

Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Ekspresi *Superoxide Dismutase* Organ Ginjal Pada Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase

SKRIPSI

Oleh:

RIZKY AYU NUR LESTARI

155130107111010



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

repository.ub.ac.id

**Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium
corrymbosum*) terhadap Kadar *Malondialdehida* dan
Ekspresi *Superoxide Dismutase* Organ Ginjal Pada
Hewan Model Glomerulonefritis Akut
Hasil Induksi Streptokinase**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
RIZKY AYU NUR LESTARI
155130107111010



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*)
terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Ekspresi *Superoxide Dismutase*
Organ Ginjal Pada Hewan Model Glomerulonefritis Akut
Hasil Induksi Streptokinase**

Oleh:

**RIZKY AYU NUR LESTARI
155130107111010**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 29 Januari 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19810504 200501 1 001

drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

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 : Rizky Ayu Nur Lestari

NIM : 155130107111010

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Ekspresi *Superoxide Dismutase* Organ Ginjal Pada Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 30 Januari 2019

Yang menyatakan,

Rizky Ayu Nur Lestari
NIM. 155130107111010

**Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrybosum*)
terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Ekspresi *Superoxide Dismutase*
Organ Ginjal Pada Hewan Model Glomerulonefritis Akut
Hasil Induksi Streptokinase**

ABSTRAK

Glomerulonefritis merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya inflamasi dan proliferasi sel glomerulus ginjal. Streptokinase diproduksi oleh *Streptococcus β hemolyticus* yang berperan dalam patogenesis glomerulonefritis akut. Pemberian obat-obatan kimia seperti ACE Inhibitor pada kasus GNA dapat menyebabkan gangguan dan kerusakan pada ginjal sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrybosum*) sebagai alternatif pengobatan pada kasus Glomerulonefritis Akut (GNA) terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) dan ekspresi *Superoxida dismutase* (SOD). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus yang digunakan ialah tikus jantan strain wistar yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 150-250 gram. Hewan coba dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dengan 4 kali ulangan yaitu kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (tikus diinduksi streptokinase 3 kali dosis 6000 IU), dan 3 kelompok perlakuan yang diinduksi streptokinase 3 kali dosis 6000 IU dan diterapi dengan ekstrak etanol Blueberry (dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 1500 mg/kg BB dengan pemberian satu kali sehari selama 14 hari). Setelah 37 hari, ginjal tikus diambil untuk pemeriksaan kadar MDA menggunakan spektrofotometer dan ekspresi SOD menggunakan *flowcytometry*. Analisis kuantitatif menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji lanjutan *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% atau $\alpha = 0.05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol Blueberry dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB dapat digunakan sebagai terapi pada kasus glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase berdasarkan penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) dan peningkatan ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) organ ginjal.

Kata Kunci : Buah Blueberry, Glomerulonefritis Akut, Streptokinase, *Malondialdehida* (MDA), dan *Superoxida dismutase* (SOD).

Effect of Blueberry Ethanol Extract (*Vaccinium corrymbosum*) Therapy on Malondialdehyde Levels and Superoxide Dismutase Expression Kidney Organs in Acute Glomerulonephritis Animal Models Streptokinase Induction Result

ABSTRACT

Glomerulonephritis is a disease characterized by inflammation and proliferation of renal glomerular kidney cells. Streptokinase is produced by *Streptococcus* β hemolyticus which plays a role in the pathogenesis of acute glomerulonephritis. Giving chemical drugs such as ACE inhibitors in the case of GNA can cause interference and damage to the kidneys so that this study aims to determine the effect of giving Blueberry ethanol extract (*Vaccinium corrybosum*) as an alternative treatment in cases of Acute Glomerulonephritis (GNA) to levels of Malondialdehyde (MDA) and expression of *Superoxida dismutase* (SOD). This study uses a Completely Randomized Design (CRD). The rats used were wistar male rats aged 6-8 weeks with an average body weight of 150-250 grams. The experimental animals were divided into 5 treatment groups with 4 replications namely negative controls (healthy rats), positive controls (rats induced streptokinase 3 times with the dose of 6000 IU), and 3 groups treated with streptokinase 3 times with the 6000 IU dose and treated with Blueberry ethanol extract (dosage of 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 1500 mg/kg BB with one-day treatment for 14 days). After 37 days, rat kidneys were taken to examine the MDA levels using a spectrophotometer and SOD expression using flowcytometry. Quantitative analysis using One Way ANOVA and continued with the Tukey test follow-up test with a confidence level of 95% or $\alpha = 0.05$. The results showed that treatment of Blueberry ethanol extract at a dose of 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, and 1500 mg/kg BB can be used as a therapy in cases of streptokinase induced acute glomerulonephritis based on decreased levels of Malondialdehyde (MDA) and increased expression of Superoxide Dismutase (SOD) kidney organs.

Keywords : Blueberry Fruit, Acute Glomerulonephritis, Streptokinase, Malondialdehyde (MDA), and *Superoxida Dismutase* (SOD).

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) terhadap Kadar Malondialdehida dan Ekspresi Superoxide Dismutase Organ Ginjal Pada Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase**”. Penelitian ini merupakan payung penelitian hewan model glomerulonefritis yang diketuai oleh drh. Ahmad Fauzi, M.Sc. Serta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Strata Satu Kedokteran Hewan (S.KH). Dalam penulisan laporan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D sebagai Pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan, memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech sebagai pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan, memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Drh. Aldila Noviatry, M. Biomed sebagai Penguji I yang telah bersedia meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Drh. Albiruni Haryo, M.Sc. sebagai Penguji II yang telah bersedia meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
6. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.



7. Seluruh staf dan karyawan FKH yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
8. Bapak Sugiono, S. Pd dan Ibu Luluk Elfiyah selaku orang tua penulis yang telah mencurahkan segala kasih sayang, kesabaran, nasihat, pengorbanan, dukungan material dan moral serta doa restu yang diberikan kepada penulis.
9. Kakek Karsono, Nenek Stripah dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan kasih sayang serta dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi dengan baik.
10. Tim penelitian Blueberry “Aulia Fadil, Nurul Insyirah, dan Sari Murni” atas semangat dan kerjasama yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar dan terselesaikan.
11. Sahabat tercinta “Erina Bidari, Kurnia Indah, Riris Ridha, Ulfa Luluk, dan Nurfitriani” yang selalu setia menemani, memberikan dukungan, dan semangat tiada henti.
12. Drh. Balqis Alrasyid Suyoto, Firdausi Kahfi Maulana, Utita Nurrosyada Hilmi, dan Akhmad Syarifuddin Hidayat atas segala dukungan, motivasi, dan doa yang diberikan kepada penulis.
13. Seluruh teman seperjuangan di Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya angkatan 2015 khususnya Kabinet Asique yang telah menjadi keluarga selama proses Pendidikan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.

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

Malang, 30 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Ginjal	7
2.2 Glomerulonefritis Akut	9
2.3 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus novergicus</i>)	12
2.4 Streptokinase	14
2.5 Buah Blueberry	15
2.6 Radikal Bebas	17
2.7 Antioksidan	20
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	22
3.1 Kerangka Konsep	22
3.2 Hipotesis Penelitian	25
BAB 4. METODELOGI PENELITIAN	26
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	26
4.2 Alat dan Bahan	26
4.3 Rancangan Penelitian	27
4.4 Sampel Penelitian	28
4.5 Variabel Penelitian	29
4.6 Tahapan Penelitian	29
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	30
4.6.2 Preparasi Streptokinase	31
4.6.3 Pembuatan Hewan Model GNA Hasil Induksi Streptokinase	31
4.6.4 Pemeriksaan Kadar BUN dan Kreatinin Darah	32
4.6.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Blueberry	33
4.6.6 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Blueberry	33
4.6.7 Euthanasia Hewan Coba	34



4.6.8	Pembuatan Kurva Baku <i>Malondialdehida</i> (MDA)	34
4.6.9	Pengukuran Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	35
4.6.10	Pengukuran Ekspresi <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)	36
4.6.11	Analisis Data	37
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN		38
5.1	Pembuatan Hewan Model GNA Hasil Induksi Streptokinase	38
5.2	Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry Terhadap Kadar MDA	42
5.3	Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry Terhadap Ekspresi SOD.....	46
BAB 6. PENUTUP		50
6.1	Kesimpulan	50
6.2	Saran	50
DAFTAR PUSTAKA		51
LAMPIRAN		59



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	28
5.1 Nilai Rata-rata Kadar BUN dan Kreatinin Serum Tikus	39
5.2 Rata-rata Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA) Ginjal Tikus.....	43
5.3 Rata-rata Ekspresi <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD) Ginjal Tikus.....	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Histologi ginjal.....	8
2.2 Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) strain Wistar.....	13
2.3 Buah Blueberry	15
2.4 Rumus Struktur Antosianin.....	16
2.5 Mekanisme pembentukan <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	20
5.1 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik Etik.....	59
2. Uji Determinasi Buah Blueberry.....	60
3. Skema Perlakuan.....	64
4. Kerangka Operasional.....	66
5. Perhitungan Dosis Obat Cacing.....	67
6. Preparasi Streptokinase.....	68
7. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Blueberry.....	70
8. Perhitungan Dosis Anastesi.....	72
9. Langkah Kerja Penelitian.....	73
10. Prosedur Pengukuran Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	77
11. Prosedur Pengukuran Ekspresi <i>Superoxide dismutase</i> (SOD).....	79
12. Perhitungan Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	80
13. Perhitungan Ekspresi <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD).....	81
14. Analisa Statistik <i>One Way</i> ANOVA Kadar MDA.....	84
15. Analisa Statistik <i>One Way</i> ANOVA Ekspresi SOD.....	87
16. Gambaran Histopatologi Glomerulus.....	90
17. Dokumentasi.....	91

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat celsius
μL	Mikroliter
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
cm	Centimeter
g	Gram
GNA	Glomerulonefritis Akut
GNAPS	Glomerulonefritis Akut Pasca Streptokokus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IL	Interleukin
IU	International Unit
kg BB	Kilogram berat badan
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MDA	<i>Malondialdehida</i>
mg	Miligram
mL	Milliliter
MMP	<i>Matrix Matelloproteinase</i>
Na-Thio	<i>Sodium Thiobarnituric Acid</i>
ng	Nanogram
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	Perangkat hydrogen
PUFA	<i>Poly Unsaturates Fatty Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotasi per menit
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
TCA	<i>Tri Chloro Acetic</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
XO	<i>Xanthine Oksidase</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Glomerulonefritis Akut (GNA) disebut juga Glomerulonefritis Akut Pasca Streptokokus (GNAPS) merupakan penyakit kompleks imun yang ditandai dengan adanya inflamasi dan proliferasi sel glomerulus ginjal. GNA disebabkan oleh bakteri *Streptococcus β hemolyticus* grup A tipe nefritogenik (Nelson dkk., 2000; Pardede, 2009). Menurut (Madaio dan Harrington, 2001), glomerulonefritis menjadi penting untuk ditangani karena dapat menyebabkan gagal ginjal kronik dengan peningkatan angka kejadian setiap tahunnya. Pada tahun 2007 hingga 2012 terjadi 501 kasus glomerulonefritis pada anjing dengan rata-rata umur 6,8 tahun (kisaran 4 bulan – 14 tahun) (Schneider *et al.*, 2013). Kejadian GNA pernah dilaporkan terjadi pada anjing ras Rottweilers, Samoyeds, English Springer Spaniels, Greyhounds, Poodles, Shih Tzu, dan English Cocker Spaniels, beberapa ras kucing, kambing, dan sapi (Okaiyeto *et al.*, 2013).

Saat terjadi Glomerulonefritis Akut (GNA), glomerulus mengalami inflamasi akibat infiltrasi dari sel-sel radang seperti makrofag, leukosit polimorfonuklear dan monosit. Sel-sel radang akan memicu pelepasan radikal bebas dan enzim proteolitik yang akan merusak integritas sel endothelial (Pardede, 2009). Destruksi glomerulus pada GNA ditandai dengan menurunnya kadar antioksidan endogen enzim *Superoksida dismutase* (SOD) serta meningkatnya *Malondialdehida* (MDA) yang terjadi pada membran sel

yaitu *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Candrawati, 2013). *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan salah satu antioksidan dalam tubuh yang melindungi jaringan terhadap efek negatif radikal bebas, sehingga adanya inflamasi pada glomerulus akan mempengaruhi kadar SOD (Haugen and Nath, 2001). Kondisi stres oksidatif yang meningkat dapat berdampak buruk pada beberapa penyusun membran sel seperti kerusakan pada lipida membran yang akan membentuk *Malondialdehida* (MDA) (Migriauli, 2004). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Candrawati (2013), bahwa tingginya kadar *Malondialdehida* (MDA) didalam tubuh dapat disebabkan oleh peningkatan aktivitas radikal bebas.

Glomerulonefritis akut merupakan suatu kondisi yang berpotensi serius sehingga membutuhkan tes diagnostik dan perawatan yang luas, prognosis dengan diagnosis dini dan terapi yang tepat dapat memperpanjang kelangsungan hidup anjing menjadi lebih baik (Brown, 2013). Kondisi glomerulonefritis lebih lanjut dapat menyebabkan gagal ginjal kronik dan hanya dapat di terapi dengan cuci darah (*hemodialysis*), *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*, *Automated Peritoneal Dialysis* atau transplantasi ginjal (Pernefri, 2011). *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) inhibitor seperti benazepril, captopril, enalapril, atau lisinopril sering diberikan dalam penanganan kasus glomerulonefritis, selain itu pemberian obat diuretik, aspirin, dan obat anti-inflamasi juga direkomendasikan (Brown, 2013). Penggunaan obat-obatan kimia tersebut dapat menyebabkan gangguan dan kerusakan pada ginjal, kerusakan yang paling sering terjadi yaitu interstitial

nephritis (Kenward and Tan, 2003). Berdasarkan paparan diatas, jika glomerulonefritis akut dibiarkan tanpa terapi yang tepat maka dapat menyebabkan gagal ginjal kronik, dimana terapi untuk gagal ginjal kronik sendiri terbilang mahal dan lebih rumit. Oleh sebab itu perlu adanya inovasi untuk terapi GNA dengan menggunakan obat herbal sebagai sebuah alternatif pengobatan yang lebih murah, aman dan memiliki toksisitas rendah yaitu menggunakan buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*).

Buah Blueberry merupakan jenis tanaman yang memiliki kadar antioksidan dan nilai gizi yang tinggi diantaranya (mangan, kalsium, fosfor, besi, kalium, dan seng), nutrisi lain yang juga ditemukan dalam buah kecil berwarna keunguan ini adalah vitamin A, C, E, K, B1, B2, B3, B6, serat, karbohidrat, serta lemak (Maryam dan Hadisoebroto, 2013). Buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) memiliki kapasitas antioksidan tertinggi di antara buah-buahan lainnya, yang terdiri dari antosianin, proantosianidin, resveratrol, flavonoid, polifenolik dan tanin (Nair *et al.*, 2014). Dalam sebuah studi yang dilakukan oleh Youdim *et al.* (2000), bahwa antosianin Blueberry mampu menghambat pengembangan ROS dalam sel darah merah yang terpapar hidrogen peroksida. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Prior (2003), bahwa antosianin dapat bertindak sebagai antioksidan langsung dengan menyumbangkan elektron dari struktur fenolik mereka ke ROS. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa antosianin memiliki efek antioksidan dan mampu melindungi sel yang tertekan secara oksidatif (Galambos, 2012),

dengan menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) dan meningkatkan ekspresi *Superoksida dismutase* (SOD) (Maryam dan Hadisoebroto, 2013).

Dosis bertingkat yang digunakan yaitu sebesar 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB, perbandingan tersebut mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Jha and Paul (2017). Menurut Wang *et al.* (2010), dosis 1500 mg/kg BB dapat menurunkan terjadinya kerusakan jaringan dan perosidasi lipid. Berdasarkan data diatas, tujuan penelitian ini difokuskan pada efek antioksidan dari buah Blueberry terhadap penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) dan meningkatnya ekspresi *Superoksida dismutase* (SOD) pada hewan coba model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah pemberian ekstrak etanol Blueberry dapat digunakan sebagai terapi pada hewan model glomerulonefritis akut induksi streptokinase terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) organ ginjal?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol Blueberry dapat digunakan sebagai terapi pada hewan model glomerulonefritis akut induksi streptokinase terhadap ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) organ ginjal?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang akan digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain Wistar berumur 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 150-250 gram. Hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 962-KEP-UB.
2. Pembuatan hewan model glomerulonefritis akut (GNA) dilakukan dengan cara induksi streptokinase sebanyak 6000 IU per ekor pada 16 ekor tikus.
3. Ekstrak etanol Blueberry yang digunakan diperoleh di daerah Malang dan dilakukan pembuatan ekstrak etanol Blueberry serta uji Determinasi dan Fitokimia di Balai Materia Medika Batu Malang.
4. Dosis untuk terapi glomerulonefritis akut menggunakan ekstrak etanol Blueberry sebanyak 500 mg/kg BB (P1), 1000 mg/kg BB (P2), dan 1500 mg/kg BB (P3) selama 14 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar *Malondialdehida* (MDA) yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri dan ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) diukur menggunakan *flow cytometry*.
6. Data hasil dalam penelitian ini yaitu kadar *Malondialdehida* (MDA) dan ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) organ ginjal dianalisis secara kuantitatif menggunakan analisis ragam ANOVA (*Analysis of variance*) yang dilanjutkan uji lanjutan *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% atau $\alpha = 0.05$.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Blueberry terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) pada hewan model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Blueberry terhadap ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) pada hewan model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dalam penelitian ini antara lain :

1. Manfaat Khusus

Menambah wawasan dan keterampilan dalam proses penelitian maupun *lab skill*, serta dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk penelitian selanjutnya mengenai penggunaan ekstrak etanol Blueberry sebagai antioksidan untuk terapi glomerulonefritis akut.

2. Manfaat Umum

Memberikan informasi tentang potensi ekstrak etanol Blueberry sebagai antioksidan untuk terapi glomerulonefritis akut. Serta sebagai bahan kajian pustaka untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Blueberry terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) dan ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) pada hewan model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase.

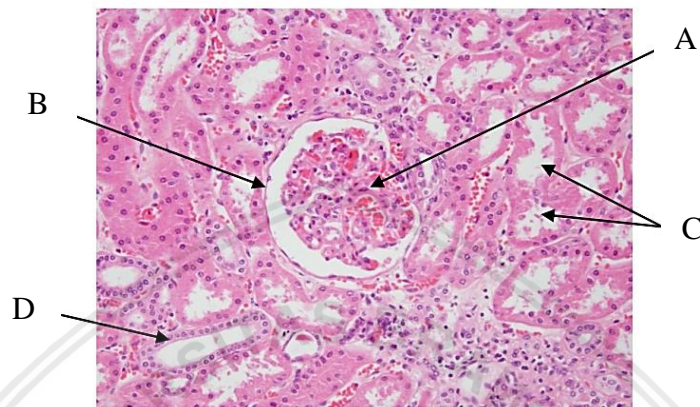
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ginjal

Ginjal pada umumnya berbentuk seperti kacang merah, merupakan organ yang menyaring plasma dan unsur plasma dari darah, kemudian secara selektif akan menyerap kembali air dan unsur yang berguna dan akhirnya mengeluarkan kelebihan produk buangan plasma (Bijanti dkk., 2010). Ginjal pada mamalia berjumlah sepasang, yang terletak dalam rongga abdomen retroperitoneal primer kiri dan kanan kolumna vertebralis (Maharani, 2012).

Unit kerja fungsional ginjal disebut nefron, dalam setiap ginjal terdapat sekitar 1 juta nefron. Nefron terdiri dari kapsula bowman (mengitari rumbai kapiler glomerulus), tubulus kontortus proksimalis, lengkung henle, tubulus kontortus distalis, dan ductus koligentes (Bijanti dkk., 2010). Kapsula bowman merupakan ruang sempit berbentuk piala antar lapisan viseralis dan lapisan parietalis yang akan dilewati ultrafiltrat serta membungkus permukaan kapiler glomerulus. Glomerulus merupakan bagian nefron yang bertanggungjawab untuk produksi suatu ultrafiltrasi dari plasma. Pada irisan jaringan, glomerulus terlihat sebagai benda lonjong atau bulat yang terdiri dari sekumpulan kapiler yang mengandung banyak sel darah merah dan dibatasi oleh ruangan kecil (Hanifah, 2008). Epitel tubulus kontortus proksimal ialah selapis kubus dengan *brushborder* yang jelas, sehingga apabila dilihat menggunakan mikroskop lumen tubulus kontortus proksimal terlihat penuh dan kotor. Epitel tubulus kontortus distal tersusun atas epitel selapis kubus yang tidak memiliki *brush*

border sehingga pada gambaran histologinya akan tampak lumen duktus yang bersih (Baqarizki dan Fiizdha, 2015). Gambaran histologi ginjal dapat dilihat pada **gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Histologi ginjal, (A) glomerulus (B) kapsula bowman (C) tubulus kontortus proksimal (D) tubulus kontortus distal (Ariputri, 2016).

