

**Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air
(*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid
(MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase
(SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Urolithiasis**

SKRIPSI

Oleh :

**BONANZA WAHYU PRADANA
0911313016**



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

Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air
(*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid
(MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase
(SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Urolithiasis

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

BONANZA WAHYU PRADANA
0911313016



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*)
terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida
Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Urolithiasis**

**Oleh :
BONANZA WAHYU PRADANA
0911313016**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 23 Oktober 2013
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Dr. Djoko Winarso, drh., MS
NIP. 19530605 198403 1 001

Mengetahui,
Ketua Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

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



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Bonanza Wahyu Pradana
NIM : 0911313016
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis.

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, 23 Oktober 2013
Yang Menyatakan,

(Bonanza Wahyu P.)
NIM. 0911313016

**Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*)
terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida
Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Urolithiasis**

ABSTRAK

Urolithiasis adalah penyakit yang disebabkan oleh adanya akumulasi kristal pada saluran urinasi. Urolithiasis merupakan penyakit yang sering terjadi dan memiliki peringkat kedua di dunia dari semua kasus penyakit saluran urinaria pada hewan kesayangan. Semanggi air (*Marsilea crenata*) memiliki kandungan fitokimia dan mineral, seperti flavonoid dan kalium sebagai antiinflamasi, antioksidan dan diuretik yang dapat mencegah terjadinya urolithiasis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dalam menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL). Kadar MDA dan SOD dianalisis statistika menggunakan uji *oneway* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) apabila terdapat signifikansi dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan konsentrasi. Induksi urolithiasis menggunakan kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%. Dosis perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi dibagi menjadi beberapa konsentrasi, yaitu P3 (5%), P4 (10%), P5 (20%), dan P6 (40%). Induksi urolithiasis dan perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air diberikan secara oral menggunakan sonde lambung selama 10 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian perasan semanggi air dapat mencegah urolithiasis. Kesimpulan bahwa pemberian perasan semanggi air dapat mencegah urolithiasis dibuktikan dengan menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD pada tikus putih urolithiasis.

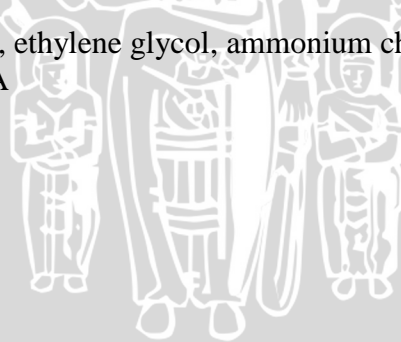
Kata kunci : urolithiasis, etilen glikol, amonium klorida, semanggi air, SOD, MDA

The Effect of Freshly Squeezed Leaves and Stalk of Water Clover (*Marsilea crenata*) Levels Against Superoxide Dismutase (SOD) and Malondialdehida (MDA) in Albino Rat (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis

ABSTRACT

Urolithiasis is a disease caused by the accumulation of crystals in the urinary tract. Urolithiasis is a common disease and has second ranked in the world of all cases in pets urinary tract diseases. Water clover (*Marsilea crenata*) contains phytochemicals and minerals, such as potassium and flavonoids as anti-inflammatory and antioxidant that can inhibit the occurrence of urolithiasis. This study aimed to determine the effect of water clover's leaves and stalks in the lower levels of MDA and increased level of SOD enzyme activity. This study used a complete random design (CRD). MDA and SOD levels were analyzed statistically using oneway ANOVA test with 95% confidence level ($\alpha = 0,05$). The urolithiasis animal model were induced by 0.75% ethylene glycol and 2% ammonium chloride for 10 days. Treatment group was divided into control positive group, treatment 1 (5% dose), treatment 2 (10% dose), treatment 3 (20% dose), treatment 4 (dose 40%) and negative treatment groups (without treatment). Each treatment group consisted of four rats as replication. The results showed that the therapeutic of freshly squeezed water clover could reduce levels of MDA and SOD enzyme activity. Leaves and stalks water clover could reduce the level of MDA and increase the level of SOD enzyme activity in the rat urolithiasis.

Keywords : urolithiasis, ethylene glycol, ammonium chloride, water clover, SOD, MDA



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga skripsi yang berjudul **“Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis”** ini dapat diselesaikan.

Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik melalui bantuan berbagai pihak yang terkait. Oleh karena itu, dalam kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati drh, MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Aulani'am, drh, DESS selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
3. Dr. Sri Murwani, drh., MP yang telah mengizinkan penulis mengikuti penelitian di bawah penelitian beliau dan sebagai dosen pembimbing skripsi I yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan kritik dan saran pada penulisan skripsi ini.
4. Dr. Djoko Winarso, drh., MS selaku dosen pembimbing skripsi II yang bersedia membimbing, membantu, mengarahkan, dan memberikan motivasi kepada penulis selama penyusunan proposal dan hasil skripsi.

5. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc. dan drh. Handayu Untari selaku dosen penguji yang telah bersedia memberikan kritik dan saran pada penulisan.
6. Bapak Drs. Nandar Wahyudi dan Ibu Endang Suwarni serta seluruh keluarga besar yang selalu memberikan nasehat, motivasi, do'a, dan dukungan kepada penulis.
7. Rekan-rekan dalam pelaksanaan penelitian Lelyta D., Jefri H., dan Mardiana K. yang telah berjuang bersama dalam keadaan suka dan duka selama penelitian.
8. Rekan-rekan seperjuangan mahasiswa PKH UB angkatan 2009.
9. Staf Laboratorium Ilmu Faal FK UB.
10. Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan banyak ilmu kepada penulis.
11. Bapak dan ibu staf tata usaha PKH UB yang telah melancarkan urusan administrasi skripsi penulis.
12. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tentu jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya konstruktif sangat penulis harapkan dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 15 November 2013

Penulis

DAFTAR ISI

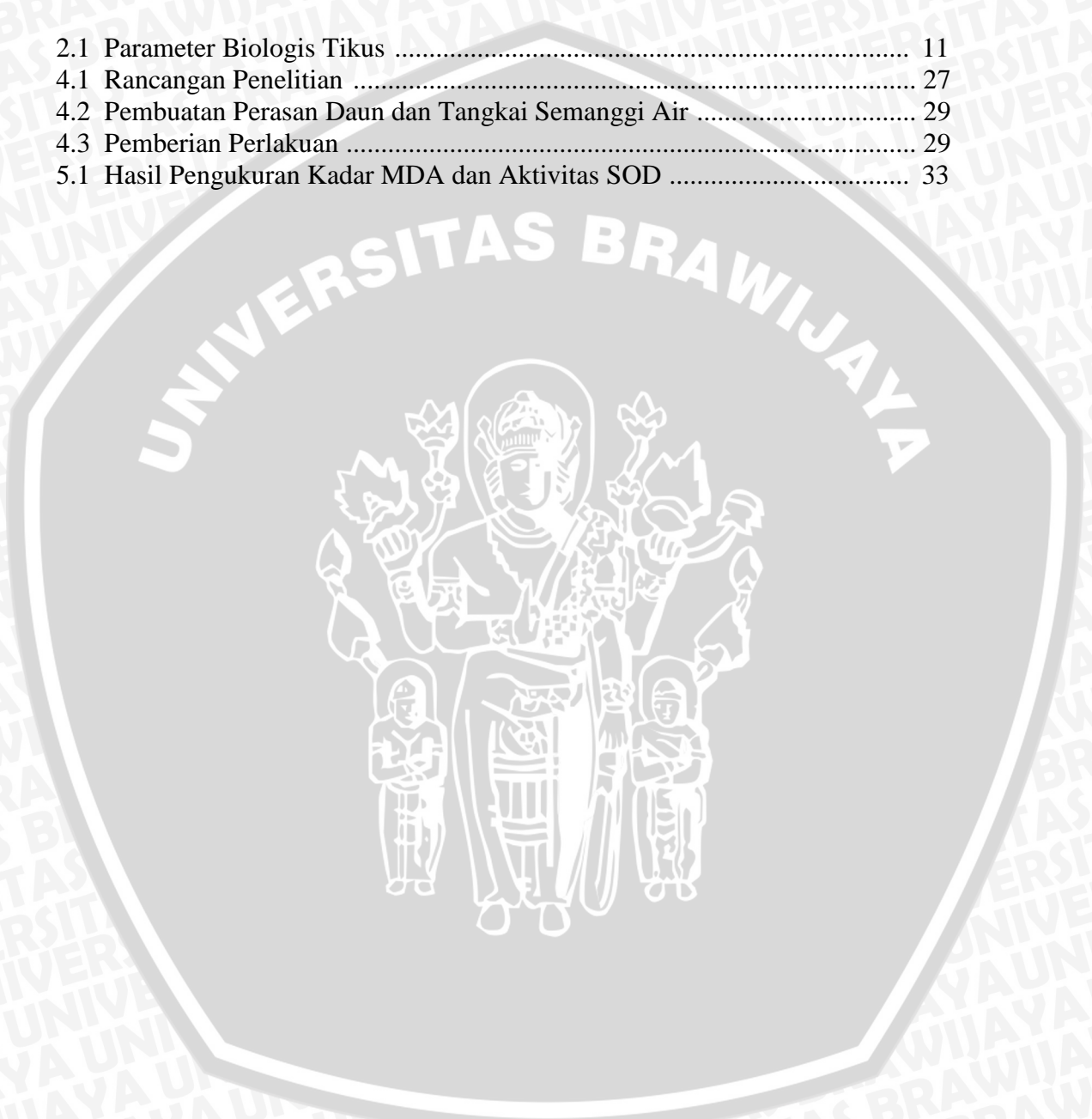
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Semanggi Air (<i>Marsilea crenata</i>)	6
2.1.1 Morfologi Semanggi Air	6
2.1.2 Kandungan Semanggi Air	7
2.1.3 Flavonoid Sebagai Antiinflamasi	8
2.1.4 Flavonoid Sebagai Antioksidan	8
2.1.5 Kalium Sebagai Diuritik	9
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	10
2.3 Definisi Urolithiasis	12
2.4 Tipe Kristal Urolithiasis	12
2.5 Patofisiologi	13
2.6 Stress Oksidatif dan Inflamasi pada Urolithiasis	14
2.7 Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD)	16
2.8 Komposisi Bahan induksi Urolithiasis	18
2.8.1 Etilen Glikol	18
2.8.2 Amonium Klorida	19
BAB 3. KERANGKA KONSEP	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	23
4.2.1 Perawatan Hewan Model	23
4.2.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air	23
4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi	24



4.2.4 Alat Perlakuan Perasan Pada Hewan Model	24
4.2.5 Alat Pembedahan Tikus	24
4.2.6 Pemeriksaan MDA	24
4.2.7 Pemeriksaan SOD	24
4.3 Tahapan Penelitian	24
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	24
4.3.2 Penetapan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air	25
4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis	26
4.3.4 Rancangan Penelitian	26
4.3.5 Variabel Penelitian	27
4.3.6 Analisis Statistik Kadar MDA dan Aktivitas SOD	28
4.4 Prosedur Kerja	28
4.4.1 Persiapan Hewan Model	28
4.4.2 Pemilihan Daun dan Tangkai Semanggi Air	28
4.4.3 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air	29
4.4.4 Pemberian Perlakuan	29
4.4.5 Pengambilan Sampel Serum Darah	30
4.4.6 Pengambilan Sampel Organ Ginjal	30
4.4.7 Pengukuran Aktivitas SOD	30
4.4.8 Pengukuran Kadar MDA	31
4.4.8.1 Pembuatan Kurva Baku MDA	31
4.4.8.2 Pengukuran Kadar MDA	31
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
Pengaruh Pemberian Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air Terhadap Kadar MDA dan Aktivitas SOD	33
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	42
6.1 Kesimpulan	42
6.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49

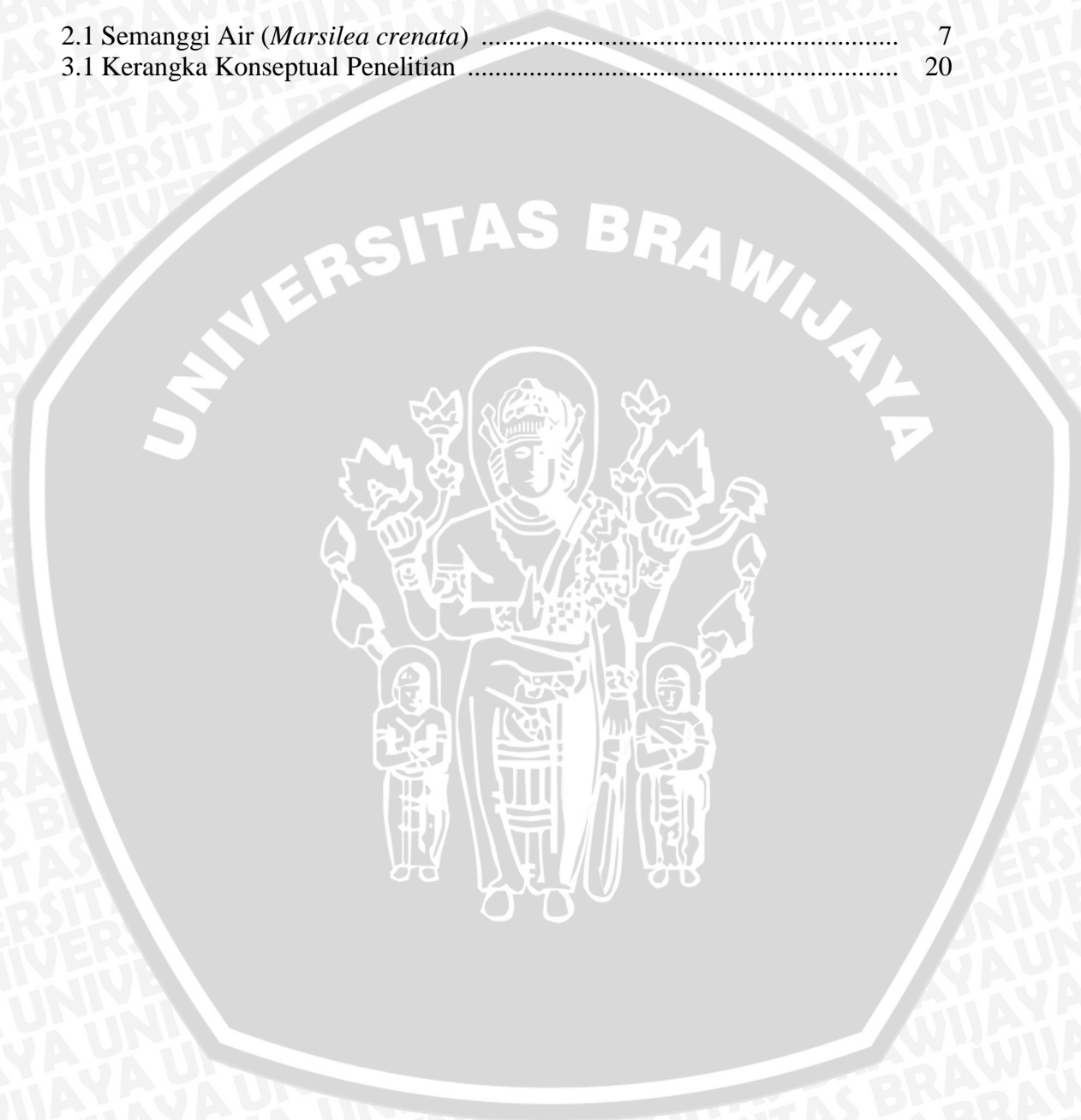
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Parameter Biologis Tikus	11
4.1 Rancangan Penelitian	27
4.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air	29
4.3 Pemberian Perlakuan	29
5.1 Hasil Pengukuran Kadar MDA dan Aktivitas SOD	33



