satu tikus perhari

$$394.4 \text{ mg} : 30 = 13.15 \text{ mg (10 ekor)}$$

$$13.15 \text{ mg} : (10 \text{ ekor}) = 1.3 \text{ mg/ekor/hari}$$

Dijadikan 2ml → ditambah 0.7ml air

Rata-rata berat badan tikus kelompok dengan pemberian ekstrak kacang tunggak pada bulan kedua adalah 396.25 gram.

Untuk 8 tikus perhari

$$\frac{3170}{1000} \text{ kg} \times 0.5 \text{ mg/kgBB} = 1.585 \text{ mg/hari}$$

Untuk 8 tikus per 34 hari

$1.585 \text{ mg/hari} \times 34 = 53.89 \text{ mg genistein}$

$$\frac{53.89 \text{ mg}}{140.7 \text{ mg}} \times 1000 \text{ ml} = 383.01 \text{ mg kacang tunggak}$$

Untuk 1 tikus perhari

$383.01 \text{ mg} : 34 = 11.265 \text{ ml (8 ekor)}$

$11.265 \text{ mg} : (8 \text{ ekor}) = 1.4 \text{ mg/ekor/hari}$

Dijadikan 2 ml → ditambah 0.6 ml air



## LAMPIRAN 4

## Hasil Perhitungan Jumlah Sel Glomerulus Ginjal

Kelompok	Jumlah Sel Glomerulus		Standar Deviasi	
N	45.5	43.74	8.92407	8.92
N	41.85			
N	44.25			
N	43.35			
N+O4	53.3	51.43	8.23050	8.23
N+O4	51.6			
N+O4	50.7			
N+O4	50.1			
N+G	50.95	48.74	8.78397	8.78
N+G	49.1			
N+G	49.05			
N+G	45.85			
A2O4(-)G	82.5	81.53	7.88200	7.88
A2O4(-)G	80.85			
A2O4(-)G	81.95			
A2O4(-)G	80.8			
A2O4(+)G	59.65	57.93	10.37618	10.38
A2O4(+)G	58.95			
A2O4(+)G	58.5			
A2O4(+)G	54.6			
A3O4(-)G	86.15	86.40	10.37963	10.38
A3O4(-)G	87.2			
A3O4(-)G	86.8			
A3O4(-)G	85.45			
A3O4(+)G	68.2	63.13	10.93407	10.93
A3O4(+)G	60.25			
A3O4(+)G	62.4			
A3O4(+)G	61.65			
A4O4(-)G	91.85	94.21	11.21786	11.22
A4O4(-)G	97.6			
A4O4(-)G	91.9			
A4O4(-)G	95.5			
A4O4(+)G	82.85	77.67	10.23617	10.24
A4O4(+)G	78.15			
A4O4(+)G	77			
A4O4(+)G	72.7			

LAMPIRAN 5

Dokumentasi Penelitian



Kandang Tikus



Penempatan Kandang Tikus



Penyondean Ekstrak KT



Pengasapan pada Kelompok Tikus



Kotak Pengasapan Tikus



Penggantian Sekam Kandang



Anestesi Sebelum Pembedahan



Proses Pembedahan



Penempatan Organ Tikus



LAMPIRAN 6

Analisa Data Jumlah Sel Glomerulus Ginjal

Hasil Pengujian One-way ANOVA

Descriptives

Data	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Normal	80		
Normal + O4	80	51.4250	8.23050	.92020	49.5934	53.2566	30.00	69.00
Normal + G	80	48.7375	8.78397	.98208	46.7827	50.6923	31.00	67.00
A2O4(+ )G	80	57.9250	10.37618	1.16009	55.6159	60.2341	35.00	79.00
A2O4(- )G	80	81.5250	7.88200	.88123	79.7709	83.2791	66.00	103.00
A3O4(+ )G	80	63.1250	10.93407	1.22247	60.6917	65.5583	39.00	106.00
A3O4(- )G	80	86.4000	10.37963	1.16048	84.0901	88.7099	71.00	118.00
A4O4(+ )G	80	77.6750	10.23617	1.14444	75.3971	79.9529	52.00	98.00
A4O4(- )G	80	94.2125	11.21786	1.25419	91.7161	96.7089	72.00	126.00
Total	720	67.1958	19.72740	.73520	65.7524	68.6392	30.00	126.00

