

Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

SKRIPSI

Oleh:

MULAM DIRATNA PARNASUKMA

125130107111001



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

MULAM DIRATNA PARNASUKMA
125130107111001



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018



Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Oleh:
MULAM DIRATNA PARNASUKMA
125130107111001

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

Pembimbing 1

Pembimbing 2

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

Drh Dyah Ayu O. A. P., M. Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas 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 : Mulam Diratna Parnasukma

NIM : 125130107111001

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai
Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model
Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α)
Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

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 dikemukakan 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,.....
Yang menyatakan,

(Mulam Diratna Parnasukma)
NIM. 125130107111001

**Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai
Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model
Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α)
Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)**

ABSTRAK

Kerusakan organ ginjal akibat hiperglikemia dapat menjadi salah satu faktor resiko terjadinya urolithiasis. Salah satu pencegahan yang dapat dilakukan yaitu dengan memberikan tanaman semanggi air. Semanggi air (*Marsilea crenata*) memiliki kandungan kalium dan flavonoid, dimana kandungan tersebut dapat berperan sebagai peluruh kristal, antihiperglikemia, antioksidan, dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dalam mencegah terjadinya urolithiasis pada hewan model hiperglikemia ditinjau dari ekspresi TNF α pada organ ginjal dan aktivitas SOD. Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan metode eksperimental. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 5, yaitu P1 (kontrol positif urolithiasis), P2 (kontrol positif hiperglikemia dan urolithiasis), dan P3, P4, P5 (induksi hiperglikemia dan perasan daun dan tangkai semanggi air dibagi menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60% serta induksi urolithiasis). Variabel penelitian berupa ekspresi TNF α dengan metode imunohistokimia dan aktivitas SOD diukur menggunakan *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* yang dianalisis statistika dengan uji *one-way ANOVA* dan uji lanjutan (*Posthoc Test*) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air secara signifikan dapat mencegah kenaikan ekspresi TNF α dan meningkatkan aktivitas SOD pada konsentrasi yang paling baik sebesar 60%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa perasan daun dan tangkai semanggi memiliki potensi sebagai prevensi urolithiasis pada hewan model hiperglikemia melalui penurunan ekspresi TNF α dan peningkatan aktivitas SOD.

Kata kunci : Hiperglikemia, urolithiasis, semanggi air, TNF α , SOD.

Effect of *Marsilea crenata* Leaves and Stalks Juice as Urolithiasis Prevention in rats (*Rattus norvegicus*) Hyperglycemia Model against Expression of Necrosis Tumor of Alpha Factor (TNF α) Kidney Organ and activity of Superoxide Dismutase (SOD)

ABSTRACT

Kidney organ damaged due to hyperglycemia might be one of the factors of risk occurrence of urolithiasis. One of the prevention that can be conducted is to give *Marsilea crenata*. *Marsilea crenata* contains potassium and flavonoid which all of those compound acted as set crystals, antihyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory. This study was aimed to know the influence of the giving *Marsilea crenata* leaves and stalks juice in preventing the occurrence of urolithiasis in animal model of hyperglycemia in terms of expression of TNF α on kidney organ and activity of SOD. This study used a CRD (Complete Random Design) with the experimental method. Treatment is divided into 5 groups, namely P1 (positive control urolithiasis), P2 (positive control hyperglycemia and urolithiasis), and P3, P4, P5 (induction hyperglycemia and *Marsilea crenata* leaves and stalks juice divided into several concentration i.e. 20%, 40%, 60% with induction urolithiasis. The study variable was TNF α expression with immunohistochemical method and SOD activity was measured using Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601 was analyzed statistically with one-way ANOVA test and advanced test (Posthoc Test) with 95% confidence level. The result showed *Marsilea crenata* leaves and stalks juice can prevent the increase in expression of TNF α and increasing activity of SOD at the best concentration of 60%. It was concluded that *Marsilea crenata* leaves and stalks juice have effect as prevention of urolithiasis in animal models of hyperglycemia through the decrease in expression of TNF α and increased activity of SOD.

Keywords: Hyperglycemia, urolithiasis, *Marsilea crenata*, TNF α , SOD.

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga skripsi dengan judul “Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) sebagai Prevensi Urolithiasis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperglikemia terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) Organ Ginjal dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)” dapat terselesaikan.

Dengan rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penulisan proposal ini. Ucapan terima kasih terutama kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP dan drh Dyah Ayu Oktavianie A. P., M. Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, ilmu, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan sehingga penulisan skripsi ini telah terselesaikan.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech dan drh. Fidi Nur Aini E.P.D, M.Si. selaku dosen penguji atas saran dan arahan untuk perbaikan laporan skripsi.
3. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., M.S. atas bimbingan, Ilmu, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan sehingga penulisan skripsi ini telah terselesaikan.
4. Seluruh staf laboratorium ilmu Faal dan laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, staf laboratoriu farmakologi Fakultas Kedokteran UMM yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan pengujian sampel.

5. Orang tua tercinta, bapak Parnadi, ibu Regreat Suasmiati, kakak Dhira Gunawan Parenanda dan adik Janmadika Triwardana Parenanda, Mahesti Puspa Parnasukma serta Dyvia Natades Parnasukma yang memberikan semangat, dukungan, kasih sayang, dan doa demi terselesaikannya penulisan skripsi ini.
6. Kelompok Penelitian Fransiska Ike K.T, Alifatul Firdausyah M. Abdul Wahid, Guritna Saputra dan Gallant Gestuyev atas kerjasama yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar.
7. Teman-teman Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang memberikan semangat.
8. Semua pihak dan orang-orang yang saya sayangi yang telah banyak membantu saya semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu memberikan kebaikan serta melimpahkan rahmatNya.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN 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 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sistem urinaria	6
2.2 Hiperglikemia.....	8
2.2.1 Definisi	8
2.2.2 Etiologi Hiperglikemia	9
2.2.3 Patofisiologi	9
2.2.4 Diagnosa	10
2.2.5 Hubungan Hiperglikemia dan Urolithiasis	10
2.3 Urolithiasis.....	11
2.3.1 Definisi Urolithiasis	11
2.3.2 Tipe Kristal	11
2.3.3 Patofisiologis	16
2.3.4 Diagnosa	19
2.3.5 Pencegahan	19
2.3.6 Pengobatan.....	20
2.4 Semanggi Air (<i>Marsilea crenata</i>)	22
2.4.1 Morfologi Semanggi Air	22
2.4.2 Kandungan Semanggi Air	23
2.4.3 Manfaat	24
2.5 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	26
2.6 Bahan Induksi Urolithiasis.....	27
2.7 Bahan Induksi Hiperglikemia	29
2.8 Superoksida Dismutase (SOD)	30
2.9 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF α).....	32
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	34
3.1 Kerangka Konseptual	34
3.2 Hipotesis Penelitian	37

BAB 4. METODE PENELITIAN	38
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	38
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	38
4.2.1 Perawatan Hewan Model	38
4.2.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air ...	38
4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi	39
4.2.4 Alat Perlakuan Perasan pada hewan Model	39
4.2.5 Alat Pembedahan Tikus	39
4.2.6 Pemeriksaan TNF α	39
4.2.7 Pemeriksaan SOD	39
4.3 Tahapan Penelitian	40
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian.....	40
4.3.2 Penetapan Dosis Tangkai dan Daun Semanggi Air	41
4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Diabetes	41
4.3.4 Penetapan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis.....	41
4.3.5 Rancangan Penelitian	41
4.3.6 Variabel Penelitian	43
4.4 Prosedur Penelitian.....	43
4.4.1 Persiapan Hewan Coba Tikus	43
4.4.2 Pemilihan daun dan Tangkai Semanggi Air	44
4.4.3 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air ..	44
4.4.4 Pemberian Perlakuan	44
4.4.5 Pengukuran Glukosa Darah.....	45
4.4.6 Pengambilan Sampel Urin.....	45
4.4.7 Pemeriksaan	46
4.4.8 Pengambilan Sampel Serum Darah	46
4.4.9 Pengukuran Sampel Organ Ginjal	47
4.4.10 Pengukuran Aktivitas SOD Darah.....	47
4.4.11 Pengukuran Ekspresi TNF α	48
4.4.12 Analisa Data	49
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	50
5.1 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) Organ Ginjal.....	54
5.2 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air terhadap Aktivitas SOD.....	66
BAB 6 PENUTUP	71
6.1 Kesimpulan	71
6.2 Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN	80



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	42
4.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air	44
4.3 Pemberian Perlakuan.....	44
5.1 Rata-rata ekspresi TNF α ginjal tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	62
5.2 Rata-rata aktivitas SOD.....	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Sistem Urinaria	6
2.2 Contoh Batu Urolithiasis pada Anjing, Kucing dan Kelinci	12
2.3 Kristal Kalsium Oksalat	13
2.4 Kristal Struvit.....	14
2.5 Kristal Asam Urat	15
2.6 Kristal Sistin	15
2.7 Semanggi Air	22
5 A Hasil Pengamatan Sedimen Kristal Urin P1	51
5 B Hasil Pengamatan Sedimen Kristal Urin P2	51
5 C Hasil Pengamatan Sedimen Kristal Urin P3	52
5 D Hasil Pengamatan Sedimen Kristal Urin P4	52
5 E Hasil Pengamatan Sedimen Kristal Urin P5	53
5.1 a Kontrol Positif Urolithiasis	56
5.1 b Kontrol Positif Urolithiasis dan Hiperglikemia	57
5.1 c Perlakuan 20%	58
5.1 d Perlakuan 40%	59
5.1 e Perlakuan 60%	60
5.2 Grafik Rata-rata Aaktivitas SOD Tikus Putih	66
L 2.1 Proses Pengenceran Perasan Daun dan Tangkai Semanggi air (<i>Marsilea crenata</i>)	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Tahapan Penelitian.....	80
2. Prosedur Kerja.....	81
3. Determinasi Tanaman Semanggi Air	83
4. Sertifikat Laik Etik Penelitian.....	84
5. ANOVA <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF α).....	85
6. ANOVA Superoksida Dismutase (SOD)	88
7. Data Hasil Uji Glukosa Darah	91
8. Dokumentasi Penelitian.....	92



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
<	kurang dari
≥	lebih dari sama dengan
±	kurang lebih
°C	Derajat celcius
β	Beta
μl	mikrolite
AGEs	<i>Advance Glycation End</i>
AK	Ammonium Klorida
BB	Berat Badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
CaOX	Kalsium Oksalat
cm	Centimeter
dL	Desiliter
EG	Etilen Glikol
ESWL	<i>Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy</i>
g	Gram
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IHK	Imunohistokimia
IKK	<i>Ikb kinase</i>
kDA	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Liter
mg	Miligram
ml	Mililiter
mm	milimeter
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
nm	nanometer
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i>
PIV	<i>Pielografi Intra Vena</i>
PO	Per Oral
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotasi per menit
SOD	Superoksida Dismutase
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
URS	Ureteroskopi
XO	Xantine Oksida

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Urolithiasis tidak hanya terjadi pada manusia, tetapi juga banyak terjadi pada hewan seperti anjing dan kucing. Resiko tertinggi urolithiasis terjadi pada hewan jantan, karena memiliki sistem urinasi panjang dan uretra sempit sehingga mudah untuk menghalangi urolit yang kecil (Yool, 2011). Batu saluran kemih atau urolithiasis merupakan keadaan patologis karena adanya masa keras seperti batu yang terbentuk disepanjang saluran kencing dan dapat menyebabkan nyeri, perdarahan, atau infeksi pada saluran kencing. Terbentuknya batu disebabkan beberapa zat mineral mengendap membentuk kristal dalam urin dan adanya kekurangan materi-materi yang dapat menghambat pembentukan batu, kurangnya produksi air kencing, dan keadaan-keadaan lain yang idiopatik.

Prevalensi urolithiasis pada anjing dilaporkan sekitar antara 0,25-0,5% di Swedia dan Norwegia, 3% di Ukraina (Tion, 2012). Angka morbiditas diketahui sekitar 0,5% di Amerika Utara dan antara 0,5-1% di Jerman (Tion, 2015). Terdapat 5 jenis batu yaitu struvite, kalsium oksalat, kalsium fosfat, kalsium karbonat dan silika. Uric acid, cystine, hippuric acid, dan kristal tirosin juga dapat ditemukan. Jenis batu yang paling sering menyerang pada anjing dan kucing adalah kalsium oksalat(CaOx). Prevalensi kejadian CaOx sekitar 70 % (Grauer, 2014).

Hiperglikemia adalah suatu kondisi dimana kadar glukosa darah melebihi batas normal. Hiperglikemia kronis dapat menimbulkan kerusakan organ tubuh, khususnya ginjal. Kerusakan organ ginjal akibat hiperglikemia dapat menjadi salah satu faktor resiko terjadinya urolithiasis. Gejala awal diabetes mellitus berhubungan dengan efek langsung dari kadar glukosa yang tinggi (hiperglikemia). Jika kadar glukosa darah tinggi, maka glukosa akan dikeluarkan melalui urin. Menurut Nugroho (2006), peningkatan volume urin terjadi disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik). Ginjal akan mengalami hiperfungsi sehingga ketika produksi urin melimpah terjadi adanya kumpulan urolit pada ginjal dan saluran urinasi.

Obstruksi pada saluran ureter akibat akumulasi kristal menyebabkan proses urinasi menjadi tersumbat sehingga ureter mengalami inflamasi. Reaksi inflamasi ini direspon makrofag dengan mensekresi sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi yang berperan sebagai indikator terjadinya inflamasi adalah sitokin TNF α . Inflamasi juga menyebabkan generasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) meningkat. Keadaan ROS yang meningkat memicu terjadinya stres oksidatif pada sel dan jaringan di saluran ureter. Stres oksidatif akan menyebabkan peroksidasi membran fosfolipid sehingga akan menurunkan aktivitas superoksida dismutase (SOD). Stres juga diketahui akan dapat mengurangi efektifitas pemanfaatan antioksidan di dalam tubuh (Maslachah, 2008).

Selama ini tindakan penanganan yang dilakukan untuk pengobatan urolithiasis adalah pemasangan kateter dan pemberian obat (farmasetik). Sekitar

11% dari kasus urolithiasis menunjukkan adanya obstruksi akibat pemasangan kateter (Stevenson, 2002). Pengobatan tersebut kurang efektif, timbul permasalahan baru dan mahal karena penyembuhan tidak total dan tingkat keterulangan terjadinya kristal pada sistem urinasi sehingga upaya pencegahan perlu dilakukan.

Pemanfaatan semanggi air (*Marsilea crenata*) tidak hanya sebagai bahan pangan, daun dan tangkai semanggi dapat digunakan sebagai obat herbal, salah satunya untuk mencegah urolithiasis (Afriastini, 2003). Tanaman semanggi air memiliki kandungan fitokimia berupa flavonoid dan kalium. Flavonoid berfungsi sebagai antihiperqlikemia, antiinflamasi dan antioksidan (Nurjanah *et al*, 2012). Kalium berfungsi sebagai pelarut kristal (batu) (Wakidi, 2003).

Antioksidan dalam semanggi air berperan penting dalam meredam radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif, yaitu diabetes mellitus (Juniarti *et al*, 2009). Semanggi air dapat berperan dalam mengurangi kadar glukosa darah penyakit hiperqlikemia dan peluruhan kristal akibat urolithiasis. Penelitian semanggi air terhadap *antiurolithiasis* sudah dilakukan, namun perlakuan diberikan pada hewan model tikus yang sehat. Sementara untuk hewan model tikus hiperqlikemia belum pernah dilakukan. Penggunaan obat herbal digunakan karena harga relatif murah dan tidak memiliki efek samping yang berarti.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antihiperqlikemia, antiinflamasi dan antioksidan yang terkandung didalam semanggi air terhadap

tikus putih urolithiasis model hiperglikemia. Perlakuan dilakukan untuk mendapatkan hasil penurunan ekspresi TNF α dan peningkatan aktivitas SOD.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah urolithiasis pada tikus hiperglikemia dengan menurunkan ekspresi TNF α ?
2. Apakah perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah urolithiasis pada tikus hiperglikemia dengan meningkatkan aktivitas SOD?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini yaitu :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar umur 3-4 bulan, jenis kelamin jantan, berat badan antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah memiliki sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang No: E.5.a/180/KEPK-UMM/XI/2016 (Lampiran 4).
2. Daun dan tangkai semanggi air sebagai obat prevensi yang memiliki 4 helai anak daun dengan ukuran rata-rata panjang 2,5 cm dan lebar 2,3 cm diambil setiap hari dalam keadaan segar dan berwarna hijau muda yang dipanen pada umur \pm 3 minggu (Pradana, 2013), didapatkan dari UPT Materia Medica Batu (Lampiran 3).
3. Induksi hiperglikemia dilakukan dengan pemberian larutan fruktosa 66%, dan margarin yang telah dipanaskan sebanyak 1,7 gram selama 15 hari (Rahmawati, 2015).

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 volume 12 ml/200 g BB/hari selama 10 hari (Handayani, 2016).
5. Perasan daun dan tangkai semanggi air diberikan dengan konsentrasi bertingkat yaitu 20%, 40%, 60% diberikan secara per oral (PO) selama 10 hari sesuai dengan kelompok perlakuan (Pradana, 2013).
6. Variabel yang diamati yaitu melalui ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) yang diamati dengan metode imunohistokimia dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Untuk mengetahui perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah terjadinya urolithiasis pada hewan model tikus putih hiperglikemia dibuktikan dengan adanya penurunan ekspresi TNF α .
2. Untuk mengetahui perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah terjadinya urolithiasis pada hewan model tikus putih hiperglikemia dibuktikan dengan adanya peningkatan aktivitas SOD.

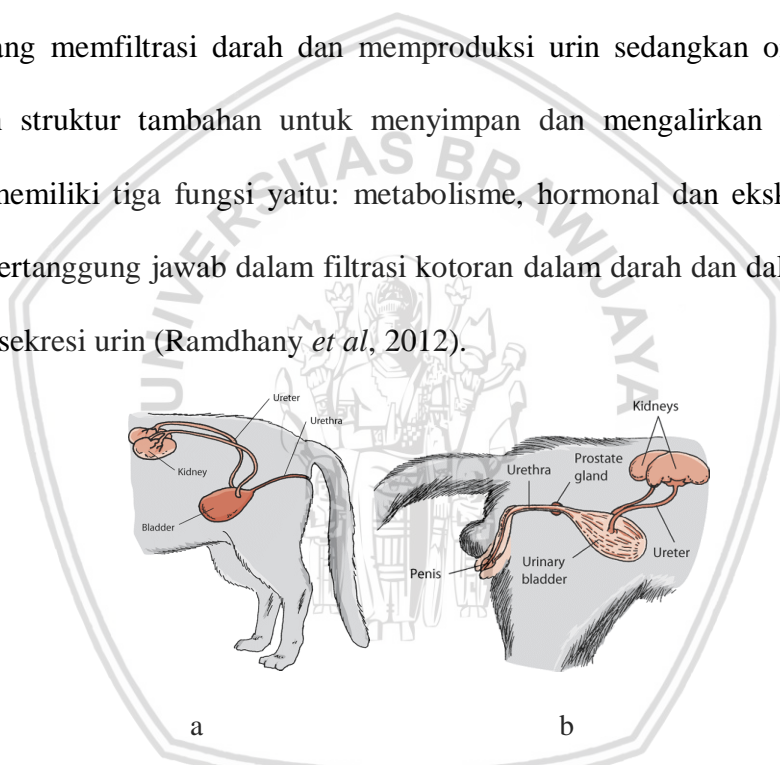
1.5 Manfaat Penelitian

Memberi informasi tentang pemanfaatan daun dan tangkai semanggi air sebagai bahan preventif (pencegahan) urolithiasis pada penderita hiperglikemia dan sebagai dasar penelitian selanjutnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Urinaria

Sistem urinari adalah sistem organ dalam tubuh yang terdiri dari ginjal, *vesica urinaria*, *ureter* dan *urethra* (Gambar 2.1). Organ-organ tersebut berperan dalam produksi dan ekskresi urin. Organ utama dari sistem ini adalah ginjal yang memfiltrasi darah dan memproduksi urin sedangkan organ lainnya hanyalah struktur tambahan untuk menyimpan dan mengalirkan urin. Sistem urinari memiliki tiga fungsi yaitu: metabolisme, hormonal dan ekskresi. Sistem urinari bertanggung jawab dalam filtrasi kotoran dalam darah dan dalam produksi maupun sekresi urin (Ramdhany *et al*, 2012).



Gambar 2.1 Sistem Urinaria a. Kucing Betina b. Kucing Jantan (Fitzgerald *et al*, 2011).

a. Ginjal

Ginjal adalah organ tubuh yang menjalankan proses filtrasi glomerulus, reabsorpsi tubulus dan sekresi tubulus. Cairan yang menyerupai plasma difiltrasi melalui dinding kapiler glomerulus ke tubulus renalis di ginjal. Dalam perjalanannya sepanjang tubulus ginjal, volume cairan filtrat akan berkurang dan susunannya berubah akibat proses reabsorpsi tubulus untuk membentuk urin yang

akan disalurkan ke dalam pelvis renalis. Filtrasi glomerulus berdasarkan faktor-faktor hemodinamik dan osmotik (Ganong, 2001).

b. Ureter

Setiap ginjal memiliki saluran yang disebut ureter terdapat di hilus dan merupakan saluran berotot yang mengangkut urin dari ginjal menuju vesika urinaria. Ureter terdiri dari tiga lapisan yaitu lapisan luar fibrosa, lapisan otot tengah yang dibentuk oleh otot halus dan lapisan dalam epitel transisional. Ureter merupakan lanjutan dari pelvis renalis. Tiap ureter meninggalkan ginjal di hilus. Epitel transisional menyebabkan ureter meregang ketika dilewati oleh urin sampai ke vesika urinaria (Colville, 2002). Lapisan otot halus pada ureter adalah lapisan yang fungsional, menggunakan gerak peristaltik untuk memindahkan urin, sama seperti kontraksi usus (Dyce *et al*, 2002).

c. Vesika Urinaria

Vesika urinaria menampung urin yang diproduksi dan mengeluarkannya secara periodik dari tubuh. Vesika urinaria memiliki dua bagian yaitu kantung otot dan leher yang terlihat seperti balon. Ukuran dan posisi vesika urinaria bervariasi berdasarkan jumlah urin yang terkandung di dalamnya. Vesika urinaria dilapisi oleh epitel transisional yang meregang ketika berisi urin. Ketika otot berkontraksi, vesika urinaria tertekan dan urin akan keluar. Leher vesika urinaria merupakan lanjutan caudal dari vesika urinaria menuju uretra (Colville, 2002).

d. Uretra

Uretra adalah lanjutan dari leher vesika urinaria yang berjalan melalui ruang pelvis menuju lingkungan luar (Reece, 2006). Uretra dilapisi oleh epitel

transisional yang menyebabkan uretra dapat meluas. Uretra jantan berjalan sepanjang pusat penis, membawa urin dari vesika urinaria sampai ke lingkungan luar. Uretra jantan juga mempunyai fungsi sebagai alat reproduksi. *Vas deferens* dan kelenjar asesoris masuk ke uretra melalui ruang pelvis. Sedangkan pada uretra betina hanya memiliki fungsi urinaria saja. Menurut Dyce *et al*, (2002), uretra betina berjalan secara caudal di atas lantai pelvis di bawah saluran reproduksi. Uretra betina relatif pendek menghubungkan vesika urinaria menuju *sphincter* uretra eksternal. Sedangkan pada jantan relatif lebih panjang, saluran tersebut berjalan melalui kelenjar prostat dan berjalan sepanjang penis sebelum mencapai *sphincter* eksternal. *Sphincter* uretra eksternal bekerja di bawah kesadaran (*voluntarily*) dan direlaksasikan ketika waktu dan tempat yang cocok untuk urinasi telah ditentukan (Colville, 2002). *Sphincter* eksternal terletak di luar vesika urinaria, tersusun dari otot rangka yang melingkari uretra (Reece, 2006).