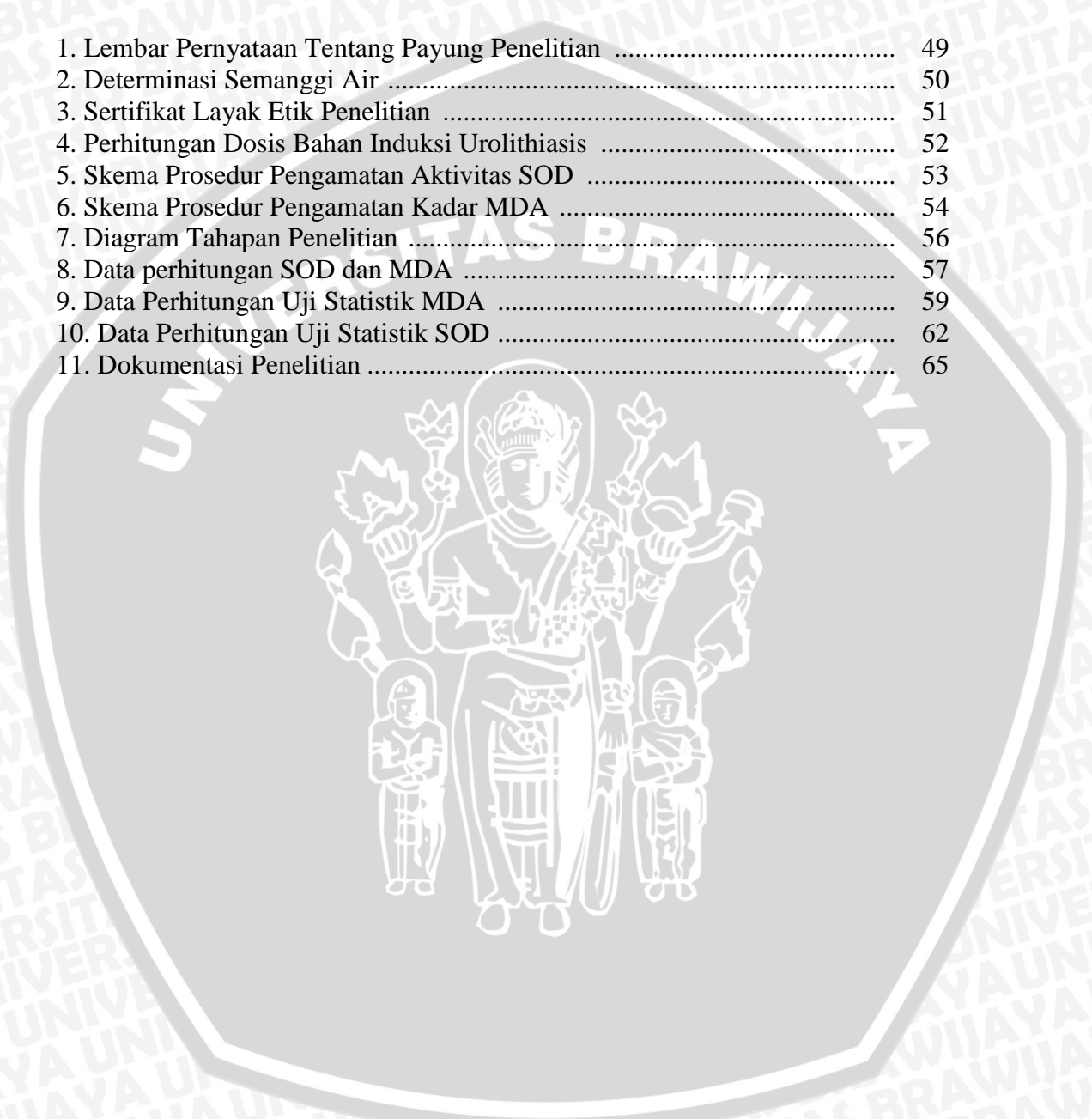
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Semangi Air (<i>Marsilea crenata</i>)	7
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	20



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Lembar Pernyataan Tentang Payung Penelitian	49
2. Determinasi Semanggi Air	50
3. Sertifikat Layak Etik Penelitian	51
4. Perhitungan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis	52
5. Skema Prosedur Pengamatan Aktivitas SOD	53
6. Skema Prosedur Pengamatan Kadar MDA	54
7. Diagram Tahapan Penelitian	56
8. Data perhitungan SOD dan MDA	57
9. Data Perhitungan Uji Statistik MDA	59
10. Data Perhitungan Uji Statistik SOD	62
11. Dokumentasi Penelitian	65



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of variant</i>
BB	berat badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
CaOx	<i>calcium oxalate</i>
DNA	<i>Deoxiribonucleat Acid</i>
g	gram
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HCl	asam klorida
IKK	<i>IkB kinase</i>
IL-1 β	<i>interleukin 1 beta</i>
MDA	malondialdehid
Na-Thio	<i>Sodium Thiobarbituric acid</i>
NaCl	Natrium klorida
NO	Oksida nitrit
Nrf2	<i>nuclear related factor 2</i>
OH	Radikal Hidroksil
O ₂ -	Radikal Superoksida
PBS	<i>phospate buffer saline</i>
PO	per oral
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TCA	<i>Tri Chloro Acetic</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	Standar deviasi
SOD	Superoksida Dismutase
SPSS	<i>statistical package for the social sciences</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
μ l	mikroliter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kasus urolithiasis merupakan kejadian yang sangat umum pada hewan kesayangan, terutama anjing dan kucing. Urolithiasis merupakan masalah yang sering terjadi dalam bidang praktisi veteriner (Ross, 2005). Urolithiasis adalah penyakit yang disebabkan oleh adanya akumulasi kristal pada saluran urinaria (Lulich and Osborne, 2007). Urolithiasis memiliki peringkat kedua di dunia dari semua kasus penyakit saluran urinaria pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing (Sparkes and Philippe, 2008). Menurut Vedrenne, *et al.*, (2003), kejadian urolithiasis paling sering pada sistem urinaria kucing jantan dibanding kucing betina. Kejadian kasus urolithiasis dilaporkan mencapai 0,5-1% per tahun pada populasi kucing di Eropa dan Amerika Selatan (Hesse, 2008).

Kristal kalsium oksalat (CaOx) adalah tipe kristal yang paling sering ditemukan pada anjing dan kucing yang mengalami urolithiasis dengan angka prevalensi 90% (Sparkes and Philippe, 2008) dan mengalami peningkatan setiap tahunnya (Mariyani, 2009). Peningkatan pembentukan kristal (CaOx) pada anjing dan kucing berhubungan dengan diet pakan yang tidak seimbang seperti pakan kering dan mengandung protein yang tinggi (Gisselman, *et al.*, 2009).

Penanganan urolithiasis dapat dilakukan dengan menggunakan obat (farmasetika) dan kateterisasi. Namun setelah dilakukan tindakan penanganan, kekambuhan dari urolithiasis ini sering terjadi. Menurut Sparkes and Philippe

(2008), angka kekambuhan urolithiasis pada anjing dan kucing yaitu 20-50% apabila tidak dilakukan upaya pencegahan (prevensi).

Hewan model urolithiasis yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% yang dilakukan selama 10 hari menyebabkan terbentuknya kristal CaOx pada saluran urinaria (Susilawati, dkk., 2003). Penggunaan tikus putih jantan dikarenakan tikus jantan memiliki struktur anatomi ureter yang sempit dan panjang sehingga resiko terjadinya urolithiasis semakin tinggi.

Pembentukan kristal adalah proses kompleks yang diproduksi oleh beberapa proses fisiokimia seperti peningkatan ekskresi kalsium dan oksalat dalam urin, supersaturasi urin, kristalisasi, agregasi kristal, pertumbuhan kristal, penempelan kristal pada membran sel ginjal, dan agglomerasi ginjal (Yadav, *et al.*, 2011). Akumulasi kristal pada saluran urinaria menyebabkan proses urinasi menjadi tersumbat sehingga saluran urinaria mengalami inflamasi. Sel-sel inflamasi yang teraktivasi akibat inflamasi pada kasus urolithiasis akan menghasilkan *reactive oksigen species* (ROS) sebagai respon terhadap beberapa rangsangan (Caramori and Papi, 2004). Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid sehingga meningkatkan kadar malondialdehid (MDA) dan menurunkan aktivitas superoksida dismutase (SOD).

Penelitian mengenai pengobatan dan pencegahan urolithiasis sebelumnya telah dilakukan dengan menggunakan tanaman herbal seperti tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*), buah anggur biru (*Vitis vinifera L.*), dan daun

tempuyung (*Sonchus arvensis*) (Saputra, 2009). Penelitian tersebut diperoleh bahwa semua jenis tanaman tersebut mempunyai kandungan flavonoid yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Namun belum ada penelitian yang dilakukan untuk mempelajari efek antiinflamasi, antioksidan, dan diuretik pada semanggi air. Pemilihan semanggi air pada penelitian ini didasarkan bahwa tanaman semanggi air mudah dibudidayakan di Indonesia serta memiliki harga jual yang relatif murah.

Semanggi air (*Marsilea crenata*) merupakan salah satu jenis tanaman yang sering dimanfaatkan sebagai obat herbal (Afriastini, 2003). Kandungan mineral dan fitokimia dalam semanggi air yang dimanfaatkan dalam penelitian ini adalah kalium dan flavonoid. Kalium berfungsi sebagai pelarut kristal CaOx, sedangkan flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Nurjanah, dkk., 2012). Sehingga tanaman semanggi air diharapkan bisa melancarkan urinasi (diuretik), memperbaiki fungsi ginjal, dan mencegah terjadinya urolithiasis.

Penelitian ini difokuskan pada efek antiinflamasi dan antioksidan dari tanaman semanggi air terhadap penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas SOD pada hewan model urolithiasis. Pengukuran kadar MDA menggunakan organ ginjal dan aktivitas SOD menggunakan serum dari darah (Edyson, 2003).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah urolithiasis pada hewan model tikus putih dengan menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini yaitu:

1. Daun dan tangkai semanggi air diperoleh dari UPT. Materia Medica Batu (Lampiran 2). Daun dan tangkai semanggi air sebanyak ± 100 g diambil setiap hari dalam keadaan segar dan berwarna hijau muda yang dipanen pada umur ± 3 minggu. Daun dan tangkai semanggi air tersebut diperas dan didapatkan ± 10 ml perasan murni (segar).
2. Perasan daun dan tangkai semanggi air diberikan dengan konsentrasi bertingkat 5%, 10%, 20%, dan 40% diberikan secara per oral (PO) dengan dosis 1 ml/100 g BB/hari selama 10 hari sesuai dengan kelompok perlakuan (Jagannath, *et al.*, 2012)
3. Hewan model yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 12 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan antara 175-200 g dan sebanyak 24 ekor yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan model dalam penelitian ini mendapatkan sertifikasi layak etik oleh Komisi Etik Penelitian FK Universitas Brawijaya No.421/EC/KEPK/07/2013 (Lampiran 3.).
4. Induksi urolithiasis dilakukan dengan menggunakan etilen glikol dalam bentuk cairan dan amonium klorida dalam bentuk serbuk dilarutkan dengan *aquabidest* dengan konsentrasi masing-masing 0,75% dan 2% dengan dosis 12 ml/200 g BB/hari selama 10 hari (Anggraini, 2013).
5. Variabel yang diamati yaitu melalui kadar malondialdehid (MDA) dan aktivitas superoksida dismutase (SOD).

1.4 Tujuan

Untuk mengetahui perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah terjadinya urolithiasis pada hewan model tikus putih dibuktikan dengan adanya penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas SOD.

1.5 Manfaat

Memberi informasi tentang pemanfaatan daun dan tangkai semanggi air sebagai bahan terapi urolithiasis.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Semanggi Air (*Marsilea crenata*)

Semanggi air banyak ditemukan di lingkungan air tawar seperti, sawah, kolam, dan sungai. Semanggi air dimanfaatkan oleh masyarakat di Jawa Timur sebagai bahan pangan dan campuran sayuran (Champion and Clayton, 2001).

Klasifikasi semanggi air menurut Steenis (2008) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Pteridophyta
Kelas	: Pteridopsida
Ordo	: Marsileales
Famili	: Marsileaceae
Genus	: <i>Marsilea</i>
Spesies	: <i>Marsilea crenata</i>

2.1.1 Morfologi Semanggi Air

Semanggi air memiliki morfologi batang berupa stolon yang berwarna hijau kecokelatan. Daun semanggi air berwarna hijau gelap yang setiap tangkai terdiri dari empat helai daun berbentuk lonjong bertepi rata yang pangkalnya runcing dengan panjang daun ± 2 cm dan lebar daun $\pm 1,5$ cm (Gambar 2.1). Semanggi air tumbuh di dasar perairan berupa serabut yang berwarna putih (Steenis, 2008).



Gambar 2.1 Semanggi Air (*Marsilea crenata*) (Arifin, 2009)

2.1.2 Kandungan Semanggi Air

Tumbuhan semanggi air memiliki kandungan gizi makro dan mikro. Kandungan gizi makro terdiri dari protein, karbohidrat, dan lemak. Kandungan mikro terdiri dari vitamin dan mineral. Menurut Arifin (2009), kandungan mineral daun dan tangkai semanggi air (mg/100 g) dalam keadaan segar adalah kalium (937,56), fosfor (142,8), besi (108,3), natrium (69,6), kalsium (69,05), seng (7,56), dan tembaga (5,19). Kalium sebagai kandungan mineral tertinggi yang berfungsi sebagai diuretik yang dapat meningkatkan jumlah urin, menghambat terjadinya supersaturasi dan kristalisasi, dan mencegah terjadinya urolithiasis (Yadav, *et al.*, 2011).

Semanggi air memiliki kandungan fitokimia yang merupakan senyawa bioaktif pada tumbuhan dan digunakan dalam pengobatan pada manusia dan hewan (Kristiono, 2009). Senyawa fitokimia sangat penting dalam penelitian obat yang dihasilkan dari tumbuhan. Senyawa fitokimia yang terkandung didalam daun dan tangkai semanggi air, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino (Kristiono, 2009). Beberapa senyawa fitokimia

tersebut, senyawa flavonoid yang paling berperan penting sebagai antiinflamasi dan antioksidan dalam mencegah dan mengobati urolithiasis (Zabri, *et al.*, 2008).

2.1.3 Flavonoid Sebagai Antiinflamasi

Flavonoid terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid adalah golongan senyawa fenol terbesar sebagai kandungan khas tumbuhan hijau (zat warna alami yang disebut antosianin). Flavonoid ada di seluruh bagian tanaman termasuk pada daun dan tangkai (Kristiono, 2009). Flavonoid sebagai antiinflamasi berperan dalam menghambat dan menurunkan stimulus inflamasi IKK kompleks akibat manifestasi obstruksi pada saluran urinaria yang disebabkan Kristal kalsium oksalat (Singh, *et al.*, 2006).

2.1.4 Flavonoid Sebagai Antioksidan

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa aromatik yang termasuk polifenol dan mengandung antioksidan. Zat antioksidan adalah suatu zat yang dapat menghambat atau memperlambat proses oksidasi. Flavonoid sebagai antioksidan berperan dalam menghambat berbagai bentuk ROS sehingga dapat mencegah stres oksidatif pada sel (Brunetti, *et al.*, 2013).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi menjadi tiga, yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier. Antioksidan primer seperti superoksida dismutase (SOD), enzim katalase, dan enzim *glutathion dismutase* berperan untuk mencegah pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder berfungsi menangkap senyawa radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai seperti vitamin E, vitamin C, dan β -karoten.

Antioksidan tersier berfungsi memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Contoh dari antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang berfungsi untuk memperbaiki DNA.

2.1.5 Kalium Sebagai Diuretik

Semanggi air pada bagian batang dan daun memiliki banyak kandungan mineral, seperti kalium, fosfor, kalsium, natrium, besi, tembaga, dan seng. Kalium (K) memiliki jumlah atau kadar yang paling tinggi diantara mineral yang lain, yaitu sebesar 937,56 mg/100 g dalam keadaan segar dan sebesar 866,4 mg/100 g setelah dikukus (Arifin, 2009).