Ginjal memerankan berbagai fungsi tubuh yang sangat penting bagi kehidupan, yakni sebagai organ yang mengatur komposisi cairan tubuh. Organ tersebut menjalankan proses filtrasi glomerulus, reabsorpsi tubulus, dan sekresi tubulus. Cairan yang menyerupai plasma difiltrasi melalui dinding kapiler glomerulus ke tubulus renalis. Di sepanjang tubulus ginjal, volume cairan filtrat akan berkurang dan mengalami perubahan susunan akibat proses reabsorpsi tubulus untuk membentuk urin (Fauziah, 2015). Menurut Reece (2006), ginjal mempunyai lima fungsi dasar yaitu eliminasi zat-zat sisa dari metabolisme yang tidak dibutuhkan tubuh dalam bentuk urin; regulasi keseimbangan cairan tubuh; regulasi asam-basa; pembentukan dari eritropoetin, renin, serta vitamin D; dan menjaga konsentrasi dari ion potassium *extracellular* agar tetap dalam keadaan normal.

2.2 Glomerulonefritis Akut

2.2.1 Etiologi Glomerulonefritis Akut

Glomerulonefritis merupakan penyakit ginjal dengan suatu inflamasi dan proliferasi sel glomerulus yang disebabkan oleh suatu mekanisme imunologis (Lumbanbatu, 2003). Kerusakan fungsi glomerulus mengakibatkan penurunan laju filtrasi glomerulus (GFR) yang merupakan salah satu indeks penting dalam menentukan fungsi ginjal karena dapat memberikan informasi mengenai jumlah jaringan yang berfungsi (Bijanti dkk., 2010). Glomerulonefritis akut (GNA) adalah suatu proses inflamasi di glomeruli yang merupakan reaksi antigen-antibodi terhadap infeksi bakteri atau virus tertentu. Bakteri *Streptococcus β hemolyticus* grup A tipe nefritogenik merupakan penyebab infeksi yang paling sering terjadi (Glomerulonefritis akut post infeksi streptokokus; GNAPS) (Riskawa dan Rachmadi, 2010). Menurut Pardede (2009), bakteri *Streptococcus β hemolyticus* grup A merupakan bentuk paling virulent karena memiliki toksin yang berperan dalam patogenesis GNA yaitu eksoprotein ekstraselular aktif, selain itu enzim invasif lokal yang dikeluarkan diduga memiliki sifat toksik terhadap ginjal. Gejala klinis yang dipresentasikan pada kejadian GNA meliputi hematuria, hipertensi, edema, proteinuria dan penurunan fungsi ginjal. Hematuria dan proteinuria terjadi akibat penurunan kemampuan glomerulus dalam menyaring darah, apabila kejadian tersebut berlangsung lebih dari enam bulan dapat memungkinkan terjadinya glomerulonefritis kronik (Hidayani dkk., 2016).

2.2.2 Patogenesis Glomerulonefritis Akut

Streptococcus β hemolyticus grup A mampu memproduksi streptokinase imunogenik. Hewan yang terinfeksi bakteri tersebut memberikan reaksi terhadap antigen streptokokus dengan membentuk antibodi. Reaksi antigen antibodi ini terjadi dalam sirkulasi darah atau didalam glomerulus. Selanjutnya aktivasi plasminogen menjadi plasmin oleh streptokinase yang diikuti dengan aktivasi komplemen (Pardede, 2009). Sistem komplemen yang teraktivasi adalah C3a dan C5a yang berperan sebagai respon terjadinya inflamasi. Aktivasi C3a akan menghasilkan anafilatoksin yang menstimulasi protein kontraktile dalam pembuluh darah dan meningkatkan permeabilitas vaskuler, sedangkan aktivasi C5a akan menginduksi pelepasan basofil yang memiliki peran untuk meningkatkan permeabilitas kapiler ginjal dan memicu terjadinya kenaikan IL-1 yang menginduksi TNF- α . Interleukin-1 berperan sebagai kemotaktik neutrofil yang mengakibatkan keluarnya neutrofil yang diikuti oleh migrasi dari basofil, eosinofil, dan makrofag ke tempat terjadinya aktivasi komplemen (Behrman, 2000), dan akan memfagositosis peptida yang terlarut (Marks *et al.*, 2000). Selain itu, terjadi aktivasi jalur komplemen terminal dan pembentukan kompleks C5-9. Kompleks komplemen terminal menggambarkan kemampuan untuk menstimulasi produksi substansi vasoaktif, enzim proteolitik, dan radikal bebas yang semuanya akan merusak integritas membran kapiler glomerulus (Pardede, 2009). Hasil samping dari fagositosis adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS yang berkepanjangan dapat meningkatkan kerentanan terhadap peroksidasi lipid

dan lisis sel osmotik. Peroksidase yang meningkat ditandai oleh peningkatan fragilitas osmotik sel darah merah, serta peningkatan kadar *Malondialdehida* (MDA). Glomerulonefritis akut menyebabkan enzim antioksidan seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), katalase, *glutation peroksidase* dan *glutation S-Transferase* menjadi menurun, yang mengakibatkan kadar *glutation* reduksi akan sangat rendah dan sistem redoks *glutation* yaitu reduksi *glutation* oksidase menurun atau tidak ada (Sulyok, 2004).

2.2.3 Diagnosa Glomerulonefritis Akut

Urinalisis dilakukan sebagai metode dalam mendiagnosa adanya penyakit ginjal. Glomerulonefritis memiliki ciri khas adanya inflamasi pada glomerulus yang biasanya bermanifestasi sebagai hematuria dan proteinuria (Keith and Wyatt, 2005). Keadaan tersebut sesuai dengan pendapat Rachmadi (2010), bahwa peningkatan kerusakan kapiler menyebabkan protein dan eritrosit ikut terbawa keluar bersama urin. Pemeriksaan biokimia serum digunakan untuk mengetahui kadar ureum dan kreatinin dalam darah. Kasus glomerulonefritis akut terjadi apabila kedua indikator tersebut mengalami peningkatan (Mayer *et al.*, 2011). Menurut Bijanti dkk. (2010), kadar BUN meningkat jika terdapat trauma pada glomerulus, kerusakan tubular, dan aliran darah ke ginjal yang buruk, sedangkan kadar kreatinin serum akan meningkat pada penyakit ginjal. Biopsi ginjal sebagai metode diagnosa definitif dapat dilakukan dengan cara pengambilan sampel berukuran kecil dari ginjal untuk melihat dan menilai kondisi jaringan organ tersebut melalui mikroskop (Mayer *et al.*, 2011).

2.2.4 Pengobatan Glomerulonefritis Akut

Pengobatan yang dapat diberikan pada kasus glomerulonefritis meliputi terapi immunosupresan seperti *azathioprine*, *chlorambucil*, atau *cyclosporine* untuk menekan pembentukan kompleks imun. Pemberian antitrombotik (aspirin) pada anjing dapat mencegah pembekuan darah di glomerulus (Brown, 2013). Menurut Prabu dan Shatri (2015), kortikosteroid tidak diberikan pada anjing karena dapat menyebabkan peningkatan proteinuria dan kondisi azotemia. Pemberian *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) *Inhibitor* direkomendasikan untuk mengatasi keadaan proteinuria (Brown, 2013).

2.3 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Penelitian yang dilakukan dilaboratorium untuk mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kesehatan memerlukan hewan coba. Hewan coba yang sering digunakan untuk eksperimental dunia medis yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Ezumi *et al.*, 2007). Menurut Maust (2002), tikus memiliki kemampuan adaptasi atau penyesuaian diri paling baik dengan lingkungannya. Keunggulan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang digunakan karena memiliki kadar asam amino dan sistem metabolisme yang hampir menyerupai mamalia lain sehingga mempermudah dilakukannya penelitian (Miller *et al.*, 2010), selain itu tikus sebagai hewan coba memiliki siklus hidup yang relatif pendek, serta proses pemeliharaannya cukup mudah (Ridwan, 2013).

Menurut Myers dan Armitage (2004), klasifikasi tikus putih (*Rattus novergicus*) ialah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Sub Phylum : Vertebrata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Sciurognathi

Famili : Muridae

Subfamili : Murinae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus novergicus*



Gambar 2.2 Tikus (*Rattus novergicus*) strain Wistar (Sharma *et al.*, 2015).

Hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) telah dilaporkan dapat digunakan untuk studi mekanisme kerusakan ginjal dan perbaikan fungsi ginjal. *Rattus novergicus* sudah digunakan oleh Setyawan (2015), dalam penelitian hewan model gagal ginjal. Hewan model dalam penelitian tersebut dilakukan dengan induksi streptokinase.

2.4 Streptokinase

Menurut Moore *et al.* (2007), streptokinase merupakan protein yang terbuat dari filtrat kultur *Streptococcus β hemolyticus*. Streptokinase memiliki berat molekul 46-kDa, terdiri dari 414 asam amino, serta berperan dalam patogenesis GNAPS yang dapat menyebabkan kerusakan pada glomerulus. Sediaan streptokinase yang berasal dari *Streptococcus β hemolyticus* adalah vial 1.500.000 IU (Pardede, 2009).

Mekanisme streptokinase merusak jaringan ginjal melalui dua tahap. Pertama, streptokinase yang diinjeksikan akan membentuk kompleks antigen-antibodi di dalam darah dan bersirkulasi di dalam glomerulus. Kompleks tersebut kemudian terperangkap dalam membran basalis dan mengaktifasi sistem komplemen. Kedua, streptokinase membentuk kompleks dengan plasminogen (proenzim inaktif). Kompleks streptokinase-plasminogen tersebut mengubah plasminogen bebas menjadi plasmin (enzim aktif) dengan memutus rantai peptida. Selanjutnya plasmin mengaktifasi sistem komplemen sebagai mediator inflamasi yang penting (Kumar dkk., 2013). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Pardede (2009), plasmin mengaktifasi kaskade komplemen, memecah protein matriks ekstraselular dan menginduksi pelepasan vasoaktif bradikinin yang akan menyebabkan inflamasi pada jaringan dan menyebabkan glomerulosklerosis serta fibrosis ginjal. Menurut Djamali (2007), bradikinin yang teraktivasi akan berikatan dengan β 1 integrin yang berada di dalam makrofag kemudian mengaktifasi makrofag untuk menghasilkan radikal bebas.

2.5 Buah Blueberry

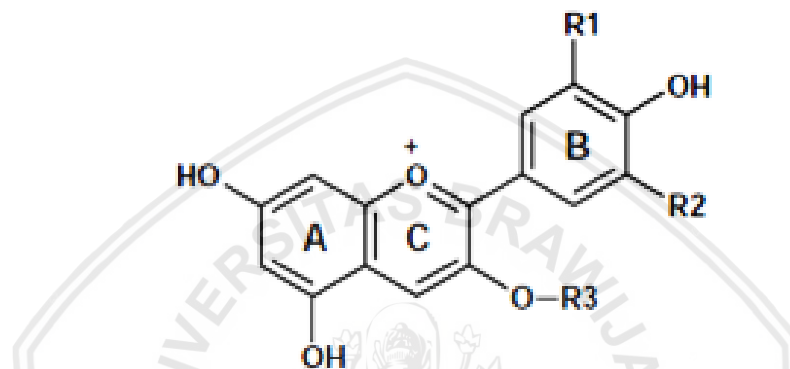


Gambar 2.3 Buah Blueberry, *Vaccinium corymbosum* (kanan), dan *Vaccinium myrtillus* (kiri) (Rodbotten *et al.*, 2005).

Buah Blueberry (Genus *Vaccinium*) merupakan salah satu alternatif antioksidan alami yang cukup potensial. Buah Blueberry memiliki kadar antioksidan dan nilai gizi yang tinggi diantaranya (mangan, kalsium, fosfor, besi, kalium, dan seng). Nutrisi lain yang juga ditemukan dalam buah kecil berwarna keunguan ini adalah vitamin A, C, E, K, B1, B2, B3, B6, serat, karbohidrat dan lemak. Tingginya kadar antioksidan (antosianin, proantosianidin, resveratrol, flavonoid, polifenolik dan tanin) dapat menghambat radikal bebas (Maryam dan Hadisoebroto, 2013). Satu atau lebih cincin aromatic dengan satu atau lebih grup hydroxyl yang dimiliki Antosianin dapat menghambat mekanisme pembentukan radikal bebas (Yodmadee *et al.*, 2011). Antosianin merupakan senyawa yang memiliki kadar antioksidan lebih tinggi dibandingkan vitamin E dan vitamin C (Choi *et al.*, 2007; Shen, 2009).

Potensi anti-inflamasi antosianin dalam Buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) dapat menghambat proses inflamasi, dan menghambat sitokin

pro-inflamasi seperti IL - 1 beta, IL - 2, IL - 3, IL - 6, IFN - γ , dan TNF - α . Mekanisme anti-inflamasi terjadi melalui efek penghambatan pada jalur metabolisme *arachidonic acid*, pembentukan prostaglandin, dan pelepasan histamin pada radang. Berkurangnya respon inflamasi membuat sel dapat kembali berfungsi dengan normal (Soleha dan Yudistira, 2016).



Gambar 2.4 Rumus struktur Antosianin (Harborne, 2005).

Antosianin merupakan senyawa berwarna yang bertanggungjawab untuk kebanyakan warna merah, biru, dan ungu pada buah, sayur, dan tanaman hias. Senyawa ini termasuk dalam golongan flavonoid. Struktur utamanya ditandai dengan adanya dua cincin aromatic benzene (C_6H_6) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin. Terdapat sekitar 539 jenis antosianin yang telah diekstrak dari tanaman (Harborne, 2005).

Secara visual, rumus struktur antosianin disajikan pada **Gambar 2.4**. Warna diberikan oleh antosianin berdasarkan susunan ikatan rangkap terkonjugasinya yang panjang, sehingga mampu menyerap cahaya pada rentang cahaya tampak. Sistem ikatan rangkap terkonjugasi ini juga mampu menjadikan antosianin sebagai antioksidan dengan mekanisme penangkap radikal (Low *et al.*, 2007).

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan bersifat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan zat kimia organik atau anorganik. Saat dibentuk didalam sel, radikal bebas menyerang dan mendegradasi asam nukleat serta berbagai molekul membran sel. Radikal bebas dapat menginisiasi reaksi autokatalitik, sehingga semakin memperbanyak rantai kerusakan. Protein, asam lemak jenuh, lipoprotein, karbohidrat, RNA, dan DNA merupakan target utama radikal bebas (Valko *et al.*, 2005; Winarsi, 2007).

Radikal bebas terbentuk dari metabolisme normal sel-sel tubuh, fagositosis dan sebagian lagi dari reaksi inflamasi, radiasi, dan polusi. Radikal bebas juga dapat terbentuk dari senyawa hidrogen peroksida, ozon, dan senyawa lainnya. Kedua kelompok senyawa tersebut sering disebut sebagai senyawa reaktif oksigen atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Winarsi, 2007).

Pada kondisi Glomerulonefritis Akut (GNA), radikal bebas terbentuk saat aktivitas fagositosis yaitu keluarnya neutrofil (diikuti migrasi dari eosinophil, basophil, dan makrofag) ke tempat aktivasi komplemen (Destiawan, 2016). Peningkatan jumlah radikal bebas disebabkan oleh peningkatan aktivasi sel-sel inflamatori. Molekul radikal bebas yang meningkat akan menyebabkan reaksi antar molekul semakin reaktif, sehingga akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan peroksidasi lipid yang berperan dalam kerusakan struktur membran jaringan ginjal. Kerusakan struktur membran tersebut dapat mempengaruhi fungsi jaringan secara normal (Luqmana dkk., 2014).

Menurut Halliwell and Gutteridge (2007), kerusakan membran sel oleh radikal bebas terjadi melalui rangkaian proses ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen-komponen membran, oksidasi gugus tiol pada komponen membran oleh radikal bebas dan reaksi peroksidasi lipid PUFA. Menurut (Destiawan, 2016), peroksidasi lipid menyebabkan destruksi glomerulus. Glomerulonefritis Akut (GNA) terjadi karena adanya inflamasi dan proliferasi sel glomerulus ginjal.

2.6.1 *Reactive Oxygen Species* (ROS)

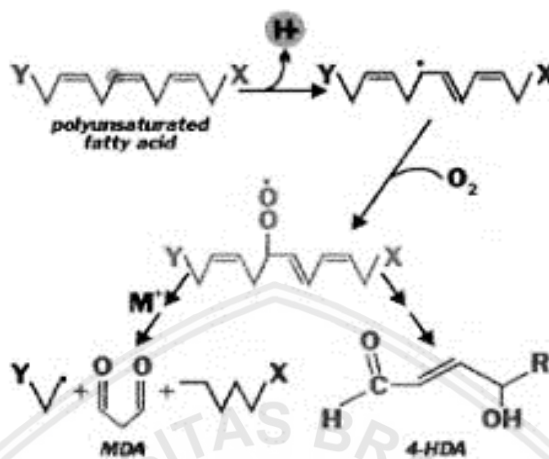
Reactive Oxygen Species (ROS) diproduksi oleh sel dalam kondisi stres maupun tidak stres. Pada kondisi tidak stres, terdapat keseimbangan antara proses pembentukan dan pemusnahan ROS. Sementara pada keadaan stres, pembentukan ROS lebih tinggi dibandingkan dengan pemusnahannya yang mengakibatkan sistem pertahanan tubuh bekerja lebih keras untuk memusnahkan ROS. Sistem pertahanan yang bekerja menekan ROS yang berlebihan ialah antioksidan enzimatis dan nonenzimatis (Mitchel and Contran, 2008). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan produk normal dari metabolisme seluler. *Reactive Oxygen Species* (ROS) memiliki efek yang menguntungkan dan efek yang merugikan. Efek menguntungkan terjadi pada konsentrasi rendah yang merupakan proses fisiologis dalam respon seluler terhadap bahan-bahan yang merugikan, seperti pertahanan diri terhadap infeksi dan induksi respon mitogenik (Valko, 2006).

2.6.2 Stres Oksidatif

Winarsi (2007) menyebutkan gangguan keseimbangan produksi radikal bebas dengan antioksidan yang menyebabkan kerusakan jaringan disebut stres oksidatif yang diakibatkan oleh pengurangan level antioksidan dan peningkatan produksi radikal bebas. Perubahan keseimbangan ke arah peningkatan ROS yang disebut stres oksidatif akan menyebabkan kerusakan oksidatif serta menimbulkan efek buruk terhadap sel dan organisme (Kohen dan Nyska, 2002). Stres oksidatif terjadi akibat reaksi metabolik yang menggunakan oksigen dan terganggunya keseimbangan status reaksi oksidan dan antioksidan pada makhluk hidup. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan akan merusak lipid seluler, protein maupun DNA dan menghambat fungsi normal sel (Kovacic and Jacintho, 2001).

Stres oksidatif akan menyebabkan proses peroksidasi menjadi peroksida lipid (peroksidasi lipid) yang merupakan perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang menghasilkan senyawa *Malondialdehida* (MDA), sehingga MDA dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh. Tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas. Mekanisme pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang oleh gugus radikal hidroksil (OH), sehingga lipid bersifat radikal. Kemudian radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O_2)

membentuk radikal peroksil (OO), yang selanjutnya menghasilkan MDA (dengan ikatan tak jenuh lebih dari tiga) (Yustika dkk., 2013).



Gambar 2.5 Mekanisme pembentukan MDA (Yustika dkk., 2013).

2.7 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron (*electron donors*) kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat dihambat (Maryam dan Hadisoebroto, 2013). Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil tetapi mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan juga dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga kerusakan sel akan dihambat. Secara umum antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu antioksidan enzimatis yang terdiri dari SOD, katalase, dan glutathion peroksidase, dan antioksidan nonenzimatis yang terdiri dari vitamin C, E, karotenoid, flavonoid, quinon, bilirubin, asam urat, dan lain-lain (Winarsi, 2007).

