

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) FIBROSIS GINJAL  
HASIL INDUKSI STREPTOKINASE**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**RIZKA ASRINI**

**0911310059**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) FIBROSIS GINJAL  
HASIL INDUKSI STREPTOKINASE**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**RIZKA ASRINI**

**0911310059**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) FIBROSIS GINJAL HASIL INDUKSI STREPTOKINASE

Oleh :

RIZKA ASRINI

0911310059

Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengaji  
pada tanggal 19 Agustus 2013

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc  
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,

Ketua Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter  
Hewan Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., M.S.  
NIP. 19480615 197702 2 001

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



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Rizka Asrini

NIM : 0911310059

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus  
*(Rattus norvrgicus)* Fibrosis ginjal Hasil Induksi Streptokinase.

Dengan ini menyatakan bahwa`:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 September 2013  
Yang Menyatakan

(Rizka Asrini)  
NIM. 0911310059

## Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Fibrosis ginjal Hasil induksi Streptokinase

### ABSTRAK

Fibrosis ginjal merupakan penyebab utama penyakit ginjal kronik. Fibrosis ginjal akan semakin parah dengan induksi streptokinase, protein ekstraselular yang diproduksi oleh semua strain *Streptococcus β-haemolytic*. Streptokinase bersifat *nefrotoxic* jika diberikan dengan dosis tinggi. Tingginya aktivitas enzim protease pada organ ginjal dapat merusak ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh induksi streptokinase terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan tikus dibagi dalam empat kelompok yaitu kelompok kontrol, dan tiga kelompok yang diberikan streptokinase satu kali, 2 kali dan 3 kali dengan dosis 6000 IU dengan interval pengulangan pemberian streptokinase 5 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan aktivitas protease sebesar 32,5% sampai dengan 72,5%, selain itu induksi streptokinase dapat merusak ginjal berdasarkan pada kerusakan tubulus pada gambaran histopatologi ginjal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease tertinggi dengan diinduksi streptokinase 6000 IU sebanyak 3 kali dan menunjukkan gambaran histopatologi ginjal yang sudah terjadi fibrosis ginjal dengan ditemukannya sel fibroblast penghasil serat kolagen.

**Kata kunci :***Fibrosis ginjal, Streptokinase, protease, histopatologi, tubulus ginjal.*

## Activity of Protease Enzyme and Renal Histopathology on Rat (*Rattus norvegicus*) Renal Fibrosis Models After Streptokinase Induction

### ABSTRACT

Renal fibrosis is a major cause of chronic renal disease. It will be more severe by induction of streptokinase, an extracellular protein produced by all strains of  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus*. Streptokinase is nefrotoxic when administered with a high dose. The high activity of protease enzyme can damage the renal. This study aimed to determine the effect of streptokinase induced in rats (*Rattus norvegicus*) on protease activity and histopathological appearance of renal tubules. This study used rats which divided into four groups were control group and three groups were given streptokinase once, twice and three times with 6000 IU of streptokinase and administration interval of 5 days. The result showed that the induction of streptokinase in rat (*Rattus norvegicus*) could induce renal fibrosis models. Streptokinase could increase protease activity 32,5% until 72,5%. Streptokinase induction could lead histopathological changes of renal tubules changed with tubular renal destruction. The results showed that the highest activity of protease enzyme resulted from 6000IU streptokinase induced 3 times and the occurrence of fibroblast cells producing collagen fibers.

**Keywords :** Renal Fibrosis, streptokinase, protease, histopathology, renal tubules.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberi rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase**”.

Penelitian ini merupakan payung penelitian hewan model fibrosis ginjal yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni'am,drh., DES. Serta salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya. Dalam penulisan laporan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan Dyah Kinashih Wuragil,S.Si.,MP.,M.Sc., selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan sehingga skripsi ini telah terselesaikan.
2. drh. Masdiana C. Padaga M.App.Sc dan drh. Handayu Untari atas tanggapan dan saran yang telah diberikan.
3. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., M.S., selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Seluruh staf serta asisten laboratorium Biokimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
5. Bapak Akhmad Hitten SE.Ak.MM dan ibu Muslikah S.pd serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan kasih sayang dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.



6. Tim Penelitian Fibrosis ginjal “keni, pascara, helda, candra, raka, vindy” atas semangat yang diberikan sehingga penelitian ini terselesaikan.
7. Seluruh Sahabat seperjuangan di Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya angkatan 2009 atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 2 September 2013

Penulis



	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	iii
<b>ABSTRAK .....</b>	iv
<b>ABSTRACT .....</b>	v
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	vi
<b>DAFTAR ISI .....</b>	viii
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	x
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....</b>	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	5
2.1 Fibrosis ginjal .....	5
2.2 Patomekanisme Fibrosis ginjal .....	6
2.3 Histopatologi Fibrosis ginjal .....	7
2.4 Hewan Coba Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	9
2.5 Streptokinase .....	11
2.6 Enzim Protease .....	13
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	14
3.1 Kerangka Konsep .....	14
3.2 Hipotesis Penelitian .....	15
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	16
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	16
4.2 Sampel Penelitian .....	16
4.3 Rancangan Penelitian .....	17
4.4 Variabel Penelitian .....	17
4.5 Materi Penelitian .....	17
4.6 Tahapan Penelitian .....	18
4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan .....	18
4.6.2 Preparasi Streptokinase .....	19
4.6.3 Tatalaksana Injeksi Streptokinase .....	19
4.6.4 Pengambilan Organ Ginjal .....	20
4.6.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease .....	20
4.6.6 Pembuatan Preparat Histologi .....	21
4.7 Analisa data .....	21

<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	22
5.1 Pengaruh Induksi Streptokinase Terhadap Aktivitas Enzim Protease Ginjal Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	22
5.2 Pengaruh Induksi Streptokinase Terhadap Gambaran Histopatologi Tubulus Ginjal Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	26
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	31
6.1 Kesimpulan .....	31
6.2 Saran .....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	32
<b>LAMPIRAN .....</b>	38



**Tabel**

**DAFTAR TABEL**

**Halaman**

5.1 Peningkatan Aktivitas Protease Rata-rata .....	22
--	----



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Histologi Ginjal Normal .....	8
2.2 Histopatologi Ginjal Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Fibrosis Ginjal .....	9
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	14
5.1 Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Hasil Induksi Streptokinase .....	26



## Lampiran

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
1. Skema Kerja Penelitian .....	39
2. Pembuatan Larutan Streptokinase.....	40
3. Isolasi Enzim Protease Ginjal .....	41
4. Pembuatan Preparat Histologi .....	44
5. Penentuan Panjang Gelombang Tirosin .....	46
6. Pembuatan Kurva Standar.....	47
7. Perhitungan Aktivitas Protease .....	48
8. Data dan Uji Statistika Aktivitas Protease .....	50
9. Pembuatan Larutan.....	52
10.Sertifikat Laik Etik.....	54



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

$\alpha$  – SMA  
*Ad libitum*  
ANOVA  
BNJ  
CsA  
ECM  
EMT  
HGF  
IU  
KDOQI  
LPR-1  
 $Mg$   
MAPK  
MMP-9  
PAR- 1  
RAL  
ROS  
 $Sp$   
TCA  
TNF-  $\alpha$   
TGF-  $\beta$

$\alpha$  – *Smooth muscle actin*  
Tidak Terbatas  
Analisis Of Variant  
Beda Nyata Jujur  
Cyclosporine  
*Extracellular Matrix*  
*Ephitelial Mesenchymal Transition*  
*Hepatocyte Growth Factor*  
International Unit  
*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*  
*Receptor-related protein -1*  
Miligram  
*Mitogen Activated Protein Kinase*  
Matrix Metaloproteinase- 9  
*Protease Activator Receptor- 1*  
Rancangan Acak Lengkap  
*Reactive Oxygen Species*  
Spesies  
*Tri Chloro Acetic Acid*  
*Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$*   
*Transforming Growth Factor -  $\beta$*

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Fibrosis ginjal adalah penyakit ginjal yang ditandai dengan munculnya glomerulosklerosis dan jaringan fibrosa pada organ ginjal. Fibrosis ginjal merupakan penyebab utama penyakit ginjal kronik (Cho, 2010). Penyakit ginjal kronik merupakan tahap akhir kerusakan ginjal yang bersifat *progesif* dan *irreversibel*, sehingga kemungkinan keberhasilan terapi sangat kecil. Penyakit ginjal kronik menjadi masalah kesehatan di berbagai negara dengan angka kematian tinggi. Berdasarkan data dari *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI), di Amerika 8,3 juta orang menderita penyakit ginjal kronik (Slattery, 2005). Hewan yang sering menderita penyakit fibrosis ginjal adalah kucing. Angka prevalensi penderita penyakit fibrosis ginjal pada kucing di seluruh dunia kurang lebih 20% (Watson, 2001).

Streptokinase merupakan obat trombolitik yang digunakan secara luas untuk mengatasi permasalahan seputar penyakit jantung, seperti *myocardiac infarction* (Tjay, 2007). Streptokinase memiliki sifat toksik terhadap ginjal (Hu, et al., 2008). Streptokinase bekerja sebagai aktivator plasminogen yang tidak selektif, sehingga menyebabkan terjadinya fibrinolisis dan pemecahan protein *ekstraceluler matriks* di seluruh sistem peredaran darah kemudian terakumulasi di ginjal, hal ini akan memicu terjadinya fibrosis pada ginjal (Sacher, 2004).

Protease merupakan enzim yang bersifat proteolitik sebagai respon pertahanan tubuh terhadap bahan patogen (Suryanto, 2003). Pada penyakit fibrosis



ginjal aktivitas protease meningkat dan memecah protein pada ginjal secara berlebihan sehingga mengakibatkan tingginya produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam ginjal. Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebihan mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan (Wati, et al., 2013). Penelitian sebelumnya telah mempelajari pembuatan hewan model fibrosis ginjal dengan induksi *aminonucleoside* dan *cyclosporine* namun pembuatan hewan model tersebut memerlukan biaya yang besar (Klahr & Morrissey, 2002),

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa penyakit fibrosis ginjal pada hewan model memiliki kesamaan pada manusia dengan ciri infiltrasi sel inflamasi, proliferasi tubulus, *epithelial mesenchymal transition* (EMT), akumulasi *myofibroblast*, meningkatnya *matrix extracellular* dan atropi tubulus (Bascand & Schanstra, 2005). Patomekanisme fibrosis ginjal akibat induksi streptokinase masih relatif sedikit diketahui. Berdasarkan hal di atas maka penelitian ini akan mengkaji patomekanisme fibrosis ginjal pada hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) berdasarkan peningkatan aktivitas enzim protease organ ginjal dan kerusakan gambaran histopatologi organ ginjal.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

- 1) Bagaimana peningkatan aktivitas enzim protease pada organ ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi streptokinase?



