

Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS)
dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada
Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Induksi Streptokinase

SKRIPSI

Oleh :
CANDRA LUQMANA
0911313017



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

**Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS)
dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada
Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Induksi Streptokinase**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
CANDRA LUQMANA
0911313017



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS)
dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada
Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Induksi Streptokinase**

Oleh :
CANDRA LUQMANA
0911313017

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 09 Desember 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

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

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

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

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : CANDRA LUQMANA

NIM : 0911313017

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul : “ Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS) dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase.”

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 09 Desember 2013

Yang menyatakan,

(CANDRA LUQMANA)

NIM. 0911313017

Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase

ABSTRAK

Kondisi fibrosis *tubulointerstitial* merupakan salah satu mekanisme utama yang mendasari proses perkembangan *chronic kidney disease* (CKD) menjadi *end-stage renal disease* (ESRD). Angka kejadian CKD pada kucing geriatrik sebanyak 81% dari 5.496 kasus yang dilaporkan oleh Banfield Pet Hospital di Amerika Serikat. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui berapakah dosis optimum streptokinase yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh perubahan kadar MDA dan perubahan ekspresi iNOS pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol (sehat) tanpa perlakuan, kelompok B tikus diinduksi streptokinase satu kali (1x 6000 IU), kelompok C tikus diinduksi streptokinase dua kali (2x 6000 IU), dan kelompok D tikus diinduksi streptokinase tiga kali (3x 6000 IU). Ekspresi iNOS diukur menggunakan metode imunohistokimia dengan penghitungan menggunakan *software axiovision*. Kadar MDA ginjal tikus diukur menggunakan metode spektrofotometri. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa induksi streptokinase mengakibatkan peningkatan ekspresi iNOS dan kadar MDA yang berbeda nyata ($P < 0.05$) pada kelompok perlakuan. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa induksi streptokinase sebanyak 1x 6.000 IU merupakan dosis optimum yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh peningkatan kadar MDA dan peningkatan ekspresi enzim iNOS pada organ ginjal tikus.

Kata kunci : fibrosis ginjal, streptokinase, *axiovision*, malondialdehid, iNOS.

Expression Of Nitric Inducible Oxide Synthase (iNOS) and Level Of Malondialdehyde (MDA) Kidney Rats (*Rattus norvegicus*) induced Streptokinase

ABSTRACT

Tubulointerstitial fibrosis is a major mechanism underlying the development of chronic kidney disease (CKD) to end-stage renal disease (ESRD). The incidence of CKD in geriatric cats was as much as 81% of 5,496 cases reported by Banfield Pet Hospital in the United States. The aim of this study is to know the optimum dose of streptokinase to induce renal fibrosis followed by increasing levels of Nitric Inducible Oxide Synthase (iNOS) And Level Of Malondialdehyde (MDA) expression on *R. norvegicus* model of renal fibrosis induced by streptokinase. The research used Completely Randomized Design (CRD). The animal models were divided into four groups: Group A is the control mice (healthy) without treatment, group B rats induced streptokinase (1x 6000 IU) once, group C rats induced streptokinase (2x 6000 IU) twice, and group D rats induced streptokinase (3x 6000 IU) three times. iNOS expression were measured by immunohistochemistry technique which calculated using axiovision software. MDA levels in rat's kidney were measured using spectrophotometry. The results showed that induced streptokinase increasing iNOS expression and MDA level and significantly different ($P < 0.05$) between treated groups. It can be concluded that streptokinase induction of 1x 6000 IU is the optimum dose to induce renal fibrosis followed by increasing level of MDA and iNOS expression in rat's kidney.

Key words : Renal fibrosis, streptokinase, axiovision, malondialdehyde, iNOS.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga skripsi yang berjudul “ Studi Ekspresi *Inducible nitric Oxide Synthase* (INOS) dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase ” ini dapat terselesaikan. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES tentang pembuatan hewan model fibrosis ginjal.

Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu membimbing dalam menyelesaikan skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES yang telah mengizinkan penulis untuk mengikuti penelitian dibawah payung penelitian beliau dan selaku dosen pembimbing pertama, atas bimbingan, kesabaran, waktu dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
2. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku dosen pembimbing kedua atas bimbingan, kesabaran, ilmu dan waktu yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Dyah Ayu Oktavanie A. P., M. Biotech. dan drh. Handayu Untari selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
4. Keluarga penulis, ayahanda Prayitno dan ibunda Pujiatin serta adik Annisa tercinta yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa yang tiada henti-hentinya demi keberhasilan putra - putrinya.

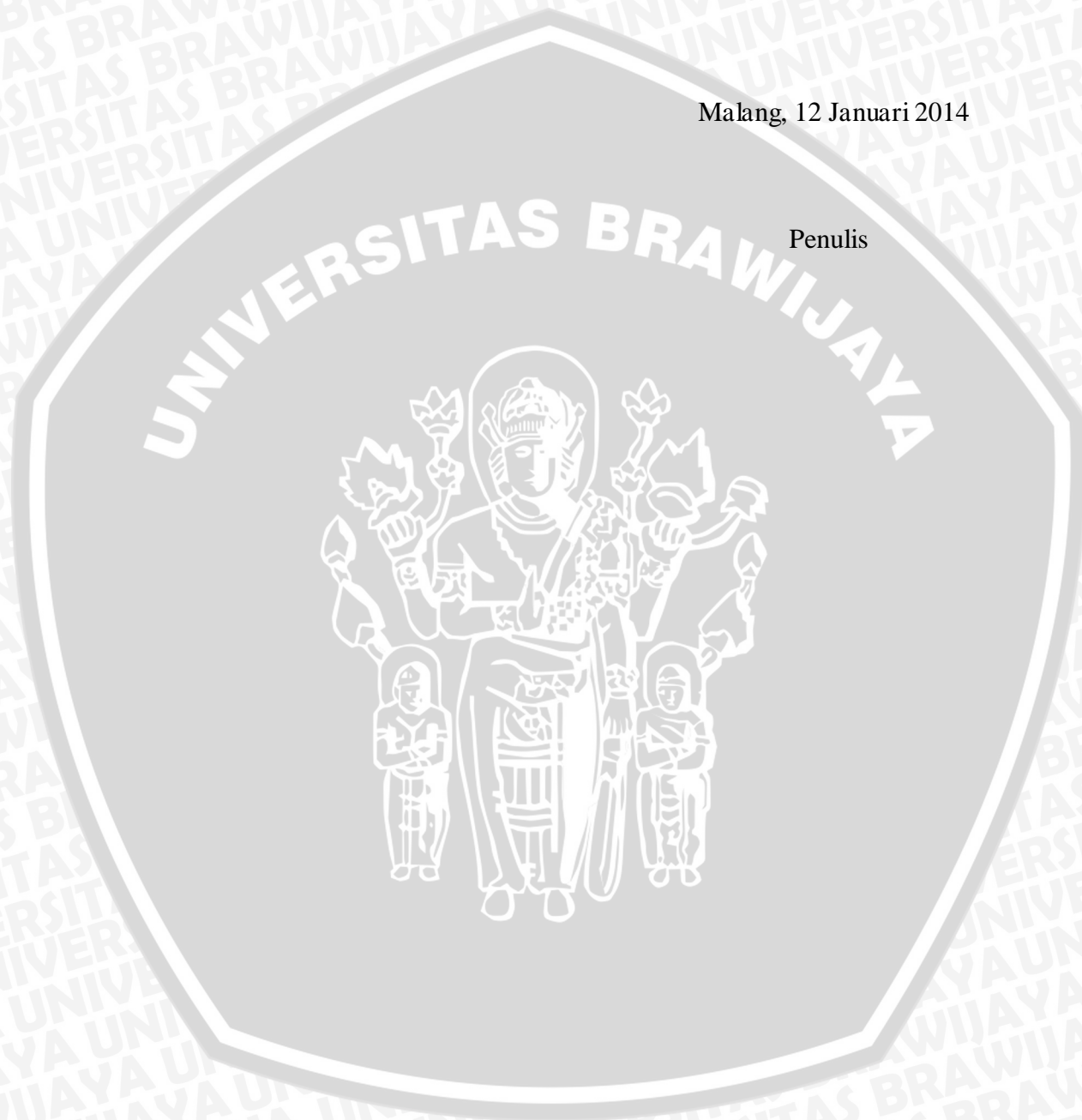
5. Seluruh staf dan asisten Laboratorium Biokimia, Laboratorium Fisiologi Hewan, dan Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya serta Laboratorium Patologi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya yang telah membantu penulis dalam penelitian.
6. Seluruh jajaran Dekanat, Dosen dan Staff Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas fasilitas dan waktu yang diberikan kepada penulis.
7. Teman-teman angkatan 2009 PKH UB, Prima, Pimpim dan Winda dan yang lainnya yang selalu memberikan semangat, inspirasi serta keceriaan yang luar biasa.
8. Teman kelompok penelitian fibrosis ginjal Raka, Keny, Riska, Helda, Pascara, Elok, Hariati dan Vindy atas kesabaran, toleransi, kekompakan serta semangat yang tiada kenal lelah.
9. Keluarga ku Sonya Loresta, Ling Sandra dan Ari Putu yang telah memberikan warna dalam hidup ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan proposal skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi kesempurnaan selanjutnya. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat khususnya bagi penulis dan umumnya pada orang lain untuk penelitian selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini. Amin

Malang, 12 Januari 2014

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Fibrosis Ginjal pada Bidang Veteriner	7
2.2 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Fibrosis Ginjal	7
2.3 Streptokinase	8
2.4 Hubungan Streptokinase dengan Fibrosis Ginjal	9
2.5 Hubungan <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) dengan Patomekanisme Fibrosis Ginjal	10
2.6 Hubungan malondialdehid (MDA) dengan patomekanisme fibrosis ginjal	12
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL	16
3.1 Kerangka Konseptual	16
3.2 Hipotesis Penelitian	19
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	20
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	20
4.2.1 Alat Penelitian	20
4.2.2 Bahan Penelitian	20
4.3 Tahapan Penelitian	21
4.3.1 Pra Penelitian	21
4.3.2 Persiapan Sampel	21
4.3.3 Rancangan Penelitian	22
4.3.4 Variabel Penelitian	22

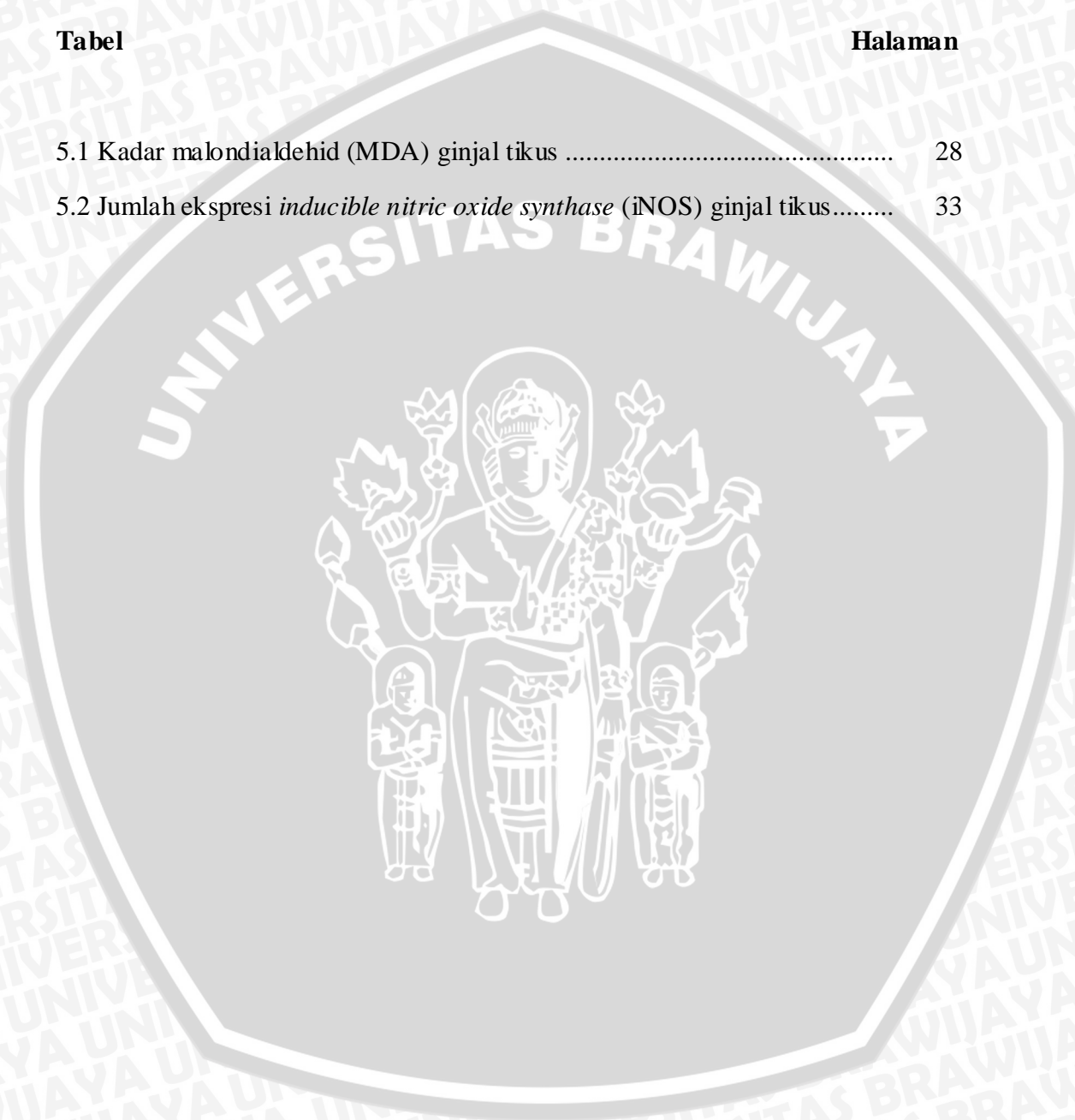


4.3.5 Analisis Data	23
4.4 Prosedur Penelitian	23
4.4.1 Persiapan Hewan Coba	23
4.4.2 Preparasi Streptokinase	24
4.4.3 Induksi Streptokinase pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	24
4.4.4 Pengambilan Organ Ginjal	25
4.4.5 Uji Imunohistokimia	25
4.4.6 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehid (MDA)	26
4.4.7 Pengukuran Kadar Malondialdehid	27
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase	28
5.2 Ekspresi <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) pada Ginjal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase	32
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1 Kesimpulan	37
6.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	44