**Test of Homogeneity of Variances**

Data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.829	8	711	.069

**ANOVA**

Data	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	212486.475	8	26560.809	280.493	.000
Within Groups	67326.912	711	94.693		
Total	279813.388	719			



Multiple Comparisons

Dependent Variable:Data

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Normal	Normal + O4	-7.68750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-10.7083	-4.6667
		Normal + G	-5.00000 <sup>*</sup>	1.53861	.001	-8.0208	-1.9792
		A2O4(+ )G	-14.18750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-17.2083	-11.1667
		A2O4(-)G	-37.78750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-40.8083	-34.7667
		A3O4(+ )G	-19.38750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-22.4083	-16.3667
		A3O4(-)G	-42.66250 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-45.6833	-39.6417
		A4O4(+ )G	-33.93750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-36.9583	-30.9167
		A4O4(-)G	-50.47500 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-53.4958	-47.4542
	Normal + O4	Normal	7.68750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	4.6667	10.7083
		Normal + G	2.68750	1.53861	.081	-.3333	5.7083
		A2O4(+ )G	-6.50000 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-9.5208	-3.4792
		A2O4(-)G	-30.10000 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-33.1208	-27.0792
		A3O4(+ )G	-11.70000 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-14.7208	-8.6792
		A3O4(-)G	-34.97500 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-37.9958	-31.9542
		A4O4(+ )G	-26.25000 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-29.2708	-23.2292
A4O4(-)G		-42.78750 <sup>*</sup>	1.53861	.000	-45.8083	-39.7667	
Normal + G	Normal	5.00000 <sup>*</sup>	1.53861	.001	1.9792	8.0208	



		Normal + O4	-2.68750	1.53861	.081	-5.7083	.3333
		A2O4(+)-G	-9.18750	1.53861	.000	-12.2083	-6.1667
		A2O4(-)-G	-32.78750	1.53861	.000	-35.8083	-29.7667
		A3O4(+)-G	-14.38750	1.53861	.000	-17.4083	-11.3667
		A3O4(-)-G	-37.66250	1.53861	.000	-40.6833	-34.6417
		A4O4(+)-G	-28.93750	1.53861	.000	-31.9583	-25.9167
		A4O4(-)-G	-45.47500	1.53861	.000	-48.4958	-42.4542
	A2O4(+)-G	Normal	14.18750	1.53861	.000	11.1667	17.2083
		Normal + O4	6.50000	1.53861	.000	3.4792	9.5208
		Normal + G	9.18750	1.53861	.000	6.1667	12.2083
		A2O4(-)-G	-23.60000	1.53861	.000	-26.6208	-20.5792
		A3O4(+)-G	-5.20000	1.53861	.001	-8.2208	-2.1792
		A3O4(-)-G	-28.47500	1.53861	.000	-31.4958	-25.4542
		A4O4(+)-G	-19.75000	1.53861	.000	-22.7708	-16.7292
		A4O4(-)-G	-36.28750	1.53861	.000	-39.3083	-33.2667
	A2O4(-)-G	Normal	37.78750	1.53861	.000	34.7667	40.8083
		Normal + O4	30.10000	1.53861	.000	27.0792	33.1208
		Normal + G	32.78750	1.53861	.000	29.7667	35.8083
		A2O4(+)-G	23.60000	1.53861	.000	20.5792	26.6208
		A3O4(+)-G	18.40000	1.53861	.000	15.3792	21.4208
		A3O4(-)-G	-4.87500	1.53861	.002	-7.8958	-1.8542

