

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Physalis angulata* L.
TERHADAP JUMLAH VASKULER, KADAR MALONDIALDEHID (MDA), DAN
EKSPRESI NFKB PADA GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN MODEL
DISFUNGSI ENDOTEL YANG DIINDUKSI L-NAME**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Biomedik**



Oleh

Zahrah Febianti

156070100111004

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

PEMINATAN FARMAKOLOGI - BIOKIMIA

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Physalis angulata* L. TERHADAP JUMLAH VASKULER, KADAR MALONDIALDEHID (MDA), DAN EKSPRESI NFKB PADA GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN MODEL DISFUNGSI ENDOTEL YANG DIINDUKSI L-NAME

Oleh:

Zahrah Febianti, dr.

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal 23 Juni 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat
Komisi Pembimbing,



Dr.drg. Nur Permatasari, MS
Ketua



Dr.dr. Setyawati Karyono, M.Kes
Anggota

Penguji,



dr. Eviana Norahmawati, SpPA(K)
Penguji 1



Dr.dr. Retty Rathawati, M.Sc.
Penguji 2

Malang,

Universitas Brawijaya
Dekan


Dr. dr. Sri Endang, M.Kes
NIP. 195804141987012001

JUDUL TESIS:

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Physalis angulata* L. TERHADAP JUMLAH VASKULER, KADAR MALONDIALDEHID (MDA), DAN EKSPRESI NFKB PADA GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN MODEL DISFUNSI ENDOTEL YANG DIINDUKSI L-NAME

Nama : Zahrah Febianti

NIM : 156070100111004

Program Studi : Magister Ilmu Biomedik

Peminatan : Biokimia-Farmakologi

PEMBIMBING :

Ketua : Dr. drg. Nur Permatasari, MS

Anggota : Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

PENGUJI :

Penguji 1 : dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA(K)

Penguji 2 : Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc

MONEV : Edwin Widodo, M.Sc, Ph.D

Tanggal ujian : 23 Juni 2018

Nomor keputusan penguji :

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak dapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 23 Juni 2018

Mahasiswa,



Nama : Zahrah Febianti, dr.
NIM : 156070100111004
PS : Ilmu Biomedik
Prog. : Pascasarjana
Fak : Kedokteran UB

RIWAYAT HIDUP

Zahrah Febianti, terlahir di Jember, 02 Februari 1988, dari Ibu Siti Aminah dan Bapak Suwito. Masa pendidikan SD hingga SMA ditempuhnya di kampung halaman di Tanggul, Jember. Pada tahun 2006, setelah lulus dari SMAN 02 Tanggul, Zahrah Febianti melanjutkan petualangan akademiknya dengan menempuh pendidikan kedokteran program studi dokter umum di Universitas Brawijaya Malang dan lulus pada tahun 2012. Kecintaannya pada dunia akademik menuntun langkahnya untuk meniti karir sebagai Dosen Biokimia di Fakultas Kedokteran Universitas Jember sejak tahun 2013 hingga sekarang. Pada tahun 2018, dia mendapatkan gelar master dari program studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Brawijaya dengan peminatan Farmakologi-Biokimia.





Tesis ini saya persembahkan untuk:

Kedua orang tua tercinta,

Ibunda Siti Aminah dan Ayahanda Suwito

Suami terkasih, Fanteri Aji Dharma Suparno

Anak-anak tersayang,

Ammar Saqif Zafran dan Amira Saqina Zahrin



RINGKASAN

Zahrah Febianti, NIM. 156070100111004. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 09 April 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun *Physalis Angulata* L. Terhadap Jumlah Vaskuler, Kadar Malondialdehid (MDA), dan Ekspresi NFkB Pada Ginjal Tikus Wistar Jantan Model Disfungsi Endotel Yang Diinduksi L-NAME. Ketua: Nur Permatasari, Anggota : Setyawati Soeharto, Eviana Norahmawati, Retty Ratnawati

Penyakit ginjal kronik merupakan masalah kesehatan global dengan biaya tinggi. Hemodialisis dan transplantasi ginjal masih menjadi manajemen utama ketika proses penyakit mencapai stadium akhir. Faktor komorbid terbanyak dari penyakit ini adalah hipertensi dan diabetes. Sedangkan penyakit kardiovaskuler adalah penyebab mortalitas tertinggi dari penyakit ini. Patomekanisme yang menghubungkan antara penyakit ginjal dengan faktor komorbidnya dan dengan penyebab mortalitasnya adalah disfungsi endotel. Pada disfungsi endotel terjadi penurunan bioavailabilitas vasodilator, terutama NO, sehingga memicu kondisi prokoagulasi, proinflamasi, disregulasi pertumbuhan dan *remodelling* vaskuler. Salah satu bentuk *remodelling* vaskuler akibat defisiensi NO adalah fragmentasi vaskuler. Fragmentasi vaskuler menyebabkan berkurangnya densitas kapiler ginjal. Penurunan densitas kapiler ginjal berkaitan dengan proses penuaan dan penyakit degeneratif akibat disfungsi endotel. Pada disfungsi endotel juga terjadi stres oksidatif dan inflamasi. Stres oksidatif di ginjal akan merusak sel ginjal dan menghasilkan senyawa akhir hasil peroksidasi lipid yang dinamakan malondialdehid (MDA). Stres oksidatif juga akan memperparah inflamasi melalui peningkatan ekspresi dan aktivasi faktor transkripsi, NFkB. NFkB akan meningkatkan sintesis sitokin proinflamasi. Pada jaringan yang normal, iskemia dan inflamasi akan diikuti mekanisme kompensasi yaitu pembentukan pembuluh darah baru. Namun, pada disfungsi endotel kompensasi ini terganggu akibat adanya *remodelling* vaskuler berupa fragmentasi mikrovaskuler. Belum jelas apakah terdapat hubungan antara inflamasi, stres oksidatif, dan fragmentasi vaskuler yang terjadi pada ginjal dengan disfungsi endotel. Begitu kompleksnya efek iskemia dan inflamasi dalam patogenesis penyakit ginjal kronik akibat disfungsi endotel, sehingga dibutuhkan manajemen medikamentosa yang bersifat pencegahan dan dapat mengatasi ketidakseimbangan bioavailabilitas NO pada disfungsi endotel.

Daun ceplukan, *Physalis angulata* L., berdasarkan penelitian terdahulu diketahui memiliki kandungan bahan aktif fisalin yang dapat meningkatkan kadar NO secara *in vitro* dan memiliki efek antiinflamasi melalui inhibisi TNF α . Pemberian ekstrak air daun ceplukan pada tikus model disfungsi endotel diharapkan dapat mencegah penurunan kadar NO sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif dan inflamasi ginjal yang pada akhirnya akan memicu proses perbaikan jaringan melalui angiogenesis dan mencegah fragmentasi vaskuler ginjal.

Metode penelitian ini adalah *true experimental* dengan sampel tikus Wistar jantan, yang diinduksi L-NAME 40 mg/kgBB secara intraperitoneal selama 15 hari. Pemberian L-NAME sebagai analog L-arginin akan menghambat sintesis NO sehingga terjadi ketidakseimbangan bioavailabilitas NO seperti yang terdapat pada kondisi disfungsi endotel. Tikus Wistar jantan dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (NS 40 mg/kgBB intraperitoneal), kelompok kontrol positif (L-NAME 40 mg/kgBB i.p), kelompok dosis 1 (L-NAME 40 mg/kgBB dan diberi ekstrak air daun ceplukan dengan dosis 500 mg/kgBB peroral), kelompok dosis 2 (L-NAME dan ekstrak air daun ceplukan dengan dosis 1500 mg/kgBB), kelompok dosis 3 (L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan dengan dosis 2500 mg/kgBB). Variabel yang diukur antara lain adalah jumlah vaskuler sebagai penanda perbaikan jaringan, kadar MDA sebagai penanda stres oksidatif, dan ekspresi NFkB sebagai penanda inflamasi. Kadar MDA diukur melalui reaksi *Thiobarbituric acid*

reaction (TBARs) dengan spektrofotometri. Sedangkan ekspresi NFkB dianalisis dengan immunohistokimia menggunakan antibodi p65. Jumlah vaskuler dihitung dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada preparat yang dicat HE. Analisa data dilakukan dengan uji -tidak berpasangan dan ANOVA dengan signifikansi $p < 0.05$.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi L-NAME 40 mg/kg BB i.p selama 15 hari dapat meningkatkan kadar MDA dan ekspresi NFkB namun tidak signifikan, dan dapat menurunkan jumlah vaskuler ginjal namun tidak signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh mekanisme autoregulasi ginjal yang tidak hanya dipengaruhi NO, namun juga angiotensin. Mekanisme autoregulasi ini kemungkinan masih intak sehingga diperlukan waktu induksi yang lebih lama atau dosis L-NAME yang lebih besar. Peningkatan kadar MDA dan ekspresi NFkB dapat dicegah pada pemberian dosis ekstrak 500 mg/kgBB dan dosis 1500 mg/kgBB, namun pada dosis 2500 mg/kgBB justru terjadi peningkatan kadar MDA dan peningkatan ekspresi NFkB bila dibandingkan dosis kontrol positif. Hal ini kemungkinan terjadi akibat efek senyawa bioaktif lain yang terdapat dalam daun *Physalis angulata* L. yang bersifat prooksidan dan diduga efeknya menjadi lebih dominan ketika dosisnya ditingkatkan. Selain itu, peningkatan kadar NO yang berlebihan yang dapat terjadi akibat pemberian ekstrak, akan memberikan efek prooksidan dan proinflamasi. Sementara itu, pemberian ekstrak dosis 500 mg/kgBB dan dosis 1500 mg/kgBB dapat meningkatkan jumlah vaskuler ginjal secara signifikan, namun pada dosis 2500 mg/kgBB justru mengakibatkan penurunan jumlah vaskuler walaupun tidak signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya peningkatan kadar NO yang berlebihan pada kedua dosis tersebut sehingga justru memicu apoptosis vaskuler.

Dapat disimpulkan bahwa suplementasi ekstrak air daun *Physalis angulata* pada dosis tertentu dapat mencegah fragmentasi vaskuler, stres oksidatif, dan inflamasi ginjal pada tikus Wistar jantan yang diinduksi L-NAME.

SUMMARY

Zahrah Febianti, NIM. 156070100111004. Postgraduate Programs Faculty of Medicine Universitas Brawijaya Malang, 09 April 2018. The Effect of *Physalis Angulata* L. Leaves Water-Extract on Vascular Number, Malondialdehyd (MDA) Level, NFkB expression in The Kidney of NOS-inhibited Rats by Nw-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).. Supervisor chairman: Nur Permatasari, Members : Setyawati Soeharto, Eviana Norahmawati, Retty Ratnawati

Chronic kidney disease is a global and high cost health problem. Hemodialysis and renal transplantation are still the main management when the disease process reaches the final stage. The most common comorbid factors of this disease are hypertension and diabetes, while cardiovascular disease is the cause of the highest mortality of this disease. The pathomechanism linking renal disease to its comorbid factor and its cause of mortality is endothelial dysfunction. In this condition, there is a decrease of vasodilator bioavailability, especially NO, thereby triggering procoagulation, proinflammation, growth dysregulation and vascular remodeling. Endothelial dysfunction in renal microvascular causes tissue ischemia resulting in oxidative stress and inflammation. Oxidative stress in kidneys will damage the kidney cells and produce final compounds of lipid peroxidation called malondialdehyd (MDA). Oxidative stress will also aggravate inflammation through the activation of transcription factors, NFkB. Activation of NFkB will increase the synthesis of proinflammatory cytokines. In normal tissue, ischemia will be followed by a compensatory mechanism that is the formation of new blood vessels. However, in endothelial dysfunction this compensation is disrupted and the opposite condition occurs resulting in vascular fragmentation. The complexity of ischemic effects in the pathogenesis of chronic renal disease resulting from endothelial dysfunction, causing the prevention of disease progression is needed. The disease management should overcome the imbalance of NO bioavailability in endothelial dysfunction and enhance tissue repair by promoting angiogenesis.

Physalis angulata L. leaves extract, based on previous studies are known to contain active ingredients that can increase NO level *in vitro*. The herbs also showed anti-inflammatory effects through TNF α inhibition. Provision of ceplukan leaf water extract in endothelial dysfunction rat model was expected to prevent the decrease in NO levels. It was to prevent oxidative stress and kidney inflammation that will eventually lead to tissue repair through angiogenesis and prevent renal vascular fragmentation.

The design of this study was true experimental using male Wistar rat, induced by L-NAME 40 mg / kgBB intraperitoneally for 15 days. Administration of L-NAME as an L-arginine analogue will inhibit NO synthesis resulting in an imbalance of NO bioavailability as found in endothelial dysfunction. Male Wistar rats were divided into five groups: negative control group (NS 40 mg / kgBB intraperitoneally), positive control group (L-NAME 40 mg / kgBB ip), group 1 (given L-NAME 40 mg/kgBW i.p and 500 mg / kgBW water extract of *Physalis angulata* leaves orally), group 2 (given L-NAME 40 mg / kgBW i.p and 1500 mg / kgBW water extract of *Physalis angulata* leaves orally), group 3 (given L-NAME 40 mg / kgBW i.p and 2500 mg / kgBW water extract of *Physalis angulata* leaves). Measured variables include vascular number as a marker of tissue repair, MDA levels as a marker of oxidative stress, and p65 protein NFkB expression as an inflammatory marker. MDA levels are measured by Thiobarbituric acid reaction (TBARs) reactions method. While NFkB expression was analyzed by immunohistochemistry using p65 antibody. The vascular number is calculated by a 400x magnification light microscope on HE preparation. The data analysis was done by *t*-independent test and ANOVA method using significance $p < 0.05$.

The results showed that induction of L-NAME 40 mg / kg BB i.p for 15 days insignificantly increase MDA and NFkB expression, and insignificantly decrease vascular density. This is probably due to a mechanism of renal autoregulation which is not only affected by NO, but also angiotensin. This autoregulation mechanism is probably still intact

so that the kidneys are not subjected to excessive oxidative stress and inflammation. Increased levels of MDA and NFkB expression can be prevented at the dose of 500 mg/kgBW extract and 1500 mg/kgBW, whereas at dose of 2500 mg / kgBW there is an increase in MDA levels and increased NFkB expression when compared to positive control group. This is likely due to the effects of other bioactive compounds contained in the *Physalis angulata* L. leaf which are pro-oxidant and suspected to have prominent effect by increasing the dose. In addition, an excessive increase in NO levels which may be caused by extract administration will have a prooxidant effect. Meanwhile, the administration of 500 mg/kgBW and 1500 mg/kgBW doses extract significantly increased the number of vascular kidneys, but the administration of 2500 mg / kgBW *Physalis angulata* leaf's water extract reduced the vascular density. This is probably due to the excessive increase of NO levels in higher dose, thus precipitating vascular apoptosis.

It can be concluded that supplementation of *Physalis angulata* leaves water extracts at certain doses can prevent vascular fragmentation, oxidative stress, and kidney inflammation in male Wistar rats induced by L-NAME.



KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah Subhanallahu Wa Ta'alla yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun *Physalis Angulata* L. Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA), Ekspresi NFkB, dan Jumlah Vaskuler Ginjal Pada Tikus Model Disfungsi Endotel Yang Diinduksi L-NAME".

Proses penulisan Tesis ini merupakan sebuah proses yang memberi saya pengalaman yang sangat berharga. Pengalaman yang tidak hanya memberikan tantangan dalam segi keilmuan tetapi juga sarat ujian mental dan fisik. Sebuah proses eksplorasi yang tidak pernah berhenti, yang mungkin akan sangat berat jika tidak ada campur tangan pihak lain yang bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membantu saya.

Dengan selesainya Tesis ini, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. drg. Nur Permatasari, MS., sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari proses pembuatan proposal, penelitian, sampai Tesis ini berbentuk *hard cover* berwarna hijau.
3. Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes., sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan dengan sabar, sehingga saya dapat menyelesaikan Tesis ini.
4. dr. Eviana Norahmawati, Sp. PA (K), dengan segudang kesibukannya namun masih menyempatkan diri ketika diminta menjadi ketua tim penguji Tesis.

5. Dr. dr. Retty Rathawati, M.Sc., yang langsung bersedia ketika diminta menjadi ketua tim penguji Tesis.
6. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA dan dr. Kenty W. Anita, M.Kes., Sp.PA yang bersedia meluangkan waktu dan tenaganya untuk membimbing saya menganalisis preparat histopatologi.
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tesis Program Magister Biomedik FKUB dan staf Laboratorium yang membantu saya secara teknik dan administratif.
8. Suami tercinta yang mendukung studi saya secara materi maupun non materi serta selalu mendoakan kelancaran studi saya.
9. Kedua orang tua tercinta, yang senantiasa mendoakan dan melakukan yang terbaik untuk saya serta membantu mengasuh anak-anak saya ketika saya harus berjuang ke luar kota untuk menyelesaikan studi saya.
10. Anak-anak tercinta, Ammar Saqif Zafran dan Amira Saqina Zahrin, yang selalu menghibur saya ketika saya penat.
11. Adik-adik tersayang, Defina Sofi Amaliah dan Muhammad Azzam Azzuhry, yang sering saya mintai bantuan dalam proses penyelesaian Tesis ini
12. Teman-teman seperjuangan, yang tidak sungkan-sungkan membagi ilmu, bahan, dan pengalaman ujiannya.

, Saya sadar bahwa dalam Tesis ini masih masih ditemukan banyak kekurangan. Oleh sebab itu, saya sangat menghargai jika ada kritik dan saran yang bersifat membangun demi perbaikan karya ini.

Malang, 09 April 2018

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	Error! Bookmark not defined.
SUMMARY.....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	Error! Bookmark not defined.
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1 Tujuan Umum	Error! Bookmark not defined.
1.3.2 Tujuan Khusus	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Manfaat Akademik.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
2.1 Disfungsi Endotel	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Patofisiologi.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 L-NAME	Error! Bookmark not defined.
2.2 Penyakit Ginjal dan Disfungsi Endotel..	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Patogenesis.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Neovaskularisasi Sebagai Respon terhadap Hipoksia Jaringan.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Radikal Bebas.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Stres Oksidatif.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.2 Malondialdehid (MDA).....	Error! Bookmark not defined.
2.3.3 Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Inflamasi.....	Error! Bookmark not defined.



2.4.1	Konsep Dasar Inflamasi.....	Error! Bookmark not defined.
2.4.2	NFkB.....	Error! Bookmark not defined.
2.5	Ceplukan (<i>Physalis angulata</i> L.).....	Error! Bookmark not defined.
2.5.1	Klasifikasi dan Morfologi.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.2	Habitat dan Sebaran.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.3	Kandungan Kimia Ceplukan (<i>Physalis angulata</i> L.).....	Error! Bookmark not defined.
		Bookmark not defined.
BAB 3	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	Error! Bookmark not defined.
3.1	Kerangka Konsep	Error! Bookmark not defined.
3.2	Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 4	METODE PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
4.1	Desain Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2.1	Waktu	Error! Bookmark not defined.
4.2.2	Tempat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.3	Sampel dan Jumlah Pengulangan.....	Error! Bookmark not defined.
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	Error! Bookmark not defined.
		defined.
4.4.1	Klasifikasi Variabel.....	Error! Bookmark not defined.
4.4.2	Definisi Operasional.....	Error! Bookmark not defined.
4.5	Alat dan Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.5.1	Alat	Error! Bookmark not defined.
4.5.2	Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6	Prosedur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.6.1	Pembuatan Ekstrak	Error! Bookmark not defined.
4.6.2	Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
		not defined.
4.6.3	Pengorbanan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.6.4	Pemeriksaan Kadar MDA Ginjal .	Error! Bookmark not defined.
4.6.5	Preparasi Preparat Histopatologi	Error! Bookmark not defined.
4.6.6	Proses Pewarnaan Hematoxilin Eosin	Error! Bookmark not defined.
		defined.
4.6.7	Proses Immunohistokimia.....	Error! Bookmark not defined.

4.6.8 Pembacaan Preparat Histopatologi Error! Bookmark not defined.

4.6.9 Alur Penelitian Error! Bookmark not defined.

4.6.10 Analisis Data..... Error! Bookmark not defined.

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA..... Error! Bookmark not defined.

5.1 Hasil Penghitungan Vaskuler Ginjal..... Error! Bookmark not defined.

5.2 Hasil Pengukuran MDA Ginjal..... Error! Bookmark not defined.

5.3 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Protein p65 NFkB Error! Bookmark not defined.

5.4 Analisis Jalur Error! Bookmark not defined.

BAB 6 PEMBAHASAN..... Error! Bookmark not defined.

6.1 Jumlah Vaskuler Ginjal Error! Bookmark not defined.

6.1.1 Pengaruh Induksi L-NAME terhadap Jumlah Vaskuler Ginjal
Error! Bookmark not defined.

6.1.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun
Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Jumlah Vaskuler
Ginjal..... Error! Bookmark not defined.

6.2 Kadar MDA Ginjal Error! Bookmark not defined.

6.2.1 Pengaruh Induksi L-NAME terhadap Kadar MDA Ginjal Error!
Bookmark not defined.

6.2.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis terhadap Kadar MDA
Ginjal..... Error! Bookmark not defined.

6.3 Ekspresi p65 NFkB Error! Bookmark not defined.

6.3.1 Induksi L-NAME dan Ekspresi p65 NFkB Error! Bookmark not
defined.

6.3.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun
Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Ekspresi p65 NFkB
Error! Bookmark not defined.

6.4 Pengaruh Langsung dan Tidak Langsung Kadar MDA terhadap
Jumlah Vaskuler Ginjal Error! Bookmark not defined.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN..... Error! Bookmark not defined.

7.1 Kesimpulan Error! Bookmark not defined.

7.2 Saran Error! Bookmark not defined.

DAFTAR PUSTAKA Error! Bookmark not defined.
LAMPIRAN Error! Bookmark not defined.