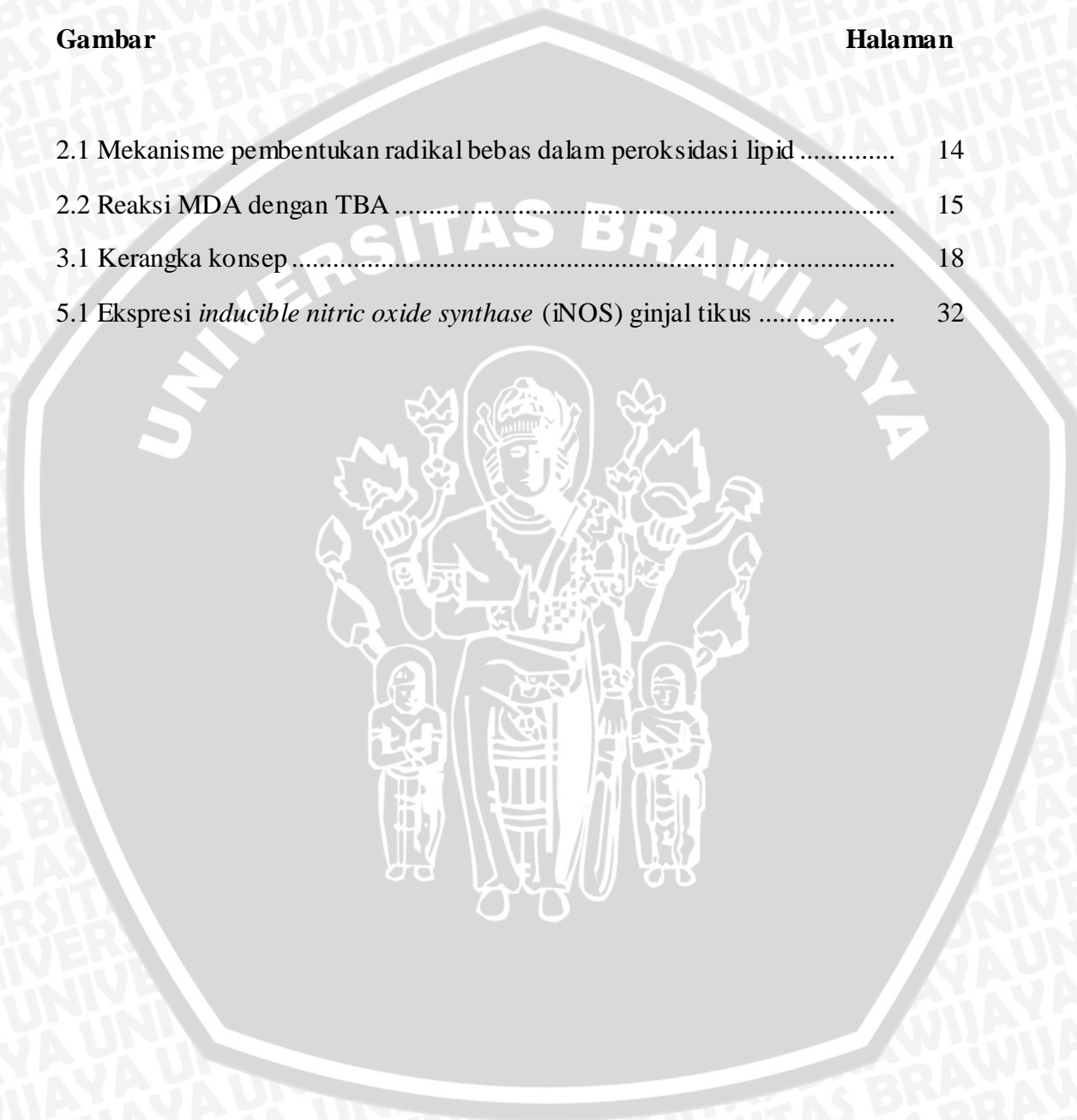
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Kadar malondialdehid (MDA) ginjal tikus	28
5.2 Jumlah ekspresi <i>inducible nitric oxide synthase</i> (iNOS) ginjal tikus.....	33



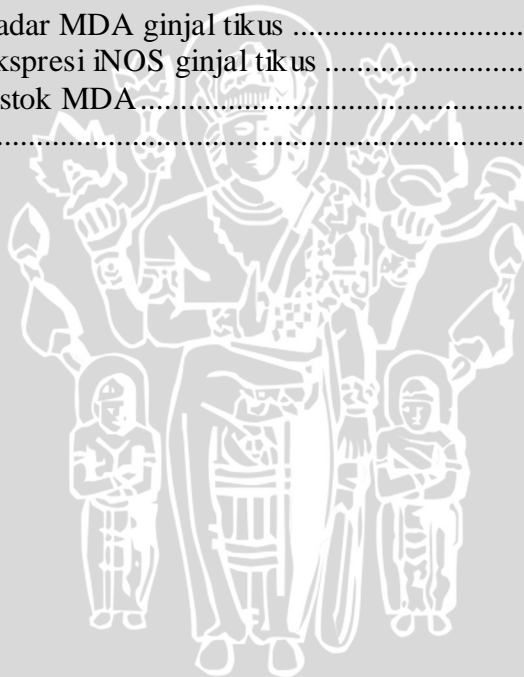
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mekanisme pembentukan radikal bebas dalam peroksidasi lipid	14
2.2 Reaksi MDA dengan TBA	15
3.1 Kerangka konsep	18
5.1 Ekspresi <i>inducible nitric oxide synthase</i> (iNOS) ginjal tikus	32



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka operasional.....	45
2. Preparasi larutan streptokinase.....	46
3. Diagram kerja penelitian.....	47
4. Kurva baku MDA.....	52
5. Data absorbansi dan perhitungan kadar MDA.....	53
6. Data ekspresi iNOS.....	54
7. Analisa statistika kadar MDA ginjal tikus.....	55
8. Analisa statistika ekspresi iNOS ginjal tikus.....	58
9. Pembuatan larutan stok MDA.....	61
10. Sertifikat laik etik.....	63



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Analytical Communities</i>
BH ₄	: <i>Tetrahydrobiopterin</i>
CKD	: <i>Chronic Kidney Disease</i>
C3	: <i>Komplemen 3</i>
C3a	: <i>Komplemen 3a</i>
DAB	: <i>Diamano Benzidine</i>
EDRFs	: <i>Endothelium-derived relaxing factors</i>
EMT	: <i>Epithel to Mesenchmal Transition</i>
eNOS	: <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ESRD	: <i>End Stage Renal Disease</i>
FAD	: <i>Flavin adenine dinucleotidase</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FMN	: <i>Flavin mononucleotidase</i>
g	: <i>gram</i>
HE	: <i>Hematoxylen Eosin</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
HCl	: <i>Asam klorida</i>
kDa	: <i>Kilo Dalton</i>
KEP	: <i>Komisi Etik Penelitian</i>
IFN- γ	: <i>Interferon gamma</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
IL-12	: <i>Interleukin-12</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IU	: <i>International Unit</i>
LRP-1	: <i>Low density lipoprotein receptor-related protein-1</i>
MDA	: <i>Malondialdehyd</i>
mg	: <i>Miligram</i>
MIPA	: <i>Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam</i>
ml	: <i>Mililiter</i>
Mm	: <i>Milimeter</i>
mRNA	: <i>Messenger ribonucleic acid</i>
miRNA	: <i>Mikro Messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
Na-Thio	: <i>Na Thiobarbiturat</i>
NK	: <i>Natural killer</i>
nm	: <i>Nanometer</i>
nNOS	: <i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
N ₂ O ₃	: <i>Dinitrogen trioxide</i>

N_2O_4	: <i>Dinitrogen tetraoxide</i>
O_2^-	: Radikal superoksida
$ONOO^-$: Peroksinitrit
OH^+	: Radikal hidroksil
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS-azida	: <i>Phosphate Buffer Saline-azida</i>
PFA	: <i>Paraformaldehid</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
R^*	: Radikal lipid
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RNI	: <i>Reactive Nitrogen Intermediate</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROO^*	: Peroksil lipid
ROOH	: Lipid peroksida
RS	: Rumah Sakit
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroksidase</i>
SD	: Standar Deviasi
SOD	: <i>Superoksid Dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistic program for social science</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric Acid Reactivity Test</i>
TCA	: <i>Tri Chloro Acetic</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor- β</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alfa</i>
UB	: Universitas Brawijaya
UPHP	: Unit Pengembangan Hewan Percobaan
UV	: Ultraviolet
$\partial 2$ -AP	: $\partial 2$ Antiplasmin
$\beta 1$: Beta 1
μl	: Mikroliter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis ginjal merupakan suatu keadaan dimana terjadi akumulasi fibroblas dan matriks protein yang bersamaan dengan hilangnya fungsi ginjal (Liu, 2005). Fibrosis ginjal ditandai dengan adanya glomerulosklerosis, proteinuria dan kerusakan *tubulointerstitial* seperti akumulasi ekstraseluler matriks, atrofi tubuler, penurunan ekspresi *E-Caderin* serta infiltrasi sel inflamatori (Lukito dkk., 2013). Kondisi fibrosis *tubulointerstitial* merupakan mekanisme utama yang mendasari proses perkembangan *chronic kidney disease* (CKD) menjadi *end-stage renal disease* (ESRD) (Sebekova *et al.*, 2007).

Chronic kidney disease merupakan salah satu penyebab kematian pada kucing *geriatric* (Lefebvre, 2011). Angka kejadian CKD pada kucing dengan usia ≥ 10 tahun sebanyak 81% dan pada kucing usia ≥ 3 tahun sampai ≤ 10 tahun sebanyak 17% dari 5.496 kasus yang dilaporkan oleh Banfield Pet Hospital di Amerika Serikat. Perubahan permanen yang terjadi pada CKD bersifat *irreversible* sehingga penanganan yang dilakukan bertujuan untuk mengurangi laju filtrasi pada bagian ginjal yang masih berfungsi, mengurangi gejala klinis dan memperlambat laju penyakit. Penanganan yang dapat dilakukan pada kasus ESRD hanya transplantasi dan euthanasia pada hewan (Shearer, 2010).

Kerusakan *tubulointerstitial* pada fibrosis ginjal secara langsung maupun tidak langsung terjadi melalui stres oksidatif dan berbagai macam molekul efektor pemicu respon seluler seperti aktivasi fibroblas dan perubahan fenotipik menjadi miofibroblas, proliferasi limfosit atau makrofag, serta *epithel to mesenchymal transition* (EMT) (Liu, 2005). Sel-sel inflamasi dan sel struktural yang teraktivasi akibat inflamasi akan menghasilkan oksidan reaktif dan nitrogen (ROS dan RNS) sebagai respon terhadap beberapa rangsangan (Caramori dan Papi, 2004). Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh mengakibatkan stres oksidatif.

Nitric oxide (NO) merupakan radikal bebas dibentuk oleh makrofag dalam reaksi eliminasi patogen intrasel melalui jalur *reactive nitrogen intermediate* (RNI). NO disintesis oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Peningkatan ekspresi iNOS mengindikasikan keadaan patologi dari suatu jaringan (Kim *et al.*, 2009). Peningkatan kadar NO mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel akibat reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut menghasilkan hasil akhir berupa malondialdehid yang bersifat toksik terhadap sel (Mudassir dkk., 2012). Menurut Sharma *et al.* (2003), MDA berperan dalam menaikkan permeabilitas vaskuler, kemotaksis leukosit, sintesis prostaglandin serta pelepasan histamin sehingga menimbulkan inflamasi.

Pembuatan hewan model fibrosis ginjal sebelumnya telah dilakukan oleh Borgeson *et al.* (2011) dan Alvarino (2012) menggunakan *valsatran* dan *lipoxin A₄* pada tikus yang terlebih dahulu dilakukan obstruksi ureter. Wati dkk. (2013) juga membuat hewan model fibrosis ginjal dengan menggunakan *Cyclosporine-A*.

Pembuatan hewan model fibrosis ginjal dengan menggunakan *Cyclosporine-A* dirasa kurang efektif karena selain harganya yang mahal dan sulit diperoleh, diperlukan juga waktu yang cukup lama yaitu 21 hari untuk menimbulkan fibrosis ginjal. Mengingat diperlukannya alternatif lain dalam menginduksi terjadinya fibrosis ginjal pada hewan model, maka dapat digunakan streptokinase sebagai *inducer*.

Streptokinase merupakan agen trombolitik yang sering digunakan dalam dunia medis untuk penanganan penyakit arterial thromboembolism (Moore *et al.*, 2007). Streptokinase mudah didapatkan dan harganya relatif terjangkau. Streptokinase adalah protein ekstraseluler dengan berat molekul 46 kDa, diproduksi oleh semua strain *Streptococcus* grup C. Streptokinase mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin akan mengaktifasi kaskade komplemen, memecah protein matriks ekstraseluler dan menginduksi pelepasan vasoaktif bradikinin. Peristiwa tersebut akan menyebabkan inflamasi pada jaringan dan menyebabkan glomerulosklerosis serta fibrosis ginjal (Pardede, 2009).

Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) dikarenakan memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik antara tikus dan mamalia (Hendrich, 2006). Pemilihan jenis kelamin didasarkan rendahnya kadar estradiol pada jantan sehingga fibrosis ginjal lebih mudah terbentuk (Blush *et al.*, 2004). Pada penelitian ini akan dipelajari kemampuan streptokinase dalam menginduksi terjadinya fibrosis ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diikuti oleh perubahan kadar MDA dan ekspresi enzim iNOS pada jaringan ginjal yang belum pernah dilakukan sebelumnya. Hasil dari

penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam penelitian selanjutnya untuk penentuan terapi fibrosis ginjal yang tepat sesuai dengan patomekanisme yang telah diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah :

Berapakah dosis optimum streptokinase yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh perubahan kadar MDA dan ekspresi iNOS pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Beberapa batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan jenis kelamin jantan, berumur 10 minggu dan berat badan antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 132- KEP- UB (Lampiran 10).
2. Pembuatan keadaan fibrosis ginjal pada hewan model tikus dilakukan dengan cara induksi streptokinase secara intravena pada *vena coccygea* dengan dosis sebesar 1x 6000 IU/ekor, 2x 6000 IU/ekor dan 3x 6000 IU/ekor yang ditambahkan pelarut ringer laktat sampai 100 µl setiap pemberiannya.