- 2) Bagaimana kerusakan ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinjeksi streptokinase berdasarkan gambaran histopatologi sel tubulus ginjal?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur 10 minggu dan berat badan antara 150-250 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 132- KEP-UB.
- 2) Pembuatan tikus fibrosis ginjal dilakukan dengan cara injeksi streptokinase melalui vena *coccygea* dengan berbagai perlakuan dosis yaitu 1 x 6000 IU, 2 x 6000 IU dan 3 x 6000 IU dengan interval pemberian 5 hari.
- 3) Streptokinase yang digunakan adalah protein ekstraselular dengan berat molekul 46-kDa, terdiri dari 414 asam amino, diproduksi oleh *Streptococcus* golongan C  $\beta$ -*haemolytic*.
- 4) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim protease dan gambaran kerusakan sel tubulus ginjal dengan pewarnaan Hematoxilen Eosin (HE).



## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui peningkatan aktivitas enzim protease pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi streptokinase.
- 2) Mengetahui kerusakan tubulus ginjal berdasarkan gambaran histopatologi pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi streptokinase.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi tentang efek induksi streptokinase terhadap tingkat keparahan fibrosis ginjal serta dapat dipergunakan sebagai informasi kajian ilmiah tentang patomekanisme fibrosis ginjal yang diinduksi streptokinase.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Fibrosis ginjal

Fibrosis ginjal adalah perubahan patofisiologi fungsi ginjal normal menjadi rusak sehingga terjadinya kehilangan fungsi normal ginjal. Penyakit fibrosis ginjal ditandai dengan akumulasi *extracellular matrix* (ECM) dan poliferasi fibroblas (Kondo *et al.*, 2001). Fibrosis ginjal merupakan manifestasi akhir dari penyakit ginjal kronis, penyakit ginjal kronis yang bersifat *progressive* akan mengakibatkan terbentuknya luka parut yang berlanjut obstruksi pada ginjal dan mengakibatkan *End Stage Renal Disease (ESRD)* (Liu, 2006). Berdasarkan data dari *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI)* di Amerika terdapat 8,3 juta orang menderita penyakit ginjal kronik (Slattery, 2005).

Hewan yang sering menderita penyakit fibrosis ginjal adalah kucing. Angka prevalensi fibrosis ginjal pada kucing di seluruh dunia berkisar 20 % (Watson, 2001). Gejala fibrosis ginjal ditandai dengan peningkatan produktifitas kolagen yang berlebihan pada parenchyma ginjal sehingga menyebabkan terjadinya luka parut dan kehilangan fungsi normal ginjal adalah trauma, infeksi, inflamasi, sirkulasi darah yang abnormal, dan respon imun yang mengakibatkan kerusakan sel pada ginjal (Schnaper, 2003).

Penyebab terjadinya fibrosis ginjal adalah :

- a. Obat-obatan yang merusak ginjal adalah obat-obatan analgesik yang diberikan tanpa resep dokter dengan penggunaan jangka waktu yang lama (Morrissey, 2009).



- 2 Kebiasaan buruk yang dapat memicu terjadinya fibrosis ginjal yaitu memakan makanan sumber protein hewani dan nabati yang terlalu tinggi dan kurangnya minum air putih dapat menyebabkan terjadinya kerusakan ginjal (Venkatachalam *et al.*, 2010).
- 3 Tekanan darah tinggi menyebabkan kerusakan pembuluh darah kecil sehingga menyebabkan fibrosis ginjal (Anonymous, 2010; Klag *et al.*, 1996; Hsu, 2005).

## 2.2 Patomekanisme Fibrosis ginjal

Terdapat empat fase yang menyebabkan terjadinya fibrosis ginjal yaitu: (Eddy, 2000)

- Fase pertama adalah aktivasi seluler dan fase *injury*. Awal mula terjadi penyakit ginjal yaitu terjadi akumulasi matrix protein pada *interstitial space* dan di dalam sel tubulus. Sel tubulus memproduksi molekul *inflammatory* dan terjadi inflamasi pada interstitial yang berkontribusi secara langsung terjadinya fibrosis.
- Pada fase kedua adalah *fibrogenic signaling phase* yaitu dengan *release* beberapa *growth factor* dan sitokin seperti *transforming growth factor- $\beta$* , *connective tissue growth factor*, angiotensin II, dan endotelin-1. Faktor yang lainnya adalah *platelet derived growth factor*, *basic fibroblast growth factor*, *tumor necrosis factor  $\alpha$* , dan interleukin-1, interferon dan *hepatocit growth factor*.

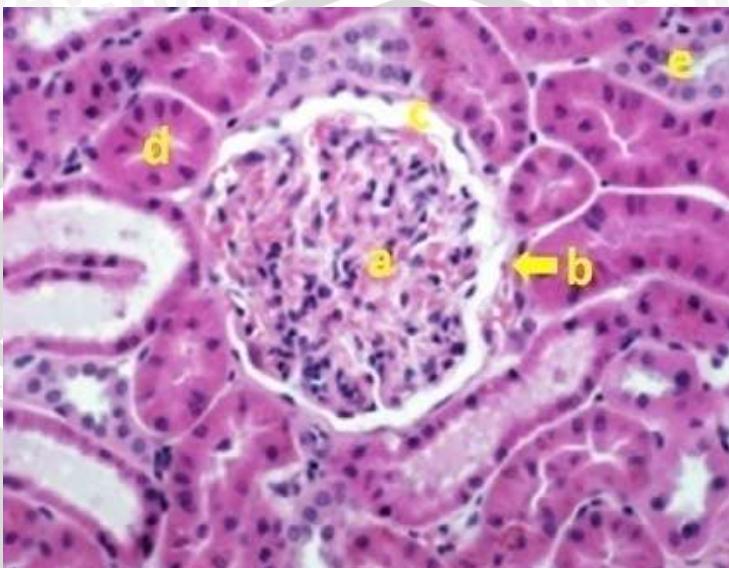
- Fase ketiga adalah *fibrogenic phase*, yaitu terjadinya akumulasi matrix protein yang normal dan rusak pada sel interstitial. Terjadi gangguan sintesis matrix protein, ginjal memproduksi. Aktivasi tersebut meregulasi *matrix cellular* yang berlebihan.
- Pada fase ke empat, yaitu terjadinya *renal destruction*. Matrix protein terakumulasi secara berlebihan, menghilangnya tubulus dan *peritubular capiler*. Jumlah *intake* ginjal menurun drastis dan terjadi penurunan filtrasi glomerulus.

### 2.3 Histopatologi Fibrosis ginjal

Ginjal tersusun atas  $\pm$  100 juta nefron yang merupakan unit fungsional, ginjal terletak pada kortek ginjal memiliki struktur dan fungsi yang sama yaitu, pembentukan urin dan memelihara kekonstanan komposisi cairan ekstraseluler tubuh. Nefron terdiri dari dua bagian, yaitu korpus renalis dimana plasma darah difiltrasi dan tubulus renalis yang mengabsorpsi dan mensekresi cairan yang lewat. Korpus renalis dibagi menjadi dua bagian yaitu glomerulus dan kapsula bowman yang mengelilingi kapiler glomerulus. Tubulus renalis dibagi menjadi tiga bagian, yaitu tubulus proksimal, lengkung henle dan tubulus distalis (Dellman & Eurell, 2006).

Glomerulus merupakan anyaman pembuluh darah kapiler yang merupakan cabang dari arteriol aferen. Glomerulus dalam keadaan normal secara keseluruhan tertutup oleh kapsula bowman yang membentuk mangkok, kapiler glomerulus dilapisi oleh sel-sel endotel, memiliki pori-pori dengan diameter kurang lebih 100 nm dan

terletak pada membran basalis (Robbins & Kumar, 1995). Glomerulus merupakan bagian nefron yang bertanggung jawab untuk filtrasi plasma (Dellman & Eurell, 2006). Gambaran histologi pada ginjal normal ditunjuk pada Gambar 2.1.

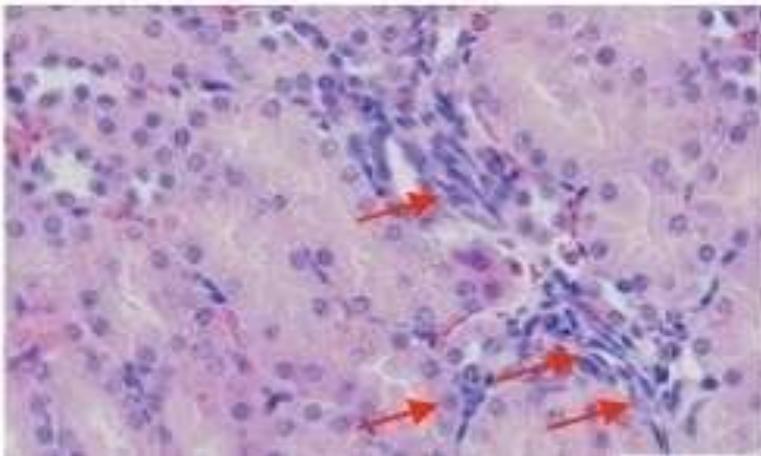


**Gambar 2.1** Histologi Ginjal Normal.

Keterangan: Glomerulus (a), kapsula Bowman (b), ruang Bowman (c), tubulus proksimal (d) dan tubulus distalis (e). Pewarnaan HE. (Dellmann dan Eurell, 2006).

Beberapa studi tentang histopatologi pada penyakit fibrosis ginjal pada hewan model memiliki kesamaan yang terjadi pada manusia dengan ciri infiltrasi sel inflamasi, poliferasi tubulus, *epithelial mesenchymal transition* (EMT), akumulasi *myofibroblast*, meningkatnya *extracellular matrix*, dan atropi tubulus (Bascand & Schanstra, 2005). Pada penderita penyakit ginjal kronis ditemukan lesi pada jaringan yang bersifat *non reversible*. Ciri ciri fibrosis adalah terdapatnya glomerulosklerosis dan tidak ditemukan *tubulointestinal space*, pada kondisi tersebut terjadi sintesis *extracellular matrix* protein yang berlebihan (Vergoulas, 2009). Rastaldi *et al.*, (2002) menyatakan bahwa hasil biopsi ginjal pada semua penyakit ginjal pada gambaran histologis akan terlihat lesi, dan ditemukannya *epithelial mesenchymal transition*

(EMT) pada sel epitel tubulus, *epithelial mesenchymal transition* (EMT) yang ditemukan berkaitan dengan tingkat keparahan pada kerusakan interstitial (Wati *et al.*, 2013).



**Gambar 2.2** Histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis ginjal pada inti sel epitel tubulus. Pewarnaan HE. Perbesaran 220 X (Wati *et al.*, 2013).

*Epithelial-mesenchymal transition* (EMT) adalah proses deferensiasi sel epitel normal menuju sel epitel yang memiliki sel fibroblas. Sel fibroblas ini akan berbentuk runcing yang ditunjukkan tanda panah merah. Sel fibroblas merupakan sel penghasil serat fibril atau kolagen yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis pada daerah ekstraseluler pada ginjal sehingga menyebabkan gagal ginjal (Wati *et al.*, 2013).