2.2 Hiperglikemia

2.2.1 Definisi

Kadar glukosa darah yang berada di atas nilai normal disebut hiperglikemia. Hiperglikemia merupakan kondisi yang dapat menyebabkan berbagai komplikasi baik makro maupun mikrovaskuler yang dapat mengakibatkan kerusakan organ tubuh. Resistensi insulin adalah salah satu faktor yang mendasari terjadinya hiperglikemia kronis yang juga merupakan risiko penyakit *diabetes mellitus* dan sindrom metabolik (Rahmawati, 2015).

2.2.2 Etiologi Hiperglikemia

Penyebab tidak diketahui dengan pasti tapi umumnya diketahui kekurangan insulin adalah penyebab utama dan faktor herediter yang memegang peranan penting. Penyebab lain akibat pengangkatan pankreas, pengerusakan secara kimiawi sel beta pulau langerhans. Faktor predisposisi herediter, obesitas. Faktor imunologi; pada penderita hiperglikemia khususnya *diabetes mellitus* terdapat bukti adanya suatu respon autoimun. Respon ini merupakan respon abnormal dimana antibodi terarah pada jaringan normal tubuh dengan cara bereaksi terhadap jaringan tersebut yang dianggap sebagai jaringan asing. Hiperglikemia terjadi jika konsentrasi glukosa darah ≥ 105 mg/dL (Fahri *et al*, 2005).

2.2.3 Patofisiologi

Hiperglikemia dapat disebabkan defisiensi insulin yang dapat disebabkan oleh proses autoimun, kerja pankreas yang berlebih, dan herediter. Insulin yang menurun mengakibatkan glukosa sedikit yang masuk kedalam sel. Hal itu bisa menyebabkan lemas dengan kadar glukosa dalam darah meningkat. Kompensasi tubuh dengan meningkatkan glukagon sehingga terjadi proses glukoneogenesis. Selain itu tubuh akan menurunkan penggunaan glukosa oleh otot, lemak dan hati serta peningkatan produksi glukosa oleh hati dengan pemecahan lemak terhadap kelaparan sel. Hiperglikemia dapat meningkatkan jumlah urin yang mengakibatkan dehidrasi sehingga tubuh akan meningkatkan rasa haus (polydipsi). Penggunaan lemak untuk menghasilkan glukosa memproduksi badan keton yang dapat mengakibatkan *anorexia* (tidak nafsu makan), nafas bau keton dan mual (*nausea*) hingga terjadi asidosis (Price, 2005).

Menurunnya insulin dalam darah asupan nutrisi akan meningkat sebagai akibat kelaparan sel. Menurunnya glukosa intrasel menyebabkan sel mudah terinfeksi. Gula darah yang tinggi dapat menyebabkan penimbunan glukosa pada dinding pembuluh darah yang membentuk plak sehingga pembuluh darah menjadi keras (arteriosklerosis) dan apabila plak tersebut terlepas akan menyebabkan terjadinya trombus. Trombus ini dapat menutup aliran darah yang dapat menyebabkan timbulnya penyakit lain (tergantung letak tersumbatnya, misal cerebral dapat menyebabkan stroke, ginjal dapat menyebabkan gagal ginjal, jantung dapat menyebabkan miokard infark, mata dapat menyebabkan retinopati) bahkan kematian (Price, 2005).

2.2.4 Diagnosa

Diagnosis klinik untuk hiperglikemia biasanya ditandai dengan gejala klasik (meningkatnya rasa haus, nafsu makan bertambah dan sering buang air kecil) dapat disertai pula kehilangan berat badan yang tidak bisa dijelaskan dan pada kasus yang parah dapat terjadi koma dan adanya glikosuria. Untuk diagnosis lebih lanjut maka dilakukan pemeriksaan glukosa darah (Kardika, 2013).

2.2.5 Hubungan Hiperglikemia dan Urolithiasis

Hiperglikemia disebabkan karena tubuh kekurangan insulin baik absolut maupun relatif yang secara normal dihasilkan oleh sel β pankreas (Putri, 2014). Defisiensi insulin pada penderita hiperglikemia yang kronis akan menyebabkan ginjal hiperfungsi (Erwin, 2013). Hiperfungsi ini menyebabkan ginjal menjadi hipertropi dan terjadi peningkatan tekanan intrakapiler glomerulus. Peningkatan tekanan intrakapiler menyebabkan kerusakan glomerulus.

Organ ginjal memiliki fungsi mengatur jumlah air dalam urin dan mengeliminasi produk yang tidak diperlukan tubuh. Ketika glomerulus sebagai filter tidak bekerja dengan baik, maka kandungan tinggi dari substansi yang tidak dapat larut (seperti kalsium, oksalat, asam urat) dapat membentuk kristal yang perlahan akan membentuk batu ginjal. Batu ginjal dapat berupa butiran seperti pasir bahkan sampai sebesar bola golf. Kandungan mayor dari batu ginjal adalah kalsium (Wolf Jr, 2013).

2.3 Urolithiasis

2.3.1 Definisi Urolithiasis

Urolithiasis merupakan penyakit batu ginjal yang disebabkan oleh adanya akumulasi zat-zat yang terkandung di dalam urin sehingga membentuk seperti batu. Batu ginjal tersusun atas mikrolitmikrolit yang memadat yang dapat tumbuh membesar (Oktari *et al*,2014). Urolithiasis adalah adanya batu (kalkuli) di traktus urinarius. Batu tersebut dibentuk oleh kristalisasi larutan urin (kalsium oksalat, asam urat, kalsium fosfat, struvit dan sistin) (Sandra, 2002).

2.3.2 Tipe Kristal Urolithiasis

Berdasarkan komposisi kimianya batu terdiri dari urat, oksalat, fosfat, karbonat, sistin dan bahan lain yang ditemui secara tunggal atau dalam bentuk campuran. Batu urat terbentuk dari urat yang keras tetapi rapuh, tersusun berlapis-lapis secara konsentrik atau membentuk kristal. Batu ini berbentuk lonjong atau tidak beraturan, dengan warnanya kuning hingga coklat. Batu oksalat keras dan bentuknya tidak beraturan. Permukaannya kasar atau licin, berwarna kuning terang atau coklat tua. Permukaannya kadang bergerigi dan berduri seperti buah

mulberry sehingga disebut mulberry calculus. Batu fosfat permukaannya licin atau kasar, warnanya putih abu-abu. Batu fosfat biasanya terlihat sebagai batu tunggal yang besar atau gerombolan batu yang besar atau kadang-kadang terdiri dari beberapa batu kecil yang jumlahnya ratusan. Kandungan bahan kimia berbagai batu fosfat murni adalah amonium magnesium fosfat dan kalsium fosfat, sedangkan pada tipe yang tidak murni sering ditemukan bercampur dengan sejumlah urat, oksalat atau karbonat (Pasaribu, 2001).

Batu sistin biasanya berukuran kecil dan berwarna kuning berbentuk spirikal, tidak beraturan, rata atau oval dengan permukaan yang licin. Batu struvit merupakan batu yang berwarna putih atau abu-abu. Biasanya sering berisi kapur yang lembut dan rapuh. Batu struvit terdapat dalam bentuk murni atau campuran bersama kalsium fosfat, amonium urat, oksalat dan karbonat. Batu ini dapat berbentuk tunggal dan besar atau banyak seperti pasir (Pasaribu, 2001). Gambar batu urolithiasis dapat dilihat pada gambar 2.2

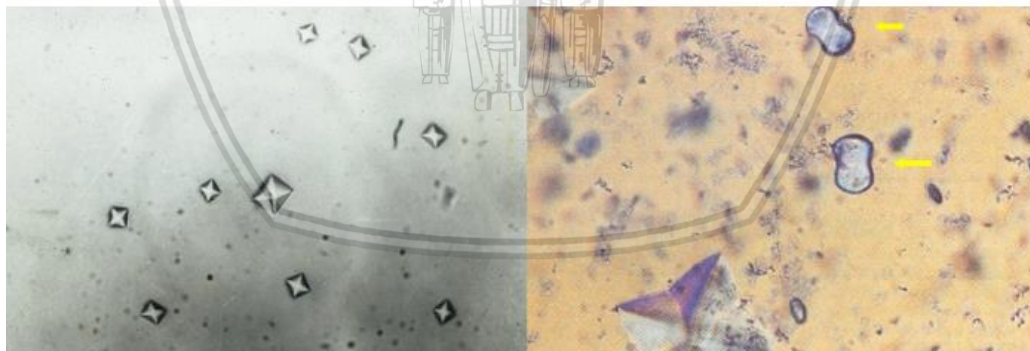


Gambar 2.2 Contoh Batu Urolithiasis pada Anjing, Kucing dan Kelinci (CastleVet, 2013)

Macam-macam tipe kristal yang sering ditemukan adalah:

1. Kristal kalsium

Peningkatan ekskresi kalsium atau hiperkalsiuria mengindikasikan adanya potensi hewan menderita batu ginjal. Dalam membentuk batu ginjal, kalsium bersenyawa dengan dengan oksalat atau fosfat. Patofisiologi penting terbentuknya batu kalsium adalah hiperkalsiuria. Hiperkalsiuria dapat terjadi karena berbagai hal, yaitu hiperkalsiuria absorptif (meningkatnya absorpsi kalsium di usus), hiperkalsiuria renal (meningkatnya ekskresi kalsium akibat kelainan di tubulus ginjal), hiperkalsiuria resorptif (hiperparatiroidisme primer menyebabkan terambilnya kalsium di tulang sehingga menyebabkan hiperkalsemia dan ekskresi kalsiuria), hiperkalsiuria idiopatik (tidak diketahui sebabnya). Hiperoksaluria dapat menyebabkan terbentuknya kristal kalsium oksalat (Orson, 2006) seperti yang terlihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Kristal kalsium oksalat (a) bihidrat, (b) monohidrat (Aryal, 2015).

2. Kristal struvit (magnesium-amonium fosfat)

Kristal struvit (Gambar 2.4) disebut juga sebagai batu infeksi karena proses terbentuknya kristal terjadi akibat proses infeksi. Batu infeksi disusun terutama oleh unsur magnesium amonium fosfat ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$). Mikroorganisme

penghasil urease (*Proteus* sp, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Ureaplasma urealyticum*) menghasilkan dua amonium dan bikarbonat untuk setiap urea yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Keadaan ini akan memudahkan terjadinya kristalisasi amonium. Konsentrasi bikarbonat yang tinggi juga akan meningkatkan karbonat, dan selanjutnya menyebabkan terbentuknya kristal karbonat apatite (Orson, 2006).



Gambar 2.4 Kristal Struvit (Aryal, 2015).

3. Kristal asam urat

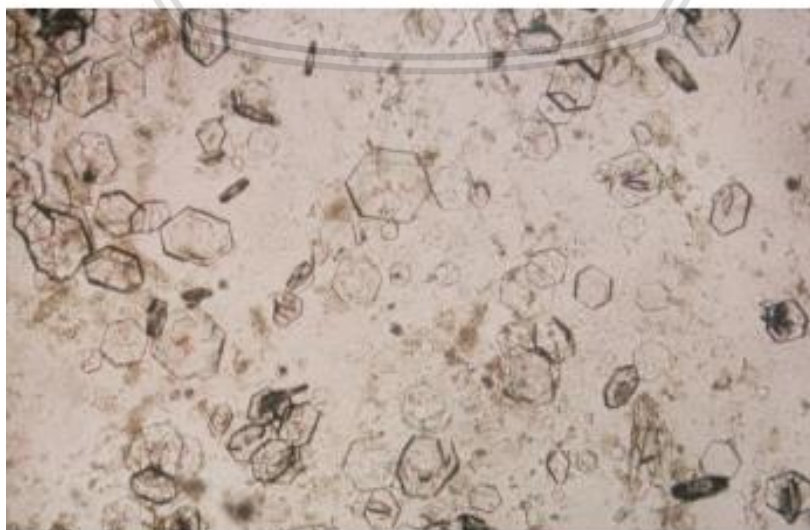
Dalam keadaan di mana ginjal berfungsi normal, kelebihan produksi asam urat akan diimbangi dengan pengeluaran asam urat melalui urin, atau yang disebut sebagai *hyperuricosuria*. Kelarutan asam urat tergantung dari keasaman atau pH urine. Pada urin yang bersifat asam ($\text{pH} < 5,5$) asam urat mudah berubah menjadi kristal. Di lingkungan yang bersifat basa asam urat lebih sulit mengkristal dan mudah dibuang bersama urin (Becker, 2007). Kristal asam urat terlihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.5 Kristal Asam Urat (Aryal, 2015).

4. Kristal sistin

Kristal sistin (Gambar 2.6) terbentuk didasari adanya kelainan resesif autosomal, di mana terjadi gangguan dalam transport asam dikarboksilik sistin, ornitin, lisin dan arginin. Sistin yang sulit larut memicu proses kristalisasi (Orson, 2006).



Gambar 2.6 Kristal Sistin (Aryal, 2015).

2.3.3 Patofisiologi

Secara pasti etiologi batu saluran kemih belum diketahui dan sampai sekarang banyak teori dan faktor yang berpengaruh untuk terjadinya batu saluran kemih, yaitu:

a. Teori Fisiko-Kimiawi

Hal yang melatarbelakangi terbentuknya urolithiasis ini adalah karena adanya terbentuknya proses kimia, fisika maupun gabungan fisiko kimiawi

1) Teori Supersaturasi

Supersaturasi air kemih dengan garam-garamnya pembentuk batu merupakan dasar terpenting dan merupakan syarat terjadinya pengendapan. Apabila kelarutan suatu produk tinggi dibandingkan titik endapannya maka terjadi supersaturasi sehingga menimbulkan terbentuknya kristal dan pada akhirnya akan terbentuk batu (Purnomo, 2011).

2) Teori nukleasi

Teori ini menjelaskan bahwa pembentukan batu berasal dari inti batu yang membentuk kristal atau benda asing. Inti batu yang terdiri dari senyawa jenuh yang lama kelamaan akan mengalami proses kristalisasi sehingga pada urin dengan kepekatan tinggi lebih beresiko untuk terbentuknya batu karena mudah sekali untuk terjadi kristalisasi (Grace and Borley, 2006).

3) Teori tidak adanya inhibitor

Supersaturasi kalsium, oksalat dan asam urat dalam urin dipengaruhi oleh adanya inhibitor kristalisasi. Magnesium, sitrat dan pirofosfat telah diketahui dapat menghambat nukleasi spontan kristal kalsium. Beberapa jenis glikosaminoglikans, seperti khondroitin sulfat dapat menghambat pertumbuhan kristal kalsium yang telah terbentuk sebelumnya. Zat lain yang mempunyai peranan inhibitor antara lain : asam ribonukleat, asam amino terutama alanin, sulfat, fluoride dan seng (Trihono and Pardede, 2009).

4) Teori epitaksi

Epitaksi adalah peristiwa pengendapan suatu kristal di atas permukaan kristal lain (Trihono and Pardede, 2009).

5) Teori Kombinasi

Urolithiasis dapat terbentuk berdasarkan campuran dari beberapa teori yang ada (Purnomo, 2011).

b. Teori Infeksi

Teori terbentuknya urolithiasis juga dapat terjadi karena adanya infeksi dari kuman tertentu.

1) Teori terbentuknya batu struvit

Batu struvit disebut juga batu infeksi mempunyai komposisi magnesium amonium fosfat. Terjadinya batu jenis ini dipengaruhi pH air kemih $\geq 7,2$ dan terdapat amonium dalam air kemih, misalnya terdapat bakteri pemecah urea (*urea splitting bacteria*). Bakteri penghasil urease sebagian besar gram negatif yaitu golongan *Proteus*, *Klebsiela*, *Providensia* dan *Pseudomonas*. Ada juga bakteri gram positif yaitu *Stafilokokus*, *Mikrokokus* dan

Corinebakterium serta golongan mikoplasma, seperti *T strain mikoplasma* dan *Ureaplasma urelithikum* (Bahdarsyam, 2011).

2) Teori nano bakteri

Nanobakteria merupakan bakteri terkecil dengan diameter 50- 200 nanometer yang hidup dalam darah, ginjal dan air kemih. Dinding sel bakteri ini mengeras membentuk cangkang kalsium (karbonat apatit). Kristal karbonat apatit ini akan mengadakan agregasi dan membentuk inti batu (Bahdarsyam, 2011).

c. Teori vaskuler

Pada penderita batu saluran kemih sering didapat adanya penyakit hipertensi dan kadar kolesterol darah yang tinggi

1) Hipertensi

Pada penderita hipertensi 83% mempunyai perkapuran ginjal sedangkan pada pasien yang tidak hipertensi yang mempunyai perkapuran ginjal sebanyak 52%. Hal ini disebabkan aliran darah pada papilla ginjal berbelok 1800 dan aliran darah berubah dari aliran laminar menjadi turbulensi. Pada penderita hipertensi aliran turbulen ini berakibat pengendapan ion-ion kalsium papilla (Stoller *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

2) Kolesterol

Adanya kadar kolesterol yang tinggi dalam darah akan disekresi melalui glomerulus ginjal dan tercampur didalam air kemih. Adanya butiran kolesterol tersebut akan merangsang agregasi dengan kristal kalsium oksalat

dan kalsium fosfat sehingga terbentuk batu (Stoller *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

2.3.4 Diagnosa

Diagnosa urolithiasis dapat dilakukan berdasarkan gejala-gejala klinik yang terlihat, pemeriksaan klinik pada hewan penderita, pemeriksaan laboratorium dan pemeriksaan radiografi. Selain itu diperlukan juga anamnesa lengkap dari hewan tersebut. Tes laboratorium sangat berguna dalam membuat diagnosa klinis pada urolithiasis seperti pemeriksaan urin dan darah. Pada pemeriksaan urin, biasanya akan ditemukan kandungan asam urin yang berlebihan dan protein serta kenaikan pH urin akibat perombakan urea menjadi amonia. Pada pemeriksaan darah ditemukan urea dan kreatin dalam jumlah yang banyak. Pemeriksaan bakteri juga termasuk dalam tes laboratorium, karena infeksi bakteri juga dapat menginduksi terjadinya batu yang terdapat dalam vesika urinaria (Pasaribu, 2001).

2.3.5 Pencegahan

Pencegahan yang dianjurkan adalah untuk meningkatkan konsumsi air agar mendorong diuresis dan mengurangi waktu agregasi serta kristalisasi. Terapi diet dapat mengurangi kekambuhan kalkuli, meskipun studi klinis pada tingkat kekambuhan masih jarang dilakukan. Pengendalian infeksi saluran kemih dan perubahan dalam diet dapat membantu dalam pencegahan urolitiasis pada penderita. Manajemen nutrisi termasuk salah satu strategi terbaik pencegahan terhadap urolitiasis (Tion *et al.*, 2015).

2.3.6 Pengobatan

1. Pengurangan rasa nyeri

Morfin atau meperidin diberikan untuk mencegah syok dan sinkop akibat nyeri yang luar biasa. Selain itu dapat diberikan cairan tambahan, karena dapat meningkatkan tekanan hidrostatik pada ruang di belakang kristal sehingga mendorong pasase kristal tersebut ke bawah. Masukan cairan sepanjang hari 14 mengurangi konsentrasi kristaloid urin dan mengencerkan urin (Brunner dan Suddarth, 2001).

2. Pengangkatan kristal

Pemeriksaan sitoskopik dan pasase kateter ureteral kecil untuk menghilangkan kristal yang menyebabkan obstruksi, sehingga akan dapat mengurangi tekanan belakang pada ginjal dan mengurangi nyeri (Brunner dan Suddarth, 2001).

3. *Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy* (ESWL)

Merupakan prosedur *non-invasive* yang digunakan untuk menghancurkan kristal di kaliks ginjal. Setelah kristal pecah menjadi bagian yang kecil seperti pasir, sisa kristal tersebut dikeluarkan secara spontan (Tiselius *et al*, 2001).

4. Metode Endourologi Pengangkatan Batu

Metode untuk mengangkat kristal renal tanpa pembedahan mayor. Nefrostomi perkutan (nefrolitotomi perkutan) dilakukan dan nefroskop dimasukkan ke traktus perkutan yang sudah dilebarkan ke dalam parenkim ginjal (Brunner dan Suddarth, 2001).

5. Ureteroskopi (URS)

Visualisasi dan aksis ureter dengan memasukkan suatu alat ureteroskop melalui sistoskop. Kristal dapat dihancurkan dengan menggunakan laser, lithotripsy elektrohidrolik atau ultrasound kemudian diangkat (Tiselius *et al*, 2001).

6. Pielografi Intra Vena (PIV)

Pemeriksaan yang bertujuan menilai keadaan anatomi dan fungsi ginjal. Selain itu PIV dapat mendeteksi adanya kristal semiopak atau batu non opak yang tidak dapat terlihat oleh foto polos abdomen. (Tion *et al*, 2015).

7. Pelarutan batu

Infus cairan kemolitik (agen pembuat asam dan basa) untuk melarutkan kristal dapat dilakukan sebagai alternatif penanganan untuk pasien beresiko terhadap terapi lain dan menolak metode lain (Brunner dan Suddarth, 2001).