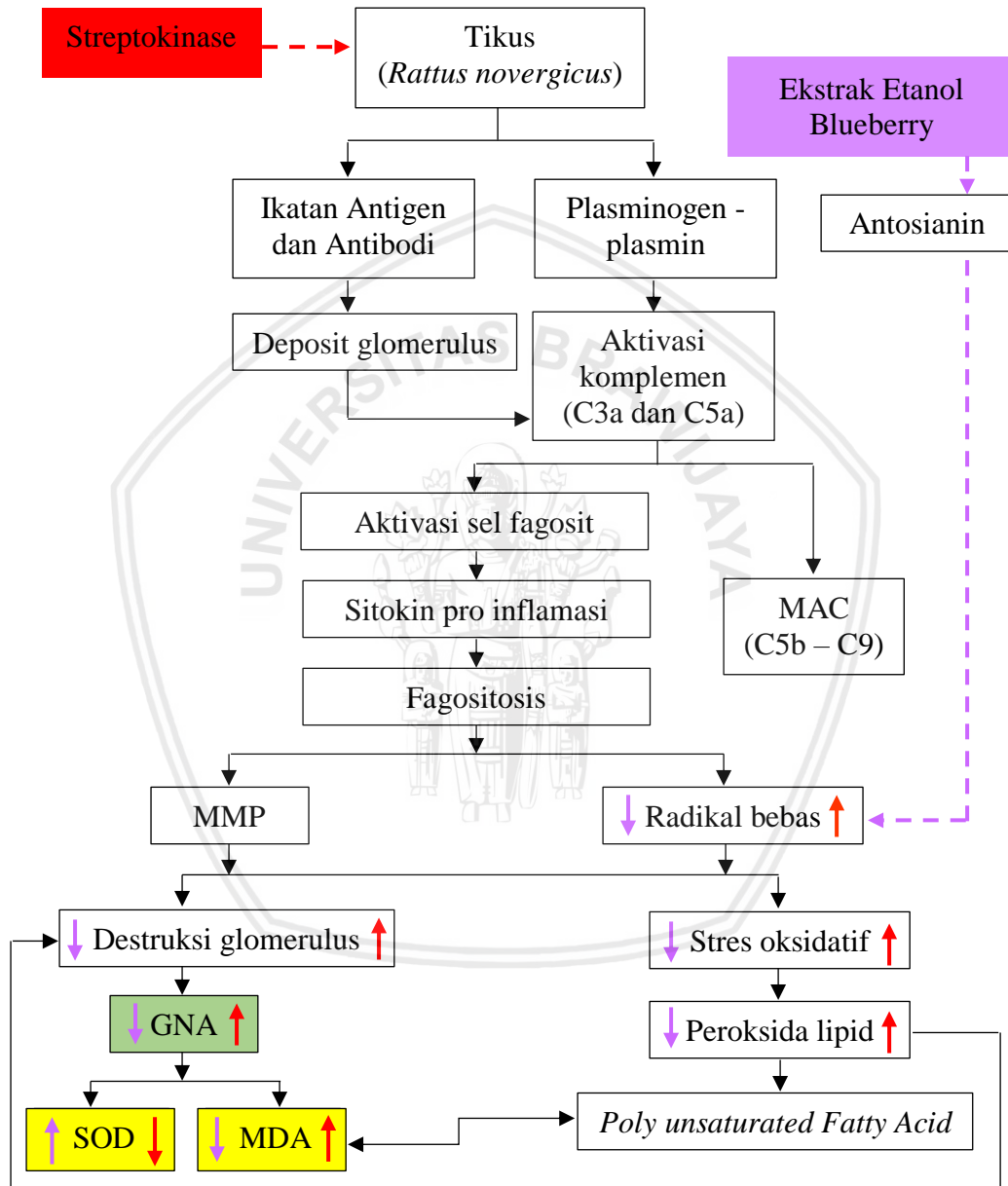
2.7.1 *Superoxide dismutase (SOD)*

Superoxide dismutase (SOD) merupakan salah satu antioksidan yang mampu memperbaiki efek tekanan (stres) oksidatif. SOD mengkatalis perubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Nurhayati dkk., 2011). SOD melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadinya peradangan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Enzim *Superoxide dismutase (SOD)* memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktifitas senyawa oksigen reaktif yang menyebabkan stres oksidatif. Di dalam sitosol dan mitokondria sel terdapat bermacam-macam isozim *Superoxide dismutase* (Winarsi, 2007). Jenis SOD, seperti Copper-Zinc SOD (Cu-Zn-SOD) terdapat di dalam sitosol terutama di lisosom dan nukleus, manganese-SOD (Mn-SOD) terdapat di dalam mitokondria (Chackraborty *et al.*, 2007; Cemelli *et al.*, 2009).

Aktivasi SOD dapat dilihat dari banyaknya produk peroksidase lipid dari setiap organel. Tingginya SOD menggambarkan rendahnya produk oksidasi lipid (Winarsi, 2007). SOD adalah salah satu biomarker yang baik untuk menilai tingkat stres oksidatif (Pavani dkk., 2012). Penurunan kadar SOD berimplikasi pada beberapa kondisi dan penyakit, seperti rheumatoid arthritis, anemia Fanconi (kelainan resesif autosomal yang menyebabkan pansitopenia, hipoplasia sumsum tulang dan instabilitas kromosom), infeksi saluran nafas, katarak, dan infertile. Ekspresi SOD dapat diukur dengan menggunakan beberapa cara, salah satu caranya adalah menggunakan sistem yang menghasilkan superoksida dan indikator warna (Winarsi, 2007).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- = Induksi
- = Terapi
- = Variabel yang diamati
- - - - -> = Induksi
- - - - -> = Menghambat
- ↓ ↑ = Pengaruh Induksi
- ↓ ↑ = Pengaruh Terapi

Streptokinase merupakan protein yang terbuat dari filtrat kultur *Streptococcus β hemolyticus*. Kerusakan pada glomerulus disebabkan karena adanya toksin eksoprotein ekstraselular aktif dan enzim invasif lokal yang memiliki sifat toksik terhadap ginjal. Streptokinase merusak jaringan ginjal melalui dua mekanisme. Pertama, streptokinase yang diinjeksikan akan membentuk ikatan antigen dan antibodi di dalam darah dan terdeposit di dalam glomerulus. Ikatan tersebut kemudian terperangkap dalam membran basalis dan mengaktivasi komplemen (C3a dan C5a). Kedua, streptokinase membentuk kompleks dengan plasminogen (proenzim inaktif) dan akan mengubahnya menjadi plasmin (enzim aktif) dengan memutus rantai peptida. Selanjutnya plasmin mengaktivasi komplemen (C3a dan C5a). Aktivasi C3a akan menghasilkan anafilatoksin yang menstimulasi protein kontraktile dalam pembuluh darah dan meningkatkan permeabilitas vaskuler, sedangkan aktivasi C5a akan menginduksi pelepasan basofil yang memiliki peran untuk meningkatkan permeabilitas kapiler ginjal dan memicu terjadinya kenaikan IL-1 yang menginduksi TNF- α . Interleukin-1 berperan sebagai kemotaktik neutrofil yang mengakibatkan keluarnya neutrofil yang diikuti oleh migrasi dari basofil, eosinofil, dan makrofag ke tempat terjadinya aktivasi komplemen kemudian terjadi aktivitas fagositosis. Aktivasi komplemen juga akan memicu terbentuknya *membrane attack complex* (MAC) C5b – C9. MAC adalah *lipophilic membrane insert* yang membentuk pori-pori pada membran di permukaan sel atau mikroba sehingga menyebabkan terjadinya lisis. Aktivitas fagositosis menyebabkan terbentuknya radikal bebas, dan teraktivasinya

Matrix Matelloproteinase (MMP). MMP merupakan enzim yang dapat merusak dinding sel glomerulus sehingga menyebabkan kerusakan matriks ekstraseluler yang dapat mempengaruhi aliran darah dalam tubuh, sehingga dapat menyebabkan destruksi glomerulus yang memicu terjadinya glomerulonephritis akut (GNA).

Aktivitas fagositosis yang semakin tinggi dari sel fagosit menyebabkan radikal bebas juga akan meningkat. Molekul radikal bebas yang meningkat mengakibatkan reaksi antar molekul menjadi semakin reaktif, sehingga akan memicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif akan menyebabkan proses peroksidasi menjadi peroksida lipid serta destruksi glomerulus yang menyebabkan terjadinya GNA yang ditandai oleh menurunnya kadar antioksidan endogen enzim *Superoksida dismutase* (SOD) serta meningkatnya *Malondialdehida* (MDA) pada membran sel yaitu *poly unsaturated fatty acid* (PUFA).

Tingginya kadar antioksidan antosianin dalam Buah Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dapat menghambat mekanisme pembentukan radikal bebas. Antosianin mampu menghambat pembentukan ROS dengan bertindak sebagai antioksidan langsung yaitu menyumbang elektron dari struktur fenolik ke ROS. Kemampuan menstabilkan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom H pada tahapan inisiasi, terminasi, dan propagansi dari reaksi peroksidasi lipid sehingga menghambat terjadinya stres oksidatif yang dapat menurunkan pembentukan *Malondialdehida* (MDA) dan meningkatkan *Superoksida dismutase* (SOD).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) dapat memberikan efek terapi pada kasus Glomerulonefritis Akut (GNA) yang diinduksi streptokinase, ditandai dengan penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) dan peningkatan ekspresi superoksida dismutase (SOD).



BAB 4 METODELOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan pada Bulan Agustus 2018 sampai September 2018. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu pembuatan ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) di Balai Matera Medika Batu Malang. Uji kuantitas kandungan antosianin di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan FTP Universitas Brawijaya. Perawatan hewan coba, dan perlakuan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar BUN dan Kreatinin darah di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kegiatan pembedahan di Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar *Malondialdehida* (MDA) Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Serta pengukuran ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang tikus kotak plastik ukuran 21 X 30 X 9 cm yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum, kertas label, spidol, kandang jepit, *appendofe*

tube, timbangan, *ice box*, spuit tuberculin 1 mL dan 3 mL, *vortex mixer*, mortar, blender, oven, erlenmeyer, *rotary evaporator*, sonde lambung, tabung vacutainer berwarna merah, *microtube*, mikropipet, kuvet, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, mikrohematokrit, *dissecting set*, pot organ, masker, sarung tangan, *rotary evaporator*, tabung reaksi, sentrifus, *waterbath*, spektrofotometer, BD FACS Calibur cytometer, aluminium foil, labu ukur 50 mL dan 100 mL, pengaduk kaca, dan pipet tetes.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan berumur 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 150-250 gram, serbuk kayu, pakan, minum, ekstrak Blueberry, etanol 70%, organ ginjal, *thiobarbituric acid* (TBA), larutan *sodium thiobarbituric acid* (Na-Thio)1%, *tri chloro acetic* (TCA) 100%, PBS - azida, Streptokinase, *Aqua Pro Injections*, sampel darah tikus, NaCl fisiologis, larutan formalin 10%, stok kit MDA konsentrasi 1,2,3,4,5,6,7,8 mg/mL, aquades, NaCl 0,9%, HCl, larutan Fiksatif, larutan Permeabilitas, dan antibodi spesifik (anti SOD).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *control design only* menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL). Metode *control design only* yaitu dilakukan uji parameter (*Malondialdehida* dan ekspresi *Superoxide dismutase*) setelah diberi perlakuan. Menurut Kusriningrum (2008) Rancangan

Acak Lengkap (RAL) digunakan pada penelitian yang bersifat eksperimental, yaitu pada penelitian sama atau dianggap seragam. Kelompok hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan		Keterangan
	Induksi Streptokinase	Ekstrak Etanol Blueberry	
KN	-	-	Kontrol negatif, tanpa induksi streptokinase, dan tanpa terapi
KP	6000 IU	-	Kontrol positif, induksi streptokinase, dan tanpa terapi
P1	6000 IU	500 mg/kg BB	Perlakuan 1, diinduksi streptokinase, dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis I
P2	6000 IU	1000 mg/kg BB	Perlakuan 2, diinduksi streptokinase, dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis II
P3	6000 IU	1500 mg/kg BB	Perlakuan 3, diinduksi streptokinase, dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis III

4.4 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan umur 6-8 minggu. Berat badan tikus rata-rata 150-250 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di Laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan hewan coba

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dan induksi streptokinase

Variabel tergantung : Kadar *Malondialdehida* (MDA) dan Ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) ginjal

Variabel kontrol : Jenis kelamin, berat badan 150-250 gram, umur 6-8 minggu, suhu, pakan, dan kandang tikus.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Persiapan hewan coba
2. Preparasi Streptokinase
3. Pembuatan hewan model glomerulonefritis akut (induksi streptokinase)

4. Pemeriksaan kadar BUN dan Kreatinin darah
5. Pembuatan ekstrak etanol Blueberry
6. Pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry
7. Euthanasia hewan coba
8. Pembuatan Kurva Baku *Malondialdehida*
9. Pengukuran kadar *Malondialdehida*
10. Pengukuran ekspresi *Superoxide dismutase*
11. Analisis data

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan ialah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 150-250 gram. Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari di ruangan laboratorium dengan tujuan untuk meminimalisir stres dan hewan dapat mengekspresikan perilaku alamiahnya dengan bebas. Pemberian pakan berupa ransum basal standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) dengan komposisi karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5 g/100 g BB/hari) dan pemberian air minum secara *adlibitum*. Selama proses aklimatisasi tikus dapat diberikan antihelmintik seperti pyrantel pamoat (praziquantel) dan mebendazole yang digunakan untuk menekan adanya penyakit helminthiasis yang dapat mempengaruhi kondisi tikus (Dewi, 2012).

Sebanyak 20 ekor tikus berdasarkan masing-masing kelompok perlakuan ditempatkan dalam kandang berupa bak plastik dengan penutup

berbahan kawat berukuran 21 X 30 X 9 cm. Kandang diletakkan pada ruangan yang bebas dari keramaian, polutan, dan memiliki ventilasi cukup dengan suhu optimum 22-24°C dan kelembapan udara 50-60% (Asrini, 2013).

4.6.2 Preparasi Streptokinase

Fibrion Streptokinase diperoleh dari Rumah Sakit Aisyiyah (RSIA) Malang. Obat tersebut berasal dari Biofactor GmbH, Bad Harzburg Jerman yang diimpor oleh PT Dixa Medica, Palembang. Dosis streptokinase yang diberikan pada hewan coba, yaitu 6000 IU/ekor sebanyak 3 kali. Streptokinase berjumlah 1.500.000 IU (550 mg) berbentuk serbuk dalam vial ditimbang 32,5 mg/16 ekor tikus sebanyak tiga kali (tiga kali induksi). Pengenceran dilakukan pada hari induksi, hal tersebut dimaksudkan untuk meminimalisir terjadinya kerusakan streptokinase. Dimasukkan 32,5 mg streptokinase kedalam tabung falcon dan ditambahkan larutan pengencer aqua pro injection sebanyak 1,6 mL. Dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 5-6 menit, kemudian diambil 0,1 mL yang mengandung 6000 IU untuk diinjeksikan pada tikus. Perhitungan pengenceran dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

4.6.3 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis Akut (GNA)

Injeksi streptokinase sebesar 6000 IU/ekor diberikan melalui vena *coccygea* setelah tikus diaklimatisasi. Injeksi dilakukan pada 16 ekor tikus pada hari ke-8, hari ke-13, dan hari ke-18 dengan interval waktu lima hari. Empat ekor tikus tidak diinjeksikan streptokinase karena sebagai kontrol

negatif. Perlakuan antar kelompok yang diinduksi streptokinase terdiri dari empat kelompok yaitu kelompok glomerulonephritis (kontrol positif), kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II, dan kelompok perlakuan III.

4.6.4 Pemeriksaan Kadar BUN dan Kreatinin Darah

Pemeriksaan kadar BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin dalam serum dilakukan setelah injeksi streptokinase ketiga. Tujuan pemeriksaan BUN dan kreatinin serum yaitu untuk menentukan faal ginjal. Secara umum, peningkatan nilai kreatinin sebanyak dua kalinya menunjukkan penurunan nilai GFR, sedangkan kadar BUN berhubungan dengan fungsi ekskresi ginjal, sehingga meningkatnya kadar urea dalam darah sampai melebihi batas normal mengindikasikan adanya penyakit ginjal (Pasma, 2016). Menurut Bihun and Bauck (2004), nilai kreatinin normal tikus yaitu 0,38 – 0,8 mg/dL, sedangkan nilai BUN normal tikus yaitu 12 – 22 mg/dL.

Kadar ureum (BUN) dapat diukur dengan metode urease, pengukuran dilakukan berdasarkan reaksi enzimatik dengan diasetil monoksim yang memanfaatkan enzim *urease* yang sangat spesifik terhadap urea (Alunat dkk., 2014). Pengukuran kadar kreatinin dapat dilakukan dengan metode jaffe, yaitu reaksi antara kreatinin dengan asam pikrat dalam suasana basa, membentuk kompleks kreatinin pikrat berwarna jingga (Haribi dkk., 2009). Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin adalah serum yang dikoleksi dari masing-masing kelompok.

4.6.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*)

Buah Blueberry didapatkan dari toko Lai – Lai Kota Malang, selanjutnya dilakukan uji determinasi dan fitokimia di Balai Materia Medica Batu Malang menggunakan metode maserasi **Lampiran 2**. Buah Blueberry dibagi menjadi dua bagian untuk mengeluarkan bijinya. Dibersihkan buah Blueberry dengan dicuci bersih dan dikeringkan menggunakan oven 40°C dengan kadar 3 – 6 %. Selanjutnya buah Blueberry dihaluskan menggunakan blender, diambil 500g buah yang telah halus dan ditambahkan 1500 mL etanol 70%. Dishaker dengan kecepatan 50 rpm, kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang didapatkan dipekatkan atau disuling didalam *rotary evaporator* pada suhu 40 °C selama 2 jam. Ekstrak etanol Blueberry disimpan pada suhu 4 °C untuk penggunaan lebih lanjut (Widianto, 2017).

4.6.6 Pemberian Terapi Menggunakan Ekstrak Etanol Blueberry

Terapi ekstrak etanol Blueberry diberikan pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Pemberian terapi dimulai pada hari ke-23 (setelah induksi streptokinase ketiga) dengan interval pemberian satu kali sehari selama 14 hari. Pemberian terapi dilakukan dengan cara sonde peroral. Teknik sonde merupakan teknik pemberian kepada hewan coba melalui rongga mulut dengan menggunakan spuit dan jarum suntik tumpul (Lailani dkk., 2013). Teknik sonde dilakukan dengan memegang leher bagian belakang dengan tangan kiri, sedangkan tangan kanan memegang alat sonde yang berisi ekstrak etanol Blueberry. Sonde dimasukkan dengan hati-hati kira-kira sampai di lambung, setelah itu jarum sonde dimasukkan kedalam

lambung (Ngatidjan, 2006). Dosis ekstrak etanol Blueberry yang diberikan yaitu 500, 1000, dan 1500 mg/kg BB. Perhitungan dosis terapi dapat dilihat pada **Lampiran 7**.

4.6.7 Euthanasia Hewan Coba

Proses *euthanasia* pada hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) dilakukan pada hari ke-37 setelah seluruh perlakuan. *Euthanasia* hewan coba dilakukan dengan cara dislokasi pada leher, kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan secara rebah dorsal, pembedahan dilakukan dengan membuat sayatan pada bagian abdomen kemudian ginjal di isolasi. Organ ginjal dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9 % kemudian ginjal kiri disimpan dalam larutan *Phospate Buffer Saline* - azida (PBS - azida) pH 7,4 dan disimpan dalam *freezer* untuk pengukuran kadar MDA dan SOD (Fitriana dkk., 2017).

4.6.8 Pembuatan Kurva Baku *Malondialdehida*

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

dengan membuat persamaan regresi antara absorbansi dan konsentrasi MDA (Shofia dkk., 2013).

4.6.9 Pengukuran Kadar *Malondialdehida*

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Thiobarbituric Acid (TBA). MDA (*Malondialdehida*) dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lipid dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan suatu marker kerusakan (*oxidative injury*) yang dipresentasikan sebagai MDA (*Malondialdehida*). Pada kondisi normal MDA tetap dihasilkan selama terjadinya biosintesis prostaglandin dalam sel, namun ketika terjadi peningkatan kadar MDA maka dapat mengganggu keutuhan membran sel yang dapat menyebabkan kerusakan pada suatu organ (Winarsi, 2007).