3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar MDA yang diukur menggunakan *thiobarbituric acid reactivity test* (TBA) serta ekspresi enzim iNOS dengan menggunakan metode imunohistokimia pada organ ginjal.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

Untuk mengetahui berapakah dosis optimum streptokinase yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh perubahan kadar MDA dan ekspresi iNOS pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai kemampuan streptokinase dalam menginduksi terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh perubahan kadar malondialdehida (MDA) dan peningkatan ekspresi iNOS pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*). Hewan model fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase selanjutnya dapat digunakan untuk menentukan terapi yang tepat berdasarkan patomekanisme fibrosis ginjal.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fibrosis Ginjal pada Bidang Veteriner

Fibrosis ginjal merupakan penyakit ginjal yang ditandai dengan adanya glomerulosklerosis dan jaringan fibrosa pada organ ginjal. Fibrosis ginjal merupakan penyebab utama *Chronic kidney disease* (CKD) (Cho, 2010). CKD merupakan salah satu penyakit utama yang menyebabkan kematian pada kucing geriatric. Banfield Pet Hospital di Amerika Serikat melaporkan bahwa 81 % kucing yang menderita CKD berusia ≥ 10 tahun sedangkan sebesar 17 % sisanya berusia antara 3 sampai 10 tahun (Shearer, 2010).

Diagnosa CKD yang ditemukan pada kucing sering terlambat dimana penyakit sudah mengalami progresif menuju *end stage renal disease* (ESRD). Penanganan CKD yang sudah mengalami progresif menjadi ESRD sangat sulit dilakukan dimana penanganan hanya dapat dilakukan dengan *euthanasia*. Mengingat sulitnya penanganan CKD maka diperlukan tindakan pencegahan maupun deteksi dini terhadap kejadian CKD yang dapat dilakukan pada tahap fibrosis ginjal (Roudebush *et al.*, 2009).

Pada fibrosis ginjal terdapat 2 fase yaitu fase *reversible* dan fase *irreversible*. Pada fase *reversible* terjadi inflamasi pada organ ginjal yang ditandai dengan glomerulosklerosis. Kejadian fibrosis ginjal pada fase *reversible* masih dimungkinkan untuk disembuhkan dengan pengobatan menggunakan anti-inflamasi sehingga mencegah terjadinya akumulasi fibrosis pada ginjal. Pada fase *irreversible* organ ginjal telah mengalami penumpukan jaringan fibrosa secara

menyeluruh sehingga mempengaruhi kerja organ ginjal akibat jaringan ginjal tidak dapat kembali ke kondisi normal (White *et al.*, 2006).

2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Ginjal

Penggunaan tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba model fibrosis ginjal telah dilaporkan sebelumnya oleh Borgeson *et al.*, (2011) dan Alvarino (2012) dengan menggunakan *lipoxin A₄*, *benzo-lipoxin A₄* dan *valsatran* pada obstruksi ureter. Pembuatan hewan model fibrosis ginjal dengan menggunakan *Cyclosporine-A* oleh Wati dkk (2013). Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilaporkan dapat digunakan untuk studi mekanisme fibrosis ginjal dan perbaikan fungsi ginjal dengan melakukan obstruksi ureter unilateral. Obstruksi ureter unilateral pada tikus (*Rattus norvegicus*) menyebabkan berkurangnya aliran darah ginjal dan laju filtrasi glomerulus, hidronefrosis, inflamasi interstisial, dan fibrosis yang menggambarkan infiltrasi makrofag, kematian sel tubular, aktivasi fibroblast dan kemungkinan transisi fenotipik sel ginjal yang merupakan karakteristik terjadinya fibrosis ginjal (Klahr and Morrissey, 2002).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan karena mudah diperoleh dalam jumlah banyak dan mempunyai respon yang cepat (Sihombing dan Tuminah, 2011). Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa keunggulan, antara lain: penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih, tenang dan mudah

ditangani di laboratorium dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Miller *et al.*, 2010).

Rattus norvegicus memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm (Myers dan Armitage, 2004), bobot jantan dewasa berkisar 450-520 g dan betina 250-300 g. Tikus disapih hingga usia 21 hari dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers and Armitage (2004) serta Sharp and La Regina (1998) adalah sebagai berikut:



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar

2.3 Streptokinase

Streptokinase adalah protein ekstraselluler dengan berat molekul 46-kDa, terdiri dari 414 asam amino, diproduksi oleh semua strain *Streptococcus* grup C. *Streptococcus* grup C dapat memproduksi 2 jenis streptokinase imunogenik yaitu streptokinase yang dapat mengubah plasminogen menjadi plasmin dan

streptokinase yang mengubah C3 menjadi C3a, suatu faktor kemotaktis (Todd, 2004).

Streptokinase yang terdapat pada plasma akan membentuk ikatan dengan plasminogen. Ikatan ini akan mengaktifasi molekul plasminogen lainnya menjadi plasmin. Ikatan streptokinase plasminogen ini resisten terhadap inhibitor proteinase di dalam sirkulasi dan mengaktifasi plasminogen di dalam sirkulasi dan berikatan dengan fibrin dan menimbulkan keadaan *systemic lytic state* yang ditandai dengan penurunan degradasi fibrinogen dan α 2-Antiplasmin (α 2-AP) di dalam sirkulasi (Colleen, 2001).

Streptokinase dikenal juga *spreading factor* dalam sistem fibrinolisis dan berperan dalam penyebaran kuman melalui jaringan karena kemampuan mengubah plasminogen menjadi plasmin (Smith *et al.*, 2003). Plasmin akan mengaktifasi kaskade komplemen, menyebabkan pemecahan protein matriks ekstraselluler, mencerna fibrin, dan menginduksi pelepasan vasoaktif bradikinin. (Sulyok, 2004).

2.4 Hubungan Streptokinase dengan Fibrosis Ginjal

Streptokinase merupakan plasminogen aktivator yang akan merubah plasminogen menjadi enzim aktif plasmin. Streptokinase mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang ditandai oleh penurunan ekspresi *E-Chaderin* pada ginjal tikus. *E-Chaderin* merupakan kelompok senyawa - senyawa glikoprotein transmembran yang berperan dalam adhesi sel. Penurunan *E-cadherin* terjadi karena streptokinase secara langsung menginduksi TGF β . TGF β yang teraktivasi

dalam jumlah banyak menekan ekspresi dari miRNA 192/215. miRNA 192/215 merupakan mikro RNA yang terdapat di dalam inti sel ginjal yang berperan meregulasi *E-cadherin*. Penurunan *E-cadherin* mengakibatkan terjadinya kerenggangan antar sel epitel sehingga memfasilitasi terjadinya EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*). EMT akan menyebabkan kemunculan sel fibroblas dan akumulasi matriks ekstraseluler (Lukito dkk., 2013).

Induksi streptokinase secara tidak langsung meningkatkan ekspresi TGF- β yang merupakan sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrosis melalui dua mekanisme, yaitu melalui ikatan dengan LRP-1 pada membran sel ginjal dan aktivasi plasminogen menjadi plasmin. TGF- β mengaktifasi proses *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) sehingga terjadi perubahan sel-sel epitel ginjal menjadi sel-sel fibroblas. Sel-sel fibroblas mengakibatkan produksi kolagen, dan fibronectin, pada ginjal sehingga terjadi fibrosis ginjal (Kusuma dkk., 2013).

2.5 Hubungan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dengan Patomekanisme Fibrosis Ginjal

Nitric oxide (NO) merupakan sebuah modulator endogen dengan fungsi fisiologis yang beragam meliputi kontrol elastisitas pembuluh darah, perfusi jaringan, neurotransmisi dan proses inflamasi (Kone, 1997). *Nitric oxide* disintesis oleh sel endotel dari L-arginine dan oksigen molekuler melalui fosforilasi *nitric oxide synthase* (NOS). *Nitric oxide synthase* mengkatalisis reaksi dengan mengkonversi L-arginine menjadi citrulline dan NO serta memerlukan bantuan calmodulin dan *tetrahydrobiopterin* (BH₄) sebagai kofaktor (Dudzinski and Michel, 2006)

Terdapat 3 jenis NOS yaitu *endotelial* (eNOS), *neuronal* (nNOS) dan *inducible* (iNOS). Pada ginjal eNOS terdapat pada sel endotelial arteri, glomerulus dan kapiler peritubular sedangkan nNOS pada makula densa (Zhou *et al.*, 2003). iNOS merupakan suatu bentuk enzim yang dapat diinduksi, dapat ditemukan dan dilepas oleh miosit, makrofag, dan sel endotel pembuluh darah kecil yang diaktifkan serta dapat diinduksi oleh stimulus imunologis oleh sitokin dan endotoksin. iNOS berperan sebagai katalisator dalam pembentukan NO. NO dapat berperan sebagai mediator apoptosis untuk berbagai macam sel termasuk endotel dan otot polos (Widiastuti, 2010).

iNOS diekspresikan di ginjal secara spontan dan merupakan regulasi pembentukan NO (Aeillo *et al.*, 1997). Pada ginjal NO berperan dalam beberapa proses penting diantaranya pengaturan pembuluh darah pada medula dan glomerulus, pelepasan renin, serta pengaturan volume cairan ekstraseluler (Rajj and Baylis, 1995). Dalam jumlah normal NO berperan sebagai molekul pertahanan tubuh namun dalam jumlah yang berlebih NO bersifat sitotoksik. NO berperan dalam beberapa proses penyakit ginjal termasuk *immune mediated glomerulonephritis*, *acute renal ischemic nephropathy* dan *renal allograft rejection* (Kone, 1997).

Pada mekanisme fibrosis ginjal kerusakan yang terjadi pada epitel ginjal merangsang aktivasi sel sel inflamatori salah satunya makrofag. Makrofag yang telah teraktivasi kemudian menginisiasi pembentukan NO di dalam jaringan ginjal dengan bantuan enzim iNOS. Aktivasi makrofag dalam jumlah besar yang terjadi secara terus menerus menghasilkan NO dalam jumlah besar. NO merupakan

radikal bebas yang sangat reaktif untuk dan memiliki kecenderungan berikatan dengan molekul lainnya karena memiliki elektron yang tidak berpasangan. Peningkatan NO di dalam ginjal melebihi jumlah anti oksidan mengakibatkan suatu keadaan yang disebut dengan stres oksidatif. NO yang merupakan radikal bebas akan memperoksidasi PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) dan menghasilkan senyawa aldehid berupa malondialdehid (Hirschberg, 2005 ; Xin *et al.*, 2000)

2.6 Hubungan Malondialdehida (MDA) dengan Patomekanisme Fibrosis Ginjal

Patogenesis fibrosis ginjal merupakan proses yang terjadi secara terus menerus. Terjadinya fibrosis ginjal hampir sama dengan respon penyembuhan luka. Jaringan ginjal yang mengalami luka mengalami serangkaian proses homeostasis untuk memperbaiki jaringan yang rusak. Proses ini meliputi aktivasi sel ginjal, yang kemudian meningkatkan produksi dan sekresi sitokin proinflamatori. Adanya gradien kemotaksis sitokin memberikan signal untuk mengarahkan infiltrasi monosit atau makrofag dan sel T menuju jaringan yang rusak. Pada jaringan yang rusak sel inflamatori menjadi aktif dan memproduksi molekul luka seperti reaktif oksigen spesies (ROS) sel fibrogenik dan sitokin inflamatori (Kalliuri dan Neilson, 2003).

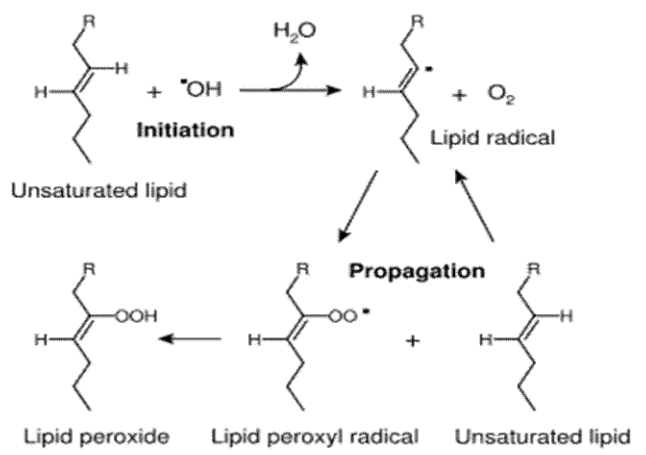
ROS merupakan radikal bebas yang berasal dari oksigen termasuk disini radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^+) dan radikal hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal bebas adalah substansi yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Di dalam tubuh, ROS secara konstan diproduksi dan dieliminasi, selama sel masih memiliki pertahanan endogen melawan zat oksidan

tersebut. Kadar ROS yang rendah berperan dalam fisiologi *signaling* antar sel secara normal, atau penting untuk memelihara homeostasis sedangkan, produksi ROS yang berlebihan atau terjadinya kerusakan perlindungan terhadap ROS menimbulkan stress oksidasi, sehingga mengakibatkan terjadinya beberapa kelainan patologis (Rush *et al.*, 2005). Peningkatan aktifitas ROS pada kerusakan ginjal yang ditandai oleh glomerulosklerosis, atrofi tubulus dan fibrosis (Xin *et al.*, 2000).

ROS dapat memicu proses peroksidasi terhadap lipid. Peroksidasi terhadap lipid dalam membran sel akan sangat mengganggu fungsi membran, menimbulkan kerusakan yang *irreversibel* terhadap fluiditas dan elastisitas membran yang menyebabkan ruptur membran sel (Szocs, 2004). Menurut Yustika dkk., (2013) peningkatan kadar MDA merupakan pertanda peningkatan jumlah radikal bebas yang terjadi pada fibrosis jaringan ginjal.

Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) pada membran sel yang menghasilkan radikal peroksida-lipid hidroperoksida dan produk aldehida, misalnya malondialdehida (MDA). Reaksi radikal bebas terhadap *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) akan menghasilkan peroksil lipid (ROO*) yang dapat menghasilkan lipid peroksida (Gambar 2.1). Radikal peroksil lipid jika bereaksi dengan PUFA yang lain dapat membentuk lipid peroksida (ROOH) dan lipid bebas (R*) yang baru. Lipid peroksida terbentuk akibat hilangnya sebuah atom hidrogen yang diakibatkan serangan radikal peroksil lipid. Reaksi ini

berlangsung secara berantai dan terus menerus, sebab reaksi ini menghasilkan radikal lipid bebas (R^*) (Murray *et al.*, 2003).

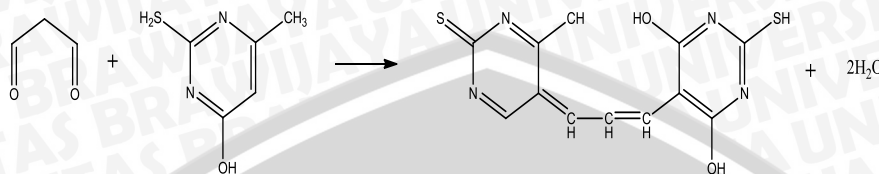


Gambar 2.1 Mekanisme pembentukan radikal bebas dalam peroksidasi lipid (Murray *et al.*, 2003).