Berdasarkan penelitian Winarto dan Tim Karyasari (2004), kandungan kalium yang tinggi dalam tempuyung dapat menghancurkan kristal kalsium oksalat dalam ginjal. Kalium akan menyingkirkan kalsium untuk bergabung dengan senyawa karbonat, oksalat, atau urat yang merupakan pembentuk kristal, sehingga endapan kristal dapat larut dan keluar bersama urin. Kalium juga dapat berfungsi untuk menjaga keseimbangan elektrolit dalam ginjal. Hal tersebut diperkuat dengan pernyataan Johnny (1994) yang menyebutkan bahwa salah satu kandungan kimia yang berfungsi untuk melarutkan kristal kalsium adalah kalium. Daya melarutkan kalium terhadap kristal kalsium oksalat disebabkan oleh letak kalium di dalam deret Volta sebelum letak kalsium, sehingga kalium akan menyingkirkan kalsium untuk bergabung dengan senyawa karbonat, oksalat, atau urat dan senyawa kalsium menjadi larut. Menurut Guyton and Hall (2004), kalium yang tinggi dalam darah akan menyebabkan penurunan kontraksi otot polos

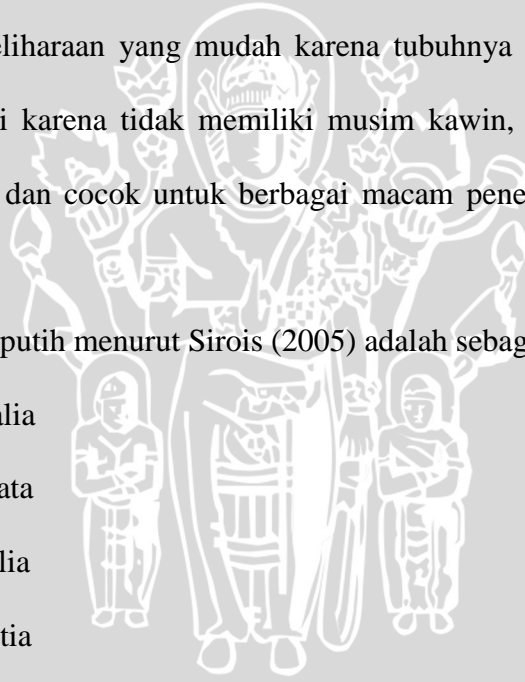
vaskuler yang kemudian menyebabkan penurunan aldosteron. Penurunan aldosteron akan mengakibatkan peningkatan ekskresi air oleh ginjal.

2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Rattus norvegicus digunakan sebagai hewan model karena memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik dengan mamalia sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada anjing dan kucing (Hedrich, 2006). *Rattus norvegicus* memiliki beberapa keunggulan, yaitu penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih, dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Malole dan Pramono, 1989).

Klasifikasi tikus putih menurut Sirois (2005) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Sub Famili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Berat badan tikus jantan pada umur 12 minggu mencapai 240 g, sedangkan betinanya mencapai 200 g. Tikus putih memiliki lama hidup berkisar antara 4-5 tahun (Sirois, 2005), beberapa penelitian sebelumnya juga menggunakan tikus putih jantan sebagai hewan coba urolithiasis karena dari struktur anatomi ureter lebih panjang dan sempit di bandingkan tikus putih betina sehingga potensi terjadinya urolithiasis lebih besar. Sedangkan untuk parameter biologis tikus dijelaskan dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Parameter Biologis Tikus (Sharp and La Regina, 1998).

Parameter	Nilai
Lama hidup	2,5-3,5 tahun
Suhu tubuh (rectal)	35,9-37,5°C
Penggunaan O ₂	0,84 ml/m ² /grBB
Intake pakan	5-6g/100 gr BB/hr
Intake minum	10-12 ml/100 gr BB/hr
pH urin	7,3-8,5
Total air dalam tubuh	167 ml
Volume plasma	7,8
Ketebalan barrier udara dan darah	1,5 µm
Kapasitas residu fungsional	3,9 ±0,8 ml

Tikus putih telah banyak digunakan sebagai hewan model urolithiasis, seperti pada penelitian sebelumnya menggunakan hewan model tikus putih yang diinduksi dengan etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% untuk menguji efek ekstrak etanol asparagus (*Asparagus racemosus*) sebagai antiurolithiasis (Jagannath, *et al.*, 2012).

2.3 Definisi Urolithiasis

Urolithiasis adalah penyakit yang disebabkan oleh adanya akumulasi kristal pada saluran urinasi. Kristal yang terbentuk dan menghambat proses urinasi di dalam saluran urinaria adalah ginjal, ureter, vesika urinaria, dan urethra. Beberapa faktor predisposisi yang diketahui berpengaruh pada pembentukan kristal adalah ras, jenis kelamin, umur, anatomi dan disfungsi saluran urinaria, metabolisme abnormal, infeksi saluran urinaria, diet, pH urin dan homeostasis cairan tubuh. Masing-masing faktor predisposisi memiliki peranan penting dalam perkembangan dari berbagai tipe kristal yang terbentuk (Lulich dan Osborne, 2007). Proses pembentukan Kristal dari beberapa proses fisiokimia seperti peningkatan eksresi kalsium dan oksalat dalam urin, supersaturasi urin, kristalisasi, agregasi kristal, pertumbuhan kristal, penempelan kristal ke membran sel ginjal, retensi ginjal dan agglomerasi ginjal (Yadav, *et al.*, 2011).

2.4 Tipe Kristal Urolithiasis

Kristal dapat digolongkan berdasarkan kandungan kalsium, densitas, dan komposisi pembentuk kristal. Berdasarkan kandungan kalsium, kristal digolongkan menjadi *calcareous* (kristal yang mengandung kalsium) dan *non calcareous*. Berdasarkan densitasnya (melalui pemeriksaan foto abdomen), kristal diklasifikasikan menjadi *radiopaque* dan *radioluscent*. Kristal kalsium atau *calcareous* umumnya bersifat *radiopaque*, sedangkan kristal asam urat, sistin, dan struvit bersifat *radioluscent* (Suharjo dan Cahyono, 2010). Berdasarkan komposisi zat penyusun kristal, dibagi menjadi 4, yaitu:

1. Kristal kalsium oksalat, kalsium fosfat (70–80%)

Peningkatan ekskresi kalsium atau terjadinya hiperkalsiuria mengindikasikan adanya potensi pembentukan kristal yang mengandung senyawa kalsium dan oksalat atau fosfat.

2. Kristal struvit yang terbentuk dari magnesium, amonium, dan fosfat (5–15%)

Kristal struvit disebut juga sebagai kristal infeksi karena proses terbentuknya kristal terjadi akibat adanya agen infeksius. Kristal infeksi disusun oleh unsur magnesium, amonium, dan fosfat ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \rightarrow 6\text{H}_2\text{O}$).

3. Kristal sistin (1%)

Kristal sistin terbentuk berdasarkan adanya kelainan resesif autosomal, dimana terjadi gangguan dalam transport asam dikarboksilik sistin, ornithin, lisin, dan arginin. Sistin yang sulit larut memicu proses kristalisasi.

4. Kristal asam urat (5–10%)

Kristal asam urat terbentuk ketika produksi asam urat yang berlebihan yang dikeluarkan melalui urin (hiperurikosuria). Kelarutan asam urat tergantung dari keasaman atau pH urin.

2.5 Patofisiologi

Tahap pembentukan kristal terjadi ketika kation dan anion dari kristal terbentuk karena konsentrasi urin yang jenuh. Pembentukan kristal dapat diidentifikasi sebagai ketidakseimbangan promotor (kalsium, oksalat, asam urat, fosfat anorganik, dan lain-lain) dan inhibitor (sitrat, magnesium, potasium, pirofosfat, glikoprotein, dan lain-lain). Faktor pH, suhu, dan *flow rate* juga mempengaruhi pembentukan kristal (Saputra, 2009).

Terbentuknya kristal diawali adanya supersaturasi pada urin terhadap unsur kalsium, oksalat, dan asam urat. Supersaturasi urin dapat dibuktikan dengan meningkatnya ekskresi kalsium (hiperkalsiuria), oksalat (hiperoksaluria), dan asam urat (hiperurikosuria) (Suharjo dan Cahyono, 2010). Antara kristal-kristal kecil yang terbentuk dapat bersatu menjadi agregat dan berkembang menjadi batuan yang besar relatif cepat. Pembentukan kristal dihambat oleh beberapa zat seperti sitrat, magnesium, mukoprotein Tamm-Horsfall yang dihasilkan di tubulus renalis, dan bikunin di urin (Stockham dan Scott, 2008). Kerusakan pada epitel di ginjal dan vesika urinaria sehingga menghasilkan tempat yang cocok untuk menempelnya kristal ke organ tersebut. Adanya kristal tersebut dapat menghambat kemampuan urin melakukan perjalanan ke ureter yang menyebabkan nyeri, obstruksi, dan menghalangi aliran urin keluar dari ginjal (Shah, *et al.*, 2011).

2.6 Stress Oksidatif dan Inflamasi pada Urolithiasis

Terbentuk dan terakumulasinya kristal dapat menyebabkan terjadinya obstruksi pada saluran ureter sehingga terjadi inflamasi (Ross, 2005). Inflamasi merupakan reaksi dari tubuh terhadap gangguan membran sel karena obstruksi. Obstruksi pada saluran urinari akibat akumulasi kristal menyebabkan generasi *reactive oxygen species* (ROS) meningkat. ROS adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif. Fungsi ROS di dalam jaringan adalah menimbulkan reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan jaringan dan

mengganggu fungsi sel. ROS yang meningkat memicu terjadinya stres oksidatif pada sel dan jaringan pada saluran urinaria.

Radikal bebas berasal dari senyawa hidrogen, oksigen dan logam transisi pada kulit terluarnya terdapat elektron yang tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan ini, akan berusaha menarik elektron di sekelilingnya dari molekul lainnya untuk mendapatkan kembali konfigurasi pasangan elektron. Radikal bebas dapat terbentuk dari senyawa lain yang bukan radikal bebas tetapi mudah menjadi radikal bebas. Kedua kelompok senyawa tersebut diistilahkan sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS merupakan bentuk lain dari oksigen yang teraktivasi seperti ion superoksida (O_2^{*-}) dan *hydroxyl radicals* (OH \cdot), juga spesies *non free radical* seperti *hydrogen peroxide* (H_2O_2) (Winarsi, 2007). Radikal bebas tidak menyerang sasaran secara spesifik tetapi juga menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, struktur sel dan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) (Wuryastuti, 2000; Wirakusumah, 2000; Hariyatmi, 2004).

Secara fisiologis, radikal bebas berperan dalam proses transport elektron, metabolisme tubuh dalam keadaan fagositosis serta sintesis DNA dan protein. Namun, jika jumlah radikal bebas terlalu banyak dalam waktu yang berkepanjangan akan mengakibatkan kerusakan pada sel tubuh terutama perubahan makromolekul seperti DNA, lipid, dan protein yang ditunjukkan dengan rendahnya aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan tingginya kadar malondialdehid (MDA) dalam plasma akan memicu terjadinya stres oksidatif (Sharma, *et al.*, 2003). Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal

bebas dengan antioksidan di dalam tubuh, dimana produksi radikal bebas melebihi kemampuan mekanisme *scavenging* (pembersih) yang dapat merusak membran sel, protein dan DNA dan berakibat fatal bagi kelangsungan hidup sel dan jaringan (Sharma, *et al.*, 2003).

Stres oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan bahwa sel mengalami stres oksidatif (Valko, 2006). Malondialdehid terbentuk dari asam lemak tidak jenuh jamak *Poly Unsaturates Fatty Acid* (PUFA) yang mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi (Price and Lorraine, 2006).

2.7 Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD)

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu zat yang dapat menghambat atau memperlambat proses oksidasi. Oksidasi adalah jenis reaksi kimia yang melibatkan pengikatan oksigen, pelepasan hidrogen atau pelepasan elektron. Proses oksidasi adalah peristiwa alami yang terjadi di alam dan dapat terjadi dimana-mana, tak terkecuali di dalam tubuh (Halliwell and Whiteman, 2004).

Antioksidan sebagai sistem perlindungan tubuh dapat dibedakan atas antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen meliputi: superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksida serta antioksidan eksogen yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti akar, daun, buah dan bunga yang memiliki kandungan flavonoid berfungsi sebagai pengganti apabila

antioksidan endogen tidak mencukupi (Simanjuntak, 2007) dan juga dapat mendetoksikasi radikal bebas (Halliwell and Whiteman, 2004).

Superoksida dismutase merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dihasilkan terbanyak di dalam tubuh, berfungsi sebagai penangkal *Reactive oxygen species* (ROS) khususnya senyawa anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Semua SOD adalah metaloprotein yang mengandung *cooper* (Cu), besi (Fe), mangan (Mn) pada sisi aktifnya (Deshpande, *et al.*, 1996). Dalam tubuh hewan mamalia, SOD mempunyai berbagai macam jenis dan lokasi, antara lain Mn-SOD yang terdapat dalam mitokondria, SOD ekstraseluler dan Cu,Zn-SOD terdapat pada sitosol dan nukleus (Yoon, *et al.*, 2008). Enzim SOD memiliki efek dapat mereduksi radikal anion $O_2^{\cdot-}$ seperti yang ditunjukkan reaksi dibawah ini:



Antioksidan SOD bekerja mengkatalisis dismutasi anion $O_2^{\cdot-}$ yang merupakan oksigen reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) di dalam mitokondria. Hidrogen peroksida yang terbentuk menyebabkan terjadinya inaktivasi SOD. Namun, inaktivasi SOD tidak akan terjadi selama jumlah radikal bebas yang bisa ditanggulangi oleh antioksidan enzimatis yang lain seperti katalase dan *glutathione peroxide* (GPx) atau antioksidan eksogen yang bersifat non enzimatis. Kerjasama antara antioksidan tersebut menyebabkan oksidan yang berada di dalam tubuh dapat dipertahankan konsentrasinya dalam tingkat yang dapat diterima, sehingga tidak sampai menimbulkan kerusakan jaringan tubuh. Pada enzim SOD memiliki peran yang sangat penting pada patogenesis inflamasi urolithiasis. Beberapa penelitian penderita urolithiasis

menunjukkan penurunan aktivitas SOD sehingga menyebabkan meningkatnya stres oksidatif pada tubuh (Comhair, *et al.*, 2005).

2.8 Komposisi Bahan Induksi Urolithiasis

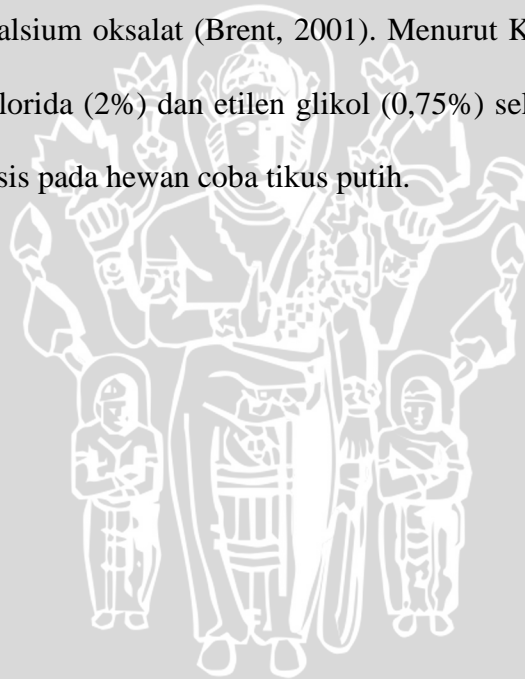
2.8.1 Etilen Glikol

Etilen glikol adalah senyawa kimia turunan yang dibuat dari beberapa produk kimia komersial seperti *Polietilen Tereftalat* (PET) resin, poliester resin tak jenuh, serat poliester, dan poliester lapis. Ginjal merupakan organ yang paling peka terhadap etilen glikol dan merupakan target organ primer. Kerusakan ginjal tersebut diakibatkan oleh pembentukan kristal kalsium oksalat pada tubulus ginjal (Cruzan, *et al.*, 2004).