DAFTAR TABEL

Table 2.1 Berbagai Jenis Radikal Oksigen dan Radikal Nitrogen..... **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.2 Biomarker yang Umum Digunakan untuk Mengetahui Status Oksidan dan Antioksidan..... **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.3 Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.4 Perbandingan Jalur Aktivasi Kanonikal dan Nonkanonikal **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.5 Protein yang terlibat dalam umpan balik negatif NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.6 Kandungan Fitokimia Daun dan Buah *Physalis minima* alias *Physalis angulata* dalam Berbagai Jenis Ekstrak. **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.7 Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Tanaman yang dinyatakan dengan BHA..... **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.8 Kandungan Senyawa Fitokimia di daun dan bagian kulit pohon *Physalis angulata* **Error! Bookmark not defined.**

Table 2.9 Kandungan Fenol Total pada Setiap Gram Ekstrak *Physalis angulata* setara dengan equivalen gallic acid (GA) dalam satuan miligram (mg GA/gram ekstrak) **Error! Bookmark not defined.**



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Endotel **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.2 Disfungsi endotel dalam patogenesis penyakit kardiovaskuler.
..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.3 Sintesis Nitrogen monoksida..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.4 Peran Nitrogen monoksida..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.5 Siklus aktivasi dan deaktivasi eNOS **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.6 Peran penting uncoupling NO sintase endotelial dalam patogenesis
disfungsi endotel..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.7 L-NAME Struktur 2-dimensi..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.8 Pengaruh L-NAME pada Sintesis Nitrogen monoksida (NO). **Error!**
Bookmark not defined.

Gambar 2.9 Prevalensi Gagal Ginjal Kronis berdasarkan Karakteristik di
Indonesia **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.10 Proporsi Diagnosis Etiologi Pasien Hemodialisis di Indonesia **Error!**
Bookmark not defined.

Gambar 2.11 Gambaran Skematik Perbedaan Mikrovaskuler di Ginjal **Error!**
Bookmark not defined.

Gambar 2.12 Gambaran Skematik Mekanisme Hilangnya Mikrovaskuler dan
Efeknya terhadap Fungsi dan Struktur Ginjal **Error! Bookmark not**
defined.

Gambar 2.13 Mekanisme molekuler homeostasis oksigenasi jaringan **Error!**
Bookmark not defined.

Gambar 2.14 Neovaskularisasi..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.15 Jaringan granulasi..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.16 Tahapan angiogenesis, fase tenang, fase aktivasi, fase resolusi
..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.17 Gambaran skematik mekanisme vaskulogenesis **Error! Bookmark**
not defined.

Gambar 2.18 Penyakit-Penyakit yang Dipicu Oleh Stres Oksidatif **Error!**
Bookmark not defined.

Gambar 2.19 Stres Oksidatif dan Inflamasi Mempengaruhi Kemampuan Relaksasi
Endotel **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.20 Proses Peroksidasi Lipid dan Pembentukan MDA dari Asam Lemak

Tidak Jenuh **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.21 Pembentukan MDA dan metabolismenya **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.22 Reaksi antara MDA dan TBA membentuk molekul berpigmen MDA-TBA2..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.23 Struktur Protein NFkB..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.24 Enam macam IKB mamalia **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.25 Jalur Aktivasi NFkB..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.26 Regulasi Aktivasi NFkB oleh Umpan Balik Negatif **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.27 Peran penting NFkB dalam regulasi inflamasi dan homeostasis sel endotel pada kondisi hipertensi..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.28 *Physalis angulata*..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2.29 Farmakokinetik Flavonoid **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.1 Korelasi berat badan tikus dengan fase kehidupannya **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.1 Rerata Jumlah Vaskuler Kelompok Kontrol **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.2 Rerata Jumlah Vaskuler Kelompok Perlakuan **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.3 Pengamatan Jumlah Vaskuler Ginjal, **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.4 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Ginjal pada Kelompok Kontrol **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.5 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Ginjal pada Kelompok Perlakuan..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.6 Rerata dan Standar Deviasi Ekspresi p65 NFkB Ginjal. **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.7 Rerata dan Standar Deviasi Ekspresi p65 NFkB Ginjal..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 5.8 Hasil immunohistokimia p65 NFkB. **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Lembar Etik Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 2. Pernyataan Keaslian Tanaman **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 3. Surat Determinasi Tumbuhan dari ITB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 4. *Datasheet* Antibodi p65 NFKB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 5. Uji Normalitas Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 6. Uji Homogenitas Jumlah Vaskuler..... **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 7. Uji *t*-tidak berpasangan kelompok kontrol positif dan negatif **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 8. Hasil uji ANOVA kelompok perlakuan **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 9. Uji post Hoc *Bonferroni* Kelompok Perlakuan **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 10. Uji linearitas Jumlah Vaskuler terhadap Dosis Ekstrak **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 11. Uji Korelasi Pearson Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 12. Uji Regresi Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 13. Kurva Standard MDA **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 14. Hasil Uji Normalitas MDA **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 15. Uji Homogenitas MDA **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 16. Uji uji *t*-tidak berpasangan Kadar MDA Kelompok Kontrol:..... **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 17. Uji ANOVA *Welch* Kelompok Perlakuan **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 18. Uji Linearitas MDA terhadap Dosis Ekstrak **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 19. Uji Korelasi Pearson Dosis Ekstrak Physalis dan Kadar MDA **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 20. Uji Regresi Kadar MDA dan Dosis .. **Error! Bookmark not defined.**



Lampiran 21. Uji Linearitas Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 22. Uji Korelasi Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 23. Uji Regresi Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 24. Uji Normalitas Ekspresi p65 NFkB .. **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 25. Uji Varians / homogenitas Ekspresi p65 NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 26. Uji *t-tidak berpasangan* antara kelompok kontrol positif dan negatif **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 27. Uji *One-way ANOVA* Kelompok Perlakuan Ekspresi p65 NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 28. Uji *PostHoc* Kelompok Perlakuan.... **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 29. Uji Linearitas Ekspresi NFkB p65 dan Dosis **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 30. Uji Korelasi Pearson Ekspresi NFkB p65 **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 31. Uji Regresi Ekspresi NFkB p65 **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 32. Uji Linearitas Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 33. Uji Korelasi Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 34. Uji Regresi Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 35. Uji Linearitas MDA dan Ekspresi NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 36. Uji Korelasi MDA dan Ekspresi NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 37. Uji Regresi MDA dan Ekspresi NFkB **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 38. Analisis Jalur **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 39. Dokumentasi Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR SINGKATAN

AA	:	Asam Arakidonat
ACE	:	Angiotensin Converting Enzyme
ADMA	:	Asymmetric Dimethylarginine
AGE	:	Advanced Glycation End Products
Ang-II	:	Angiotensin II
ATP	:	Adenosine Triphosphate
BAFF	:	B-cell activating factor
CaM	:	Calmodulin
CAT-1	:	Cationic Amino Acid Transporters-1
cGMP	:	Cyclic Guanosine Monophosphate
c-IAP	:	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1
CML	:	Carboxymethyllysine
COX	:	Cyclooxygenase
CREB	:	cAMP response element binding protein
CYPR	:	Cytochrome P450 reductase
Dhcr7	:	7-Dehydrocholesterol Reductase
DUB	:	Deubiquitinating enzymes
EGF	:	Epidermal Growth Factor
eNOS	:	endothelial nitric oxide sintase
EPO	:	Erythropoietin
ET-1	:	Endotelin
EVG	:	Elastic Van Gieson
FAD	:	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	:	Flavin Mononucleotide
GC	:	Guanilate cyclase
GPR91	:	G-Protein Coupled Receptor 91
HE	:	Haematoxilyn-Eosin
HIF	:	Hypoxia-Inducible Factors
HMG-CoA	:	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A
HOIL-1	:	Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin Ligase 1
HOIP	:	HOIL-1-interacting protein



Hsp90	:	<i>Heat Shock Protein 90</i>
I-CAM	:	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	:	Interferon
IGF-1	:	insulin-like growth factor 1
IKB	:	inhibitor of kappa B
IKK	:	IkB kinase
IL	:	Interleukin
iNOS	:	<i>inducible nitric oxide sintase</i>
IRAP	:	Interleukin 1-Receptor Antagonist Protein
IRP2	:	Iron-responsive element-binding proteins
JGA	:	Juxtaglomerular Apparatus
LDL	:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
L-NAME	:	N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester
L-NNA	:	NG-nitro-L-Arginine
LOX-1	:	<i>Lectin-Type Oxidized LDL Receptor 1</i>
LUBAC	:	Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex
MAP3K	:	Mitogen-activated protein kinase kinase kinases
MCP-1	:	Monocyte chemoattractant protein-1
MDA	:	Malondialdehyde
MMP	:	Matrix metalloproteinases
mPGEs	:	Microsomal prostaglandin E synthase-1
NADPH	:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Nedd4-2	:	<i>Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein</i>
NEMO	:	NF-κB essential modulator
NFKB	:	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NHE2	:	Na ⁺ /H ⁺ exchanger isoform 2
NHERF2	:	<i>Sodium-Hydrogen Exchange Regulatory Cofactor</i>
NIK	:	NFKB Inducing Kinase
NKCC2	:	Na-K-Cl cotransporter
nNOS	:	<i>neuronal nitric oxide sintase</i>
NO	:	<i>Nitric Oxide</i>
Ox-LDL	:	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
PAS	:	Periodic acid–Schiff

PDGF	:	Platelet-derived growth factor receptors
pERK1/2	:	extracellular signal-regulated kinases
PGE ₂	:	Prostaglandin E2
PGI ₂	:	Prostasklin
PKG	:	Protein Kinase G
PLGF	:	Placental Growth Factor
RAGE	:	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RANK	:	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RBCK-1	:	RANBP2-type and C3HC4-type zinc finger containing 1
RNF31	:	Ring Finger Protein 31
ROMK	:	Renal Outer Medullary Potassium Channel
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	:	reverse transcription-polymerase chain reaction
SGK-1	:	Serine/threonine-protein kinase
SGLT	:	Sodium-glucose cotransporter
SHARPIN	:	SHANK (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein)-Associated Rh Domain Interact
TAB2	:	TAK1 <i>binding protein</i>
TAK1	:	Transforming growth factor beta-activated kinase
TAL	:	Thick Ascending Limb
TBK	:	Tank-binding kinase 1
TBx	:	Tromboksan
TGF	:	Transforming Growth Factor
TNFα	:	Tumor Necrosis Factor
TRAF	:	Tumor necrosis factor receptor-associated factors
TWEAK	:	TNF-related weak inducer of apoptosis
Ubc13	:	ubiquitin-conjugating enzyme
V-CAM	:	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VSMC	:	Vascular Smooth Muscle



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 1990, berdasarkan *Global Burden of Disease* penyakit ginjal kronik merupakan penyumbang kematian nomor 19 sedangkan pada tahun 2015 peringkatnya meningkat menjadi nomor 10 di dunia (IHME, 2016). Prevalensi global penyakit ini sebesar 13,4% (Hill *et al.*, 2016) dan insidennya semakin meningkat dari tahun ke tahun (Kao *et al.*, 2010). Penyakit ini merupakan masalah kesehatan global dengan biaya tinggi terutama bila sudah berada dalam stadium akhir (Hill *et al.*, 2016).

Menurut Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI (2017) dan Jha *et al.* (2013), penyebab terbanyak dari penyakit ginjal kronik adalah hipertensi kemudian diikuti oleh diabetes. Seluruh stadium penyakit ginjal kronik berkaitan dengan peningkatan morbiditas kardiovaskuler, mortalitas, dan juga penurunan kualitas hidup (Hill *et al.*, 2016). Proses yang menghubungkan antara patogenesis penyakit ginjal kronik dengan penyakit penyertanya (hipertensi dan diabetes) dan antara penyakit ginjal kronik dengan komplikasinya (penyakit kardiovaskuler) adalah disfungsi endotel (Goligorsky, 2015).

Disfungsi endotel dicirikan oleh penurunan bioavailabilitas vasodilator, utamanya *nitric oxide* (NO) (Endemann dan Schiffrin, 2004). Hal ini memicu terjadinya vasokonstriksi dan aktivasi endotel yang dicirikan oleh kondisi proinflamasi, proliferasi, dan prokoagulasi (Rajendran *et al.*, 2013). Berkurangnya bioavailabilitas NO pada penyakit ginjal akibat disfungsi endotel, perlu mendapat penanganan. Selama ini, preparat NO yang terdapat di praktik klinik berupa nitrogliserin, prekursor NO. Penggunaan nitrogliserin terbatas pada penanganan

awal dan profilaksis serangan jantung akut, yang artinya sudah muncul komplikasi kardiovaskuler (Boden *et al.*, 2015). Nitrogliserin belum digunakan sebagai tata laksana preventif pada penyakit ginjal kronik karena penggunaan nitrogliserin secara terus-menerus dan kronis dapat memicu takifilaksis dan merusak sel jantung saat terjadi serangan jantung. Nitrogliserin juga dapat merusak enzim ALDH2. Enzim ALDH2 berfungsi untuk membersihkan radikal bebas dan mengkonversi nitrogliserin menjadi NO (Ferreira dan Mochly-Rossen, 2012). Oleh karena itu diperlukan alternatif intervensi medikamentosa baru yang lebih aman dan bersifat preventif.

Disfungsi endotel pada mikrovaskuler ginjal menyebabkan terjadinya iskemia jaringan ginjal dengan berbagai konsekuensinya. *Prolong ischemia* dapat merusak sel pembuluh darah yang berujung pada fragmentasi struktur pembuluh darah ginjal (*vascular rarefaction*) (Goligorsky, 2015). Fragmentasi kapiler ginjal berkaitan dengan proses penuaan, fibrosis ginjal, dan merupakan indikator penurunan fungsi ginjal (Schmitt dan Melk, 2017).

Iskemia dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas berlebihan sehingga terjadi stres oksidatif (Goligorsky, 2015). Stres oksidatif dapat menyebabkan nonaktivasi NO menjadi peroxynitrit (ONOO). Peroksinitrit merupakan oksidan sitotoksik (Endemann dan Schiffrin, 2014) sehingga hal ini menyerupai lingkaran setan. Di level seluler, radikal bebas merusak membrane sel salah satunya dengan menyebabkan peroksidasi lipid. Lipid merupakan target yang rentan teroksidasi karena struktur molekulnya memiliki ikatan rangkap yang reaktif. Salah satu produk akhir oksidasi asam lemak tak jenuh dari sel adalah malondialdehid (MDA). Peningkatan radikal bebas berkaitan dengan peningkatan

kadar MDA. Oleh karena itu, kadar MDA sering digunakan sebagai penanda stres oksidatif dan status antioksidan *in vivo* (Gawel *et al.*, 2004).

Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas dapat mengaktifasi salah satu faktor transkripsi yang selanjutnya akan mensintesis mediator-mediator inflamasi, begitu juga sebaliknya. Faktor transkripsi tersebut adalah NFkB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). NFkB merupakan suatu kompleks protein yang terdiri dari lima macam protein, salah satunya adalah p65.

NFkB berfungsi meregulasi transkripsi gen (Oeckinghaus and Ghosh 2009) yang berperan dalam proses inflamasi, imunitas, proliferasi dan diferensiasi sel, dan apoptosis. Aktivasi NFkB yang berlebihan akan memicu terjadinya inflamasi berlebih dan kerusakan sel, termasuk sel ginjal (Guzik and Harrison, 2007).

Penelitian di lapangan menunjukkan bahwa suplementasi vitamin E pada pasien gagal ginjal dapat menurunkan kejadian komplikasi kardiovaskuler dengan signifikan. Pada suatu uji *randomized-control*, disebutkan juga bahwa pemberian N-asetilsistein pada penderita penyakit ginjal dapat menurunkan insiden terjadinya komplikasi kardiovaskuler (Kao *et al.*, 2010). Inflamasi juga menjadi salah satu penyebab dan akibat penting dari stres oksidatif yang terjadi pada penyakit ginjal. Namun, pemberian antiinflamasi non-steroid justru akan menambah kerusakan ginjal karena dapat menghambat sintesis prostaglandin. Prostaglandin merupakan vasodilator yang juga berperan dalam menjaga homeostasis aliran darah ginjal (Dixit *et al.*, 2010). Oleh karena itu, perlu dikaji lebih lanjut mengenai suplemen alternatif dari bahan herbal yang memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi pada ginjal dan lebih aman untuk diberikan pada penderita disfungsi endotel.

Salah satu bahan herbal, ceplukan (*Physalis angulata*), secara *in vitro* dapat meningkatkan NO, bersifat antioksidan, dan juga antiinflamasi. Tanaman ini mengandung senyawa bioaktif fisalin A, fisalin B, fisalin C, fisalin D, wita fisalin A, wita fisalin C dan 5,6-epoksifisalin B. Bahan-bahan tersebut diketahui bersifat sebagai fitoestrogen yang dapat meningkatkan produksi NO (Permatasari *et al.*, 2010). Tanaman ini juga kaya akan senyawa golongan polifenol dan flavonoid yang terutama terdapat pada daunnya dan berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Bastos *et al.*, 2008; Kusumaningtyas *et al.*, 2015; Lestari *et al.*, 2016). Dengan demikian dapat diduga bahwa *Physalis angulata* L. dapat mengatasi kelainan ginjal akibat disfungsi endotel yang sejauh ini belum banyak diketahui.

Pada penelitian ini akan diteliti peran ekstrak air daun tanaman tersebut dalam mereservasi jaringan ginjal secara *in vivo*. Sebagai hewan coba dengan model disfungsi endotel akan digunakan tikus wistar jantan yang diinduksi L-NAME. Pemberian L-NAME pada hewan coba diharapkan dapat menurunkan kadar NO sehingga terjadi kondisi disfungsi endotel. Untuk mengetahui mekanisme kerja ekstrak daun *Physalis angulata* L. terhadap disfungsi endotel yang diduga melalui mekanisme antioksidan, maka dilakukan dengan mengukur kadar peroksidasi lipid ginjal (MDA ginjal). Dan untuk mengetahui apakah daun *Physalis angulata* dapat menurunkan proses inflamasi yang terjadi pada disfungsi endotel adalah dengan menilai ekspresi NFkB. Untuk mengetahui apakah daun *Physalis angulata* berperan dalam proses perbaikan jaringan ginjal adalah dengan menghitung jumlah vaskuler ginjal.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal melalui pencegahan stres oksidatif dan inflamasi ginjal?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal?
2. Apakah pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah peningkatan kadar MDA ginjal?
3. Apakah pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah peningkatan ekspresi NFkB ginjal?
4. Apakah terdapat hubungan antara besarnya dosis ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dengan kadar MDA, ekspresi NFkB, dan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME?
5. Apakah terdapat hubungan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)?

6. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi NFkB dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal melalui pencegahan stres oksidatif dan inflamasi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan efek ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dalam mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME.
2. Untuk membuktikan efek ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dalam mencegah peningkatan kadar MDA ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME.
3. Untuk membuktikan efek ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dalam mencegah peningkatan ekspresi NFkB ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME.
4. Untuk membuktikan hubungan antara besarnya dosis pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dengan kadar MDA, ekspresi NFkB, dan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME.

5. Untuk membuktikan hubungan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)

6. Untuk membuktikan hubungan antara ekspresi NFkB dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat digunakan sebagai dasar ilmiah bagi penelitian selanjutnya dan mendukung perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kedokteran, terutama yang berhubungan dengan aspek prevensi penyakit ginjal akibat disfungsi endotel.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

- Memperkaya khazanah pengetahuan tentang khasiat tanaman sebagai terapi komplementer dan memasyarakatkannya.
- Mengembangkan terapi alternatif dari bahan yang mudah didapatkan di sekitar sebagai upaya prevensi sekunder terhadap penyakit ginjal sebagai komplikasi dari disfungsi endotel.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Disfungsi Endotel

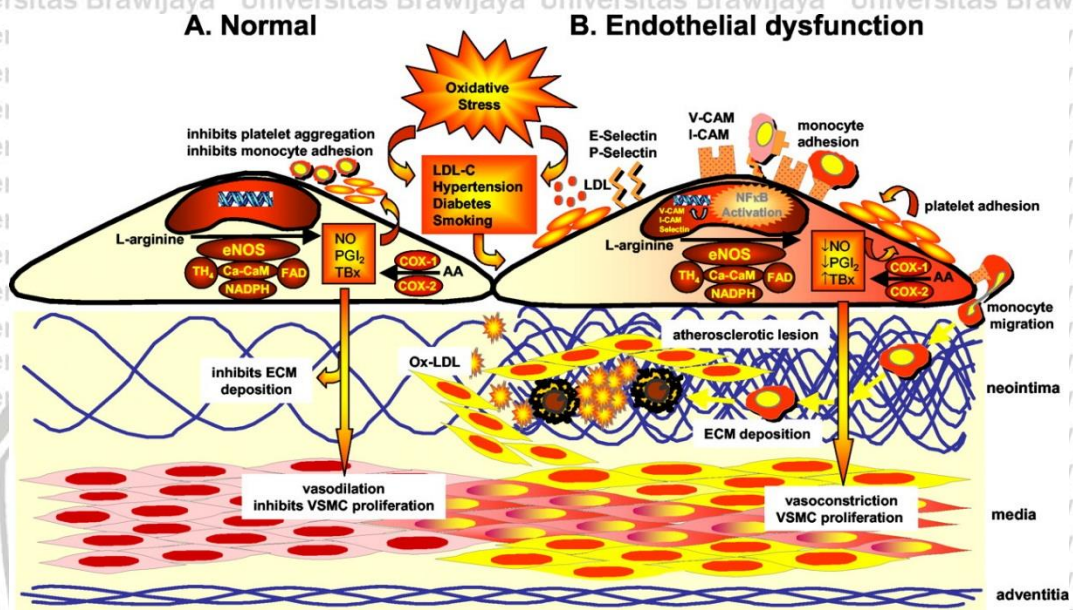
2.1.1 Patofisiologi

Disfungsi mikrovaskuler merupakan hal yang berperan penting bagi progresifitas penyakit kardiometabolik dan penyakit ginjal. Disfungsi mikrovaskuler sering hadir bersamaan dengan atau bahkan mendahului penyakit makrovaskuler. Proses awal yang terjadi pada disfungsi mikrovaskuler adalah disfungsi endotel (Houben *et al.*, 2017). Penelitian sejak tahun 1980an menunjukkan bahwa endotel tidak hanya selapis dinding pembatas yang membatasi darah dan jaringan sekitarnya, namun juga sebagai organ yang dapat menghasilkan berbagai senyawa metabolik aktif (Davel *et al.*, 2011) yang memiliki efek autokrin dan parakrin (Verma *et al.*, 2003).