Pengukuran kadar MDA diawali dengan menggerus organ ginjal seberat 100 mg pada mortar dingin yang ditambahkan 1 mL TCA 1%. Diambil 400 μ L homogenasi dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* ukuran 15 mL, ditambahkan TCA 100% 200 μ L, Na Thio 1% 200 μ L, dan HCl 1 N 200 μ L. Dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100°C, kemudian dilakukan sentrifus selama 10 menit (3500 rpm). Diambil 1 mL supernatan kemudian dimasukkan pada kuvet, dan diukur menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (532nm) (Shofia dkk., 2013).

4.6.10 Pengukuran Ekspresi *Superoxide dismutase*

Pengukuran ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) diawali dengan menggerus organ ginjal seberat 100 mg pada mortar dingin yang ditambahkan 1 mL PBS. Cairan diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf*. Disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C. Dilakukan pengambilan pelet kemudian ditambahkan PBS sebanyak 1 mL dan dilakukan *pipetting*. Diambil 100 µL hasil *pipetting* dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* baru. Selanjutnya ditambahkan 500 µL PBS, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C. Pelet hasil sentrifugasi kemudian diwarnai pewarnaan intraseluler dengan menambahkan 50 µL larutan fiksatif. Diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4°C dalam ruang gelap. Selanjutnya ditambahkan larutan permeabilitas (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) sebanyak 500 µL, dan dihomogenisasi. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C. Larutan antibodi spesifik (anti SOD) ditambahkan pada pelet sebanyak 50 µL dan diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4°C dalam ruang gelap. Dilakukan kembali penambahan larutan antibodi sekunder 50 µL pada pelet, dan diinkubasi kembali. Selanjutnya ditambahkan ± 400 µL PBS, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan dihitung oleh aliran BD FACS Calibur cytometer selama 45 menit (Luo *et al.*, 2017). Flow cytometry dilakukan dengan pancaran cahaya 488 nm pada kecepatan medium (500 sel/detik) (Ghule *et al.*, 2011).

4.6.11 Analisis Data

Data hasil perlakuan dalam penelitian ini yaitu kadar *Malondialdehida* (MDA) dan ekspresi *Superoxide dismutase* (SOD) ginjal dianalisis secara kuantitatif menggunakan analisis ragam ANOVA (*Analysis of variance*) yang dilanjutkan uji lanjutan *Posthoc Test* menggunakan BNJ (Beda Nyata Jujur) atau *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% atau $\alpha = 0.05$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase

Penelitian ini mengenai glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase, dengan dosis pemberian 6000 IU. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Luqmana dkk. (2014), bahwa pemberian streptokinase dosis 6000 IU (dapat menyebabkan glomerulonefritis akut yang mengacu pada peningkatan kadar BUN dan kreatinin sebagai akibat dari penurunan laju filtrasi glomerulus). Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) jantan. Selain kemampuan adaptasi dengan lingkungan yang baik, keunggulan tikus putih ialah memiliki kadar asam amino dan sistem metabolisme yang hampir menyerupai mamalia lain sehingga mempermudah dilakukannya penelitian (Miller *et al.*, 2010). Jenis kelamin jantan dipilih karena tingkat stres yang dimiliki cukup rendah dibandingkan dengan tikus putih betina. Tingkat stres tersebut dapat dipengaruhi oleh perubahan hormonal seperti pada masa siklus estrus yang menyebabkan ketidakstabilan hormon pada tikus putih betina. Pemilihan umur pada hewan coba didasarkan pada profil reproduksi di mana tikus berumur 6-8 minggu merupakan tikus pradewasa (*subadult*) yang sistem reproduksinya telah berkembang (Fitria dkk., 2015). Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin serum pada kelompok tikus kontrol positif (KP) dan kelompok tikus kontrol negatif (KN) **Tabel 5.1.**

Tabel 5.1 Nilai Rata-rata Kadar BUN dan Kreatinin Serum Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Nilai Rata – rata	Kelompok Tikus		Persentase Berdasarkan kontrol negative
	Kontrol Negatif (mg/dL)	Kontrol Positif (mg/dL)	Peningkatan (%)
BUN	16,15	17,28	6,99 %
Kreatinin	0,7	0,73	4,28 %

Berdasarkan rata-rata nilai di atas, kadar BUN dan kreatinin masih dalam batas normal sesuai dengan pendapat Bihun and Bauck (2004), bahwa kadar normal BUN pada tikus sebesar 12 – 22 mg/dL sedangkan kadar normal kreatinin pada tikus sebesar 0,38 – 0,8 mg/dL. Perhitungan persentase rata-rata hasil kontrol positif berdasarkan kontrol negatif terjadi peningkatan kadar BUN sebesar 6,99% dan kadar kreatinin sebesar 4,28%. Peningkatan persentase kadar BUN dan kreatinin pada kelompok kontrol positif dibandingkan kelompok kontrol negatif menunjukkan adanya kerusakan glomerulus sehingga BUN dan kreatinin yang seharusnya terfiltrasi dan dikeluarkan melalui urin kembali ke peredaran darah. Menurut Doloksaribu (2008), peningkatan pada kelompok kontrol positif tidak melebihi batas normal dapat terjadi karena perubahan singkat fungsi dari glomerulus yang dapat diimbangi dengan meningkatnya sekresi oleh tubuli. Selain itu, peningkatan kadar BUN dan kreatinin secara bermakna hanya terjadi apabila fungsi ginjal sudah mengalami penurunan sekitar 50 – 70% (Wijaya dan Miranti, 2005).

Kreatinin merupakan bentuk anhidrida dari kreatin yang sebagian besar disintesis di dalam otot melalui proses dehidrasi non-enzimatik dari kreatin fosfat. Kreatinin diekskresikan seluruhnya ke dalam urin melalui filtrasi

glomerulus karena memiliki molekul lebih besar dari ureum dan bersifat tidak permeabel terhadap membran tubulus (Guyton and Hall, 2006). Konsentrasi kreatinin dalam plasma pada individu sehat pada umumnya konstan, tidak terpengaruh oleh jumlah air yang diminum, aktivitas dan kecepatan produksi urin. Oleh karena itu, kenaikan kadarnya dalam plasma selalu mengindikasikan adanya penurunan ekskresi yang disebabkan oleh adanya gangguan fungsi ginjal (Sumaryono dkk., 2008). Penelitian Vishal dkk. (2008), menyatakan penggunaan kreatinin serum sebagai biomarker fungsi ginjal merupakan *delayed marker* nonspesifik dan tidak sensitif untuk diagnosa gagal ginjal akut saat ginjal belum mengalami kematian sel berupa apoptosis maupun nekrosis. Kadar kreatinin tetap statis kecuali jika terdapat kerusakan oleh trauma atau keadaan patologis parah pada ginjal (Kaliahpan, 2010).

BUN merupakan parameter yang menunjukkan jumlah urea nitrogen dalam darah sebagai produk metabolisme protein. Pembentukan ureum diawali dengan derivatisasi asam amino yaitu ornitina yang akan bergabung dengan *carbamoyl phosphate* membentuk sitrulin. Sitrulin akan membentuk *argininosuccinate* dan berubah menjadi arginina. Arginina lalu dipecah menjadi ornitina dan urea. Urea akan berdifusi dari sel hati ke cairan tubuh lalu diekskresikan melalui ginjal, sedangkan ornitina akan digunakan untuk siklus berulang (Wati, 2015). Peningkatan BUN dan kreatinin serum (azotemia) dapat dikategorikan menjadi prerenal, renal, dan postrenal. Glomerulonefritis akut merupakan penyebab azotemia renal dimana terjadi penurunan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) (Bijanti dkk., 2010).

Kondisi glomerulonefritis akut juga diketahui berdasarkan gambaran histopatologi ginjal **Lampiran 16** pada kelompok tikus kontrol positif (KP) terlihat gambaran HE ginjal tampak abnormal ditandai dengan hipertrofi glomerulus disertai penyempitan *Bowman space* dan hemorraghi sesuai dengan pendapat Bijol (2011), bahwa perubahan yang khas pada glomerulonefritis adalah bertambahnya sel-sel glomerulus yang disebabkan oleh pembengkakan sel, penambahan sel endotel dan sel epitel dalam glomerulus sehingga pembesaran glomerulus akan menyebabkan penyempitan pada *Bowman space*. Gambaran histopatologi ginjal kelompok tikus kontrol negatif (KN) terlihat normal yang ditandai dengan adanya kapiler darah dalam glomerulus dan *space bowman* yang lebar, serta epithelium tubulus kontortus proksimal dan distal tampak normal. Pada glomerulus normal akan terlihat sel-sel glomerulus berbentuk epitel selapis kubus dengan inti sel bulat dan padat, kapsula bowman masih lebar dan tidak terdapat sel radang pada glomerulus. Epitel kapsula bowman terlihat beraturan yang terdiri atas sel epitel pipih selapis (Mills, 2007). Tubulus kontortus proksimal dibatasi oleh epitel selapis kubus dengan banyak mikrovili membentuk *brush border*, sedangkan epitel tubulus kontortus distal tersusun atas epitel selapis kubus yang tidak memiliki *brush border* (Baqarizki dan Fiizdha, 2015). Pembuatan hewan model Glomerulonefritis Akut (GNA) hasil induksi streptokinase pada kelompok tikus kontrol positif menunjukkan gejala klinis berupa rambut kusam, serta terjadi peningkatan kadar BUN dan Kreatinin dalam darah (azotemia). Hasil pemeriksaan tersebut merupakan gejala klinis untuk mendiagnosa glomerulonefritis akut.

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry Terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA) Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase

Malondialdehida (MDA) sering digunakan sebagai indikator adanya stres oksidatif. Data hasil perhitungan kadar MDA pada tikus kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU), perlakuan 1 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 500 mg/kg BB), perlakuan 2 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 1000 mg/kg BB), dan perlakuan 3 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 1500 mg/kg BB) dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) **Lampiran 14** sehingga dilanjutkan pada uji *One Way* ANOVA. Pada uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) yang diberikan sebagai terapi pada hewan model glomerulonefritis akut hasil induksi streptokinase memiliki pengaruh terhadap penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) secara signifikan ($p < 0,05$). Setelah hasilnya signifikan dilanjutkan dengan uji lanjutan menggunakan *Tukey Test* **Tabel 5.1**.

Hasil pengukuran kadar *Malondialdehida* (MDA) organ ginjal pada kelompok tikus kontrol negatif (KN) menunjukkan rata-rata sebesar 502,75 ng/mL. Dalam kondisi fisiologis, tubuh tetap menghasilkan *Malondialdehida* namun dalam kadar normal. Sesuai dengan pendapat Repetto *et al.*, (2012), jika

dalam keadaan normal MDA akan tetap dihasilkan selama terjadinya biosintesis prostaglandin dalam sel, namun juga dihasilkan sebagai produk dari peroksidasi lipid terutama *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang merupakan reaksi berantai akibat penambahan oksigen radikal dan mengakibatkan kerusakan oksidatif pada membran sel.

Tabel 5.2 Rata-rata Kadar *Malondialdehida* (MDA) Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Kelompok	Rata-rata Kadar MDA (ng/mL)	Kadar MDA berdasarkan kontrol negatif (%)	Kadar MDA berdasarkan kontrol positif (%)
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	502,75 ± 41,85 ^a	-	-
Kontrol Positif	889,00 ± 94,14 ^b	76,82%	-
Perlakuan 1 (500 mg/kg BB)	494,82 ± 18,85 ^a	-	44,33%
Perlakuan 2 (1000 mg/kg BB)	490,87 ± 29,88 ^a	-	44,78%
Perlakuan 3 (1500 mg/kg BB)	485,87 ± 97,26 ^a	-	45,34%

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

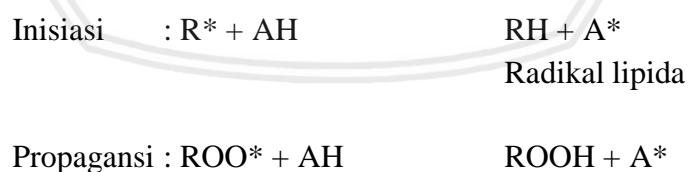
Kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan rata-rata kadar MDA sebesar 889,00 ng/mL. Jumlah tersebut mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) serta menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Tingginya kadar MDA pada kontrol positif disebabkan oleh adanya stres oksidatif akibat induksi streptokinase yang menyebabkan glomerulonefritis akut. Streptokinase memiliki kemampuan mengubah plasminogen menjadi plasmin yang akan mengaktifkan bradikinin. Bradikinin akan berikatan dengan β_1 integrin yang dimiliki oleh makrofag sehingga

makrofag akan teraktivasi untuk menghasilkan radikal bebas. Peningkatan pembentukan radikal bebas dapat menyebabkan stress oksidatif. Peningkatan stress oksidatif menggambarkan terjadinya peningkatan jumlah sel makrofag dan aktivasi sitokin pro-inflamasi yang berada di dalam jaringan ginjal. Stress oksidatif yang meningkat menyebabkan kerusakan DNA, oksidasi protein reseptor ataupun fungsional (reseptor, enzim, protein transport) sehingga menyebabkan rusaknya protein serta membran sel yang mengandung asam lemak tak jenuh yang akan menjadi peroksida lipid (Ulilalbab, 2015). Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lemak tak jenuh rantai panjang yang menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik dan juga menyebabkan kerusakan pada membran sel. *Malondialdehida* dapat terbentuk apabila *reactive oxygen species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lemak dari membrane sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid (Yunus, 2001). *Malondialdehida* yang dihasilkan tersebut dapat dijadikan indeks peroksidasi lipid dan dapat dijadikan sebagai alat ukur aktivitas radikal bebas (Suryohudoyo, 2000).

Pada perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 terjadi penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) sebesar 44,33% (perlakuan 1), 44,78% (perlakuan 2), dan 45,34% (perlakuan 3). Hal tersebut disebabkan karena buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) mengandung metabolit sekunder salah satunya yaitu antosianin yang memiliki fungsi sebagai antioksidan. Menurut (Youdim *et al.*, 2000), antosianin Blueberry mampu menghambat pengembangan

Reactive Oxygen Species (ROS) dalam sel darah merah yang terpapar hidrogen peroksida. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Prior (2003), bahwa antosianin dapat bertindak sebagai antioksidan langsung dengan menyumbangkan atom hidrogen (elektron) dari struktur fenolik mereka ke radikal bebas.

Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama sebagai pemberi atom hidrogen disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagansi. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Prakash, 2001).



Gambar 5.1 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Prakash, 2001).

Hasil pemberian ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan. Namun ketiga dosis tersebut dapat menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) sebesar 44,33 % pada

perlakuan satu, 44,78 % pada perlakuan dua, dan 45,34 % pada perlakuan tiga sehingga ekstrak etanol Blueberry dapat digunakan sebagai terapi Glomerulonefritis Akut (GNA).

5.3 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Blueberry Terhadap Ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) Hewan Model Glomerulonefritis Akut Hasil Induksi Streptokinase

Superoxide Dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan yang termasuk dalam antioksidan intraseluler (didalam sel) yang dikatalis oleh dismutase anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Sugito, 2012). Data yang diperoleh dari hasil perhitungan ekspresi SOD pada tikus kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU), perlakuan 1 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 500 mg/kg BB), perlakuan 2 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 1000 mg/kg BB), dan perlakuan 3 (diinduksi streptokinase dosis 6000 IU dan terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 1500 mg/kg BB) dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Untuk mengetahui perbedaan yang nyata maka harus dilakukan uji *One Way ANOVA* **Lampiran 16**, setelah hasilnya signifikan dilanjutkan dengan uji lanjutan *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% atau $\alpha = 0.05$ **Tabel 5.3**.

Berdasarkan hasil analisa statistika terhadap ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) organ ginjal hewan model Glomerulonefritis Akut (GNA) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara

kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Kelompok kontrol negatif (KN) menunjukkan rata-rata sebesar 30,79 %. Menurut Masyrifah (2017), SOD merupakan salah satu enzim yang berperan sebagai antioksidan dalam tubuh. SOD melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadinya peradangan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Enzim tersebut memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktifitas senyawa oksigen reaktif yang menyebabkan stres oksidatif (Winarsi, 2007).

Tabel 5.3 Rata-rata Ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Kelompok	Rata-rata Ekspresi SOD (%)	Ekspresi SOD berdasarkan kontrol negatif (%)	Ekspresi SOD berdasarkan kontrol positif (%)
		Penurunan	Peningkatan
Kontrol Negatif	30,79 ± 1,80 ^b	-	-
Kontrol Positif	17,05 ± 3,17 ^a	48,28 %	-
Perlakuan 1 (500 mg/kg BB)	32,97 ± 8,95 ^b	-	48,28 %
Perlakuan 2 (1000 mg/kg BB)	34,92 ± 7,52 ^b	-	51,17 %
Perlakuan 3 (1500 mg/kg BB)	37,01 ± 6,39 ^b	-	53,93 %

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

Kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan rata-rata ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) sebesar 17,05 %. Jumlah tersebut mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN). Penurunan ekspresi SOD pada kontrol positif disebabkan oleh adanya stres oksidatif akibat induksi streptokinase yang menyebabkan glomerulonefritis akut. Streptokinase memiliki kemampuan mengubah plasminogen menjadi plasmin yang akan

mengaktifkan bradikinin. Bradikinin akan berikatan dengan $\beta 1$ integrin yang dimiliki oleh makrofag sehingga makrofag akan teraktivasi untuk menghasilkan radikal bebas. Peningkatan pembentukan radikal bebas dapat menyebabkan stress oksidatif (Ulilalbab, 2015). Mitchel and Contran (2008), berpendapat bahwa pada keadaan stres pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari proses metabolisme seluler lebih tinggi dibandingkan dengan pemusnahannya yang mengakibatkan sistem pertahanan tubuh (antioksidan enzimatis) bekerja lebih keras untuk memusnahkan ROS.

Pada perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 terjadi peningkatan ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) sebesar 48,28% (perlakuan 1), 51,17% (perlakuan 2), dan 53,93% (perlakuan 3). Hal tersebut disebabkan oleh pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) yang mengandung antosianin sebagai antioksidan yang akan mensintesis peningkatan enzim SOD untuk menetralkan radikal bebas yang berada didalam tubuh. Widyastuti dan Nyoman (2012), menyatakan bahwa antosianin merupakan sub-tipe senyawa organik flavonoid yang memiliki kemampuan untuk merangsang Cu-Zn-SOD yang berfungsi melindungi sel dari serangan stres oksidatif sehingga tidak terbentuk peroksida lipid yang berkepanjangan.

Menurut Sugito (2012), mekanisme antosianin sebagai antioksidan dalam meningkatkan enzim SOD disebabkan adanya komponen fenolik yang menginduksi gen enzim antioksidan, kemudian komponen fenolik menginduksi *Antioxidant Receptor Element* (ARE) dan menginduksi DNA untuk memproduksi enzim antioksidan. Komponen fenolik pada antosianin

dapat memicu terekspresinya gen enzim antioksidan contohnya Mn-SOD, Cu-Zn-SOD, sehingga ekspresi SOD menjadi meningkat (Mann *et al.*, 2007). Antioksidan yang terinduksi akan melindungi lipid dari proses peroksidasi dengan cara mendonorkan elektronnya ke radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak akan menyerang sel dan menyebabkan terputusnya reaksi oksidasi (Clarkson and Thompson, 2000).

Hasil pemberian ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan. Namun ketiga dosis tersebut dapat meningkatkan ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD) sebesar 48,28 % pada perlakuan satu, 51,17 % pada perlakuan dua, dan 53,93 % pada perlakuan tiga sehingga ekstrak etanol Blueberry dapat digunakan sebagai terapi Glomerulonefritis Akut (GNA). Dari hasil penelitian didapatkan bahwa ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) memiliki pengaruh sebagai terapi Glomerulonefritis Akut (GNA) terhadap penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) dan peningkatan ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD). Menurut Yustika dkk. (2013), tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas yang dapat memperbanyak rantai kerusakan (Valko *et al.*, 2005; Winarsi, 2007). Pembentukan MDA dapat dicegah oleh senyawa antioksidan yang berasal dari dalam tubuh seperti *Superoxide Dismutase* (SOD) yang menjadi pertahanan utama dalam tubuh untuk mengatasi stres oksidatif (Dianti dkk., 2016). Tingginya SOD menggambarkan rendahnya produk oksidasi lipid (Winarsi, 2007).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dapat digunakan sebagai terapi Glomerulonefritis Akut (GNA) berdasarkan penurunan kadar *Malondialdehida* (MDA) organ ginjal dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB.
2. Ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dapat digunakan sebagai terapi Glomerulonefritis Akut (GNA) berdasarkan peningkatan *Superoxide Dismutase* (SOD) organ ginjal dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB.