MDA merupakan produk hasil pemutusan secara endoperoksida pada sedikitnya tiga ikatan ganda asam lemak tak jenuh (Marnett, 1999). Menurut Shirpoor *et al.*, (2007) Kadar malondialdehida digunakan sebagai indikator untuk mencerminkan stres oksidatif dan kerusakan sel membran, yang menunjukkan tingkat stress oksidatif. Menurut Sharma *et al.*, (2003) MDA berperan dalam menaikkan permeabilitas vaskuler, kemotaksis leukosit, dan mengubah sintesis prostaglandin serta pelepasan histamine sehingga menimbulkan inflamasi.

Metode pengukuran kadar MDA di dalam jaringan pada umumnya dapat ditentukan dengan menggunakan metode *thiobarbituric Acid* (TBA) (Edyson, 2003). 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 seperti pada Gambar 2.2. Intensitas warna merah muda yang

terbentuk dari kondensasi MDA-TBA mengindikasikan besarnya peroksidasi lipid (Edyson, 2003).



Gambar 2.2. Reaksi MDA dengan TBA (Edyson, 2003)



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

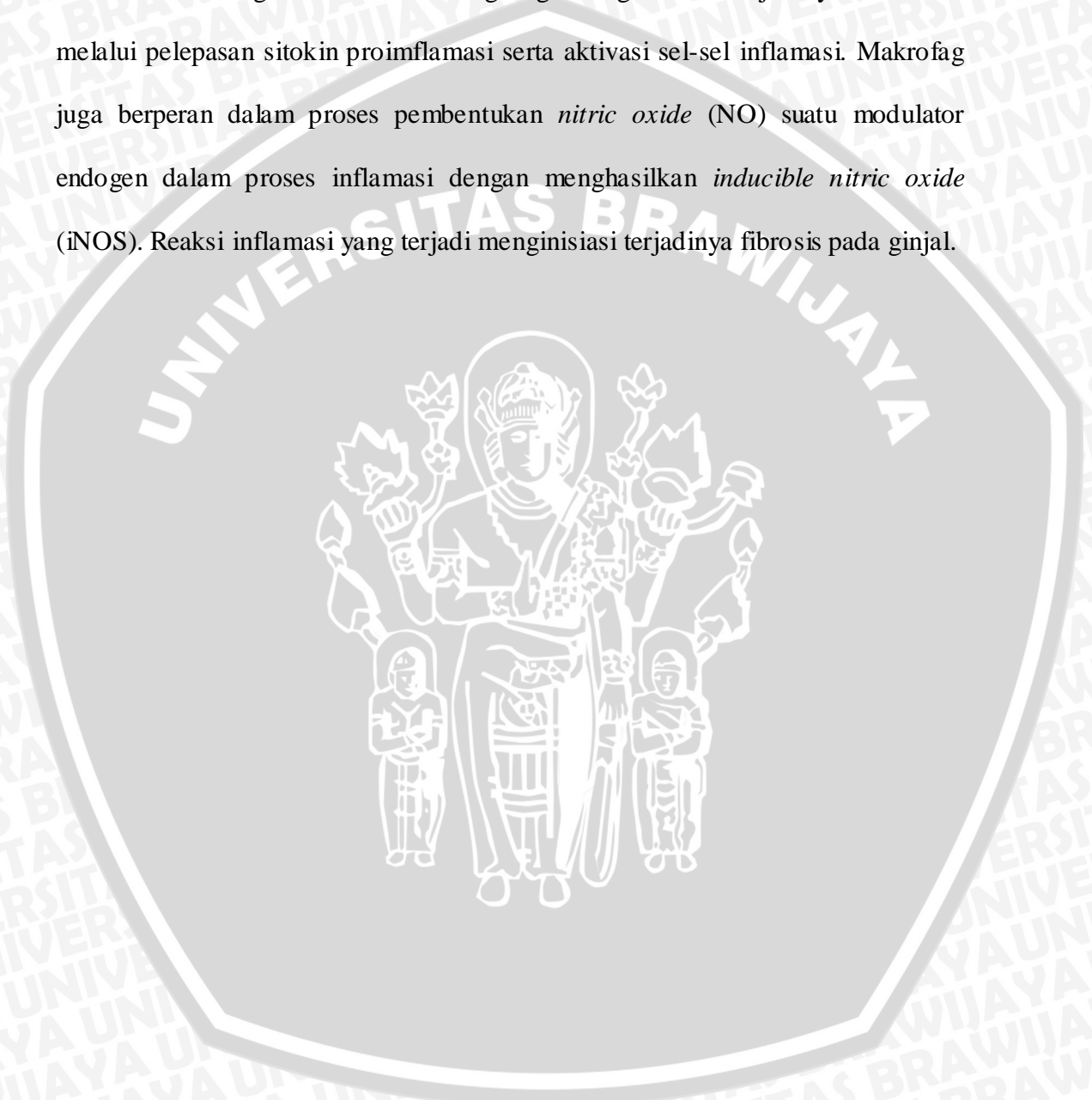
Induksi Streptokinase pada tikus menginduksi terjadinya perubahan plasminogen (proenzim inaktif) menjadi plasmin (enzim aktif) yang terdapat pada sirkulasi. Plasmin akan mengaktifkan TGF β dalam ginjal yang berperan dalam penghambatan pembentukan *E-Chaderin*. *E-Chaderin* merupakan protein *junction* yang berperan penting sebagai *marker* terjadinya fibrosis ginjal (Lukito dkk., 2013) Penurunan ekspresi *E-Chaderin* menginduksi terjadinya *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) pada ginjal. EMT mengakibatkan perubahan epitel ginjal menjadi fibroblas sehingga terbentuk jaringan ikat pada ginjal (fibrosis ginjal). Peningkatan fibroblas pada ginjal mengakibatkan peningkatan jumlah matriks ekstra seluler pada ginjal.

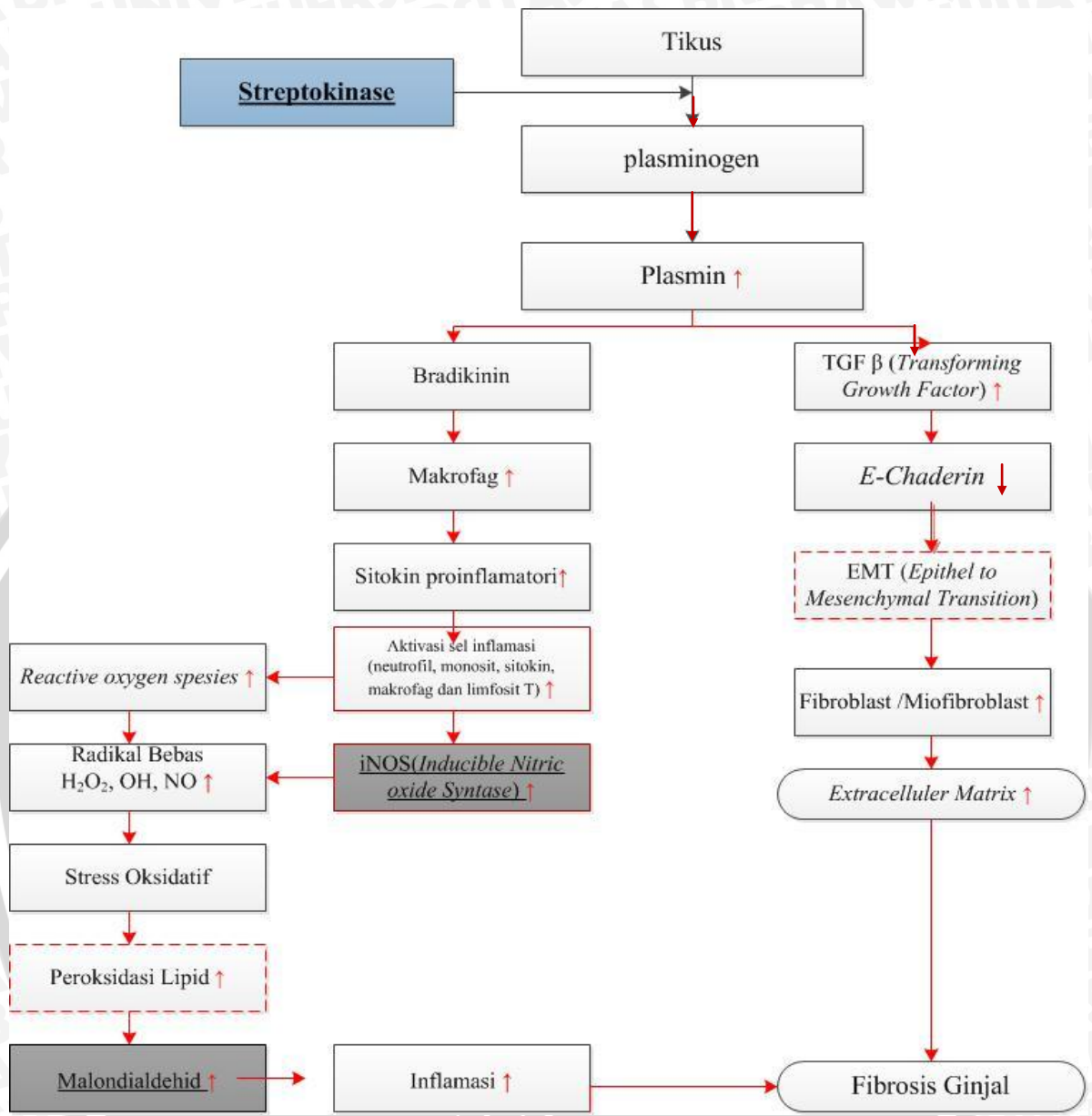
Plasmin sebagai enzim aktif juga akan mengaktifasi bradikinin yang selanjutnya berinteraksi dengan $\beta 2$ integrin yang terdapat pada makrofag sehingga terjadi peningkatan migrasi makrofag ke dalam jaringan. Makrofag akan menghasilkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12. Pelepasan sitokin proinflamasi akan mengaktifasi sel-sel inflamatori seperti monosit dan neutrofil sehingga menyebabkan lepasnya berbagai mediator sekunder seperti mediator vasoaktif dan ROS. Peningkatan produk ROS seperti radikal hidroksil (OH^*), radikal superoksida (O_2^*), hidrogen peroksida (H_2O_2) mengakibatkan timbulnya stress oksidasi. Stres oksidasi menyebabkan peroksidasi



lipid dengan hasil akhir berupa malondialdehid (MDA), Kerusakan membran akibat peroksidasi lipid menimbulkan respon inflamasi pada jaringan ginjal.

Makrofag secara tidak langsung menginduksi terjadinya inflamasi melalui pelepasan sitokin proinflamasi serta aktivasi sel-sel inflamasi. Makrofag juga berperan dalam proses pembentukan *nitric oxide* (NO) suatu modulator endogen dalam proses inflamasi dengan menghasilkan *inducible nitric oxide* (iNOS). Reaksi inflamasi yang terjadi menginisiasi terjadinya fibrosis pada ginjal.





Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :

- : Efek induksi streptokinase
- : Sel dan mediator
- : Variabel yang diamati
- : Peningkatan
- : Mekanisme



3.2 Hipotesis Penelitian

Induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti dengan meningkatnya kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (INOS).



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Juli 2013 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Patologi RS Dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain *disposable syringe*, kandang tikus, *scalpel*, gunting, gelas objek, gelas cover, timbangan mortar, *ependof*, *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet, pipet tetes, *vortex*, pipet *waterbath*, lemari pendingin, spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* dan mikroskop Olympus BX51.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *strain Wistar* berumur 10 minggu, berat badan tikus antara 150-200 gram, *Streptokinase*, standar MDA, *Tri Chloro Acetic* (TCA) 100%, HCl, *Na Thiobarbiturat* (Na-Thio) 1%, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, *Phospate Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4 *paraformaldehid* 4% (PFA). xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%). PBS pH 7,4 3% H₂O₂ 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) antibodi primer *anti iNOS*, antibodi sekunder *anti rabbit biotin*

SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) DAB (*Diamano Benzidine*)
Mayer Hematoxylen, entellan.

4.3 Tahapan penelitian

4.3.1 Pra penelitian

Pra penelitian dilakukan untuk menentukan dosis yang aman digunakan dalam penelitian yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis dengan menggunakan 3 ekor tikus. Pemberian dosis streptokinase sebanyak 2000 IU (tikus pertama), 4000 IU (tikus kedua), dan 6000 IU (tikus ketiga). Tikus pertama, kedua dan ketiga selanjutnya dilakukan pembedahan pada hari ke-6 setelah pemberian streptokinase. Pembedahan ditujukan untuk pengambilan organ ginjal dan selanjutnya dilakukan evaluasi hasil berupa preparat histologi dengan pewarnaan HE. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa dosis streptokinase 6000 IU merupakan dosis aman yang mampu menginduksi terjadinya fibrosis ginjal yang didasarkan atas terdapatnya glomerulosklerosis pada organ ginjal.

4.3.2 Persiapan sampel

Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok(terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar sebanyak 20 ekor. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok dengan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus berumur 10 minggu dengan berat badan tikus antara 150-200 g. Penentuan hewan coba didasarkan pada kriteria purposif.

4.3.3 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol (sehat) tanpa perlakuan, kelompok B tikus diinduksi streptokinase satu kali (hari ke-1), kelompok C tikus diinduksi streptokinase dua kali (hari ke-1 dan ke-6), dan kelompok D tikus diinduksi streptokinase tiga kali (hari ke-1 ke-6 dan ke-11). Induksi streptokinase pada tikus kelompok C dan D dilakukan dengan selang waktu 5 hari sesuai dengan Budhiarta (2007).

4.3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

- Variabel Bebas : Jumlah pemberian streptokinase sebanyak 1x 6000 IU, 2x 6000 IU dan 3x 6000 IU
- Variabel tergantung : Ekspresi iNOS dan kadar MDA
- Variabel kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, umur, strain Wistar, berat dan pakan

4.3.5 Analisis Data

Perubahan kadar MDA dan ekspresi iNOS diamati secara kuantitatif. Kadar absorbansi MDA ginjal tikus diukur menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*. Ekspresi iNOS dihitung menggunakan *Software Axiovision*. Penghitungan ekspresi iNOS didasarkan atas terbentuknya warna coklat pada preparat yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Hasil diperoleh dari rata-rata 5 lapangan pandang yang dihitung. Data kemudian ditabulasi dengan menggunakan Microsoft Office Excel dan dilakukan analisis ragam ANOVA dengan SPSS 21 for Windows. Apabila antar kelompok perlakuan diperoleh hasil berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan $\alpha = 0.05\%$ (Kusriningrum, 2008).