	A4O4(+G	3.85000	1.53861	.013	.8292	6.8708
	A4O4(-G	-12.68750	1.53861	.000	-15.7083	-9.6667
A3O4(+G	Normal	19.38750	1.53861	.000	16.3667	22.4083
	Normal + O4	11.70000	1.53861	.000	8.6792	14.7208
	Normal + G	14.38750	1.53861	.000	11.3667	17.4083
	A2O4(+G	5.20000	1.53861	.001	2.1792	8.2208
	A2O4(-G	-18.40000	1.53861	.000	-21.4208	-15.3792
	A3O4(-G	-23.27500	1.53861	.000	-26.2958	-20.2542
	A4O4(+G	-14.55000	1.53861	.000	-17.5708	-11.5292
	A4O4(-G	-31.08750	1.53861	.000	-34.1083	-28.0667
	A3O4(-G	Normal	42.66250	1.53861	.000	39.6417
Normal + O4		34.97500	1.53861	.000	31.9542	37.9958
Normal + G		37.66250	1.53861	.000	34.6417	40.6833
A2O4(+G		28.47500	1.53861	.000	25.4542	31.4958
A2O4(-G		4.87500	1.53861	.002	1.8542	7.8958
A3O4(+G		23.27500	1.53861	.000	20.2542	26.2958
A4O4(+G		8.72500	1.53861	.000	5.7042	11.7458
A4O4(-G		-7.81250	1.53861	.000	-10.8333	-4.7917
A4O4(+G	Normal	33.93750	1.53861	.000	30.9167	36.9583
	Normal + O4	26.25000	1.53861	.000	23.2292	29.2708
	Normal + G	28.93750	1.53861	.000	25.9167	31.9583

	A2O4(+) <sup>†</sup> G	19.75000	1.53861	.000	16.7292	22.7708
	A2O4(-) <sup>†</sup> G	-3.85000	1.53861	.013	-6.8708	-8.292
	A3O4(+) <sup>†</sup> G	14.55000	1.53861	.000	11.5292	17.5708
	A3O4(-) <sup>†</sup> G	-8.72500	1.53861	.000	-11.7458	-5.7042
	A4O4(-) <sup>†</sup> G	-16.53750	1.53861	.000	-19.5583	-13.5167
A4O4(-) <sup>†</sup> G	Normal	50.47500	1.53861	.000	47.4542	53.4958
	Normal + O4	42.78750	1.53861	.000	39.7667	45.8083
	Normal + G	45.47500	1.53861	.000	42.4542	48.4958
	A2O4(+) <sup>†</sup> G	36.28750	1.53861	.000	33.2667	39.3083
	A2O4(-) <sup>†</sup> G	12.68750	1.53861	.000	9.6667	15.7083
	A3O4(+) <sup>†</sup> G	31.08750	1.53861	.000	28.0667	34.1083
	A3O4(-) <sup>†</sup> G	7.81250	1.53861	.000	4.7917	10.8333
	A4O4(+) <sup>†</sup> G	16.53750	1.53861	.000	13.5167	19.5583

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

### Correlations

		Sel	Paparan
Sel	Pearson Correlation	1	.464**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	240	240
Paparan	Pearson Correlation	.464**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	240	240

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

LAMPIRAN 7

Hasil Uji Komparasi Jumlah Sel Glomerulus

Perbandingan Antar Kelompok		Nilai P	Arti	
N	N+O4	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	N+G	0.001	Perbedaan naik signifikan	
	A2O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A2O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A3O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A3O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
N+O4	N+G	0.081	Perbedaan turun tidak signifikan	
	A2O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A2O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A3O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A3O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	N+G	A2O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan
A2O4(+)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A3O4(-)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A3O4(+)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A4O4(-)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A4O4(+)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A2O4(-)G		A2O4(+)G	0.000	Perbedaan turun signifikan
		A3O4(-)G	0.002	Perbedaan naik signifikan
	A3O4(+)G	0.000	Perbedaan turun signifikan	
	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(+)G	0.013	Perbedaan turun tidak signifikan	
	A2O4(+)G	A3O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan
		A3O4(+)G	0.001	Perbedaan naik signifikan
		A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan
A4O4(+)G		0.000	Perbedaan naik signifikan	
A3O4(-)G	A3O4(+)G	0.000	Perbedaan turun signifikan	
	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(+)G	0.000	Perbedaan turun signifikan	
A3O4(+)G	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(+)G	0.000	Perbedaan naik signifikan	
	A4O4(-)G	0.000	Perbedaan turun signifikan	
A4O4(-)G	A4O4(+)G	0.000	Perbedaan turun signifikan	

LAMPIRAN 8