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

Tikus putih *Rattus norvegicus* memiliki morfologi dengan ciri bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah

ekornya yang panjang. Berat badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4-5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267-500 gram dan betina 225-325 gram (Sirois, 2005). Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004):

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

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan spesies ideal untuk uji toksikologi dan memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia (Kusumawati, 2004). Hewan model fibrosis ginjal telah dipelajari setelah induksi *aminonucleoside* dan *cyclosporine* (Klahr & Morrissey, 2002). *Aminonucleoside* atau yang biasa disebut dengan *Puromycin Aminonucleoside* merupakan antibiotik yang bersifat *antineoplastic* dan menyebabkan *glomerosclerosis* pada ginjal di tikus. Induksi *Aminonucleoside* untuk mendapatkan hewan model fibrosis ginjal

sangat cepat yaitu 15 hari setelah di induksi aminonucleoside (Caufield *et al.*, 1976), namun penggunaan *aminonucleoside* membutuhkan biaya yang besar (Anonymous, 2007).

*Cyclosporine* merupakan obat yang bersifat immunosupresan untuk transplantasi organ. Penggunaan *Cyclosporine* sebagai *immunosupresant* membutuhkan biaya yang besar dan kebanyakan hewan tidak menyukai rasa dari *cyclosporine*, sehingga penggunaan *cyclosporine* sering dikombinasikan dengan gel atau kapsul yang memiliki rasa (Davidson & Plumb, 2003). Pembuatan hewan model fibrosis ginjal menggunakan *cyclosporine* memerlukan waktu yang lama. Sesuai dengan penelitian Bobadilla & Gerando (2007) memerlukan waktu 28 hari untuk membuat hewan model fibrosis ginjal hasil induksi *cyclosporine*.

## 2.5 Streptokinase

Streptokinase adalah protein ekstraselular dengan berat molekul 46-kDa, terdiri dari 414 asam amino, diproduksi oleh semua strain *Streptococcus β-haemolytic* (Pardede, 2009). Streptokinase merupakan enzim yang memiliki struktur *single chain polypeptide* yang menghasilkan *fibrinolytic action indirectly* pada plasminogen. Streptokinase diproduksi oleh *Streptococcus* pertama kali oleh Billorth pada tahun 1874 yang berasal dari luka manusia. *Streptococcus sp* diklasifikasikan menjadi tiga group berdasarkan reaksi *haemolytic* yaitu *alpha*, *beta* dan *gamma*. Berdasarkan sifat *β-hemolytic*, streptokinase dibagi menjadi beberapa strain A, C dan G (Anirban *et al.*, 2003).

*Streptococcus* strain C yaitu *Streptococcus equisimilis* H46A (ATCC12449) yang diisolasi dari manusia umumnya digunakan sebagai bahan untuk memproduksi streptokinase. *S. equisimilis* H46A dipilih dari ratusan isolat bakteri yang paling efektif sebagai *fibrinolytic*. *S. equisimilis* H46A tidak memproduksi *erythrogenic toxin* dibanding *streptococcus* strain A (Anirban *et al.*, 2003). Streptokinase digunakan secara luas untuk mengatasi masalah penyakit *myocardiac infark* dan penyakit jantung lainnya, karena kemampuannya dalam mendegradasi gumpalan fibrin yang terbentuk pada pembuluh darah, sehingga mampu mengatasi masalah yang ditimbulkan akibat sumbatan pada pembuluh darah (Tjay, 2007). Aktivitas streptokinase disebut diekspresikan dalam satuan International Units (IU) (Anonymous, 2007). Streptokinase bekerja tidak selektif dan aktivitasnya luas, sehingga mampu menyebabkan terjadinya fibrinolisis dan pemecahan fibrinogen di seluruh sistem peredaran darah (Sacher, 2004).

Mekanisme kerja streptokinase adalah sebagai plasminogen *activator*, mengaktifkan terjadinya *fibrinolysis*. Aktivasi plasminogen yang berlebihan mampu memicu terjadinya terjadinya akumulasi dan deposisi dari *epithel mesenchymal transition*. Plasminogen teraktivasi dan berubah menjadi plasmin, maka plasmin menyebabkan pemecahan protein matriks ekstraselular. Pemecahan protein matriks ekstraselular akan terakumulasi dan terdeposisi akan menginduksi keberadaan fibroblas dan myofibroblas pada sel-sel ginjal, sehingga terbentuk jaringan fibrosa pada ginjal (Pardede, 2009).

## 2.6 Enzim Protease

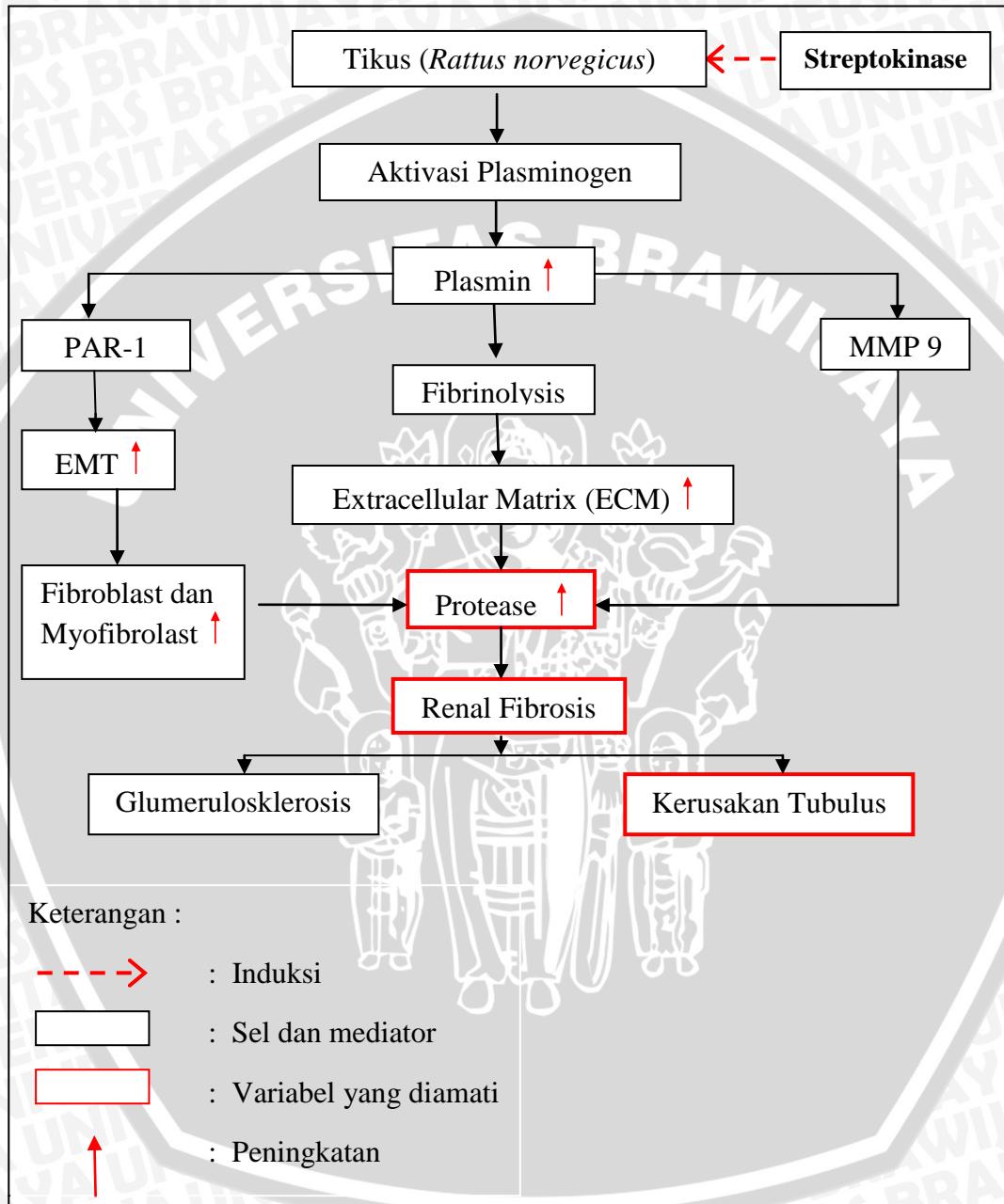
Enzim merupakan biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai biokatalis (Winarno, 1993). Protease merupakan enzim hidrolase yaitu enzim yang memecah protein (Erez *et al.*, 2009). Menurut persetujuan internasional, satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai satu mikromol produk per menit pada kondisi optimal enzim tersebut (Lehninger, 1995).

Protease dibagi menjadi dua golongan besar yaitu ekstraseluler dan intraseluler. Protease yang bersifat ekstraseluler adalah enzim yang menghidrolisis substrat polimer protein berukuran besar menjadi kecil sehingga dapat dimanfaatkan oleh sel yang menghasilkannya. Protease intraseluler berperan penting dalam proses pembentukan dan germinasi spora, aktivitas patogenik beberapa virus, proses koagulasi darah, fibrinolisis, pengontrolan tekanan darah, proses modifikasi serta ekskresi berbagai enzim (Rao *et al.*, 1998).

Aktivitas protease yang tinggi dapat merusak sel-sel ginjal, sehingga mengalami disfungsi. Aktivitas protease meningkat dan memecah protein pada ginjal secara berlebihan mengakibatkan tingginya produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam ginjal. Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebihan mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan. *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan molekul yang terbentuk karena adanya reaksi reduksi pada oksigen yang bersifat radikal (Wati *et al.*, 2013).

### BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Streptokinase merupakan *plasminogen activator* yang mengubah plasminogen menjadi plasmin sehingga mengakibatkan terjadinya fibrinolisis dan degradasi matrix. Plasmin secara langsung menginduksi tubulus menjadi *epithelial mesencymal transition* dengan mekanisme *Protein Activator Receptor-1* (PAR-1) (Zhang *et al.*, 2007). Plasminogen yang aktif mengakibatkan sitokin berikatan dengan receptor LPR-1 untuk menginduksi ekspresi MMP-9, yang memfasilitasi *epithelial mesencymal transition* dengan mendestruksi *tubular base membran* (Yang *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006). Akumulasi matrix protein menyebabkan terjadinya *progressive renal scarring*, yaitu dengan terjadinya proses peningkatan sintesis protein, jika *sintesis matrix* terlalu banyak terakumulasi menyebabkan terjadinya lesi pada ginjal yang merupakan awal kerusakan pada organ ginjal. Pada saat ginjal mengalami kerusakan maka aktivitas protease meningkat. Terjadinya akumulasi matrix protein yang berlebihan akan mengalami kerusakan struktur ginjal dan fungsinya, terjadinya kerusakan tubulus yaitu terjadinya *atrophy* tubulus atau sampai terjadinya *tubular ischemia* karena proses apoptosis dan nekrosis pada ginjal (Eddy, 2000).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) meningkatkan aktivitas enzim protease.
2. Induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) dapat merusak tubulus ginjal berdasarkan gambaran histopatologi.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-April 2013 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. Soetomo, Surabaya.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 10 minggu. Berat badan tikus antara 150-250 gram. Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan Kusriningrum (2008):

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,7$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok. Sehingga diperlukan 20 hewan coba.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, kelompok streptokinase 1 diinjeksi dengan dosis 6.000 IU pada hari pertama dan dibedah pada hari ke 16, kelompok streptokinase II diinjeksi Streptokinase 6.000 IU sebanyak 2 x yang diberikan pada hari pertama dan hari ke enam kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke 16. Kelompok streptokinase III diinjeksi Streptokinase dengan dosis 6.000 IU sebanyak 3 x yang diberikan pada hari pertama, hari ke enam dan hari ke 11, kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke 16.