Endotel berfungsi meregulasi tonus vaskuler, adesi seluler, tromboresisten, proliferasi sel otot polos, dan inflamasi dinding pembuluh darah (Deanfield *et al.*, 2007). Sel endotel mempertahankan tonus vaskuler dengan cara menyeimbangkan senyawa vasodilator dan vasokonstriktor yang dihasilkan. Endotel juga berfungsi mengontrol kekentalan darah dan koagulasi melalui faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas platelet, kaskade pembekuan, dan sistem fibrinolisis (Libby *et al.*, 2002).

Pada kondisi normal (Gambar 2.1 (a)), sel endotel menghasilkan senyawa anti-inflamasi, antitrombotik, dan sitostatik yang membantu memelihara tonus vaskuler dan melindungi dinding pembuluh darah dari sel inflamasi, adesi platelet, formasi trombus, dan proliferasi sel vaskuler. Homeostasis sel endotel

dipelihara oleh *nitric oxide* / nitrogen monoksida (NO) yang terbentuk dari gugus guanidin terminal L-arginin dengan bantuan eNOS, dan prostasiklin (PGI₂) yang berasal dari pemecahan asam arakidonat oleh siklooksigenase (cox) dan prostasiklin sintase (Melo *et al.*, 2004).



Gambar 2.1 Endotel

(A). Sel endotel pada kondisi normal (B). Disfungsi endotel. Hilangnya mediator yang menghambat pertumbuhan dari endotel memicu aktivasi dan migrasi sel otot polos vaskuler ke tunika intima sehingga membentuk lapisan neointima. Infiltrasi sel-sel inflamasi ke tunika intima dan akumulasi LDL yang teroksidasi menyebabkan terbentuknya lesi aterosklerotik (Melo *et al.*, 2004)

Selama berada dalam keadaan homeostasis, fungsi-fungsi endotel tersebut dapat dipertahankan dengan baik. Namun, pada kondisi tertentu, seperti merokok, penuaan, hiperkolesterolemia, hipertensi, hiperglikemia, obesitas, meningkatnya kadar C-reactive protein (CRP), dan infeksi sistemik kronik, dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan vasodilatasi yang bergantung pada endotel (Widlansky *et al.*, 2003).

Ketika produksi NO berkurang, keseimbangan vasodilator dan vasokonstriktor seperti endotelin dan tromboksan menjadi terganggu sehingga cenderung ke arah vasokonstriksi. Sel endotel menjadi teraktivasi dan

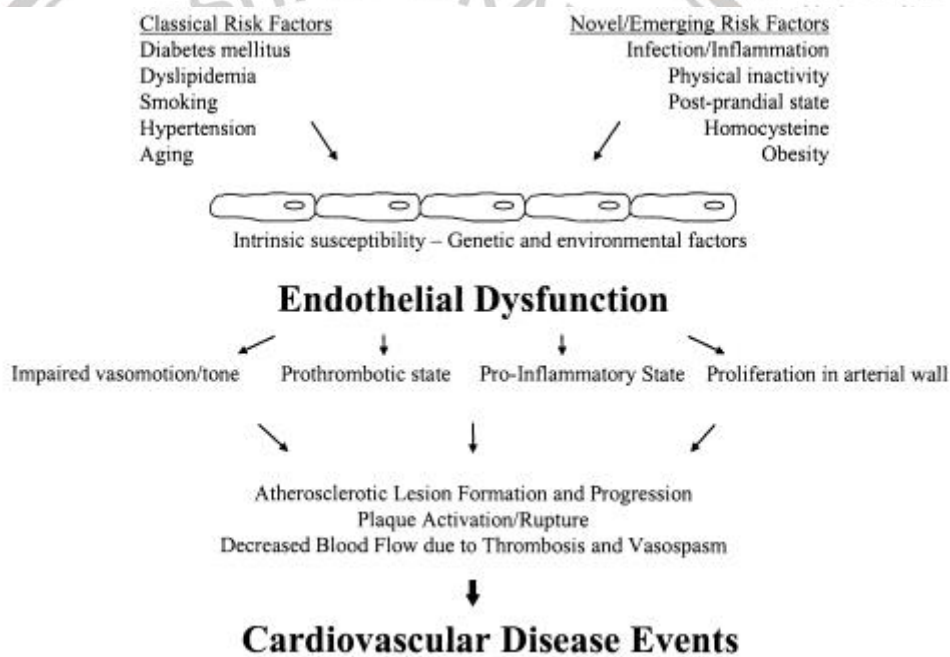
mensekresikan molekul adesi seperti selektin dan integrin yang meningkatkan leukosit dan adesi platelet serta formasi trombus. Hilangnya mediator yang menghambat pertumbuhan dari endotel memicu aktivasi dan migrasi sel otot polos vaskuler ke tunika intima sehingga membentuk lapisan neointima. Infiltrasi sel-sel inflamasi ke tunika intima dan akumulasi LDL yang teroksidasi menyebabkan terbentuknya lesi aterosklerotik (Melo et al., 2004)

Disfungsi endotel terjadi ketika homeostasis endotel terganggu oleh stres patologis seperti stres oksidatif, hiperlipidemia, hipertensi, dan diabetes (Melo et al., 2004). Disfungsi endotel dicirikan dengan bergesernya keseimbangan fungsi endotel sehingga mengganggu proses vasodilatasi, rentan terjadi inflamasi dan koagulasi berlebihan. Disfungsi endotel berkaitan dengan berbagai penyakit kardiovaskuler, seperti hipertensi, penyakit jantung koroner, gagal jantung kronik, penyakit arteri perifer, diabetes, dan gagal ginjal kronik (Endemann dan Shifrin, 2014).

Mekanisme yang terjadi pada penurunan kemampuan vasodilatasi akibat disfungsi endotel antara lain adalah menurunnya produksi nitrogen monoksida (NO), meningkatnya produksi agen vasoaktif, seperti endotelin-1, angiotensin II, dan tromboksan (TBx) sehingga cenderung ke arah vasokonstriksi (Melo et al., 2004), dan menurunnya produksi faktor yang menyebabkan hiperpolarisasi. Sel endotel teraktivasi sehingga meningkatkan ekspresi molekul adesi, kemokin, seperti *macrophage chemoattractant peptide-1*, selektin, integrin, dan *plasminogen activator inhibitor-1*, yang terlibat dalam proses inflamasi, koagulasi, dan formasi trombus (Gambar 2.1b). Selain itu, pada proses disfungsi endotel terdapat akumulasi dimetilarginin asimetris yang merupakan inhibitor nitrogen monoksida endogen, hiperkolesterolemia, hiperhomosisteinemia, terganggunya

sinyal insulin, dan hiperglikemia. Akhirnya terjadi apoptosis dan pengelupasan sel endotel (anoikis). Disfungsi endotel merupakan proses awal dalam aterosklerosis, sehingga memunculkan terjadinya plak. Menurunnya sel-sel progenitor endotel di sirkulasi yang berfungsi untuk regenerasi endotel juga berperan dalam patofisiologi endotel. Disfungsi endotel sangat berperan dalam menentukan terjadinya penyakit kardiovaskuler (Gambar 2.2). Penanganan terhadap disfungsi endotel berkaitan dengan menurunnya risiko kardiovaskuler.

Sel-sel progenitor endotel yang terdapat di sirkulasi dapat menjadi pendekatan terapi yang potensial bagi disfungsi endotel (Endemann dan Shifrin, 2014).

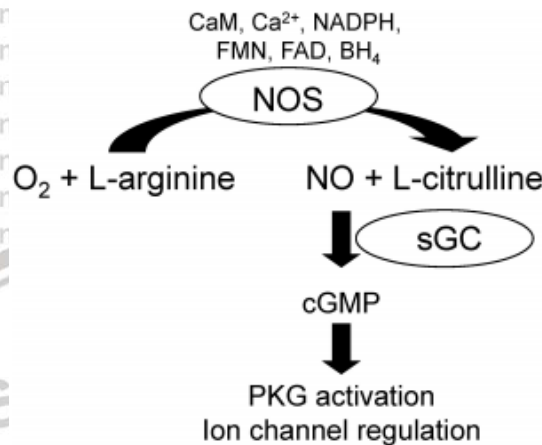


Gambar 2.2. Peran disfungsi endotel dalam patogenesis penyakit kardiovaskuler. Respon endotel terhadap berbagai faktor risiko penyakit kardiovaskuler berkaitan dengan faktor lingkungan dan faktor intrinsik seperti polimorfisme genetik, faktor diet, aktifitas fisik, dan lain sebagainya. Oleh karena itu, endotel berperan sebagai barometer untuk terjadinya risiko kardiovaskuler (Widlansky *et al.*, 2003).

2.1.1.1 Nitric Oxide (NO) dalam Patogenesis Disfungsi Endotel

Nitrogen monoksida merupakan molekul radikal bebas berupa gas dengan berat molekul 30.006 g/mol yang dihasilkan secara endogen oleh

berbagai sel mamalia. Molekul ini bersifat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan oksigen. NO bersifat larut air dan berperan sebagai mediator komunikasi antar sel (Pubchem, 2017).



Gambar 2.3 Sintesis Nitrogen monoksida

NO sintase (NOS) mengubah oksigen dan L-arginin menjadi nitrogen monoksida (NO) dan L-citrullin. Kofaktor yang dibutuhkan untuk reaksi ini antara lain kalmodulin (CaM), kalsium (Ca²⁺), tetrahydrobiopterin (BH₄), flavinmononukleotida (FMN), dan flavin adenin dinukleotida (FAD) (Sasser, 2015).

Penurunan bioavailabilitas NO merupakan kunci utama pada patogenesis disfungsi endotel (Chade, 2013). Hal ini terkait dengan fungsi NO sebagai salah satu vasodilator penting yang dihasilkan endotel (Endemann dan Shifrin, 2014). Selain berperan untuk mengimbangi vasokonstriktor endotel seperti Ang II dan endotelin-1 (Verma *et al.*, 2003), NO juga dapat menghambat pertumbuhan otot polos, sintesis matriks, dan inflamasi, serta memiliki efek antiagregasi terhadap platelet (Endemann dan Schiffrin, 2014). Penurunan NO dapat memicu apoptosis sel endotel (Ungvari *et al.*, 2010).

NO disintesis dari substratnya L-arginin oleh enzim NO sintase (NOS) (Gambar 2.3). NO yang telah terbentuk akan mengaktifasi guanilil siklase solubel sehingga menghasilkan cGMP. cGMP mengaktifasi protein kinase G dan

mempengaruhi kanal ion kalsium dan kalium sehingga terjadi relaksasi (Sasser, 2015).

NO dapat mencegah translokasi NFκB ke dalam nukleus melalui dua cara, yaitu, pertama, NO meningkatkan ekspresi IκB. IκB merupakan protein pengikat heterodimer NFκB p50/p65. Kedua, NO juga akan berikatan dengan gugus sistein dari p50. Pada akhirnya kedua hal ini akan mencegah translokasi NFκB ke nukleus sehingga mencegah terjadinya ekspresi molekul inflamasi seperti VCAM-1, MCP-1, dan ICAM-1 (Guzik dan Harrison, 2007). Penurunan NO sering diterjadi saat fungsi endotel terganggu. Hal ini dapat disebabkan oleh menurunnya aktivitas NO sintase endotel (eNOS) sehingga menurunkan bioavailabilitas NO (Endemann dan Schiffrin, 2014). Fungsi NO diringkas dalam

Gambar 2.4 berikut:



Gambar 2.4. Peran Nitrogen monoksida. Ujung panah runcing menunjukkan induksi, ujung panah segi empat (wajik) menunjukkan inhibisi (Sasser, 2015).

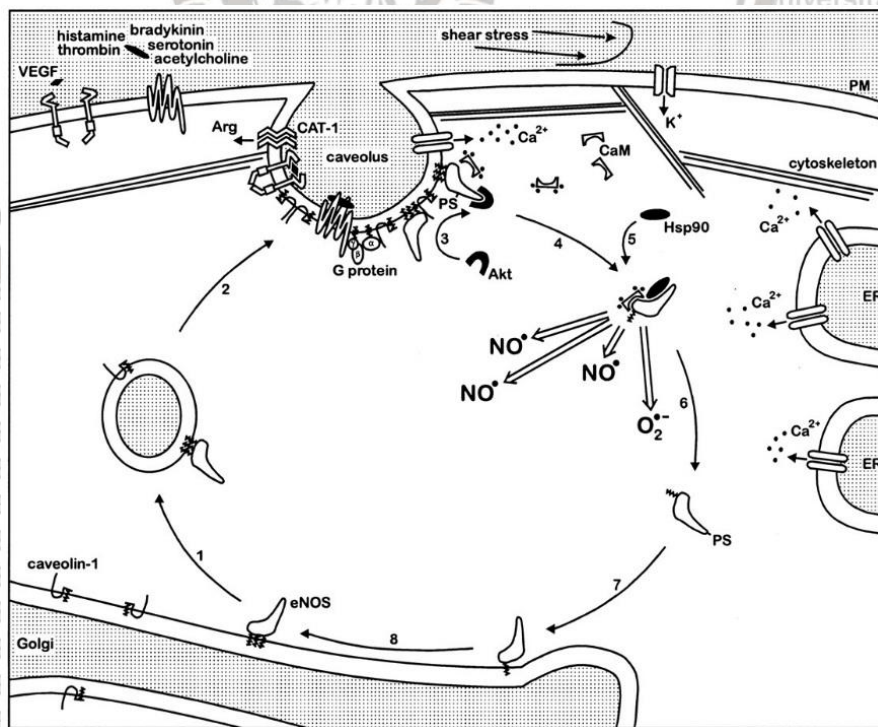
Telah disebutkan bahwa pembentukan NO diperantarai oleh enzim NO sintase (NOS). Terdapat tiga isoform NOS pada mamalia: neuronal NOS (NOS1, nNOS), *inducible* NOS (NOS2, iNOS), dan endotelial NOS (NOS3, eNOS). Di

ginjal ditemukan ketiga macam NO sintase dan telah dikonfirmasi dengan *Northern blotting*, *RT-PCR*, hibridisasi in situ untuk mRNA, dan penentuan lokalisasi secara immunohistokimia dan Western blot pada level protein. NOS1 dan NOS3 dependen terhadap kalsium/ kalmodulin; sedangkan NOS2 independen terhadap kalsium dan dipicu sebagai respon terhadap rangsangan inflamasi (Sasser, 2015).

eNOS terletak di kaveola membran plasma. Pada sel endotel, eNOS berada dalam kondisi inaktif selama masih berikatan dengan caveolin 1 (cav-1).

Ketika mengalami aktivasi, eNOS berdisosiasi dari cav-1 kemudian berikatan dengan calmodulin (CAM) dan *heat shock protein 90* (Hsp90) lalu mengalami fosforilasi di bagian serin. Pada Gambar 2.5 eNOS yang terdapat di dalam kompleks Golgi (terikat di membran oleh gugus miristoil dan palmitoyl), ditransport bersamaan dengan caveolin-1 ke dalam caveola di membran plasma (PM) melalui vesikel (1 dan 2). Di dalam kaveola, eNOS berikatan dengan caveolin-1 yang mencegah aktivitas eNOS. Sinyal *shear stress* melalui kanal potasium dan sitoskeleton menyebabkan fosforilasi tirosin, aktivasi fosfatidilinositol 3-kinase, dan aktivasi Akt kinase. Aktivasi Akt oleh *shear stress* dan VEGF akan mengaktivasi eNOS melalui fosforilasi serin (3) sehingga meningkatkan afinitas eNOS terhadap kalmodulin. Setelah berikatan dengan agonisnya di membran plasma, reseptor eNOS akan bertranslokasi ke kaveola. Reseptor ini akan mengaktivasi *G proten*, sedangkan reseptor VEGF akan menghantarkan sinyal melalui domain tirosin kinase. Reseptor-reseptor ini selanjutnya akan mengaktivasi kanal kalsium di caveola. Dan lebih jauh lagi, akan mengaktivasi kanal kalsium dari retikulum endoplasma melalui fosfolipase C dan inositol 1,4,5-trifosfat. Kalsium fluks memicu ikatan kalmodulin ke eNOS, sementara itu

interaksi eNOS-caveolin-1 akan terlepas. Pada waktu yang bersamaan, eNOS akan mengalami depalmitoilasi dan bertranslokasi ke sitosol (4). Saat berikatan dengan kalmodulin, eNOS melepaskan NO (dan pada kondisi tertentu dapat melepaskan superoksid, O_2^-), yang dapat dipicu oleh interaksinya dengan Hsp90 (5). eNOS diinaktivasi oleh PS dan oleh disosiasi kalmodulin (6). Fosforilasi memicu lepasnya ikatan eNOS-kalmodulin. Setelah bertranslokasi ke kompleks Golgi (7), eNOS kembali dipalmitoilasi (8), yang menyebabkan eNOS ditransport ke kaveola lagi. CAT-1, cationic amino acid transporter (Govers dan Rabelink, 2001). Protein eNOS fungsional merupakan dimer (sehingga dinamakan *coupled eNOS*) dengan kofaktor esensial tetrahydrobiopterin (BH4) yang penting untuk optimalisasi aktivitas eNOS. BH4 memfasilitasi transfer elektron dari NADPH untuk mengkonversi L-arginin menjadi NO dan L-citrulin (Kietadisorn *et al.*, 2012).

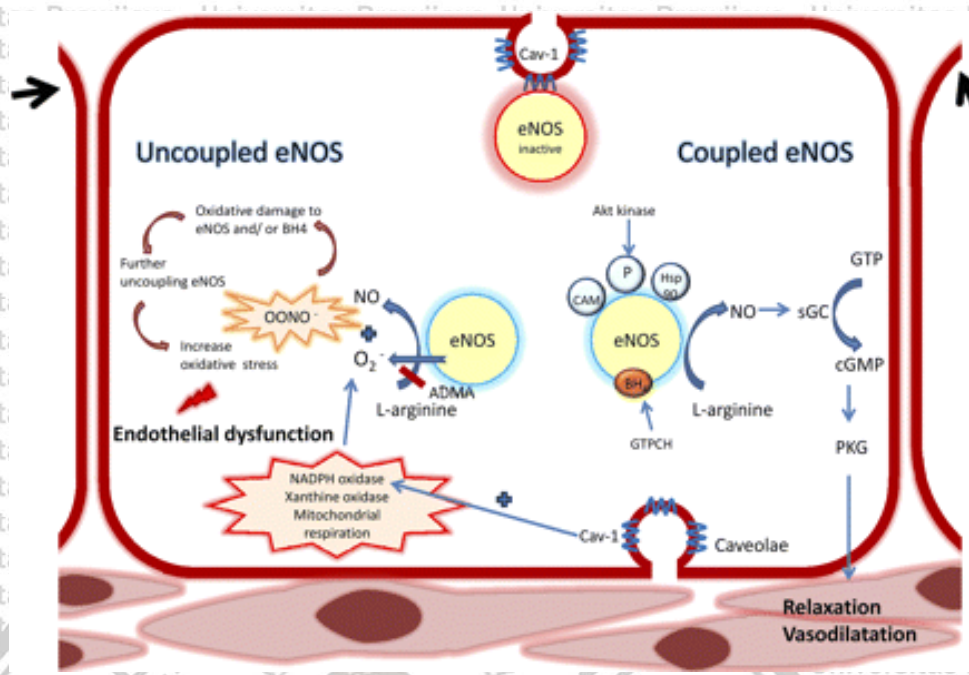


Gambar 2.5. Siklus aktivasi dan deaktivasi eNOS

Penurunan aktivitas eNOS terjadi akibat adanya inhibitor eNOS endogen atau pun eksogen dan atau menurunnya substrat eNOS yaitu L-arginin. Spesies oksigen reaktif dapat menon-aktifkan NO dengan mengubah NO menjadi peroxynitrit (ONOO) (Endemann dan Schiffrin, 2014); yang merupakan oksidan sitotoksik, dan melalui nitrasi protein akan memengaruhi fungsi protein dan fungsi endotel. Peroksinitrit merupakan mediator penting bagi oksidasi LDL, terutama saat pembentukan plak aterosklerotik (Griendling dan FitzGerald, 2003).

Peroksinitrit menyebabkan degradasi kofaktor eNOS tetrahidrobiopterin (BH4) (Endemann dan Schiffrin, 2014) sehingga menyebabkan terbentuknya eNOS yang tidak berpasangan (*uncoupling* eNOS) (Endemann dan Schiffrin, 2014) dan menghasilkan senyawa superoksida dan hidrogen peroksida (Verma *et al.*, 2003)

Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan katalis dekomposisi peroxynitrit, FP15, dapat mencegah disfungsi endotel pada mencit yang diabet (Szabo *et al.*, 2002). Oksidan yang berlebihan dapat menyebabkan penurunan BH4 dan meningkatkan BH2 (dihidrobiopterin) (Gambar 2.6). Ketika hal ini terjadi, pembentukan dimer eNOS aktif dengan aktifitas oksigenase dan produksi NO berkurang. Fungsi reduktase dari eNOS teraktivasi sehingga terbentuklah senyawa oksigen reaktif yang berlebihan. NO sintase berubah dari fungsi oksigenase yang menghasilkan NO menjadi fungsi reduktase yang menghasilkan ROS, akibatnya terjadi efek buruk pada endotel dan vaskuler (Landmesser *et al.*, 2003)



Gambar 2.6 Peran penting uncoupling NO sintase endotelial dalam patogenesis disfungsi endotel. NO berperan melalui kaskade signaling yang dependen cGMP. Interaksi antara L-arginin dengan ADMA merupakan kompetisi langsung. Ketika kadar L-arginin atau BH4 inadekuat, eNOS menjadi tidak stabil dan *uncoupled*, sehingga produksi NO berkurang dan terbentuk superoksida. Interaksi antara superoksida dan NO membentuk peroksinitrit, oksidan poten yang dapat mengoksidasi BH4. Hal ini menimbulkan lingkaran setan dan semakin memperberat disfungsi endotel (Kieatadisorn *et al.*, 2012).