6.2 Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan urin (urinalisis) sebagai metode dalam mendiagnosa adanya glomerulonefritis akut sehingga peneguhan diagnosa lebih kuat dan memperkaya data yang dimiliki oleh peneliti. Serta diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas ekstrak etanol Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dengan menggunakan dosis tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Alunat, D. E. S., I. M. Kardenia, dan I. M. Suarsana. 2014. Pengaruh Konsumsi Urin Sapi Bali Terhadap Kadar Blood Urea Nitrogen, Kreatinin serta Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus. *Buletin Veteriner Udayana*, 6(2): 169-173.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Benjamin Franklin Station. Washington.
- Ariputri, F. A. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Dosis Bertingkat Terhadap Gambaran Mikroskopis Ginjal. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Asrini, R. 2013. Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus novergicus*) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Baqarizki dan Fiizhda. 2015. Studi Awal: Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar, dan Ginjal Tikus Diabetes Mellitus yang di Induksi STZ dengan Pewarnaan Hematoxillin Eosin [Skripsi]. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Behrman, A. K. 2000. *Ilmu Kesehatan*. EGC: Jakarta.
- Bihun, C., and L. Bauck. 2014. Basic Anatomy, Physiology, Husbandry, and Clinical Techniques. In: *Quesenberry, E Katherine; Carpenter W, James*. Missouri: Saunders, p. 290.
- Bijanti, R., M. G. A. Yulianti, R. S. Wahjuni, dan R. B. Utomo. 2010. Buku Ajar Patologi Klinik Veteriner. Airlangga University Press, Surabaya.
- Bijol, V. 2011. *Postinfectious Glomerulonephritis Accute Diffuse Proliferative*. http://www.renaldigest.com/egi-bin/nephrology/preview?ADD=0&LESION_ID=1&POST=toc. [10 Desember 2018].
- Brown, S. A. 2013. Glomerular Disease in Small Animals. Merck Veterinary Manual. http://www.merckmanuals.com/vet/urinary_system/noninfection_diseases_of_the_urinary_system_in_small_animals/glomerular_disease_in_small_animals.html. [16 September 2018]
- Candrawati, S. 2013. Pengaruh Aktivitas Fisik Terhadap Stres Oksidatif. *Mandala of Health*, 6(1): 454-461.
- Choi, Y., Heon-Sang, J., and Lee, J. 2007. Antioxidant Activity of Methanolic Extract from Some Grains Consumed in Korea. *Food Chemistry*. 103: 130-138.
- Clarkson, P. M., and Thompson, H. S. 2000. Antioxidant: What Role Do They Play in Physical Activity and Health. *Am J Clin Nutr*, 729(Suppl): 637-346.



- Destiawan, R. A. 2016. Pemberian Ekstrak Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Pada Mencit (*Mus musculus*) Model Glomerulonefritis Akut Hipersensitifitas Tipe III Terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA) dan Aktivitas *Superoksida dismutase* (SOD) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Dewi, C. S. 2012. Pengaruh Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) Sebagai Antihelmintik Terhadap Waktu Kematian Cacing *Ascaris suum*, *Goeze In Vitro* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Dianti, R. R., Rusdi, Dian, E. 2016. Kadar *Malondialdehida* dan Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase pada Hipertensi dan Normotensi. *Bioma J*, 12(1): 50-53.
- Djamali, A. 2007. Oxidative Stress as a Common Pathway to Chronic Tubulointerstitial Injury in Kidney Allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F445-F455.
- Doloksaribu, B. 2008. Pengaruh Proteksi Vitamin C Terhadap Kadar Ureum, Kreatinin dan Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit yang Dipapar Plumbum [Tesis]. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 82: 47-95.
- Ezumi, M. F., S. S. Wan., C. G. Farid, and S. S. J. Mohsin. 2007. Morphological Characteristics of The Adrenals of *Rattus norvegicus*: A Revisit by Scanning Electron Microscopy. *Annuals of Microscopy Journal*, Vol 9: 13.
- Fauziah, H. 2015. *Gambaran Cystitis Melalui Pemeriksaan Klinis dan Laboratoris (Uji Dipstick dan Sedimentasi Urin) Pada Kucing di Klinik Hewan Makassar* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin.
- Fitria, L., Mulyati, C. M. Tiraya, dan A. S. Budi. 2015. Profil Reproduksi Jantan Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Stadia Muda, Pradewasa, dan Dewasa. *Jurnal Biologi Papua*, 7(1): 29-36.
- Fitriana, I., A. D. Wijayanti, P. W. Sari, R. G. D. Satria, D. C. B. Setiawan, Y. H. Fibrianto, dan W. S. Nugroho. 2017. Kadar Malondialdehid Tikus Diabetes Melitus Tipe 2 dengan Terapi Ekstrak Media Penumbuh Sel Punca Mesenkimal. *ACTA Veterinaria Indonesiana*, 5(1): 29-36.
- Galambos, A. R. 2012. *The Effects of Blueberry Anthocyanidins On Antioxidant Enzyme Activity in Human HEPG2 Cells*. Master of Science. University of Georgia.
- Ghule, A. E., S. S. Jadhav, and S. L. Bodhankar. 2011. Renoprotective Effect of *Linum Usitatissimum* Seeds Through Haemodynamic Changes and Conservation of Antioxidant Enzymes in Renal Ischaemia-Reperfusion Injury in Rats. *Arab Journal of Urology*, 9: 215-221.

- Guyton, A. C., and J. E. Hall. 2006. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Penerjemah: Irawati, Ramadani D, Indriyani F. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Halliwell, B. and J. M. C Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth edition*. New York. Oxford University Press.
- Hanifah, L. 2008. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Tingkat Nekrosis Epitel Glomerulus dan Tubulus Ginjal Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi CCl₄ (Karbon tetraklorida) [Skripsi]. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Malang.
- Harborne. 2005. *Encyclopedia of Food and Color Additives*. CRP Press, Inc. New York.
- Haribi, R. S., T. Darmawati, dan Hartiti. 2009. Kelainan Fungsi Hati dan Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus, L.*) Akibat Suplementasi Tawas dalam Pakan. *Jurnal Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*, 2(2): 11-19.
- Haugen, E. and K. Nath. 2001. The Involvement of Oxidative Stress in The Progression of Renal Injury. *Blood Purif*, 17: 58-56.
- Hidayani, A. R. E., A. Umboh, S. Gunawan. 2016. Profil Glomerulonefritis Akut Pasca Streptokokus pada Anak yang Dirawat di Bagian Ilmu Kesehatan Anak RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado. *Jurnal e-Clinic (eCl)*, 4(2): 20-29.
- Jha, A., and S. Paul. 2017. Evaluation of Anti Imflammatory Effect of Blueberry (*Vaccinium*) Fruit Extract in Wistar Rats: An Experimental Study. *Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(11): 156-159.
- Kaliahpan, P. 2010. *Perubahan Kadar Ureum dan Kreatinin Sebelum dan Sesudah Hemodialisis pada Penderita Gagal Ginjal di RSUD Dr. Pirngadi* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Keith, K. L., and R. J. Wyatt. 2005. Glomerulonephritis. *Jurnal Medical Clinics*, 16(5): 67-85.
- Kenward, R., and C. K. Tan. 2003. *Penggunaan Obat pada Gangguan Ginjal, dalam Aslam Farmasi Klinis: Menuju Pengobatan Rasional dan Penghargaan Pilihan Pasien*. PT Elex Media Komputindo Gramedia, Jakarta: 140-153.
- Kohen, R., and Nyska, A. 2002. Oxidation of Biological System: Oxidative Stress Phenomen, Antioxidant, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicology Pathology*, 30(6): 620-650.
- Kovacic, P., and Jacintho, J. D. 2001. Mechanisms of Carcinogenesis: Fokus on Oxidative Stess and Electron Tranfer. *Curr. Med. Chem* 8: 773-796.
- Kumar, V., R. S. Cotran, S. L. Robbins. 2013. *Buku Ajar Patologi Robbins Ed 7. Vol 1*. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta.

- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lailani, M., Z. Edward, dan R. B. Herman. 2013. Gambaran Tekanan Darah Tikus Wistar Jantan dan Betina Setelah Pemberian Diet Tinggi Garam. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2(3): 146-150.
- Lee, J., N. Koo, and D. B. Min. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compre Rev. in Foof Sci and Food Safety*, 3: 21-33.
- Low, W. J., Mary A., Nadia, O., Benedito C., Filipe Z., and David T. 2007. Ensuring the Supply of and Creating Demand for a Biofortified Crop with a Visible Trait: Lessons Learned from the Introduction of Orange-Fleshed Sweet Potato in Drought-Prone Areas of Mozambique. *Food and Nutrition Bulletin*, 28(2): 258-270.
- Lumbanbatu, S. M. 2003. Glomerulonefritis Akut Pasca Streptokokus pada Anak. *Jurnal Sari Pediatri*, 5(2): 58-63.
- Luo, Q., H. Cui, H. Deng, P. Kuang, H. Liu, Y. Lu, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, and L. Zhao. 2017. Histopathological Findings of Renal Tissue Induced by Oxidative Stress Due to Different Concentrations of Fluoride. *Journal of Vet Med*, 8(31): 50430-50446.
- Luqmana, C., Aulanni'am, P. Trisunuwati. 2014. Studi Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Kadar *Malondialdehida* (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Hasil Induksi Streptokinase. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Madaio, M. P., and J. T. Harrington. 2001. The Diagnosis Glomerular Disease Acute Glomerulonephritis and Nephrotic Syndrome. *Arch Intern Med*. 161(1): 25-34.
- Maharani, H. 2012. Uji Potensi Nefroprotektif Senyawa Dimer dari Isoeugenol Terhadap Histologi Ginjal Mencit Jantan Galur DDY [Skripsi]. Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Mann, G. E., Rowlands, D. J., Li F. Y. L., de Winter, P. and Siow, R. C. M. 2007. Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Dietary Isoflavones: Role of NO in Nrf2-Mediated Antioxidant Gene Expression. *Cardiovascular Reseach*, 75(2): 261-274.
- Marks, D. B., A. D. Marks, and C. M. Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Edisi 1. EGC: Jakarta. 513-30.
- Maryam, S., dan G. Hadisoebroto. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Buah Blueberry (*Genus vaccinium*) dengan Metode DPPH. *Jurnal Sabdariffarma*, 1: 9-13.
- Masyrifah, M. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) Terhadap kadar Enzim Superoksida Dismutase pada


- Tikus Wistar Jantan (*Rattus novergicus* L.) Diabetes Mellitus [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Maust, M. 2002. Introduced Species Summary Projects Norway Rat (*Rattus novergicus*).
http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoffburg/invasion_bio/inv_spp_summ/Rattus_novergicus.html. [11 September 2018]
- Mayer, Weslh, and Kowalak. 2011. Buku Ajar Patologi. EGC, Jakarta.
- Migriauli, L. 2004. Effect of Diet and Physical Activity on The Markers of Oxidative Stress. Auckland: Auckland University of Technology.
- Miller, S. D., J. C. Russel, H. E. MacInnes, Abdelkrim, and Fewster, R. M. 2010. Multiple Pternity in Wild Population of Invasive *Rattus* Species. *New Zeland Journal of Ecology*, 34(3): 360-362.
- Mills, S. 2007. *Histology for Pathologist, 3 rd Edition*. United States; Lippicott Williams and Wilkins.
- Mitchel, R. N., and Contran R.S. 2008. Cell Injury, Cell Death, and Adaptions. Basic Pathology Elsevier Saunders, Philadelphia. 1-30.
- Moore, K. E., N. Morris, N. Dhupa and J. E. Rush. 2007. Restrospective Study of Streptokinase Administration in 46 Cats with Arterial Thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 10: 245-257.
- Myers, P., and D. Armitage. 2004. "*Rattus novergicus*" Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus.html. [11 September 2018].
- Nair, A. R, C. M. Elks, J. Vila, F. D. Piero, D. B. Paulsen, J. Francis. 2014. A Blueberry-Enriched Diet Improves Renal Function and Reduces Oxidative Stress in Metabolic Syndrome Animals: Potential Mechanism of TLR4-MAPK Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 9(11): e111976.
- Nelson, E., D. Wahab, dan A. Samik. 2000. Ed, 15, Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus. EGC: Jakarta, 3: 1813 – 1814.
- Ngatidjan. 2006. Metode Laboratorium dalam Toksikologi. Metode Uji Toksisitas. Hal 86-135.
- Nurhayati, Siti, Kisnanto, Teja, Syaifudin, Mukh., 2011. *Superoxide dismutase (SOD) Apa dan Bagaimana Peranannya dalam Radioterapi*. *Jurnal IPTEK Ilmiah Populer*, 13(2): 67-74.
- Okaiyeto, S.O., B. Y. Kaltungo, I. I. Onoja and L. K. Okoro. 2013. A Case of Glomerulonefritis in A 4-Year-Old Kano Brown Doe. *J Vet Adv*, 3(9): 256-260.
- Pardede, S. O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus. *Jurnal Sari Pediatri*, 11(1): 56-65.

- Pasma, A. F. N. 2016. Pengaruh Minuman Berenergi Terhadap Terjadinya Penyakit Ginjal Kronis pada Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus novergicus*) dengan Marker Imunohistokimia α -Smooth Muscle Actin [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Pavani, B. Ch., Kumar, S. V., Ramaro, J., Rau, B. R., dan Mohanty, S. 2012. Role of Biochemical Marker for Evaluation of Oxidative Stress in Cataract. *Inj J Pharm Bio Sci*, 2(2): 178-184.
- Pernefri. 2011. *4th Report of Indonesian Renal Registry*. Perkumpulan Nefrologi Indonesia.
- Plumb, D. C. 2008. *Veterinary Drug Handbook*. Sixth Edition. Blackwell Publishing Professional. South State Avenue: 83-937.
- Prabu, O. G., dan H. Shatri. 2015. Penggunaan ACE – *Inhibitor* untuk Mengurangi Proteinuria pada Sindrom Nefrotik. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*, 3(2): 135-140.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. Medallion Laboratories Analytical Progress. 19 (2), Minnesota.
- Price, S. A., and M. W. Lorraine. 2006. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses – Proses Penyakit*. EGC: Jakarta.
- Prior, R. L. 2003. Fruits and Vegetables in The Prevention of Cellular Oxidative Damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3): 570-578.
- Rachmadi, 2010. Diagnosis dan Penatalaksanaan Glomerulonefritis Akut [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Padjajaran RS. DR Hasan Sadikin Bandung.
- Reece. 2006. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Edisi ke-3. Australia: Blackwell Publishing Asia. Hlm. 269-302.
- Repetto, M., J. Semprine, and A. Boveris. 2012. Lipid Peroxidation Chemical Mechanism, Niological Implication and Analytical Determination. Dalam Lipid Peroxidation, Angel Catala (Ed), InTech, DOI: 10.5772/45943.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc*, 63(3): 112-116.
- Riskawa, H., dan D. Rachmadi. 2010. Glomerulonefritis Akut Pada Anak [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Padjajaran.
- Rodbotten, M., B. K. Martinsen, H. J. Rosenfeld, P. Lea, and K. Haffner. 2005. Quality of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Jam. *Journal of Fruit Science*, 5(2): 61-71.
- Schneider, S. M., R.E. Cianciolo, M.B. Nability, F.J. Clubb Jr, C.A. Brown, and G.E. Lees. Prevalence of Immune-Complex Glomerulonephritides in Dogs Biopsied for Suspected Glomerular Disease: 501 Cases (2007–2012). *Journal of Vet Intern Medicine*. 27: S67-S75.

- Setyawan, W. E., 2015. Terapi Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) Terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Hasil Induksi Streptokinase [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Sharma, T. K., R. Singh, and V. K. Yadav. 2015. Toxic Effect of Titanium (TiO_2) on Wistar Rat (*Rattus novergicus*) Injected by Intravenously. *Journal of Materials Science & Nanotechnology*, 3(1): 1-7.
- Shofia, V., Aulanni'am, dan Mahdi, C. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Prismaticum*) Terhadap Kadar *Malondialdehida* dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal pada Tikus (*Rattus novergicus*) Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia Student Journal*, 1(2): 119-125.
- Soleha, T. U., dan M. A. P. Yudistira. 2016. Blueberry (*Vaccinium corrymbosum*) dalam Menghambat Proses Inflamasi. *Majority*, 5(1): 63-67.
- Sugito. 2012. Aktivitas Antioksidan Biologis Sorgum dan Jewawut Serta Aplikasinya Pada Pencegahan Penyakit Degeneratif. *Jurnal Pembangunan Manusia*, 6(1): 116-128.
- Sulyok, E. 2004. *Acute Proliferative Glomerulonephritis*. Lippincott Williams and Wilkins *Pediatric Nephrology*. Philadelphia. 601-613.
- Sumaryono, W., A. E. Wibowo, S. Ningsih, K. Agustini, R. Sumarny, F. Amri, H. Winarno. 2008. Analisis Urea-Kreatinin Tikus Putih Pasca Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa dan Herba Pegagan. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Hal 35-40 ISSN 1693-1831.
- Suryohudoyo, P. 2000. Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Ilmu Kedokteran Molekuler. Sagung Seto. Jakarta. 31-46.
- Ulilalbab. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kelopak Rosella Terhadap *Malondialdehida* dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok [Tesis]. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Airlangga.
- Valko, M. 2006. Free Radical, Metal and Antioxidant in Oxidative Stress Induced Cancer, *J. Chem-Biol, Rusia*, edisi 160, p. 1-40.
- Vishal, S., Vaidya, A. Michael, Ferguson, V. Joseph, Bonventre. 2008. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Wang, Y.P., M. L. Cheng, B. F Zhang, M. Mu, and J. Wu. 2010. Effect of Blueberry on Hepatic Fibrosis and Transcription Factor *Nrf2* in Rats. *Journal of Gastroenterology*, 16(21): 2657-2663.
- Wati, C. D. K. 2015. *Toksistas Subakut Infusa Biji Persea Americana Mill Pada Tikus Galur Sprague Dawley Terhadap Kadar Blood Urea Nitrogen dan Kreatinin* [Skripsi]. Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

- Widianto, S. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Strawberry (*Fragaria x annanassa Duchesne*) Terhadap Kerusakan Morfologi Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis Toksik [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Widyastuti, S. K., dan S. Nyoman. 2012. Pengaruh Pemberian Isoflavon Terhadap Peroksidasi Lipid Pada Hati Tikus Normal. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(4): 483-491.
- Wijaya, I., dan Miranti. 2005. *Patologi Ginjal dan Saluran Kemih*. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kaninus. Yogyakarta.
- Yodmanee, S., T. T. Karrila, and P. Pakdeechanuan. 2011. Physical, Chemical, and Antioxidant Properties of Pigmented Rice Grown in Southern Thailand. *International Food Research Journal*, 18(30): 901-906.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., & Joseph, J. A. 2000. Polyphenolics Enhance Red Blood Cell Resistance to Oxidative Stress: in Vitro and in Vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1523(1): 117-122.
- Yunus, M. 2001. Pengaruh Antioksidan Vitamin C terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik. *Jurnal Pendidikan Jasmani*, 9(1): 9-16.
- Yustika, A. G., Aulanni'am, dan S. Prasetyawan. 2013. Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cylosporine-A*. *Kimia Student Journal*, 1(2): 222-228.