8. Pengangkatan batu

Pembedahan dengan nefrolitotomi (insisi pada ginjal untuk mengangkat kristal) atau nefrektomi jika ginjal tidak berfungsi akibat infeksi atau hidronefrosis. Kristal dalam piala ginjal diangkat dengan pielolitotomi, sedangkan kristal pada ureter diangkat dengan ureterolitotomi dan sistotomi jika kristal berada di vesika urinaria. Jika kristal berada di vesika urinaria, suatu alat dapat dimasukkan ke dalam vesika urinaria, kemudian kristal dihancurkan oleh penjepit pada alat ini. Prosedur ini disebut sistolitopaksi (Brunner dan Suddarth, 2001).

2.4 Semanggi Air (*Marsilea crenata*)

2.4.1 Morfologi Semanggi Air

Klasifikasi dari semanggi air (*M. crenata Presl.*) menurut dalam Afriastini (2003) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Pteridopsida

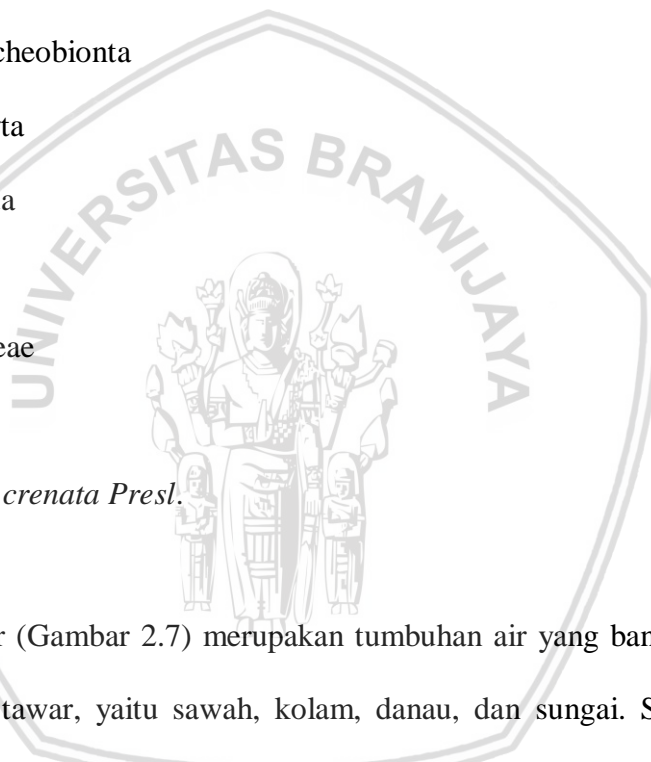
Ordo : Salviniiales

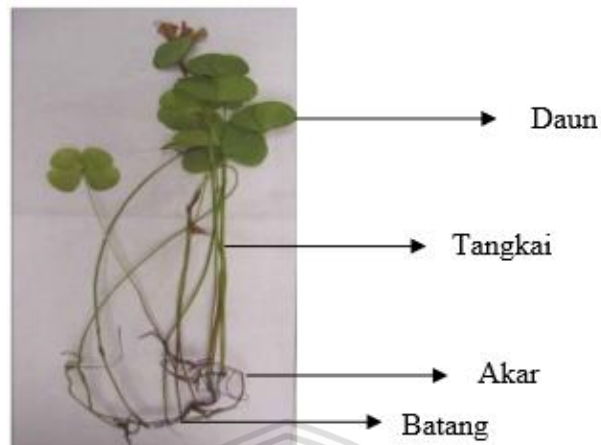
Famili : Marsileaceae

Genus : Marsilea

Spesies : *Marsilea crenata Presl.*

Semanggi air (Gambar 2.7) merupakan tumbuhan air yang banyak terdapat di lingkungan air tawar, yaitu sawah, kolam, danau, dan sungai. Semanggi air sering dianggap sebagai gulma pada tanaman padi namun memiliki nilai kegunaan yang beraneka ragam (Afriastini 2003). Tumbuhan ini biasanya hidup dengan jenis-jenis tumbuhan air lain, misalnya eceng kecil, genjer, rumput air, serta teki alit. Semanggi air memiliki beberapa nama lain, yaitu jukut calingcingan (Sunda), tapak itek (Malaysia), upat-upat (Filipina), chutul phnom (Kamboja), pak vaen (Laos), phak waen (Thailand), dan water clover fern (Inggris).





Gambar 2.7 Semanggi Air (*Marsilea crenata*) (Sulistiono, 2011)

Di Indonesia khususnya di Jawa, daun semanggi air yang masih muda digunakan sebagai sayuran untuk makanan (pecel di Surabaya). Di Thailand tanaman ini dimakan segar dengan sambal lokal. Di Filipina daun semanggi air digunakan sebagai bahan obat untuk neurasthenia dan oedema. Sedangkan di India daun semanggi air digunakan melawan kusta, demam, dan keracunan pada darah. Di Australia tanaman ini banyak digunakan sebagai tepung dan dimakan. Selain untuk dikonsumsi dan digunakan sebagai obat, di New Zealand semanggi air juga dapat digunakan sebagai tanaman hias pada akuarium (Champion dan Clayton 2001).

2.4.2 Kandungan Semanggi Air

Komposisi kimia semanggi air yaitu kadar air, abu, protein lemak, serat dan karbohidrat. Semanggi air mempunyai kadar air sebesar 89,02%. Kandungan vitamin yang terkandung dalam semanggi air adalah vitamin C dan β karoten. Semanggi air mengandung beberapa mineral penting antara lain fosfor, kalsium, kalium, natrium, besi, tembaga, dan seng. Pada tanaman semanggi segar terdapat

kandungan fitokimia berupa gula pereduksi, steroid, kandungan karbohidrat, dan flavonoid (Jacoeb *et al*, 2010).

2.4.3 Manfaat Semangi Air

a. Flavonoid sebagai Antihiperglikemia

Flavonoid juga berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah dengan cara meningkatkan sekresi insulin di sel β pankreas, meningkatkan pengambilan glukosa jaringan dan meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin. Selain itu, flavonoid dapat mencegah kerusakan sel β pankreas karena memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang bekerja dengan cara menangkap atau menetralkan radikal bebas yang terkait dengan gugus OH sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak (Wulandari, 2016). Flavonoid sebagai antioksidan dapat mencegah reaksi pembentukan rantai AGE penyebab perubahan patologis pada keadaan hiperglikemik. Mekanisme lain dari flavonoid yang menunjukkan efek hipoglikemik yaitu mengurangi penyerapan glukosa dan mengatur aktivitas ekspresi enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat (Brahmachari, 2011).

b. Flavonoid sebagai Antiinflamasi

Inflamasi merupakan suatu respon protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik. Inflamasi adalah usaha tubuh untuk menginaktifkan atau merusak organisme yang menyerang, menghilangkan dan mengatur derajat perbaikan jaringan. Tujuannya adalah untuk memperbaiki kerusakan atau setidaknya untuk membatasinya dan juga untuk menghilangkan penyebabnya, misalnya bakteri atau benda asing. Inflamasi disebabkan oleh pelepasan mediator kimiawi dari jaringan

yang rusak dan migrasi sel (Riansyah *et al*, 2015). Kerusakan sel akibat dari inflamasi terjadi pada membran sel, menyebabkan leukosit melepaskan enzim lisosom dan jalur siklooksigenase (COX) dalam metabolisme arakhidonat menghasilkan prostaglandin yang memiliki berbagai efek pada pembuluh darah, ujung saraf, dan pada sel yang terlibat dalam peradangan (Riansyah *et al*, 2015).

Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiinflamasi. Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi dapat melalui beberapa jalur yaitu dengan penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil, penghambatan pelepasan histamin (Nijveltd *et al*, 2001).

c. Flavonoid sebagai Antioksidan

Flavonoid adalah antioksidan eksogen yang telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun secara tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme (Sumardika dan Jawi, 2010).

d. Kalium sebagai Pelarut Kristal

Kalium merupakan salah satu mineral makro yang memegang peranan dalam pemeliharaan keseimbangan cairan dan elektrolit. Kalium penting dalam menghantarkan impuls saraf serta pembebasan tenaga dari protein, lemak, dan

karbohidrat sewaktu metabolisme (Dwipartha *et al*, 2014). Kandungan kalium yang terdapat pada semanggi air dapat menghancurkan kalsium oksalat dalam batu 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. Selain itu kalium dapat berfungsi untuk menjaga keseimbangan elektrolit dalam ginjal (Yusrin *et al*, 2009).

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan percobaan adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut (Ridwan, 2013). Salah satu hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus putih banyak digunakan pada penelitian-penelitian toksikologi, metabolisme lemak, obat-obatan maupun mekanisme penyakit infeksius. Tikus putih baik digunakan dalam penelitian karena mudah dipelihara, mudah berkembang biak sehingga cepat mendapatkan hewan coba yang seragam dan mudah dikelola di laboratorium (Berata *et al*, 2010).

Kriteria yang dibutuhkan oleh peneliti dalam menentukan tikus putih sebagai hewan percobaan, antara lain: kontrol (*recording*) pakan, kontrol (*recording*) kesehatan, recording perkawinan, jenis (strain), umur, bobot badan, jenis kelamin, silsilah genetik. Terdapat tiga galur tikus putih yang memiliki kekhususan untuk digunakan sebagai hewan percobaan antara lain *Wistar*, *long evans* dan *Sprague dawley* (Hubrecht dan Kirkwood, 2010). Tikus *Wistar* saat ini

menjadi salah satu yang strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. Hal ini ditandai oleh kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang selalu kurang dari panjang tubuhnya. Galur tikus *Sprague dawley* dan Long-Evans dikembangkan dari tikus galur *Wistar*. Tikus *Wistar* lebih aktif (agresif) daripada jenis lain seperti tikus *Sprague dawley* (Sirois, 2005).

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).

2.6 Bahan Induksi Urolithiasis

2.6.1 Etilen Glikol

Etilen glikol merupakan bahan yang banyak digunakan sebagai cairan antipembekuan, penghilang es, pelapis permukaan, pemindah panas, pendingin industri, hidrolik, surfaktan dan pengemulsi. Penggunaan etilen glikol di daerah yang memiliki musim salju sangat umum yaitu sebagai anti *freeze* untuk mencegah terjadinya pembekuan pada air radiator mobil. Keracunan akut pada manusia dan hewan peliharaan banyak terjadi secara tidak sengaja mengonsumsi cairan tersebut karena rasanya yang manis. Ginjal merupakan organ yang paling peka terhadap etilen glikol dan merupakan target organ primer (Cruzan *et al*, 2004).

Etilen glikol dalam tubuh dimetabolisme menjadi glikoaldehid dengan katalisator enzim alkohol dehidrogenase. Glikoaldehid diubah menjadi asam glikolat, kemudian asam glikolat dimetabolisme menjadi asam glikosalat dan akhirnya menjadi asam oksalat. Asam oksalat berikatan dengan kalsium untuk membentuk kristal kalsium oksalat dan terdeposit pada oorgan yang dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai organ tubuh termasuk otak, jantung, ginjal, dan paru-paru. Akumulasi kalsium oksalat pada ginjal menyebabkan kerusakan ginjal yang mengakibatkan oliguria dan anuria serta kegagalan ginjal akut (Brent, 2001).

Kelebihan dari penggunaan model etilen glikol adalah murah dan mudah dalam pemberiannya. Penggunaan etilen glikol sebagai penginduksi dapat digunakan sendiri atau kombinasi dengan dengan zat kimia yang lain seperti ammonium klorida.

2.6.2 Amonium Klorida

Berbentuk Kristal putih, tidak berbau, merupakan garam dari ammonia yang larut dalam air. Bila dilarutkan dalam air, sedikit asam, karena garam ini berasal dari asam kuat (HCl) dan basa lemah. Rumus kimia NH_4Cl , dengan berat molekul: 53.491 Titik didih $338\text{ }^\circ\text{C}$. Kelarutan dalam air 297 g/L ($0\text{ }^\circ\text{C}$), 372 g/L ($20\text{ }^\circ\text{C}$), dan 773 g/L ($100\text{ }^\circ\text{C}$); sedangkan dalam alkohol 6 g/L ($19\text{ }^\circ\text{C}$). Tidak larut dalam *diethyl ether*, *acetone* serta hampir tidak larut dalam etil asetat (SIKerNas, 2010). Secara *in vitro* dengan menggunakan hewan coba yaitu tikus yang diinduksi dengan etilen glikol atau amonium klorida untuk meningkatkan kadar kalsium pada ginjal Secara histologis, pada tikus yang diinduksi etilen glikol atau

amonium klorida saja memperlihatkan deposit dari kristal kalsium oksalat pada semua bagian ginjal (Touhami *et al*, 2007). Amonium klorida ketika direaksikan dengan etilen glikol dapat mempercepat proses pembentukan kristal kalsium sebagai metode uji praklinis yang mendekati keadaan penderita batu ginjal yang sebenarnya (Mayee dan Thosar, 2011).

2.7 Bahan Induksi Hiperglikemia

2.7.1 Fruktosa

Fruktosa adalah gula sederhana yang dapat memberikan rasa manis pada makanan alami seperti buah-buahan, biji-bijian, madu dan sayuran. Fruktosa merupakan monosakarida, terdiri atas 6 atom karbon (heksosa) yang merupakan isomer glukosa ($C_6H_{12}O_6$) dan mengandung gugus karbonil sebagai keton. Fruktosa dikonsumsi dalam bentuk sukrosa dan jarang dalam bentuk bebas. Di dalam usus, sukrosa dihidrolisis oleh enzim sukrase menjadi fruktosa dan glukosa. Setelah diabsorpsi oleh usus, fruktosa diangkut melalui vena porta menuju hepar untuk dimetabolisme menjadi lipid (Prahastuti, 2011).

Penggunaan fruktosa pada induksi ini karena fruktosa lebih dimetabolisme sebagai lemak dibandingkan glikogen dan efek pemberian pakan tinggi lemak ini diharapkan dapat memicu terjadinya resistensi insulin karena kandungan kolesterol, trigliserida dan asam lemak yang sangat tinggi (Warditiani, 2012). Fruktosa juga dapat menyebabkan kegagalan signaling insulin sehingga dapat menurunkan sintesis glikogen dan meningkatkan glikogenolisis dan glukoneogenesis, akibatnya terjadi peningkatan kadar glukosa darah (Carranza, dkk. 2004). Pemberian pakan tinggi lemak diharapkan dapat meningkatkan

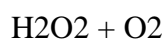
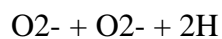
kandungan asam lemak bebas di dalam plasma sel yang mengakibatkan penurunan sensitifitas insulin pada jaringan perifer (Shulman, 2000). Dengan pemberian makanan tinggi lemak tersebut, kadar lemak di dalam darah akan tinggi.

2.7.2 Margarin

Margarin merupakan emulsi dengan tipe emulsi *water in oil* (w/o), yaitu fase air berada dalam fase minyak atau lemak. Pemberian margarin yang telah dicairkan juga diketahui dapat meningkatkan kadar glukosa darah (Sakti, 2012). Konsumsi makanan tinggi lemak trans dilaporkan dapat menyebabkan berkurangnya sensitivitas kadar insulin untuk mengontrol kadar glukosa darah. Margarin mengandung asam lemak trans yang dapat memicu terjadinya peningkatan kadar glukosa darah. Konsumsi asam lemak trans yang tinggi dapat meningkatkan aktifitas *AcetylCoenzyme Carboxylase 1* (ACC1) dan *AcetylCoenzyme Carboxylase 2* (ACC2) pada jaringan tubuh tikus. ACC 1 dan ACC 2 merupakan enzim yang berperan pada sintesis dan oksidasi asam lemak. Peningkatan aktifitas ACC1 dan ACC 2 translokasi GLUT 4 ke membran plasma menurun, sehingga menurunkan penyerapan glukosa dan meningkatkan tingkat glukosa darah plasma. Dengan menginduksi aktivitas ACC1 dan ACC2, translokasi GLUT4 ke membran plasma menurun, sehingga menurunkan penyerapan glukosa dan meningkatkan tingkat glukosa darah plasma (Adriaria, 2016).

2.8 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase adalah salah satu enzim yang berperan sebagai antioksidan dalam tubuh. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran tingkat stres oksidatif dalam tubuh (Pavani *et al*, 2012). Sebagai antioksidan, SOD bekerja mengkatalisa radikal superoksida yang terdismutasi menjadi hidrogen peroksida. Di bawah ini adalah contoh reaksi katalisis yang dimaksud.



Sekresi dan ekspresi gen antioksidan enzim, salah satunya SOD dipengaruhi oleh siklus terang – gelap. Perusakan siklus sirkadian melatonin dengan cara pemaparan hewan coba pada cahaya terus menerus akan menurunkan aktivitas antioksidan enzim pada malam hari, dimana biasanya antioksidan enzim akan meningkat. Diduga, bahwa hal ini disebabkan oleh hubungan melatonin dan antioksidan enzim, salah satunya SOD.

Enzim Superoksida dismutase memiliki 3 tipe, yaitu:

a. *Copper Zinc* Superoksida dismutase (CuZnSOD)

Terletak dalam sitoplasma dan organel dengan ukuran 32.000 kDA. Memiliki dua sub unit protein dengan kandungan atom tembaga dan zinc. CuZnSOD disebut juga sebagai SOD1. CuZnSOD berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Satu unit CuZnSOD diartikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghambat autooksidasi pirogalol sebanyak 50 % (Young dan Woodside, 2001).

b. Mangan Superoksida Dismutase (MnSOD)

Terdapat di dalam mitokondria, MnSOD menjadi antioksidan utama dalam menghambat kerja superoksida di dalam mitokondria. Terdiri dari 4 sub unit dengan atom mangan dan memiliki ukuran sebesar 40.000 kDA. Merupakan tipe SOD terbanyak yang didapat pada cairan ekstraseluler. MnSOD disintesis terbatas oleh beberapa sel, diantaranya sel endotel dan *fibroblast* (Young dan Woodside, 2001).

c. *Ferrum* Superoksida Dismutase (FeSOD)

FeSOD merupakan enzim yang banyak ditemukan pada organisme prokaryot yaitu tumbuhan dan bakteri. FeSOD memiliki struktur kimia berupa tiga ion besi yang berikatan dengan tiga histidin, satu aspartat, dan satu molekul air.

2.9 *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α)

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T. Ekspresi dan sintesa dari TNF α dihasilkan oleh sel-sel hematopoetik dan sel intrinsik ginjal termasuk sel mesangial, glomerulus, endotel, dendrit, sel tubulus ginjal. TNF α dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF α secara cepat dapat meningkatkan kadar TNF α yang aktif (Navarro dan Mora, 2008). Meningkatnya kadar TNF α terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al*, 2007).

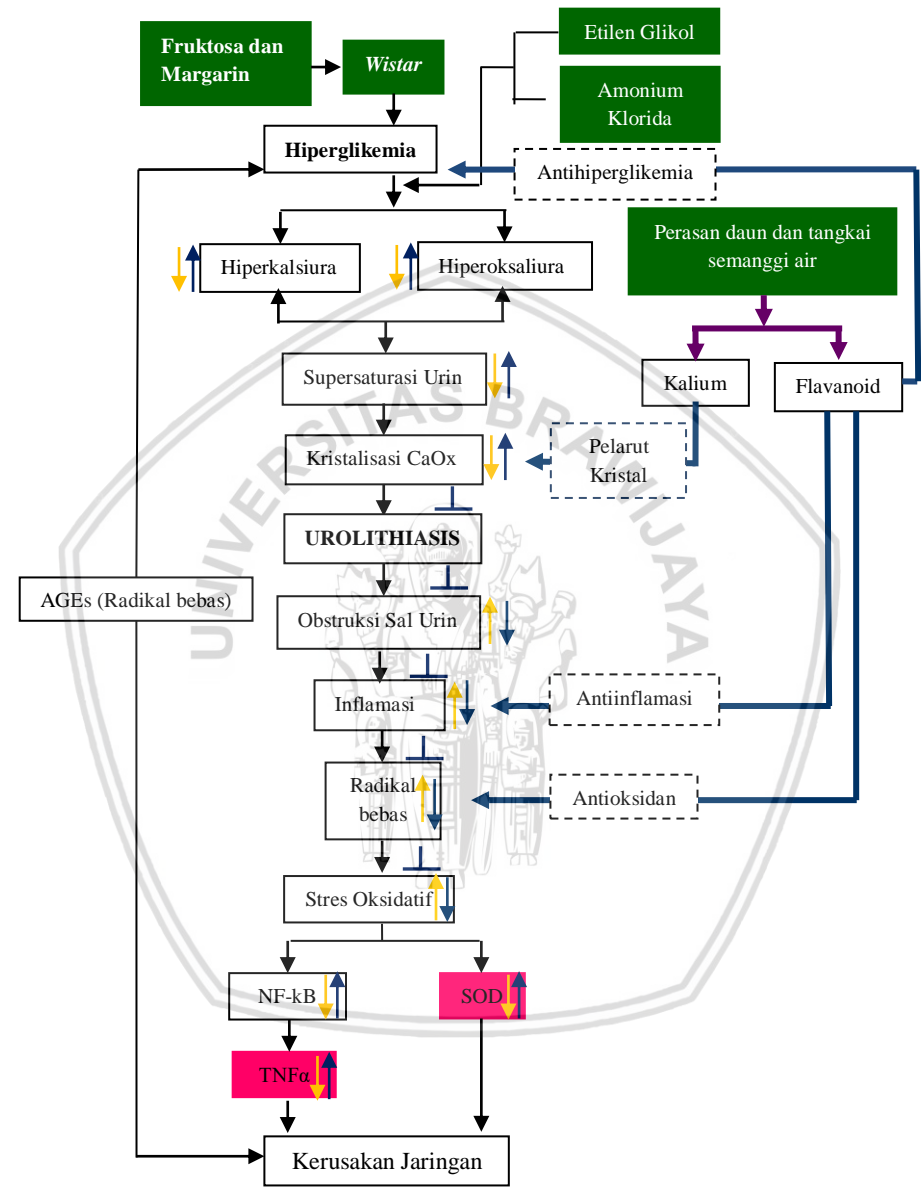
TNF α bersifat sitotoksin bagi banyak jenis sel tumor dan terbukti merupakan modulator respon imun kuat yang memperantarai induksi molekul adhesi, sitokin lain dan aktivasi netrofil. TNF α merupakan sitokin proinflamasi yang memiliki peran fundamental dalam pertahanan imun dan dapat dipakai

sebagai indikator bahwa sel mengalami stres oksidatif, apoptosis atau nekrosis (Abbas dan Lichtman, 2003). Sekresi sitokin TNF α oleh makrofag dihasilkan ketika adanya aktivasi dari jalur NF-kB dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Aktivasi NF-kB memicu perekrutan *I κ B kinase* (IKK) yang merupakan enzim kompleks pemicu respon seluler menjadi inflamasi. Adanya IKK menyebabkan terbentuknya I κ B α yang mengikat NF-kB untuk memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, dan faktor-faktor apoptosis (Dundar, 2001).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual



Keterangan :

- Variabel Bebas
- Variabel tergantung
- Kandungan Fitokimia
- Menghambat
- Pengaruh pemberian semangi
- Proses
- Pengaruh terpapar Urolithiasis



Pemberian fruktosa dan margarin dapat meningkatkan kadar glukosa darah. Konsumsi makanan tinggi lemak trans dapat menyebabkan berkurangnya sensitivitas kadar insulin untuk mengontrol kadar glukosa darah. Pada resistensi insulin berkepanjangan sel pankreas tidak lagi mampu melakukan kompensasi insulin maka terjadilah hiperglikemia. Hiperglikemia dapat menginduksi peningkatan radikal bebas melalui pembentukan Advance Glycation End product (AGEs). AGEs merupakan produk glikasi non-enzimatik dan oksidasi protein dan lipid yang bersifat ireversibel. Protein yang dirusak oleh AGEs akan mengubah struktur dan fungsi jaringan.