Produksi ROS berlebih dapat memicu kondisi proinflamasi pada dinding pembuluh darah. Spesies oksigen reaktif meningkatkan sintesis molekul adesi (VCAM-1 dan ICAM-1) dan molekul kemotaktik (*macrophage chemoattractant peptide-1* [MCP-1]) (Griendling dan FitzGerald, 2003). Inflamasi menurunkan bioavailabilitas NO. *C-reactive protein* menurunkan aktifitas eNOS (Venugopal *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2002). Sumber utama oksidan berlebih di vaskuler adalah NAD(P)H oksidase. Sumber oksidan yang lain adalah xantin oksidase (Landmesser *et al.*, 2002), mitokondria (Du X *et al.*, 2003), dan NOS *uncoupled*.

Berdasarkan uraian di atas, disimpulkan bahwa menurunnya bioavailabilitas NO dapat disebabkan oleh berbagai faktor, misalnya penurunan ekspresi eNOS, berkurangnya substrat atau kofaktor eNOS, gangguan proses

penghantar sinyal di dalam sel, inhibisi enzim oleh senyawa inhibitor, meningkatnya degradasi NO radikal bebas.

2.1.1.2 Angiotensin II dalam Patogenesis Disfungsi Endotel

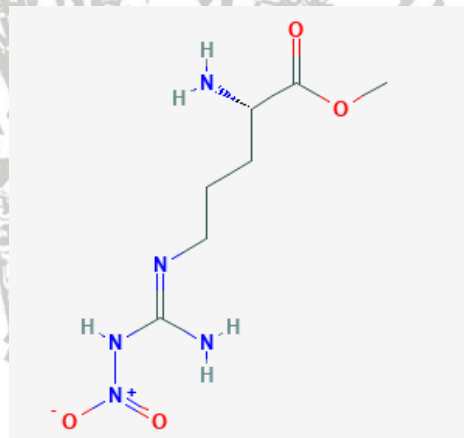
Angiotensin II berkaitan dengan patofisiologi hipertensi dan gagal ginjal kronik (Diep *et al.*, 2002). Keseimbangan antara angiotensin II dan *nitric oxide* diperlukan untuk menjaga fungsi ginjal (Polichnowski *et al.*, 2011). Pemberian Angiotensin II melalui infus dapat memicu disfungsi endotel pada tikus (Diep *et al.*, 2002). Penelitian oleh Polichnowski *et al.* (2011) menyatakan bahwa kerusakan ginjal pada tikus yang diinduksi L-NAME dan angiotensin II tidak bergantung pada kenaikan tekanan darah (Polichnowski *et al.*, 2011). Stimulasi Angiotensin II pada reseptor AT₂ akan menyebabkan efek proinflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi NFκB (Wolf *et al.*, 2002)

Angiotensin II meningkatkan spesies oksigen reaktif dengan cara menstimulasi NAD(P)H oksidase (Touyz *et al.*, 2002), dan menyebabkan inflamasi vaskuler (Schiffrin dan Touyz, 2003). Spesies oksigen reaktif tersebut dapat menginaktivasi NO dan juga dapat mengaktivasi NFκB secara langsung melalui mekanisme *redox sensitive*. Kombinasi efek ini dapat mempercepat kerusakan organ (salah satunya adalah ginjal) akibat hipertensi (Guzik and Harrison, 2007). Pada manusia yang menderita hipertensi, pemberian inhibitor ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) atau bloker angiotensin reseptor dapat mengembalikan fungsi endotel yang berlawanan dengan efek β-bloker (tidak memiliki efek terhadap vasodilatasi yang bergantung endotel) (Schiffrin *et al.*, 2002).

2.1.2 L-NAME

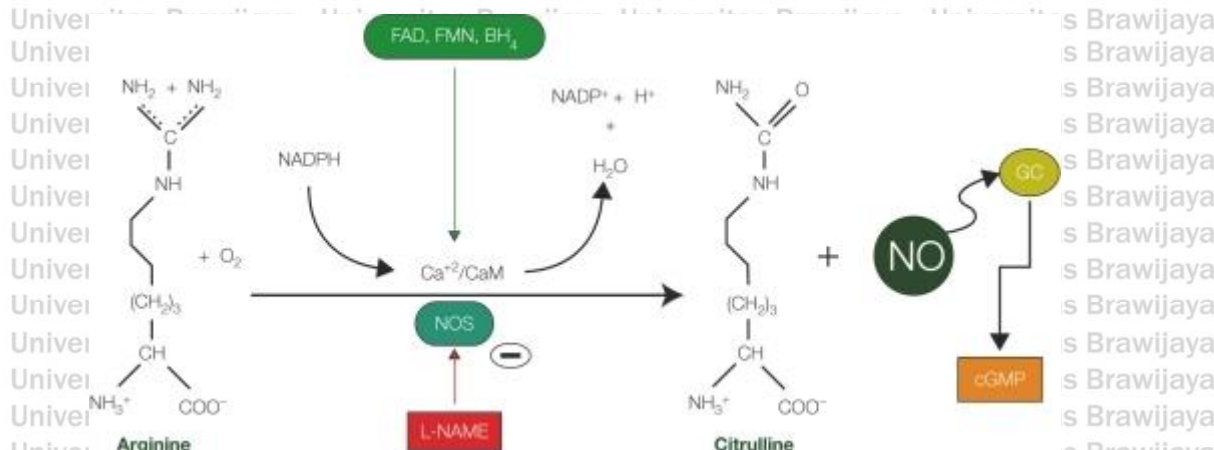
L-NAME atau disebut juga N omega-nitro-L-arginin metil ester, yang memiliki rumus molekul $C_7H_{15}N_5O_4$ merupakan inhibitor non-selektif dari *nitric oxide syntase* yang sering digunakan untuk menginduksi terjadinya hipertensi pada suatu penelitian. L-NAME memiliki berat molekul 233.228 g/mol. Saat diinkubasi dengan plasma dan darah, L-NAME dihidrolisis menjadi N(G)-nitro-L-arginine (L-NOARG), yang merupakan bentuk aktifnya. Pada pemberian secara infus, L-NAME memiliki waktu paruh 19 menit, sementara itu L-NOARG 23 jam.

Volume distribusi L-NAME adalah 0.451/kgBB, sedangkan L-NOARG 1.961/kg BB (Vite'cek *et al.*, 2012). Berikut adalah struktur dua dimensi dari L-NAME (Pubchem, 2017; Gambar 2.7):



Gambar 2.7. L-NAME Struktur 2-dimensi

L-NAME dapat menghambat sintesis NO karena bertindak sebagai analog L-arginin yang merupakan substrat dari NO sintase (Suda *et al.*, 2002) (Gambar 2.8). L-NAME mudah larut air dibandingkan L-NNA. Perlu diketahui bahwa penelitian pada tikus membuktikan bahwa aktivitas saraf simpatis tidak dipengaruhi oleh administrasi L-NAME (Santos *et al.*, 2010).



Gambar 2.8. Pengaruh L-NAME pada Sintesis Nitrogen monoksida (NO).

NO dihasilkan dari arginin dan oksigen. Proses pembentukan NO dikatalisis oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS) dan membutuhkan kofaktor NADPH (*nicotinamide dinucleotide phosphate*), BH₄ (*tetrahydrobiopterin*), FMN (*flavin mononucleotide*), dan FAD (*flavin adenine dinucleotide*). Sintesis NO dapat dihambat oleh N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), senyawa inhibitor nNOS dan eNOS. Singkatan: Ca²⁺/CaM: Calcium/calmodulin; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; GC: guanylate cyclase; PKG: protein kinase G (Freire *et al.*, 2009)

Pemberian analog L-arginin secara akut maupun kronik mempengaruhi fungsi dan struktur ginjal. Saat diberikan secara akut, senyawa ini memiliki efek antinatriuresis sehingga meningkatkan tekanan perfusi ginjal (Jover dan Mimran, 2001). Pemberian L-NAME secara sistemik pada tikus menyebabkan penurunan aliran plasma ginjal. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan resistensi vaskuler ginjal. Peningkatan resistensi vaskuler ginjal ini dapat terjadi meskipun tidak terjadi peningkatan tekanan darah (Sasser, 2015).

Endotelin dan angiotensin II berperan penting dalam regulasi hemodinamik ginjal yang berkaitan dengan L-NAME. Pemberian L-NAME memicu hipersensitivitas sel terhadap angiotensin II yang diduga melalui peningkatan ekspresi atau peningkatan sensitifitas reseptor angiotensin II (AT1) (Figuroa-Guillén *et al.*, 2009). Pemberian L-NAME jangka panjang menyebabkan hipertensi, lesi vaskuler intrarenal, lesi tubular, lesi glomerular, dan menurunnya fungsi ginjal. Beberapa penelitian melaporkan bahwa perubahan

struktur ginjal akibat induksi L-NAME tidak tergantung pada tekanan darah dan sebagian dimediasi oleh endotelin. Sistem saraf simpatis dan sistem renin-angiotensin sama-sama berperan pada inhibisi L-NAME secara kronik (Jover dan Mimran, 2001). Pemberian L-NAME jangka panjang secara per-oral pada hewan coba dapat menimbulkan lesi arteriosklerotik pada pembuluh darah koroner pada level mikrovaskuler. Induksi hewan coba dengan L-NAME dianggap sebagai model hewan coba yang sesuai untuk mempelajari peran NO endotel dalam patogenesis arteriosklerosis (Suda *et al.*, 2002).

Pemberian L-NAME secara intravena (20 mg/kg) menyebabkan perubahan aliran darah yang kompleks pada anjing. Pemberian L-NNA dan L-NAME dengan dosis mencapai 0.1 mmol/L pada pembuluh darah koroner hewan coba dapat menurunkan efek vasodilator (bradikinin, 5-hidroksitriptamin, dan lain sebagainya) (Viteček *et al.*, 2012). Pemberian L-NAME selama 15 hari secara intraperitoneal dengan dosis 40 mg/kgBB pada tikus wistar dapat menyebabkan kerusakan otak, ginjal, dan paru-paru akibat stres oksidatif (Talas *et al.*, 2013) dan dapat merusak mikrosirkulasi liver (Talas *et al.*, 2015).

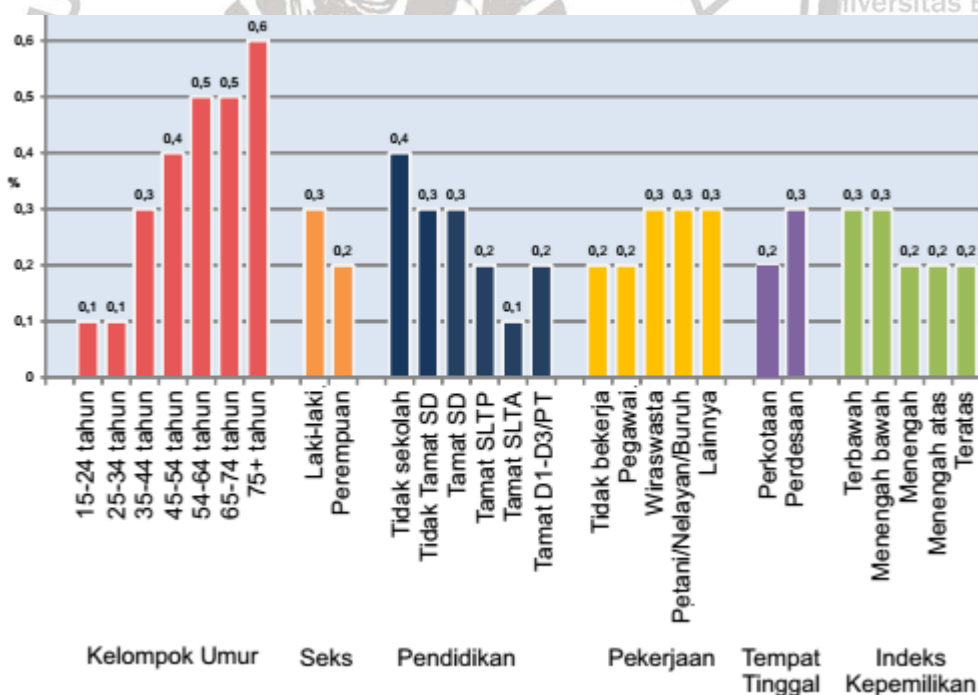
2.2 Penyakit Ginjal dan Disfungsi Endotel

Penyakit ginjal merupakan istilah umum untuk berbagai gangguan pada struktur dan fungsi ginjal (Levey and Coresh, 2012). Berdasarkan durasinya, penyakit ginjal meliputi penyakit ginjal akut dan penyakit ginjal kronik. Penyakit ginjal akut merupakan terganggunya fungsi ginjal secara tiba-tiba dan sementara. Sedangkan penyakit ginjal kronik adalah penurunan fungsi ginjal selama lebih dari tiga bulan. Penyakit ginjal kronik ini dapat berkembang menjadi penyakit

ginjal stadium akhir (*end-stage renal disease / ESRD*) (The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2016).

Penyakit ginjal kronik merupakan masalah kesehatan global dengan biaya tinggi dan merupakan faktor risiko independen terhadap penyakit kardiovaskuler. Seluruh stadium penyakit gagal ginjal kronik berkaitan dengan peningkatan morbiditas kardiovaskuler, mortalitas, dan juga penurunan kualitas hidup. Prevalensi global penyakit ginjal kronis sebesar 13,4% (Hill *et al.*, 2016).

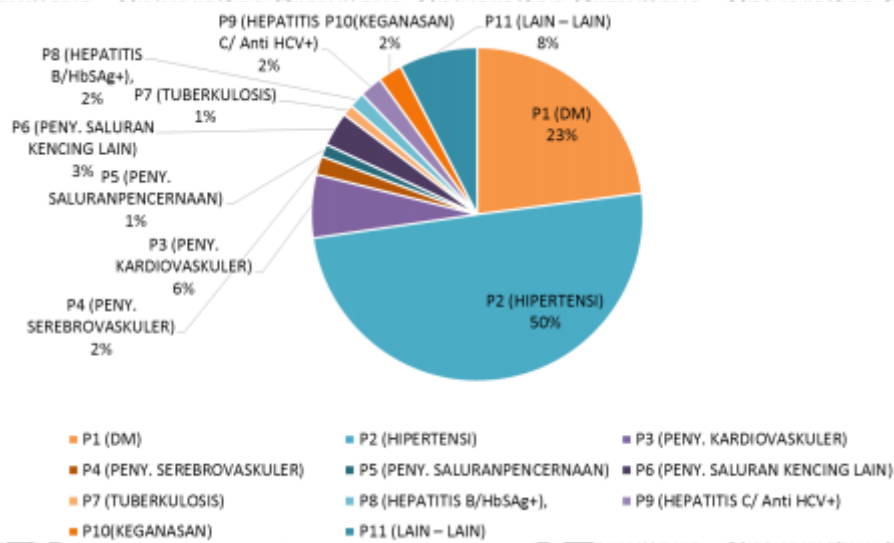
Berdasarkan *Global Burden of Disease*, pada tahun 1990 penyakit ginjal kronis merupakan penyebab kematian peringkat ke-27 di dunia dan meningkat menjadi urutan ke-18 pada tahun 2010. Sedangkan pada tahun 2015, penyakit ginjal menjadi penyebab kematian peringkat ke-14 di dunia dan diprediksi akan meningkat menjadi urutan ke-13 pada tahun 2030 (WHO, 2015).



Gambar 2.9 Prevalensi Gagal Ginjal Kronis menurut Karakteristik di Indonesia (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017)

Di Indonesia, hasil Riskesdas 2013 (Gambar 2.9) menunjukkan bahwa pada populasi umur ≥ 15 tahun yang terdiagnosis gagal ginjal kronis adalah sebesar 0,2%. Angka ini lebih rendah dibandingkan prevalensi penyakit ginjal kronik di negara-negara lain. Sedangkan hasil penelitian Perhimpunan Nefrologi Indonesia (Pernefri) tahun 2006, mendapatkan prevalensi penyakit ginjal kronik sebesar 12,5%. Hal ini karena Riskesdas 2013 hanya menangkap data orang yang terdiagnosis PGK sedangkan sebagian besar PGK di Indonesia baru terdiagnosis pada tahap lanjut dan akhir. Hasil tersebut juga menunjukkan prevalensi meningkat seiring dengan bertambahnya umur, dengan peningkatan tajam pada kelompok umur 35-44 tahun dibandingkan kelompok umur 25-34 tahun. Prevalensi pada laki-laki (0,3%) lebih tinggi dari perempuan (0,2%), prevalensi lebih tinggi terjadi pada masyarakat perdesaan (0,3%), tidak bersekolah (0,4%), pekerjaan wiraswasta, petani/nelayan/buruh (0,3%), dan kuintil indeks kepemilikan terbawah dan menengah bawah masing-masing 0,3%. Sedangkan provinsi dengan prevalensi tertinggi adalah Sulawesi Tengah sebesar 0,5%, diikuti Aceh, Gorontalo, dan Sulawesi Utara masing-masing 0,4 % (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017).

Penyakit ginjal kronik umumnya berkaitan dengan usia tua, diabetes, hipertensi, obesitas, dan penyakit kardiovaskuler (Levey and Coresh, 2012). Di Indonesia, hipertensi masih menjadi penyakit penyerta terbanyak pada pasien hemodialisa (Gambar 2.10), kemudian diikuti oleh diabetes dan penyakit kardiovaskular (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017). Disfungsi endotel terlibat dalam patofisiologi penyakit ginjal kronik dan penyakit penyertanya tersebut (Chade, 2013).



Gambar 2.10 Proporsi Diagnosis Etiologi Pasien Hemodialisis di Indonesia (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017)

Penyakit ginjal kronik dicirikan oleh vaskulopati generalisata, yang diikuti dengan meningkatnya mortalitas akibat komplikasi kardiovaskuler, terutama aterosklerosis (Costa-hong *et al.*, 2009). Disfungsi sel endotel merupakan penyebab terjadinya morbiditas kardiovaskuler ini (Goligorsky, 2015). Endotel terdapat di seluruh sistem organ dan memiliki bermacam-macam fungsi. Sel endotel terdapat di arteri, kapiler, vena di setiap jaringan dan organ, termasuk vaskuler tumor dan juga ginjal (Malyszko, 2010). Pembahasan mengenai endotel tidak bisa lepas dari pembahasan mengenai sistem sirkulasi. Telah dijelaskan pada subbab sebelumnya bahwa ginjal memiliki struktur sirkulasi yang unik secara anatomi maupun fungsional. Hal yang menarik pada sirkulasi ginjal antara lain adalah adanya anyaman kapiler double di glomerulus (sebagai lokasi filtrasi) dan di tubulus (sebagai tempat ekskresi, sekresi, reabsorpsi). Aliran darah yang menuju ginjal sekitar 22% dari curah jantung, atau sebanyak 1100 mL/menit sehingga ginjal merupakan salah satu organ dengan suplai darah terbesar karena ginjal hanya menggunakan 10% dari keseluruhan suplai oksigen yang

ditujukan ke ginjal. Mikrosirkulasi yang intak secara struktural maupun fungsional merupakan hal yang penting bagi setiap organ, termasuk ginjal, agar transport oksigen dan nutrisi serta pengeluaran toksin berlangsung dengan baik (Chade, 2013). Oleh karena itu, disfungsi endotel tidak hanya berkaitan dengan jantung atau terbatas pada penyakit yang berkaitan dengan aterosklerosis namun juga berkaitan dengan penyakit vaskuler di organ ginjal (Malyszko, 2010).

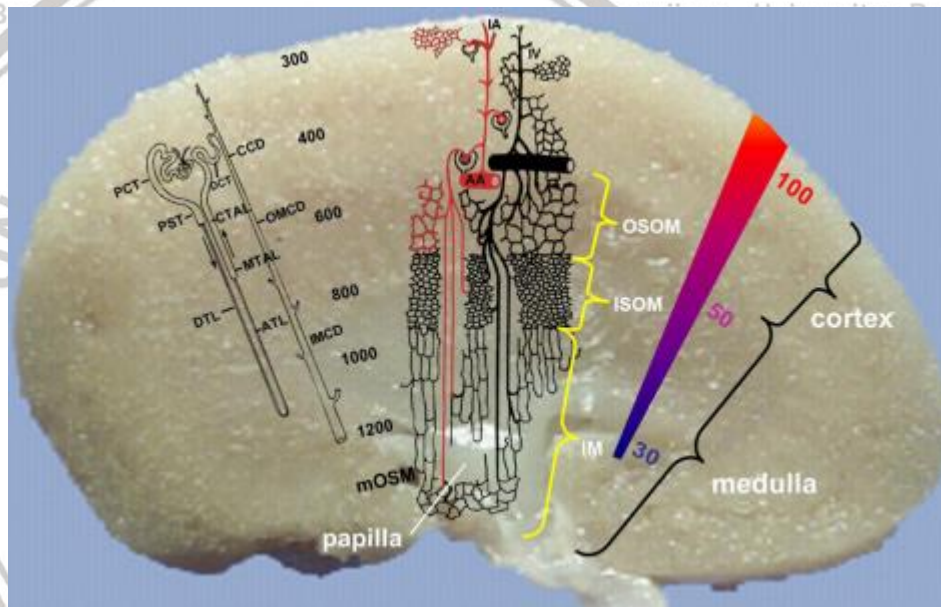
2.2.1 Patogenesis

Ginjal merupakan organ dengan populasi sel endotel terbanyak. Sel endotel ginjal memiliki kemampuan transport yang berbeda-beda tergantung pada segmen nefronnya. Sel endotel di ginjal harus tahan terhadap oksigenasi dan osmolalitas interstitial yang ekstrim (Gambar 2.11). Di korteks ginjal, sel endotel terpapar dengan osmolalitas dan kadar oksigen normal. Sedangkan sel endotel di bagian medula terpapar dengan osmolalitas yang lebih pekat, yaitu mencapai 1200 mOsm dan konsentrasi O_2 yang lebih rendah hingga 20 mmHg.