Lampiran 1. Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 962-KEP-UB

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


PENELITIAN BERJUDUL : PERBANDINGAN TERAPI BENAZEPRIL DAN EKSTRAK BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum*) TERHADAP EXPRESI INOS DAN HISTOPATOLOGI GINJAL PADA HEWAN MODEL GLUMERULONEFRITIS TIPE NEFRITOGENIK

PENELITI : AHMAD FAUZI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 22 Mei 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

NB: Nama yang terlampir pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti

Lampiran 2. Uji Determinasi Buah Blueberry



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 264 / 102.7 / 2018
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Blueberry**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : NURINA TITISARI
 NIP : 19860122 201504 2 001
 Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman blueberry

Kingdom : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta (tumbuhan berbunga)
 Class : Magnoliopsida (berkeping dua)
 Ordo : Ericales
 Famili : Vacciniaceae
 Genus : Vaccinium
 Section : *Vaccinium* sect. *Cyanococcus* Rydb.
 Spesies : *Vaccinium corymbosum*
 Nama Umum : Blueberry.
 Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-

- 27a-28b-29b-30b-31a-32a-33b-35a-36d-37b-38b-39b-40b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76b-333b-334b-335b-366a-367b-368b-369b-370b-371b-372a-373b-381a-382b-383a-384a-1.
2. Morfologi : Habitus: Semak, tinggi 10 cm – 4 m. Daun: Ovata atau lanceolata, 1 – 8 cm x 0,5 – 3,5 cm, hijau. Bunga: Bentuk bel, putih, merah, merah muda atau kehijauan. Buah: Buni, berdaging lunak, tebal, berair, berwarna biru tua. Biji: Kecil, berkumpul lepas, memiliki salut biji, kekuningan. Akar: Tunggang, kecoklatan.
3. Nama Simplisia : *Vaccinium Fructus* / Buah blueberry.
4. Kandungan Kimia : Antosianin, proantosianidin, resveratrol, flavonol, tanin.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka

- Backer, C.A. & Bakhuizen Van Den Brink, R.C. 1963. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol I. N.V.P. Noordhoff, Groningen.
- Backer, C.A. & Bakhuizen Van Den Brink, R.C. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol. II. N.V.P. Noordhoff, Groningen.

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

Batu, 20 Juli 2017

Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin RM, Apt. M. Kes.
 NIP.19611102 199103 1 003





PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

SURAT KETERANGAN EKSTRAK
 No. 074 / 116C / 102.7 / 2018

Bersama ini kami sampaikan hasil ekstraksi berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama : NURINA TITISARI
 NIP : 198601222015042001
 Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Blueberry
 Nama latin : Vaccinium corymbosum
 Bagian sampel : Buah
 Bentuk sampel : Kering
 Asal sampel : Malang
 Jumlah sampel : 500 gram
 Tanggal penerimaan :-


3. Hasil

No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 Kali
	c. Pelarut	Etanol 70%
	d. Jumlah pelarut	1500 mL
	e. Waktu evaporasi	2Jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Jumlah bahan tambahan	-
	d. Berat / volume	425 ml

4. Pustaka

- Ditjen POM, 1986. "Sediaan Galenik", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Sudjadi, 1986. "Metode Pemisahan", UGM Press, Yogyakarta.
- Nugroho, Agung. 2017. "Teknologi Bahan Alam". Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 26 Juli 2018
 Kepala UPT Materia Medica Batu






PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 67D / 102.7 / 2018 Halaman : 1 dari 1
 Sifat : Biasa
 Perihal : Surat Keterangan Skrining Fitokimia

Memenuhi permohonan saudara :
 Nama : Nurina Titisari
 NIP : 19860122 2015 04 2001
 Fakultas : Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Kami menerangkan bahwa yang bersangkutan telah melakukan Skrining Fitokimia untuk bahan penelitian dari Ekstrak Blueberry dengan menggunakan pelarut Etanol 70%. Adapun proses skrining dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu dengan rincian sebagai berikut :

Bahan : Aquadest
 HCl 2M

Alat : Tabung Reaksi Penjepit Tabung Reaksi Spatula Stainlesssteel
 Pipet Tetes Gelas Ukur Bunsen
 Corong Gelas Beaker Glass

Cara Kerja :

I. Identifikasi Antosianin

2 ml sampel ekstrak → Ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama ± 10 menit → Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi → Ditambahkan 3 tetes HCl 2M → Dipanaskan selama kurang lebih 5 menit pada suhu 100°C → Hasil Positif: warna merah tidak pudar

Hasil :

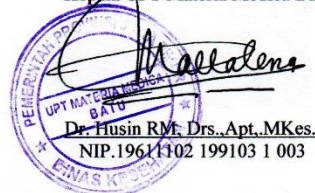
Nama Sampel	Antosianin
Blueberry	+

Kesimpulan :

- Uji Antosianin → Hasil Positif (+) mengandung Antosianin, ditunjukkan dengan adanya warna merah pada larutan yang tidak pudar

Demikian keterangan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 20 Juli 2018
 Kepala UPT Materia Medica Batu





**LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU DAN KEAMANAN PANGAN
(TESTING LABORATORY OF FOOD QUALITY AND FOOD SAFETY)**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

Jl. Veteran, Malang 65145, Telp. (0341) 573358
E-mail : labujipangan_thpub@yahoo.com

**KEPADA : Sari Murni Indah Agustini
FKH UB
MALANG**

**LAPORAN HASIL UJI
REPORT OF ANALYSIS**

Nomor / Number : 0963/THP/LAB/2018
 Nomor Analisis / Analysis Number : 0963
 Tanggal penerbitan / Date of issue : 17 Desember 2018
 Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
The undersigned ratifies that examination
 Dari contoh / of the sample (s) of : **EKSTRAK BLUEBERRY**
 Untuk analisis / For analysis :
 Keterangan contoh / Description of sample :
 Diambil dari / Taken from :
 Oleh / By :
 Tanggal penerimaan contoh / Received : 06 Desember 2018
 Tanggal pelaksanaan analisis / Date of analysis : 06 Desember 2018
 Hasil adalah sebagai berikut / Resulted as follows :

PARAMETER	HASIL
ANTOSIANIN (ppm)	150,98

HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK
CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL
CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN
TANDING BARANG

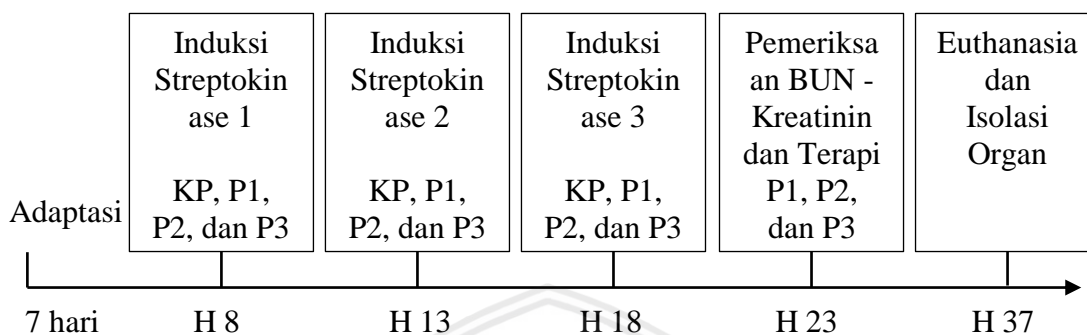


Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002



Lampiran 3. Skema Perlakuan

Perlakuan :



Keterangan :

KN = Kontrol Negatif

KP = Kontrol Positif

P1 = Perlakuan 1 (dosis terapi 500 mg/kg BB)

P2 = Perlakuan 2 (dosis terapi 1000 mg/kg BB)

P3 = Perlakuan 3 (dosis terapi 1500 mg/kg BB)

Penjelasan :

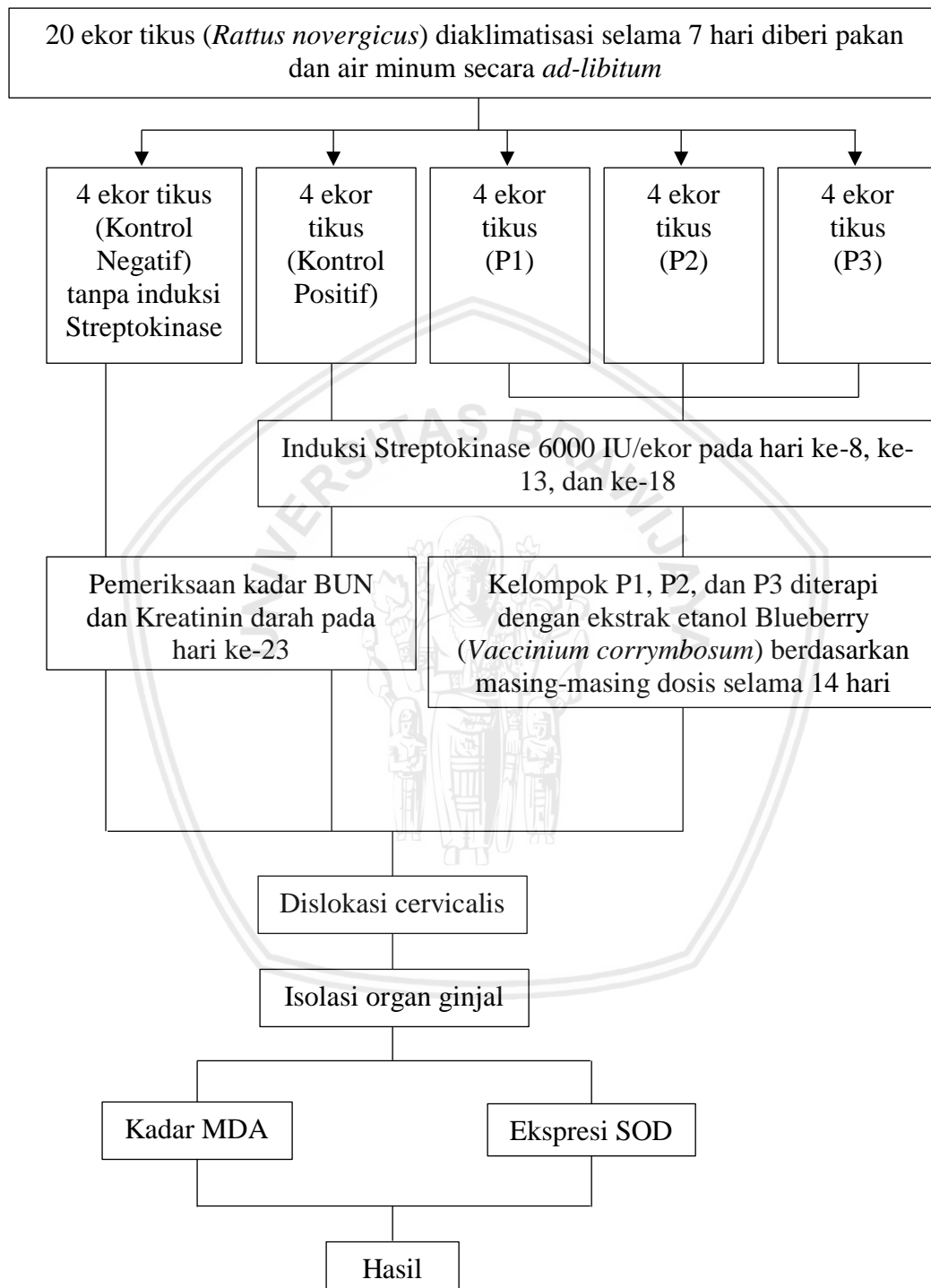
1. Hari ke-8 dilakukan induksi Streptokinase pertama pada KP, P1, P2, dan P3 sebanyak 6000 IU secara IV
2. Hari ke-13 dilakukan induksi Streptokinase kedua pada KP, P1, P2, dan P3 sebanyak 6000 IU secara IV
3. Hari ke-18 dilakukan induksi Streptokinase ketiga pada KP, P1, P2, dan P3 sebanyak 6000 IU secara IV
4. Hari ke-23 dilakukan pengambilan darah melalui sinus infraorbitalis untuk pemeriksaan kadar BUN dan Kreatinin darah, serta dilakukan pemberian

terapi ekstrak etanol Blueberry dengan masing-masing dosis yaitu 500 mg/kg BB untuk P1, 1000 mg/kg BB untuk P2, dan 1500 mg/kg BB untuk P3

5. Hari ke-37 dilakukan euthanasia dan isolasi organ ginjal untuk pemeriksaan kadar MDA dan ekspresi SOD



Lampiran 4. Kerangka Operasional



Lampiran 5. Perhitungan Dosis Obat Cacing

Dosis Pirantel pamoat (Praziquantel) yang diberikan pada tikus penelitian ini mengacu pada Plumb (2008), yaitu sebesar 30 mg/kg BB dengan pemberian secara peroral (PO).

Obat cacing yang diberikan = Combantrin[®] (Pirantel Pamoat) 125mg dalam 5

mL

Jumlah yang diberikan = 1 botol

Perhitungan dosis = $\frac{BB \times \text{dosis}}{[]}$

$$= \frac{0,2 \text{ kg} \times 30 \text{ mg/kg}}{125 \text{ mg/5mL}}$$

$$= 0,24 \text{ mL/tikus}$$

$$= 0,24 \text{ mL} \times 20 \text{ ekor tikus}$$

$$= 4,8 \text{ mL/20tikus}$$

Lampiran 6. Preparasi Streptokinase

Induksi dosis streptokinase pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Luqmana dkk. (2014), yaitu sebesar 6000 IU :

Perhitungan larutan streptokinase yaitu sebesar 6000 IU

- Diketahui

Dosis total streptokinase = 1.500.000 IU

Jumlah sediaan streptokinase = 550 mg

Dosis yang digunakan = 6000 IU

Jumlah tikus yang diinduksi streptokinase = 16 ekor

- Ditanya

a) Berapa jumlah sediaan streptokinase yang diambil ?

b) Berapa volume streptokinase yang dibutuhkan dalam sekali induksi ?

- Dijawab

Dosis streptokinase yang digunakan (X)

X = 6000 IU

a) Jumlah sediaan streptokinase (Y) yang diambil sehingga menjadi dosis 6000 IU

$$\frac{\text{Dosis Total}}{\text{Sediaan Total}} = \frac{\text{Dosis yang dibutuhkan}}{\text{Sediaan yang dibutuhkan}}$$

$$\frac{1.500.000 \text{ IU}}{550 \text{ mg}} = \frac{6000 \text{ IU}}{\text{Sediaan yang dibutuhkan}}$$

$$\text{Sediaan yang dibutuhkan} = \frac{550 \text{ mg} \times 6000 \text{ IU}}{1.500.000 \text{ IU}}$$

Sediaan yang dibutuhkan = 2,2 mg streptokinase/tikus (6000 IU)

= 35,2 mg streptokinase/16 tikus (96000 IU)

b) volume streptokinase (Z) yang dibutuhkan dalam sekali induksi

35,2 mg streptokinase (96000 IU) $\xrightarrow{\text{diencerkan}}$ 1,6 mL aqua pro injection

= 1,6 mL streptokinase/16 tikus (96000 IU)

= 0,1 mL/tikus (6000 IU)



Lampiran 7. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Blueberry

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

Buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

- dibagi menjadi dua bagian untuk mengeluarkan bijinya, dicuci bersih
- dikeringkan menggunakan oven 40 °C dengan kadar 3-6 %
- dihaluskan menggunakan blender
- diambil 500 g buah dan ditambahkan 1500 mL etanol 70 %
- dishaker dengan kecepatan 50 rpm, disaring
- dipekatkan filtrat dalam *rotary evaporator* suhu 40 °C selama 2 jam
- disimpan ekstrak etanol Blueberry dalam suhu 4 °C
- dilakukan uji fitokimia terhadap kandungan antosianin pada buah Blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

Hasil

2. Perhitungan Dosis (Dosis Individu)

A. Perlakuan Satu (Dosis 500 mg/kg BB)

$$= \frac{\text{Dosis X BB}}{\text{Sediaan}}$$

$$\text{Tikus 1} = \frac{500 \text{ mg/kg} \times 0,256 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,128 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 2} = \frac{500 \text{ mg/kg} \times 0,260 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,13 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 3} = \frac{500 \text{ mg/kg} \times 0,237 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,118 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 4} = \frac{500 \text{ mg/kg} \times 0,191 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,09 \text{ mL}$$

B. Perlakuan Dua (P2) (Dosis 1000 mg/kg BB)

$$= \frac{\text{Dosis x BB}}{\text{Sediaan}}$$

$$\text{Tikus 1} = \frac{1000 \text{ mg/kg} \times 0,228 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,228 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 2} = \frac{1000 \text{ mg/kg} \times 0,267 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,267 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 3} = \frac{1000 \text{ mg/kg} \times 0,223 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,223 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 4} = \frac{1000 \text{ mg/kg} \times 0,251 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,251 \text{ mL}$$

C. Perlakuan Tiga (P3) (Dosis 1500 mg/kg BB)

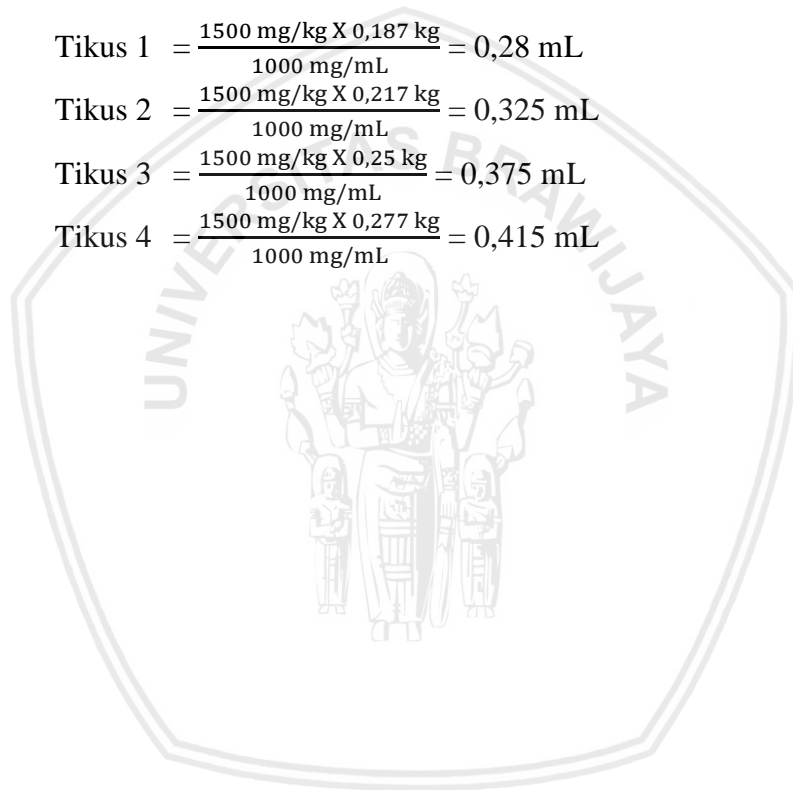
$$= \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{\text{Sediaan}}$$

$$\text{Tikus 1} = \frac{1500 \text{ mg/kg} \times 0,187 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,28 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 2} = \frac{1500 \text{ mg/kg} \times 0,217 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,325 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 3} = \frac{1500 \text{ mg/kg} \times 0,25 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,375 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 4} = \frac{1500 \text{ mg/kg} \times 0,277 \text{ kg}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0,415 \text{ mL}$$



Lampiran 8. Perhitungan Dosis Anastesi

Dosis anastesi Ketamine yang diberikan pada tikus penelitian ini mengacu pada Plumb (2008), yaitu sebesar 50 – 100 mg/kg BB dengan pemberian secara intramuscular (IM).

- Diketahui

Dosis Ketamine (tunggal) = 50 – 100 mg/kg BB

= 100 mg/kg BB (yang digunakan)

Berat Badan Tikus = 150 – 250 g

= 200 g (yang digunakan)

- Ditanya

Berapakah volume Ketamine yang dibutuhkan ?