Kelompok kontrol merupakan tikus tanpa perlakuan. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan. Skema kerja penelitian ini terdapat pada Lampiran 1.

### 4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- |                     |  |
|---------------------|--|
| Variabel bebas      | : Pemberian streptokinase                                |
| Variabel tergantung | : Aktivitas enzim protease dan histopatologi ginjal.     |
| Variabel kendali    | : Berat badan tikus, umur tikus dan jenis kelamin tikus. |

### 4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Streptokinase (Streptase), PBS, Formaldehyde 10%, dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Merck



KgaA, 64271 Darmstadt, Germany), HCl (Merck), KCl (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), NaCl (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck), Tween-20 (Biorad), NaN<sub>3</sub> (Biorad), Tris-HCl (Biomedical), KMnO<sub>4</sub> (Merck), *Poly Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF) (Sigma), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), NaOH (Merck), tirosin (Merck), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), xilol, parafin, akuades steril, *Tri Chloro acetic Acid* (TCA) 4% (Sigma).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak plastik berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm yang ditutupi dengan penutup berbahan kawat sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas objek, labu takar, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas, gelas arloji, mortar, mikro pipet, penangas air, *waterbath*, *stirrer*, tabung *polipropilen*, pH meter (Inolab-WTW), penjepit, mitokrom, neraca analitik (Sartoric basic P-160), seperangkat alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV-VIS, mikroskop cahaya (Nikon), *autoclave*.

#### **4.6 Tahapan Penelitian**

##### **4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan**

Tikus yang digunakan diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Tikus ditempatkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan.



Kandang terbuat dari bak plastik dan ditutupi dengan penutup berbahan kawat.

Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan, suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

#### **4.6.2 Preparasi streptokinase**

Streptokinase 1.500.000 IU dilarutkan dalam 2 ml ringer laktat kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Diambil 1 ml dan dilarutkan dalam ringer laktat sebanyak 5ml. Hasil pengenceran 1 ml streptokinase mengandung 150.000 IU. 40  $\mu$ l streptokinase mengandung 6000 IU. Perhitungan larutan pada Lampiran 2.

#### **4.6.3 Tatalaksana Injeksi Streptokinase**

Injeksi streptokinase secara intravena dilakukan dengan dosis 6.000 IU pada bagian ekor. Perlakuan antar kelompok yang diinduksi streptokinase terdiri dari empat kelompok yaitu :

Perlakuan I : kelompok kontrol, tikus sehat yang tidak diinduksi streptokinase, pembedahan dilakukan pada hari ke 16.

Perlakuan II : Tikus diinduksi streptokinase pada hari pertama dan dilakukan pembedahan pada hari ke 16.

Perlakuan III : Tikus diinduksi streptokinase pada hari pertama, dan hari ke enam, pembedahan dilakukan pada hari ke 16.

Perlakuan IV : Tikus diinduksi streptokinase pada hari pertama, hari ke enam dan hari ke 11. Pembedahan dilakukan pada hari ke 16.



#### 4.6.4 Pengambilan Organ Ginjal

Pengambilan organ ginjal pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16. Langkah awal yang dilakukan adalah melakukan dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan dan bagian ginjal diisolasi. Organ ginjal dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin, kemudian ginjal bagian kiri disimpan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan disimpan dalam *refrigerator* sebagai bahan isolasi enzim protease. Ginjal bagian kanan dimasukkan kedalam larutan PFA 10 % untuk pembuatan preparat histologi.

#### 4.6.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease.

Pengukuran aktivitas protease dimulai dengan melakukan isolasi protease. Setelah mendapatkan protease dari ginjal, agar dapat mengukur aktivitas protease terlebih dahulu membuat kurva baku tirosin untuk mengetahui panjang gelombang maksimal. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas protease hasil isolasi dari ginjal tikus. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Keterangan :  
v = volume total sampel (mL)  
q = waktu inkubasi (menit)  
f<sub>p</sub> = faktor pengencaran  
p = jumlah enzim (ML)

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat Histologi

Semua kelompok dari tiap perlakuan yang dilakukan pada tikus, dimatikan pada hari ke-16. Organ ginjal dicuci menggunakan NaCl fisiologis 0,9% untuk

mengilangkan darah. Organ ginjal kemudian direndam dalam larutan PFA 10%.

Tahapan pembuatan preparat histologi ginjal berdasarkan metode Wati (2013) terdiri dari fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek serta menggunakan pewarnaan HE. Skema kerja pembuatan preparat histologi terdapat pada Lampiran 4.

#### 4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil perlakuan aktivitas enzim protease dianalisis menggunakan Analisis Ragam ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan  $\alpha = 0.05$  untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Data yang diperoleh dari hasil gambaran histopatologi dianalisis menggunakan analisis deskriptif.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Induksi Streptokinase Terhadap Aktivitas Enzim Protease Ginjal

Tikus (*Rattus norvegicus*).

Hasil pengukuran aktivitas protease pada ginjal hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) tertera pada Tabel 5.1. Unit aktivitas protease dari ginjal *Rattus norvegicus* didefinisikan sebagai banyaknya unit tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi dari ginjal *Rattus norvegicus* pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37 °C dan waktu inkubasi 60 menit.

**Tabel 5.1** Peningkatan Aktivitas Protease Rata-rata

Kelompok	Rata-rata Aktivitas Protease	Peningkatan Aktivitas Protease (%)
Perlakuan A (kontrol)	0,099 ± 0,020 <sup>a</sup>	0
Perlakuan B (Dosis 6000IU 1x)	0,148 ± 0,059 <sup>b</sup>	32,5
Perlakuan C (Dosis 6000IU 2x)	0,249 ± 0,009 <sup>c</sup>	59,9
Perlakuan D (Dosis 6000IU 3x)	0,36 ± 0,002 <sup>d</sup>	72,5

Keterangan : Notasi menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P<0,005).

Kelompok kontrol menunjukkan nilai aktivitas protease sebesar  $0,099 \pm 0,020$  nmol.mL/menit. Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Perhitungan uji statistik secara lengkap dapat dilihat pada

Lampiran 6. Perlakuan 1 (B) yang diinduksi streptokinase 6000 IU 1X memiliki nilai rata-rata aktivitas protease sebesar  $0,148 \pm 0,059$  nmol.mL/menit. Perlakuan 2 (C) yang diinduksi streptokinase 6000 IU 2X memiliki nilai rata-rata aktivitas protease sebesar  $0,249 \pm 0,009$  nmol.mL/menit. Kelompok tikus pada perlakuan 3 (D) yang diinduksi streptokinase 6000 IU 3X memiliki nilai rata-rata aktivitas protease tertinggi  $0,36 \pm 0,002$  nmol.mL/menit. Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) Lampiran 6 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata keempat kelompok perlakuan tersebut ( $P < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap masing-masing kelompok. Aktivitas protease pada perlakuan 1 yang diinduksi streptokinase 6000 IU 1X mengalami peningkatan aktivitas protease sebesar 32,5%, pada perlakuan 2 yang diinduksi streptokinase 6000 IU 2X dengan jangka waktu pemberian 5 hari aktivitas protease meningkat sebesar 59,9 % dan perlakuan 3 yang diinduksi streptokinase 6000 IU 3X dengan jangka waktu pemberian 5 hari merupakan peningkatan aktivitas protease paling tinggi yaitu sebesar 72,5 %. Perhitungan aktivitas protease secara lengkap disajikan pada Lampiran 7. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan streptokinase dapat meningkatkan aktivitas enzim protease.

Pemberian streptokinase dilakukan dengan interval waktu pemberian 5 hari untuk mendapatkan hewan model fibrosis ginjal, karena streptokinase memiliki waktu paruh yang pendek dan jika diberikan lebih dari 5 hari maka tubuh akan membentuk antibodi streptokinase sehingga tidak efektif untuk membuat hewan coba fibrosis. Hal ini sesuai dengan pendapat Budhiarta (2007) bahwa jika terbentuk antibodi streptokinase mengurangi efektivitas dan lebih sedikit menimbulkan reaksi

alergi maka pengulangan dosis lebih dari 5 hari tidak akan memberikan hasil yang baik untuk menyebabkan reaksi alergi.

Aktivitas protease secara normal pada ginjal berfungsi sebagai pertahanan struktur ginjal. Enzim protease pada ginjal normal berfungsi untuk memecah matrix protein. Pembentukan matrix protein dan pemecahan matrix protein harus seimbang untuk mencegah terjadinya fibrosis pada ginjal, hal ini sesuai dengan pendapat Eddy (2000) bahwa pada ginjal normal memiliki aktivitas protease. Tingginya peningkatan aktivitas protease pada perlakuan B, C, dan D karena streptokinase yang merupakan plasminogen aktivator merubah plasminogen menjadi plasmin sehingga terjadi fibrinolisis dan degradasi matrix. Fibrinolis berperan pada proses proteolitik yang mendegradasi fibrin menjadi *fibrin degradation product* (FDPs). *Fibrin degradation product* (FDPs) adalah hasil dari pemecahan fibrin pada proses fibrinolisis. Jika terjadi akumulasi hasil pemecahan fibrin dan protein *ekstraceluler matriks* pada ginjal akan menyebabkan terbentuknya fibrosis pada ginjal. Hal ini sesuai dengan pendapat Sacher (2004) yang menyatakan bahwa pada saat terjadinya fibrinolisis dan pemecahan protein *ekstraceluler matriks* di seluruh sistem peredaran darah kemudian terakumulasi di ginjal, hal ini akan memicu terjadinya fibrosis pada ginjal. Selain itu efek proteolitik pada saat terjadi fibrinolisis adalah plasmin dapat mengaktifkan matrix metalloproteinases (MMP-9) untuk mendegradasi *extracellular matrix* (ECM) (Odekon *et al.*, 1994). Tingginya aktifitas MMP-9 memicu terjadinya kerusakan pada membran sel tubulus.