Walaupun aliran darah yang masuk ke ginjal secara keseluruhan adalah 4 mL/g jaringan/ menit, namun aliran darah yang diterima korteks adalah sebesar 5-6 mL/g/menit, sedangkan area yang lebih dalam dari korteks mendapat aliran darah yang semakin berkurang per satuan beratnya. Bagian medula ginjal mendapat aliran darah sekitar 1-0.5 mL/g/menit, sehingga 90% aliran darah dialirkan menuju ke korteks (Kumar dan Molitoris, 2016).

Ginjal dalam menjalankan fungsinya sangat dipengaruhi oleh integritas endotel vaskuler. Integritas endotel vaskuler berperan penting dalam pergerakan molekul di dalam darah dengan jaringan sekitarnya. Kerusakan atau jejas sel endotel selalu berkaitan dengan kondisi klinik seperti trombosis, hipertensi, gagal

ginjal, dan aterosklerosis. Pada penderita penyakit ginjal kronik, terjadi kerusakan endotel pada sistem kapiler ginjal yang dapat memicu fragmentasi struktur vaskuler (*vascular rarefaction*). Hal ini diduga sebagai proses utama yang menyebabkan kerusakan ginjal yang progresif. Disfungsi endotel juga bertanggung jawab terhadap progresifitas aterosklerosis pada pasien dengan gagal ginjal kronik (Malyszko, 2010). Aterosklerosis dan gangguan angiogenesis berperan penting pada munculnya risiko kardiovaskuler pada pasien tersebut (Choi *et al.*, 2004).



Gambar 2.11. Gambaran Skematik Perbedaan Mikrovaskuler di Ginjal. OSOM (*outer stripe of the outer medulla*; ISOM, *inner stripe of the outer medulla*; IM, *Inner medulla*; PCT, *proximal convoluted tube*; PST, *proximal straight tubule*; DLT, *descending thin limb*; DCT, *distal convoluted tubule*; CCD, *cortical collecting duct*; OMCD, *outer medullary collecting duct*; IMCD, *inner medullary collecting duct*; AA, *arcuate artery*; IA, *interlobular artery*) (Kumar dan Molitoris, 2016)

Berbicara tentang vaskuler dan endotel, maka tidak bisa lepas dari molekul penting yang mempengaruhi kondisinya, yaitu NO. Di ginjal, sintesis arginin sebagai bahan baku sintesis NO terutama terjadi di tubulus proksimal. Sedangkan eNOS sebagai katalisator sintesis NO dapat ditemukan di

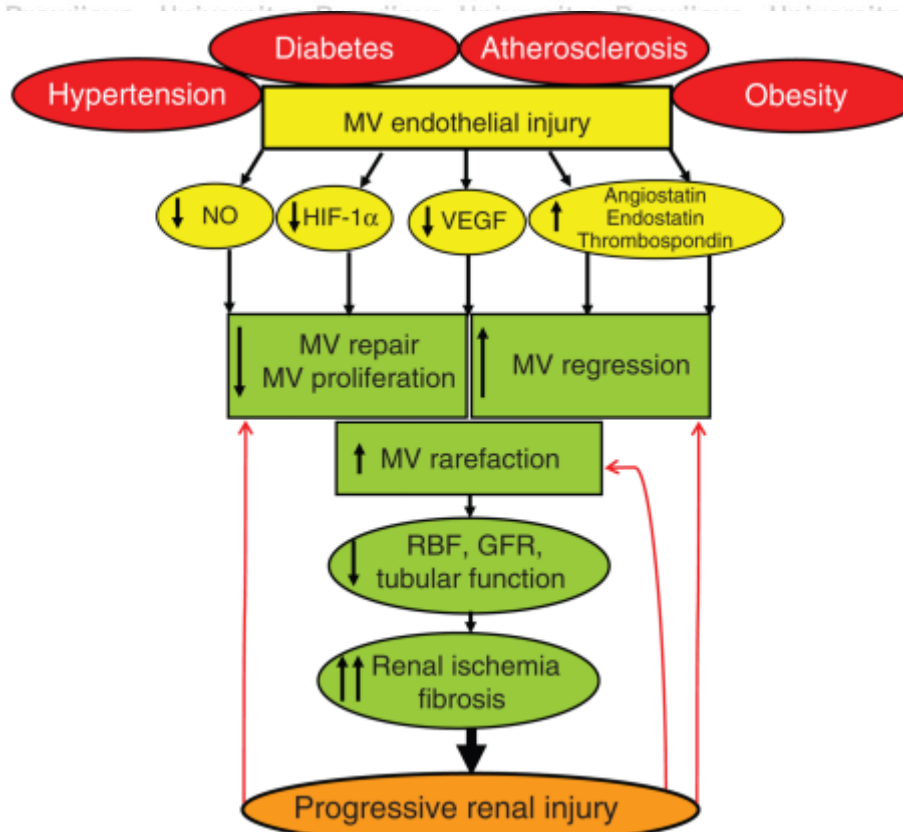
glomerulus, vaskuler, dan segmen tubulus termasuk makula densa dan duktus kolektivus. iNOS dapat ditemukan di sel otot polos pembuluh darah, arteriol aferen bagian distal dan *loop of Henle* bagian *ascending*. Sitokin yang merangsang iNOS terdapat di tubulus proksimal dan duktus kolektivus serta mesangium (Aldámiz-Echevarría and Andrade, 2012).

Aliran darah ginjal bervariasi sebagai responnya terhadap vasodilatasi yang dependen endotel dan NO (nitrogen monoksida) (Sasser, 2015). NO memiliki berbagai fungsi di ginjal. Pada tikus, hambatan NOS akibat pemberian L-NAME secara kronis dapat menyebabkan hipertensi dan kerusakan ginjal yang progresif. Kadar NO menurun pada pasien dengan penyakit ginjal kronik. Defisiensi NO berperan dalam progresifitas penyakit ginjal (Tsuchiya *et al.*, 2010). Kadar fisiologi NO sangat penting untuk memelihara fungsi dan homeostasis ginjal (Sasser, 2015). Inhibisi sintesis NO di ginjal pada disfungsi endotel dapat mengakibatkan terjadinya konsekuensi sebagai berikut:

- Peningkatan resistensi vaskuler dari arteriol aferen dan eferen sehingga menurunkan aliran darah glomerulus (Aldámiz-Echevarría and Andrade, 2012). Penurunan aliran darah menyebabkan terjadinya iskemia. Iskemia merupakan penyebab tersering terjadinya jejas seluler yang melatarbelakangi patogenesis berbagai penyakit. Abnormalitas utama yang terjadi pada kerusakan sel akibat iskemia adalah menurunnya produksi ATP. Penurunan ATP menyebabkan terjadinya kegagalan sistem seluler yang bergantung ATP, seperti (1) pompa ion (sehingga menyebabkan pembengkakan sel dan influks kalsium dengan berbagai efek negatifnya); (2) penurunan cadangan glikogen dan akumulasi asam laktat yang menurunkan pH intraseluler, dan (3) penurunan sintesis protein. Iskemia juga

menyebabkan terjadinya akumulasi radikal bebas dengan berbagai akibatnya. Jika iskemia menetap, akan terjadi kerusakan sel yang ireversibel dan nekrosis (Kumar *et al.*, 2013).

- Penurunan ultrafiltrasi, aliran darah ginjal, dan laju filtrasi glomerulus (GFR).
- Penurunan sekresi renin, sehingga berdampak pada menurunnya kemampuan ekskresi sodium pada kondisi normal dan terjadi peningkatan tekanan darah serta penurunan fungsi ginjal.
- Berkurangnya stimulasi terhadap transport Na^+ dan HCO_3^- di tubulus proksimal yang dimediasi oleh cGMP.
- Produksi senyawa oksigen reaktif, salah satunya adalah senyawa peroksida nitrat (Aldámiz-Echevarría and Andrade, 2012).
- Fragmentasi mikrovaskuler yang merupakan fenomena patologis penting pada penyakit ginjal. Arteriol kecil dan kapiler adalah pembuluh darah yang pertama kali diserang ketika mengalami jejas akut maupun kronik. Hilangnya struktur mikrovaskuler dapat mempengaruhi hemodinamik dan fungsi ginjal. Pada proses penuaan yang fisiologis, hilangnya mikrovaskuler berkontribusi terhadap penurunan aliran darah dan laju filtrasi ginjal. Mikrovaskuler merupakan pembuluh darah yang berdiameter kurang dari atau sama dengan 200 μm . Yang termasuk mikrovaskuler di ginjal antara lain, a. interlobar, a. arkuata, a. interlobular, serta arteriol, kapiler, dan venul (Chade, 2013). Delesi vaskuler dapat terjadi akibat stres oksidatif yang memicu apoptosis sel endotel (Kobayashi *et al.*, 2005). Fragmentasi vaskuler juga dapat disebabkan oleh inflamasi dan disfungsi endotel (Goligorsky, 2010; Mohammed *et al.*, 2015)



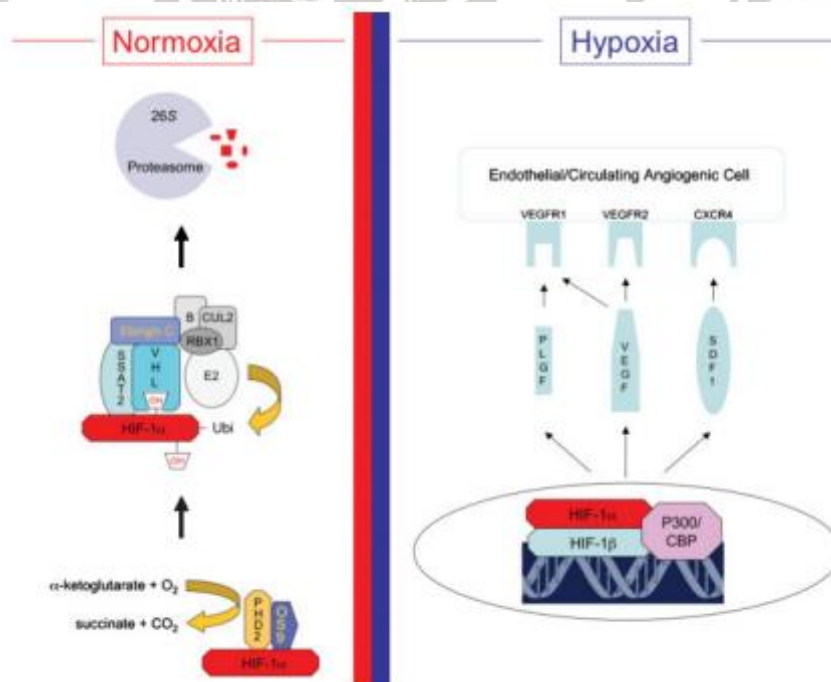
Gambar 2.12 Gambaran Skematik Mekanisme Hilangnya Mikrovasculer dan Efeknya terhadap Fungsi dan Struktur Ginjal. MV: mikrovasculer, RBF: *Renal Blood Flow*, GFR: *Glomerular Filtration Rate*, NO, nitrogen monoksida; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; HIF-1 α , *hypoxia-induced factor-1 α* (Goligorsky, 2015).

Pada Gambar 2.12 ditunjukkan bahwa kerusakan endotel mikrovasculer (apapun penyebabnya) dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan faktor yang terlibat dalam perbaikan, proliferasi, dan regresi mikrovasculer sehingga menyebabkan fragmentasi mikrovasculer secara progresif dan memperburuk hemodinamika, mengganggu fungsi, dan merusak jaringan ginjal. Kerusakan ginjal yang progresif dapat memicu rusaknya dan hilangnya mikrovasculer lebih lanjut sehingga terjadi lingkaran setan (Goligorsky, 2015). Densitas kapiler peritubuler ginjal berbanding terbalik dengan kondisi fibrosis interstitial dan proteinuria (Kang, *et al.*, 2001). Penelitian terhadap penderita penyakit ginjal kronik menunjukkan bahwa mereka yang memiliki densitas kapiler interstitial

ginjal paling sedikit akan mengalami kerusakan ginjal yang terparah (Eardly *et al.*, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa densitas kapiler interstitial ginjal sangat menentukan status kesehatan ginjal.

2.2.2 Neovaskularisasi Sebagai Respon terhadap Hipoksia Jaringan

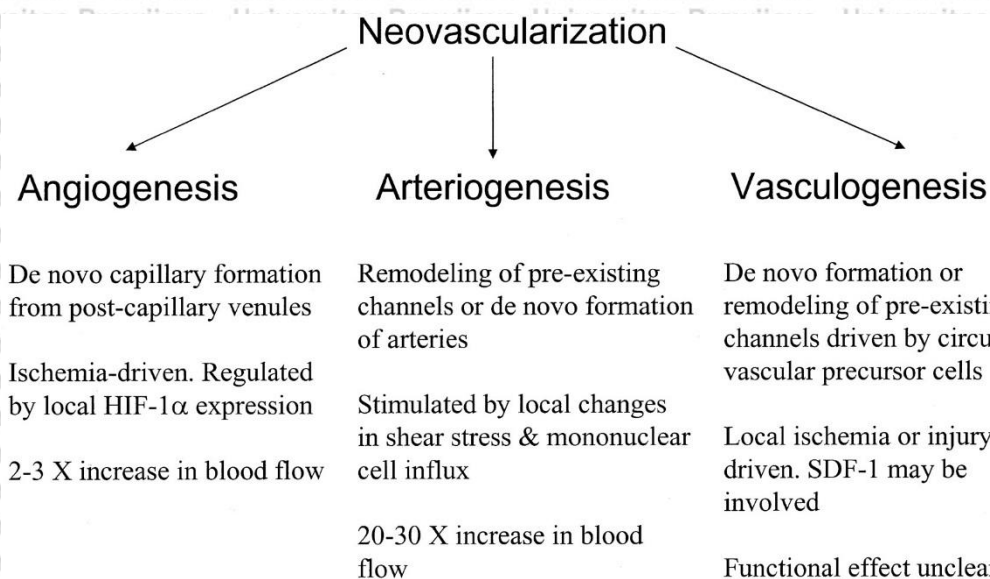
Hipoksia jaringan merupakan stimulus kuat terhadap terjadinya neovaskularisasi. Dalam hal ini, neovaskularisasi adalah respon fisiologis (Chade, 2011). Restorasi aliran darah ke jaringan yang iskemia merupakan respon fisiologis penting agar terjadi perbaikan perfusi pada jaringan tersebut. Pembentukan neovaskularisasi mencapai puncaknya pada hari ke 3-5 setelah terjadinya jejas dan perlahan jumlahnya akan menurun sekitar hari ke-7 (Kumar *et al.*, 2013).



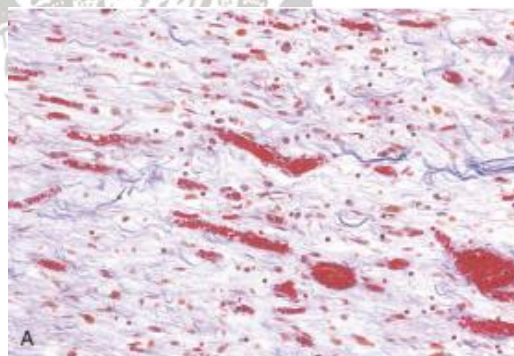
Gambar 2.13 Mekanisme molekuler homeostasis oksigenasi jaringan (Semenza, 2007)

Neovaskularisasi pada jaringan yang iskemik terutama diregulasi oleh suatu protein yang bernama HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 α*). Saat kadar oksigen normal (normoksia), HIF-1 α yang telah disintesis akan segera mengalami hidroksilasi pada residu prolin oleh kompleks enzim PHD2-OS9 dan hidroksilasi asparagin oleh FIH-1. HIF-1 α yang telah terhidroksilasi akan diikat oleh protein tumor supresor von Hippel-Lindau (VHL) yang bersama SSAT2 (*Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 2*) akan merekrut *Elongin C*. Kompleks tersebut selanjutnya akan merekrut kompleks ubiquitin ligase yang mengandung *Elongin B* (B), *ring box protein 1* (RBX1), *cullin 2* (CUL2), dan sebuah enzim yang mengkonjugasikannya dengan ubiquitin E2. HIF-1 α yang sudah berikatan dengan ubiquitin ini selanjutnya akan didegradasi oleh proteosom (Haase, 2013). Pada kondisi hipoksia, HIF-1 α terakumulasi dan mengalami dimerisasi dengan HIF-1 β . Kompleks tersebut akan merekrut koaktivator CBP/p300, dan mengaktifasi transkripsi gen yang mengkode sitokin pemicu angiogenesis, seperti (PLGF, VEGF, dan SDF-1). Sitokin tersebut selanjutnya akan berikatan dengan reseptornya yang terletak di membran plasma sel endotel dan sel angiogenik di sirkulasi (Gambar 2.13) (Haase, 2013).

Terdapat tiga macam mekanisme neovaskularisasi, yaitu vaskulogenesis, angiogenesis, dan arteriogenesis (Gambar 2.14). Pembentukan pembuluh darah ginjal terjadi melalui mekanisme angiogenesis dan vasculogenesis (Carlstrom *et al.*, 2015). Kerusakan jaringan akibat iskemia juga memicu angiogenesis maupun vaskulogenesis. Sedangkan arteriogenesis diinduksi oleh *shear stress* (Simons, 2005). Proses angiogenesis akan meningkat pada jaringan granulasi post inflamasi (Kumar *et al.*, 2013) (Gambar 2.15).



Gambar 2.14 Neovaskularisasi. 3 proses yang menyebabkan terbentuknya pembuluh darah baru di jaringan manusia dewasa. SDF-1. Serum-derived factor-1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α (Simons, 2005).



Gambar 2.15 Jaringan granulasi mengandung banyak pembuluh darah, matriks ekstraseluler yang longgar dan mengandung beberapa sel radang. Kolagen tercatat biru dengan pengecatan trikrom (Kumar *et al.*, 2013).

Anyaman mikrovaskuler memiliki kemampuan untuk beradaptasi terhadap kebutuhan metabolisme lingkungan sekitarnya dengan cara melakukan regulasi angiogenesis. Kemampuan ini dinamakan plastisitas mikrovaskuler dan dipengaruhi oleh VEGF (*vascular endothelial growth factor*). VEGF penting dalam memelihara mikrovaskuler, memicu pembelahan, migrasi sel endotel, termasuk

sel endotel ginjal. Pada kondisi hipoksia akut, VEGF meningkat secara signifikan, namun akan menurun ketika hipoksia berlangsung lebih lama. Hal ini menunjukkan regulasi bifasik dari VEGF dan menunjukkan bahwa sel yang mensekresikan VEGF juga mengalami jejas sehingga tidak mampu lagi mensekresikan sitokin ini (Chade, 2013; Kumar *et al.*, 2013). Penurunan VEGF juga dapat disebabkan oleh penurunan sitokin di jalur atasnya, seperti HIF-1 α dan NO, dan atau penurunan mediator di jalur bawahnya (seperti angiopoietin-1) (Chade, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Dulak *et al* (2000) menyebutkan bahwa NO dapat meningkatkan kadar VEGF secara *in vitro*. VEGF merupakan sitokin yang menentukan apakah sel endotel akan tetap dipertahankan hidup atau mengalami apoptosis. VEGF mencegah apoptosis pada sel endotel dengan menghambat jalur MAPK/ERK dan SAPK/JNK (Gupta *et al.*, 1999).

Angiogenesis juga merupakan proses perbaikan jaringan yang terjadi dalam inflamasi kronik. Keseimbangan NO dan radikal ROS berperan penting dalam respon ini. VEGF dapat mengaktifasi NADPH oksidase di endotel vaskuler, yang kemungkinan disebabkan oleh aktivasi dan translokasi GTPase Rac1 ke membran plasma. VEGF juga memicu aktivasi eNOS yang terdapat di kaveola melalui mekanisme dependen PI3K/Akt. NADPH oksidase yang dependen terhadap ROS dan sinyal transduksi yang dependen eNOS tampaknya mempengaruhi pembentukan berbagai komponen pembuluh darah baru, seperti destabilisasi sambungan endotel, aktivasi MMP, migrasi sel endotel, dan pembentukan tabung. Peran penting eNOS terhadap angiogenesis dibuktikan oleh penelitian bahwa ternyata sel endotel yang hanya mengandung kaveola sedikit tidak dapat mengalami migrasi (Granger dan Senchenkova, 2010).