- Dijawab

$$= \frac{\text{Dosis X BB}}{\text{Sediaan}}$$

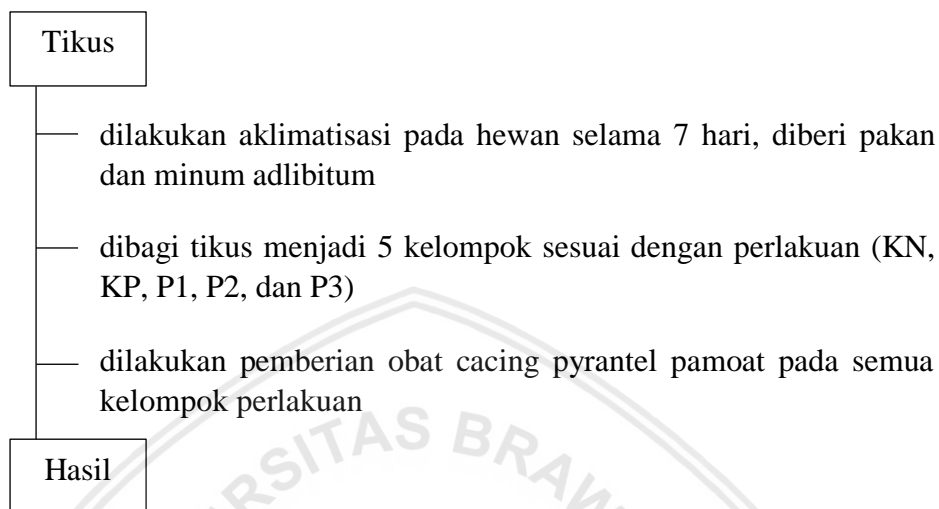
$$= \frac{100 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 0,2 \text{ kg}}{100\text{mg/mL}}$$

$$= 0,2 \text{ mL/tikus}$$

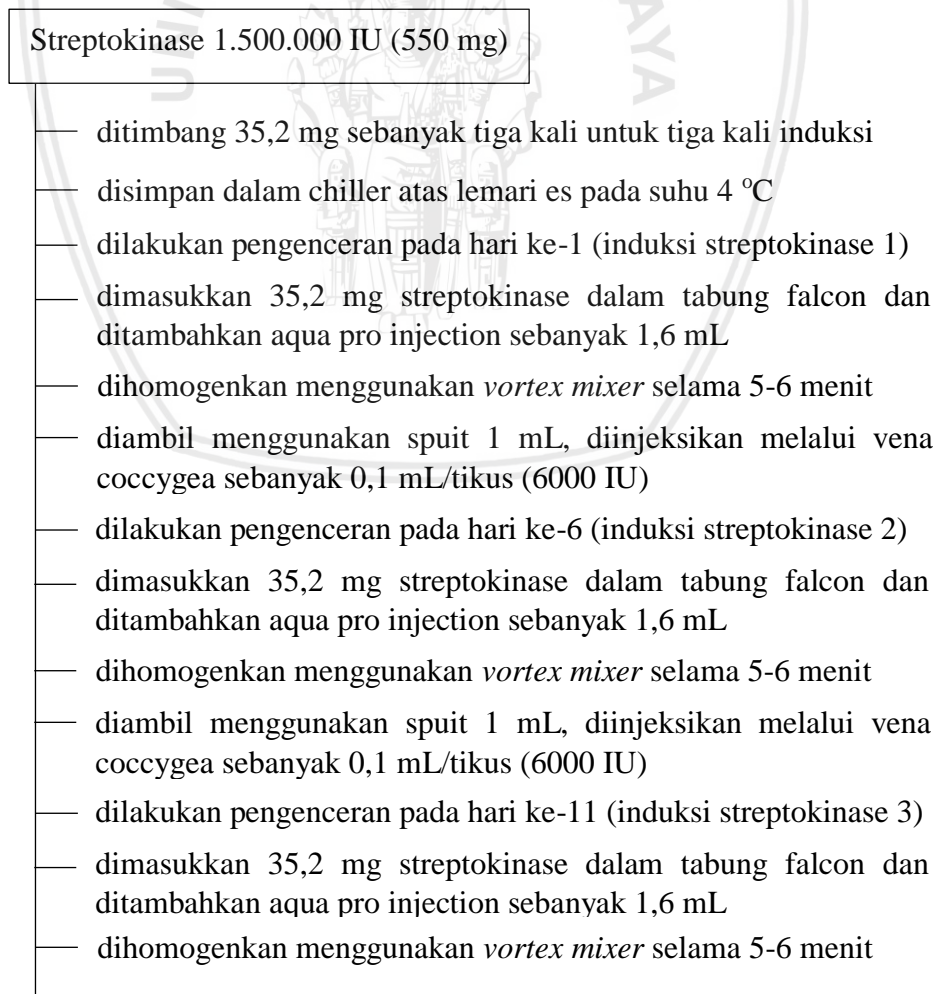
$$= 4 \text{ mL/20 tikus}$$

Lampiran 9. Langkah Kerja Penelitian

1. Persiapan hewan coba



2. Preparasi Streptokinase



diambil menggunakan spuit 1 mL, diinjeksikan melalui vena coccygea sebanyak 0,1 mL/tikus (6000 IU)

Hasil

3. Pembuatan hewan model glomerulonefritis akut

Tikus

diinduksi streptokinase 1 (hari ke-8) dosis 6000 IU pada 20 ekor tikus (KP, P1, P2, dan P3)

diinduksi streptokinase 2 (hari ke-13) dosis 6000 IU pada 20 ekor tikus (KP, P1, P2, dan P3)

diinduksi streptokinase 3 (hari ke-18) dosis 6000 IU pada 20 ekor tikus (KP, P1, P2, dan P3)

Hasil

4. Pemeriksaan kadar BUN dan Kreatinin darah

Tikus

diinjeksi tikus menggunakan ketamine melalui intramuscular sebanyak 0,2 mL/tikus

dilakukan pengambilan darah melalui sinus infraorbitalis menggunakan mikrohematokrit

dikoleksi sampel darah ke dalam tabung vacutainer merah sebanyak 1,5 mL

dilakukan sentrifus 5000 rpm selama 5 menit, diambil serum dan dimasukkan ke dalam mikrotube

Serum

dilakukan pengukuran kadar BUN dan Kreatinin darah menggunakan alat *Autoanalyzer Biosystem*

- diambil dan dikalibrasi dengan NaCl 0.90% dalam C.f.a.s (Calibrator for automated system)
- dilarutkan kalibrator dengan aquades dan dicampur hingga homogen
- disimpan pada suhu 2-8 °C
- ditekan panel “calibration” dan “suhu” dan dipilih parameter yang dikalibrasi
- ditekan kalibrasi kemudian tombol “Start”
- dilakukan “Quality control” dengan Bio-Rad:
 1. 300 μ L Bio-Rad dipipet kedalam cup serum dan diletakkan pada rak kontrol yang telah ditentukan
 2. Tekan panel “Quality control”
 3. Tekan panel “Install”
 4. Pilih jenis kontrol Bio-Rad
 5. Pilih parameter yang akan dikontrol (Blood Urea Nitrogen dan Kreatinin)
 6. Diaktifkan dengan menekan panel “Active test” kemudian tekan “Start” 2 kali
 7. Selanjutnya untuk pemeriksaan kadar serum sampel, sampel yang telah diberi kode kemudian diletakkan pada masing-masing dan dilakukan langkah-langkah yang sama seperti langkah pada pengujian serum kontrol
 8. Secara otomatis alat akan menghitung konsentrasi parameter (Blood Urea Nitrogen dan Kreatinin) yang diuji.

Hasil

5. Pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry

Tikus

- dikocok terlebih dahulu ekstrak Blueberry
- dilakukan pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 1 (500 mg/kg BB) pada kelompok tikus perlakuan satu (P1) sesuai dengan perhitungan dosis tiap individu secara oral
- dilakukan pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 2 (1.000 mg/kg BB) pada kelompok tikus perlakuan dua (P2) sesuai dengan perhitungan dosis tiap individu secara oral

dilakukan pemberian terapi ekstrak etanol Blueberry dosis 3 (1.500 mg/kg BB) pada kelompok tikus perlakuan tiga (P3) sesuai dengan perhitungan dosis tiap individu secara oral

Hasil

6. Euthanasia hewan coba

Tikus

diinjeksi tikus menggunakan ketamine melalui intramuscular sebanyak 0,2 mL/tikus

dilakukan dislokasi cervicalis, dan diposisikan rebah dorsal

diinsisi linea mediana abdominalis bagian caudalis dari caudal kearah cranial sampai ventral mandibula, insisi linea alba

dipotong costochondral antara costae dengan vertebrae thorachalis, diangkat kearah cranial

diamati topografi organ visceral thoracalis dan abdominalis

dilakukan isolasi organ ginjal, dipotong menjadi 2 bagian dengan berat masing-masing 100 mg

dimasukkan organ ginjal kedalam pot sampel yang sudah berisi larutan *Phosphate Buffer Saline* - azida

disimpan dalam freezer -20 °C

Hasil

Lampiran 10. Prosedur Pengukuran Kadar Malondialdehida

1. Pengukuran panjang gelombang Maksimum MDA

100 μ L stok kit MDA konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7, dan 8

— dimasukkan dalam tabung reaksi kecil, ditambahkan 550 μ L aquades

— ditambahkan 100 μ TCA 10%, 250 μ L HCl 1N, dan 100 μ L Na-Thio 1%, dan dihomogenkan

— disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

— diinkubasi di waterbath 100 °C selama 30 menit

— diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruang

— diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer (panjang gelombang maksimal = 532 nm)

Absorbansi larutan kurva standar MDA

2. Pembuatan Homogenat

Ginjal

— dipotong ditimbang dengan berat 100 mg

— digerus dalam mortar dingin dan ditambahkan 1 mL PBS

— diambil 400 μ L, dimasukkan dalam tabung *eppendorf*

Larutan

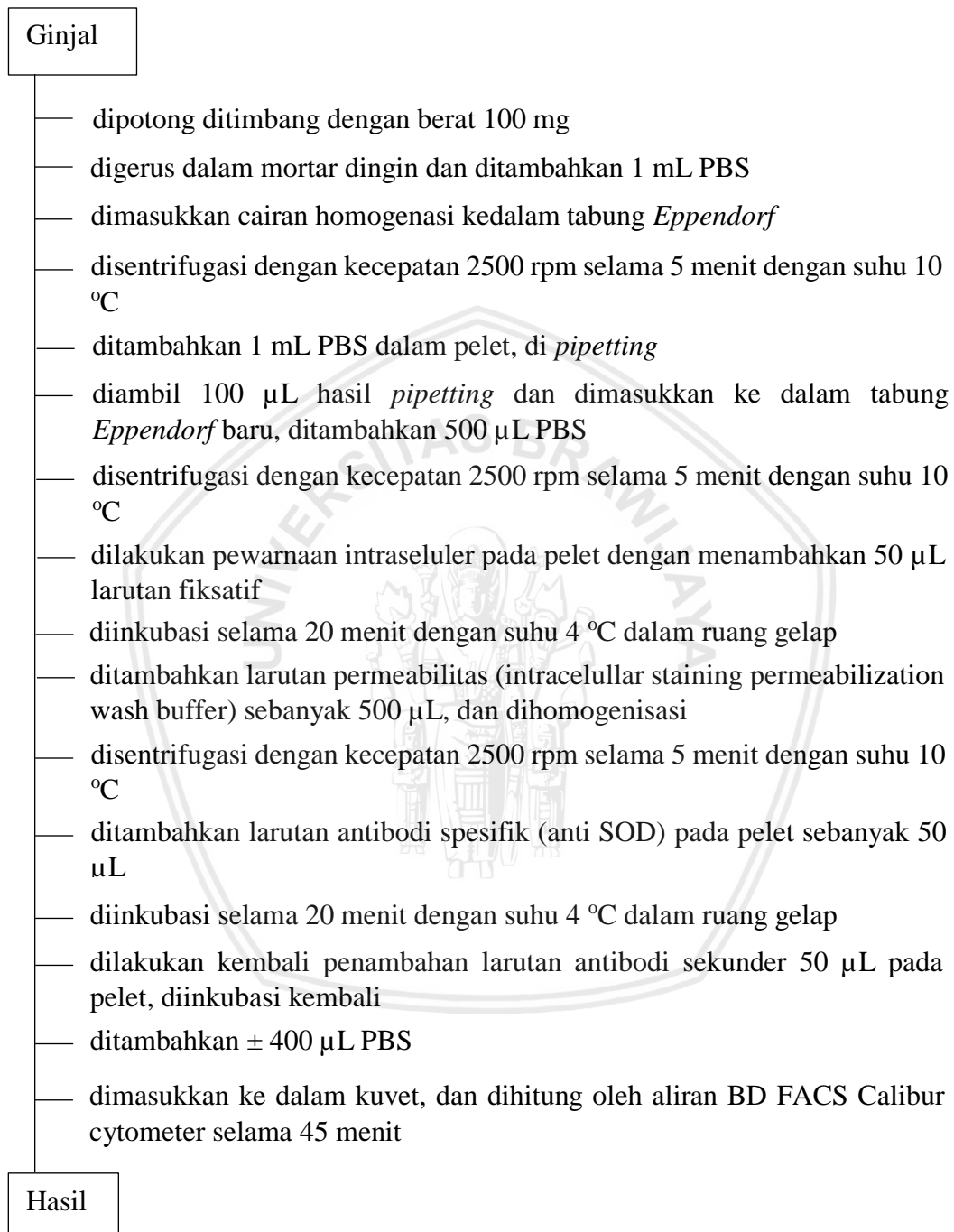
3. Pengukuran Kadar MDA Homogenat

Larutan

- ditambahkan TCA 100% 200 μ L, Na Thio 1% 200 μ L, dan HCl 1N 200 μ L
- dipanaskan dalam waterbath pada suhu 100 $^{\circ}$ C selama 20 menit
- dilakukan sentrifugasi selama 10 menit (3500 rpm)
- diambil 1 mL supernatan dan dimasukkan dalam kuvet
- diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada α maksimum

Hasil



Lampiran 11. Prosedur Pengukuran Ekspresi *Superoxide dismutase*

Lampiran 12. Perhitungan Kadar *Malondialdehida* (MDA)

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

No	Kode	ABS	Kadar (ng/mL)
1	KN 1	0,213	564,0
2	KN 2	0,185	494,0
3	KN 3	0,180	481,5
4	KN 4	0,176	471,5
5	KP 1	0,398	1026,5
6	KP 2	0,314	816,5
7	KP 3	0,325	844,0
8	KP 4	0,335	869,0
9	P1 1	0,185	494,8
10	P1 2	0,196	521,5
11	P1 3	0,180	481,5
12	P1 4	0,180	481,5
13	P2 1	0,198	526,5
14	P2 2	0,172	461,5
15	P2 3	0,176	471,5
16	P2 4	0,189	504,0
17	P3 1	0,234	616,5
18	P3 2	0,174	466,5
19	P3 3	0,179	479,0
20	P3 4	0,140	381,5

Contoh:

$$y = 0,213$$

$$0,213 = 0,0004x - 0,0126$$

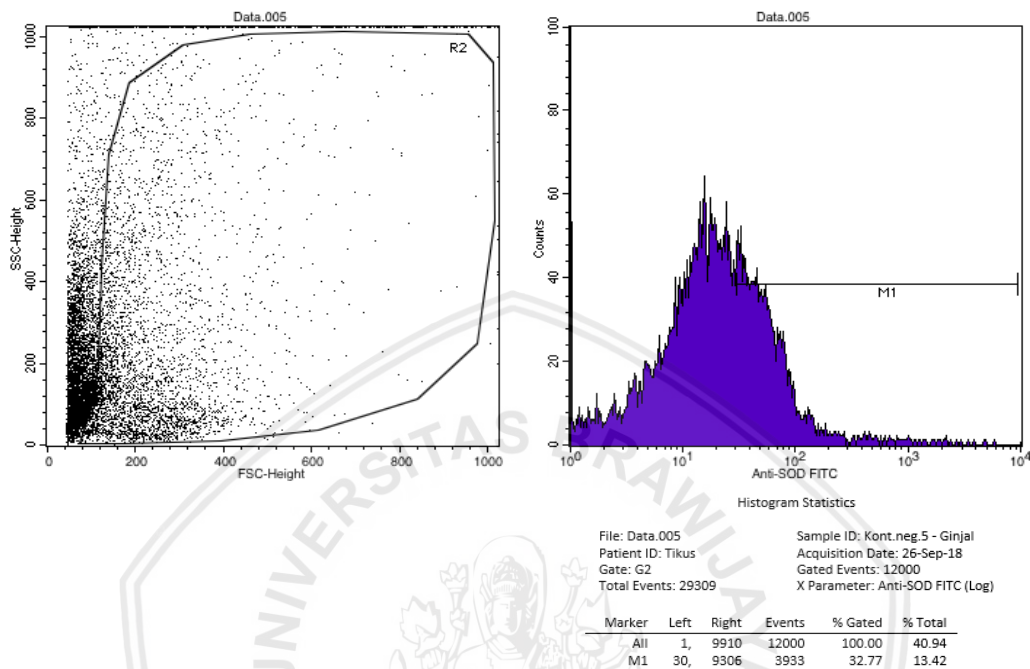
$$0,0004x = 0,213 + 0,0126$$

$$0,0004x = 0,2256$$

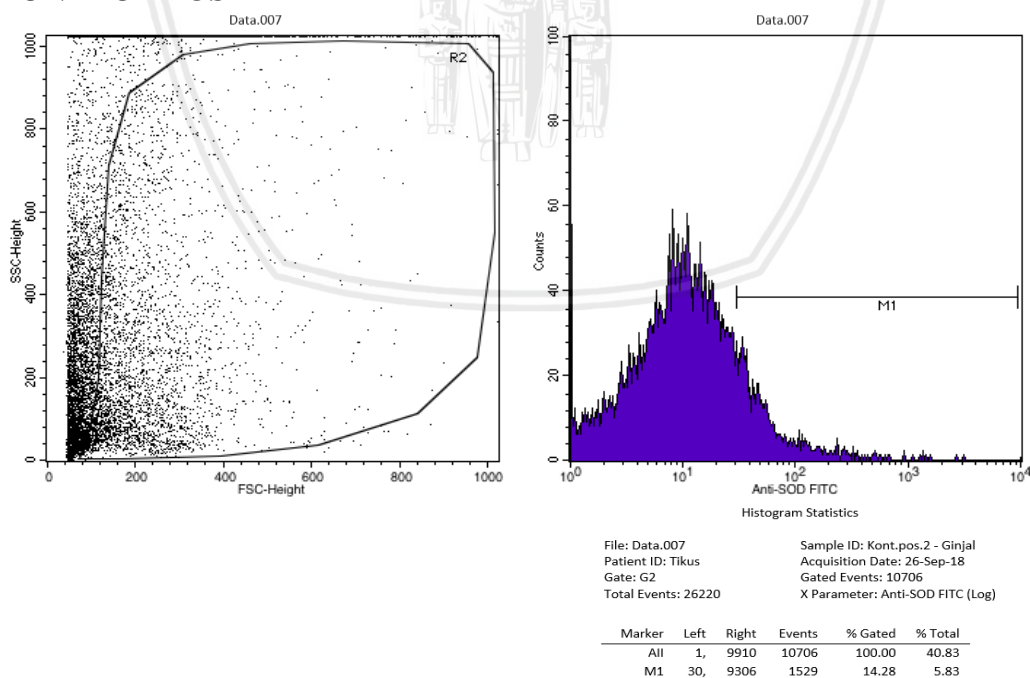
$$x = 564,0$$

Lampiran 13. Perhitungan Ekspresi *Superoxide Dismutase* (SOD)