4.4 Prosedur penelitian

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities (AOAC) (2005)* yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga

dari polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi diberi alas sekam. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Preparasi streptokinase

Preparasi dosis streptokinase yaitu sebagai berikut:

- Stok I 1.500.000 IU streptokinase ditambah ringer laktat sampai 2 ml
- Stok II diambil 1ml dari stok I yang mengandung 750.000 IU dilarutkan dengan ringer laktat sampai 5ml.
- Stok III diambil 1ml dari stok II yang mengandung 150.000 IU kemudian diambil sebanyak 40 μ l yang mengandung 6000 IU untuk diinjeksi ke tikus

4.4.3 Induksi Streptokinase pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Induksi streptokinase dengan dosis 6000IU/tikus dilakukan secara intravena melalui vena *coccygea* diberikan kepada kelompok B, C dan D (kelompok A sebagai kontrol, tidak dilakukan induksi streptokinase).

Induksi streptokinase pada kelompok B dilakukan hanya sekali yaitu pada hari ke-1 dengan jumlah dosis streptokinase yang diberikan sebesar 6000 IU/ekor tikus yang ditambahkan ringer laktat 60 μ L untuk setiap kali induksinya. Tikus kemudian dieuthanasi, dibedah dan diambil organ ginjalnya pada hari ke-16

Induksi streptokinase pada kelompok C dilakukan sebanyak 2x yaitu pada hari ke-1 dan hari ke-6. Dosis streptokinase yang diberikan sebesar 6000 IU/ekor tikus yang ditambahkan ringer laktat 60 μ L untuk setiap kali induksinya. Tikus kemudian dieuthanasi, dibedah dan diambil organ ginjalnya pada hari ke-16

Induksi streptokinase pada kelompok C dilakukan sebanyak 3x yaitu pada hari ke-1, hari ke-6 dan hari ke-11. Dosis streptokinase yang diberikan sebesar 6000 IU/ekor tikus yang ditambahkan ringer laktat 60 μ L untuk setiap kali induksinya. Tikus kemudian dieuthanasi, dibedah dan diambil organ ginjalnya pada hari ke-16.

4.4.4 Pengambilan Organ Ginjal

Pengambilan organ ginjal hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16 . Euthanasia dilakukan dengan dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakan dengan posisi rebah dorsal diatas papan pembedahan. Kemudian dibedah pada bagian abdomen lalu diambil bagian organ ginjal. Organ ginjal mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Kemudian ginjal dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4 dan *paraformaldehid* 4% (PFA).

4.4.5 Uji Imunohistokimia

Uji imunohistokimia diawali dengan pembuatan preparat histologi. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning* dan penempelan di gelas objek seperti pada lampiran 2.3. Langkah-langkah dalam metode pewaranan *Imunohistokimia* diawali dengan tahapan perendaman slide preparat pada xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%). Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit

selanjutnya ditetesi 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit selama 3 kali dan diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti iNOS 2* selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Berikutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil diamati menggunakan mikroskop (Calnek, 1997).

4.4.6 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida (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 maksimum (532 nm) menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*. Kurva standar MDA dibuat dengan membuat persamaan regresi antara absorbansi dan konsentrasi MDA (Shofia dkk., 2013).

4.4.7 Pengukuran Kadar Malondialdehida

Organ ginjal dengan berat 1,8 g dimasukkan ke dalam mortar dingin dan digerus, ditambah 500 μ l NaCl fisiologis 0,9%, dimasukkan dalam *microtube*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit, kemudian diambil supernatan dan dipindah ke *microtube* baru. Homogenat sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil, ditambah 550 μ l aquades, 100 μ l TCA kemudian dihomogenkan dengan vorteks, ditambah 250 μ l HCl 1 N kemudian dihomogenkan dengan vorteks, dan ditambahkan 100 μ l Na-Thio 1% kemudian dihomogenkan dengan vorteks. Mulut tabung ditutup dengan plastik *wrap* dan dipanaskan dalam *waterbath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi 500 rpm sepuluh 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 maksimum (532 nm) (Shofia dkk., 2013).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase.

Pada penelitian ini dilakukan induksi streptokinase pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan untuk mendapatkan hewan model fibrosis ginjal. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar malondialdehid (MDA) pada ginjal tikus. Hasil pengukuran kadar MDA ginjal tikus tertera pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Kadar malondialdehid (MDA) ginjal tikus.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata kadar MDA (Mean±SD) (mg/ml)	Peningkatan kadar (%)
A (Kontrol)	3.787±0,327 ^a	0.00
B (1x 6000 IU)	5.551±0,409 ^b	46.58
C (2x 6000 IU)	8.293±0,383 ^c	119.01
D (3x 6000 IU)	12.369±0,555 ^d	226.65

Keterangan: Superscript yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan (P<0.05)

Hasil rata-rata kadar MDA pada Tabel 5.1 didapatkan dengan pengukuran nilai absorbansi pada alat spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm yang diplotkan pada kadar standar MDA. Kelompok perlakuan A (Kontrol) menunjukkan nilai rata-rata kadar MDA sebesar 3,787 mg/ml. Nilai rata-rata kelompok kontrol merupakan standar yang digunakan untuk mengetahui adanya peningkatan maupun penurunan kadar MDA yang terjadi pada kelompok perlakuan hasil induksi streptokinase (kelompok B, C dan D). Kadar MDA pada kelompok kontrol merupakan indikator terdapatnya radikal bebas di dalam jaringan ginjal dalam proses peroksidasi lipid. Radikal bebas secara normal diproduksi oleh tubuh dalam jumlah kecil sebagai akibat dari berbagai proses enzimatik di dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi atau

pembakaran sel yang berlangsung pada proses respirasi sel, dan pencernaan. Cai and Harisson (2000), menyatakan bahwa interaksi antara radikal bebas NO dan superoksid 3 kali lebih cepat dibanding reaksi antara superoksid dengan antioksidan superoksid dismutase (SOD). Radikal bebas NO lebih cepat bereaksi dengan membran lipid bila dibandingkan dengan reaksi eliminasi radikal bebas oleh SOD. Menurut Pham-Huy *et al.*, (2008) radikal bebas diproduksi oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma, dan inti sel. Radikal bebas terus menerus dibentuk di dalam sel melalui jalur metabolik tubuh yang merupakan proses biologis normal.

Peningkatan kadar MDA terjadi pada semua kelompok perlakuan yang diinduksi streptokinase. Pada kelompok perlakuan B kadar MDA sebesar 5.551 mg/ml atau terjadi peningkatan kadar MDA sebesar 46.58 % dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan kadar MDA juga terjadi pada kelompok perlakuan C menjadi 8.293 mg/ml atau meningkat sebesar 119.01 % dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan kadar MDA paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan D yaitu sebesar 12.369 mg/ml atau sebesar 226.65 % dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 5.1). Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) menunjukkan bahwa induksi streptokinase memberikan perbedaan yang nyata terhadap peningkatan kadar MDA antara keempat kelompok perlakuan *p-value* ($p < 0,05$), hal tersebut dinyatakan dengan pemberian notasi yang berbeda (Tabel 5.1).

Peningkatan kadar MDA yang terjadi pada kelompok perlakuan hasil induksi streptokinase menunjukkan semakin meningkatnya jumlah peroksidasi lipid yang terjadi di dalam jaringan ginjal. Induksi streptokinase mengakibatkan peningkatan kadar MDA melalui mekanisme aktivasi plasminogen. Streptokinase sebagai plasminogen aktivator memiliki kemampuan dalam mengubah plasminogen menjadi enzim aktif plasmin. Menurut Djamali (2007), plasmin mengaktivasi bradikinin yang berperan sebagai mediator terjadinya inflamasi. Bradikinin akan berikatan dengan $\beta 1$ integrin yang berada di dalam makrofag kemudian mengaktivasi makrofag untuk menghasilkan radikal bebas.

Peningkatan jumlah peroksidasi lipid akibat induksi streptokinase mengindikasikan peningkatan jumlah radikal bebas dalam jaringan ginjal. Peningkatan jumlah radikal bebas disebabkan oleh peningkatan aktivasi sel-sel inflamatori seperti makrofag. Peningkatan jumlah radikal bebas di dalam jaringan mengakibatkan terjadinya kerusakan terhadap struktur membran jaringan ginjal. Perubahan struktur membran yang terjadi akibat kerusakan mempengaruhi fungsi jaringan secara normal. Menurut Noer (2010), ROS dapat mengakibatkan fibrosis pada sel-sel epitel organ ginjal. Fibrosis ginjal terjadi karena inflamasi pada epitel tubulus dan glomerulus. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Kusuma dkk., (2013) bahwa induksi streptokinase mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang ditandai oleh rusaknya kapsula bowman dan rusaknya epitel tubulus.

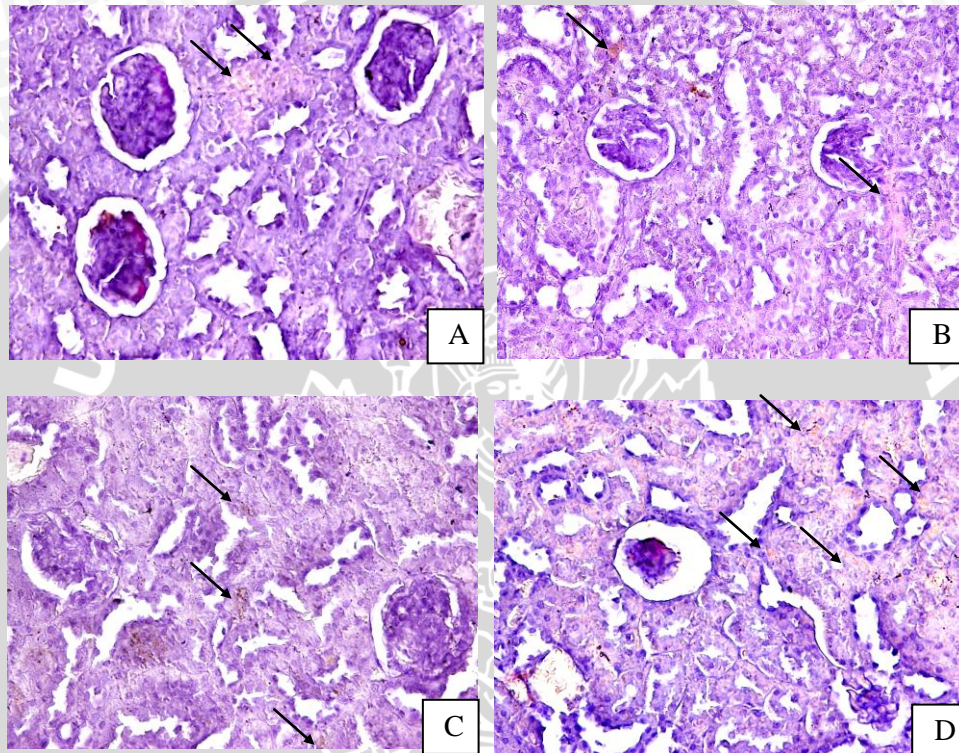
Induksi streptokinase yang merupakan aktivator plasminogen mengakibatkan pembentukan radikal bebas dalam jumlah besar dan melebihi jumlah antioksidan di dalam jaringan ginjal. Peningkatan jumlah radikal bebas

yang melebihi jumlah antioksidan mengakibatkan suatu keadaan yang disebut dengan stress oksidatif. Menurut Jang *et al.*, (2008) stres oksidatif yang terjadi akibat peningkatan jumlah radikal bebas menggambarkan peningkatan jumlah makrofag teraktivasi oleh sitokin proinflamasi di dalam jaringan ginjal. Stres oksidatif memicu timbulnya efek patologis pada jaringan ginjal. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Halliwell and Gutteridge (2007), bahwa 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.



5.2 Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Streptokinase

Ekspresi *Inducible Nitric Oxide* (iNOS) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi streptokinase ditunjukkan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ginjal tikus
Keterangan: A = ginjal tikus kontrol; B = ginjal tikus fibrosis ginjal dosis 1x 6000 IU; C = ginjal tikus fibrosis ginjal dosis 2x 6000 IU dan D = ginjal tikus fibrosis ginjal dosis 3x 6000 IU. (↑) Ekspresi iNOS

Ekspresi iNOS ditunjukkan oleh area yang berwarna kecoklatan. Warna kecoklatan yang terbentuk menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi pada jaringan ginjal. iNOS di dalam preparat ini berperan sebagai antigen yang berikatan dengan antibodi primer *anti iNOS 2*. Pemberian antibodi sekunder menggunakan *anti rabbit* yang telah dilabel *biotin*. Biotin merupakan substrat yang akan bereaksi dengan penambahan enzim SAHRP (*Strep Avidin-horse*

radish peroxidase) dan menjadi penanda terjadinya reaksi antigen dan antibodi di dalam jaringan ginjal. Reaksi antara antigen dan antibodi yang terbentuk akan semakin diperjelas dengan penambahan DAB (*Diamano Benziidine*) yang berfungsi sebagai kromogen (Calnek,1997).

Ekspresi iNOS pada organ ginjal dapat dikalkulasi menggunakan program *axiovision*. Mekanisme kerja program *Axiovision* didasarkan atas pembacaan titik-titik warna coklat yang terbentuk pada preparat. Preparat ginjal sebelum dilakukan pembacaan menggunakan program *Axiovision* terlebih dahulu difoto dengan perbesaran 400x. Penghitungan ekspresi iNOS dihitung berdasarkan warna coklat yang terbantu per satuan lapangan pandang. Hasil ekspresi iNOS diperoleh dalam satuan presentase area (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Jumlah ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ginjal tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata ekspresi iNOS (Mean±SD) (% area)	Peningkatan ekspresi (%)
A (Kontrol)	1.528±0.274 ^a	0.00
B (6000 IU)	4.616±0.324 ^b	202.02
C (2x 6000 IU)	7.628±0.681 ^c	399.11
D (3x 6000 IU)	10.782±0.335 ^d	605.46

Keterangan: Superscript yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan (P<0.05)

Kelompok perlakuan A (Kontrol) menunjukkan nilai rata-rata ekspresi iNOS sebesar 1,528±0,274. Nilai rata-rata kelompok kontrol merupakan standar yang digunakan untuk mengetahui adanya peningkatan maupun penurunan ekspresi iNOS yang terjadi pada kelompok perlakuan hasil induksi streptokinase (kelompok B, C dan D). Pada kelompok kontrol terdapat ekspresi iNOS yang menggambarkan pembentukan NO dalam jumlah kecil. iNOS diekspresikan oleh

sel imun, eritrosit, otot polos, pembuluh darah, ginjal, pankreas dan paru-paru. iNOS diaktivasi ketika proses transkripsi dari *messenger ribonucleic acid* (mRNA) dalam keadaan normal dan berperan sebagai relaksasi otot polos pembuluh darah serta otot jantung. Schoonover *et al.*, (2000) menyatakan bahwa NO hasil aktivasi iNOS berperan sebagai mediator relaksasi pembuluh darah.