Metabolisme etilen glikol terdiri dari empat tahap, berawal dari perombakan senyawa tersebut di hati dimetabolisme menjadi glikol aldehid oleh alkohol dehidrogenase. Glikolaldehid selanjutnya diubah menjadi glikolat oleh aldehid dehidrogenase pada tahap kedua. Lebih jauh lagi glikolat diubah menjadi glioksilat yang hasil metabolisme selanjutnya adalah oksalat. Senyawa tersebut mengendap bersama kalsium dalam tubuh membentuk kristal kalsium oksalat (Cox and Phillips, 2004). Keracunan etilen glikol memperlihatkan perbedaan kepekaan antar spesies dan jenis kelamin setelah pemberian jangka panjang, dimana tikus lebih peka daripada mencit dan jenis kelamin jantan lebih peka daripada jenis kelamin betina (Cruzan, *et al.*, 2004). Pemberian etilen glikol (0,75%) selama 24 hari pada hewan coba tikus putih dapat menyebabkan urolithiasis (Jie, *et al.*, 1999).

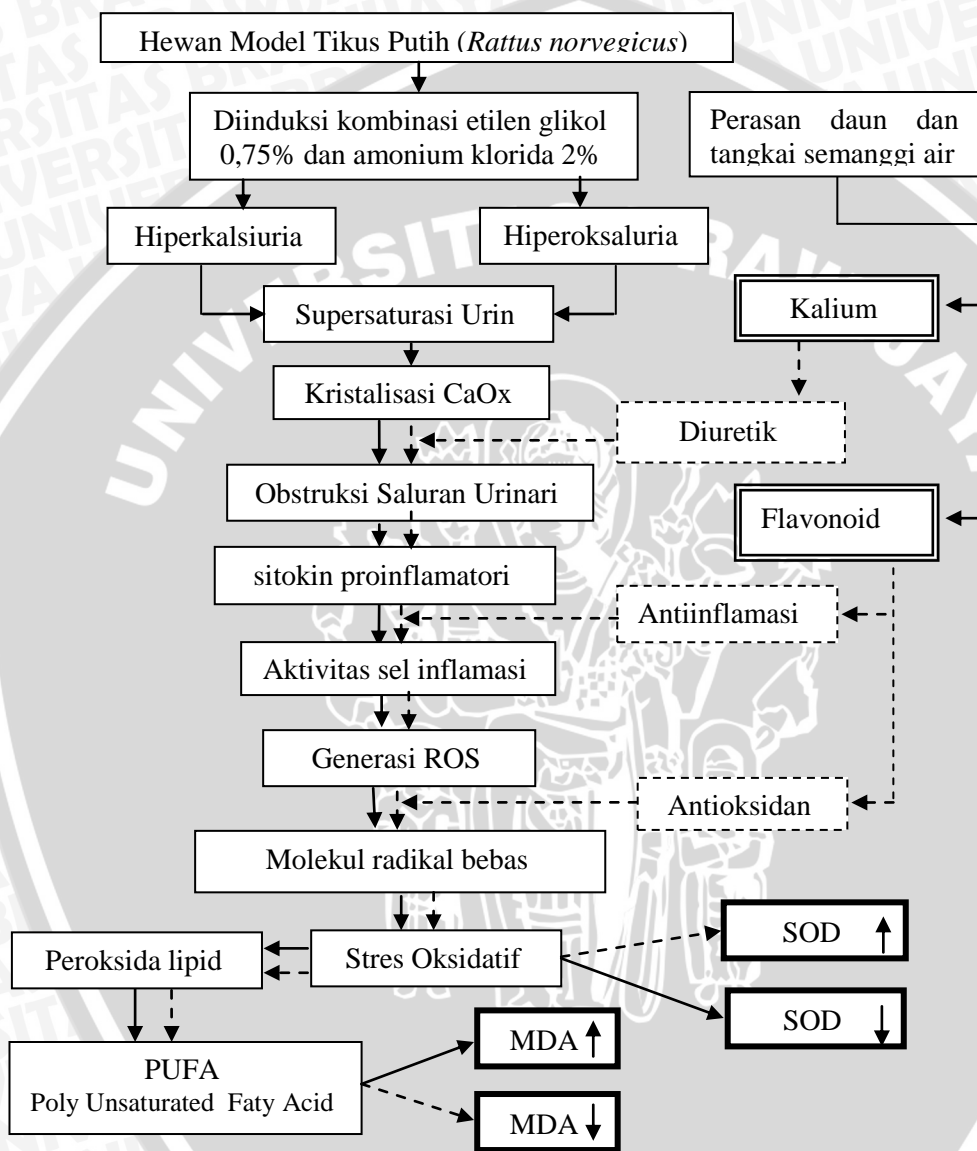
2.8.2 Amonium Klorida

Amonium klorida merupakan garam yang terbuat dari asam kuat HCl dan basa lemah NH_4OH sehingga amonium klorida merupakan garam yang dapat terhidrolisis dalam air membentuk larutan yang agak asam ($\text{pH} < 7$). Amonium klorida digunakan sebagai bahan yang mempercepat terjadinya pembentukan kristal kalsium oksalat. Hal ini karena amonium klorida dapat meningkatkan konsentrasi kalsium dan oksalat pada urin sehingga terjadi peningkatan ekskresi kalsium dan oksalat. Mekanisme tersebut menjadi promotor terjadinya pembentukan kristal kalsium oksalat (Brent, 2001). Menurut Khan *et al.*, (2011), kombinasi amonium klorida (2%) dan etilen glikol (0,75%) selama 10 hari dapat mempercepat urolithiasis pada hewan coba tikus putih.



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:

- > Efek induksi etilen glikol dan amonium klorida
- - -> Efek flavonoid sebagai diuretik, antiinflamasi dan antioksidan
- ==== Senyawa fitokimia penghambat urolithiasis
- ▬ Variabel yang diteliti



Hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) diinduksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%. Bahan-bahan tersebut menyebabkan hiperkalsiuria dan hiperoksaluria sehingga terjadi supersaturasi urin (kejenuhan urin). Supersaturasi urin memicu terbentuknya kristalisasi berupa kristal kalsium oksalat (CaOx) pada saluran urinaria. Kalsium sebagai inti dari kristal yang mengalami pertumbuhan kristal sehingga terbentuk kristal dengan beberapa lapisan, yaitu, nidus, kristal, *shell*, dan permukaan kristal. Pembentukan kristal kemudian diikuti dengan akumulasi kristal atau aglomerasi kristal, yaitu kristal beragregat bersama dengan membentuk partikel yang lebih besar. Akumulasi kristal menyebabkan retensi kristal sehingga mengakibatkan obstruksi saluran urinaria.

Obstruksi saluran urinaria akan menyebabkan inflamasi dan mengaktifkan mediator inflamasi untuk merekrut sel-sel imunitas. Sel-sel imunitas yang teraktifasi akan memproduksi sitokin proinflamatori (IL-1 dan TNF- α). Pelepasan sitokin proinflamatori akan mengaktifasi sel-sel inflamasi (monosit dan neutrofil) sehingga menyebabkan lepasnya *reactive oxygen spesies* (ROS). Peningkatan ROS di dalam tubuh mengakibatkan timbulnya stres oksidatif. Reaksi ROS tersebut akan membentuk molekul-molekul radikal bebas seperti radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2). Stres oksidatif akan menyebabkan proses peroksidasi menjadi peroksida lipid pada *poly unsaturated faty acid* (PUFA) dengan hasil akhir berupa malondialdehid (MDA). Kerusakan membran akibat peroksidasi lipid menimbulkan respon inflamasi pada jaringan ginjal.

ROS akan mengaktifkan sel-sel inflamatori sebagai respon terhadap adanya radikal bebas. Molekul radikal bebas yang tinggi akan menyebabkan reaksi antar molekul yang semakin reaktif. Keadaan tersebut akan mengakibatkan kondisi stress oksidatif yang menyebabkan penurunan aktivitas superoksida dismutase (SOD). Pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air yang memiliki kandungan antiinflamasi akan menurunkan aktivitas sel inflamasi dan antioksidan berperan dalam menghambat dan menurunkan stres oksidatif. Antioksidan akan meningkatkan aktivitas SOD dan dapat menurunkan kadar MDA.

Selain itu, semanggi air memiliki kandungan mineral seperti kalium yang berfungsi sebagai diuretik untuk memecah kristal CaOx. Oleh karena itu, diharapkan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dapat memecah kristal CaOx dan mencegah inflamasi sehingga penyakit urolithiasis tidak terjadi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah urolithiasis pada hewan model tikus putih dibuktikan dengan penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas SOD.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu perawatan dan perlakuan terhadap hewan model dilaksanakan di Klinik Hewan Pendidikan PKH UB. Pembedahan serta pengukuran kadar malondialdehid (MDA) dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal FK UB. Penelitian ini dilakukan selama bulan April sampai dengan Juni 2013.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Perawatan Hewan Model

Kandang pemeliharaan kelompok untuk tikus terbuat dari kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 12 cm sebanyak enam buah disusun beralaskan sekam ditutup kawat ram, tempat pakan, tempat minum (*nipple*), sekam, pakan *BR2 Comfeed*, dan air mineral.

4.2.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Timbangan digital, *juicer*, *beaker glass* 100 ml, tabung reaksi 10 ml, spuit 10 ml, styrofoam, *icepack*, rak kayu tabung reaksi, sumbat karet tabung reaksi, daun dan tangkai semanggi air, dan aquabidest. Setiap hari memerlukan ± 100 g daun dan tangkai semanggi air dan 100 ml aquabidest. ± 100 g daun dan tangkai semanggi air menghasilkan ± 10 ml perasan daun dan tangkai semanggi air dengan konsentrasi 100% (perasan murni), kemudian diencerkan sehingga memiliki konsentrasi bertingkat yaitu 40%, 20%, 10%, dan 5%.

4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi

Timbangan digital, tabung erlenmeyer 100 ml, spatula, spuit 10 ml, dan tabung reaksi 10 ml. Setiap hari memerlukan 2,16 ml etilen glikol 100%, 5,18 g amonium klorida 100%, dan 40 ml aquadest.

4.2.4 Alat Perlakuan Perasan Pada Hewan Model

Sonde lambung (*oral gavage*).

4.2.5 Alat Pembedahan Tikus

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, eppendofit 2000 ul, vakutainer, alkohol dan *phosphate buffer saline* (PBS).

4.2.6 Pemeriksaan MDA

Microtube, *micropipete*, tabung reaksi, *water bath*, *spectrophotometer*, organ ginjal, aquadest, *thiobarbituric acid* (TBA), larutan *sodium thiobarbituric acid* (Na-Thio) 1 %, *tri chloro acetic* (TCA) 100%, dan HCl 1N.

4.2.7 Pemeriksaan SOD

Microtube, *micropipete*, tabung reaksi, inkubator, serum, xantine, xantine oxidase (XO), (NBT), dan PBS.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria inklusi hewan model adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jenis kelamin jantan, umur 12 minggu, berat badan antara 175-200 g (Lampiran 11), kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada

abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP FKUB (Lampiran 3), dan belum pernah digunakan penelitian.

Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dapat dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, untuk enam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal empat kali dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan empat kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 24 ekor. Selanjutnya dibagi dalam 6 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, dan perlakuan 4.

4.3.2 Penetapan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis konsentrasi bertingkat, yaitu 5%, 10%, 20%, dan 40%. Dosis tersebut dirujuk berdasarkan penelitian (Jagannath, *et al.*, 2012) untuk mengetahui aktivitas antiurolithiasis

pada tikus putih menggunakan ekstrak *Asparagus racemosus*. Penggunaan metode perasan dirujuk berdasarkan penelitian (Wijaya dan Darsono, 2005) untuk mengetahui kemampuan antiurolithiasis menggunakan perasan buah ketimun (*Cucumis sativus L.*).

4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis

Bahan induksi urolithiasis dibuat dengan menggunakan bahan etilen glikol 0,75% dalam bentuk cair dan amonium klorida 2% dalam bentuk serbuk dan diberikan per oral sebanyak 2 ml per ekor per hari. Dosis induksi urolithiasis merujuk pada penelitian Anggraeni (2013). Perhitungan dosis tercantum pada lampiran 4.

4.3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *post test-only control group* menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi enam kelompok perlakuan, yaitu kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, perlakuan 4 serta kelompok negatif dan kontrol positif sebagai pembanding. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan. Rancangan penelitian ditunjukkan dalam tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		MDA	SOD
P1 (Kontrol Negatif)	Pakan standar dan air minum		
P2 (Kontrol Positif)	Pakan standar dan air minum + Induksi EG 0,75% dan AK 2% sebanyak 1ml/100gr		
P3 (perlakuan 1)	Pakan standar dan air minum + 5% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2% sebanyak 1ml/100gr		
P4 (perlakuan 2)	Pakan standar dan air minum + 10% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2% sebanyak 1ml/100gr		
P5 (perlakuan 3)	Pakan standar dan air minum + 20% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2% sebanyak 1ml/100gr		
P6 (perlakuan 4)	Pakan standar dan air minum + 40% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2% sebanyak 1ml/100gr		

Keterangan:

EG = Etilen glikol

AK = Amonium klorida

4.3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : - Konsentrasi perasan daun dan tangkai semanggi air
 - Kombinasi etilen glikol (0,75%) dan amonium klorida (2%)

Variabel tergantung : Kadar MDA dan aktivitas enzim SOD

Variabel kendali : - Tikus putih meliputi galur, berat badan awal, umur, jenis kelamin
 - Semanggi air meliputi kondisi yang masih segar, warna, dan umur tanaman



4.3.6 Analisis Statistika Kadar MDA dan Aktivitas SOD

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data penelitian berupa kadar MDA diukur secara kuantitatif menggunakan uji TBA dan pengukuran aktivitas SOD secara kuantitatif menggunakan SOD spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (580 nm). Selanjutnya dianalisis statistika dengan uji *One Way Analysis of Variant* (ANOVA). Uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) atau *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

4.4 Prosedur kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Model

Hewan model dibagi dalam enam kelompok perlakuan secara acak. Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Lina, dkk., 2003). Hewan model diberi pakan standar sebanyak 20 g (10% dari berat badan) per hari dan minum secara *ad libitum* setiap hari selama tujuh hari selama masa adaptasi. Pemberian pakan dilakukan setiap pagi dan sore.

4.4.2 Pemilihan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Daun dan tangkai semanggi air diperoleh dari UPT. *Materia Medica Batu*. Daun dan tangkai semanggi air segar, berwarna hijau, dan berumur ± 3 minggu (Kristiono, 2009). Daun dan tangkai semanggi air ditimbang sebanyak ± 100 g.

4.4.3 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Tabel 4.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Alat dan Bahan	Volume dan Konsentrasi Perasan
100 g daun dan tangkai semanggi air diblender	Diperoleh \pm 10 ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 1	Diisi \pm 10 ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 2	Diisi 4 ml perasan dari tabung 1 + 6 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 40%)
Tabung reaksi 3	Diisi 2 ml perasan dari tabung 1 + 8 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 20%)
Tabung reaksi 4	Diisi 1 ml perasan dari tabung 1 + 9 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 10%)
Tabung reaksi 5	Diisi 0,5 ml perasan dari tabung 1 + 9,5 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 5%)

4.4.4 Pemberian Perlakuan

Tabel 4.3 Pemberian Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
P1	Pakan standar dan minum
P2	Pakan standar + minum + induksi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% sebanyak 1ml/100gr
P3	Pakan standar + minum + induksi 5% perasan daun dan tangkai semanggi air + etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% sebanyak 1ml/100gr
P4	Pakan standar + minum + induksi 10% perasan daun dan tangkai semanggi air + etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% sebanyak 1ml/100gr
P5	Pakan standar + minum + induksi 20% perasan daun dan tangkai semanggi air + etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% sebanyak 1ml/100gr
P6	Pakan standar + minum + induksi 40% perasan daun dan tangkai semanggi air + etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% sebanyak 1ml/100gr

Pemberian perlakuan dilakukan selama 10 hari. Perasan dan bahan induksi urolithiasis diberikan kepada hewan model secara per oral (PO) menggunakan sonde lambung (*oral gavage*). Perasan daun dan tangkai semanggi air di berikan terlebih dahulu, satu jam kemudian diinduksi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%.