Kondisi hiperglikemia dapat meningkatkan tekanan intrakapiler glomerulus sehingga menyebabkan kerusakan pada glomerulus. Kerusakan tersebut mengakibatkan ginjal tidak bisa memfilter glukosa sehingga glukosa akan ikut terlarut dalam urin. Adanya glukosa dalam urin dapat mengakibatkan penimbunan glukosa pada dinding saluran urinasi yang membentuk plak sehingga saluran urinasi menjadi keras dan dapat menutup aliran urin maka akan menjadi faktor terjadinya urolithiasis. Pemberian induksi urolithiasis tikus putih menggunakan etilen glikol 0,75% dengan amonium klorida 2% dapat mempercepat pembentukan kristal.

Pada batu kalsium oksalat kondisi yang terlibat adalah hiperkalsiuria dan hiperoksaluria. Adanya kondisi hiperoksaluria merangsang terjadinya kristal kalsium oksalat yang akan terakumulasi menjadi batuan yang dapat menyebabkan gagal ginjal akut. Kristal dapat mengendap di dalam saluran urinari ketika urin dalam kondisi supersaturasi, sebelum kristal menjadi batu ginjal maka kristal

harus mengalami proses pengikatan di ginjal. Pengendapan kristal berkumpul dalam saluran urinari sehingga menyebabkan terjadinya penyumbatan dalam jumlah banyak. Sumbatan kristal pada saluran urinari dapat menyebabkan obstruksi dan menipisnya parenkim ginjal, dinding ureter dan vesika urinaria.

Keadaan hiperglikemia dan urolithiasis menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas dan penurunan sejumlah antioksidan. Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar sehingga bersifat tidak stabil. Radikal bebas berusaha menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel. Jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel. Hal ini dapat menyebabkan teraktivasinya *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) sehingga makrofag meresponnya dengan mensekresi sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF α). Pada kondisi stres oksidatif terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan meningkatkan produksi radikal bebas di dalam tubuh dapat menurunkan enzim-enzim antioksidan intrasel dan menyebabkan kerusakan sel. Superoksida dismutase (SOD) adalah salah satu enzim yang berperan sebagai antioksidan dalam tubuh. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran tingkat stres oksidatif dalam tubuh.

Kandungan yang terdapat didalam perasan daun dan tangkai semanggi air antara lain kalium dan flavonoid. Kalium sebagai pelarut kristal memiliki manfaat untuk memecah kristal CaOx dan mencegah penyumbatan didalam saluran

urinasi. Sementara kandungan flavonoid mempunyai manfaat sebagai antihiperglikemia, antiinflamasi, antioksidan. Peran flavonoid sebagai antihiperglikemia adalah menurunkan kadar glukosa darah dengan cara meningkatkan sekresi insulin di sel β pankreas. Flavonoid juga berperan sebagai antiinflamasi yaitu mengurangi inflamasi yang terjadi akibat obstruksi pada saluran urinari. Aktivitas sebagai antioksidan didalam flavonoid mampu menekan radikal bebas (ROS). Untuk mengetahui efek perasan daun dan tangkai semanggi air terhadap hewan model urolithiasis dapat dilakukan dengan melihat penurunan ekspresi TNF α dan peningkatan aktivitas enzim SOD.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian perasan daun semanggi air dapat mencegah urolithiasis pada hewan model hiperglikemia yang dibuktikan dengan penurunan ekspresi TNF α dan peningkatan aktivitas SOD.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober hingga November 2016.
- b. Tahap perawatan dan pemberian perlakuan hewan coba dilaksanakan di laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang.
- c. Pembedahan dan pengambilan sampel serum darah dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang.
- d. Tahap pembuatan Perasan tangkai dan daun semanggi air dilakukan di UPT. Materia Medica Batu.
- e. Pengukuran ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB.
- f. Pengukuran aktivitas superoksida dismutase (SOD) dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal FK UB.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Perawatan Hewan Model

Kandang pemeliharaan terbuat dari dari kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 12 cm sebanyak enam buah kandang beralaskan sekam dan ditutup kawat ram, tempat pakan, tempat minum (*nipple*), sekam, pakan *BR2 Comfeed*, dan air mineral (Lina *et al*, 2003).

4.2.2 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi air

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan perasan adalah 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 *aquadest* (Pradana, 2013).

4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk bahan induksi adalah timbangan digital, tabung erlenmeyer 100 ml, spatula, spuit 10 ml, dan tabung reaksi 10 ml. Untuk urolit setiap hari memerlukan 1,44 ml etilen glikol 100%, 3,84 g amonium klorida 100% dan 40 ml *aquadest* selama 10 hari. Untuk hiperglikemia setiap hari memerlukan larutan fruktosa 66% dan margarin yang telah dipanaskan sebanyak 1,7 gram selama 15 hari (Rahmawati, 2015).

4.2.4 Alat Pemberian Perasan Kepada Hewan Model

Sonde lambung (*oral gavage*) 18g.

4.2.5 Alat Pembedahan Tikus

Alat pembedahan pada tikus yaitu Gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, appendoft 2000 ul, vakutainer, alkohol, dan *Phosphate buffer saline* (PBS).

4.2.6 Pemeriksaan TNF α

PFA 4%, alkohol (30%, 70%) etanol (30%, 80%, 90%, 95%), etanol absolut, xylol, inkubator, H₂O₂ 3%, PBS pH 7,4 BSA 1%, antibodi primer (*anti rat TNF α*), antibodi sekunder (*rabbit anti rat labelled streptavidin biotin*), SA-HRP, pewarna *Major Hematoxylin* (Ramos, 2005).

4.2.7 Pemeriksaan SOD

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

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel penelitian

Kriteria inklusi hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar*, jenis kelamin jantan berumur 3-4 bulan, dan bobot badan 150-200 gram, kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi oleh Komissis Etik UMM (Lampiran 4). dan belum pernah digunakan penelitian.

Pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$\text{Rumus Federer : } p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

dimana t (jumlah perlakuan) dan n (jumlah ulangan minimal dari tiap perlakuan). Sebelum dilakukan perlakuan pada penelitian ini, hewan uji diaklimatisasikan selama seminggu, diberi pakan standar dan asupan air secara *ad libitum*.

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal empat kali dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 20 ekor. Selanjutnya dibagi dalam lima kelompok yaitu kontrol positif urolithiasis (P1), kontrol positif hiperglikemia dan urolitiasis (P2), perlakuan 1 (P3), perlakuan 2 (P4), perlakuan 3 (P5).

4.3.2 Penetapan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Dosis perasan tangkai dan daun semanggi air yang digunakan merupakan hasil dari perasan ± 120 gram diambil setiap hari dalam keadaan segar dan berwarna hijau muda yang dipanen pada umur ± 3 minggu kemudian diperas dan didapatkan ± 12 ml perasan murni (segar). Kemudian dibuat konsentrasi bertingkat yaitu 20%, 40%, dan 60% dengan cara diencerkan menggunakan *aquadest* dan diberikan sebanyak 2 ml per ekor per hari secara peroral sesuai dengan kelompok perlakuan. Konsentrasi rujukan yang diambil berdasarkan penelitian yang dilakukan Pradana (2013).

4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Hiperglikemia

Pemberian larutan fruktosa 66% dan margarin yang telah dipanaskan sebanyak 1,7 gram selama 15 hari berturut-turut diberikan melalui pakan (Rahmawati, 2015). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.3.4 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 peroral sebanyak 2 ml per ekor per hari. Dosis induksi urolithiasis merujuk pada penelitian Handayani (2016). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan *post test only control*

design. Hewan model dibagi menjadi lima kelompok yang sebelumnya telah diinduksi hiperglikemia selama 15 hari. Lima kelompok perlakuan tersebut yaitu kelompok positif urolithiasis, kelompok positif hiperglikemia dan urolithiasis, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. 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	Perlakuan
P1 (Kontrol Positif Urolithiasis)	Pakan standart dan minum ad libitum + induksi EG 0,75 % dan AK 2 %
P2 (Kontrol Positif Hiperglikemia dan Urolithiasis)	Pakan standart dan minum ad libitum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + induksi EG 0,75 % dan AK 2 %
P3 (Perlakuan 1) Perasan Daun dan Tangkai Semanggi 20%	Pakan standart dan minum ad libitum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 20 % perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75 % dan AK 2 %
P4 (Perlakuan 2) Perasan Daun dan Tangkai Semanggi 40%	Pakan standart dan minum ad libitum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 40 % perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75 % dan AK 2 %
P5 (Perlakuan 3) Perasan Daun dan Tangkai Semanggi 60%	Pakan standart dan minum ad libitum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 60 % perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75 % dan AK 2 %

Keterangan :

EG : Etilen Glikol

AK : Ammonium Klorida

4.3.6 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Dosis perasan daun dan tangkai semanggi air, Kombinasi etilen glikol (0,75 %) dan ammonium klorida (2%), fruktosa 66% dan margarin 1,7 gram.

Variabel tergantung : Ekspresi TNF α dan aktivitas enzim SOD

Variabel kendali : Tikus Putih meliputi strain, kelamin jantan, berat badan, dan umur. Semanggi air meliputi umur tanaman dan asal tanaman.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Persiapan Hewan Coba Tikus

Sebelum digunakan dalam penelitian hewan model diadaptasikan terhadap lingkungan selama tujuh hari. Hewan model diberi minum secara *ad libitum* dan pakan sesuai standart sebanyak 20 g atau 10% berat badan setiap pagi dan sore (Pradana, 2013).

Hewan model dikandangan dalam kandang kelompok. Setiap kandang berisi empat ekor tikus. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang menggunakan sekam yang mudah dibersihkan dan disanitasi, ditempatkan pada suhu ruang (Lina *et al*, 2003).

4.4.2 Pemilihan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Daun dan tangkai semanggi air diperoleh dari UPT. Materia Medica Batu. Daun dan tangkai semanggi segar, berwarna hijau, dan berumur \pm 3 minggu (Pradana, 2013). Daun dan tangkai semanggi air ditimbang sebanyak \pm 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
120 g daun dan tangkai semanggi air diblender	Diperoleh \pm 12 ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 1	Diisi \pm 12 ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 2	Diisi \pm 6 ml perasan dari tabung 1 + 4 ml <i>aquadest</i> (konsentrasi 60%)
Tabung reaksi 3	Diisi \pm 4 ml perasan dari tabung 1 + 6 ml <i>aquadest</i> (konsentrasi 40%)
Tabung reaksi 4	Diisi \pm 2 ml perasan dari tabung 1 + 8 ml <i>aquadest</i> (konsentrasi 20%)

4.4.4 Pemberian perlakuan

Tabel 4.3 Pemberian Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
P1 (Kontrol Urolithiasis)	Pakan standar dan air minum+ induksi EG 0,75 % dan AK 2 %
P2 (Kontrol Positif Hiperglikemia dan Urolithiasis)	Pakan standar dan air minum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + induksi EG 0,75% dan AK 2%
P3 (Perlakuan 1)	Pakan standar dan air minum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 20% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2%
P4 (Perlakuan 2)	Pakan standar dan air minum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 40% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2%
P5 (Perlakuan 3)	Pakan standar dan air minum + larutan fruktosa 66% dan margarin 1,7 g + 60% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi EG 0,75% dan AK 2%

Pemberian bahan induksi hiperglikemia dilakukan selama 15 hari berturut-turut yang dicampurkan pada pakan kemudian pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air bahan induksi urolithiasis dilakukan selama 10 hari secara per oral (PO) menggunakan sonde lambung.

4.4.5 Pengukuran Glukosa Darah

Pengambilan darah diperoleh dengan cara menusukkan bagian ekor hewan coba pada *vena coccygea* menggunakan *blood lancet*. Pengecekan kadar glukosa darah dengan menggunakan glukometer digital. Untuk *glucotest* awal, disiapkan *stick glucometer* dan glukometer digital (*one touch lifescan*) sesuai petunjuk penggunaan. Darah dari ekor diteteskan pada *stick glucometer* dan ditunggu hasil yang tertera pada layar glukometer digital (Akiles, 2012). Proses pengecekan kadar glukosa dilakukan setelah pemberian larutan fruktosa dan margarin (kadar glukosa darah melebihi darah normal tikus yaitu ≥ 105 mg/dL, tikus dinyatakan hiperglikemia).

4.4.6 Pengambilan Sampel Urin

Pengambilan sampel urin dilakukan pada hari ke-11 setelah pemberian semanggi air dan bahan induksi urolithiasis. Tikus dimasukkan ke dalam kandang metabolik untuk menampung urin selama 24 jam. Setiap tampungan urin yang diperoleh dimasukkan ke dalam pot urin berukuran 5 ml dan disimpan kedalam *ice box*. Urin yang diperlukan minimal 2 ml untuk dapat dilakukan pengujian (Pradana, 2013).

4.4.7 Pemeriksaan

a. Pemeriksaan berat jenis urin

Pemeriksaan urin menggunakan *Urine Analyzer* (Sacher *et al*, 2002):

1. Masing-masing sampel urin yang diperoleh dimasukkan ke dalam gelas beker untuk melihat volume urin
2. Urin sebanyak 1 ml diteteskan pada strip uji
3. Strip uji ditempatkan pada baki geser *urine analyzer*
4. Ditunggu selama 55-65 detik
5. Hasil pemeriksaan berat jenis urin tertera pada *print out urine analyzer* (*output* berbentuk semikuantitatif)

b. Pemeriksaan Sedimen Urin

Tahapan pemeriksaan sedimen urin kalsium oksalat menurut Chew dan DiBartola (2004) sebagai berikut:

1. Sebanyak 0,5-1,0 ml sampel urin diambil menggunakan pipet tetes dan diletakkan di atas gelas obyek dan ditutup dengan kaca penutup.
2. Pemeriksaan sedimen kalsium oksalat menggunakan mikroskop dengan lensa obyektif kecil (10x) dilanjutkan dengan lensa obyektif besar (40x).
3. Pengamatan atau determinasi sedimen urin berdasarkan gambar yang mengacu pada textbook *Small Animal Clinical Nutrition 5th ed.*

4.4.8 Pengambilan Sampel Serum Darah

Hari ke-11 setelah pemberian perasan semanggi air dan bahan induksi urolithiasis semua tikus dieuthanasi melalui dislokasi pada leher, kemudian diambil darahnya sebanyak ± 2 ml melalui jantung (*intracardial*) 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 *appendorf* lalu dilakukan pengamatan dan pengukuran kadar SOD (Pradana, 2013).

4.4.9 Pengambilan Sampel Organ Ginjal

Hari ke-11 setelah pemberian perasan semanggi air dan bahan induksi urolithiasis semua tikus dieuthanasi melalui dislokasi pada leher, kemudian abdomen dibedah untuk mengambil organ ginjal. Organ ginjal disimpan pada larutan PFA 4% untuk pembuatan preparat IHK.

4.4.10 Pengukuran Aktivitas SOD Darah

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 *appendorf*. Sampel serum sebanyak 100 μ l dimasukkan dalam tabung reaksi kecil, ditambah 100 μ l *xantine*, 100 μ l *xantine oxidase* kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, ditambah 1600 μ l NBT kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Mulut tabung ditutup dengan plastik *warp* 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 absorpsinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang (580 nm) (Pradana, 2013).

4.4.11 Pengukuran Ekspresi TNF α

Organ difiksasi dengan cara direndam dalam PFA 4% kemudian didehidrasi dengan alkohol dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95%, dan etanol absolut selama 20 menit. Organ dijernihkan dalam larutan *xylol* I selama 20 menit dan *xylol* II selama 30 menit. Infiltrasi dan *embedding* jaringan dengan parafin cair kemudian *trimming*. Sediaan jaringan disimpan dalam inkubator suhu 38-40C selama 24 jam.

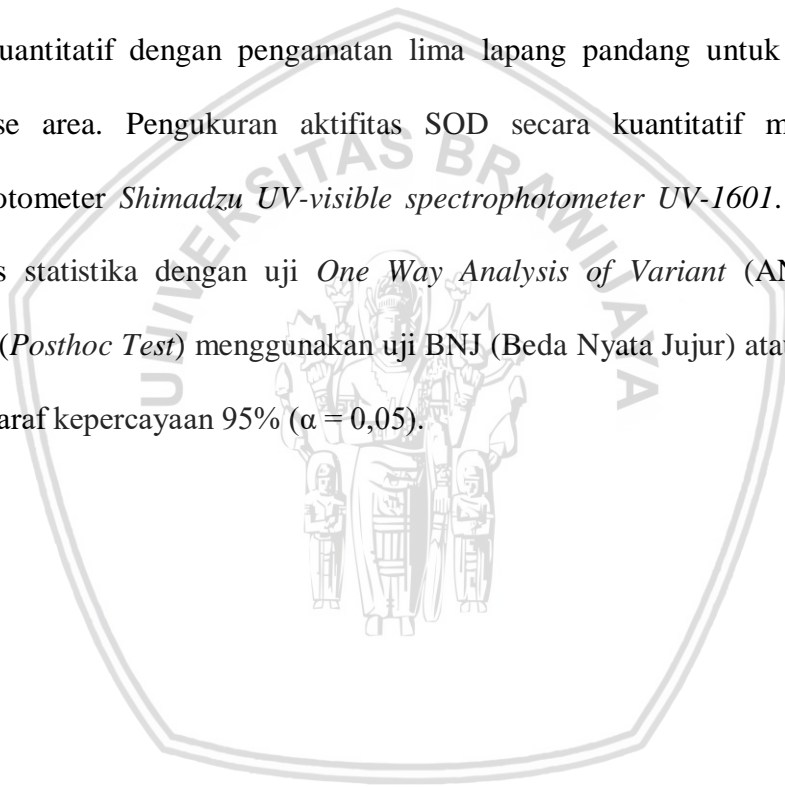
Preparat dideparafinasi dengan larutan *xylol* 2 kali, etanol 70%, alkohol 30%, dan aquades steril selama 2 menit, kemudian disimpan selama 24 jam suhu 40C. Cuci preparat dalam PBS pH 7,4, kemudian direndam dalam H₂O₂ 3% selama 10 menit (dalam PBS) dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4, lalu direndam dalam BSA 1% (dalam PBS) selama 1 jam suhu ruang (Ramos, 2005).

Preparat ditetesi dengan antibodi primer, anti rat TNF α (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi suhu 40C selama 24 jam. Preparat dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan 30 menit, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Preparat ditambahkan antibodi sekunder, *rabbit anti rat labelled streptavidin biotin* dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Preparat ditambahkan SA-HRP dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Kemudian ditambahkan kromogen DAB selama 20 menit suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Preparat dilakukan counter staining dengan pewarna *Major Hematoxylin* lalu dibilas dan

dibiarkan semalam. Preparat di *mounting* dengan entelan dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400X (Ramos, 2005).

4.4.12 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data penelitian berupa hasil pembuatan imunohistokimia TNF α organ ginjal diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x untuk melihat ekspresi TNF α secara kuantitatif dengan pengamatan lima lapang pandang untuk mengetahui presentase area. Pengukuran aktifitas SOD secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*. 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% ($\alpha = 0,05$).

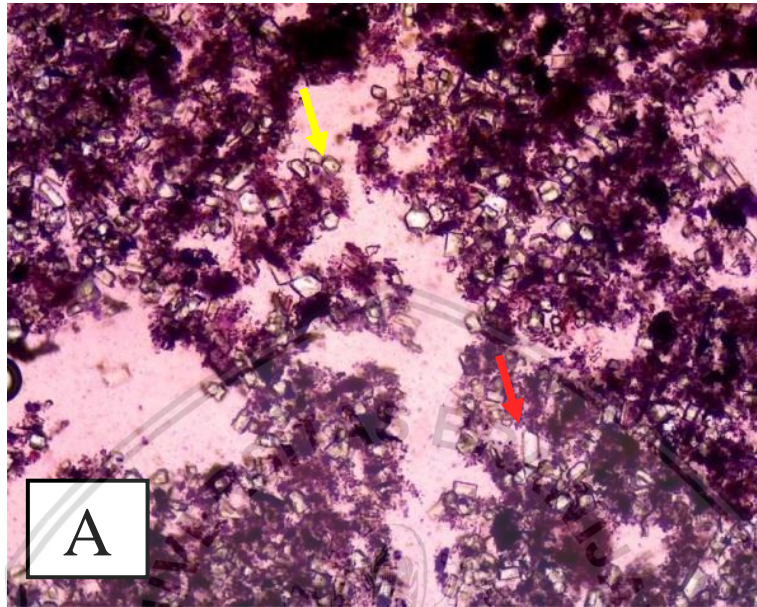


BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

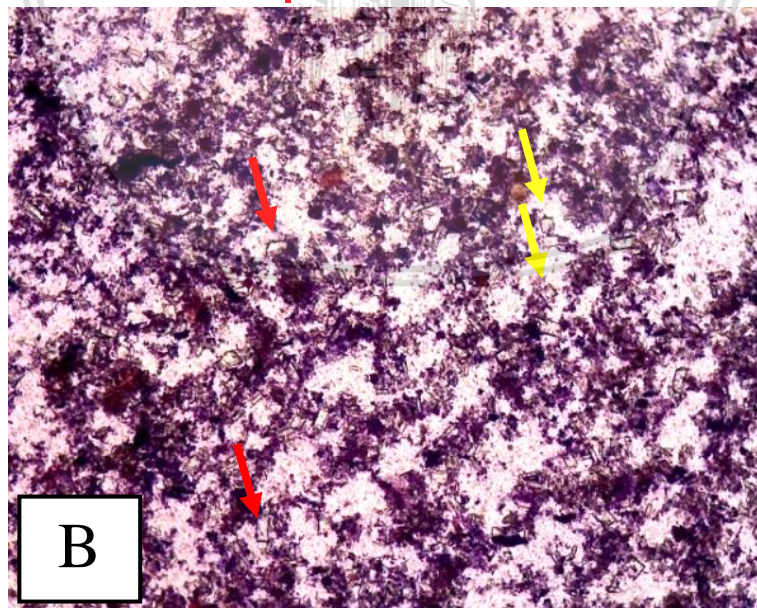
Pada penelitian ini dilakukan pengujian Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) organ ginjal dan aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada tikus putih *Rattus norvegicus* yang diinduksi penyakit hiperglikemia selama 15 hari, kemudian diinduksi urolithiasis dan perasan daun dan tangkai semanggi air (*Marsilea crenata*) selama 10 hari. Pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air digunakan sebagai antihiperglikemia, antiinflamasi, antioksidan dan pelarut kristal dalam mencegah urolithiasis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah mengalami hiperglikemia melalui variabel ekspresi TNF α dan aktivitas SOD.