Peningkatan ekspresi iNOS terjadi pada semua kelompok perlakuan yang diinduksi streptokinase yang diukur dengan *Axiovision* dan ditentukan dalam presentase area (% area). Ekspresi iNOS paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan D yaitu sebesar $10,782 \pm 0,335$ atau terjadi peningkatan sebesar 605,46% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan ekspresi iNOS juga terjadi pada kelompok perlakuan B dan C. Pada kelompok perlakuan B ekspresi iNOS sebesar $4,616 \pm 0,324$ atau terjadi peningkatan ekspresi iNOS sebesar 202,02% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan ekspresi iNOS pada kelompok perlakuan C menjadi $7,628 \pm 0,681$ atau meningkat sebesar 399,11% dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 5.2). Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) menunjukkan bahwa pemberian streptokinase memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan ekspresi iNOS organ ginjal pada kelompok induksi ($p < 0.05$). Notasi berbeda yang tertera pada setiap kelompok perlakuan di atas (Tabel 5.2) menyatakan bahwa tiap kelompok perlakuan induksi streptokinase terdapat perbedaan yang nyata. Induksi streptokinase yang semakin meningkat pada kelompok perlakuan mengakibatkan peningkatan jumlah makrofag sehingga semakin banyak iNOS yang terbentuk.

Peningkatan ekspresi iNOS yang terjadi akibat induksi streptokinase menunjukkan bahwa pemberian streptokinase mampu mengaktivasi sel-sel inflamatori seperti makrofag. Zhou *et al.*, (2003) menyatakan bahwa aktivasi iNOS diakibatkan oleh adanya agen proinflamasi yang spesifik seperti endotoksin, *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interferon γ (IFN- γ) serta makrofag.

Streptokinase yang merupakan plasminogen aktivator akan mengaktivasi plasminogen menjadi enzim aktif plasmin. Plasmin mengaktivasi mediator inflamasi seperti bradikinin TNF- α , IFN- γ dan IL-1, yang kemudian menginduksi aktivasi iNOS. Ekspresi iNOS yang meningkat akibat peningkatan produksi sitokin proinflamasi oleh sel imun terutama sel makrofag. Chow *et al.*, (2004) menyatakan bahwa makrofag yang telah teraktivasi akan memproduksi bermacam-macam sitokin, salah satunya adalah IL-12, dimana IL-12 akan mengaktifkan sel *natural killer* (NK) untuk memproduksi IFN- γ . IFN- γ ini akan meningkatkan proliferasi dan aktivasi dari makrofag.

Streptokinase mengaktivasi makrofag untuk menghasilkan NO melalui jalur *reactive nitrogen intermediat* (RNI). Jalur produksi RNI dimulai dari proses perubahan L-arginin menjadi L-citrulin yang membutuhkan *flavin adenine dinucleotidase* (FAD), *flavin mononucleotidase* (FMN), NADPH dan bentuk tereduksi dari biopretin (BH₄) dengan bantuan enzim iNOS dengan hasil akhir molekul NO. NO merupakan radikal bebas yang sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran. Forbes *et al.*, (2008) menyatakan bahwa NO dapat teroksidasi menjadi senyawa RNI seperti *nitric oxide*, nitrit, nitrat

dinitrogen trioxide (N_2O_3) dan *dinitrogen tetroxide* (N_2O_4). NO bereaksi membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) suatu oksidan yang dapat merusak lipid membran.

Peningkatan iNOS mengakibatkan peningkatan jumlah *nitric oxide* (NO) di dalam jaringan ginjal yang merupakan radikal bebas. NO dihasilkan oleh makrofag teraktivasi berperan dalam vasodilatasi lokal dan inhibisi agregasi trombosit. Ito *et al.*, (2003) menyatakan bahwa aktivasi iNOS akan menyebabkan terbentuknya NO dalam jumlah yang besar dan menunjukkan bahwa *L-arginine* tersedia dalam jumlah yang cukup. Pada ginjal ekspresi iNOS terjadi pada kondisi patologis dimana terjadi infiltrasi makrofag pada glomerulus dan tubulus. NO merupakan *endothelium-derived relaxing factors* (EDRFs) terpenting yang terbentuk dari transformasi asam amino L-arginin menjadi L-citrulin. Shah *et al.*, (2006) menyatakan bahwa NO diproduksi atas pengaruh asetilkolin, bradikinin, serotonin, dan bertindak sebagai reseptor endotel spesifik.

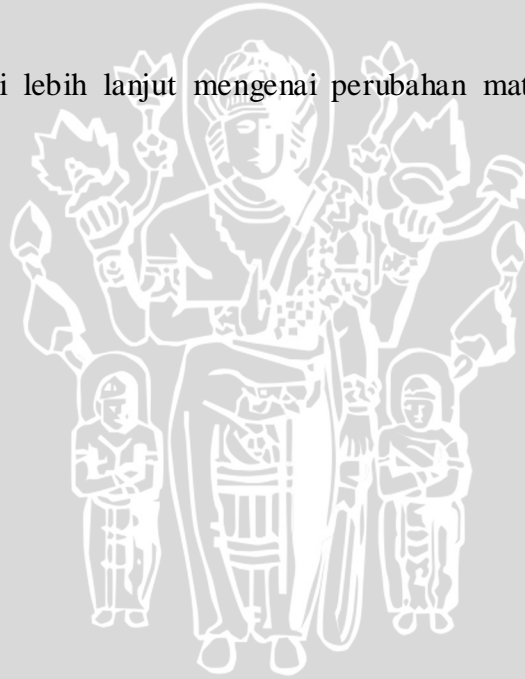
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Streptokinase sebesar 1x 6000 IU merupakan dosis optimum yang mampu mengakibatkan terjadinya fibrosis ginjal yang diikuti oleh peningkatan kadar MDA sebesar 46.58 % dan peningkatan ekspresi iNOS sebesar 202.02 % pada organ ginjal.

6.2 Saran

Perlu dipelajari lebih lanjut mengenai perubahan matriks ekstraselluler pada fibrosis ginjal.



DAFTAR PUSTAKA

- Aiello, S., M. Noris. and Todeschini. 1997. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int.* ; 52: 171–81.
- Alvarino. 2012. *Pengaruh Valsartan Terhadap Fibrosis Ginjal pada Obstruksi Ureter*. Bagian Ilmu Bedah Sub Divisi Urologi FK Universitas Andalas.
- Blush, J., J. Lei., W. Ju., S. Silbiger., J. Pullman. and J. Neugarten. 2004. Estradiol Reverses Renal Injury In Alb/TGF-beta1 Transgenic Mice. *Kidney Int.* 66(6):2148-54
- Borgeson, E., N. G. Docherty. and M. Murphy. 2011. Lipoxin A₄ and benzo-lipoxin A₄ attenuate experimental renal fibrosis. *The FASEB Journal* vol. 25 no. 9 2967-2979
- Budhiarta, A. A. G. 2007. Peran Sistem Fibrinolisis pada Berbagai Proses Fisiologis dan Patologis. *Jurnal Penyakit Dalam.* 7 (232) : 231-242.
- Cai, H. and D. G. Harisson. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases the role of oxidant stress. *Circ Res;* 87 : 840 – 44.
- Calnek, B. W. 1997. *Imunohistokimia*. Ames Iowa State University Press.
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*. Thorax Vol 59 (2): 170-173.
- Cho, M. H. 2010. *Renal Fibrosis*. Kyungpook National University School of Medicine. Daegu.
- Chow, F. Y., D. J. N. Paterson., R. C. Atkins. and G. H. Tesch. 2004 Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2987–2996 doi:10.1093/ndt/gfh441
- Collen, D. 2001. Role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodelling. *Hematology*;1:1-9.
- Djamali, A. 2007. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F445–F455.
- Dudzinski, D. M. and T. Michel. 2006. *The vascular biology of nitric oxide and nitric oxide synthase*. Dalam Colman RW, V. Marder., A. W. Clowes., J.

- N. George. and Goldhaber SZ(eds). Hemostasis and Thrombosis.5th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wikons;; 653-5
- Edyson. 2003. *Pengaruh Pemberian Vitamin C dan E Terhadap Aktifitas Kadar MDA pada Eritrosit Rattus Novergicus Galur Wistar yang Diinduksi Ltiroksin*. Unair. Surabaya.
- Forbes, J. M., M. T. Coughlan. and M. E. Cooper. 2008. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *diabetesjournals.org* vol. 57 no. 6 1446-1454 doi: 10.2337/db08-0057.
- Halliwell, B. and J. M. C Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth edition*. New York. Oxford University Press.
- 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.
- Hirschberg, R. 2005. Wound healing in the kidney: complex interactions in renal interstitial fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*; 16: 9–11.
- Ito, K., J. Chen., M. E. Chaar., J. M. Stern., S. V. Seshan., J. J. Khodadadian., I. Richardson., M. J. Hyman., E. D. V Junior., D. P. Poppas. and D. Felsen. 2003. Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Vol. 287 no. F1283-F1293DOI: 10.1152.
- Jang, H. S., J. Kim., Y. K. Park. and K. M. Park. 2008. Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys. *J Am Vet Med Assoc* 85: 447–455.
- Kalluri, R. and E. G. Neilson. 2003. Epithelial–mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* ; 112: 1776–1784.
- Kim, J., Y. M. Seok., K. J. Jung. and K. M. Park. 2009. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *American Journal of Physiology*.Vol. 297 no. F461-F470.
- Klahr, S. and J. Morrissey. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *American Journal of Physiology* Vol. 283 no. F861-F875.
- Kone, B. C. 1997. Nitric oxide in renal health and disease. *Am. J. Dis.* ; 30:311–33.

- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusuma, K. R., Aulanni'am. dan D. K. Wuragil. 2013. *Studi Ekspresi Transforming Growth Factor (Tgf- B) dan Gambaran Histopatologi Glomerulus Ginjal Pada Tikus (Rattus norvegicus) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase.* [Skripsi]. <http://Pkh.ub.ac.id/wp-content/uploads/2012/10/0911310047>
- Lefebvre, S. 2011. *Epidemiology of feline chronic kidney disease.* Banfield applied research.
- Liu, Y. 2005. *Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics* Division of Cellular and Molecular Pathology, Department of Pathology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.
- Lukito, P. F., Aulanni'am. dan D. Winarso. 2013. *Studi Ekspresi E-cadherin dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus (Rattus norvegicus) Fibrosis Ginjal Pasca Induksi Streptokinase.* [Skripsi]. <http://Pkh.ub.ac.id/wp-content/uploads/2012/10/0911310054>
- Miller, S. D., J. C. Russel., H. E MacInes., J. Abdelkrim., and R. M. Fewster., 2010. Multiple peternity in wild population of invasive Rattus species. *New Zeland Journal of Ecology* 34(3): 360-362.
- Moore, K. E., N. Morris., N. Dhupa., R. J. Murtaugh and J. E. Rush. 2007. Retrospective Study of Streptokinase Administration in 46 Cats with Arterial Thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 10: 245-257.
- Mudassir, A. Azis. dan A. Q. Punagi. 2012 *Analisis Kadar Malondialdehid (Mda) Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi pada Pemeriksaan Histopatologi.* [Tesis]. Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Kepala Leher Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Murray, R. K., D. K. Granner., P. A. Mayes. and P. A. Rodwell. 2003. *Biokimia Harper.* Ed-25. Hartono A, Bani AP, Sikumbang TMN, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Harper's Biochemistry.*
- Myers, P. and D. Armitage. 2004. "Rattus norvegicus" *Animal Diversity* http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html. [7 Januari 2013].

- Noer, M. S. 2010. *Evaluasi Fungsi Ginjal secara Laboratorik (Laboratoric Evaluation on Renal Function)* dalam Yustika, A. R., Aulanni'am dan S. Prasetyawan. 2013. Kadar Malondialdehid (MDA) Dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cylosporine-A*. *Kimia.Student Journal*, Vol. 1, No. 2, pp. 222-228.
- Pham-Huy, L.A.P., H. He. and C. Pham-Huy. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4: 89-96.
- Pardede, S. O. 2009. *Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus*. Divisi Nefrologi. Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Raij, L. dan C. Baylis. 1995. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int.* ; 48:20-32.
- Roudebush, P., D. J. Polzin. and S. J. Ross. 2009. Therapies for feline chronic kidney disease. *J Feline Med Surg* ;11(3):195-210.
- Rush, J.W. E., S. G. Denniss. and D. A. Graham. 2005. Vascular Nitric Oxide and Oxidative Stress: Determinants of Endothelial Adaptations to Cardiovascular Disease and to Physical Activity. *Can J Appl Physiol* 30(4): 442-474.
- Schoonover, L. L., S. A. Stewart. and D. G. Clifton. 2000. Hemodynamic and Cardiovascular Effects of Nitric Oxide Modulation in the Therapy of Septic Shock. *Pharmacotherapy Publications*;20(10):1184-97.
- Sebekova, K., T. Ostendorf. and F. Jurgen. 2007. *Treatment targets in renal fibrosis*, Division of Nephrology, RWTH University of Aachen, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Germany.
- Shah, S. V., R. Baliga., M. Rajapurkar. and V. A. Fonseca. 2006. Oxidants in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* jasn doi: 10.1681/ASN.2006050500.
- 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.
- Shearer, P. 2010. *Canine and feline geriatric health*. Banfield applied research.
- Shirpoor, A., M. H. Khadem Ai., S. Salami., F. Ghaderi. and P. Y. Rasmi. 2007. Effect of Vitamin E on Oxidative Stress Status in Small Intestine of

Diabetic Rat, *World J Gastroenterol* 2007 August 28; 13(32): 4340-4344, ISSN 1007-9327.

Shofia, V., Aulanni'am. dan C. Mahdi. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum Prismaticum*) Terhadap Kadar Malondialdehid Dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia.Student journal*, Vol. 1, No. 1, pp. 119-125.

Sihombing, M. dan S. Tuminah. 2011. *Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda*. Laboratorium Hewan Percobaan dan Toksikologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

Smith, J. B. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakkan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Smith, J. M., M. K. Faizan. and M. K. Eddy. 2003. *The child with acute nephritic syndrome*. Dalam: Webb N, and R. J. Postlethwaite, penyunting. *Clinical paediatric nephrology*. Edisi ke-3. New York: Oxford University Press;h.367-80.

Sulyok, E. 2004. Acute proliferative glomerulonephritis. Dalam: Avner, E. D., W. E. Harmon and P. Niaudet. *Pediatric nephrology*. Edisi ke-5. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins;.h.601-13.

Szocs, K. 2004. Endothelial Dysfunction and Reactive Oxygen Species Production in Ischemia/Reperfusion and Nitrate Tolerance. *Gen Physiol Biophys* 23: 265-295.

Todd, J. K. 2004. *Streptococcal infections*. Dalam: Gershon AA, Hotez PJ, Katz SL, penyunting. *Krugman's infectious diseases of children*. Edisi ke-11. Philadelphia: Mosby Inc;.h.641-54.