Tahapan angiogenesis seperti yang terdapat pada Gambar 2.16 adalah sebagai berikut

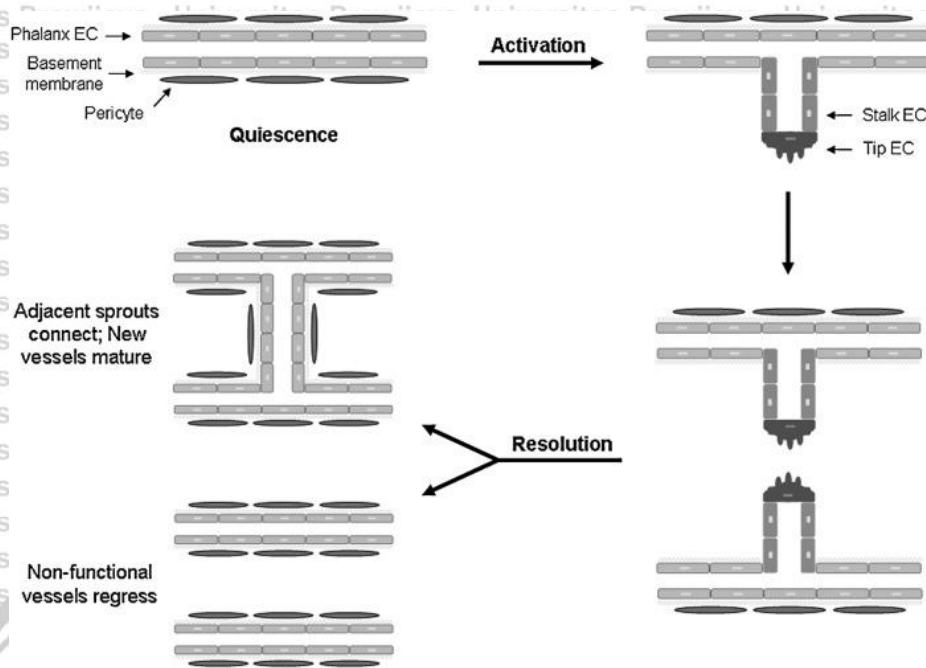
1. Fase tenang

Pada kondisi normal, pembuluh darah berada dalam fase ini. Ketika berada dalam fase tenang, bagian dalam dinding vaskuler dilapisi oleh sel endotel yang dinamakan sel *phalanx*. Vaskuler yang matur diliputi oleh membrana basalis yang tersusun atas kolagen IV dan laminin serta dilapisi perisit.

Perisit berfungsi memelihara survival dan stabilitas endotel (Carmeliet and Jain, 2011).

2. Fase aktivasi

Angiogenesis diregulasi oleh perubahan kadar molekul proangiogenik dan antiangiogenik. Aktivasi angiogenesis terjadi ketika terdapat pergeseran keseimbangan antara kedua molekul ini, dengan sinyal proangiogenik yang lebih dominan daripada sinyal antiangiogenik. Keadaan ini dinamakan *angiogenic switch* yang ditandai dengan aktivasi sel endotel serta longgarnya kontak antarsel. Perisit akan terlepas akibat degradasi enzimatik dari membrana basalis oleh matriks metaloproteinase. Kondisi ini membuka jalan bagi terbentuknya cabang pembuluh darah baru. Pertumbuhan pembuluh darah dituntun oleh sebuah sel endotel yang bernama *tip cell*. *Tip cell* mengarahkan pertumbuhan vaskuler menurut gradien sinyal dari mediator proangiogenik seperti VEGF. Sel-sel endotel yang berdekatan menjadi sel penyusun tangkai yang berproliferasi dan bermigrasi ke arah *tip cell* sehingga terjadi pemanjangan cabang pembuluh darah yang baru tersebut (Carmeliet and Jain, 2011; Kumar et al., 2013).



Gambar 2.16 Tahapan angiogenesis, fase tenang, fase aktivasi, fase resolusi (Carmeliet and Jain, 2011).

3. Resolusi

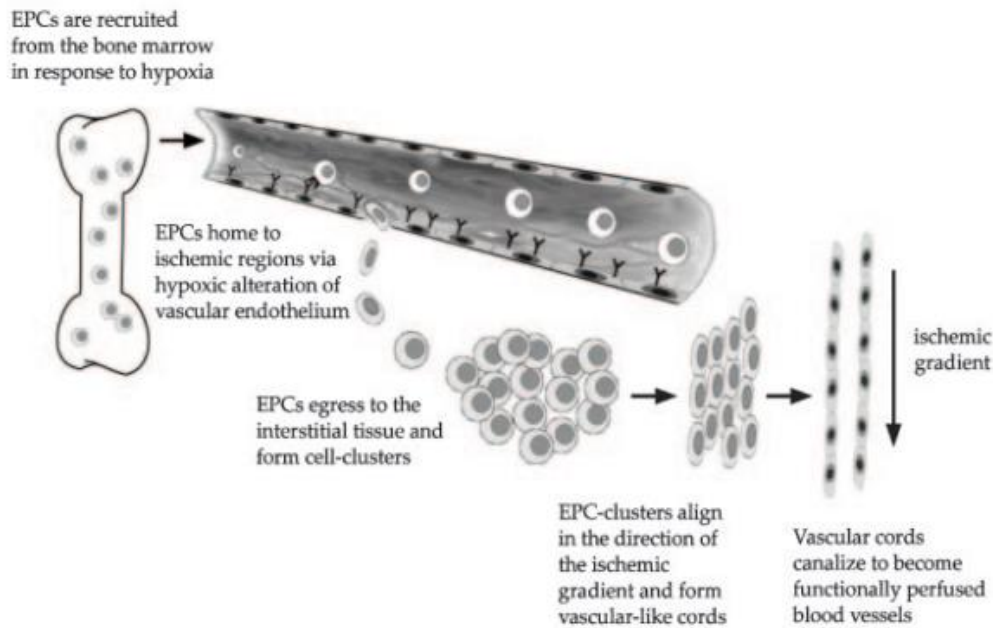
Selama fase resolusi, tunas pembuluh darah yang baru tersebut akan menyatu dengan tunas pembuluh darah lain di dekatnya agar terjadi aliran darah, sementara tunas yang tidak fungsional akan mengalami regresi.

Akhirnya pembuluh darah kembali berada dalam fase tenang, fenotip sel *phalanx* akan kembali, terbentuk membrana basalis yang baru, dan perisit akan kembali melapisi bagian luar pembuluh darah (Carmeliet and Jain, 2011).

Terdapat pengaruh langsung dari inflamasi dan hipoksia terhadap angiogenesis. Inflamasi meningkatkan produksi protein PR-39 yang dihasilkan makrofag. Protein ini menghambat degradasi HIF-1 α sehingga meningkatkan ekspresi VEGF dan reseptornya. PR-39 meningkatkan produksi *fibroblast growth factor* (FGF) yang bersifat angiogenik (Eibel *et al.*, 2011)

Pada vaskulogenesis (Gambar 2.17), vaskuler terbentuk secara *de novo* oleh penyatuan prekursor endotel yang bernama sel progenitor endotel (EPC) yang berasal dari *stem cells* di sumsum tulang dan dikeluarkan ke sirkulasi. Vaskuler yang baru terbentuk biasanya masih bocor karena sambungan interendotelnya masih belum sempurna dan VEGF meningkatkan permeabilitas vaskuler (Kumar *et al.*, 2013). Orang dewasa memiliki 2.6 ± 1.6 sel endotel di sirkulasi per mm darah. Regulator vaskulogenesis terutama adalah VEGF. Produksi VEGF dengan konsentrasi tinggi pada suatu lokasi tertentu di dalam tubuh dapat merekrut EPC yang sedang berada di sirkulasi dan memicunya untuk berdiferensiasi. GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) juga dapat meningkatkan populasi EPC di sirkulasi serta memicu diferensiasinya (Ribatti *et al.*, 2001). Pada penderita gagal ginjal kronik, terjadi disfungsi EPC di sirkulasi yang berperan terhadap munculnya komplikasi kardiovaskuler pada pasien tersebut (Choi *et al.*, 2004).

EPC berperan sebagai material penyusun pembuluh darah baru. Penelitian menyebutkan bahwa vaskulogenesis postnatal diinisiasi terutama sebagai respon terhadap iskemia jaringan. Iskemia melepaskan sitokin, seperti VEGF yang selanjutnya memobilisasi EPC dari sumsum tulang. Jaringan yang hipoksia menyebabkan sel endotelnya memerangkap EPC. EPC yang menempel selanjutnya akan ekstrasvasi ke jaringan. Beberapa hari kemudian, terjadi proliferasi EPC dan organisasi EPC membentuk pola tertentu. Setelah 14 hari, kumpulan EPC tersebut membentuk struktur vaskuler baru. Vaskuler tersebut selanjutnya akan mengalami kanalisasi (melalui mekanisme yang belum jelas) dan terhubung dengan vaskuler yang telah ada (Tepper *et al.*, 2005) (Gambar 2.17)



Gambar 2.17 Gambaran skematik mekanisme vaskulogenesis. EPC berkontribusi pada neovaskularisasi jaringan yang iskemik (Tepper *et al.*, 2005)

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan molekul yang tidak dapat berdiri sendiri karena memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbital atomnya. Keberadaan elektron yang tidak berpasangan tersebut menyebabkan molekul tersebut tidak stabil dan sangat reaktif dengan cara mendonorkan elektronnya maupun menarik elektron dari molekul lainnya. Oleh karena itu, radikal bebas dapat bertindak sebagai oksidan maupun reduktan yang dapat merusak makromolekul penting seperti lipid, asam nukleat, dan protein, sehingga menyebabkan kerusakan sel dan mengganggu homeostasis (Lobo *et al.*, 2010).

Radikal bebas meliputi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) ini merupakan produk dari reaksi redoks seluler (Tabel 2.1). Senyawa ini memiliki peran ganda, baik sebagai senyawa yang toksik

maupun sebagai senyawa yang bermanfaat. Keseimbangan antara kedua efek yang saling antagonis ini merupakan hal terpenting dalam homeostasis (Vaziri dan Iturbe, 2006).

Table 2.1 Berbagai Jenis Radikal Oksigen dan Radikal Nitrogen (Noor, 2012).

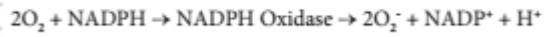
REACTIVE OXYGEN SPECIES
Superoxide anion $O_2^{\cdot-}$
Hydroxyl ion OH^{\cdot}
Singlet oxygen O^{\cdot}
Peroxyl ROO^{\cdot}
Alkoxy RO^{\cdot}
Hydrogen peroxide H_2O_2
Hypochlorite $HOCl$
REACTIVE NITROGEN SPECIES
Peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$
Nitrogen dioxide NO_2^{\cdot}
Nitrate/ nitrite NO_3^-/NO_2^-

Pada kondisi normal, metabolisme oksigen dalam sel selalu menghasilkan sejumlah kecil spesies oksigen seperti superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\cdot OH$) (Vaziri dan Iturbe, 2006).

Pembentukan ROS dan RNS dapat terjadi di dalam sel melalui dua mekanisme, yaitu: reaksi enzimatik dan non-enzimatik. Reaksi enzimatik menghasilkan radikal bebas seperti yang terjadi pada rantai respirasi, fagositosis, sintesis prostaglandin, dan sistem sitokrom P450 (Pacher *et al.*, 2007). Contoh:

- Anion superoksid ($O_2^{\cdot-}$) dihasilkan melalui beberapa sistem enzim oksidase seperti NADPH oksidase, xantin oksidase, peroksidase, lipoksigenase (LOX), siklo-oksigenase (COX), NO sintase (Valco *et al.*, 2004; Noor, 2012). NADPH oksidase merupakan enzim yang berperan dalam proses fagositosis guna menimbulkan *respiratory burst* yang terjadi saat superoksid yang terbentuk dilepaskan ke fagosom sehingga patogen mati. NADPH oksidase dihasilkan oleh monosit dan neutrofil. Sel-sel seperti endotel, fibroblas, mesangial, osteoklas, kondrosit, dan sel otot polos juga menghasilkan superoksida, yang

dinamakan *NADPH-like oxidase* yang diaktivasi oleh hormon dan sitokin.



- Begitu terbentuk superoksida, maka dia akan berperan untuk menginduksi munculnya berbagai radikal bebas lainnya seperti hydrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil ($OH\cdot$), peroksinitrit ($ONOO^-$), asam hipoklorat ($HOCl$) (Valco *et al.*, 2004).
- Rantai transport elektron di mitokondria dalam kondisi fisiologis menghasilkan ATP dan superoksida ($O_2\cdot^-$). Superoksida yang terbentuk akan diubah menjadi H_2O_2 oleh enzim dismutase seperti superoksida dismutase (SOD) (Noor, 2012). Hidrogen peroksida (H_2O_2) lebih stabil daripada superoksida ($O_2\cdot^-$) dan permeabel terhadap membran plasma.



- Asam hipoklorat ($HOCl$) dihasilkan oleh reaksi enzim yang berasal dari neutrophil, yaitu myeloperoksidase, yang mengoksidasi ion klorida dengan adanya H_2O_2 (Valco *et al.*, 2004). Hidrogen peroksida bereaksi dengan Cl^- , Br^- , I^- , dan diperantarai oleh enzim myeloperoksidase untuk membentuk asam hipo/hiperklorat yang lebih reaktif. Hal ini penting untuk agregasi protein dan fermentasi (Noor, 2012).

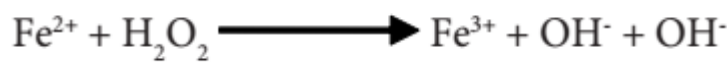


- Radikal nitrat oksida ($NO\cdot$) terbentuk di jaringan biologis dari L-arginin menjadi sitrulin oleh nitric oxide synthase (Valco *et al.*, 2004).

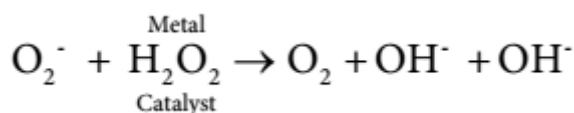


Selain yang disebutkan di atas, radikal bebas juga dapat terbentuk melalui reaksi non-enzimatik antara oksigen dengan senyawa organik yang diinduksi oleh radiasi ionisasi. Reaksi non-enzimatik juga dapat terjadi melalui fosforilasi oksidatif (respirasi aerobik) di mitokondria (Droge, 2002). Contoh reaksi non-enzimatik dalam pembentukan radikal bebas adalah reaksi Fenton dan reaksi Haber-Weiss (Noori, 2012).

Hidrogen peroksida dapat dinetralkan oleh katalase/GSH (glutasion peroksidase) dan dapat juga membentuk senyawa oksigen yang lebih reaktif, yaitu ion radikal hidroksil (OH^\cdot), dengan cara bereaksi dengan logam besi atau tembaga. Radikal hidroksil (OH^\cdot), yang merupakan radikal bebas paling reaktif secara *in vivo*, dihasilkan dari reaksi antara O_2^\cdot dengan H_2O_2 ketika terdapat Fe^{2+} atau Cu^+ sebagai katalis. Reaksi ini dinamakan reaksi Fenton (Valco *et al*, 2004):



Atau dapat juga melalui reaksi Haber-Weiss:

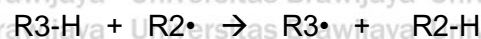


Pembentukan radikal bebas dapat dijabarkan menjadi 3 (tiga) tahap, yaitu:

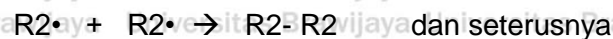
1. Tahap inisiasi



2. Tahap propagasi :



3. Tahap terminasi :



Berdasarkan sumbernya, radikal bebas dapat berasal dari sumber endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dihasilkan dari aktivasi sel-sel

imun, inflamasi, stress, latihan berlebihan, iskemia, infeksi, kanker, proses

penuaan. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari polusi udara dan air,

asap rokok, alcohol, logam berat (Cd, Hg, Pb, Fe, As), obat-obatan tertentu

(siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), pelarut industry, masakan

(daging asap, minyak yang telah digunakan, lemak), radiasi (Valko *et al.*, 2006).

Setelah zat-zat eksogen ini masuk ke dalam tubuh melalui jalur yang berbeda,

senyawa ini akan mengalami metabolisme atau dekomposisi menjadi radikal

bebas. Sumber utama radikal bebas di dinding vaskuler adalah NADPH oksidase

non-fagositik yang diregulasi oleh mediator vasoaktif (Ang II, ET-1, trombin,

serotonin), sitokin (IL-1, TNF α), *growth factor* (PDGF, IGF-1, EGF), dan faktor

mekanik (peregangan, gesekan aliran darah) (Touys, 2004).

Pada konsentrasi rendah atau sedang, radikal bebas dibutuhkan untuk

proses maturasi dari struktur seluler dan dapat berperan sebagai senjata bagi

sistem pertahanan tubuh. Fagosit (neutrophil, makrofag, monosit) membebaskan

radikal bebas untuk menghancurkan mikroba pathogen dan sel tumor (Droge,

2002). Peran penting radikal bebas pada sistem imun secara jelas dicontohkan

oleh pasien dengan penyakit granulomatous. Pada pasien ini terjadi defek pada

sistem oksidase NADPH yang terikat membrane sehingga tidak terjadi produksi

anion superoksida yang radikal ($O_2^{\bullet-}$) dan menyebabkan infeksi yang persisten dan multiple (Valko *et al.*, 2006).

Manfaat radikal bebas lainnya antara lain adalah peran fisiologisnya pada beberapa sistem signaling seluler (Young *et al.*, 2001). Radikal bebas yang dihasilkan oleh isoform NADPH oksidase pada sel nonfagositik seperti fibroblast, sel endotel, sel otot polos, myosit jantung, dan jaringan tiroid, berperan penting terhadap kaskade signaling di dalam sel tersebut. Sebagai contoh, nitrat oksida (NO) merupakan messenger intraseluler untuk memodulasi aliran darah, thrombosis, dan aktifitas neural (Pacher *et al.*, 2007). NO juga penting untuk pertahanan tubuh non-spesifik, yakni untuk membunuh pathogen intraseluler dan tumor. Manfaat lain dari radikal bebas adalah sebagai pemicu respon mitogenik (Genestra, 2007).

2.3.1 Stres Oksidatif

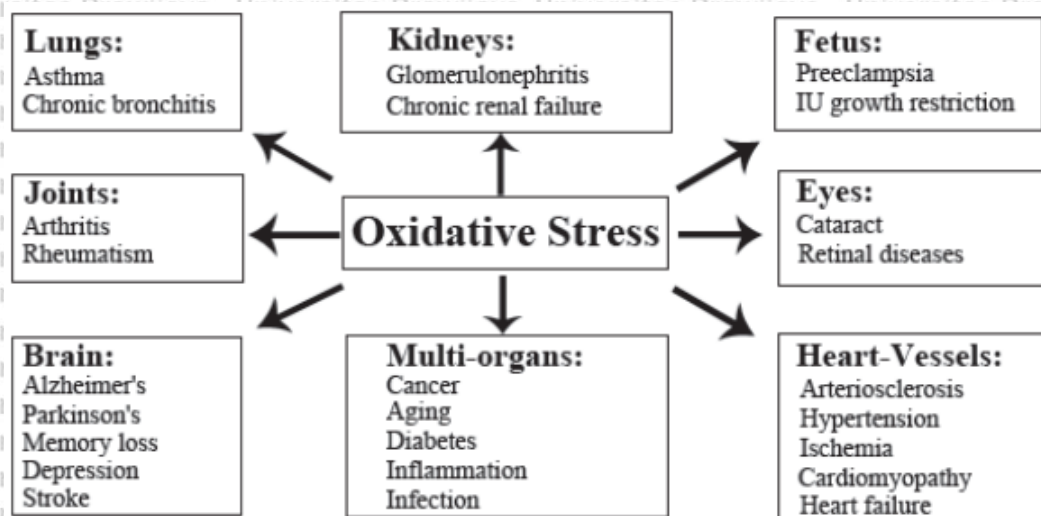
Istilah stres oksidatif pertama kali dikemukakan oleh Seis pada tahun 1985. Stres oksidatif merupakan kondisi kerusakan jaringan akibat ketidakseimbangan antara pembentukan senyawa oksidan yang berlebihan dan mekanisme pertahanan antioksidan yang tidak adekuat. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa senyawa oksidan secara fisiologis diperlukan tubuh sebagai mekanisme pertahanan melawan invasi mikroorganisme dan sel malignan. Namun aktivasi senyawa oksidan yang berlebihan dapat menimbulkan stres oksidatif (Kao *et al.*, 2010).

Stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi endotel (Cai dan Harrison, 2000), kerusakan vaskuler, dan memicu munculnya aterosklerosis (Kao *et al.*, 2010). Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan merusak membrane sel

dan struktur lain seperti protein, lipid, lipoprotein, dan DNA (deoxyribonucleic acid). Radikal hidroksil dan peroksinitrit yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan lipoprotein melalui proses yang dinamakan peroksidasi lipid. Reaksi ini menyebabkan terbentuknya malondialdehid (MDA), dan berkonjugasi dengan senyawa diene yang sitotoksik dan mutagenic (Chateerje *et al.*, 2007). Protein dapat dirusak oleh radikal bebas sehingga menyebabkan perubahan struktur dan hilangnya aktivitas enzim (Halliwell, 2007).

Kerusakan oksidatif terhadap DNA menyebabkan pembentukan lesi oksidatif DNA sehingga menimbulkan mutasi. Tubuh memiliki beberapa mekanisme untuk mengatasi hal ini adalah dengan menggunakan enzim DNA-repair dan / atau antioksidan (Genestra, 2007).

Stres oksidatif berperan penting dalam perkembangan penyakit kronik dan degeneratif seperti kanker, artritis, penuaan, autoimun, penyakit kardiovaskuler, dan penyakit neurodegeneratif (Pham-Huy *et al.*, 2008) (Gambar 2.18). Stres oksidatif berperan penting pada berbagai penyakit ginjal seperti glomerulonephritis dan nefritis tubulointerstitial, gagal ginjal kronik, proteinuria, dan uremia (Valko *et al.*, 2006). Pada pasien penyakit ginjal kronik (PGK), stres oksidatif meningkatkan insiden komplikasi penyakit kardiovaskuler. Inflamasi yang terdapat pada pasien PGK juga semakin meningkatkan produksi oksidan (Kao *et al.*, 2010). Nefrotoksisitas dari beberapa obat seperti siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin, vinblastine, adalah karena stres oksidatif yang mengakibatkan peroksidasi lipid. Pemicu stres oksidatif lainnya antara lain adalah logam berat (Cd, Hg, Pb, As) (Valko *et al.*, 2006).