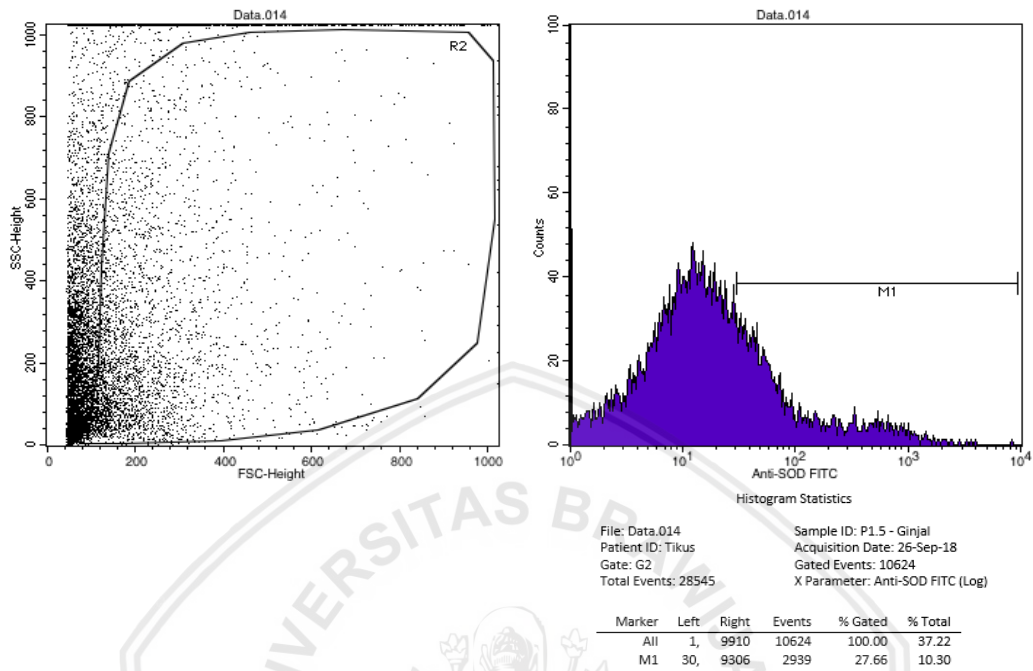
KONTROL NEGATIF



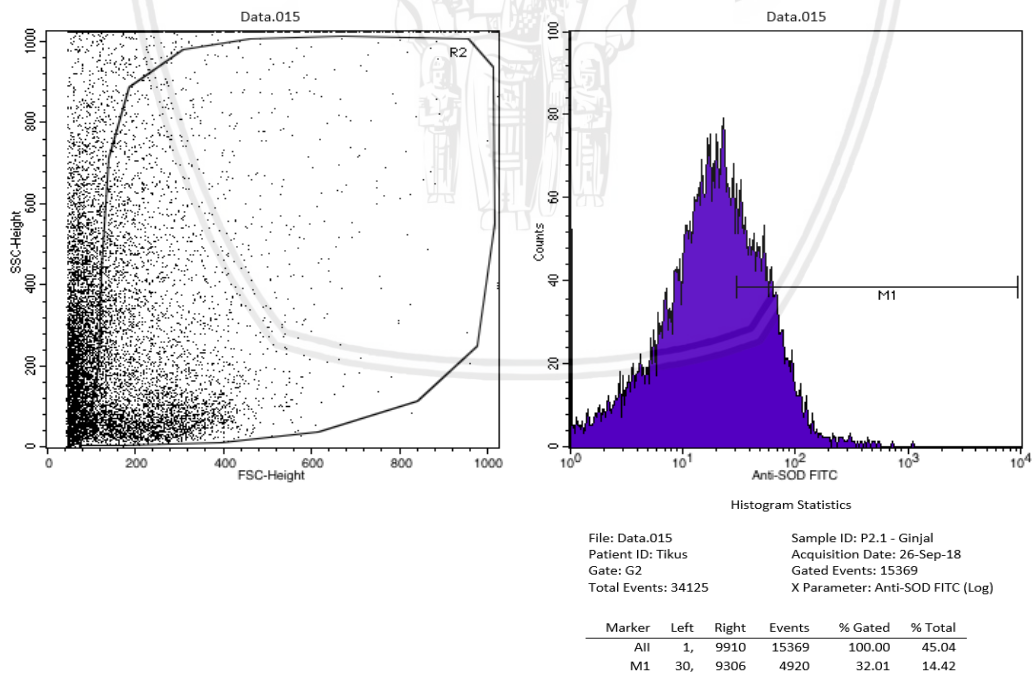
KONTROL POSITIF



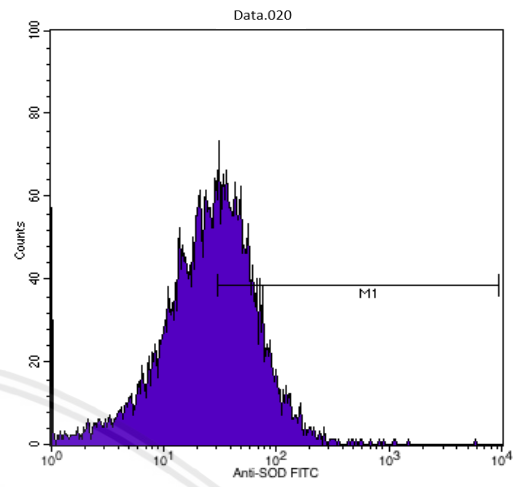
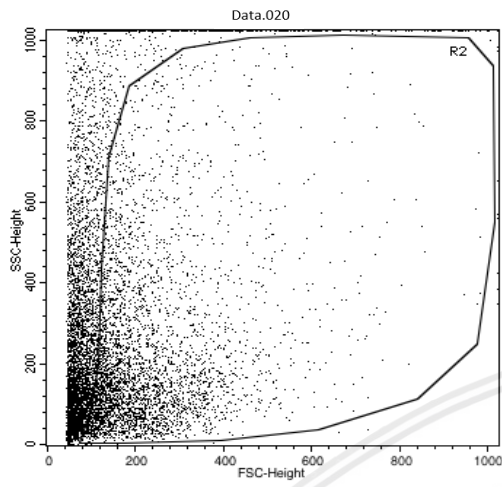
PERLAKUAN 1



PERLAKUAN 2



PERLAKUAN 3

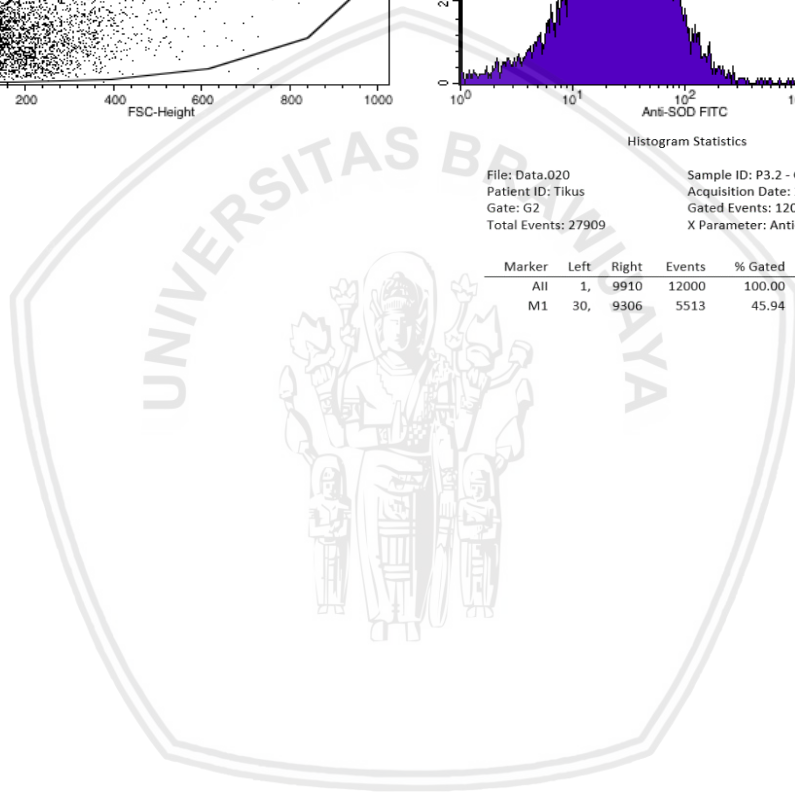


Histogram Statistics

File: Data.020
 Patient ID: Tikus
 Gate: G2
 Total Events: 27909

Sample ID: P3.2 - Ginjal
 Acquisition Date: 26-Sep-18
 Gated Events: 12000
 X Parameter: Anti-SOD FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,	9910	12000	100.00	43.00
M1	30,	9306	5513	45.94	19.75



Lampiran 14. Analisa Statistik *One Way* ANOVA Kadar MDA

Uji Normalitas

Kelompok		Shapiro – Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Kadar MDA	Kontrol negatif	.820	4	.143
	Kontrol positif	.829	4	.166
	Perlakuan 1	.827	4	.160
	Perlakuan 2	.936	4	.629
	Perlakuan 3	.943	4	.672

Interpretasi :

H0 = Distribusi data normal

H1 = Distribusi data tidak normal

Berdasarkan Uji normalitas didapatkan signifikansi $P > 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H0 distribusi data normal. Pengujian dengan *One Way ANOVA (Analysis of variance)* dapat dilanjutkan.

Uji Homogenitas

Kadar MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.779	4	15	.186

Interpretasi :

H0 = Varian data homogen

H1 = Varian data tidak homogen

Hasil pengujian homogenitas menunjukkan nilai signifikan (P) sebesar 0.186 yang artinya nilai $P > 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H0 mempunyai varian data homogen.

Tabel ANOVA

Kadar MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	500948.453	4	125237.113	29.366	.000
Within Groups	63969.792	15	4264.653		
Total	564918.246	19			

Interpretasi :

H0 = Semua kelompok sama

H1 = Salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda

Jika $P < \alpha$, maka H1 diterima

Jika $P > \alpha$, maka H0 diterima

Berdasarkan uji ANOVA didapatkan nilai signifikansi (P) sebesar 0.0 yang artinya nilai $P < 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H1 yang menyatakan terdapat salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan tingkat kesalahan 5% sudah cukup membuktikan bahwa ekstrak etanol Blueberry berpengaruh terhadap kadar MDA tikus yang diinduksi streptokinase. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda maka data diuji dengan BNJ atau uji Tukey.

Uji Posthoc

Kadar MDA

Tukey HSD

(I) Kelom pok	(J) Kelom pok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	-386.25000 [*]	46.17712	.000	-528.8415	-243.6585
	P1	7.92500	46.17712	1.000	-134.6665	150.5165
	P2	11.87500	46.17712	.999	-130.7165	154.4665
KP	P3	16.87500	46.17712	.996	-125.7165	159.4665
	KN	386.25000 [*]	46.17712	.000	243.6585	528.8415
	P1	394.17500 [*]	46.17712	.000	251.5835	536.7665
P1	P2	398.12500 [*]	46.17712	.000	255.5335	540.7165
	P3	403.12500 [*]	46.17712	.000	260.5335	545.7165
	KN	-7.92500	46.17712	1.000	-150.5165	134.6665
P2	KP	-394.17500 [*]	46.17712	.000	-536.7665	-251.5835
	P1	3.95000	46.17712	1.000	-138.6415	146.5415
	P3	8.95000	46.17712	.000	-133.6415	151.5415
P3	KN	-11.87500	46.17712	.999	-154.4665	130.7165
	KP	-398.12500 [*]	46.17712	.000	-540.7165	-255.5335
	P1	-3.95000	46.17712	1.000	-146.5415	138.6415
P3	P3	5.00000	46.17712	1.000	-137.5915	147.5915
	KN	-16.87500	46.17712	.996	-159.4665	125.7165
	KP	-403.12500 [*]	46.17712	.000	-545.7165	-260.5335
P3	P1	-8.95000	46.17712	1.000	-151.5415	133.6415
	P2	-5.00000	46.17712	1.000	-147.5915	137.5915

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

Homogeneous

Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0,05	
		1	2
Perlakuan 3	4	485.8750	
Perlakuan 2	4	490.8750	
Perlakuan 1	4	494.8250	
Kontrol negatif	4	502.7500	
Kontrol positif	4		889.0000
Sig.		.996	1.000



Lampiran 15. Analisa Statistik *One Way* ANOVA Ekspresi SOD

Uji Normalitas

Kelompok		Shapiro – Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Kadar MDA	Kontrol negatif	.913	4	.499
	Kontrol positif	.912	4	.493
	Perlakuan 1	.827	4	.161
	Perlakuan 2	.818	4	.139
	Perlakuan 3	.869	4	.294

Interpretasi :

H0 = Distribusi data normal

H1 = Distribusi data tidak normal

Berdasarkan Uji normalitas didapatkan signifikansi $P > 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H0 distribusi data normal. Pengujian dengan *One Way* ANOVA (*Analysis of variance*) dapat dilanjutkan.

Uji Homogenitas

Ekspresi SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.575	4	15	.232

Interpretasi :

H0 = Varian data homogen

H1 = Varian data tidak homogen

Hasil pengujian homogenitas menunjukkan nilai signifikan (P) sebesar 0.232 yang artinya nilai $P > 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H0 mempunyai varian data homogen.

Tabel ANOVA

Ekspresi SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	995.569	4	248.892	6.512	.003
Within Groups	573.330	15	38.222		
Total	1568.899	19			

Interpretasi :

H0 = Semua kelompok sama

H1 = Salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda

Jika $P < \alpha$, maka H1 diterima

Jika $P > \alpha$, maka H0 diterima

Berdasarkan uji ANOVA didapatkan nilai signifikansi (P) sebesar 0.003 yang artinya nilai $P < 0.05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H1 yang menyatakan terdapat salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan tingkat kesalahan 5% sudah cukup membuktikan bahwa ekstrak etanol Blueberry berpengaruh terhadap ekspresi SOD tikus yang diinduksi streptokinase. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda maka data diuji dengan BNJ atau uji Tukey.

Uji Posthoc

Ekspresi SOD

Tukey HSD

(I) Kelom pok	(J) Kelom pok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	13.74000*	4.37161	.045	.2408	27.2392
	P1	-2.17500	4.37161	.986	-15.6742	11.3242
	P2	-4.12500	4.37161	.875	-17.6242	9.3742
KP	P3	-6.21750	4.37161	.624	-19.7167	7.2817
	KN	-13.74000*	4.37161	.045	-27.2392	-.2408
	P1	-15.91500*	4.37161	.017	-29.4142	-2.4158
P1	P2	-17.86500*	4.37161	.007	-31.3642	-4.3658
	P3	-19.95750*	4.37161	.003	-33.4567	-6.4583
	KN	2.17500	4.37161	.986	-11.3242	15.6742
P2	KP	15.91500*	4.37161	.017	2.4158	29.4142
	P3	-1.95000	4.37161	.991	-15.4492	11.5492
	KN	-4.04250	4.37161	.883	-17.5417	9.4567
P3	KP	4.12500	4.37161	.875	-9.3742	17.6242
	P1	17.86500*	4.37161	.007	4.3658	31.3642
	P2	1.95000	4.37161	.991	-11.5492	15.4492
P3	P3	-2.09250	4.37161	.988	-15.5917	11.4067
	KN	6.21750	4.37161	.624	-7.2817	19.7167
	KP	19.95750*	4.37161	.003	6.4583	33.4567
P2	P1	4.04250	4.37161	.883	-9.4567	17.5417
	P3	2.09250	4.37161	.988	-11.4067	15.5917

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

Homogeneous

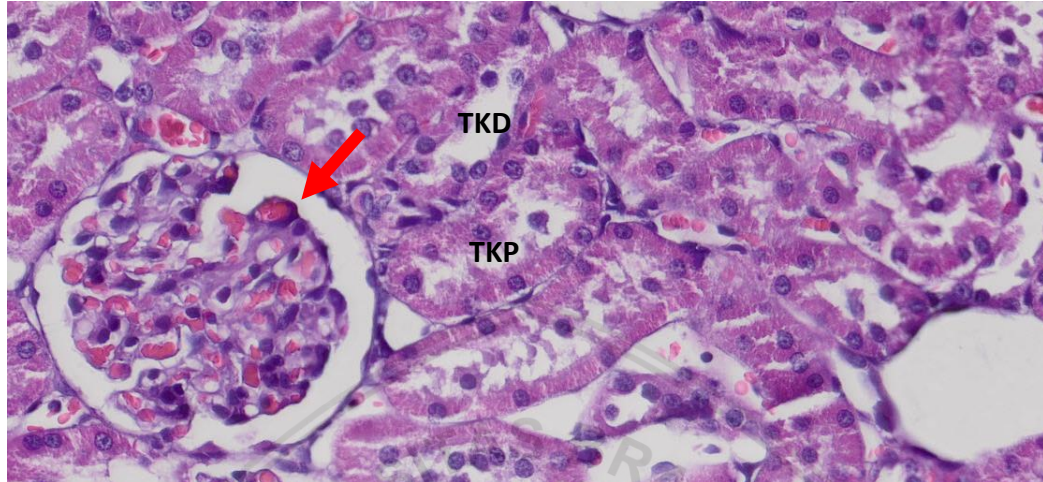
Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0,05	
		1	2
Kontrol positif	4	17.0550	
Kontrol negatif	4		30.7950
Perlakuan 1	4		32.9700
Perlakuan 2	4		34.9200
Perlakuan 3	4		37.0125
Sig.		1.000	.624



Lampiran 16. Gambaran Histopatologi Ginjal

KONTROL NEGATIF



Kelompok kontrol negatif Histopatologi ginjal (HE) perbesaran 200 x.

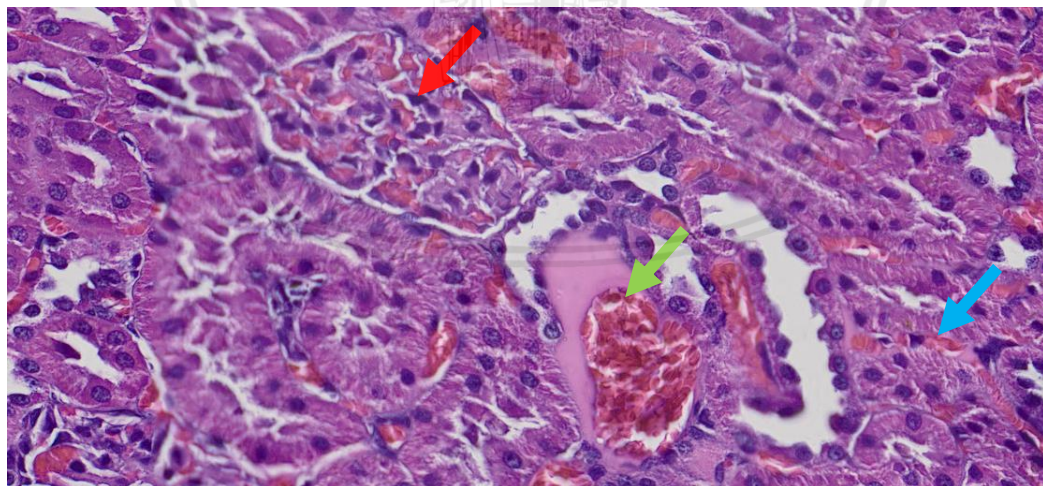
Keterangan :

→ Glomerulus tampak normal berisi kapiler darah dan *Bowman space* yang lebar

TKP = Epithelium tubulus kontortus proksimal tampak normal

TKD = Epithelium tubulus kontortus distal tampak normal

KONTROL POSITIF



Kelompok kontrol positif histopatologi ginjal (HE) perbesaran 200 x.

Keterangan :

→ Hipertrofi glomerulus disertai penyempitan pada *Bowman space* dan hemorraghi

→ Tampak adanya edema interstitialis pada septa intertubularis disertai hemorraghi

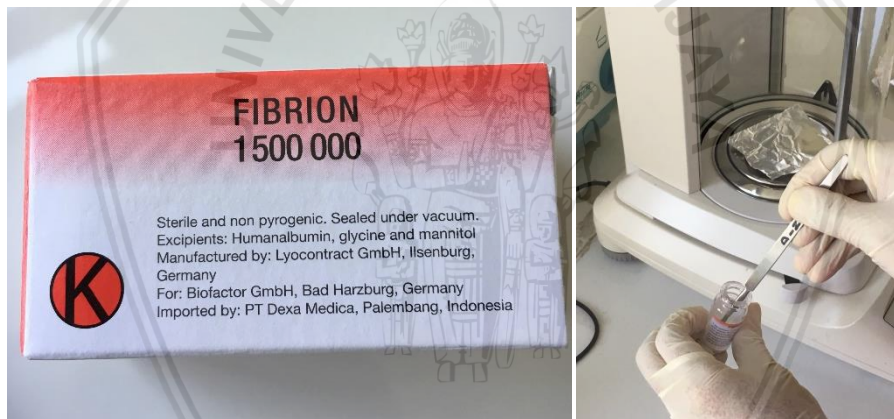
→ Kongesti pada kapiler intertubularis

Lampiran 17. Dokumentasi

A. Persiapan Hewan Coba

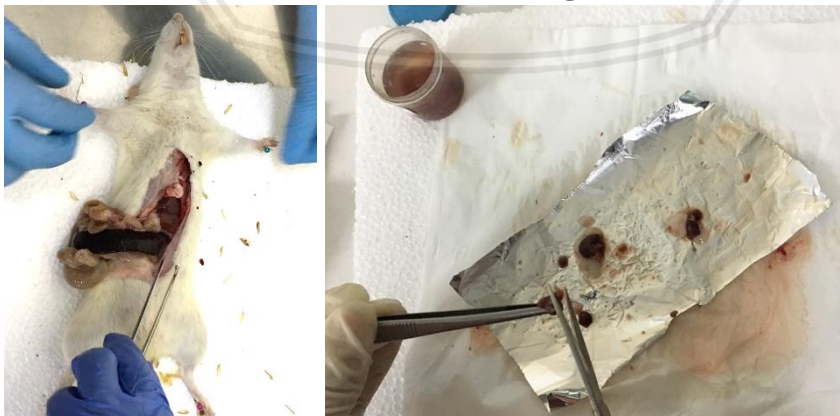


B. Preparasi Streptokinase



C. Pembuatan Hewan Model GNA dengan Induksi Streptokinase



D. Pemeriksaan kadar BUN dan Kreatinin Darah**E. Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Blueberry (*Vaccinium corymbosum*)****F. Euthanasia Hewan Coba dan Koleksi Organ**

G. Pemeriksaan Kadar MDA



H. Pemeriksaan Ekspresi SOD