Pengecekan kadar glukosa darah dengan menggunakan glukometer digital. Menurut Fahri *et al* (2005) tikus mengalami hiperglikemia jika konsentrasi glukosa darah menunjukkan angka ≥ 105 mg/dL, sementara kadar glukosa darah pada semua kelompok perlakuan menunjukkan angka rata-rata 141 mg/dL yang berarti tikus putih mengalami hiperglikemia. Data hasil pengukuran kadar glukosa darah dapat dilihat pada lampiran 7. Pemeriksaan sedimen urin menggunakan mikroskop ditunjukkan pada gambar 5. Dari hasil pengamatan sedimen pada kelompok urolithiasis ditemukan kristal berupa kalsium oksalat dan struvit dalam jumlah yang banyak (gambar 5. A), pada kelompok hiperglikemia dan urolithiasis terjadi peningkatan jumlah kristal berupa kalsium oksalat dan struvit daripada kelompok urolithiasis (gambar 5. B), pada kelompok perlakuan hiperglikemia dan

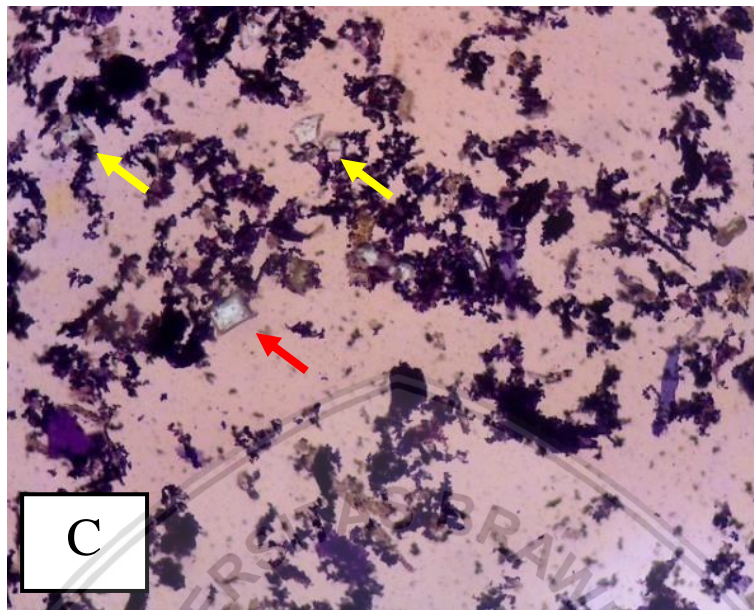
urolithiasis dengan pemberian semanggi air 20%, 40% dan 60 % terjadi penurunan jumlah kristal kalsium oksalat dan struvit (gambar 5 C, D, E).



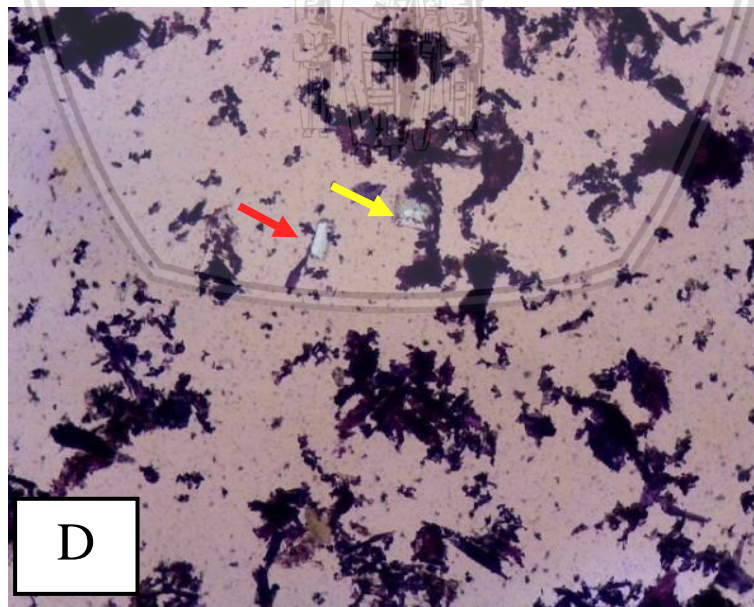
Gambar 5.A Hasil pengamatan sedimen kristal urin kelompok (P1) kontrol positif urolithiasis. Terdapat banyaknya jumlah kristal kalsium oksalat dan struvit. Tanda panah pada gambar (↑) menunjukkan adanya kristal berupa kalsium oksalat, (↑) menunjukkan kristal struvit. Perbesaran 400X.



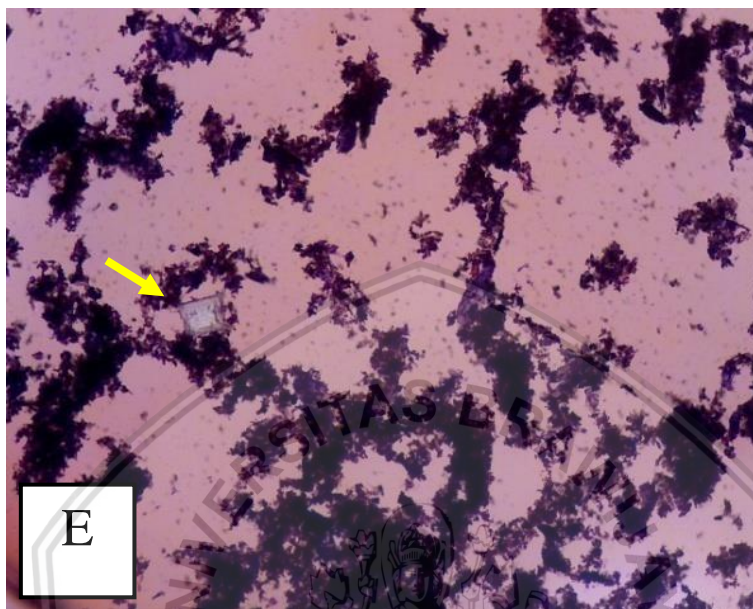
Gambar 5.B Hasil pengamatan sedimen kristal urin kelompok (P2) kontrol positif hiperglikemia dan urolithiasis. Jumlah kristal kalsium oksalat dan struvit semakin banyak. Tanda panah pada gambar (↑) menunjukkan adanya kristal berupa kalsium oksalat, (↑) menunjukkan kristal struvit. Perbesaran 400X.



Gambar 5.C Hasil pengamatan sedimen kristal urin kelompok (P3) kontrol positif hiperglikemia dan perasan semangi air (20%) serta urolithiasis. Penurunan jumlah kristal kalsium oksalat dan struvit. Tanda panah pada gambar (↑) menunjukkan adanya kristal berupa kalsium oksalat, (↑) menunjukkan kristal struvit. Perbesaran 400X.



Gambar 5.D Hasil pengamatan sedimen kristal urin kelompok (P4) kontrol positif hiperglikemia dan perasan semangi air (40%) serta urolithiasis. Jumlah kristal kalsium oksalat dan struvit semakin sedikit. Tanda panah pada gambar (↑) menunjukkan adanya kristal berupa kalsium oksalat, (↑) menunjukkan kristal struvit. Perbesaran 400X.



Gambar 5.E Hasil pengamatan sedimen kristal urin kelompok (P5) kontrol positif hiperglikemia dan perasan semanggi air (60%) serta urolithiasis. Terdapat kristal kalsium oksalat yang memiliki jumlah semakin sedikit. Tanda panah pada gambar (↑) menunjukkan adanya kristal berupa kalsium oksalat. Perbesaran 400X.

Hasil pengamatan sedimen kristal urin menunjukkan pada gambar 5.b terjadi peningkatan jumlah kristal urin daripada gambar 5.a hal ini karena tingginya jumlah kristal yang terbentuk akibat induksi hiperglikemia akan meningkatkan jumlah glukosa yang melebihi kapasitas tubulus ginjal untuk mereabsorbsinya maka sebagian glukosa akan terlarut dalam saluran urin dan dapat mengendap sehingga urin yang dikeluarkan semakin banyak. Selain itu induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% akan dimetabolisme dihati menjadi empat senyawa organik yaitu glikoaldehid, asam glikolat, asam glioksilat dan asam oksalat (Wientarsih *et al*, 2012). Pemberian etilen glikol dapat menghasilkan

senyawa metabolit oksalat yang akan berikatan dengan kalsium dalam darah membentuk kristal kalsium oksalat (CaOx) yang dapat terakumulasi di ginjal menyebabkan kalsium tidak dapat direabsorpsi. Senyawa amonium klorida berperan sebagai katalisator untuk mempercepat terbentuknya kristal kalsium oksalat. Menurut Cruzan *et al* (2004), terbentuknya kristal pada lumen tubulus ginjal menyebabkan fungsi ginjal menjadi terganggu. Selain ditemukan kristal kalsium oksalat, tampak ditemukannya kristal struvit pada beberapa kelompok perlakuan. Kristal struvit dengan jumlah tertentu akan ditemukan pada setiap urin hewan merupakan hasil metabolisme normal zat-zat sampah didalam tubuh (Susilawati *et al*, 2003). Kristal asam urat dan sistin tidak ditemukan dalam pemeriksaan urin. Hal ini dikarenakan kristal asam urat hanya ditemukan pada urin yang memiliki pH asam (Becker, 2007), dan kristal sistin hanya terbentuk pada hewan yang memiliki kelainan resesif autosomal (Orson, 2006).

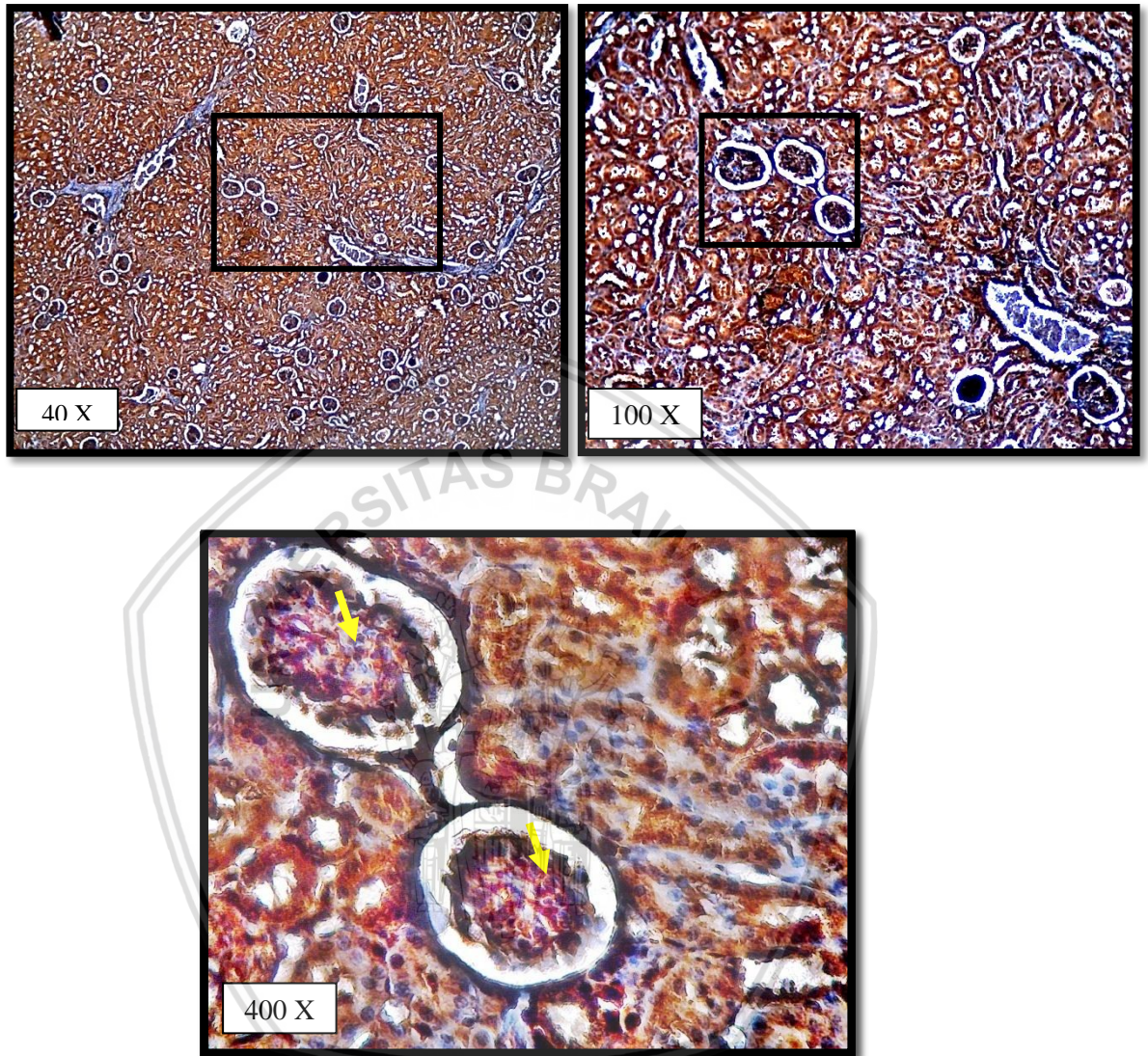
Penurunan jumlah kristal kalsium oksalat pada kelompok P3, P4 dan P5 menunjukkan bahwa perasan daun dan tangkai semanggi dapat mengurangi terbentuknya kristal dalam urin. Hal ini disebabkan perasan daun dan tangkai semanggi air mengandung kalium dan flavonoid. Kalium yang mengandung ion K^+ dan Na^+ yang cukup tinggi dapat menjaga keseimbangan elektrolit pada ginjal. Selain ion K^+ kandungan flavonoid dapat menurunkan jumlah kristal kalsium oksalat dalam urin (Hidayati *et al*, 2009). Kristal kalsium oksalat dapat membentuk senyawa kompleks dengan gugus $-\text{OH}$ dari flavonoid sehingga membentuk Ca -flavonoid. Senyawa kompleks ini lebih mudah larut dalam air, sehingga air yang ada dalam urin akan membantu kelarutan kristal. Aktifitas

diuretik dari flavonoid juga dapat membantu pengeluaran kristal kalsium oksalat dari dalam ginjal (Suharjo dan Cahyono, 2009).

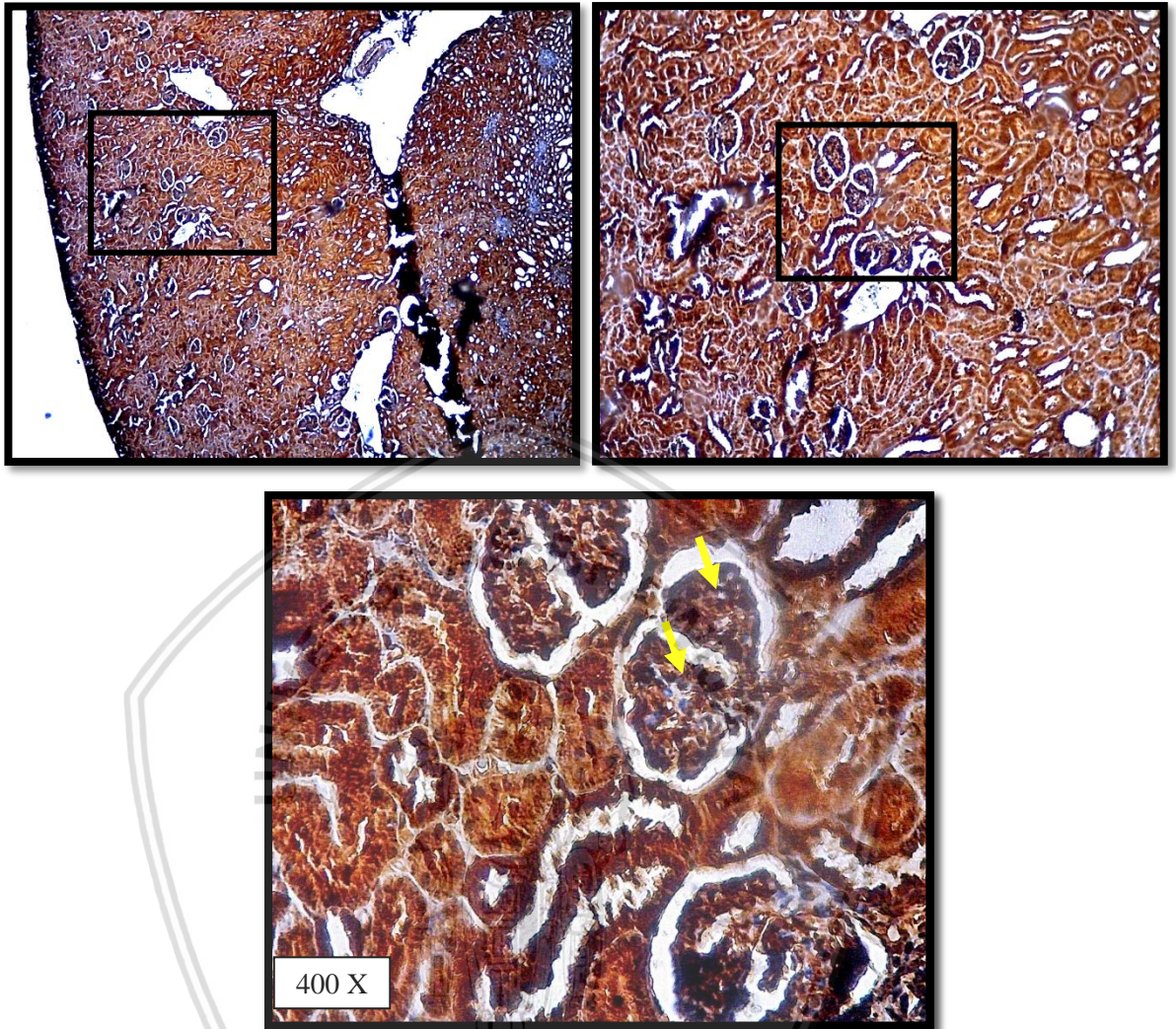
Hasil pengamatan pada variabel ekspresi TNF α dan aktivitas SOD adalah sebagai berikut:

5.1 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) Organ Ginjal.

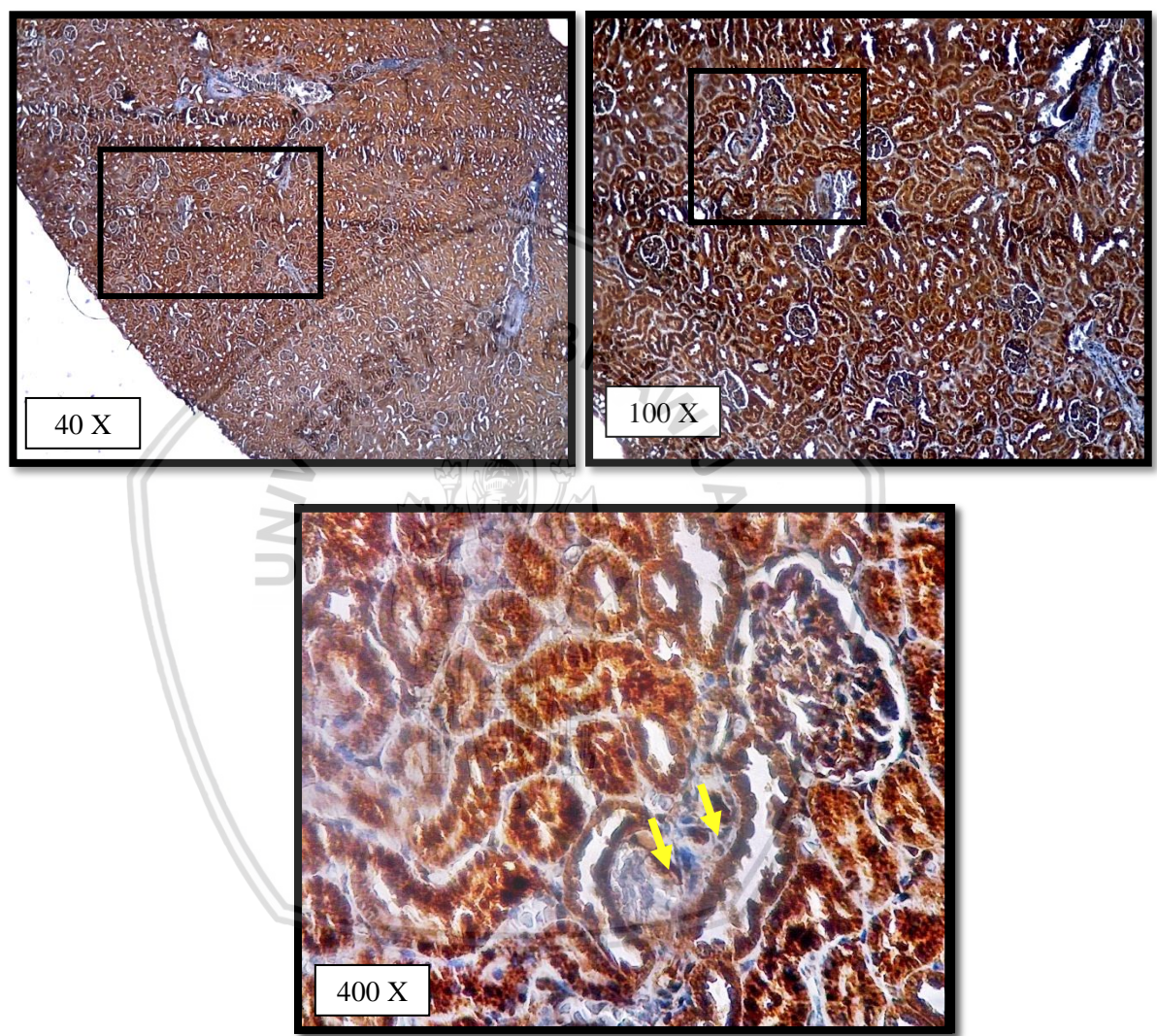
Proses inflamasi di dalam sel akan menyebabkan teraktifasinya makrofag yang akan memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi salah satunya TNF α . Ekspresi TNF α merupakan indikator utama dalam proses inflamasi akut dan terutama dihasilkan oleh fagosit mononuklear yang teraktifasi keberadaan TNF α pada jaringan ginjal dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode imunohistokimia (Suryani, 2013). Ekspresi TNF α ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada jaringan ginjal seperti pada bagian glomerulus ginjal pada Gambar 5.1. Warna coklat pada preparat disebabkan karena adanya ikatan antara antigen TNF α pada ginjal dengan antibodi primer (*anti rat TNF α*) yang dilabel dengan antibodi sekunder (*Rabbit anti rat labelled biotin*) yang kemudian ditambahkan dengan substrat *diamino benzidine* (DAB). Pengamatan jaringan ginjal menggunakan bantuan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X.