Gambar 2.18. Penyakit-Penyakit yang Dipicu Oleh Stres Oksidatif

Evaluasi stres oksidatif pada kondisi klinik sulit dilakukan karena radikal bebas memiliki waktu paruh yang singkat (beberapa detik). Untuk itu, digunakan penanda lain yang lebih stabil dan mempunyai waktu paruh yang lebih lama (beberapa jam hingga beberapa minggu). Senyawa ini antara lain meliputi molekul hasil peroksidasi lipid, yang disebut malondialdehid. Senyawa lain yang biasa digunakan terdapat dalam Tabel 2.2 berikut:

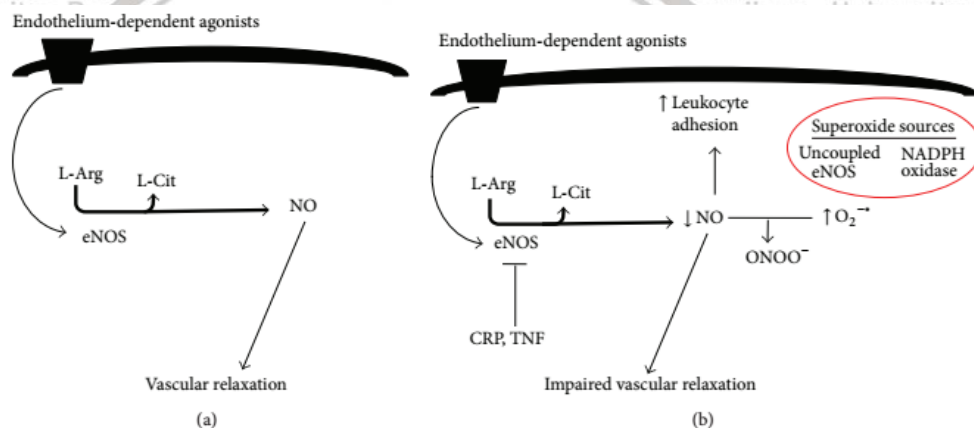
Table 2.2 Biomarker yang Umum Digunakan untuk Mengetahui Status Oksidan dan Antioksidan (Kao *et al.*, 2010)

<i>Biomarkers of oxidative stress</i>	<i>Biomarkers of antioxidant capacity</i>
Malonyldialdehyde*	SOD
F2-isoprostanes*	Catalase
GSH*	GSH
Oxidised LDL antibodies*	Glutathione
Advanced oxidation protein products (e.g., asymmetric)	Vitamin E
Dimethylarginine (ADMA)*	Vitamin C
4-Hydroxynonenal	Ferritin
Acrolein	Transferrin
Thiobarbituric acid-reactive substances	Albumin
Advanced glycosylation end-products	
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	

Abbreviations: GSH, glutathione peroxidase; LDL, low-density lipoprotein; SOD, superoxide dismutase.

*Particularly implicated in renal dysfunction patients.

Stres oksidatif memicu disfungsi endotel, inflamasi vaskuler, remodeling struktur vaskuler (Touyz dan Briones, 2011). Stres oksidatif menyebabkan terjadinya disfungsi endotel sebagaimana bukti yang menunjukkan bahwa terdapat perbaikan relaksasi pembuluh darah yang dependen endotel setelah pemberian antioksidan (Chen *et al.*, 2001). Stres oksidatif pada pasien hipertensi menyebabkan menurunnya kadar NO dan berkaitan dengan keparahan gangguan vasodilatasi yang bergantung endotel serta berkaitan dengan penyakit kardiovaskuler (Heitzer *et al.*, 2001) (Gambar 2.19).



Gambar 2.19. Stres Oksidatif dan Inflamasi Mempengaruhi Kemampuan Relaksasi Endotel. (a) Relaksasi endotel sehat dan (b) endotel yang terkena inflamasi dan stres oksidatif sehingga menyebabkan disfungsi endotel. Mediator inflamasi seperti CRP dan TNF mengganggu kestabilan mRNA eNOS. Meningkatnya superoksida (dari NADPH oksidase atau reaksi *uncoupled* eNOS) juga mengganggu bioavailabilitas NO sehingga mengganggu relaksasi vaskuler (Dinh *et al.*, 2014)

Pada pasien dengan gagal ginjal kronik, penanda stres oksidatif juga berkaitan dengan disfungsi endotel (Annuk *et al.*, 2001). Penelitian pada model hewan coba dengan gagal ginjal kronik menunjukkan bahwa peningkatan kadar spesies oksigen reaktif menyebabkan berkurangnya bioavailabilitas NO dan disfungsi endotel sehingga dapat diberi antioksidan sebagai terapi pendahuluan (Hazdan *et al.*, 2002, Vaziri *et al.*, 2002). Pada manusia dengan gagal ginjal kronik, pemberian vitamin C dapat memperbaiki disfungsi endotel dari artei

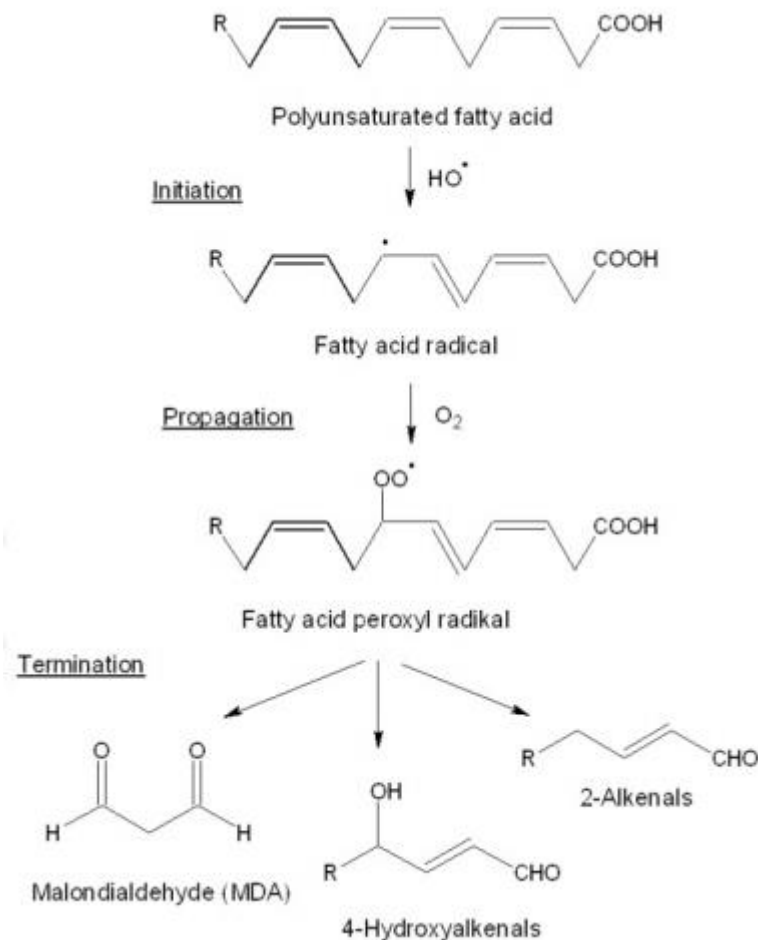
namun tidak pada arteri yang lebih besar (Cross *et al.*, 2003). Pada model hewan coba dengan diabetes, meningkatnya stres oksidatif juga menyebabkan disfungsi endotel (Kim *et al.*, 2002). Spesies oksigen reaktif juga terlibat dalam kerusakan endotel yang menyebabkan apoptosis dan anoikis (lepasnya sel endotel dari dinding pembuluh darah) (Taniyama dan Griendling, 2003). Anoikis dipicu oleh hilangnya interaksi matrik seluler namun mekanisme dan patofisiologi pastinya pada penyakit kardiovaskuler belum sepenuhnya dimengerti. Asam lemak tak jenuh, eicosapentaenoik, yang terdapat dalam minyak ikan dapat melindungi sel endotel dari anoikis (Suzuki *et al.*, 2003), yang dapat berkontribusi pada efek aterogenik dan kardioprotektif.

Peran stres oksidatif pada patofisiologi disfungsi endotel sudah sangat jelas. Spesies oksigen reaktif tersebut dapat berasal dari mitokondria, xantin oksidase, *uncouple* eNOS, dan NADPH oksidase. Senyawa oksidan menyebabkan disfungsi sel, nekrosis, atau apoptosis. Senyawa tersebut juga memicu modifikasi post-translasi yang mempengaruhi fungsi protein dan proses hantaran sinyal penting dalam sel. Peran penting stres oksidatif dalam patofisiologi penyakit kardiovaskuler menyebabkan munculnya ide untuk mengkuantifikasi senyawa oksigen reaktif sebagai biomarker penting yang menggambarkan proses perjalanan penyakit (Ho *et al.*, 2013).

2.3.2 Malondialdehid (MDA)

Radikal bebas pada organisme menyebabkan peroksidasi lipid. Lipid merupakan target yang rentan teroksidasi karena struktur molekulnya memiliki ikatan rangkap yang reaktif. Salah satu produk oksidasi asam lemak tak jenuh dari sel adalah malondialdehid (MDA). Peningkatan radikal bebas menyebabkan

produksi MDA berlebihan sehingga kadar MDA sering digunakan sebagai penanda stres oksidatif (Gawel *et al.*, 2004).



Gambar 2.20. Proses Peroksidasi Lipid dan Pembentukan MDA dari Asam Lemak Tidak Jenuh (Mimica-Dukic *et. al.*, 2012)

Sebagaimana yang terdapat pada Gambar 2.20, peroksidasi lipid terjadi dalam tiga tahap yaitu (Mimica-Dukic *et. al.*, 2012):

- 1) Inisiasi yaitu terbentuknya radikal hidoksil yang sangat reaktif pada reaksi fenton. Atom hidrogen PUFA akan ditarik oleh OH^\bullet yang merubah PUFA menjadi asam lemak radikal. Asam lemak radikal akan berubah menjadi radikal peroksil (LOO^\bullet) ketika bereaksi dengan oksigen.

2) Propagasi yaitu pemanjangan rantai radikal bebas dengan molekul lain.

Radikal peroksil yang telah terbentuk tadi akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh dan membentuk radikal peroksil dan lipid hidroperoksida.

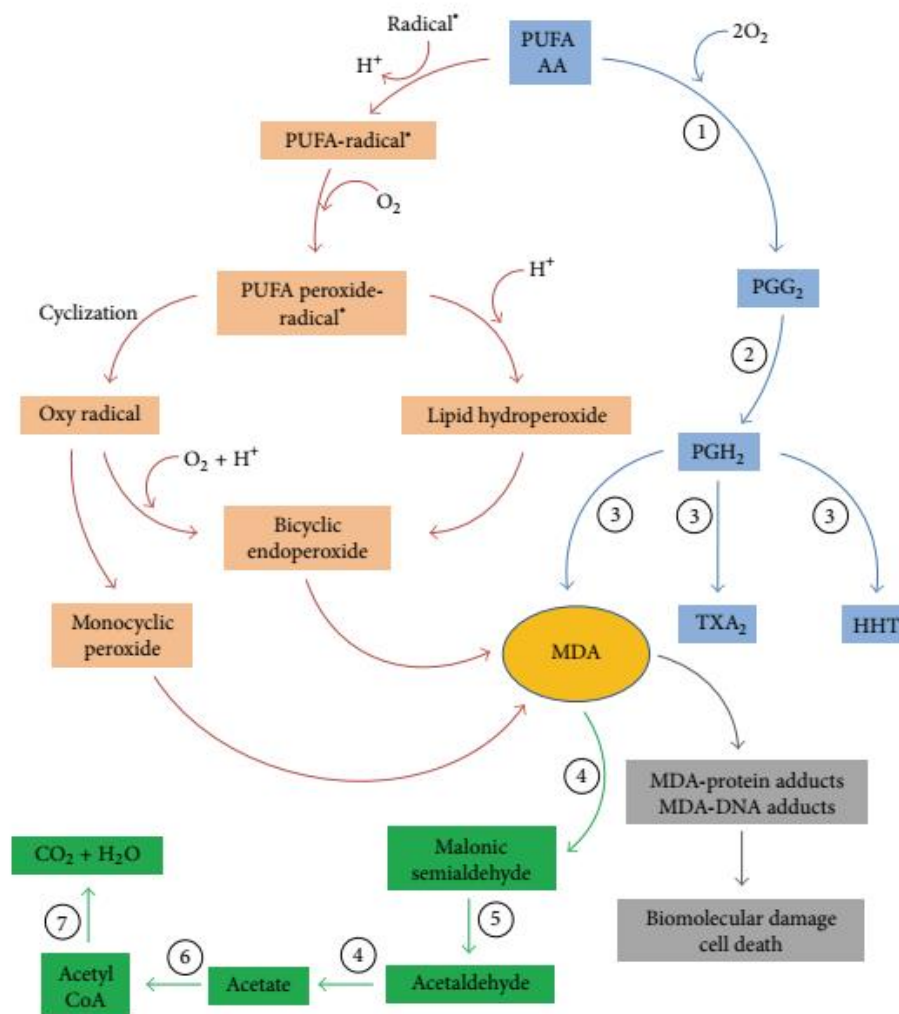
3) Terminasi yaitu reaksi radikal dengan radikal bebas lain. Antioksidan non enzimatis akan memutuskan rantai peroksidasi lipid. Sehingga reaksi ini akan menimbulkan radikal bebas tidak akan membentuk radikal bebas baru karena sifatnya yang stabil dan tidak reaktif

MDA dapat dihasilkan melalui proses enzimatik dan non-enzimatik. MDA merupakan hasil samping dari proses biosintesis tromboxanA2 secara enzimatik. TromboxanA2 merupakan metabolit aktif dari asam arakidonat yang dihasilkan dengan bantuan tromboxanA2 sintase pada prostaglandin endoperoksida atau prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ merupakan produk enzim siklooksigenase dari asam arakidonat (Ayala *et al.*, 2014).

Selama peroksidasi lipid terbentuk berbagai campuran lipid hidroperoksida. Radikal peroksil dari hidroperoksida dengan ikatan cis-ganda memudahkan adanya penyisipan senyawa radikal sehingga membentuk radikal yang baru. Senyawa radikal intermediet yang terbentuk setelah terjadi siklisasi dapat menyebabkan siklisasi lagi sehingga menyebabkan siklus berulang, dan mengalami pemecahan untuk membentuk MDA (Ayala *et al.*, 2014).

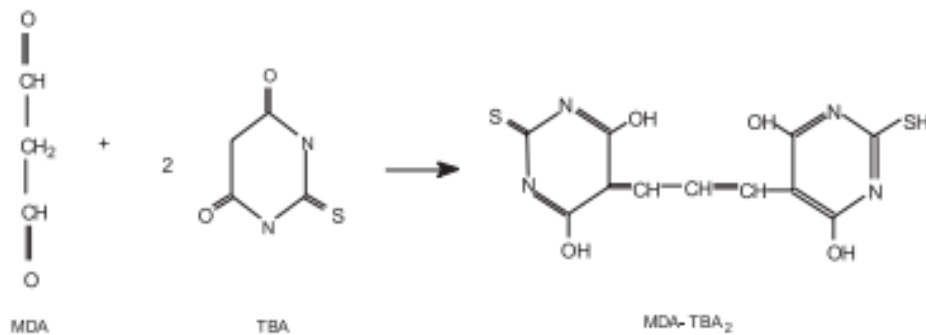
MDA dapat dimetabolisme secara enzimatik atau bereaksi dengan protein seluler dan jaringan atau bahkan DNA sehingga menyebabkan kerusakan biomolekuler. Metabolisme MDA melalui oksidasi oleh aldehyd dehidrogenase dari mitokondria yang diikuti dekarboksilasi sehingga menghasilkan asetaldehyd yang akan dioksidasi oleh aldehyd dehidrogenase menjadi asetat dan CO₂ serta H₂O (Gambar 2.21). Sementara itu, fosfogluco-isomerase akan memetabolisme

MDA sitoplasma menjadi methylglyoxal (MG) kemudian menjadi D-lactate dengan bantuan sistem enzim glioksalase dan GSH sebagai kofaktor. Sebagian MDA akan diekskresikan melalui urin dalam bentuk N-2-serin atau N-epsilon-lysine. MDA bersifat lebih stabil dan permeable dari pada spesies oksigen reaktif dan kurang toksik daripada metilglioksal (MG) (Ayala *et al.*, 2014).



Gambar 2.21. Pembentukan MDA dan metabolismenya. Secara *in vivo*, MDA merupakan hasil samping dari dekomposisi asam arakidonat (AA) dan PUFA secara enzimatik saat biosintesis tromboksanA2 (TXA2) dan 12-*I*-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT) (jalur warna biru). Pembentukan MDA secara nonenzimatis melalui endoperoksidase bisiklik yang dihasilkan selama peroksidasi lipid (jalur merah). MDA dapat dimetabolisme secara enzimatik (jalur hijau). Enzim yang berperan dalam pembentukan dan metabolisme MDA: siklooksigenase (1), prostaglandin hidropoxidase (2), tromboksan sintase (3), aldehid dehidrogenase (4), dekarboksilase(5), asetil-KoA sintase (6), dan *tricarboxylic acid cycle* (7) (Ayala *et al.*, 2014).

Pada umumnya MDA dihitung dari sampel plasma dengan metode kolorimetrik melalui reaksi MDA dengan asam tiobarbiturat (TBA) (Ho *et al.*, 2013). Pada tahun 1968, Yagi *et al.* mereaksikan TBA dengan MDA, kemudian menambahkan kromogen pada lipoperoksida. Reaksi ini dilakukan pada suhu 95°C, kondisi asam, sehingga suatu senyawa yang disebut sebagai “*thiobarbituric acid reactive substances*” (TBARS). Senyawa inilah yang dapat dideteksi dengan kolorimetri dengan panjang gelombang antara 532-535 nm atau fluorimetri (dengan eksitasi pada 532 nm dan emisi pada 553 nm). Pembentukan ikatan MDA-TBA terjadi secara nukleofilik yang melibatkan karbon ke-5 dari TBA dan karbon ke-1 dari MDA kemudian mengalami proses dehidrasi dan reaksi yang serupa pada molekul TBA yang lainnya (Gambar 2.22) sehingga menghasilkan pigmen berwarna merah. Intensitas warna merah muda yang terbentuk dari kondensasi MDA-TBA₂ mengindikasikan peroksidasi lipid (Grotto *et al.*, 2009).



Gambar 2.22. Reaksi antara MDA dan TBA membentuk molekul berpigmen MDA-TBA₂ (Grotto *et al.*, 2009).

Kecepatan reaksi tergantung pada temperature, pH, dan konsentrasi TBA. Intensitas maksimum dari pigmen yang terbentuk diperoleh jika dilakukan pemanasan selama 60 menit di dalam *water bath*. Suasana asam juga mempercepat reaksi, dan ketika konsentrasi larutan TBA ditingkatkan menjadi 20

hingga 80mM, kecepatan reaksinya meningkat dari 30 menit menjadi 5 menit (Grotto *et al.*, 2009).

Walaupun metode TBA ini relative murah dan mudah dikerjakan, namun metode ini kurang spesifik, karena TBA dapat bereaksi dengan aldehid lainnya (selain MDA) dan sama-sama menghasilkan senyawa yang menyerap cahaya dengan panjang gelombang yang sama dengan MDA. Tersedia ELISA kit untuk mendeteksi MDA. Pemeriksaan berbasis antibody ini selanjutnya divalidasi dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pemeriksaan MDA dengan HPLC ini menunjukkan spesifitas yang lebih baik dibandingkan spektrofotometri (Ho *et al.*, 2013).

2.3.3 Antioksidan

Tubuh kita memiliki beberapa mekanisme untuk mencegah terjadinya stres oksidatif dengan cara menghasilkan antioksidan, baik secara natural yang dihasilkan secara in situ (endogen), maupun yang diperoleh dari makanan (eksogen). Antioksidan merupakan senyawa kimia yang berinteraksi dan dapat menetralsir radikal bebas sehingga mencegah terjadinya kerusakan sel.

Antioksidan disebut juga sebagai *free radical scavenger* (Bouayed dan Bohn, 2010). Faktor-faktor yang mempengaruhi efisiensi antioksidan:

- Aktivasi energi antioksidan
- Oksidasi / potensial reduksi
- Kelarutan
- Stabilitas pH

Berikut adalah macam-macam antioksidan:

- Antioksidan berdasarkan fungsinya

Berdasarkan fungsinya antioksidan dibedakan menjadi antioksidan preventif yang mengurangi laju inisiasi reaksi berantai dan antioksidan pemutus rantai yang akan mengganggu proses propagasi (Murray *et al.*, 2009).

- Antioksidan berdasarkan asalnya

Berdasarkan asalnya antioksidan dibagi menjadi antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan alami berasal dari hasil ekstraksi bahan alami atau terbentuk dari reaksi kimia selama proses pengolahan. Sedangkan antioksidan sintetik didapatkan dari hasil sintesis reaksi kimia (Murray *et al.*, 2009). Senyawa aktif dari tanaman banyak mengandung antioksidan.

Senyawa fenol dan polifenol memiliki aktifitas antioksidan. Kedua senyawa ini banyak terdapat di anggur, beri, teh, herbal, dan lain sebagainya. Banyak tanaman yang mengandung fenol (Noor, 2012).

- Antioksidan berdasarkan Struktur Kimia

Berdasarkan struktur kimianya antioksidan dibagi menjadi antioksidan enzimatis dan nonenzimatis. Antioksidan enzimatis adalah antioksidan yang diproduksi didalam sel dan tidak bisa didapat dari suplemen diet. Contoh antioksidan enzimatis antara lain superoksid dismutase (SOD), catalase (CAT), glutasion peroksidase (GPx), dan glutasion reduktase (GRx). Sedangkan antioksidan non-enzimatis merupakan antioksidan yang berperan sebagai pemutus rantai (Winarsih, 2007). Antioksidan non-enzimatis dibagi menjadi antioksidan metabolic dan antioksidan nutrient.