4.4.5 Pengambilan Sampel Serum Darah

Pada hari ke-11 semua tikus dieuthanasi melalui dislokasi pada leher, kemudian diambil darahnya melalui jantung setelah dilakukan pembedahan. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan diendapkan selama 30 menit pada suhu kamar. Tahap kemudian dipindahkan dalam tabung sentrifuse dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Serum diambil dengan mikropipet sebanyak 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendoft lalu dilakukan pengamatan dan pengukuran kadar SOD.

4.4.6 Pengambilan Sampel Organ Ginjal

Pada hari ke-11 semua tikus dieuthanasi melalui dislokasi pada leher, kemudian, setelah pembedahan diambil organ ginjal. Organ ginjal dicuci dengan larutan PBS lalu ditaruh pada tempat sampel. Organ ginjal ditimbang dengan berat 0,5 g dimasukkan kedalam mortal dan digerus ditambah 500 μ l NaCl fisiologis 0,9%, dimasukkan dalam appendorf. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama sepuluh menit, kemudian diambil supernatan dan dipindah ke appendorf baru dan dilakukan proses pengukuran kadar MDA.

4.4.7 Pengukuran Aktivitas SOD

Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan diendapkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian dipindahkan dalam tabung sentrifuse dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Serum diambil dengan mikropipet sebanyak 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendoft. Sampel serum sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil, ditambah 100 μ l xantine, 100 μ l xantine oxidase kemudian

dihomogenkan dengan *vortex*, ditambah 1600 μL NBT kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Mulut tabung ditutup dengan plastik *wrap* dan diinkubasi 30°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi 3500 rpm 10 menit kemudian diambil supernatan dan dipindah ke tabung reaksi baru. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang (580 nm).

4.4.8 Pengukuran kadar MDA

4.4.8.1 Pembuatan Kurva Baku MDA

Standar MDA dengan konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 mg/mL diambil masing-masing 100 μL , dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan 550 μL aquades. Masing-masing tabung tersebut ditambahkan 100 μL TCA 100%, 250 μL HCl 1N dan 100 μL Na-Thio 1%, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang (532 nm) menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*. Kurva standar MDA dibuat dengan membuat persamaan regresi antara absorbansi dan konsentrasi MDA.

4.4.8.2 Pengukuran Kadar MDA

Organ ginjal dicuci dengan larutan PBS lalu ditaruh pada tempat sampel. Organ ginjal ditimbang dengan berat 0,5 g dimasukkan kedalam mortal dan digerus ditambah 500 μL NaCl fisiologis, dimasukkan dalam appendorf. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit,

kemudian diambil supernatan dan dipindah ke appendorf baru. Homogenat sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil, ditambah 1450 μl akuades, 100 μl TCA 100% kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, ditambah 250 μl HCl 1 N kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, dan 100 μl Na-Thio 1% kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Mulut tabung ditutup dengan plastik *wrap* dan diinkubasi 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi 3500 rpm 10 menit kemudian diambil supernatan dan dipindah ke appendorf baru. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang (532 nm).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Penelitian ini dilakukan untuk mengukur kadar MDA melalui metode *thiobarbituric acid* (TBA). Hasil kadar MDA diukur dengan spektrofotometri dan dilakukan analisis statistika menggunakan *one way analysis of variant* (ANOVA) didapatkan perbedaan hasil pengukuran yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.1).

Hasil aktivitas SOD diukur dengan spektrofotometri dan dilakukan analisis statistika menggunakan *one way analysis of variant* (ANOVA) didapatkan perbedaan hasil pengukuran yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.1)

Tabel 5.1 Hasil pengukuran kadar MDA dan aktivitas SOD

Kelompok	Rata-rata kadar MDA (ng/ml)	Rata-rata aktivitas SOD (u/ml)
P1 (Kontrol Negatif)	125,88 ± 6,57 ^a	14,40 ± 0,28 ^d
P2 (Kontrol Positif)	197,13 ± 9,44 ^e	9,97 ± 0,70 ^a
P3 (Perlakuan 1)	179,00 ± 6,12 ^d	10,50 ± 0,37 ^a
P4 (Perlakuan 2)	169,00 ± 13,07 ^c	11,73 ± 0,52 ^b
P5 (Perlakuan 3)	151,50 ± 6,12 ^b	13,12 ± 0,50 ^c
P6 (Perlakuan 4)	125,25 ± 3,23 ^a	14,18 ± 0,10 ^d

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Rata-rata nilai kadar MDA pada kelompok P1 adalah 125,88 ± 6,57 ng/ml.

Nilai tersebut menunjukkan standar nilai kadar MDA tikus putih dalam keadaan

sehat. Berdasarkan analisis statistika diketahui bahwa perlakuan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air memberikan pengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar MDA pada P3 ($179,00 \pm 6,12$ ng/ml), P4 ($169,00 \pm 13,07$ ng/ml), P5 ($151,50 \pm 6,12$ ng/ml), dan P6 ($125,25 \pm 3,23$ ng/ml) dibandingkan P2 yang memiliki kadar MDA paling tinggi ($197,13 \pm 9,44$ ng/ml) (Tabel 5.1).

Rata-rata nilai aktivitas SOD pada kelompok P1 adalah $14,40 \pm 0,28$ u/ml. Nilai tersebut menunjukkan standar nilai aktivitas enzim SOD tikus putih dalam keadaan sehat. Berdasarkan analisis statistika diketahui bahwa perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air memberikan pengaruh secara signifikan terhadap peningkatan aktivitas SOD pada kelompok P3 ($10,50 \pm 0,37$ u/ml), P4 ($11,73 \pm 0,52$ u/ml), P5 ($13,12 \pm 0,50$ u/ml), dan P6 ($14,18 \pm 0,10$ u/ml) dibandingkan dengan P2 (kontrol positif) yang memiliki nilai aktivitas enzim SOD paling rendah ($9,97 \pm 0,70$ u/ml) (Tabel 5.1).

Kelompok Perlakuan P2 dan P3 memiliki nilai rata-rata SOD yang tidak berbeda nyata, sedangkan pada nilai rata-rata MDA berbeda nyata. Hal ini sesuai dengan penelitian Supandi dkk., (2006) bahwa nilai kadar MDA dan nilai aktivitas SOD tidak selalu berbanding terbalik. Nilai rata-rata SOD yang tidak berbeda nyata karena mungkin pada perlakuan terjadi kesalahan seperti perlakuan sonde pada tikus dan cara menangani hewan model yang membuat hewan model kesakitan sehingga sistem imun menurun dan aktivitas SOD jadi menurun seperti kelompok tikus positif urolithiasis.

Berdasarkan Tabel 5.1 menunjukkan kelompok P2 jika dibandingkan dengan kelompok P1 maka terlihat kadar MDA mengalami peningkatan sangat signifikan, karena induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% pada tikus putih selama 10 hari dapat menyebabkan terjadinya urolithiasis. Diperkuat dengan pemeriksaan urin pada kelompok positif yang mempunyai hasil pH (7,5), berat jenis (0,011), dan positif terdapat kalsium oksalat (terlihat pada gambar lampiran) (Damayanti dan Murwani, 2013). Hal ini dikarenakan metabolisme akhir etilen glikol adalah senyawa oksalat yang kemudian mengendap bersama kalsium membentuk kristal kalsium oksalat (CaOx). Penambahan amonium klorida dapat meningkatkan kadar kalsium dan oksalat dalam urin sehingga terjadi peningkatan ekskresi kalsium (hiperkalsiuria) dan oksalat (hiperoksaluria). Kondisi tersebut menyebabkan urin mengalami supersaturasi, supersaturasi urin akan mempercepat pembentukan Kristal CaOx pada saluran ureter (Khan, 2011). Kristal CaOx yang secara terus menerus mengendap di saluran ureter yang akan menyebabkan obstruksi sehingga proses urinasi akan terganggu dan menimbulkan luka pada saluran ureter.

Adanya luka pada saluran ureter menyebabkan inflamasi dan mengaktifkan mediator inflamasi untuk merekrut sel-sel imunitas. Sel-sel imunitas yang teraktifasi akan memproduksi sitokin proinflamatori (IL-1 dan TNF- α). Pelepasan sitokin proinflamatori akan mengaktifasi sel-sel inflamasi (monosit dan neutrofil) sehingga menyebabkan lepasnya *reactive oxygene spesies* (ROS). Peningkatan ROS di dalam tubuh mengakibatkan timbulnya stres oksidasi. Stres oksidatif merupakan keadaan dimana antioksidan tidak seimbang dengan radikal bebas.

Reaksi radikal bebas terhadap *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) akan menghasilkan radikal peroksil lipid (ROO*) yang dapat menghasilkan lipid peroksida (ROOH). Reaksi radikal peroksil lipid dengan PUFA yang lain dapat membentuk lipid peroksida (ROOH) dan lipid bebas (R*). Lipid peroksida terbentuk akibat hilangnya sebuah atom hidrogen yang diakibatkan adanya radikal peroksil lipid. Reaksi tersebut berlangsung secara terus menerus karena reaksi tersebut menghasilkan radikal lipid bebas (R*). MDA merupakan produk aldehid yang dihasilkan dari proses peroksidasi menjadi peroksida lipid. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan bahwa sel mengalami stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan produksi radikal bebas berlebih, tanpa diimbangi dengan antioksidan sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan ginjal yang ditunjukkan dengan menurunnya aktivitas SOD (Grotto, *et al.*, 2009).

Kondisi stres oksidatif memicu timbulnya ROS yang diproduksi selama interaksi antara kristal dan sel-sel di saluran urinaria dan bertanggungjawab atas berbagai respon seluler dan menyebabkan terjadinya pelepasan molekul radikal bebas. Tingginya kandungan ROS di dalam jaringan dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Semakin tinggi kandungan ROS di dalam jaringan berbanding lurus dengan tingginya stres oksidatif serta meningkatnya produk hasil peroksidasi lipid yaitu MDA sebagai penanda kerusakan seluler akibat adanya radikal bebas. Radikal bebas oksigen dapat menyebabkan kerusakan seluruh membran biologis dengan cara menyerang protein, lipid, asam nukleat, dan gliko-konjugat (Sharma, *et al.*, 2003).

Radikal bebas merupakan molekul reaktif yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Pembentukan radikal bebas terjadi melalui sederetan mekanisme reaksi. Reaksi tahap pertama inisiasi yaitu pembentukan radikal bebas awal. Tahap kedua propagasi yaitu penambahan atau terbentuknya radikal baru secara terus menerus dan menyebabkan terjadinya proses oksidasi. Tahap terakhir adalah terminasi, yaitu penghilangan atau pengubahan radikal bebas menjadi molekul stabil dan tak reaktif. Terminasi terjadi bila ada reaksi antara radikal bebas itu sendiri (Achmadi, 2003).

Radikal bebas tidak mempunyai pasangan elektron, sehingga radikal bebas tersebut akan bebas di dalam tubuh dan berusaha untuk mencapai kestabilan dengan berikatan dengan molekul di dekatnya. Ikatan antara radikal bebas dengan molekul terdekat mengakibatkan kerusakan struktur molekul tersebut. Hal ini sesuai pendapat (Halliwell and Gutteridge, 2007) yang menyatakan kerusakan membran sel oleh radikal bebas terjadi melalui rangkaian proses ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen-komponen membran, oksidasi gugus tiol pada komponen membran oleh radikal bebas dan reaksi peroksidasi lipid PUFA. Wei hua *et al.*, (2008) memperkuat bahwa hasil peroksidasi lipid membran oleh radikal bebas, berefek langsung terhadap kerusakan makromolekul penting seperti lipid, protein dan DNA.

Keberadaan ROS dalam jaringan ini dapat diketahui melalui pengukuran kadar MDA dengan menggunakan metode TBA. Pembentukan MDA-TBA₂ terjadi melalui serangan nukleofilik yang melibatkan karbon-5 dari TBA dan karbon-1 dari MDA diikuti dengan dehidrasi dan reaksi yang sama dengan

molekul TBA yang kedua menghasilkan warna merah muda-merah. Intensitas warna merah muda yang terbentuk dari kondensasi MDA-TBA mengindikasikan besarnya peroksidasi lipid (Edyson, 2003).

Berdasarkan hasil analisis statistik diketahui bahwa perlakuan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air memberikan pengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas SOD pada kelompok P3, P4, P5, dan P6. Dari Tabel 5.1 dapat diketahui kelompok P6 menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dengan kelompok P1 (kontrol negatif). Hal ini dikarenakan perasan daun dan tangkai semanggi air memiliki kandungan flavonoid yang memiliki peran sebagai antioksidan. Semakin tinggi konsentrasi semanggi air yang diberikan, maka akan memiliki kandungan flavonoid yang tinggi juga sehingga pada kelompok P6 yang diberikan perasan daun dan tangkai semanggi air dengan konsentrasi 40% memiliki nilai kadar MDA yang rendah dan aktivitas SOD tinggi yang mendekati P1 (kontrol negatif) yaitu $125,88 \pm 6,57$ ng/ml, yang berarti pada kelompok P6 menunjukkan tikus putih dalam keadaan sehat.

Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun secara tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah menghambat proses oksidasi melalui penghambatan inisiasi dan propagasi reaksi oksidasi dari radikal bebas. Antioksidan perasan daun dan tangkai semanggi air yaitu flavonoid menyumbangkan atom hidrogen untuk menangkap radikal hidroksil (OH) agar tidak menjadi reaktif sehingga menghambat radikal bebas. Flavonoid bekerja melalui penangkapan dan menghilangkan O⁻ pada peroksida

nitrit (ONOO-) yang terbentuk dari nitrit oksida (NO) dengan superoksida (O₂-) yang bersifat radikal bebas (Chung, *et al.*, 1998). Kandungan antioksidan perasan daun dan tangkai semanggi air menghambat proses inisiasi sehingga dapat mencegah pembentukan radikal lipid yang bersifat tidak stabil karena hilangnya satu atom hidrogen (H) dari molekul lipid akibat radikal hidroksi (OH-), mencegah proses propagasi sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan PUFA (melalui penghambatan reaksi oksidasi) dan secara tidak langsung menurunkan kadar MDA tikus putih urolithiasis sehingga akan mencegah keadaan stres oksidatif. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti misalnya gen superoksida dismutase (SOD) (Sumardika dan Jawi, 2012).