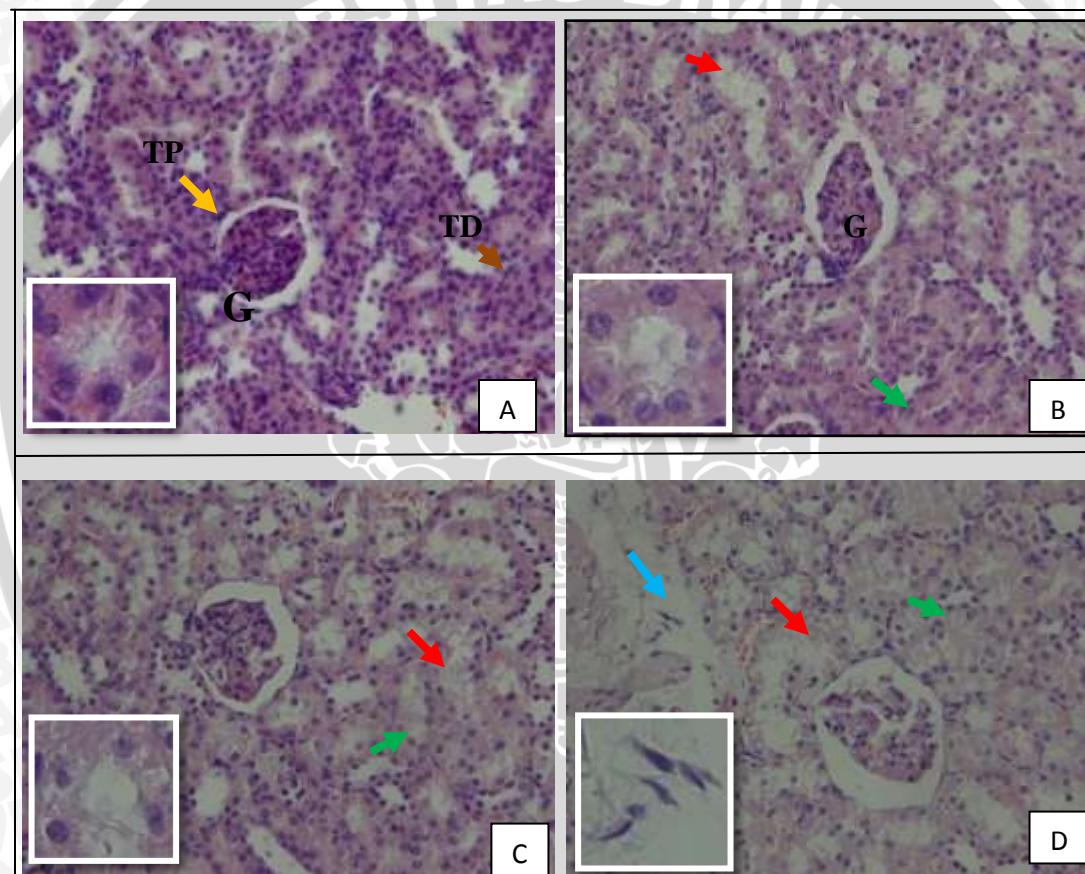
Plasmin juga dapat mengaktifkan *Protease Activator Reseptor -1* (PAR-1).

PAR-1 tidak hanya berperan sebagai *platelet-derivied growth factor, connective tissue growth factor, transforming growth factor - $\beta$*  tetapi juga berperan sebagai aktivasi dan proliferasi fibroblas, *myofibroblas transformation* dan menginduksi produksi kolagen (Wilberding *et al.*, 2001; Langer *et al.*, 2006; Chambers *et al.*, 2002 & Macfarlance *et al.*, 2001). Pada saat terjadinya sintesa kolagen yang berlebihan maka aktifitas protease meningkat untuk menghancurkan akumulasi matrix protein. Akumulasi matrix protein jika terlalu banyak akan menyebabkan terjadinya lesi pada ginjal yang merupakan awal kerusakan pada organ ginjal. Hal ini sesuai dengan pendapat Eddy (2000) yang menyatakan bahwa pada saat ginjal mengalami kerusakan maka aktivitas protease meningkat.

## 5.2 Pengaruh Induksi Streptokinase Terhadap Gambaran Histopatologi

### Tubulus Ginjal Tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Hasil pengamatan histopatologi tubulus ginjal (Gambar 5.1) menunjukkan bahwa pemberian streptokinase mengakibatkan terjadinya kerusakan epitel tubulus, mulai menghilangnya inti sel dan terbentuknya fibroblas.



**Gambar 5.1** Gambaran histopatologi tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE, perbesaran 400X.

Keterangan : (A) Ginjal Tikus Kontrol ; (B) Perlakuan 1 induksi streptokinase 6000 IU 1 X ; (C) Perlakuan 2 induksi streptokinase 6000 IU 2X ; (D) Perlakuan 3 induksi streptokinase 6000 IU 3 X. (↑) kerusakan epitel tubulus; (↑) Inti sel epitel mulai menghilang; (↑) Fibroblas; (G) Glomerulus. (TD) Tubulus Distal; (TP) Tubulus Proksimal. Gambar insert (A) Epitel tubulus normal ; (B) Kerusakan epitel dan inti sel mulai menghilang ; (C) Kerusakan sel epitel dan matinya sel ; (D) Sel fibroblas.

Hasil histopatologi pada kelompok kontrol (Gambar 5.1 A) yang tidak mendapat induksi streptokinase menunjukkan gambaran histopatologi epitel tubulus terlihat normal dengan inti sel masih berada di dalam sitoplasma, epitel berbentuk kubus selapis. Pada sel tubulus proksimal terlihat *brush border* yang masih teratur ditunjukkan pada panah oranye dan tubulus distal memiliki lumen yang rapi ditunjukkan pada tanda panah coklat.

Gambaran hasil histopatologi pada kelompok perlakuan secara keseluruhan dapat dikatakan mengalami kerusakan dengan tingkat kerusakan yang paling parah pada perlakuan 3 yaitu dengan induksi streptokinase sebanyak tiga kali. Hasil histopatologi dari kelompok perlakuan 1 (B) yang diinduksi streptokinase 1X 6000 IU (Gambar 5.1 B) menunjukkan adanya kerusakan sel epitel tubulus tidak berbentuk kubus selapis dan inti sel tubulus mulai menghilang namun batasan antara tubulus masih terlihat jelas. Induksi streptokinase mengakibatkan plasminogen aktif menjadi plasmin di dalam darah ketika jumlah plasmin meningkat, ekspresi TGF- $\beta$  juga meningkat. Peningkatan TGF- $\beta$  secara langsung akan menekan dan menurunkan ekspresi E-cadherin, karena terjadinya penurunan E-cadherin maka mengakibatkan kerusakan sel tubulus ginjal. *E-cadherin* merupakan senyawa glikoprotein transmembran yang memegang peranan penting dalam adhesi sel. Didukung oleh Aresu & Rastaldi (2008) yang menyatakan bahwa penurunan *E-cadherin* akan mengakibatkan perlekatan antar sel epitel jaringan ginjal menjadi renggang, sehingga kondisi sel menjadi tidak stabil.

Perlakuan 2 yang diinduksi streptokinase 2X 6000 IU (Gambar 5.1 C) menunjukkan adanya kerusakan sel epitel tubulus, inti sel mulai menghilang dan batasan antara sel tubulus satu dengan yang lain sudah mulai sulit dibedakan. Kerusakan interstitial tubulus karena peningkatan sintesis matrix protein yang berlebihan pada bagian interstitial sehingga batasan antar tubulus satu dengan tubulus lain sulit dibedakan. Hal ini sesuai dengan pendapat Jennette (2000) bahwa fibrosis ginjal secara histopatologi ditandai dengan kerusakan tidak terlihatnya *interstitial*. Induksi streptokinase menyebabkan aktivasi plasminogen menjadi plasmin yang berlebih, sehingga terjadi peningkatan plasmin dalam darah. Plasmin secara tidak langsung dapat mengaktifasi sitokin berikatan dengan receptor LPR-1 untuk menginduksi ekspresi MMP-9, yang memfasilitasi *epithelial mesencymal transition* dengan mendestruksi membrane basal tubulus. Membran basal tubulus berfungsi sebagai pemberi batasan antara sel tubulus dengan interstisial (Yang *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006). Jika terjadi kerusakan pada sel membran basal tubulus maka batasan antar sel tubulus satu dengan yang lain sulit dibedakan.

Perlakuan 3 yang diinduksi streptokinase 3X 6000 IU (Gambar 5.1 D) menunjukkan kerusakan sel epitel paling parah dan sudah mengalami proses nekrosis. Nekrosis yang terlihat pada gambaran tubulus ini adalah inti sel sudah banyak mengalami kematian, lumen tubulus mengalami kerusakan dan sel tubulus proksimal tidak memiliki *brush border*. Penggunaan streptokinase menyebabkan hipotensi atau *low cardiac output* yang dapat menginduksi *azotemia* dan menyebabkan terjadinya nekrosis tubulus, jika terjadi hipotensi pada tubulus maka menyebabkan

ischemia pada ginjal (Birnbaum *et al.*, 1994). Didukung oleh Eddy (2000) yang menyatakan bahwa proses nekrosis terjadi karena ischemia. Jika terjadi ischemia pada ginjal maka menyebabkan kurangnya adenosine trifosfat (ATP) sebagai sumber energi sel sehingga menyebabkan terjadinya nekrosis (Checille, 1999). Begitu juga dengan pemberian bahan bersifat *nefrotoxic* mengakibatkan terjadinya nekrosis pada tubulus ginjal, karena tubulus ginjal berfungsi sebagai reabsorsi sehingga kemungkinan besar terjadi kerusakan akibat toksin yang tinggi.

Pada kelompok perlakuan 3 (Gambar 5.1 D) terlihat mulai terbentuknya jaringan ikat pada tubulus dan terdapat fibroblas pada tanda panah biru. Hal ini sesuai dengan pendapat Liu *et al.*, (2006) fibrosis ginjal ditandai dengan infiltrasi sel infamasi, aktivasi fibroblas dan meningkatnya *extracellular matrix* (ECM). Pemberian streptokinase dapat menyebabkan peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  melalui mekanisme *binding* dengan LRP-1, plasmin juga berperan dalam proses fibrinolisis dan post- translasi aktivasi TGF- $\beta$  dari bentuk *Latent Transforming Growth Factor  $\beta$*  (LTGF- $\beta$ ) menjadi bentuk aktif yaitu TGF- $\beta$  sehingga peningkatan jumlah plasmin dalam darah akan diikuti dengan peningkatan TGF- $\beta$  akibat adanya peningkatan aktivasi LTGF- $\beta$  menjadi TGF- $\beta$  (Hu, 2008). TGF- $\beta$  merupakan sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrosis yang mengaktifkan patomekanisme biomolekuler pada penyakit fibrosis ginjal, melalui mekanisme *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) (Border dan Noble, 1994; Chen, 2012). Ketika TGF- $\beta$  mengaktifkan proses *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT) akan terjadi perubahan sel-sel epitel ginjal menjadi sel-sel fibroblas. Gambaran histopatologi sel fibroblast pada penelitian

ini terlihat berbentuk runcing dan memanjang dengan penjuluran sitoplasma, inti sel berbentuk lonjong dan pipih. Sel fibroblas yang terbentuk merupakan diferensiasi dari sel epitel ginjal.

Perubahan sel-sel epitel menjadi sel-sel fibroblas akan menyebabkan terjadi jaringan parut ginjal dengan meningkatnya produksi kolagen, fibronectin, proteoglican dan penghambatan degradasi kolagen sehingga fibrosis ginjal terjadi (Border dan Noble, 1994).