Wati, I. P., Aulanni'am. dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cyclosporine-A*. *Kimia.student journal*, Vol. 1, No. 2, pp. 257-263 Universitas Brawijaya Malang.

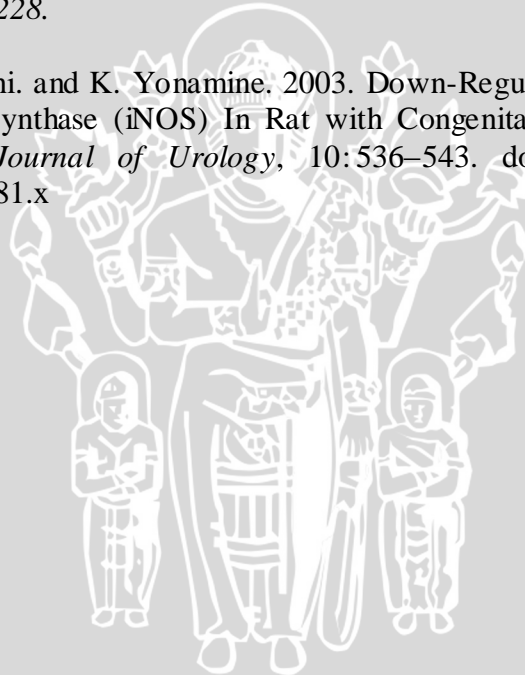
White, J. D., J. M. Norris. and R. M. Baral 2006. Naturally-occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. *Aust Vet J*. 84(6):188-194.

Widiastuti. 2010. *Perbedaan Kadar Nitric Oxide dan Derajat Stenosis pada Penderita Penyakit Jantung Koroner dengan dan tanpa Diabetes Melitus.*[Tesis]. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.Semarang.

Xin, J. Z., Z. Laszik., X. Q. Wang., F. G. Silva. and N. D. Vaziri. 2000. *Association of Renal Injury with Increased Oxygen Free Radical Activity and Altered Nitric Oxide Metabolism in Chronic Experimental Hemosiderosis.* Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas.

Yustika, A. R., Aulanni'am. dan S. Prasetyawan. 2013. Kadar Malondialdehid (MDA) Dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cylosporine-A*. *Kimia.Student Journal*, Vol. 1, No. 2, pp. 222-228.

Zhou, Y., G. Takahashi. and K. Yonamine. 2003. Down-Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) In Rat with Congenital Hydronephrosis. *International Journal of Urology*, 10:536–543. doi: 10.1046/j.1442-2042.2003.00681.x

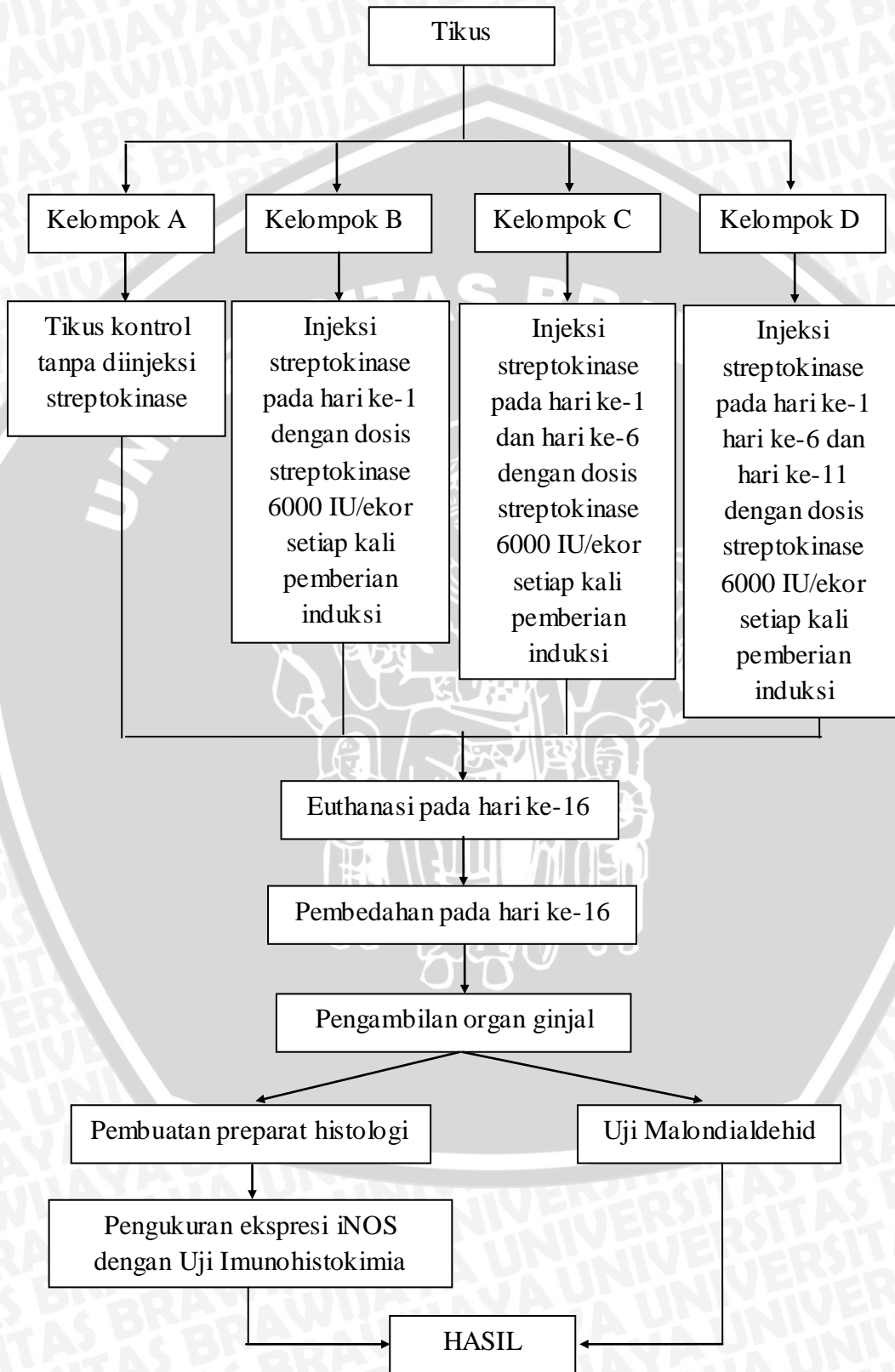




LAMPIRAN



Lampiran 1. Kerangka operasional



Lampiran 2. Preparasi larutan streptokinase

Pembuatan stok streptokinase

Stok 1 (serbuk streptokinase 1.500.000 IU)

- dilarutkan dalam 2 mL Ringer Laktat
- divorteks sampai homogen
- diambil 1 mL (mengandung 750.000 IU) sebagai stok 2 larutan streptokinase

Stok 2

- ditambahkan Ringer Laktat sampai 5 mL
- divorteks sampai homogen
- diambil 1 mL (mengandung 150.000 IU) sebagai stok 3 larutan streptokinase

Stok 3

- diambil 40 μ L (mengandung 6000 IU)
- ditambahkan Ringer Laktat sampai 100 μ L

Injeksi pada vena *coccygea* tikus

Perhitungan dosis streptokinase yang diberikan (dari stok 3):

1 mL streptokinase = 150.000 IU

1 μ L streptokinase = 150 IU

Dosis yang dibutuhkan = 6000 IU maka, larutan streptokinase yang dibutuhkan sebanyak 40 μ L.

Dosis streptokinase yang diberikan sebesar 6000 IU (40 μ L) yang ditambahkan Ringer Laktat sampai 100 μ L.

Lampiran 3. Diagram kerja penelitian

2.1 Pembedahan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 10 minggu

- didislokasi pada bagian leher
- diletakan pada papan bedah dengan posisi rebah dorsal
- dilakukan pembedahan daerah inguinal membentuk huruf v menggunakan gunting bedah
- diambil ginjal tikus
- dicuci dengan NaCl-Fis 0,9 %
- 1/4 bagian dimasukkan dalam larutan PFA 4%
- 3/4 bagian dimasukkan dalam PBS-azida pH 7,4

Organ ginjal

2.2 Pengukuran kadar MDA jaringan ginjal

2.2.1 Pembuatan kurva baku MDA

Larutan Standar MDA konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 mg/mL

- dipipet 100 μ L
- dimasukkan dalam eppendorf
- ditambah 550 μ L akuades steril
- ditambah 100 μ L TCA 4 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 250 μ L HCl 1 N dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 100 μ L Na-Thio 1 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

Supernatan

- dipanaskan dalam *waterbath* 100° C selama 30 menit
- dibiarkan pada suhu ruang
- diukur λ_{maks} menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 500-600$ nm
- diukur absorbansi tiap-tiap larutan standar menggunakan λ_{maks}

Absorbansi MDA larutan baku dan kurva

2.2.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji TBA

Ginjal Tikus

- ditimbang 1,8 gram
- digerus menggunakan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es hingga halus
- ditambah 1 mL NaCl-Fis 0,9 %

Homogenat

- dipipet
- dimasukkan dalam eppendorf
- disentrifugasi pada 8000 rpm selama 20 menit

Supernatan

- dipipet 100 μ L
- dimasukkan dalam eppendorf
- ditambah 550 μ L akuades steril
- ditambah 100 μ L TCA 4 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 250 μ L HCl 1 N dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 100 μ L Na-Thio 1 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan



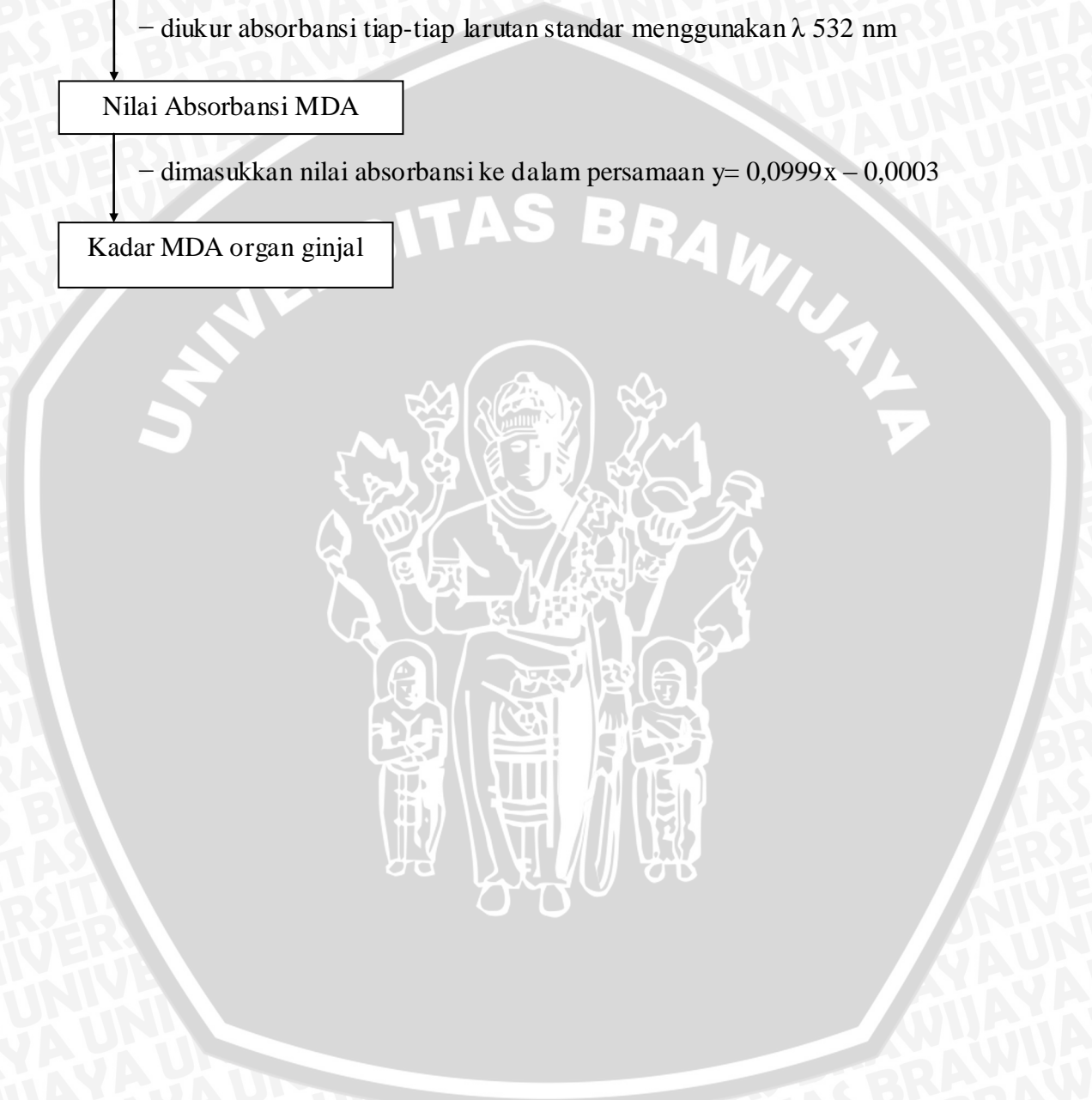
Supernatan

- dipanaskan dalam *waterbath* 100° C selama 30 menit
- dibiarkan pada suhu ruang
- diukur absorbansi tiap-tiap larutan standar menggunakan λ 532 nm

Nilai Absorbansi MDA

- dimasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan $y = 0,0999x - 0,0003$

Kadar MDA organ ginjal



2.3 Pembuatan Preparat Organ Ginjal

2.3.1 Embedding Ginjal

Ginjal dalam PFA 4%

- diambil dan direndam dalam etanol 70 % selama 24 jam
- dimasukkan pada etanol 80 % selama 2 jam
- dimasukkan pada etanol 90 % selama 20 menit
- dimasukkan pada etanol 95 % selama 20 menit
- dipindahkan dalam etanol absolut selama 3 x 20 menit

Ginjal hasil dehidrasi

- dimasukkan dalam larutan xylo 1 dan 2 masing-masing 20 menit pada suhu ruang
- organ ginjal dipindah pada xylo 3 pada suhu 60-63 °C selama 20 menit
- dicelupkan pada parafin cair yang telah dituang dalam wadah 3 x 30 menit pada suhu 56-58 °C, kemudian paraffin akan memadat
- didinginkan pada suhu 4° C

Ginjal dalam blok parafin

2.3.2 Pembuatan Preparat Ginjal

Ginjal dalam blok parafin

- diiris seukuran 5 µm
- didinginkan pada suhu ruang
- dimasukkan dalam air pada suhu 38-40 °C
- diletakkan pada objek gelas
- dikeringkan di atas *hot plate* dengan suhu 38-40 °C selama 24 jam