Superoksida dismutase merupakan antioksidan enzimatik yang berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas. Pemberian bahan induksi urolithiasis yaitu etilen glikol 0,05% dan amonium klorida 2% selama 10 hari dapat meningkatkan pembentukan dan akumulasi kristal yang menyebabkan terjadinya obstruksi pada saluran urinaria sehingga tercipta kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif secara berlebihan di dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas SOD. Pengukuran aktivitas SOD pada plasma darah, eritrosit, dan jaringan penting dilakukan untuk mendiagnosis beberapa penyakit (Nelson and Cox,

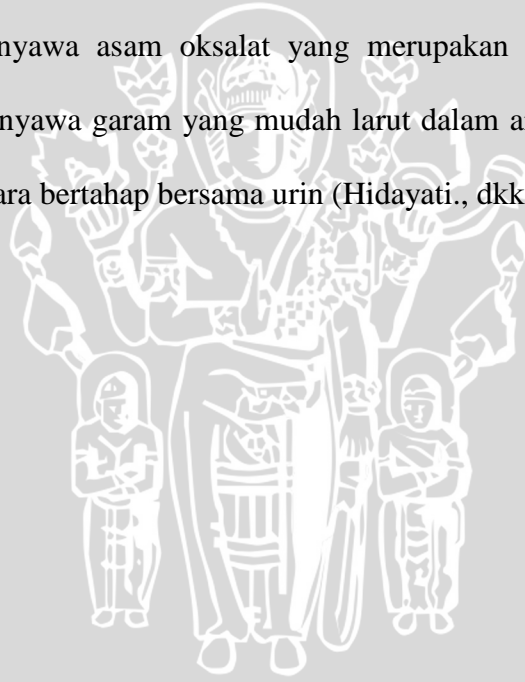
2008). Aktivitas SOD adalah jumlah mikromol substrat yang diubah oleh enzim dalam satu menit pada laju reaksi optimum (Stenesh, 1989).

Flavonoid berperan sebagai antiinflamasi terhadap kondisi sel endotel yang mengalami stres oksidatif. Mekanisme antiinflamasi dari flavonoid adalah dengan menurunkan stimulus inflamasi sehingga IKK kompleks tidak melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK α . IKK α yang tidak lepas dari struktur IKK kompleks mengakibatkan menurunnya fosforilasi IKK α menjadi I κ B. Penurunan fosforilasi IKK α menyebabkan I κ B tidak mengalami degradasi proteosomal dan menurunnya aktivasi NF- κ B untuk melakukan transkripsi di nukleus. Penurunan aktivasi NF- κ B juga dipengaruhi oleh efek inhibisi monosit terhadap enzim *protein tyrosin kinase* (PTK) p56 yang mengakibatkan PTK tidak aktif. PTK tidak teraktivasi menyebabkan faktor transkripsi NF- κ B tetap berikatan dengan inhibitor NF- κ B sehingga NF- κ B tidak dapat menduduki respon elemen yang seharusnya dapat memicu transkripsi dan translasi dari sitokin proinflamatori. Sitokin proinflamatori yang tidak terbentuk akan menurunkan aktivitas dari sel inflamasi, sehingga pelepasan ROS tidak terjadi dan mencegah keadaan stres oksidatif (Yilmaz, *et al.*, 2011). Stres oksidatif yang dihambat akan mengakibatkan penurunan kadar MDA.

Semanggi air juga mempunyai kandungan mineral yaitu kalium (K⁺) yang cukup tinggi sehingga dapat meningkatkan efek diuresis. Kandungan makro seperti ion K⁺ memiliki efek diuretik. Tingginya kalium di dalam tubuh akan menyebabkan peningkatan kadar ion K⁺ didalam cairan intraselular. Kadar kalium yang meningkat di dalam tubuh akan meningkatkan eksresi ion Na⁺ dan menekan

pelepasan enzim renin, sehingga pembentukan angiotensin I berkurang. Berkurangnya angiotensin I menyebabkan angiotensin II yang dibentuk juga menurun dan kadar hormon aldosteron rendah. Hal ini akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah, sehingga meningkatkan aliran darah ginjal dan GFR (*Glomerular Filtration Rate*) yang kemudian terjadi peningkatan ekskresi air (Chairul, 2000).

Peningkatan ekskresi urin karena Ion K^+ dari perasan daun dan tangkai semanggi air juga membuat kristal berupa kalsium oksalat terurai. Ion K^+ akan bergabung dengan senyawa asam oksalat yang merupakan pembentuk kristal dengan membentuk senyawa garam yang mudah larut dalam air, sehingga kristal tersebut akan larut secara bertahap bersama urin (Hidayati., dkk, 2009).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Perasan daun dan tangkai semanggi air (*Marsilea crenata*) pada konsentrasi 40% paling baik mencegah urolithiasis pada hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibuktikan dengan adanya penurunan kadar malondialdehid (MDA) $125,88 \pm 6,57$ ng/ml dan peningkatan aktivitas superoksida dismutase (SOD) $14,18 \pm 0,10$ u/ml.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui dosis toksik pada perasan daun dan tangkai semanggi air sebagai bahan terapi pada urolithiasis.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S. 2003. *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat. Edisi-11.*; Erlangga. Jakarta.
- Afriastini, J.J. 2003. *Marsilea crenata C. Presl., Cryptograms: Ferns and fern allies.* LIPI. Bogor.
- Anggraini, S. 2013. Uji Aktivitas Penghambatan Batu Ginjal (Anti Nefrolithiasis) Ekstrak Etanol Dari Herbal Pegagan Centella asiatica L. Urban Pada Tikus Jantan. *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 2(1): 1-5.
- Arifin, M. 2009. Analisis Mikroskopi dan Kandungan Mineral Semanggi Air Marsilea crenata Presl. (Marsileaceae). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 6 (4) : 1-10.
- Brent, J. 2001. *Current Management of Amonium Klorida Poisoning.* Drugs. 61 (7): 979–88.
- Brunetti, C., M. D. Ferdinando., A. Fini., S. Pollastri. and M. Tattini. 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of Molecular Science.* 3540-3555.
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma.* Thorax Vol 59 (2): 170-173.
- Chairul. 2000. Pengaruh pemberian ekstrak alkohol akar ilalang (*Imperata cylindrica* L.) terhadap penurunan suhu tubuh tikus putih jantan. *Berita Biologi* 5 (2): 247-254.
- Champion, P.D. and J.S. Clayton. 2001. *Border Control for Potential Aquatic Weeds.* Departemen Conversation. New Zealand.
- Chung, H.Y., T. Yokozawa., D.Y. Soung., I.S Kye and B.S. Baek. 1998. *Peroxynitrite-Scavenging Activity Of Green Tea Tanin.* J Agric. Food Chem (46) : 4484-4486.
- Comhair, S.A. XuW, S. Ghosh, F.B. Thunnissen, A. Almasan, W.J. Calhoun, A.J. Janocha, L. Zheng, S.L. Hazen, & S.C. Erzurum. 2005b. *Superoxide Dismutase Inactivation in Pathophysiology of Asthmatic Airway Remodeling and Reactivity.* Am. J. Pathol. 166: 663–674.

- Cox, R.D. and W.J Phillips. 2004. Ethylene Glycol Toxicity. *Military Medicine* 169(8): 660-663.
- Cruzan, G., R.A. Corley., G.C. Hard., J.J.W.M. Mertens., K.E. McMartin., W.M. Snellings., R. Gingell, and J.A. Deyo. 2004. Subchronic Toxicity of Ethylene Glycol in Wistar and F-344 Rats Related to Metabolism and Clearance of Metabolites. *Toxicological Sciences* 81(2): 502-511.
- Damayanti, L. dan Murwani. 2013. *Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (Marsilea crenata) terhadap Kualitas Urin pada Hewan Model Urolithiasis Tikus Putih (Rattus norvegicus)* [skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Deshpande, S.S., U.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe. 1996. Nutritional and Health Aspect of Food Antioxidant. Di dalam : Deshpande, S.S., Madhavi, D.L, and D.K. Salunkhe. *Food Antioxidant Technological, Toxicological and Health Properties*. Marcell Dekker Inc., New York.
- Edyson. 2003. *Pengaruh Pemberian Vitamin C dan E Terhadap Aktifitas Kadar MDA pada Eritrosit Rattus Novergicus Galur Wistar yang Diinduksi Ltiroksin*. Unair. Surabaya.
- Gisselman, K., C. Langston., D. Palma, and J. McCue. 2010. Calcium Oxalate Urolithiasis. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*: 496-502.
- Grotto D., G.R Barcelos., J. Valentini., L.M. An-tunes., J.P. Angeli, and S.C. Garcia. 2009. *Low Levels Of Methylmercury Induce Dna Dam-Age In Rats: Protective Effects Of Selenium*. *Arch Toxicol* 83:249-5
- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 2004. *Textbook of Medical Physiology, 10th Edition*. Elsevier Saunders.
- Hidayati, A. M., Yusrin dan A. Herlisa. 2009. Pengaruh Frekuensi Penggunaan Teh Daun Tempuyung Kering (*Sonchus arvensis*) Terhadap Daya Larut Kalsium Oksalat (CaC_2O_4). *Jurnal Kesehatan* Volume 2 Nomor. 2.
- Halliwell, B. and J.M.C Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth edition*. New York. Oxford University Press.
- Halliwell, B. and M. Whiteman. 2004. *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.

- Hariyatmi. 2004. *Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia*. MIPA 1 (14) : 52-60.
- Hedrich, H. J. 2006. *Taxonomy and stocks and strains*. In *The Laboratory Rat* M. Suckow, S. Weisbroth, and C. Franklin, eds., pp. 71-92. Elsevier Academic, Burlington, MA.
- Hesse, A. 2008. Canine Urolithiasis: Epidemiology and Analysis of Urinary Calculi. *Journal of Small Animal Practice* 31(12) : 599–604.
- Jagannath, N., S. Somashekara., Chikkannasetty, and D. Govindadas., D. Devasankaraiah. 2012. Study of Antiurolithiatic Activity of Asparagus racemosus on Albino Rats. *Indian Journal of Pharmacology* 44(5): 576-579.
- Jie, F., M.A. Glass, and P.S. Chandhoke. 1999. Impact of Ammonium Chloride Administration On A Rat Ethylene Glycol Urolithiasis Model. *Scanning Microscopy* 13(2): 299-306.
- Johnny, R.H. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Badan Penelitian dan Pengembangan kesehatan. Jakarta. Hal: 317.
- Khan, A., S. Bashir., S.R. Khan, and A.H. Gilani. 2011. Antiurolithic Activity of Origanum vulgareis Mediated Through Multiple Pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*: 1-16.
- Kristiono, S.S. 2009. Analisis Mikroskopis dan Fitokimia Semanggi Air Marsilea crenata Presl (Marsileaceae). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 5 (1) : 1-9.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lina, H.S., S. Listyawati, dan Sutarno. 2003. *Analisis Kimia-Fisika Urin Tikus Putih (Rattus norvegicus) Setelah Pemberian Daun Seledri (Apium graveolenslinn)*. Biosmart volume 5 nomer 1: 43-46.
- Lulich, J.P. and C.A. Osborne. 2007. *Management of Urolithiasis*. BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology, 2nd Edition. London. 252-263.
- Malole, M.B.M. dan C.S.U. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB.

- Mariyani. 2009. *Kasus Urolithiasis pada Anjing dan Kucing* [skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed.)*. Worth Publisher. New York.
- Nurjanah, A. Azka. dan A. Abdullah. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*: 152-158.
- Price, S.A. and M.W. Lorraine. 2006. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. EGC. Jakarta.
- Ross, L.A. 2005. Calcium Oxalate Urolithiasis in Dogs and Cats. *Standards of Care: Emergency and Critical Care Medicine from The Publisher of Compendium 77*: 1-6.
- Saputra, A.A.H. 2009. Uji Aktivitas Anti Lithiasis Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) Pada Tikus Jantan. *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 14 (2) : 1-13.
- Shah, B.N., K.D. Raiyani, and D.C. Modi. 2011. Antiurolithiatic Activity Studies of *Momordica charantia* Linn Fruits. *International Journal of Pharmacy Research and Technology* 1(1): 6-11.
- Sharma, A., S. Bansal, dan R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian Journal of Pediatrics* 70(9) : 715-717
- Sharp, P.E. and M.C. La Regina. 1998. *The Laboratory Rat*. America: CRC Press LLC.
- Simanjuntak, Kristina. 2007. Radikal Bebas Dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida (CCl₄). *J Kes Bina Widya* 18 (1) : 25-31.
- Singh, D., R. Kaur., V. Chander, and K. Chopra. 2006. Antioxidants in The Prevention of Renal Disease. *Journal Medicine Food* 9 (4) : 443-450.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Press. Washington.
- Smith, J. B. and S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakkan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Sparkes, A.H. and C.J. Philippe. 2008. *Urolithiasis in Cats: Managing The Risks*. Nestle Purina Pet Care. 1-7.

- Steenis, C.G.G.J. 2008. *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stenesh, J. 1989. *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., Canada.
- Stockham, S.L. dan M.A. Scott. 2008. *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd Edition. Blackwell Publishing. Iowa.
- Subandi, Y. Kristianto dan S. G. Pande. 2006. Pengaruh Pemberian The Hitam terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) dan Malondialdehid (MDA) pada Tikus Putih yang Diberi Diet Aterogenik [skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suharjo, J.B. dan B. Cahyono. 2010. Manajemen Batu Ginjal. *Focus Medicinus* 23(1): 29-34.
- Sumardika, I.W. dan I.M. Jawi. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid Dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus Yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina* 43 : 67-71.
- Susilawati, H.L., L. Shanty, dan Sutarno. 2003. Analisis Kimia Fisika Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* Linn.). *Jurnal Biosmart*, Volume 5: 43-46.
- Valko, M. 2006. *Free Radical, Metal And Antioxidant In Oxidative Stress Induced Cancer*, J.Chem-BioI, Rusia (160) : 1-40.
- Varcácel, M. 2000. *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*. Springer, New York.
- Vedrenne, N., Cotard, J.P., and Paragon, B. 2003. L'Urolythiase Feline: Actualites Epidemiologi-ques Le Point. *Veterinary* 232: 44 – 48.
- Wei-hua, L., H. Zi-qing, N. Hong., T. Fu-tian., H. He-qing., L. Xue-juan., D. Yan-hui., C. Shao-rui., G. Fen-fen., H. Wen-ge., C. Feng-ying, and L. Pei-qing. 2008. Berberine ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by suppression of both oxidative stress and aldose reductase. *Chin Med J* 2008;121(8):706-712.
- Wijaya, S. dan F.L. Darsono. 2005. Uji Daya Antikalkuli Perasan Buah Ketimun (*Cucumis sativus* L.) Terhadap Tikus Putih Jantan Dengan Metode Kalkuli. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 16(3): 173-176.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.

- Winarto, W.P. dan Tim Karya Sari. 2004. *Tempuyung Tanaman Penghancar Batu Ginjal*. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Wirakusumah, E.S. 2000. *Tetap Bugar di Usia Lanjut*. Trubus Agriwidya. Jakarta. Hal. 6-97.
- Wood, L. G., P. G. Gibson. and M. L. Garg. 2003. Biomarkers of Lipid Peroxidation, Airway Inflammation and Asthma. *European Respiratory Journal* 21: 177–186.
- Wuryastuti, H. 2000. *Stress Oksidatif dan Implikasinya Terhadap Kesehatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada. Hal 39.
- Yacoeb, A.M., Nurjanah., M. Arifin., W. Sulistiono, dan S.S. Kristiono. 2010. Deskripsi Histologis Dan Perubahan Komposisi Kimia Daun Dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata*) Akibat Perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* XII(2):81-95.
- Yadav, R.D., S.K. Jain., S. Alok., A. Mahor., J.P. Bharti, dan M. Jaiswal. 2011. Herbal Plants Used in The Treatment of Urolithiasis: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*: 1412-1420.
- Yilmaz, H., Y. Giizel., Z. Onal., G. Altiparmak, and S.O. Kocakaya. 2011. *4D-QSAR Study of p56 Protein Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Flavonoid Derivates Using MCET Method*. *Korean Chemical* 32(12): 4352-4360.
- Yoon, K.K., Y.O. Sun, G.J. Seong, W.P. Heung, Y.L. Soo, Y.C. Eun, B. Boram, S.L. Hyun, H.O. Min, S.K. You, H.K. Jong, S.G. Yong, H.C. Sang, U.M. Kyung, Y.K. You, Z. Zhu. 2007. Airway Exposure Levels of Lipopolysaccharide Determine Type 1 versus Type 2 Experimental Asthma. *The Journal of Immunology* 178: 5375-5382.
- Zabri, H., C. Kodjo., A. Benie., J.M. Bekro, and Y.A. Bekro. 2008. Phytochemical Screening and Determination of Flavonoids in *Secamone Afzelii* (Asclepiadaceae) Extracts. *Journal of Pure and Applied Chemistry* 2(8): 80-82.