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

- 1 Induksi streptokinase dengan dosis 6000 IU sebanyak tiga kali meningkatkan aktivitas enzim protease paling tinggi.
- 2 Gambaran histopatologi ginjal yang paling parah pada hasil induksi streptokinase dengan dosis 6000 IU sebanyak tiga kali terlihat sel epitel tubulus mengalami nekrosis dan terbentuknya fibroblas.

### 6.2 Saran

Perlu dikaji lebih lanjut efek induksi streptokinase yang menggunakan dosis terapi bersifat reversible sehingga mencari terapi dengan menggunakan herbal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2007. Product Monograph Streptase (Streptokinase Injection). CSL Behring Canda Inc.Ottawa. Ontario.
- Anonymous. 2008. *Streptase Streptokinase*. <http://www.rxlist.com/streptse-drug.html>. [12Februari 2013].
- Anonymous. 2010. Annual Report Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the united States. NIH. NIDDKD.
- AOAC, International. 2005. *Officials Methods Of Analysis Of AOAC International*. 2 Vols. 16 edition. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Arniban, B., Y. Chisti and U.C. Banarje. 2003. *Streptokinase A Clinically Usefull Thrombolytic Agent*. Research Review Paper. *Biotechnology Advance*. 287-307.
- Aresu, L., and M.P Rastaldi. 2008. Dog as model for down expresion of E-cadherin and B-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. Renal Research Laboratory. Italy.
- Bascands, J.L and J.P. Schanstra. 2005. *Obstructive Nephropathy Insights From Genetically Engineered Animals*. *Kidney Int*. 68:925-937.
- Birnbaum Y., D. Hasdai., B. Stahl. 1994. Renal Adverse Effects of Streptokinase Therapy. *Int J Cardiol*; 46: 1-6.
- Bobadilla, N.A and G. Gamba. 2007. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *American journal of physiology*. Vol. 293. 1 F2-F9.
- Bouros, D., S. Schiza and N. Siafakas. 1999. Utility of Fibrinolytic Agents for Draining Intrapleural Infection. *Semin Respir Infect*. 14:39-47.
- Border and Noble. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1286-92.

- Budhiarta. A.A.G. 2007. Peran Sistem Fibrinolisis Pada Berbagai Proses Fisiologis dan Pathologis. *J Peny Dalam.* Volume 7. No. 3. 231-242.
- Chambers, R.C and G.J. Laurent. 2002. Coagulation Cascade Protease and Tissue Fibrosis. *Biochem Soc Trans.* 30: 194-201.
- Caulfield, J.P., J.J. Reid and M.G. Farquhar. 1976. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Journal of Technical Methods and Pathology.* 34(1): 43-59.
- Chen, Jianchun. 2012. EGFR Signaling Promotes TGF- $\beta$  dependent Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23: 215- 224 doi: 10.1681/asn.2011070645.
- Cho, M. Hyun. 2010. *Renal Fibrosis.* Kyungpook National University School of Medicine. Daegu.
- Checille, N.F.1999. *Introduction to Veterinary Pathology* 2nd Edition. Iowa. Iowa State University Press.
- Davidson, G and D.C. Plumb. 2003. Veterinary Drugs Handbook Client Information Edition.
- Dellmann H.D., J.A. Eurell. 2006. *Textbook of Veterinary Histology.* Ed ke-6. USA: Blackwell Publishing.
- Eddy, A.A. 2000. Molecular Basis of Renal Fibrosis. *Pediatric Nephrology.* 15(3-4): 290-30.
- Erez, E., D. Fass and Bibi. 2009. Superoxide, NO, Peroxynitrite and PARP in Circulatory Shock and Inflammation. *Frontiers in Bioscience* 14. 263-269.
- Hsu, C. 2005. Elevated Blood Pressure and Risk for End-Stage Renal Disease In Subjects Without Baseline Kidney Disease. *Arch Intern Med.* Vol.165. No.8.PP 923-928.
- Hu, K., J. Yang., S. Tanaka., S.L. Gonias., W.M. Mars., Y. Liu. 2006. Tissue Type Plasminogen Activator Act as Cytokine That Triggers Intracellular Signal Transduction and Induce Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression. *J Biol Chem.* 281:2120-2127.
- Hu, K., M. Wendy., Mars and Y. Liu. 2008. Novel actions of tissue-type plasminogen activator in chronic kidney disease. *Front Biosci.* 13: 5174–5186.

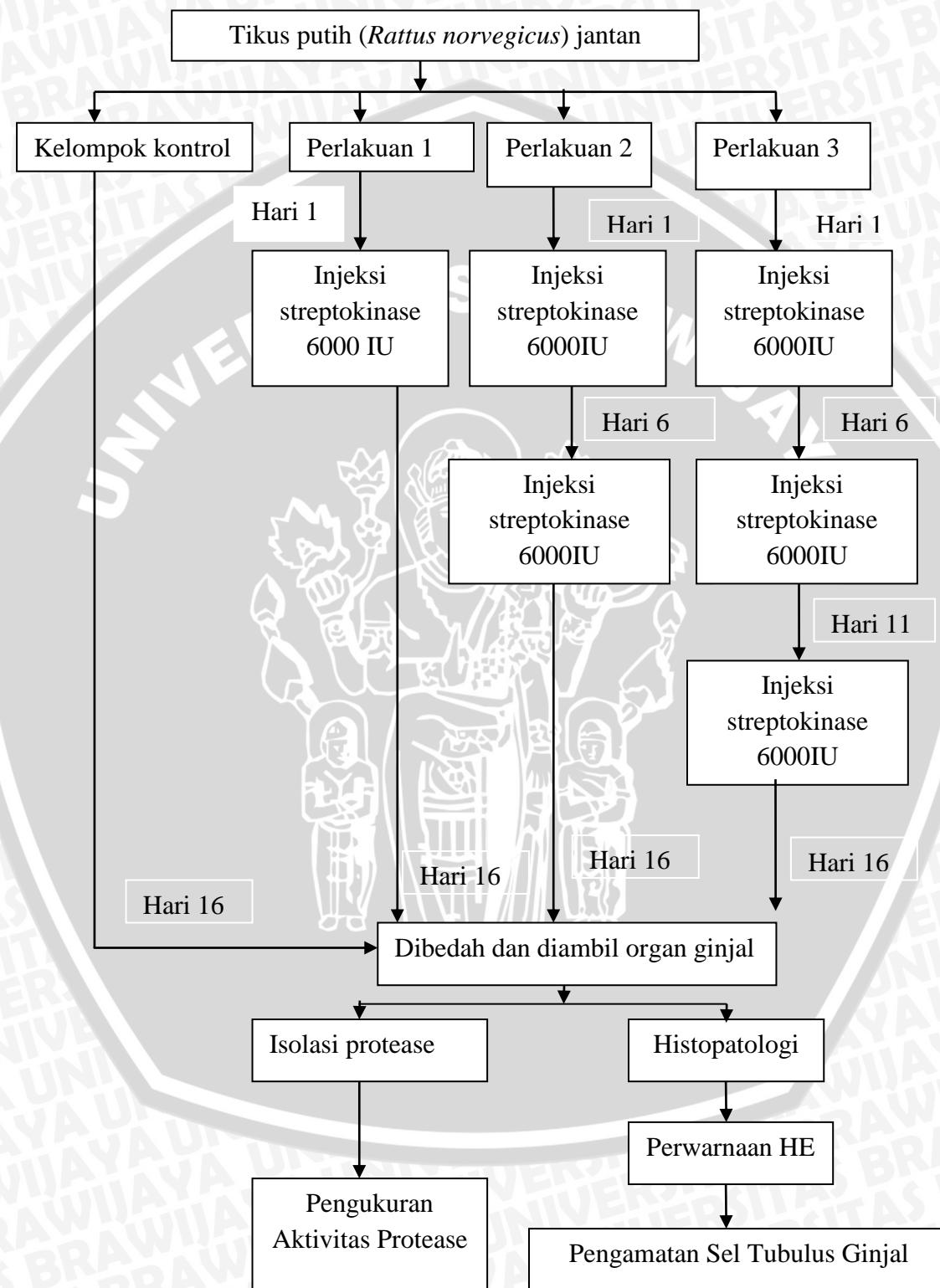
- Jennette, J. C. 2000. Renal Pathology Tutorial.  
<http://www.uncnephropathology.org/jennette/ch1.htm>. [8 Agustus 2013].
- Klag, M. J. 1996. Blood Pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med.* Vol. 334. No.1.PP.13-18.
- Klahr, S and J. Morrissey. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F861-F875.
- Kondo, S., S. Kanigami., H. Kido., Z.F. Strut., G.A. Muller., Y. Kuroda. 2001. Role of Mast Cell Tryptase in Renal Interstitial Fibrosis . *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1668-76.
- Kumar, V., S.C. Ramzi and R.L. Stanley. 2007. *Robins Buku Ajar Patologi*. Volume 1. Edisi 7. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. Hal.35-64.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Larger, .A.J., L. Covic and A. Kulopulos. 2006. Protease Activated Receptors In Cardiovasculer Disease. *Circulation.* 144:1070-1077.
- Liu, Y. 2006 Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 69 213-217.
- Lehnninger, A.L. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*, Alih Bahasa : Maggy Thenawidjaja. Erlangga, Jakarta.
- Macfarlane, S.R., M.J. Seatter and T. Kanke. 2001. Protease Activated Receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 245-282.
- Morrissey. J.J. 2009. Pleiotropic Effects of Amitriptyline Ameliorate Renal Fibrosis. *Kidney Int.* Vol 72. 583-584.
- Odekon, L.E., F. Blasi and D.B. 1994. Requirement For Receptor Bound Urokinase in Plasmin Dependent Cellular Conversation of Laten TGF- Beta to TGF- Beta. *J Cell Physiol.* 158: 398-407.
- Pardede, S., O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomeluronefritis Akut Pascarastreptokokus. Jakarta : Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM.

- Rao, M.B., A.M. Tanksale, Ghatge and V.V. Desphende. 1998. Molecular And Biothechnologycal Aspects Of Microbial Protease. *Microbiology and molecular biology rev.sci* 62: 597-635.
- Rastaldi, M.P., F. Ferrario., L. Giardino., G. Dell Antonio and C. Grillo. 2002. Epithelial-mesenchymal Transition of Tubular Epithelial Cells in Human Renal Biopsies. *Kidney Int.* 62:137-146.
- Robbins, S.L and V. Kumar. 1995. Buku Ajar Patologi II 4th. Jakarta. ECG.
- Sacher, A. 2004. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium Ed:11*. Jakarta : EGC.
- Schnaper, H.W. 2003. Idiopathic Focal Segmental Glumerosclerosis. *Semin Nephrol.* 23. 183-193.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. USA: Elsevier.
- Slattery, C., E. Campbell., T. McMorrow and P. Michael. 2005. Cyclosporine A- Induced Renal Fibrosis A Role for Epithelial- Mesenchymal Transition. Dublin : University College Dubli.
- Suryanto, E. 2003. *Patogenesis Asma*. In: Abdullah HA, Patau MJ, Susilo HT, Saleh K, Tabri NA, Mappangara I, et al eds. Pertemuan Ilmiah Khusus (PIK) X Paru, Sub Bagian Paru-Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK-UNHAS /RS Dr. Wahidin S:Makasar; p.35-41.
- Tjay, T. Hoan and Kirana Rahardja. 2007. *Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Ed:VI*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo.
- Venkatachalam. M. A., A.G. Karen., R. Lan., H. Geng., S.P Saikumar and B.Anil. 2010. Acute Kidney Injury A Springboard For Progression In Chronic Kidney Disease. *AJP Renal Physiol* .Vol. 298. No. 5.F1078-F1094.
- Vergoulas, G. 2009. *Renal Fibrosis*. Review Article. Organ Transplant Unit. Aristotle University. Hippokration Hospital. Thesaloniki. Grace.
- Wati, I.P., Aulanni'am and C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Kimia Student Journal*. Vol.1. No.2. pp 257-263.