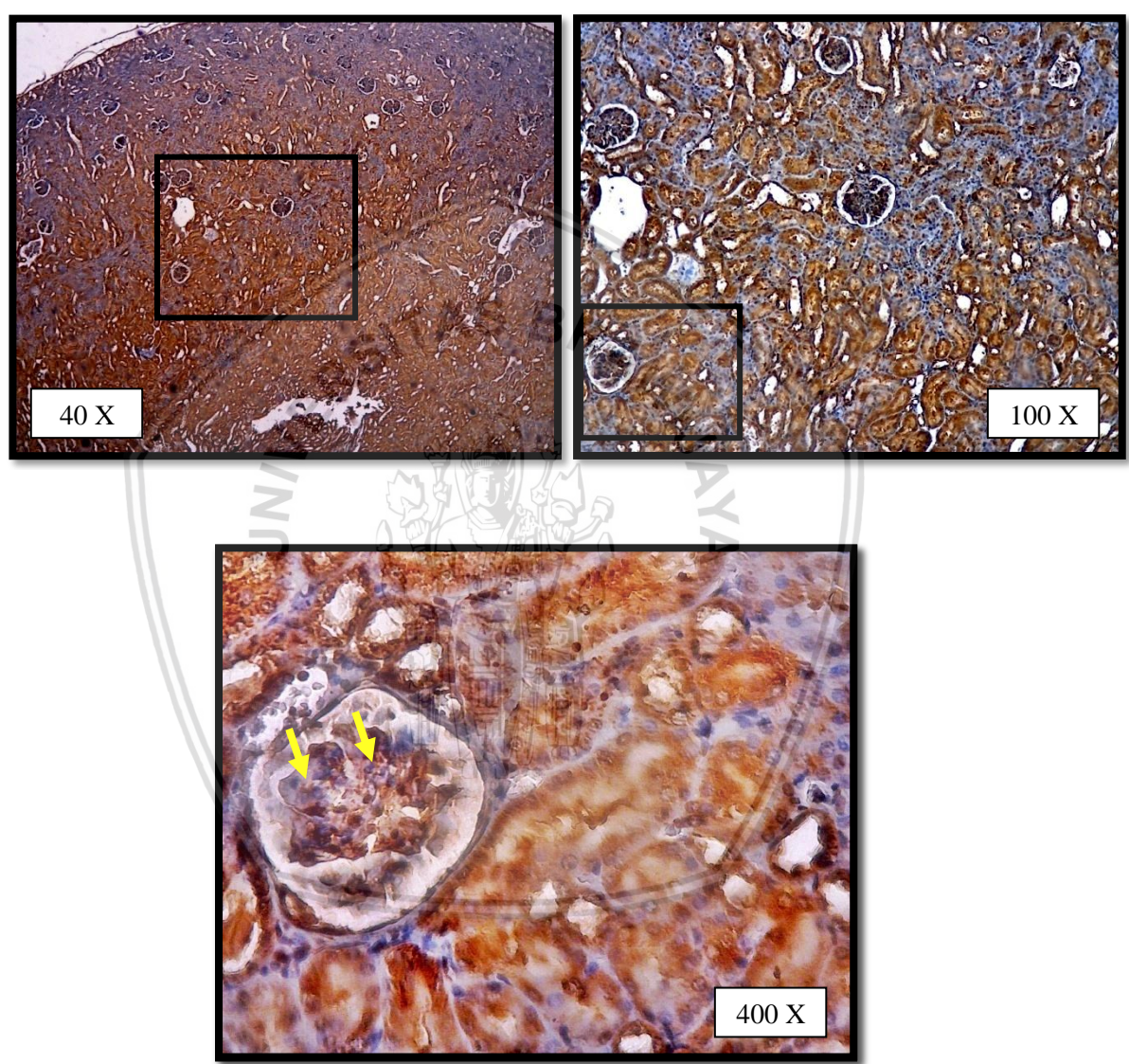
Gambar 5.1 a. Kontrol positif urolithiasis (P1) yang diinduksi dengan 0,75% etilen glikol dan 2% amonium klorida selama 10 hari. Terdapat ekspresi TNF α dengan inti sel dan permukaan membran berwarna coklat. Sel yang mengekspresikan makrofag ().



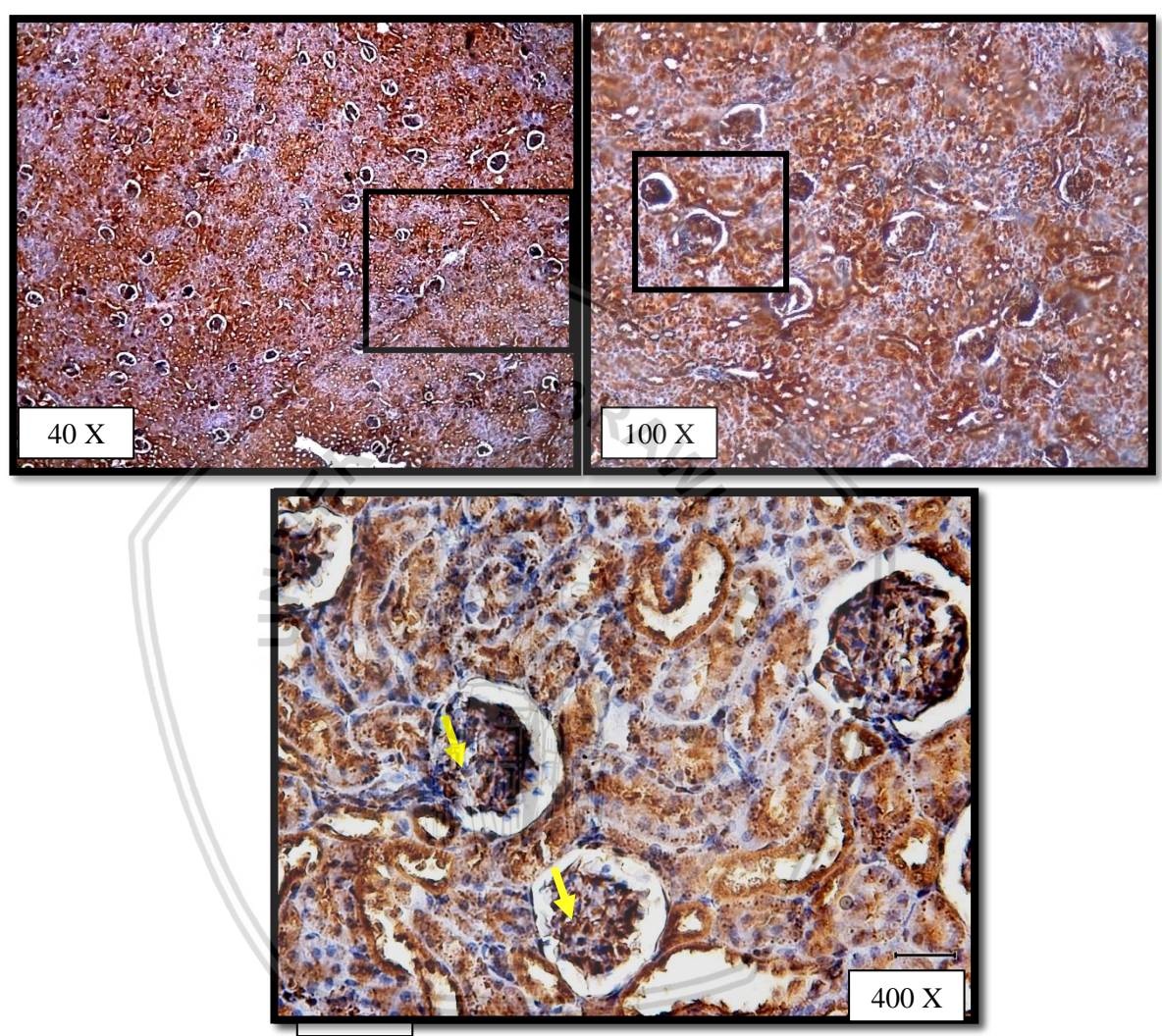
Gambar 5.1 b. Kontrol positif urolithiasis dan hiperglikemia (P2) yang diinduksi dengan 66% fruktosa dan 1,7 gram margarin selama 15 hari dan induksi urolithiasis. Terdapat ekspresi $\text{TNF}\alpha$ dalam jumlah banyak yang dapat diamati dengan inti sel dan permukaan membran berwarna coklat. Sel yang mengekspresikan makrofag ().



Gambar 5.1 c. Perlakuan 20% (P3) yang diinduksi hiperglikemia dan perasan daun dan tangkai semanggi air 20% serta induksi urolithiasis. Terdapat sedikit penurunan ekspresi TNF α dengan sebagian inti sel berwarna biru. Sel yang mengekspresikan makrofag ().



Gambar 5.1 d. Perlakuan 40% (P4) yang diinduksi hiperglikemia dan perasan daun dan tangkai semanggi air 40% serta induksi urolithiasis. Terdapat ekspresi TNF α berkurang lebih banyak dengan inti semakin banyak berwarna biru. Sel yang mengekspresikan makrofag ().



Gambar 5.1 e. Perlakuan 60% (P5) yang diinduksi hiperglikemia dan perasan daun dan tangkai semangi air 60% serta induksi urolithiasis. Terdapat sel ekspresi TNF α semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel berwarna biru. Sel yang mengekspresikan makrofag ().

Ekspresi TNF α yang dihasilkan oleh makrofag pada preparat ginjal tikus positif urolithiasis menunjukkan adanya ekspresi berwarna coklat yang banyak (Gambar 5.1a). Pada preparat ginjal tikus positif hiperglikemia dan urolithiasis memiliki

intensitas yang kuat ekspresi berwarna coklat ditemukan paling banyak (Gambar 5.1b). Adanya intensitas yang kuat karena terdapat proses inflamasi akibat induksi hiperglikemia dan urolithiasis. Kondisi inflamasi ini diinisiasi oleh adanya sitokin proinflamatori yang dihasilkan oleh makrofag. Selain menginduksi produksi sitokin proinflamatori makrofag juga dapat membentuk senyawa oksigen reaktif (ROS). Aktivitas ROS dapat menyebabkan peroksida lipid dan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif yang terjadi pada jaringan ginjal menghasilkan radikal bebas dalam jumlah banyak (Mahdi, 2012). Ekspresi TNF α pada preparat ginjal tikus pemberian induksi hiperglikemia dan perasan daun dan tangkai semanggi air dengan konsentrasi 20%, 40% dan 60% serta induksi urolithiasis menunjukkan penurunan intensitas ekspresi berwarna coklat dengan penurunan paling rendah pada konsentrasi 20% (Gambar 5.1c), kemudian penurunan sedikit meningkat pada konsentrasi 40% (Gambar 5.1 d) dan penurunan paling banyak pada konsentrasi 60% dengan intensitas yang lemah (Gambar 5.1e). Penurunan intensitas ekspresi TNF α karena pemberian daun dan tangkai semanggi air yang mengandung flavonoid berfungsi sebagai antioksidan yaitu substansi yang diperlukan tubuh untuk menangkal radikal bebas dengan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi elektron yang tidak berpasangan, sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid yang menimbulkan stres oksidatif (Astuti, 2008). Jumlah tinggi dan rendahnya ekspresi TNF α dihitung menggunakan aplikasi immunoratio melalui presentasi area sehingga diperoleh nilai rata-rata pada setiap kelompok (Tabel 5.1).

Hasil yang didapatkan kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui data tersebut normal dan homogen. Dari uji tersebut didapatkan bahwa data normal dan homogen (Lampiran 5). Hasil analisa statistika dengan *one way Anova* didapatkan $p < 0,05$ yang berarti memenuhi kriteria sehingga dikatakan data-data dari kelima kelompok tersebut memiliki perbedaan yang signifikan, selanjutnya dilakukan *uji tukey* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok perlakuan yang dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut :

Tabel 5.1 Rata-rata ekspresi TNF α ginjal tikus putih dan hasil tukey $\alpha : 0,05$

Kelompok	Rata-rata ekspresi TNF α
P1	94,28 \pm 2,88 ^{cd}
P2	97,28 \pm 1,70 ^d
P3	90,55 \pm 4,30 ^{bc}
P4	84,78 \pm 2,32 ^{ab}
P5	84,03 \pm 2,65 ^a

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan. P1=kontrol positif urolithiasis; P2=positif hiperglikemia dan urolithiasis; P3= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 20%; P4= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 40%; P5= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 60%.

Hasil *one way ANOVA* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara setiap kelompok (lampiran 5), rata-rata ekspresi TNF α pada Tabel 5.1 memiliki nilai besar dengan ditandai ada banyaknya ekspresi warna coklat yang ditunjukkan pada gambar 5.1. Timbulnya warna coklat disebabkan dalam proses pewarnaan Imunohistokimia (IHK) antigen dalam ginjal berikatan dengan antibodi primer (*Rat Anti TNF- α*) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*Rabbit anti rat labelled streptavidin biotin*), setelah semua berikatan dilakukan penambahan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) yang bertujuan untuk menghasilkan warna coklat pada sitokin (TNF α) (Wulandari, 2012).

Berdasarkan Tabel 5.1 menunjukkan kontrol positif urolithiasis (P1) memiliki nilai rata-rata ekspresi TNF α sebesar $94,28 \pm 2,88$ lebih rendah daripada dengan kontrol positif hiperglikemia dan urolithiasis (P2) sebesar $97,28 \pm 1,70$. Induksi hiperglikemia dengan larutan fruktosa dan margarin dapat menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah, induksi urolithiasis dengan etilen glikol dan ammonium klorida dapat menyebabkan kristalisasi urin pada saluran urin.

Adanya kondisi hiperglikemia yang berkepanjangan akan meningkatkan ROS dan menyebabkan oksidan dibentuk secara berlebihan dan dapat menyebabkan aktivasi PARP melalui pemecahan DNA. Aktivasi PARP ini akan berakibat inhibisi terhadap GAPDH dan mengakibatkan peningkatan jalur poliol dan heksosamin. Peningkatan jalur tersebut dapat menyebabkan peningkatan glikasi non enzimatis, produksi AGEs yang berlebihan, stres oksidatif, dan sintesis *diacylglycerol* (DAG), yang nantinya akan mengaktifkan *protein kinase C* (PKC). PKC yang teraktivasi ini akan mengaktifkan NF κ B untuk menstimulasi gen pro-inflamasi untuk mengeluarkan mediator inflamasi, seperti TNF α (Lalla, 2001). Akumulasi AGEs, dimana dengan adanya AGEs yang terakumulasi akan menyebabkan sel endotel dan monosit lebih mudah untuk terstimuli, yang akan membuat sel-sel tersebut memproduksi mediator inflamasi dalam jumlah yang banyak.

Kerusakan sel mengaktifasi pelepasan mediator inflamasi yang memicu aktivasi platelet sehingga terjadi dilatasi pembuluh darah dan peningkatan permeabilitas. Terjadinya luka pada jaringan dan peningkatan permeabilitas akan memicu pengerahan monosit ke bagian yang mengalami luka dan berdiferensiasi

menjadi makrofag. Aktivasi makrofag menghasilkan α radikal bebas dan sitokin proinflamasi TNF α dan IL1 yang menstimulasi inflamasi (Boyer *et al*, 2000), sehingga ekspresi TNF α pada jaringan meningkat. Sebagai respon inflamasi, sitokin akan menginduksi pembentukan fibroblas yang menginduksi pembentukan epitel mesenkimal transisi (EMT) yang memproduksi matriks ekstraseluler. Penumpukan matriks ekstraseluler yang mengandung berbagai komponen seperti kolagen dan fibronektin menyebabkan terbentuknya jaringan fibrosa pada ginjal (Liu, 2011).

Pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air sebagai preventif urolithiasis pada tikus putih model hiperglikemia dapat menurunkan ekspresi TNF α . Berdasarkan data yang diamati (Tabel 5.1), pada kelompok P3,P4 dan P5 jumlah ekspresi TNF α mengalami penurunan. Besarnya presentase penurunan dihitung berdasarkan presentase area TNF α kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Ekspresi TNF α pada kelompok P3 menunjukkan nilai rata-rata sebesar $90,55 \pm 4,30$, P4 sebesar $84,78 \pm 2,32$ dan P5 sebesar $84,03 \pm 2,65$. Nilai rata-rata ekspresi TNF α kelompok P5 lebih rendah daripada kelompok perlakuan lain. Kelompok P5 memiliki nilai rata-rata yang rendah dari pada kelompok perlakuan yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok P5 dengan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air 60% memberikan efek paling baik untuk prevensi urolithiasis.

Pengaruh pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air terhadap urolithiasis dengan tikus putih model hiperglikemia yang ditunjukkan dengan penurunan ekspresi TNF α , disebabkan karena semanggi air mengandung

flavonoid yang bersifat antiradikal sehingga mampu menekan jumlah radikal bebas dengan mengikat radikal bebas menjadi senyawa inaktif, sehingga dapat menekan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan (Djati *et al*, 2010).

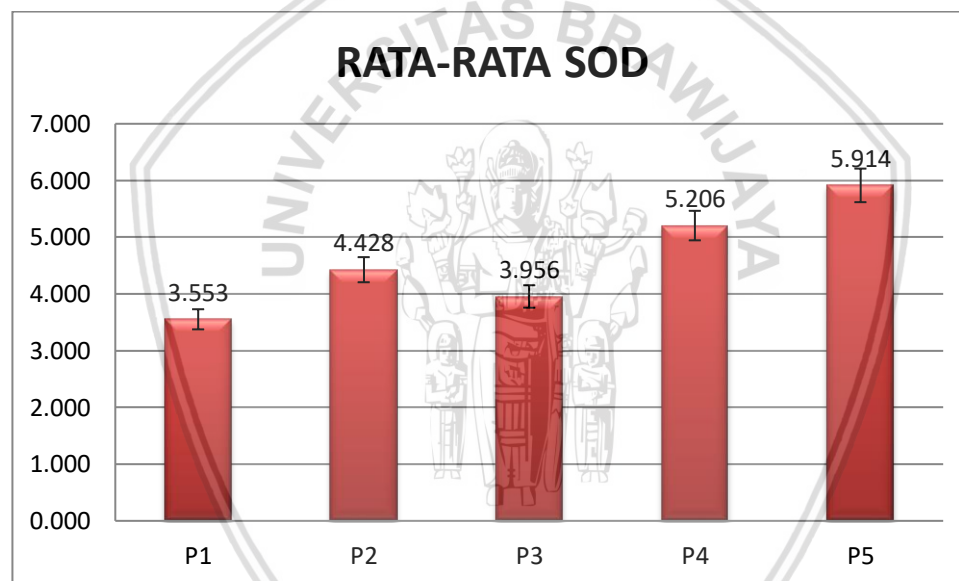
Flavonoid diketahui mampu berperan menangkap radikal bebas atau berfungsi sebagai antioksidan alami. Aktivitas antioksidan tersebut memungkinkan flavonoid untuk menangkap atau menentralkan radikal bebas (seperti ROS) terkait dengan gugus OH fenolik sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak dengan kata lain proses inflamasi dapat terhambat (Lugasi *et al*, 2003). Mekanisme kerja antioksidan flavonoid dengan cara menekan pembentukan radikal bebas, yaitu melalui penghambatan enzim, pengkelatan ion logam (metal ion chelating) yang terlibat dalam produksi radikal bebas serta meredam radikal bebas yang telah terbentuk. Menambahkan bahwa flavonoid dapat menghambat kerja enzim pembentuk radikal bebas (Sari *et al*, 2014).

Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi adalah dengan menurunkan stimulus inflamasi sehingga IKK kompleks yang terdiri dari IKK α , IKK β , dan IKK γ tidak melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK α . Tidak lepasnya IKK α dari struktur IKK kompleks mengakibatkan menurunnya fosforilasi IKK α menjadi I κ B. Adanya penurunan fosforilasi IKK α menyebabkan I κ B tidak mengalami degradasi proteosomal dan menurunnya aktivasi NF- κ B untuk melakukan transkripsi di nukelus. Selain itu, menurunnya aktivasi NF- κ B juga dipengaruhi oleh efek inhibisi monosit terhadap enzim *protein tyrosin kinase* (PTK) p56 yang mengakibatkan PTK tidak aktif (Yilmaz, *et al.*, 2011). Tidak teraktivasinya PTK menyebabkan faktor transkripsi NF- κ B tetap berikatan

dengan inhibitor NF-kB sehingga NF-kB tidak dapat menduduki respon elemen yang seharusnya dapat memicu transkripsi dan translasi dari sitokin proinflamasi TNF- α yang disekresi oleh makrofag (Abbas and Lichtman, 2004).

5.2 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Aktivitas SOD

Berdasar hasil uji Aktivitas SOD dengan metode spektrofotometri (spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang (580 nm)) didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 5.2 Grafik rata-rata aktivitas SOD tikus putih

Keterangan: P1=kontrol positif urolithiasis; P2= positif hiperglikemia dan urolithiasis; P3= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 20%; P4= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 40%; P5= positif hiperglikemia dan urolithiasis, serta perasan 60%.

Berdasarkan Gambar 5.2 dapat dilihat bahwa nilai aktivitas kelompok kontrol positif hiperglikemia dan urolithiasis (P2) lebih tinggi daripada kelompok kontrol urolithiasis (P1), seharusnya P2 lebih rendah daripada P1 karena adanya hiperglikemia dan urolithiasis yang diinduksikan pada tikus menyebabkan tingkat stres oksidatif sangat meningkat sehingga menyebabkan aktivasi SOD menurun.

Sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberikan perasan daun dan tangkai semanggi mengalami peningkatan pada setiap konsentrasi. Kenaikan paling tinggi yaitu pada kelompok P5 dengan konsentrasi 60%. Hal ini karena semanggi air mengandung kalium dan flavonoid. Kalium berfungsi sebagai diuretik dan flavonoid sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Sari *et al*, 2014).

Hasil yang didapatkan kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui data tersebut normal dan homogen. Dari uji tersebut data yang diperoleh menunjukkan data normal dan homogen (Lampiran 6), kemudian dilakukan uji *one way* ANOVA dan didapatkan hasil bahwa pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air pada tikus putih model urolithiasis penderita hiperglikemia dapat meningkatkan aktivitas SOD secara signifikan ($p < 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *tukey* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok perlakuan yang dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut :

Tabel 5.2 Rata-rata aktivitas SOD dan hasil tukey $\alpha : 0,05$

Kelompok Perlakuan	N Pengulangan	Rata-rata SOD \pm SD (u/ml)		
P1	4	3,552	\pm	0,70 ^a
P2	4	4,428	\pm	0,69 ^{ab}
P3	4	3,956	\pm	1,32 ^a
P4	4	5,206	\pm	0,13 ^{ab}
P5	4	5,914	\pm	0,88 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Rata-rata nilai aktivitas SOD pada kelompok P1 adalah $3,55278 \pm 0,701813$. Nilai tersebut menunjukkan standar aktivitas SOD tikus putih dalam keadaan menderita urolithiasis yang ditunjukkan pada Tabel 5.2 kelompok P2 (positif hiperglikemia dan urolithiasis) apabila dibandingkan dengan kelompok P1, terlihat bahwa nilai rata-rata aktivitas SOD mengalami peningkatan. Seharusnya

kelompok P2 mengalami penurunan, hal ini dikarenakan tingkat stres yang dialami kelompok lebih rendah daripada kelompok P1. Dibandingkan dengan P2 (kelompok positif), P3 (pemberian semanggi 20%) memiliki nilai rata-rata aktivitas SOD lebih rendah. Hal ini dikarenakan adanya induksi hiperglikemia dan urolithiasis yang menyebabkan tingkat stres oksidatif sangat meningkat sehingga menyebabkan aktivasi SOD menurun. Superoksida dismutase merupakan antioksidan enzimatis yang berfungsi mengubah superoksida menjadi hidrogen peroksida. Penurunan aktivitas SOD terjadi karena meningkatnya laju peroksidasi lipid yang berkontribusi dalam produksi radikal bebas sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Rahmawati, *et al* 2014). Superoksida dismutase adalah salah satu enzim yang berperan sebagai antioksidan dalam tubuh. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran tingkat stres oksidatif dalam tubuh (Pavani *et al*, 2012). Keadaan stress oksidatif yang terjadi secara terus menerus akan menyebabkan terjadinya penekanan aktivitas antioksidan endogen salah satunya aktivitas SOD (Werdhasari, 2014). Kondisi stress oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid membrane sel, yaitu electron bebas senyawa radikal akan berikatan dengan elektron makromolekul yang berada di sekitar lipid membrane sel. Peroksidasi lipid yang terjadi secara terus menerus akan menyebabkan rusaknya struktur membrane sel dan hilangnya fungsi seluler secara total.

Stres oksidatif yang terjadi menyebabkan peningkatan laju peroksidasi lipid yang berkontribusi dalam produksi radikal bebas, termasuk terbentuknya anion superoksida, sehingga menyebabkan modifikasi oksidatif yang mengakibatkan terinaktivasinya SOD. Peroksidasi lipid adalah peristiwa teroksidasinya lipid yang

berlangsung secara cepat (Pasaoglu *et al*, 2004). Lipid yang teroksidasi merupakan bagian fosfolipid membran sel β pankreas pada penderita diabetes sehingga mempengaruhi kestabilan strukturnya. Demikian pula fungsi vital sel sebagai penyedia hormon insulin turut terganggu, karena peroksidasi lipid menyebabkan peningkatan permeabilitas membran sel. Produksi hormon insulin menjadi berkurang, demikian pula fungsinya, sehingga tidak mampu mengarahkan pemasukan glukosa ke jaringan. Kondisi tersebut menyebabkan kadar glukosa dalam darah menjadi tinggi, yang berkontribusi dalam penurunan aktivitas SOD (Robertson *et al*, 2004), dengan cara membangkitkan metabolisme glukosa alternatif dan menghasilkan radikal bebas lebih banyak. Dengan demikian pemberian perasan semanggi air 20% belum efektif dalam meningkatkan aktivitas SOD pada tikus putih.

Kelompok perlakuan P3, P4, dan P5 mengalami peningkatan kadar aktivasi SOD. Hal ini dikarenakan perasan daun dan tangkai semanggi memiliki kandungan flavonoid dan kalium. Semakin tinggi konsentrasi semanggi air yang diberikan maka akan memiliki kandungan flavonoid dan kalium yang tinggi juga, sehingga kelompok P5 yang diberikan perasan semanggi air dengan konsentrasi 60% memiliki nilai rata-rata aktivitas SOD paling tinggi, yaitu sebesar $5,914 \pm 0,88$.

Flavonoid bekerja sebagai antioksidan dengan cara meningkatkan aktivitas SOD. Senyawa flavonoid secara *in vitro* telah terbukti merupakan inhibitor yang kuat pada lipid peroksidasi, menangkap senyawa oksigen atau nitrogen (ROS atau RNS), menghambat kerusakan hem protein dan pengikatan ion logam. Adanya

hidroksilasi dan posisi relatif dari gugus OH merupakan faktor penting yang menentukan kemampuan flavonoid sebagai antioksidan. Flavonoid dapat mengikat superoksida, radikal hidroksil dan peroksil, yang berpengaruh terhadap berbagai langkah dalam aliran arakidonat melalui *cyclooxygenase-2* atau *lipoxygenase*. Kekuatan aktivitas antioksidan dari flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus OH yang terdapat pada molekul. Semakin banyak substitusi gugus hidroksi pada flavonoid, maka aktivitas antiradikalnya semakin besar (Puspitasari, 2016).

Kalsium yang terdapat dalam kristal dapat dilarutkan dengan kalium. Kalium akan berkompetisi dan memisahkan ikatan kalsium dengan fosfat/ oksalat sehingga kalsium kristal menjadi terlarut. Kandungan kalium dari seledri yang membuat kristal berupa kalsium oksalat terurai, karena kalium akan menyingkirkan kalsium dan bergabung dengan senyawa kalsium oksalat, atau urat yang merupakan pembentuk kristal dengan membentuk senyawa garam yang mudah larut dalam air, sehingga kristal akan terlarut secara perlahan-lahan dan ikut keluar bersama urine. Daya melarutkan kalium terhadap endapan 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. Kalium juga membantu mengaktifasi reaksi enzim, seperti piruvat kinase yang dapat menghasilkan asam piruvat dalam proses metabolisme karbohidrat (Dewi *et al*, 2016).

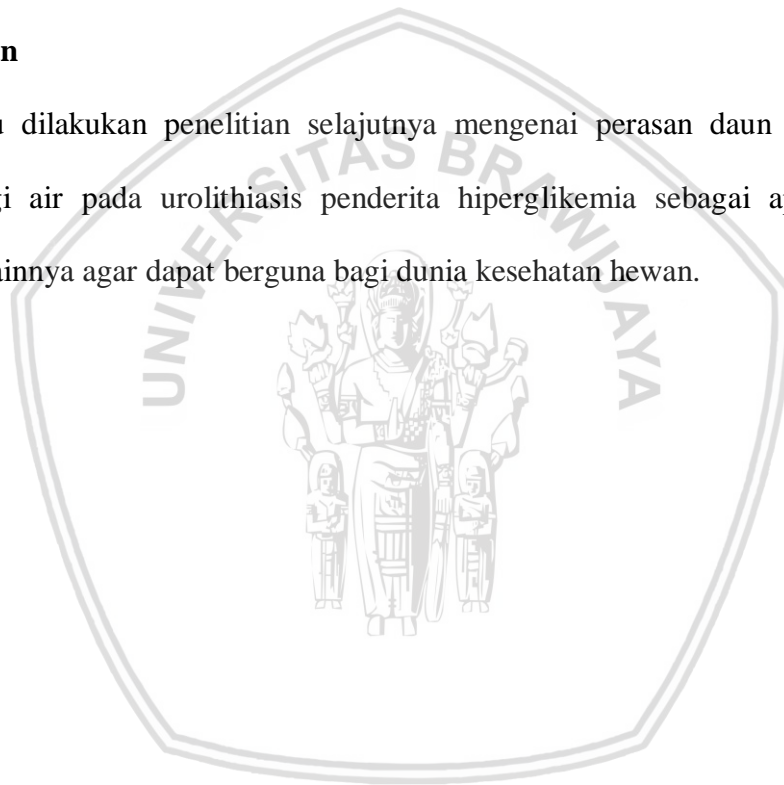
BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan bahwa perasan daun dan tangkai semanggi air dapat mencegah terjadinya urolithiasis pada tikus putih model hiperglikemia berdasarkan penurunan ekspresi TNF α dan peningkatan aktivitas SOD terutama pada konsentrasi 60%.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian selanjutnya mengenai perasan daun dan tangkai semanggi air pada urolithiasis penderita hiperglikemia sebagai aplikasi pada hewan lainnya agar dapat berguna bagi dunia kesehatan hewan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan Lichtman, A.H. 2004. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 2nd Edition*. Philadelphia. Saunders. Hlm 27, 34-37, 44, 108, 114-116
- Adriaria, M. 2016. Efek Pemberian Seduhan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocerheus Polyrrhizus*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Sprague Dawley Hiperglikemia. *Journal of Nutrition College*, 5(4): 475-483.
- Afriastini, J. J. 2003. *Marsilea crenata C.Presl*. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI
- Akiles, A. 2012. Keadaan Puasa Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus *Rattus Norvegicus*. *JESBIO*, 1(1): 29-33.
- Aryal, S. 2015. *Types of Crystals in Urine*. < <https://microbiologyinfo.com/types-of-crystals-in-urine/>>. [Diakses tanggal 21 Juli 2018]
- Astuti, S. 2008. Isoflavon kedelai dan potensinya sebagai penangkap radikal bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2): 126-136.
- Bahdarsyam, 2011. *Spektrum Bakteriologi Pada Berbagai Jenis Batu Saluran Kemih Bagian Atas di RS H. Adam Malik Medan*. Medan : Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Berata, IK, Arjana, AAG, Sudira IW, Merdana IM., Budiasta, IK, dan Oka, IBM. 2010. Studi Patologi Kejadian Cysticercosis pada Tikus Putih. *Jurnal Veteriner*. 11 (4) : 232-237.
- Boyer, B.,A.M. Valles and N. Edme. 2000. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol*. 60:1091-1099
- Brahmachari, G., 2011, Bio- Flavonoids With Promising Antidiabetic Potentials: A Critical Survey. *Research Signpost*. 187-212
- Brent J. 2001. Current Management of Ethylene Glycol Poisoning. 61 (7) : 979-988.
- Brunner, L dan Suddarth, D. 2001. *Keperawatan Medikal Bedah Edisi 8 Volume 2*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Carranza, A., Mendez, M., Barontini, and Nowicki, S. 2004, Insulin Enhances I-Dopa Renal Proximal tubule uptake: A Regulatory Mechanism impaired in insulin esistance, Pflygers Archiv.Eur. *J.Physiol*, 448 : 85-92.

- CastleVet. 2013. *Bertie's Story – Canine Urolithiasis*. <<http://castle-vets.co.uk/berties-story-canine-urolithiasis/>>.[Diakses tanggal 10 April 2016]
- Champion PD, Clayton JS. 2001. Border control for potential aquatic weeds. New Zealand : Departemen Conversation.
- Chew, D. J., DiBartola, S. P. 2004. *Interpretation of Canine and Feline Urinalysis*. USA. Nestle Purina. Hlm. 9-11.
- Colville, J. 2002. *The Urinary System*. Di dalam: Colville T dan Bassert JM, Editor. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. USA: MOSBY. Hlm. 304-317
- Cruzan, G., Corley, R.A., Hard, G.C., Mertens, J.J.W.M., McMartin, K.E., Snellings, W.M., Gingell, R., and Deyo, J.A. 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.
- Dewi, E. K. M., Walanda, D.K., dan Sabang, S. M. 2016. Pengaruh Ekstrak Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Kelarutan Kalsium dalam Batu Ginjal. *J. Akad. Kim.*5(3): 127-132
- Djati, M.S., Satuman, R. Ratnawati, S. Widyarti, E.N. Aisyah, N.Hasanah, E.P.Astuti, dan R.Rochmawati. 2010. Peran Puerarin terhadap Aktivitas Intra dan Ekstraseluler pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Huvecs) Pasca Induksi Leptin. *J.Exp. Life Sci.*1(1): 28-55
- Dwipartha, P. S., Suarsana, I N., Suwiti, N. K. 2014. Profil Mineral Kalium (K) dan Kobalt (Co) pada Serum Sapi Bali yang Dipelihara Di Lahan Perkebunan. *Buletin Veteriner Udayana*, 6 (2):125-128.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., dan Wensing, C. J. G. 2002. *Textbook of Veterinary Anatomy*. Edisi ke-3. USA: Saunders Company. Hlm. 175-433.
- Erwin, Etriwati, Muttaqien, Pangestiningih, T. W., Widyarini, S. 2013. Ekspresi Insulin pada Pankreas Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi dengan *Streptozotocin* Berulang. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7 (2):97-100.
- Fitzgerald, S.D. 2011. *The Urinary System of Cats*. <http://www.merckvetmanual.com/pethealth/cat_disorders_and_diseases/kidney_and_urinary_tract_disorders_of_cats/the_urinary_system_of_cats.html>. [Diakses tanggal 10 April 2016]
- Ganong, W. F. 2001. *Fisiologi Kedokteran*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm. 671

- Grace, P. A., Borley, N. R. 2006. *At a Glance Ilmu Bedah Edisi ke 3*. Surabaya. Erlangga
- Grauer, G. F. 2014. Calcium Oxalate Urolithiasis. <https://www.cliniciansbrief.com/article/calcium-oxalate-urolithiasis>. [Diakses tanggal 14 November 2016]
- Handayani, T.R. dan Yuliani, S. Efek Ekstrak Etanol Biji Buah Kebiul (*Caesalpinia bonduc* L. Roxb) terhadap Batu Ginjal Tikus Putih *Sprague Dawley* yang Diinduksi Etilen Glikol 0,75% dan Amonium Klorida 2%). *Media Farmasi*, 13 (2): 227-236.
- Hidayati, A. M., Yusrin dan Herlisa, A. 2009. Pengaruh Frekuensi Penggunaan Teh Daun Tempuyung Kering (*Sonchus arvensis*) Terhadap Daya Larut Kalsium Oksalat (CaC_2O_4). *Jurnal Kesehatan*. 2 (2).
- Hubrecht, R and Kirkwood, J. 2010. *The UFAW Handbook of The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. USA. Wiley Blackwell. Hlm. 311-324.
- Jacob, A. M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., dan Kristiono, S. S. 2010. Deskripsi Histologi dan Perubahan Komposisi Kimia Daun dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 13 (2) : 81-95.
- Jagannath, N, Dass, P.A, Ahmed, K. 2012. A Study Antiurolithiatic Activity of Ethanolic Extract of *Asparagus racemosus* in Animal Models. *Department of Pharmacology, Gulbarga, India*. 5:11.
- Juniarti, Osmeli D, Yuhernita. 2009. Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan antioksidan (*1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl*) dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Sains* 13(1):50-54.
- Kardika, I. B. W., Herawati, S., dan Yasa, I. W. P. S. 2013. *Preanalitik dan Interpretasi Glukosa Darah untuk Diagnosis Diabetes Melitus*. Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah.
- Kim, S.C., Coe, F.L., Tinmouth, W. 2005. Stone Formation Proportion to Papier Surface Coverage. *J. Urol*, 173(1): 11
- Kusriningrum, R. S. 2008. *Rancangan percobaan*. Airlangga Universitas Press. Surabaya.
- Lalla R.V. and D'Ambrasio J. 2001. Dental Management and Considerations for The Patient With Diabetes Mellitus. *J Am Dent Assoc*. 132(10): 25-32

- Lina, H.S., Listyawati, S., dan Sutarno. 2003. Analisis Kimia-Fisik Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* linn.). *Biosmart*, 5 (1): 43-46.
- Liu, Y. 2011. Renal Fibroblast: Origin, Activation and Their Role In Renal Fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 7:684-696.
- Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, and Biro L. 2003. The Role of Antioxidant Phytonutrients in the Prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 47: 119-125
- Mahdi, C and Aulanniam. 2012. The effect of yogurt sepplementation on rats (*Rattus norvegicus*) that formaldehyde exposure on oxidative damages and protease enzymatic activities of gastrointestinal. International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM). Surakarta.
- Maslachah, L., Sugihartuti R., Kurniasanti, R., 2008. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida (O₂⁻) oleh Antioksidan Vitamin E(α - tocopherol) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik. *Media Kedokteran Hewan*, 24 (1) : 21-26.
- Mayee, R.,Thosar, A. 2011. Evaluation of *Lantana camara* Linn. (*Verbenaceae*) for Antiurolithiatic and Antioxidant Activities in Rats. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1): 10-14.
- Navarro-Gonzalez, J.F. and C. Mora-Fernandez. 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J. Am Soc Nephrol*. 19(3) : 433-443
- Nettina, S. M. 2002. *Pedoman Praktik Keperawatan*. Jakarta: Penerbit EGC.
- Nijveldt RJ. Nood EV. Hoorn DE. Boelens PG et al. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of clinical nutrition*, 74 (4) : 418-425
- Nugroho, A. E. 2006. Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas*, 7 (4) : 378-382.
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*, 1 (3) : 152-158.
- Oktari, T., Fitmawati, dan Sofiyanti, F. 2014. Identifikasi dan Uji Fitokimia Ekstrak Alami Tanaman Antiurolithiasis. *JOM FMIPA*, 1 (2) : 1-9.

- Orson, D.M. 2006. *Kidney stones: pathophysiology and medical management*. Lancet 367: 333–44.
- Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. 2004. Lipid Peroxidation and Resistance to Oxidation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 203(3):211–8.
- Pasaribu, S. 2001. Telaah Histopatologi Urolithiasis pada Kucing. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor.
- Pavani, B. C., Kumar, S. V., Ramarao, J., Rau, B. R., & Mohanty, S. 2012. Role of Biochemical Marker for Evaluation of Oxidative Stress in Cataract. *Int J Pharm Bio Sci*, 2(2), 178-184.
- Popa C, Netea MG, M van Riel PL, M van der Meer JW, Stalenhoef AF, 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 48: 751–762.
- Pradana, B, W., Sri, M., Djoko, W. 2009. *Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (Marsilea crenata) terhadap Kadar Malondeialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Urolithiasis*. Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Prahastuti, S. 2011. *Konsumsi Fruktosa Berlebihan dapat Berdampak Buruk bagi Kesehatan Manusia*. JKM, 10 (2) : 173-189
- Price, S. A. 2005. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit, Volume 2*. Jakarta : EGC
- Purnomo B. B. 2011, *Dasar-Dasar Urologi, Edisi 3*. Jakarta : Sagung Seto
- Puspitasari, M. L., Wulansari, T. V., Widyaningsih, T. D., Maligan, J. M., Nugrahini, N. I. P. 2016. Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) dan Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana* L.): Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4 (1) : 283-290
- Putri, D. K.S. C., Hermanto, B., Wardani, T. 2014. Pengaruh Pemberian Infusum Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi alloxan. *Veterinaria Medika*, 7(1) : 7-16.
- Rahmawati, R. D. 2015. Pengaruh Pemberian Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus *Sprague Dawley*. [Artikel Penelitian]. Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.

- Ramdhany, D. N., Kustiyo, A., Handharyani, E., dan Buono, A. 2012. Diagnosis Gangguan Sistem Urinari pada Anjing dan Kucing Menggunakan VFI 5. *Jurnal Ilmu Komputer dan Informasi*, 2 (2) : 86-93.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42 (4): 405–426
- Reece, W. O. 2006. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Edisi ke-3. Australia: Blackwell Publishing Asia. Hlm. 269-302.
- Riansyah, Y., Mulqie, L., dan Choestrina, R. 2015. *Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (Ipomoea Batatas (L.) Lamk) terhadap Tikus Wistar Jantan*. Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba.
- Ridwan, Endi. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63 (3) : 122-116.
- Robertson RP, Harmon. 2004. B-cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes. J, Tran PO, Poitout V*. 53(1):S119–24.
- Sacher, R.A., Mc Pherson., Richard, A. 2002. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Sakti M. 2012. Pengaruh Pemberian Margarin Terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa Tikus Sprague Dawley [Artikel Penelitian]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Sari, PE., Simanjuntak, SBI., Winarsi,H. 2014. Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase Tikus Diabetes Yang Diberi Ekstrak Daun Kapulaga *Amomum cardamomum*. *Scripta Biologica*,1(3) : 193-196.
- Shulman GI., 2000, *Cellular Mechanisms of Insulin Resistance*, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 106, Number 2. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. [Diakses tanggal 29 September 2016]
- SIKerNas. 2011. *Amonium Klorida (Ammonium Chloride)*. Pusat Informasi Obat dan Makanan, Badan POM RI.
- Sirois, 2005, *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. USA. Elsevier.
- Stevenson, A. E. 2002. *The The Incidence of Urolithiasis in Cats and Dogs and the Influence of Diet in Formation and Prevention of Recurrence*.

[Thesis] Institute of Urology and Nephrology. University College London.