Lampiran 1. Lembar Pernyataan Tentang Payung Penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Bonanza Wahyu Pradana

Nim : 0911313016

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas : Program Kedokteran Hewan

Universitas : Brawijaya

Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Efek Preventif Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Urolithiasis pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang Diinduksi Etilen Glikol dan Amonium Klorida”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dari peneliti utama Dr. Sri Murwani, drh., MP.

Malang, 15 November 2013

Yang membuat pernyataan,

Bonanza Wahyu Pradana
0911313016

Lampiran 2. Determinasi Semanggi Air (*Marsilea crenata*)



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA
 Jalan Labor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 037/B/ 101.8 / 2013
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Semanggi air**

Memenuhi permohonan saudara :
 Nama : BONANZA WAHYU PRADANA
 N I M : 0911313016
 Fakultas : PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. Perihal determinasi tanaman semanggi air
 Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Divisi : Pteridophyta (paku-pakuan)
 Kelas : Pteridopsida
 Ordo : Salviniales
 Famili : Marsileaceae
 Genus : Marsilea
 Spesies : *Marsilea crenata Presl*
 Sinonim : *Marsilea quadrifolia Bl.* ; *M. minuta T.*
 Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi
 Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1
2. **Morfologi** : Habitus : Semak, menjalar, panjang ± 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang ± 2 cm, lebar ± 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, lepas/berdiri sendiri. Kelopak dua, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serabut, putih kotor.
3. **Nama Simplisia** : Marsileae crenatae Herba/ Herba semanggi air.
4. **Kandungan Kimia** : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol
5. **Penggunaan** : Penelitian
6. **Daftar Pustaka** :
 - Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/> salam, Diakses 14 Februari 2007
 - Anonim, <http://www.plantamor.com/semanggi/>, diakses 11 Desember 2010
 - Steenis, C.G.G.J Van Dr, *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita, Jakarta
 - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria.1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 11 Maret 2013
 Kepala UPT-Materia Medica Batu

Drs. Jusin R.M. Apt. MKes.
 NIP.19611102-199103 1 003



Lampiran 3. Sertifikat Layak Etik Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
 THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE
 FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
 MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY
 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
 THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH
 Jalan Veteran Malang – 65145
 Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 421 / EC / KEPK / 07 / 2013

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN :

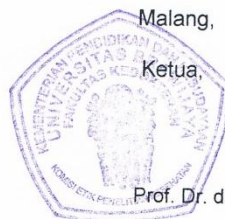
JUDUL : EFEK PREVENTIF PERASAAN DAUN DAN TANGKAI SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP UROLITHIASIS PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI ETILEN GLIKOL DAN AMONIUM KLORIDA

PENELITI UTAMA ANGGOTA : Dr.drh.SRI MURWANI, MP
 : drh.I.D.P ANOM ADNYANA
 JEFRI HARDYANTO
 LELYTA DAMAYANTI
 MARDIANA KUSUMAWATI SARTONO
 BONANZA WAHYU P

UNIT / LEMBAGA : PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

TEMPAT PENELITIAN : KLINIK HEWAN PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

DINYATAKAN LAIK ETIK



Malang,

01 AUG 2013.

Ketua,

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K) M.Hum

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis

Dosis = 12 ml/200 g BB/hari

Etilen Glikol 0,75% + Amonium Klorida 2% + Aquadest = 12 ml

Etilen Glikol 0,75% = $0,75/100 \times 12 = 0,09$ ml

Amonium Klorida 2% = $2/100 \times 12 = 0,24$ ml

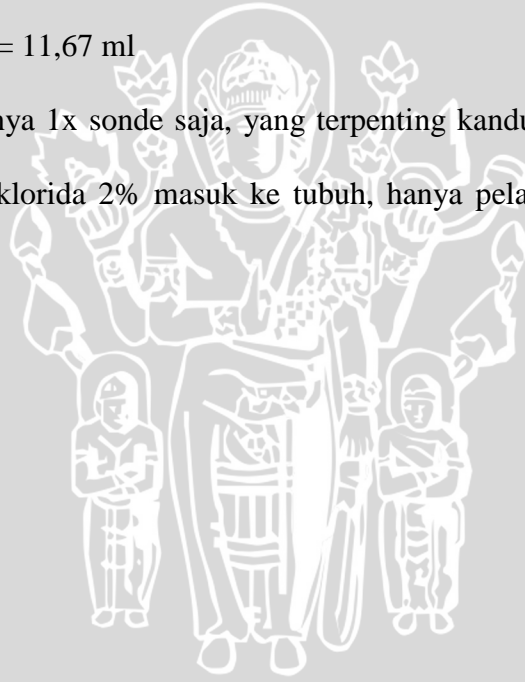
Dikonversi menjadi gram $0,24 \times 0,9 \text{ g} = 0,216 \text{ g}$

Aquadest = 12 ml – Etilen Glikol 0,75% - Amonium Klorida 2%

$$= 12 - 0,09 - 0,24$$

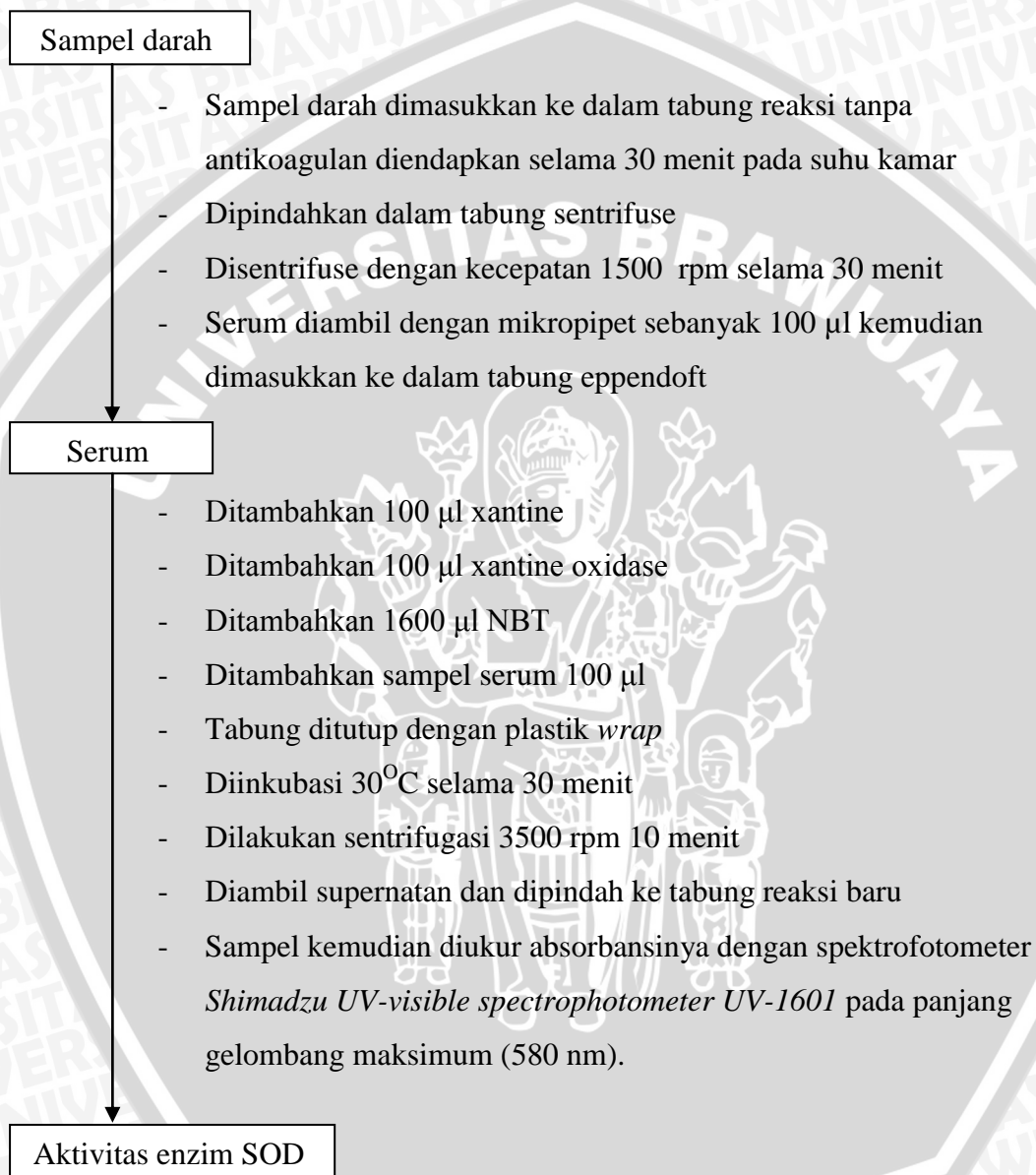
$$= 11,67 \text{ ml}$$

Jadi, induksi hanya 1x sonde saja, yang terpenting kandungan etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% masuk ke tubuh, hanya pelarutnya (Aquadest) saja yang dikurangi.



Lampiran 5.

5.1 Skema Prosedur Pengukuran Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)



Lampiran 6. Skema Prosedur Pengamatan Kadar MDA

6.1 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehid (MDA)

100 μ L stok kit MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 μ g/mL

- Dimasukan ke dalam tabung appendorf
- Ditambahkan 550 μ L aquades
- Ditambahkan 100 μ L TCA 100%
- Ditambahkan 250 μ L HCl 1N
- Ditambahkan 100 μ L Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Diinkubasi pada suhu 100°C selama 30 menit

Supernatan

- Diinkubasi dalam *waterbath* 100°C selama 30 menit
- Dibiarkan pada suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal

Absorbansi larutan standar dan kurva baku MDA

6.2 Pengukuran kadar Malondialdehid (MDA)

Organ ginjal

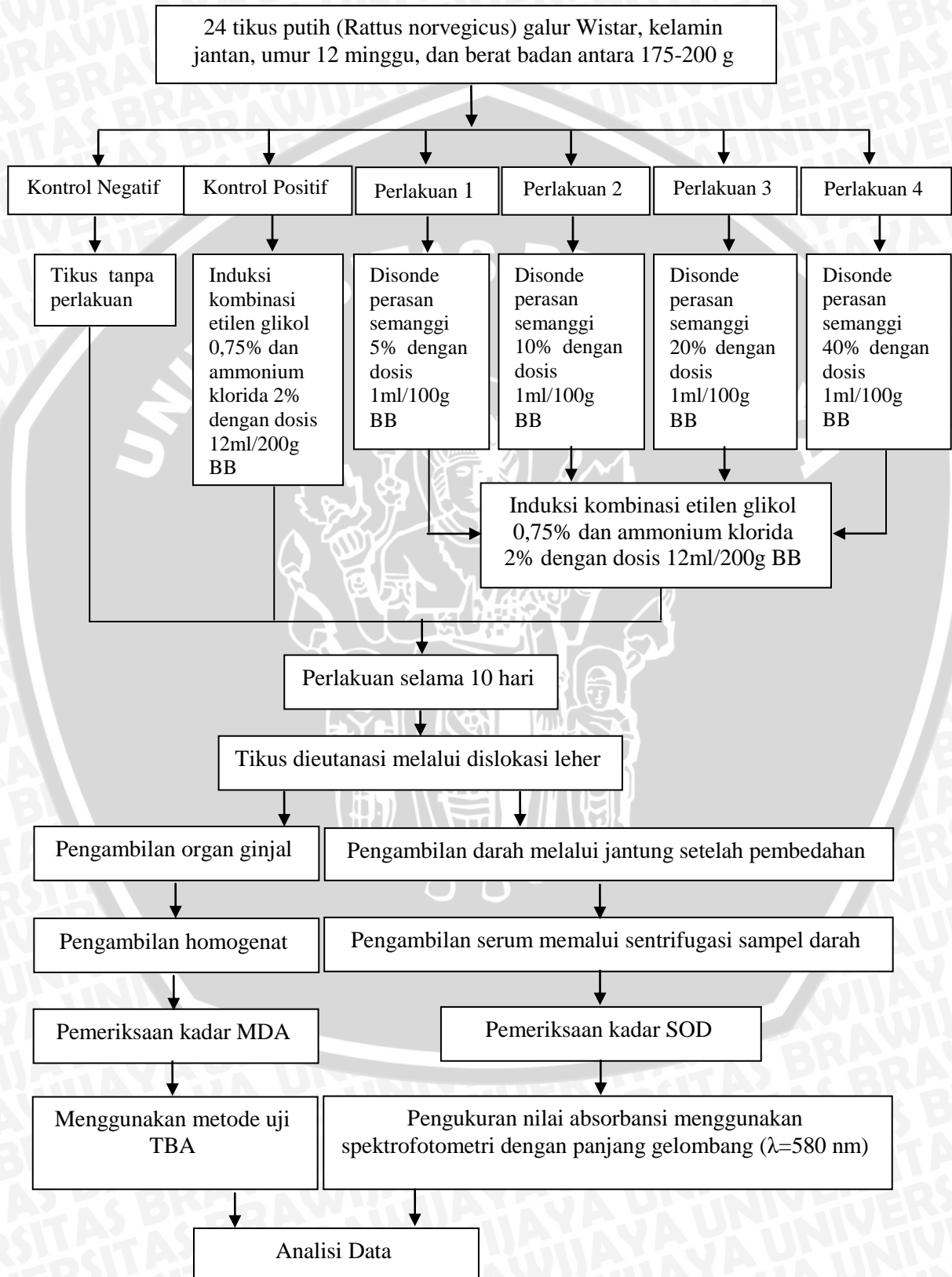
- dicuci dengan larutan PBS
- ditimbang 0,5 gram
- dimasukkan ke dalam mortal
- digerus
- ditambahkan larutan 500 μ l NaCl fisiologis 0,9%
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit
- dimasukkan dalam appendorf

Supernatan

- sebanyak supernatan 100 μ L dimasukkan dalam appendorf
- ditambahkan 1450 μ l akuades
- ditambahkan 100 μ l TCA 100%
- ditambah 250 μ l HCl 1 N
- ditambahkan 100 μ l Na-Thio 1%
- diinkubasi 100^oC selama 10 menit
- dilakukan sentrifugasi 3500 rpm 10 menit
- supernatan dan dipindah dalam appendorf
- Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (532 nm)