- Watson, A. 2001. Indicators Of Renal Insufficiency In Dogs And Cats Presented At Veterinary Teaching Hospital. *Austral Vet Pract*: 31:54-58.
- Walter, H.E. 1984. *Method With Haemoglobin, Casein, And Azocoll As Substrate In. Bergmeyer*. HU (ed). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie. Deerfield Beach Florida Basel.
- Winarno, F.G. 1993. *Pangan Gizi Teknologi dan Konsumen*. PT.Gramedia.Jakarta.
- Wilberding, J.A., V.A. Ploplis and L. McLenan. 2001. Development of Pulmonary Fibrosis In Fibrinogen Devicient Mice. *Ann Acad Sci*. 936: 542-548.
- Yang, J and Y. Liu. 2001. Dissection of Key Events in Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition and Its Implications in Renal Interstitial Fibrosis. *Am J Pathol*. 159:1465–1475.
- Yang, J., R.W., M.W. Shultz., R.E.Mars., Y. Wegner., C. Li ., K. Dui and Nejak. 2002. Disruption of Tissue-type Plasminogen Activator Gene in Mice Reduces Renal Interstitial Fibrosis in Obstructive Nephrology. *J Clin Invest*.110:1525-1538.
- Zhang, J., G. Johnston., B. Stebler and E.T Keller. 2001. *Hydrogen peroxide activates NFkappaB and the interleukin-6 promoter through NFkappaB-inducing kinase*. Antioxid Redox Signal;3:493-504.
- Zhang, G., K.A. Kerman and S.J. Collins. 2007. Plasminogen Promotes Renal Interstitial Fibrosis by Promoting Epithelial To Mesenchymal Transition Role of Plasmin Activated Signals. *J Am Soc Nephrol*. 18: 846-859.



**Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian**



## Lampiran 2. Pembuatan Larutan Streptokinase

Streptokinase sebanyak 1.500.000 IU dilarutkan dalam ringer laktat sebanyak 2 mL dan dihomogengkan dengan vortex kemudian dibagi menjadi 2 stock streptokinase masing-masing berisi 1 mL streptokinase mengandung 750.000 IU. 1 mL kemudian ditambahkan lagi ringer laktat hingga 5 mL dan dihomogengkan menggunakan vortex. Diambil 1 mL dari larutan akhir yang mengandung 150.000 IU. Untuk menyiapkan larutan streptokinase dengan dosis 6000 IU per ekor tikus streptokinase diberikan sebanyak 40  $\mu$ L.

$$\text{Streptokinase yang diberikan} = \text{streptokinase (IU)} \sim \text{isi larutan (mL)}$$

$$= \text{Dosis / streptokinase yg diberikan}$$

$$\text{Streptokinase yang diberikan} = 750.000 \text{ IU} \sim 5 \text{ mL} = 150 \text{ IU}/\mu\text{l}$$

$$= 6000 \text{ IU} / 150 \text{ IU} / \mu\text{l}$$

$$= 40 \mu\text{l}$$



### Lampiran 3. Isolasi Enzim Protease Ginjal

#### 3.1 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

0,025 g tirosin

- dilarutkan dengan 25 mL aquades
- diaduk dengan pengaduk magnetik
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok tirosin 500 ppm

#### 3.2 Pembuatan Larutan Baku Tirosin

4 mL Larutan baku tirosin 500 ppm

- dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

- dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL
- dimasukkan masing-masing larutan kedalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

#### 3.3 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- diukur absorbansinya pada  $\lambda$  maksimum tirosin

Panjang gelombang maksimum

#### 3.4 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

- dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam eppendorf
- diukur absorbansinya pada  $\lambda$  maksimum tirosin 200-300 nm

Kurva Baku Tirosin



### 3.5 Pembuatan Larutan Kasein

0,025 g kasein

- dilarutkan dengan 25 mL aquades
- diaduk dengan pengaduk magnetik
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok Kasein 500 ppm

### 3.6 Isolasi Enzim

Organ Ginjal

- dipotong kecil-kecil
- ditambah larutan PBST-PMSF sebanyak 5x volume sampel
- ditambah sedikit pasir kuarsa
- dihaluskan dengan mortar dalam kondisi dingin

Homogenat

- dimasukkan dalam tabung polipropilen steril
- digetarkan dengan vorteks selama 10 menit
- disonikasi dengan sonikator selama 10 menit
- disentrifus dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm)

Supernatan

Pellet

- ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1
- dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan
- disentrifuse dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm)

Endapan

- dikeringkan di udara bebas hingga bau etanol hilang
- ditambah buffer Tris-HCl dengan 20 mM dengan perbandingan 1:1

Ekstrak kasar protein



### 3.7 Pembuatan Larutan Blanko

Akuades steril

- dipipet 200  $\mu\text{L}$
- dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100  $\mu\text{L}$  ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400  $\mu\text{L}$  larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

Supernatan

Hasil

- dipipet 100  $\mu\text{L}$
- ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada  $\lambda$  maksimum tirosin 200 – 300 nm

### L3.8 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- dipipet 200  $\mu\text{L}$
- dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100  $\mu\text{L}$  ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400  $\mu\text{L}$  larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

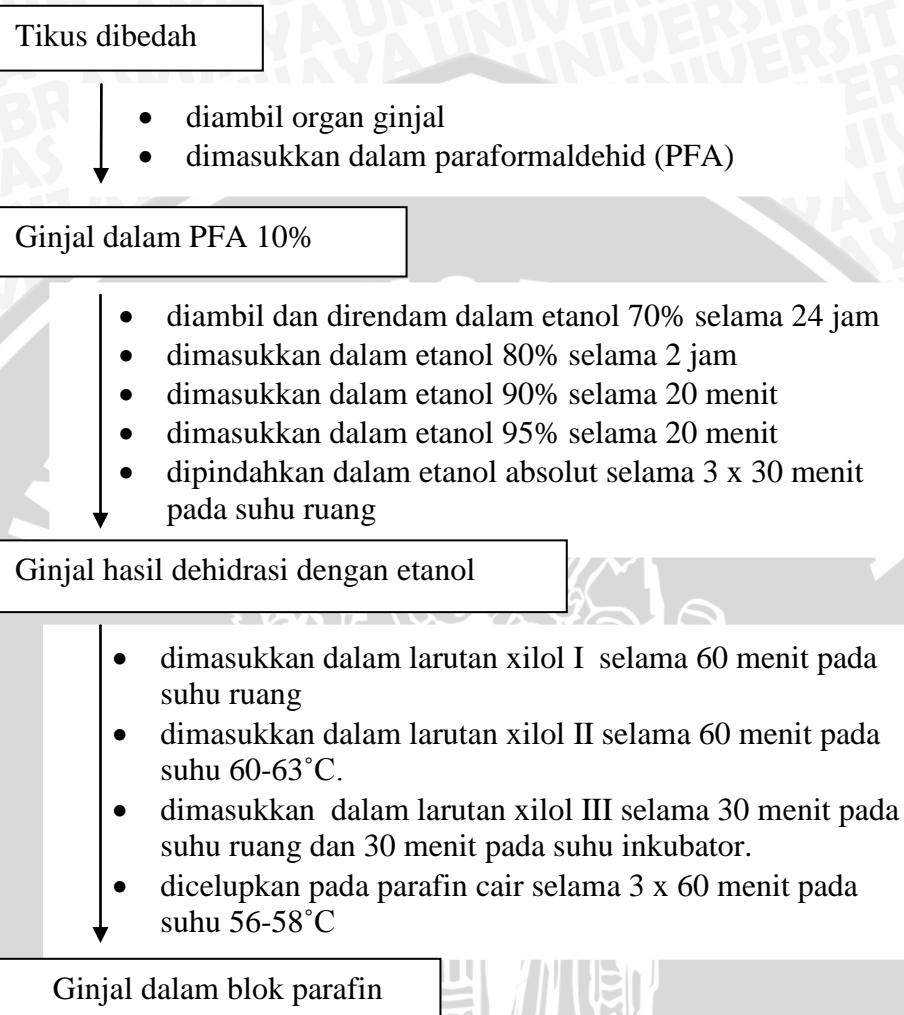
Supernatan

Hasil

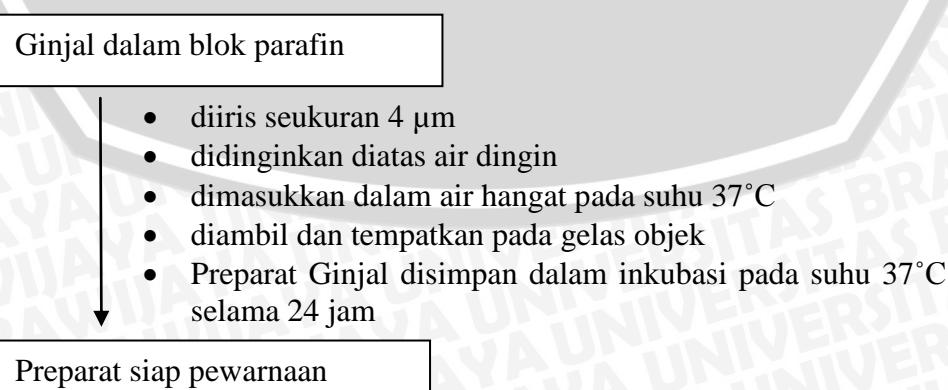
- dipipet 100  $\mu\text{L}$
- ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada  $\lambda$  maksimum tirosin 200-300 nm

## Lampiran 4. Pembuatan Preparat Histologi

### 4.1. Embedding Ginjal



### 4.2. Pembuatan preparat organ



### 4.3 Pewarnaan Hematosilin-Eosin

**Preparat**

- dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- direndam dalam akuades steril selama 5 menit