- Stoller, M., Maxwell, V.M., Harrison, A.M., Kane, J.P. 2004. The Primary Stone Event: A New Hypotesis Involving a Vasculer Etiology. *J.Urol.* 171(5):1920-1924.
- Suharjo, J.B dan Cahyono. 2009. *Batu Ginjal*. Kanisius. Yogyakarta. Hal: 27, 3031, 48-49, 82.
- Sulistiono, Widi. 2009. Analisis Mikroskopis dan Vitamin Semanggi Air *Marsilea crenata* Presl. (Marsileaceae). Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB. Bogor.
- Sumardika, IW., dan Jawi, IM. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Jurnal Ilmiah Kedokteran.* 43 (2) : 67-70.
- Suryani, N. 2013. Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Peningkatan Kadar Insulin, Penurunan Ekspresi TNF- α dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya.* 27 (3) : 137-145
- Susilawati, H.L., Shanty L., dan Sutarno. 2003. Analisis Kimia-Fisik Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* Linn.). *Jurnal BioSMART*, Vol 5. Halaman: 43-46.
- Tion, M. T. 2012. *Epidemiology of Urolithiasis*. M. Sc Dissertation. Sumy Agrarian University. Sumy, Ukraine.
- Tion, M. T., Dvorska, J., Saganuwan, S. A. 2015. A Review on Urolithiasis in Dogs and Cats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18 (1) : 1-18.
- Tiselius, H.G., Ackermann, D., Alken, P., Buck, C., Conort, P., and Gallucci, M. 2001. *Guidelines on urolithiasis*. In: *EAU Guidelines*. Edition presented at the 16th EAU Congress. Switzerland. ISBN 90-806179-3-9.
- Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F. 2007. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urol* 7: 1471-1490.
- Wakidi. 2003. *Prospek Tumbuhan Obat Tradisional untuk Menghancurkan Batu Ginjal (Urolitikum)*. Bagian Farmasi-Kedokteran Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara.
- Warditiani, N.K. 2012. Uji Aktivitas Antihiperlipidemia dan Antiaterosklerosis Isolat Andrografolid dan Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto

(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) Pada Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 Resistensi Insulin. [Tesis]. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Werdhasari,A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 3 (2) : 59- 68

Wientarsih, I., Madyastuti, R., Prasetyo, B. F., Firnanda, D. Gambaran Serum Ureum, dan Kreatinin pada Tikus Putih yang diberi Fraksi Etil Asetat Daun Alpukat. *Jurnal Veteriner*. 13(1) : 57-62.

Wolf Jr, J Stuart. 2013. *Nephrolithiasis*. < <http://emedicine.medscape.com/article/437096-overview#aw2aab6b2b1aa>>. [Diakses tanggal 26 April 2016]

Wulandari. 2016. Uji Efektivitas Antihiperqlikemia Kombinasi Jus Pare (*Momordica charantia* L) dan Jus Tomat (*Solanum lycopersicum* L) pada Tikus Wistar Jantan dengan Metode Toleransi Glukosa, *Pharmaceutical Sciences and Research* 3 (3) : 145-154.

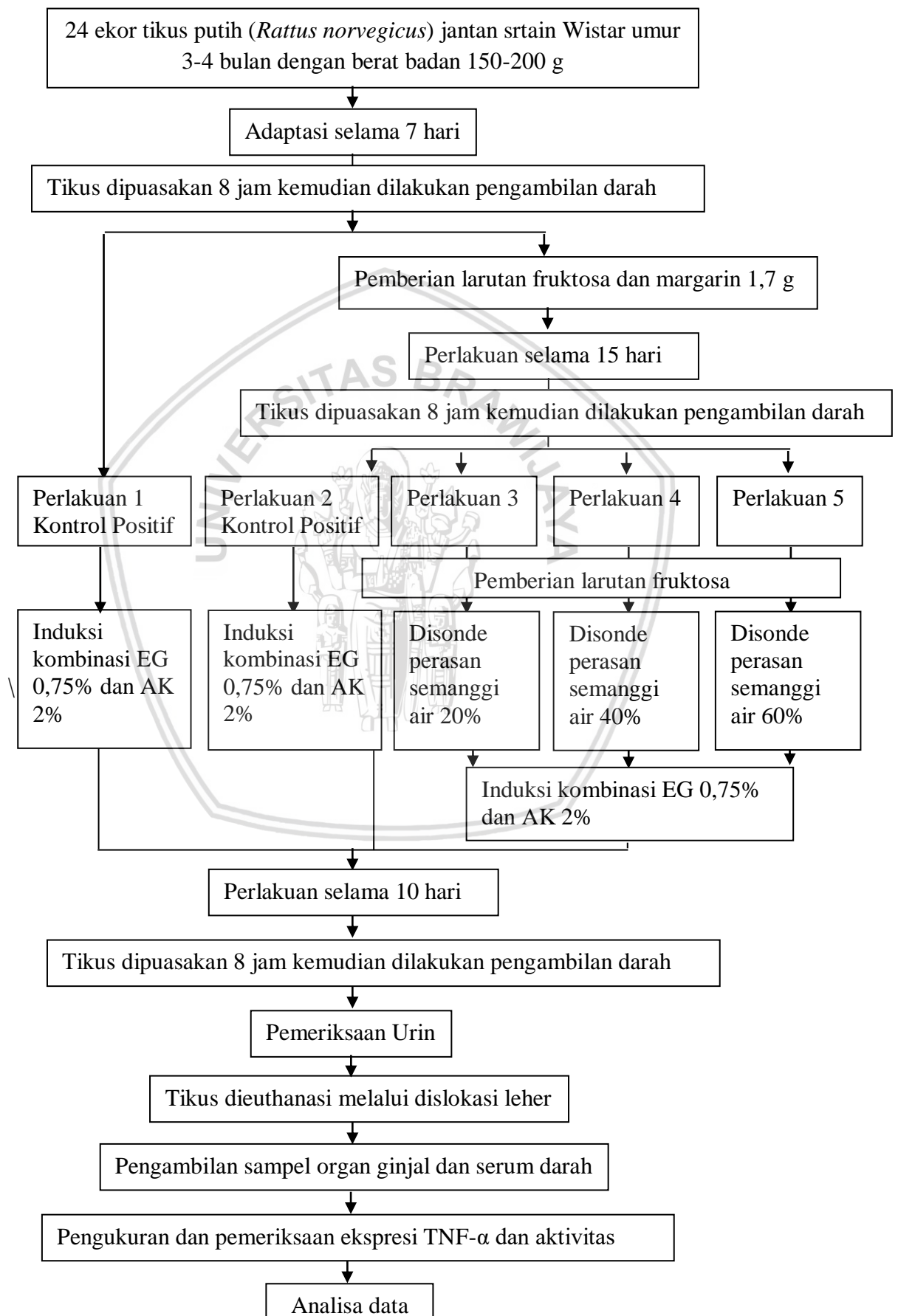
Yilmaz, H., Giizel, Y., Onal, Z., Altiparmak, G., dan Kocakaya, S.O. 2011. 4D-QSAR Study of p56 Protein Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Flavonoid Derivates Using MCET Method. *Korean Chemical Journal* 32 (12) : 4352-4360.

Yool, D. A. 2011. *Small Animal Soft Tissue Surgery*. The University of Edinburgh Hospital for Small Animals Easter Bush Veterinary Centre. Roslin, Scotland. 252-254.

Young,I.S., Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54:176-186.

Yusrin, M. Hidayati, A., Anggraini, H. 2009. Pengaruh Frekuensi Penggunaan Teh Daun Tempuyung Kering (*Sonchus Arvensis*) terhadap Daya Larut Kalsium Oksalat (CaC_2O_4). *Jurnal Kesehatan*, 2 (2) : 30-37.

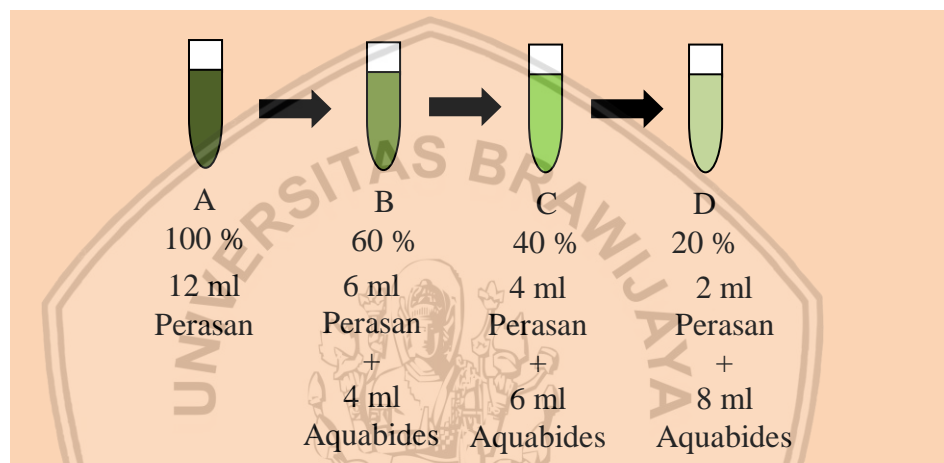
Lampiran 1. Diagram Tahapan Penelitian



Lampiran 2. Prosedur Kerja

1.1 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi air (*Marsilea crenata*)

1. Daun dan tangkai semanggi air dipilih yang masih segar dan berwarna hijau
2. Daun dan tangkai semanggi air dicuci hingga bersih
3. Daun dan tangkai ditimbang sebanyak ± 120 gram untuk mendapatkan perasan dengan konsentrasi 100% sebanyak ± 12 ml (perasan murni)
4. Daun dan tangkai dimasukkan ke dalam alat juicer
5. Perasan diencerkan untuk memperoleh konsentrasi bertingkat 20%, 40%, dan 60%. Proses pengenceran tercantum dalam gambar 2.1



Gambar 2.1 Proses Pengenceran Perasan Daun dan Tangkai Semanggi air (*Marsilea crenata*)

60% = 6 ml 100% + 4 ml aquabides

40% = 4 ml 100% + 6 ml aquabides

20% = 2 ml 100% + 8 ml aquabides

1.2 Pembuatan Bahan Induksi Hiperglikemia

Diketahui :

- Pakan 20g/ekor/hari, jumlah tikus yang diinduksi hiperglikemia 16 ekor
- Larutan fruktosa 66%
- Margarin 1,7 g

Jumlah pakan $20 \text{ g} \times 16 \text{ ekor} = 320 \text{ g/ hari}$

Larutan fruktosa yang diperlukan

$$\frac{66\%}{100\%} \times 320 \text{ g} = 211 \text{ g} = 211 \text{ ml larutan fruktosa dan } 1,7 \text{ g margarin yang}$$

ditambahkan dalam pakan perhari

1.3 Pembuatan Bahan Induksi Urolithiasis

Diketahui :

$$[] \text{ Amonium} = 2\%$$

$$[] \text{ Etilen} = 0,75 \%$$

Dosis = $12 \text{ ml} / 200 \text{ g BB per ekor selama } 10 \text{ hari}$

Amonium

$$\frac{x}{12 \text{ ml}} = 2\%$$

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} = \frac{2 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{24 \text{ mg}}{100}$$

$$= 0,24 \text{ mg/ekor/hari}$$

Etilen

$$\frac{x}{12 \text{ ml}} = 0,75\%$$

$$\frac{x}{12 \text{ ml}} = \frac{0,75 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{9 \text{ ml}}{100}$$


$$= 0,09 \text{ ml/ekor/hari}$$

Aquadest = $12 \text{ ml} - \text{Etilen Glikol } 0,75\% - \text{Amonium Klorida } 2\%$

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

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

Lampiran 3. Determinasi Tanaman Semanggi Air



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

Nomor : 074 / 290 / 101.8 / X / 2016
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Semanggi Air**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : FRANSISKA IKE KRISTIANI TABUN / 125130100111009
 GURITNA SEPUTRA / 125130102111001
 ALIFATUL FIRDAUSYIAH MAGHFIROH / 125130107111004
 GALLANT GESTUYEV / 125130107111002
 MULAM DIRATNA PARNASUKMA / 125130107111001
 ABDUL WAHID / 125130100111008

Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, JURUSAN PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

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* C. Presl.
 Sinonim : *Marsilea quadrifolia* Bl.; *M. minuta* L.
 Nama Umum : Semanggi, semanggan, paku tapak itik
 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.

4. Kandungan kimia : Daun dan batang *Marsilea crenata* mengandung saponin dan polifenol. Daun dan tangkai semanggi air segar mengandung gula pereduksi, steroid, karbohidrat, dan flavonoid. Daun semanggi juga mengandung isoflavon.


5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar pustaka

- Anonim. <http://www.palntamor.com/semanggi>, diakses tanggal 11 Desember 2010.
- Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/semanggi>, diakses tanggal 15 Februari 2007.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, C.G.G.J. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 19 Oktober 2016
 Kepala UPT Materia Medica Batu



Dr. Husin R.M. Drs. Apt. M.Kes.
 NIP. 196114021991031003

Lampiran 4. Sertifikat Laik Etik Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

NO: E.5.a/180/KEPK-UMM/XI/2016

KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG

TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : Efek Preventif Perasan Daun dan Tangkai Semangi Air
(Marsilea crenata) terhadap Urolithiasis pada Tikus Putih
(Rattus norvegicus) Penderita Hiperglikemia

PENELITI : Ketua :
Abdul Wahid (125130100111008)
Anggota:
1. Guritna Seputra (125130102111001)
2. Alifatul Firdausyah Maghfiroh (125130107111004)
3. Galant Gestuyev (125130107111002)
4. Mulam Diratna Pamasukma (125130107111001)
5. Fransiska Ike Kristiani Tambun (125130100111009)

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT : Laboratorium Farmakologi FK UMM

DINYATAKAN : Laik Etik

Malang, 14 November 2016
Ketua Komisi Etik
Univ. Muhammadiyah Malang



Dr. Djaka Handaja, MPH
NIDN: 07.22.12.430

Lampiran 5. ANOVA Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α)

Tabel Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		tnf alpha
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	90,180
	Std. Deviation	5,9111
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,170
	Positive	,155
	Negative	-,170
Test Statistic		,170
Asymp. Sig. (2-tailed)		,130 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

tnf alpha

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,481	4	15	,749

Descriptives

tnf alpha

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	4	94,275	2,8802	1,4401	89,692	98,858	90,5	97,1
2	4	97,275	1,7037	,8518	94,564	99,986	95,8	99,4
3	4	90,550	4,3085	2,1543	83,694	97,406	85,1	95,6
4	4	84,775	2,3186	1,1593	81,086	88,464	83,0	88,1
5	4	84,025	2,6513	1,3256	79,806	88,244	81,1	87,2
Total	20	90,180	5,9111	1,3218	87,414	92,946	81,1	99,4

ANOVA

tnf alpha

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	537,372	4	134,343	15,930	,000
Within Groups	126,500	15	8,433		
Total	663,872	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: tnf alpha

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-3,0000	2,0535	,601	-9,341	3,341
	3	3,7250	2,0535	,402	-2,616	10,066
	4	9,5000*	2,0535	,003	3,159	15,841
	5	10,2500*	2,0535	,001	3,909	16,591
2	1	3,0000	2,0535	,601	-3,341	9,341
	3	6,7250*	2,0535	,035	,384	13,066
	4	12,5000*	2,0535	,000	6,159	18,841
	5	13,2500*	2,0535	,000	6,909	19,591
3	1	-3,7250	2,0535	,402	-10,066	2,616
	2	-6,7250*	2,0535	,035	-13,066	-,384
	4	5,7750	2,0535	,083	-,566	12,116
	5	6,5250*	2,0535	,042	,184	12,866
4	1	-9,5000*	2,0535	,003	-15,841	-3,159
	2	-12,5000*	2,0535	,000	-18,841	-6,159
	3	-5,7750	2,0535	,083	-12,116	,566
	5	,7500	2,0535	,996	-5,591	7,091
5	1	-10,2500*	2,0535	,001	-16,591	-3,909
	2	-13,2500*	2,0535	,000	-19,591	-6,909
	3	-6,5250*	2,0535	,042	-12,866	-,184
	4	-,7500	2,0535	,996	-7,091	5,591

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

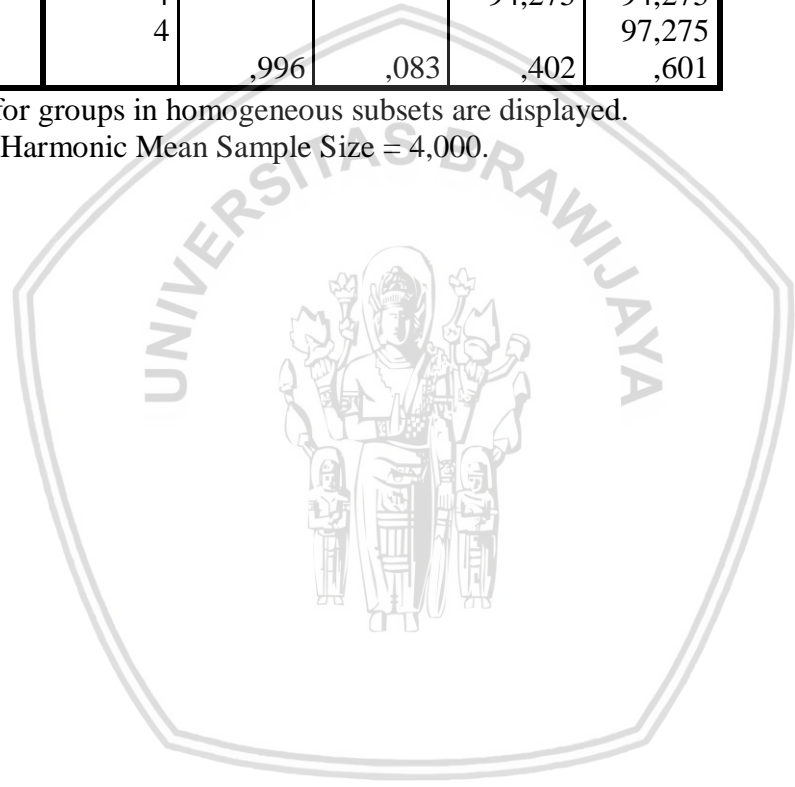
tnf alpha

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
5	4	84,025			
4	4	84,775	84,775		
3	4		90,550	90,550	
1	4			94,275	94,275
2	4				97,275
Sig.		,996	,083	,402	,601

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 6. ANOVA Superoksida Dismutase (SOD)

Tabel Uji Normalits

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SOD
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,61111
	Std. Deviation	1,148862
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,136
	Positive	,103
	Negative	-,136
Test Statistic		,136
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,496	4	15	,033

Descriptives

SOD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	4	3,55278	,701813	,350906	2,43604	4,66952	2,622	4,122
2	4	4,42778	,688680	,344340	3,33193	5,52362	3,622	5,233
3	4	3,95556	1,324818	,662409	1,84747	6,06364	2,622	5,511
4	4	5,20556	,132249	,066124	4,99512	5,41599	5,067	5,344
5	4	5,91389	,880019	,440010	4,51358	7,31420	5,011	7,122
Total	20	4,61111	1,148862	,256893	4,07343	5,14879	2,622	7,122

ANOVA

SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14,536	4	3,634	5,171	,008
Within Groups	10,542	15	,703		
Total	25,078	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,875000	,592781	,592	-2,70546	,95546
	3	-,402778	,592781	,958	-2,23324	1,42768
	4	-1,652778	,592781	,086	-3,48324	,17768
	5	-2,361111*	,592781	,009	-4,19157	-,53065
2	1	,875000	,592781	,592	-,95546	2,70546
	3	,472222	,592781	,928	-1,35824	2,30268
	4	-,777778	,592781	,688	-2,60824	1,05268
	5	-1,486111	,592781	,141	-3,31657	,34435
3	1	,402778	,592781	,958	-1,42768	2,23324
	2	-,472222	,592781	,928	-2,30268	1,35824
	4	-1,250000	,592781	,267	-3,08046	,58046
	5	-1,958333*	,592781	,033	-3,78880	-,12787
4	1	1,652778	,592781	,086	-,17768	3,48324
	2	,777778	,592781	,688	-1,05268	2,60824
	3	1,250000	,592781	,267	-,58046	3,08046
	5	-,708333	,592781	,754	-2,53880	1,12213
5	1	2,361111*	,592781	,009	,53065	4,19157
	2	1,486111	,592781	,141	-,34435	3,31657
	3	1,958333*	,592781	,033	,12787	3,78880
	4	,708333	,592781	,754	-1,12213	2,53880

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

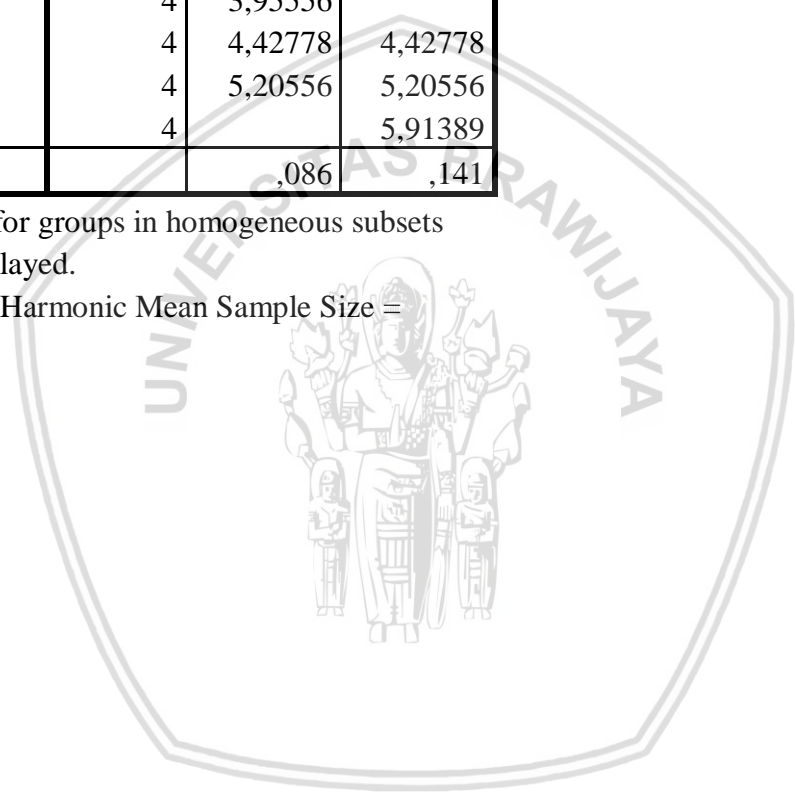
SOD

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	4	3,55278	
3	4	3,95556	
2	4	4,42778	4,42778
4	4	5,20556	5,20556
5	4		5,91389
Sig.		,086	,141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 7. Data Hasil Uji Glukosa Darah

Kelompok	Ulangan	Nilai glukosa darah (mg/dL)
Kelompok (+) hiperglikemia dan urolithiasis	1	162
	2	139
	3	118
	4	130
P1(20%)	1	125
	2	147
	3	110
	4	158
P2(40%)	1	113
	2	128
	3	140
	4	132
P3(60%)	1	282
	2	128
	3	110
	4	135

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



Kegiatan induksi pada hewan coba



Pengambilan darah dan pengukuran darah pada hewan coba



Kandang metabolit untuk hewan coba



Pengambilan sampel darah pada hewan coba





Pengambilan sampel organ ginjal pada hewan coba