Hasil

Lampiran 7. Diagram Tahapan Penelitian

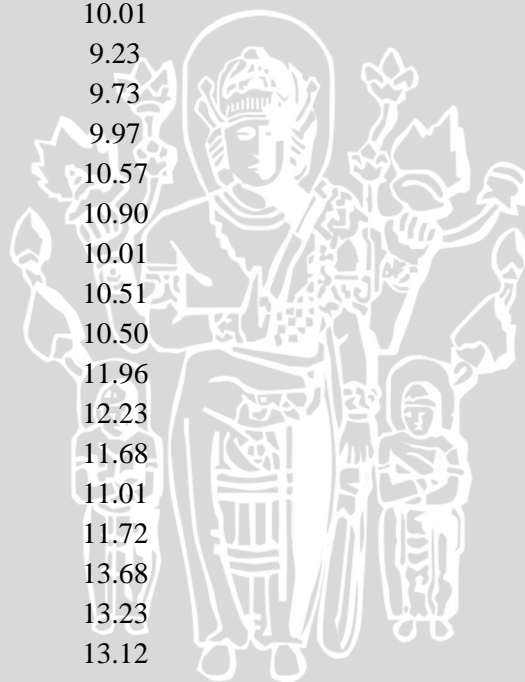


Lampiran 8 Perhitungan kadar

SOD SERUM

$$Y=0,018X+0,1048$$

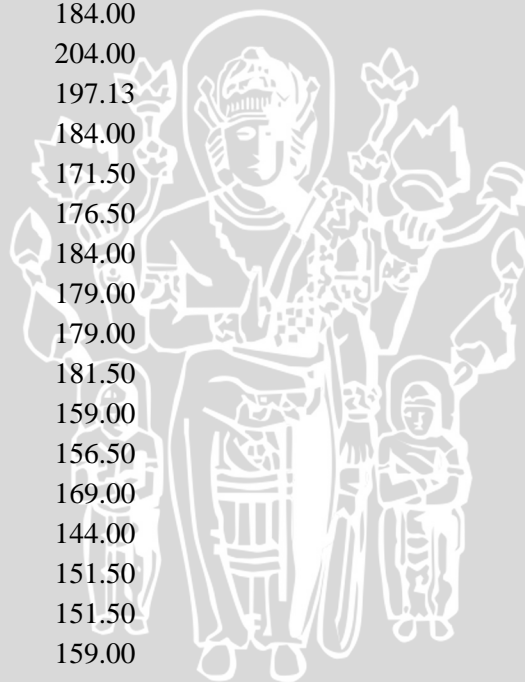
SAMPEL	ABS	Aktivitas SOD (u/ml)
K- 1	0.366	14.51
K- 2	0.357	14.01
K- 3	0.369	14.68
K- 4	0.364	14.40
Rata-rata		14.40
K+ 1	0.301	10.90
K+ 2	0.285	10.01
K+ 3	0.271	9.23
K+ 4	0.280	9.73
Rata-rata		9.97
PI 1	0.295	10.57
PI 2	0.301	10.90
PI 3	0.285	10.01
PI 4	0.294	10.51
Rata-rata		10.50
PII 1	0.320	11.96
PII 2	0.325	12.23
PII 3	0.315	11.68
PII 4	0.303	11.01
Rata-rata		11.72
PIII 1	0.351	13.68
PIII 2	0.343	13.23
PIII 3	0.341	13.12
PIII 4	0.329	12.46
Rata-rata		13.12
PVI 1	0.359	14.12
PVI 2	0.362	14.29
PVI 3	0.361	14.23
PVI 4	0.358	14.07
Rata-rata		14.18



MDA GINJAL

$$Y = 0,0004 x - 0,0126$$

SAMPEL	ABS	Kadar MDA (ng/ml)
K- 1	0.040	131.50
K- 2	0.035	119.00
K- 3	0.040	131.50
K- 4	0.036	121.50
Rata-rata		125.88
K+ 1	0.069	204.00
K+ 2	0.066	196.50
K+ 3	0.061	184.00
K+ 4	0.069	204.00
Rata-rata		197.13
PI 1	0.061	184.00
PI 2	0.056	171.50
PI 3	0.058	176.50
PI 4	0.061	184.00
Rata-rata		179.00
PII 1	0.059	179.00
PII 2	0.060	181.50
PII 3	0.051	159.00
PII 4	0.050	156.50
Rata-rata		169.00
PIII 1	0.045	144.00
PIII 2	0.048	151.50
PIII 3	0.048	151.50
PIII 4	0.051	159.00
Rata-rata		151.50
PVI 1	0.038	126.50
PVI 2	0.036	121.50
PVI 3	0.037	124.00
PVI 4	0.039	129.00
Rata-rata		125.25



Lampiran 9. Analisis Statistik *One Way* ANOVA Kadar MDA

Tabel Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		MDA
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	1.5796E2
	Std. Deviation	2.72859E1
Most Extreme Differences	Absolute	.189
	Positive	.189
	Negative	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		.926
Asymp. Sig. (2-tailed)		.358

Hasil pengujian normalitas pada tabel *One Sample Kolmogorof Smirnof Test* dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,358. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

Tabel Uji Homogenitas

Levene Statistik	df1	df2	Sig.
.353	5	18	.874

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari homogenitas sebesar 0,353 dengan nilai signifikansi sebesar 0,874 yang lebih besar dari alpha 0,05. Karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen. Pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

Tabel ANOVA

MDA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16958.333	5	3391.667	368.604	.000
Within Groups	165.625	18	9.201		
Total	17123.958	23			

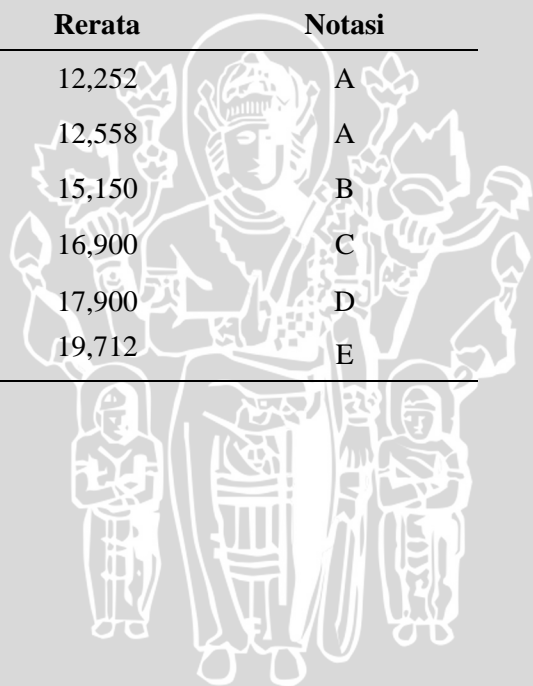
Uji Lanjutan (Posthoc Test)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-71.25000*	2.14492	.000	-78.0666	-64.4334
	perlakuan 1	-53.12500*	2.14492	.000	-59.9416	-46.3084
	perlakuan 2	-43.12500*	2.14492	.000	-49.9416	-36.3084
	perlakuan 3	-25.62500*	2.14492	.000	-32.4416	-18.8084
	perlakuan 4	.62500	2.14492	1.000	-6.1916	7.4416
kontrol positif	kontrol negatif	71.25000*	2.14492	.000	64.4334	78.0666
	perlakuan 1	18.12500*	2.14492	.000	11.3084	24.9416
	perlakuan 2	28.12500*	2.14492	.000	21.3084	34.9416
	perlakuan 3	45.62500*	2.14492	.000	38.8084	52.4416
	perlakuan 4	71.87500*	2.14492	.000	65.0584	78.6916
perlakuan 1	kontrol negatif	53.12500*	2.14492	.000	46.3084	59.9416
	kontrol positif	-18.12500*	2.14492	.000	-24.9416	-11.3084
	perlakuan 2	10.00000*	2.14492	.002	3.1834	16.8166
	perlakuan 3	27.50000*	2.14492	.000	20.6834	34.3166
perlakuan 2	kontrol negatif	43.12500*	2.14492	.000	36.3084	49.9416
	kontrol positif	-28.12500*	2.14492	.000	-34.9416	-21.3084
	perlakuan 1	-10.00000*	2.14492	.002	-16.8166	-3.1834
	perlakuan 3	17.50000*	2.14492	.000	10.6834	24.3166
perlakuan 3	perlakuan 4	43.75000*	2.14492	.000	36.9334	50.5666
	kontrol negatif	25.62500*	2.14492	.000	18.8084	32.4416
	kontrol positif	-45.62500*	2.14492	.000	-52.4416	-38.8084
	perlakuan 1	-27.50000*	2.14492	.000	-34.3166	-20.6834
perlakuan 4	perlakuan 2	-17.50000*	2.14492	.000	-24.3166	-10.6834
	perlakuan 3	26.25000*	2.14492	.000	19.4334	33.0666
	kontrol negatif	-.62500	2.14492	1.000	-7.4416	6.1916
	kontrol positif	-71.87500*	2.14492	.000	-78.6916	-65.0584
perlakuan 1	perlakuan 2	-53.75000*	2.14492	.000	-60.5666	-46.9334
	perlakuan 3	-43.75000*	2.14492	.000	-50.5666	-36.9334
	perlakuan 4	-26.25000*	2.14492	.000	-33.0666	-19.4334

Homogenous Subsets

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
perlakuan 4	4	1.25252				
kontrol negatif	4	1.25882				
perlakuan 3	4		1.51502			
perlakuan 2	4			1.69002		
perlakuan 1	4				1.79002	
kontrol positif	4					1.97122
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Perlakuan	Rerata	Notasi
P1 (Kontrol negatif)	12,252	A
P6 (Perlakuan 4)	12,558	A
P5 (Perlakuan 3)	15,150	B
P4 (Perlakuan 2)	16,900	C
P3 (Perlakuan 1)	17,900	D
P2 (Kontrol Positif)	19,712	E



Lampiran 10. Analisis Statistik *One Way* ANOVA Kadar SOD

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SOD	Perlakuan
N		24	24
Normal Parameters ^a	Mean	12.3142	3.5000
	Std. Deviation	1.79709	1.74456
Most Extreme Differences	Absolute	.161	.138
	Positive	.141	.138
	Negative	-.161	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z		.787	.678
Asymp. Sig. (2-tailed)		.565	.748

Hasil pengujian normalitas pada tabel *One Sample Kolmogorof Smirnof Test* dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,565. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.080	5	18	.404

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 1,080 dengan nilai signifikansi sebesar 0,404 yang lebih besar dari alpha 0,05. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen. Pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

Tabel ANOVA

ANOVA					
SOD	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70.545	5	14.109	68.008	.000
Within Groups	3.734	18	.207		
Total	74.279	23			

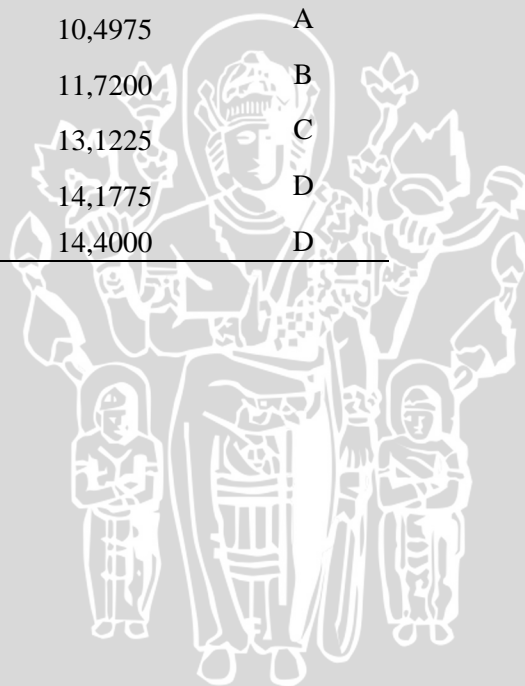
Uji Lanjutan (*Posthoc Test*)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	4.43250*	.32207	.000	3.4089	5.4561
	perlakuan 1	3.90250*	.32207	.000	2.8789	4.9261
	Perlakuan 2	2.68000*	.32207	.000	1.6564	3.7036
	perlakuan 3	1.27750*	.32207	.010	.2539	2.3011
	perlakuan 4	.22250	.32207	.981	-.8011	1.2461
kontrol positif	kontrol negatif	-4.43250*	.32207	.000	-5.4561	-3.4089
	perlakuan 1	-.53000	.32207	.581	-1.5536	.4936
	Perlakuan 2	-1.75250*	.32207	.000	-2.7761	-.7289
	perlakuan 3	-3.15500*	.32207	.000	-4.1786	-2.1314
	perlakuan 4	-4.21000*	.32207	.000	-5.2336	-3.1864
perlakuan 1	kontrol negatif	-3.90250*	.32207	.000	-4.9261	-2.8789
	kontrol positif	.53000	.32207	.581	-.4936	1.5536
	Perlakuan 2	-1.22250*	.32207	.014	-2.2461	-.1989
	perlakuan 3	-2.62500*	.32207	.000	-3.6486	-1.6014
	perlakuan 4	-3.68000*	.32207	.000	-4.7036	-2.6564
Perlakuan 2	kontrol negatif	-2.68000*	.32207	.000	-3.7036	-1.6564
	kontrol positif	1.75250*	.32207	.000	.7289	2.7761
	perlakuan 1	1.22250*	.32207	.014	.1989	2.2461
	perlakuan 3	-1.40250*	.32207	.004	-2.4261	-.3789
	perlakuan 4	-2.45750*	.32207	.000	-3.4811	-1.4339
perlakuan 3	kontrol negatif	-1.27750*	.32207	.010	-2.3011	-.2539
	kontrol positif	3.15500*	.32207	.000	2.1314	4.1786
	perlakuan 1	2.62500*	.32207	.000	1.6014	3.6486
	Perlakuan 2	1.40250*	.32207	.004	.3789	2.4261
	perlakuan 4	-1.05500*	.32207	.041	-2.0786	-.0314
perlakuan 4	kontrol negatif	-.22250	.32207	.981	-1.2461	.8011
	kontrol positif	4.21000*	.32207	.000	3.1864	5.2336
	perlakuan 1	3.68000*	.32207	.000	2.6564	4.7036
	Perlakuan 2	2.45750*	.32207	.000	1.4339	3.4811
	perlakuan 3	1.05500*	.32207	.041	.0314	2.0786

Homogenous Subsets

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol positif	4	9.9675			
perlakuan 1	4	10.4975			
Perlakuan 2	4		11.7200		
perlakuan 3	4			13.1225	
perlakuan 4	4				14.1775
kontrol negatif	4				14.4000
Sig.		.581	1.000	1.000	.981

Perlakuan	Rerata	Notasi
P2 (Kontrol Positif)	9,9675	A
P3 (Perlakuan 1)	10,4975	A
P4 (Perlakuan 2)	11,7200	B
P5 (Perlakuan 3)	13,1225	C
P6 (Perlakuan 4)	14,1775	D
P1 (Kontrol negatif)	14,4000	D



Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian



Gambar 1. Kandang Tikus Selama Penelitian



Gambar 2. Induksi perasan daun dan tangkai semanggi air



Gambar 3. Pembuatan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air



Gambar 4. Prosedur Euthanasi Tikus Melalui Dislokasi Leher



Gambar 5. Pengambilan Darah Melalui Jantung Setelah Pembedahan



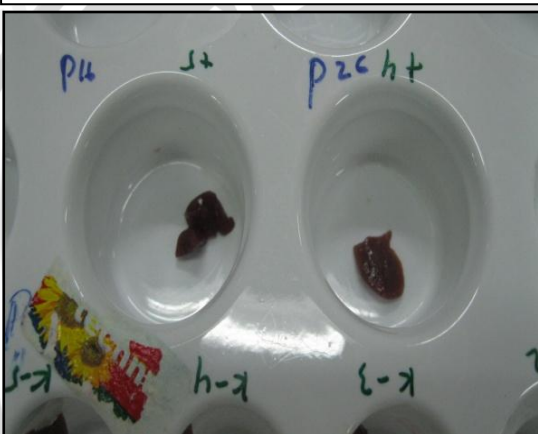
Gambar 6. Sentrifugasi Sampel Darah Untuk Mendapatkan Serum Darah



Gambar 7. Serum Darah Dalam Eppendoft



Gambar 8. Penimbangan organ ginjal



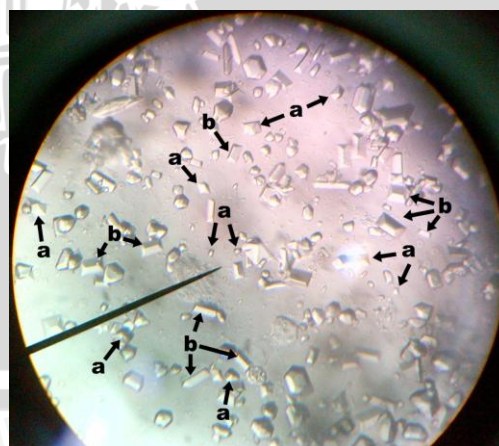
Gambar 9. Proses penggerusan organ ginjal untuk mendapatkan supernatan



Gambar 10. Sampel Siap Diukur Nilai Absorbansinya



Gambar 11. Pengukuran dengan Spektrofotometer



Gambar 12. A. Kristal kalsium oksalat dan B. kristal struvit