**Preparat**

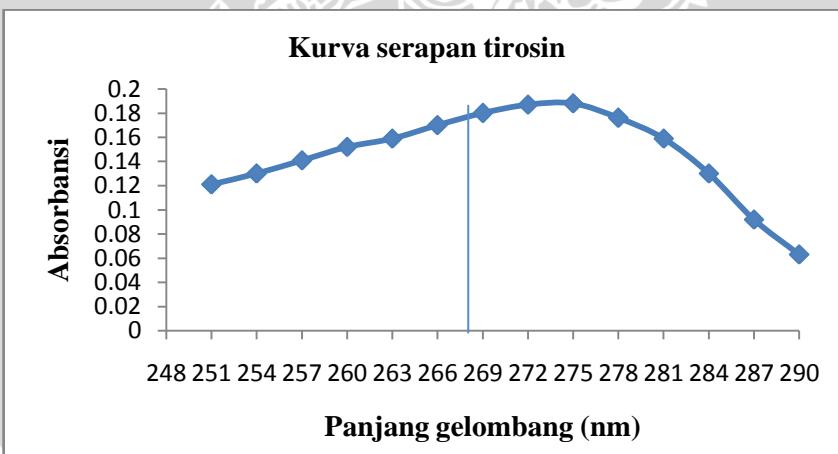
- diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit atau sampai diperoleh hasil terbaik
- dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit
- dicuci air dengan akuades selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- dimasukkan kedalam etanol absolut 3 x 2 menit
- dimasukkan dalam larutan xilol 3 x 3 menit
- dikering anginkan dan ditutup dengan *cover glass*
- *dimounting* dengan menggunakan entellan
- ditutup dengan *cover glass*

**Preparat Hematoksilin Eosin**

**Lampiran 5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin**

**Tabel 5.1. Absorbansi larutan standar tirosin 20 ppm**

$\lambda$ (nm)	Absorbansi
251	0.121
254	0.130
257	0.141
260	0.152
263	0.159
266	0.170
269	0.180
272	0.187
<b>275</b>	<b>0.188</b>
278	0.176
281	0.159
284	0.130
287	0.092
290	0.063

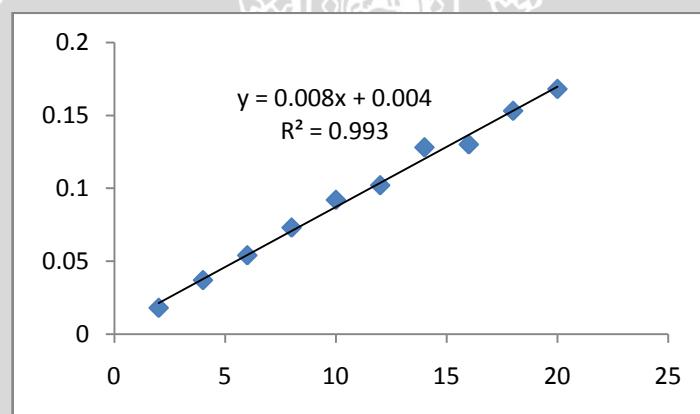


**Gambar 5.1 Kurva serapan tirosin**

## Lampiran 6. Pembuatan Kurva Standar

Tabel 6.1. Absorbansi larutan standar tirosin  $\lambda$  275 nm

[Tirosin] ppm	A <sub>absorbansi</sub>
0	0
2	0,018
4	0,037
6	0,054
8	0,073
10	0,092
12	0,102
14	0,128
16	0,13
18	0,153
20	0,168



Gambar 6.1 Kurva standar tirosin

Tabel 6.2. Data Absorbansi Tirozin

Kelompok	Absorbansi Tirozin				
	1	2	3	4	5
Kontrol	0,162	0,168	0,150	0,240	0,158
Perlakuan 1	0,240	0,264	0,280	0,246	0,268
Perlakuan 2	0,418	0,420	0,460	0,440	0,442
Perlakuan 3	0,626	0,630	0,632	0,628	0,637

## Lampiran 7. Perhitungan Aktivitas Protease

### 7.1 Rumus Perhitungan

Misal : Pengukuran aktivitas protease kontrol dengan waktu inkubasi 60 menit

dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku tirosin :  $y = 0,008x$

Dimana x = konsentrasi tirosin

$$\text{Maka } x = \frac{0,162}{0,008} = 20,25$$

Nilai x merupakan banyaknya tirosin yang terbentuk oleh enzim protease.

Untuk menetukan aktivitas enzim protease digunakan persamaan :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

- Keterangan : v = volume total sampel (mL)  
 q = waktu inkubasi (mL)  
 f<sub>p</sub> = faktor pengencaran  
 P = jumlah enzim (mL)  
 Mr = Berat Molekul Tirosin 181 µg/µmol

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas enzim} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp \\ &= \frac{20,25 \mu\text{g/mL}}{181 \mu\text{g/}\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5 \\ &= 0,111 \times 0,167 \times 5 = \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,092 \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,092 \text{ Unit}\end{aligned}$$

Satu unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol yang terbentuk oleh 1 mL protease per menit.



**Tabel 7.1. Data Aktivitas protease**

Kelompok	Aktivitas Protease					Rata 2	SD
Kontrol	0,092	0,096	0,085	0,136	0,090	0,099	±0,0206
Perlakuan 1	0,136	0,015	0,160	0,140	0,153	0,148	±0,0599
Perlakuan 2	0,239	0,240	0,263	0,251	0,253	0,249	±0,0099
Perlakuan 3	0,358	0,361	0,361	0,364	0,359	0,360	±0,0023

Induksi streptokinase dapat meningkatkan aktivitas protease tikus (*Rattus norvegicus*). Presentasi kenaikan aktivitas enzim protease sebesar sebagai berikut:

### Perlakuan 1

Peningkatan aktivitas protease (%)

$$= \frac{\text{rataan perlakuan 1} - \text{rataan kontrol}}{\text{rataan perlakuan 1}} \times 100\% \\ = \frac{0,148 - 0,099}{0,148} \times 100\% \\ = 32,5 \%$$

### Perlakuan 2

Peningkatan aktivitas protease (%)

$$= \frac{\text{rataan perlakuan 2} - \text{rataan kontrol}}{\text{rataan perlakuan 2}} \times 100\% \\ = \frac{0,249 - 0,099}{0,249} \times 100\% \\ = 59,9 \%$$

### Perlakuan 3

Peningkatan aktivitas protease (%)

$$= \frac{\text{rataan perlakuan 3} - \text{rataan kontrol}}{\text{rataan perlakuan 3}} \times 100\% \\ = \frac{0,360 - 0,099}{0,360} \times 100\% \\ = 72,5 \%$$

### Lampiran 8. Data Dan Uji Statistik Aktivitas Protease

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		protease
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.37545
	Std. Deviation	.180402
Most Extreme Differences	Absolute	.202
	Positive	.202
	Negative	-.168
Kolmogorov-Smirnov Z		.902
Asymp. Sig. (2-tailed)		.390

a. Test distribution is Normal.

#### ANOVA

##### Aktivitas Protease

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.611	3	.204	422.431	.000
Within Groups	.008	16	.000		
Total	.618	19			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable:protease

	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Normal	perlakuan 1	-.084000*	.013883	.000	-.12372	-.04428
		perlakuan 2	-.260400*	.013883	.000	-.30012	-.22068
		perlakuan 3	-.455000*	.013883	.000	-.49472	-.41528
	perlakuan 1	Normal	.084000*	.013883	.000	.04428	.12372
		perlakuan 2	-.176400*	.013883	.000	-.21612	-.13668
		perlakuan 3	-.371000*	.013883	.000	-.41072	-.33128
	perlakuan 2	Normal	.260400*	.013883	.000	.22068	.30012
		perlakuan 1	.176400*	.013883	.000	.13668	.21612
		perlakuan 3	-.194600*	.013883	.000	-.23432	-.15488
	perlakuan 3	Normal	.455000*	.013883	.000	.41528	.49472
		perlakuan 1	.371000*	.013883	.000	.33128	.41072
		perlakuan 2	.194600*	.013883	.000	.15488	.23432

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

### Aktivitas Protease

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup>	Normal	5	.17560		
	perlakuan 1	5		.25960	
	perlakuan 2	5			.43600
	perlakuan 3	5			.63060
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.



## Lampiran 9. Pembuatan Larutan

### 9.1 Pembuatan Larutan Phosphat Buffer Salline (PBS) pH 7,4

Tahapan yang harus dilakukan adalah menimbang KCL sebanyak 0,2 gram, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 gram, NaCl 8 gram dan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O sebanyak 2,16 gram. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan 250 mL akuades steril menggunakan pengaduk magnetik stirer dalam gelas kimia 500 mL dan diatur pH nya hingga mencapai 7,4 dengan pH meter. Setelah itu dipindahkan larutan tersebut kedalam labu ukur 500mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

### 9.2 Pembuatan Larutan Azida (NaN<sub>3</sub>) 1%

NaN<sub>3</sub> yang diperlukan ditimbang dengan perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{NaN}_3 1\% &= 1 \text{ gram} / 100\text{ml} \times 10 \text{ mL} \\ &= 0,1 \text{ gram} \end{aligned}$$

Setelah itu dilarutkan dengan akuades steril dan dimasukan kedalam labu ukur 10 mL diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

### 9.3 Pembuatan Larutan NaCl- Fis 0,9 %

Tahapan yang harus dilakukan adalah menimbang NaCl dengan perhitungan yaitu:

$$\begin{aligned} \text{NaCl-Fis 0,9} &= \underline{0,9 \text{ gram}} \times 1000\text{mL} \\ &\quad 100 \text{ mL} \\ &= 9 \text{ gram} \end{aligned}$$

NaCl dilarutkan dengan akuades steril dalam gelas kimia 250 mL dan dipindah kedalam labu ukur 1000mL ditambah akuades hingga tanpa batas.



#### **9.4 Pembuatan Larutan Formaldehid 10 %.**

Pembuatan formalindehid 10 % dengan mengambil 134,14 mL dari larutan stok formalin 37%. Setelah itu dimasukan dalam labu ukur 500mL. Kemudian ditambah NaCl-Fis 0,9% sampai tanda batas.

#### **9.5 Pembuatan Larutan TCA 4 %.**

TCA ditimbang sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 kedalam gelas kimia 100 ml dan dituang kedalam labu ukur 100 mL diencerkan sampai dengan tanda batas.

#### **9.6 Pembuatan Larutan Kasein 500 ppm**

0,250 gram kasein ditimbang, kemudian dilautkan dengan akuades dan ditambah dengan beberapa tetes NaOH 1 N. Kemudian diencerkan dengan akuades didalam labu ukur 50 mL sampai dengan tanda batas.



**Lampiran 10. Sertifikat Laik Etik**

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p>	
<p><b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b> <b>"ETHICAL CLEARENCE"</b></p>	
<p>No: 132-KEP-UB</p>	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p>	
<p>TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAWAH:</p>	
PENELITIAN BERJUDUL	: STUDI PAPARAN STREPTOKINASE TERHADAP MUNCULNYA FIBROSIS GINJAL : UPAYA MENDAPATKAN HEWAN MODEL TIKUS ( <i>Rattus norvegicus</i> ) FIBROSIS GINJAL DAN MEMPELAJARI PATOMEKANISMENYA.
PENELITI	: PASCARA FAJAR LUKITO
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: KIMIA/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
<p>Malang, 8 April 2013 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya</p>	
 <p>Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001</p>	