Preparat ginjal disimpan pada suhu ruang

2.4 Ekspresi iNOS dengan Metode Imunohistokimia

Ginjal hasil dehidrasi

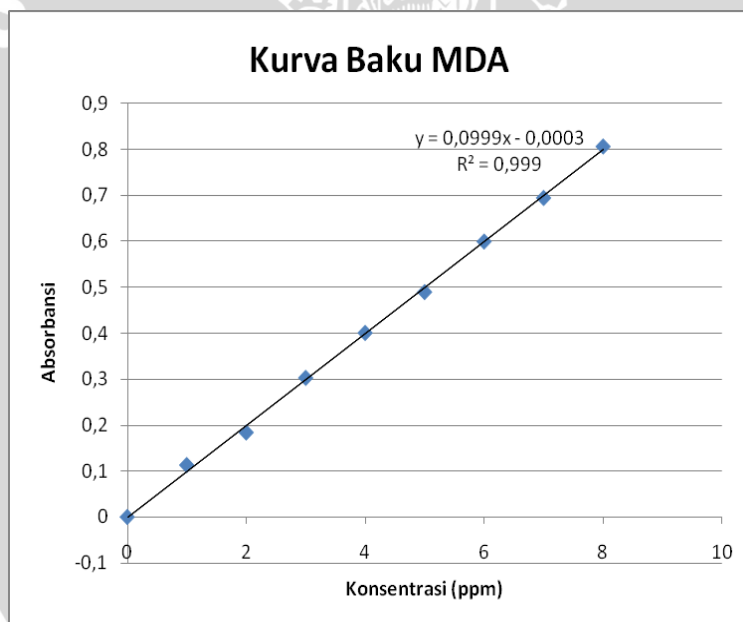
- dicuci PBS pH 7,4 selama 1x5 menit
- ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit.
- preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*)
- preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
 - diinkubasi dengan antibodi primer *anti iNOS 2* selama 1 jam dengan suhu ruang
 - dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.
- ditetesi dengan SA-HRP (Strep Avidin-horse radish peroxidase) diinkubasi selama 40 menit.
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.
- ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*)
- diinkubasi selama 10 menit
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- *counterstaining* menggunakan *Mayer Hemotoxylen* selama 10 menit.
- preparat dicuci dengan air mengalir
- dibilas dengan akuades dan dikeringkan.
- *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*.

Preparat

Lampiran 4. Kurva Baku MDA

Konsentrasi (mg/mL)	absorbansi
0	0
1	0,113
2	0,184
3	0,303
4	0,401
5	0,49
6	0,6
7	0,695
8	0,807

Tabel L.4 : hasil pengukuran absorbansi kurva baku MDA



Gambar L.4 : kurva baku MDA pada panjang gelombang 532 nm

Lampiran 5. Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA

Data absorbansi ginjal tikus

Perlakuan	Absorbansi				
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
Kontrol Negatif	0,356	0,424	0,372	0,342	0,396
Perlakuan I	0,521	0,581	0,595	0,573	0,501
Perlakuan II	0,865	0,871	0,791	0,821	0,793
Perlakuan III	1,178	1,292	1,254	1,175	1,278

Data absorbansi diperoleh dengan menggunakan spektrofotometer

Perlakuan	Kadar MDA (mg/mL)					Rata-rata	Std. Dev
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5		
Kontrol Negatif	3,566567	4,247247	3,726727	3,426426	3,966967	3,787	0,327
Perlakuan I	5,218218	5,818819	5,958959	5,738739	5,018018	5,551	0,409
Perlakuan II	8,661662	8,721722	7,920921	8,221221	7,940941	8,293	0,383
Perlakuan III	11,79479	12,93594	12,55556	11,76476	12,7958	12,369	0,555

Kadar MDA dihitung konsentrasinya dengan menggunakan persamaan yang sudah ada yang didapat dari kurva baku MDA

Contoh perhitungan konsentrasi MDA

$$Y = 0,0999X - 0,0003$$

$$0,356 = 0,0999X - 0,0003$$

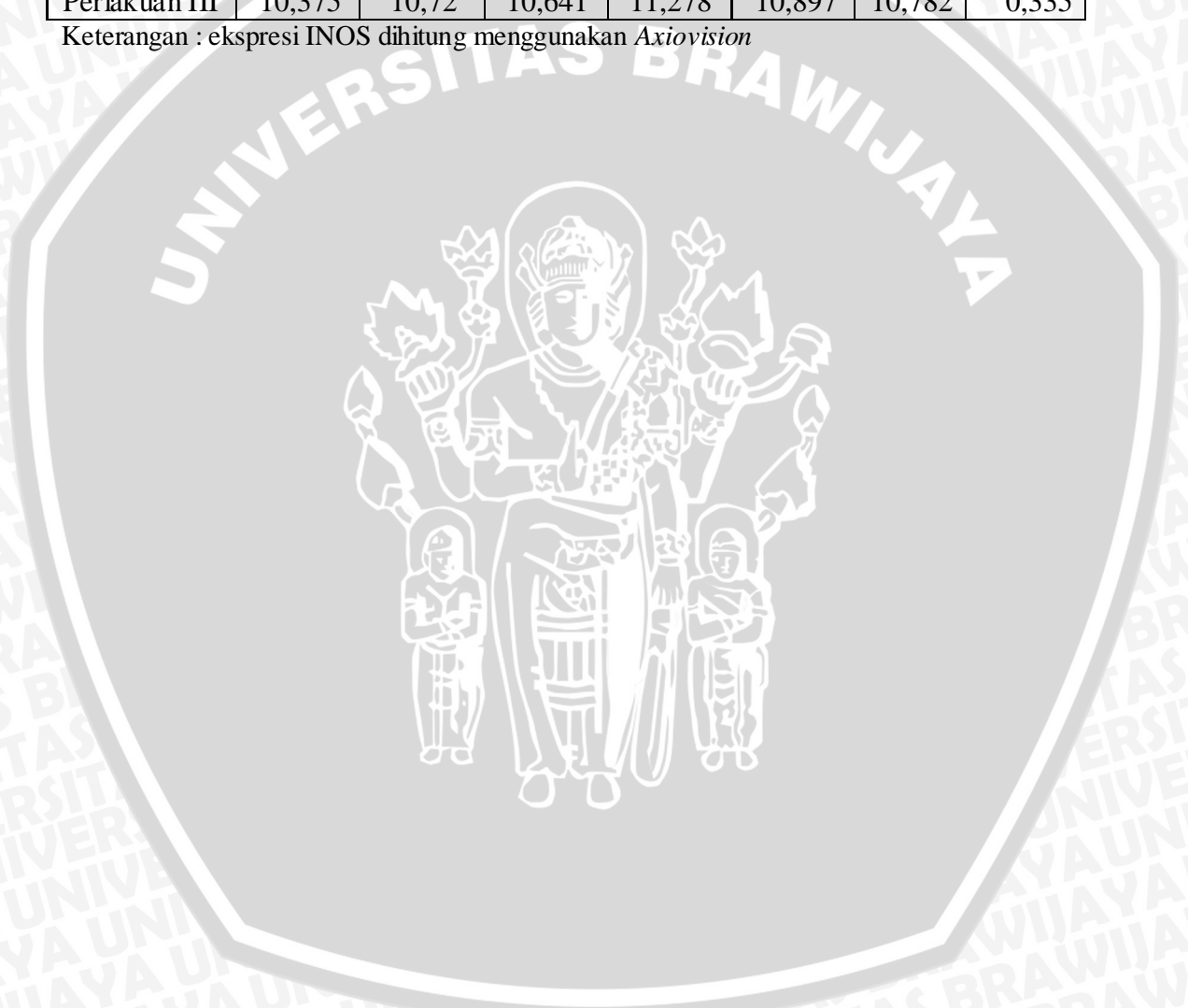
$$X = (0,356 + 0,0003) / 0,0999$$

$$= 3,566567$$

Lampiran 6. Data ekspresi iNOS

Perlakuan	Ekspresi iNOS (%)					Rata-rata	Std. Dev
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5		
Kontrol Negatif	1,945	1,371	1,534	1,212	1,58	1,528	0,274
Perlakuan I	4,06	4,757	4,886	4,625	4,752	4,616	0,324
Perlakuan II	7,141	7,469	7,742	8,742	7,048	7,628	0,681
Perlakuan III	10,375	10,72	10,641	11,278	10,897	10,782	0,335

Keterangan : ekspresi iNOS dihitung menggunakan *Axiovision*



Lampiran 7. Analisa statistika kadar MDA ginjal tikus

7.1 UJI NORMALITAS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.50000
	Std. Deviation	3.344729
	Absolute	.178
Most Extreme Differences	Positive	.178
	Negative	-.149
Kolmogorov-Smirnov Z		.794
Asymp. Sig. (2-tailed)		.554

a. Test distribution is normal

b. Calculated from data

Hasil pengujian normalitas nilai dari *kolmogorof smirnof test* menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,554. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

7.2 UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

Ulangan			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.780	3	16	.191

Hasil pengujian menunjukkan nilai dari *levене test* sebesar 1,780 dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,191. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Pengujian nilai homogenitas dan nilai normalitas sampel telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan

7.3 ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	209.642	3	69.881	383.550	.000
Within Groups	2.915	16	.182		
Total	212.557	19			

Nilai $p < 0,05$ dan F hitung $> F$ tabel, maka dapat diputuskan untuk tolak H_0 , yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan

7.4 Homogeneous Subsets

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
A (kontrol)	5	3.78679			
B (perlakuan 1)	5		5.55055		
C (perlakuan 2)	5			8.29329	
D (perlakuan 3)	5				12.36937
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Mean for groups in homogenous subsets are displayed

7.5 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A (kontrol)	B (perlakuan)	-1.763764*	.26995	.000	-2.53612	-.99141
	C (perlakuan)	-4.506507*	.26995	.000	-5.27886	-3.73415
	D (perlakuan)	-8.582583*	.26995	.000	-9.35494	-7.81023
B (perlakuan 1)	A (kontrol)	1.763764*	.26995	.000	.99141	2.53612
	C (perlakuan)	-2.742743*	.26995	.000	-3.51510	-1.97039
	D (perlakuan)	-6.818819*	.26995	.000	-7.59118	-6.04646
C (perlakuan 2)	A (kontrol)	4.506507*	.26995	.000	3.73415	5.27886
	B (perlakuan)	2.742743*	.26995	.000	1.97039	3.51510
	D (perlakuan)	-4.076076*	.26995	.000	-4.84843	-3.30372
D (perlakuan 3)	A (kontrol)	8.582583*	.26995	.000	7.81023	9.35494
	B (perlakuan)	6.818819*	.26995	.000	6.04646	7.59118
	C (perlakuan 2)	4.076076*	.26995	.000	3.30372	4.84843

* The mean difference is significant at the 0.05 level

Lampiran 8. Analisa statistika ekspresi iNOS ginjal tikus

8.1 UJI NORMALITAS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		iNOS
N		19
Normal Parameters ^a	Mean	5.88832
	Std. Deviation	3.4638160
Most Extreme Differences	Absolute	.140
	Positive	.140
	Negative	-.113
Kolmogorov-Smirnov Z		.611
Asymp. Sig. (2-tailed)		.849
a. Test distribution is Normal.		

Hasil pengujian normalitas nilai dari *kolmogorof smirnof test* menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,849. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal

8.2 UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

iNOS			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.392	3	16	.281

Hasil pengujian menunjukkan nilai dari *levене test* sebesar 1,392 dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,281. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Pengujian nilai homogenitas dan nilai normalitas sampel telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan

8.3 ANOVA

iNOS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	236.774	3	78.925	417.717	.000
Within Groups	3.023	16	.189		
Total	239.797	19			

Nilai $p < 0,05$ dan $F \text{ hitung} > F \text{ tabel}$, maka dapat diputuskan untuk tolak H_0 , yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan

8.4 Homogeneous Subsets

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
A (Kontrol)	5	1.52840			
B (Perlakuan 1)	5		4.61600		
C (Perlakuan 2)	5			7.62840	
D (Perlakuan 3)	5				1.078221
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

8.5 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A (Kontrol)	B (perlakuan	-3.087600*	.274913	.000	-3.87413	-2.30107
	C (perlakuan	-6.100000*	.274913	.000	-6.88653	-5.31347
	D (perlakuan	-9.253800*	.274913	.000	-10.04033	-8.46727
B (Perlakuan 1)	A (Kontrol)	3.087600*	.274913	.000	2.30107	3.87413
	C (perlakuan	-3.012400*	.274913	.000	-3.79893	-2.22587
	D (perlakuan	-6.166200*	.274913	.000	-6.95273	-5.37967
C (Perlakuan 2)	A (Kontrol)	6.100000*	.274913	.000	5.31347	6.88653
	B (perlakuan	3.012400*	.274913	.000	2.22587	3.79893
	D (perlakuan	-3.153800*	.274913	.000	-3.94033	-2.36727
D (Perlakuan 3)	A (Kontrol)	9.253800*	.274913	.000	8.46727	10.04033
	B (perlakuan	6.166200*	.274913	.000	5.37967	6.95273
	C (perlakuan	3.153800*	.274913	.000	2.36727	3.94033

The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 9. Pembuatan Larutan Stok MDA

Stok kit MDA:

$$\begin{aligned} \text{Densitas} &= 0,997 \text{ g/L} \\ &= 0,997 \cdot 10^3 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Stok Larutan MDA konsentrasi 8 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 0,997 \cdot 10^3 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 8 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 0,08 \text{ mL} = 80 \mu\text{L}$$

Diambil Stok kit MDA 80 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 7 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 8 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 7 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 8,75 \text{ mL} = 8750 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 8 mg/mL sebanyak 8750 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 6 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 7 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 6 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 8,571 \text{ mL} = 8571 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 7 mg/mL sebanyak 8571 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 5 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 6 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 8,333 \text{ mL} = 8333 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 6 mg/mL sebanyak 8333 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 4 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 4 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL} = 8000 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 5 mg/mL sebanyak 8000 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 3 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 4 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 7,5 \text{ mL} = 7500 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 4 mg/mL sebanyak 7500 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 2 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 3 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 6,667 \text{ mL} = 6667 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 3 mg/mL sebanyak 6667 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 1 mg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 2 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL} = 5000 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 2 mg/mL sebanyak 5000 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

Lampiran 10. Sertifikat laik etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

No: 132-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI PAPAN STREPTOKINASE TERHADAP
MUNCULNYA FIBROSIS GINJAL : UPAYA
MENDAPATKAN HEWAN MODEL TIKUS (*Rattus
norvegicus*) FIBROSIS GINJAL DAN MEMPELAJARI
PATOMEKANISMENYA.

PENELITI : PASCARA FAJAR LUKITO

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : KIMIA/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 April 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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