Antioksidan metabolic merupakan antioksidan endogen yang dihasilkan dari metabolisme dalam tubuh, seperti asam lipoat, L-arginin, coenzyme Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, protein yang mengikat logam, dsb (Droge,

2002). Sedangkan antioksidan nutrient meliputi antioksidan eksogen yang diperoleh dari makanan, seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, elemen mikro (selenium, mangan, zinc), flavonoid, omega-3, dan omega-6 (Baharun *et al*, 2006).

Table 2.3 Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya (Noor, 2012)

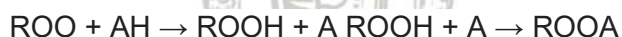
ROS Scavengers	ROS Protective Enzymes	Sequestration Of Transition Metal Ions
Glutathione	Superoxide dismutase	Transferrin
Uric acid	Catalase	Ferritin
Ascorbic acid	Glutathione peroxidase	Metallothionein
Albumin	Glutathione reductase	Ceruloplasmin

- Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya

Berdasarkan cara kerjanya, menurut Vertuani *et al.* (2004) menjelaskan bahwa antioksidan dapat berkerja dalam 2 tahap:

1. Antioksidan primer (memecah rantai)

Bekerja dengan cara merusak rantai sehingga radikal bebas yang dihasilkan kurang reaktif



2. Antioksidan sekunder (mencegahan)

Bereaksi dengan:

- Chelators / nonaktivasi logam
- Scavenge singlet oxygen (sangat toksik)
- Menghilangkan ROS

- Antioksidan berdasarkan kelarutannya

Berdasarkan kelarutannya, antioksidan dibagi secara luas menjadi dua.

- 1) Antioksidan hidrofilik

Antioksidan yang bereaksi dengan oksidan di sitoplasma sel dan plasma darah. Sebagai contoh: asam askorbat, glutathione dan asam urat.

2) Antioksidan hidrofobik

Antioksidan yang melindungi membran sel dari peroksidasi lipid.

Misalnya: Karoten, α -tocopherol dan Ubiquinol. Senyawa ini dapat disintesis dalam tubuh atau diperoleh dari makanan (Halliwell, 2000).

2.4 Inflamasi

2.4.1 Konsep Dasar Inflamasi

Inflamasi merupakan respon protektif terhadap infeksi dan kerusakan jaringan. Inflamasi adalah reaksi kompleks yang melibatkan sel-sel inflamasi untuk melokalisasi jaringan yang jejas, terjadi rekrutmen leukosit, eliminasi agen penyebab inflamasi, dan proses perbaikan jaringan yang mengalami jejas. Inflamasi melibatkan interaksi antar sel, matriks ekstraseluler, dan mediator proinflamasi (Dinh *et al.*, 2014). Inflamasi diawali oleh perubahan di dalam vaskuler sehingga meningkatkan rekrutmen leukosit dan perpindahan plasma serta protein plasma di dalam jaringan. Ini merupakan langkah awal untuk menghancurkan mikroorganisme, benda asing, serta membersihkan jaringan yang rusak (Kumar *et al.*, 2013). Inflamasi secara terus-menerus (kronis), atau terlalu hebat (jika infeksiya parah), atau yang kurang tepat sasaran (misal, ditujukan pada *self-antigen*) dapat menyebabkan kerusakan jaringan normal dan bertanggung jawab pada mekanisme beberapa penyakit (Abbas *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013).

Inflamasi dapat berupa inflamasi akut dan inflamasi kronis. Inflamasi akut terjadi dengan onset cepat dan durasi yang singkat (berakhir dalam beberapa

menit hingga beberapa hari) yang ditandai oleh eksudasi plasma dan protein plasma serta migrasi leukosit dengan dominasi neutrofil. Sedangkan inflamasi kronik berjalan lebih lambat dan dalam waktu yang lebih lama (hari hingga tahun). Inflamasi kronik didominasi oleh influks limfosit dan makrofag serta berkaitan dengan proliferasi vaskuler dan fibrosis. Kedua inflamasi ini dapat sama-sama terjadi dalam patogenesis suatu penyakit dan menimbulkan penampakan histologis yang bervariasi (Kumar *et al.*, 2013)

Secara umum, terdapat tiga proses penting yang terjadi dalam inflamasi akut yaitu :

- a) Peningkatan pasokan darah ke tempat mikroorganisme, benda asing, atau jaringan yang rusak. Penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan aliran darah sebesar sepuluh kali lipat pada jaringan akibat vasodilatasi yang dipicu inflamasi. Penyebab dilatasi vaskuler ini adalah mediator antara lain NO, histamin, prostaglandin (PGI₂), dan LTB₄.
- b) Peningkatan permeabilitas kapiler sehingga memungkinkan pergerakan molekul besar seperti leukosit, protein, dan antibodi.
- c) Leukosit dikerahkan dari sirkulasi menuju ke tempat jaringan yang rusak, benda asing, atau mikroorganisme. dikerahkan dari sirkulasi ke tempat benda asing, mikroorganisme atau jaringan yang rusak (Kumar *et al.*, 2013)

Ketiga proses di atas menimbulkan manifestasi respon inflamasi yang tampak dari luar berupa *cardinal sign* yaitu panas (*calor*), kemerahan (*rubor*), bengkak (*tumor*), nyeri (*dolor*), dan terganggunya fungsi (*functio laesa*) (Kumar *et al.*, 2013).

Peningkatan permeabilitas vaskuler lokal dipengaruhi oleh komplemen melalui jalur klasik (kompleks antigen-antibodi), jalur lectin (mannose binding

lectin) ataupun jalur alternatif. Peningkatan permeabilitas vaskuler lokal terjadi atas pengaruh anafilatoksin (C3a, C4a, C5a). Aktivasi komplemen C3 dan C5 menghasilkan fragmen kecil C3a dan C5a yang merupakan anafilatoksin yang dapat memacu degranulasi sel mast dan basofil untuk melepaskan histamin. Histamin yang dilepas sel mast atas pengaruh komplemen, meningkatkan permeabilitas vaskuler dan kontraksi otot polos, memberikan jalan untuk migrasi sel-sel leukosit serta keluarnya plasma yang mengandung banyak antibodi, opsonin dan komplemen ke jaringan perifer tempat terjadinya inflamasi (Abbas *et al.*, 2010). Sel-sel ini akan melapisi lumen pembuluh darah selanjutnya akan menyusup keluar pembuluh darah melalui sel-sel endotel (Ward, 1993).

Aktivasi komplemen C3a, C5a dan C5-6-7 dapat menarik dan mengerahkan selsel fagosit baik mononuklear dan polimorfonuklear. C5a merupakan kemoatraktan untuk neutrofil yang juga merupakan anafilatoksin. Makrofag yang diaktifkan melepaskan berbagai mediator yang ikut berperan dalam reaksi inflamasi. Beberapa jam setelah perubahan vaskuler, neutrofil menempel pada sel endotel dan bermigrasi keluar pembuluh darah ke rongga jaringan, memakan patogen dan melepaskan mediator yang berperan dalam respon inflamasi. Makrofag jaringan yang diaktifkan akan melepaskan sitokin diantaranya IL-1 (interleukin-1), IL-6 dan TNF- α (tumor necrosis factor- α) yang menginduksi perubahan lokal dan sistemik. Ketiga sitokin tersebut menginduksi koagulasi. IL-1 akan menginduksi ekspresi molekul adhesi pada sel endotel sedangkan TNF- α akan meningkatkan ekspresi selektin-E yang kemudian menginduksi peningkatan eksresi intracelluler adhesion molecule-1 (ICAM-1) dan vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Neutrofil, monosit, dan limfosit mengenali molekul adhesi tersebut dan bergerak ke dinding pembuluh darah

selanjutnya bergerak menuju ke jaringan. IL-1 dan TNF- α juga berperan dalam memacu makrofag dan sel endotel untuk memproduksi kemokin yang berperan pada influks neutrofil melalui peningkatan ekspresi molekul adhesi. IFN- γ (interferon- γ) dan TNF- α akan mengaktifkan makrofag dan neutrofil yang dapat meningkatkan fagositosis dan pelepasan enzim ke rongga jaringan (Abbas *et al.*, 2010).

Mediator-mediator inflamasi dalam keadaan normal akan didegradasi setelah dilepaskan dan diproduksi secara serempak jika ada pemicu. Selama proses inflamasi berlangsung, diproduksi sinyal untuk menghentikan reaksi inflamasi. Mekanisme ini meliputi perubahan produksi mediator proinflamasi menjadi mediator antiinflamasi antara lain antiinflamasi lipoxin, antiinflamasi sitokin, transforming growth factor- β (TGF- β) dan perubahan kolinergik yang menghambat produksi TNF pada makrofag.

Sistem tersebut dibutuhkan untuk mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan yang dapat memicu kerusakan jaringan. Hal yang sama juga dapat terjadi ketika infeksi jaringan yang terjadi terlalu besar dan respon inflamasi akut yang terjadi tidak mampu mengatasinya. Proses inflamasi tersebut akan tetap berlangsung terus-menerus dan dapat memicu terjadinya inflamasi kronis (Kumar *et al.*, 2013).

Inflamasi berkontribusi pada patofisiologi dari banyak penyakit kronis. Ketika proses inflamasi tersebut berlangsung secara terus menerus akan menyebabkan kerusakan jaringan setempat dan fungsi jaringan menjadi terganggu bahkan dapat meluas sehingga mengakibatkan kerusakan organ. Proses inilah yang kemudian akan mengakibatkan berbagai macam penyakit (Kumar *et al.*, 2013). Interaksi antara sel dengan sistem imun bawaan, sistem

imun adaptif, dan mediator-mediator inflamasi menginisiasi terjadinya inflamasi yang mendasari banyak penyakit pada organ (Libby, 2007). Peningkatan ekspresi gen proinflamasi dapat dipicu oleh adanya senyawa radikal dan faktor transkripsi.

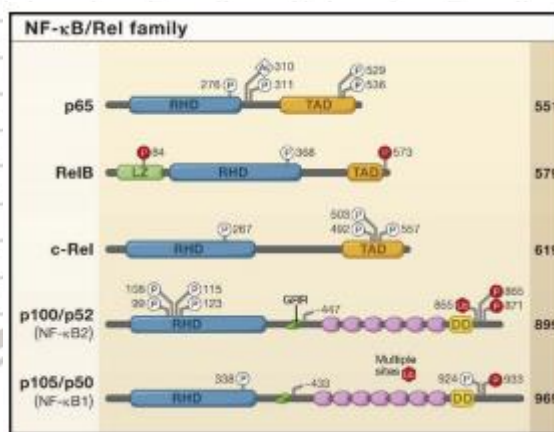
Faktor-faktor transkripsi seperti *redox-sensitive transcription factor*, nuclear factor-kappaB (NF- κ B), dan *forkhead box O* (FOXO) berperan penting dalam ekspresi mediator proinflamasi. Ekspresi mediator proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, lipooksigenase dan iNOS dipicu oleh aktivasi redox-sensitive transcription factor, NF- κ B. Ekspresi molekul adhesi (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, dan E-selectin) semuanya juga ditingkatkan oleh aktivasi NF- κ B dalam aorta selama proses tersebut (Chung *et al.*, 2011). Aktivasi NF- κ B juga dapat merangsang ekspresi COX-2, TNF- α , iNOS dan molekul adhesi pada aorta dan ginjal (Kim *et al.*, 2002) serta menginisiasi terjadinya inflamasi kronis (Rahman *et al.*, 2004; Yu & Chung, 2006). Penghambatan mediator-mediator proinflamasi dan faktor transkripsinya diperlukan dalam pengobatan penyakit yang terkait dengan inflamasi.

2.4.2 NF κ B

2.4.2.1 Struktur dan Fungsi NF κ B

NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) merupakan suatu kompleks protein yang berfungsi meregulasi transkripsi gen (Oeckinghaus and Ghosh 2009). Protein ini berperan dalam proses inflamasi, imunitas, proliferasi dan diferensiasi sel, dan apoptosis. NF κ B terdapat pada hampir seluruh sel eukariot (Perkins, 2007). NF κ B dapat meningkatkan transkripsi eNOS sebagai respon terhadap *shear stress* yang pada akhirnya akan

meningkatkan produksi NO. Peningkatan NO akan memberikan umpan balik negatif terhadap aktivasi NFkB (Grumbach *et al.*, 2005).



Gambar 2.23. Struktur Protein NFkB.

Jumlah asam amino pada masing-masing protein tertera di sebelah kanan. Modifikasi posttranslasi yang mempengaruhi aktivitas IKK atau aktivasi transkripsional ditunjukkan dengan huruf P untuk fosforilasi, U untuk ubiquitinasi, atau Ac untuk asetilasi. Tempat fosforilasi dan ubiquitinasi pada p100, p105, dan IκB yang memperantarai degradasi proteasom ditandai dengan Ps, Us. RHD, *Rel homology domain* memperantarai ikatan dengan DNA dan dimerisasi; TAD, *transactivation domain* untuk mengaktifasi transkripsi gen target; LZ, *leucine zipper domain*; GRR, *glycine-rich region*; HLH, *helix-loop-helix domain*; Z, *zinc finger domain*; CC1/2, *coiled-coil domain*; NBD, *NEMO-binding domain*; MOD/UBD, *minimal oligomerization domain dan ubiquitin-binding domain*; DD, *death domain* (Hayden and Ghosh, 2012).

NF-κB terdiri dari protein Rel dan non-Rel. Protein Rel memiliki domain homologi Rel (RHD) (Gambar 2.23) di bagian N-terminal yang berfungsi sebagai tempat berikatan dengan DNA, tempat untuk membentuk homo dan heterodimerisasi dengan protein Rel yang lain, serta mengandung *nuclear localization signal* (Hayden dan Ghosh, 2012; Sanz *et al.*, 2010). Sedangkan protein non-Rel berfungsi membentuk NFκB trimer. Yang termasuk protein penyusun NFκB (Sanz *et al.*, 2010), yaitu:

- 1) p50, disebut juga NF-κB1 dengan prekursornya adalah p105, dikode oleh gen NFκB1.
- 2) p52, disebut juga NF-κB2 dengan prekursornya adalah p100, dikode oleh gen NFκB2.

3) p65, disebut juga RelA, dikode oleh gen RELA.

4) c-Rel, dikode oleh gen REL.

5) RelB, dikode oleh gen RELB.

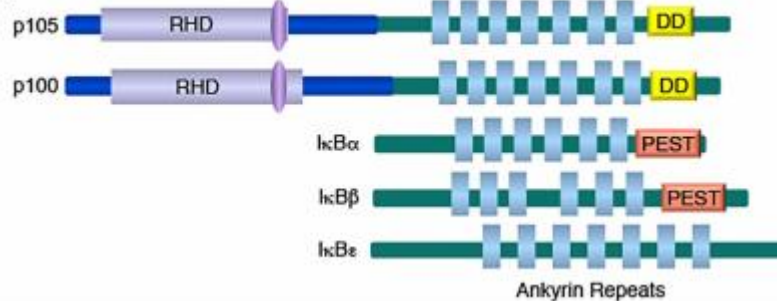
Domain aktivasi transkripsi hanya dimiliki oleh subunit RelA, c-Rel, dan RelB di bagian C-terminal. Subunit p50 dan p52 tidak memilikinya. Kedua subunit tersebut berfungsi memodulasi aktivitas pengikatan DNA oleh NF- κ B dengan membentuk heterodimer Rel/p50 dan Rel/p52 (Zhang dan Sun, 2015). Dimer Rel A/p50 merupakan dimer yang paling banyak ditemukan (Sanz *et al.*, 2010).

Homodimer p50 dan p52 berperan sebagai represor untuk mencegah gen target NF κ B tereksresi secara berlebihan (Zhang dan Sun, 2015).

Pemicu aktivasi NF κ B sangat beragam, antara lain radikal bebas, sitokin (misal, TNF α , IL-1 β), gaya mekanik yang bekerja pada dinding vaskuler, lipopolisakarida dari bakteri, antigen virus, isoproterenol, kokain, logam berat, dan radiasi terionisasi (Chandel *et al.*, 2000; Donato *et al.*, 2009). NF κ B di sel endotel diperkirakan memiliki andil pada munculnya penyakit kardiovaskuler melalui efek transkripsi gen proinflamasi, proadesi, dan prooksidan (Donato *et al.*, 2009).

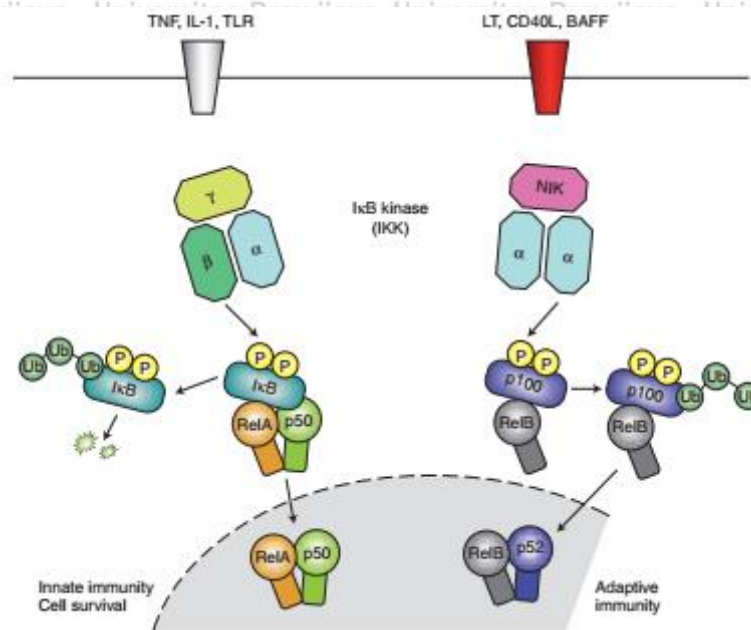
NF κ B yang berada dalam bentuk inaktif terdapat di sitoplasma dan terikat oleh protein inhibitor yang bernama I κ B (Gambar 2.24). Ciri khas I κ B adalah adanya domain gugus ankryn berulang yang berfungsi untuk berinteraksi dengan NF κ B sehingga mencegah translokasi ke nukleus. Terdapat beberapa macam I κ B, antara lain I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , termasuk juga p100 dan p105 yang merupakan protein prekursor NF κ B1 dan NF κ B2. Pembentukan NF κ B1 (p50) dan NF κ B2 (p52) yang matur melibatkan degradasi proteasom pada sekuens mirip I κ B (Zhang dan Sun, 2015).

IκB Family



Gambar 2.24. Enam macam IκB mamalia, termasuk protein p105 yang merupakan prekursor p50, protein p100 yang merupakan prekursor p52, IκBα, IκBβ, IκBε, dan beberapa anggota IκB atipik lain yang tidak ditunjukkan di gambar. Ciri khas IκB adalah adanya gugus ankyrin berulang yang berfungsi untuk menghambat NFκB. Death domain (DD) dari p105 dan p100 juga penting bagi fungsinya yang menyerupai IκB. PEST merupakan sekuens prolin, glutamin, serin, dan treonin dari IκBα dan IκBβ memediasi pergantian protein (Zhang dan Sun, 2015).

Terdapat dua macam jalur aktivasi NFκB, yaitu kanonikal dan non-kanonikal (Gambar 2.25). Jalur kanonikal bergantung pada *IκB kinase* (IKK), yang terdiri dari dua subunit katalitik, yaitu IKKα dan IKKβ, dan subunit regulator yang bernama NFκB esensial modulator (NEMO) atau IKKγ (Hayden and Ghosh, 2012). IKK dapat diaktivasi oleh berbagai hal seperti, komponen mikroba, sitokin, faktor pertumbuhan dan mitogen, serta agen yang menyebabkan stres. Saat terjadi aktivasi, IKK memfosforilasi IκB sehingga kompleks NFκB yang semula “terikat” IκB di sitoplasma menjadi aktif. Yang berperan utama dalam jalur aktivasi NFκB adalah IκBα. Ketika didegradasi oleh proteosom akibat fosforilasi IKK, IκBα disintesis ulang secara cepat melalui induksi NFκB sehingga terdapat mekanisme umpan balik untuk menghentikan respon NFκB berdasarkan waktu.



Gambar 2.25. Jalur Aktivasi NFκB: Jalur Kanonikal dan Jalur Alternatif (Non-Kanonikal). Jalur kanonikal dipicu oleh TLRs dan sitokin proinflamasi seperti TNFα dan IL-1 yang selanjutnya mengaktifasi RelA. RelA meregulasi ekspresi gen proinflamasi dan survival sel. Aktivasi NFκB melalui jalur alternatif diaktifasi oleh LT b, CD40L, BAFF, dan RANKL, sehingga mengaktifasi kompleks RelB/p52. Aktivasi jalur alternatif meregulasi gen yang dibutuhkan untuk organogenesis dan aktivasi sel B. Kedua jalur ini dicirikan oleh subunit IKK yang berbeda. IKKβ meregulasi aktivasi jalur kanonikal melalui fosforilasi IκB dan membutuhkan subunit IKKγ. Sementara itu, IKKα diperlukan untuk aktivasi jalur alternatif melalui fosforilasi dan pemrosesan p100 yang merupakan prekursor p52 (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Table 2.4 Perbandingan Jalur Aktivasi Kanonikal dan Nonkanonikal (Sanz *et al.*, 2010)

Table 1. Canonical and noncanonical NF-κB activation

Parameter	Canonical	Noncanonical
Activator	Many	LTB, BAFF, CD40 ligand, CD70, TWEAK, and RANKL
Activator in renal injury	Many	TWEAK
Key IKK	IKKβ	IKKα
Key IκB protein	IκBα	p100
Key NF-κB complex	RelA/p50, other	RelB/p52
Target genes	Many	Many and, specifically, CCL19, CCL21, CXCL12, and CXCL13
Functional studies have defined role in kidney inflammation	Yes	Not yet
Renal disease where role suggested	Many	Experimental AKI ¹⁵ and experimental DN ⁹

BAFF, B cell-activating factor; CCL19, EBI-1 ligand chemokine; CCL21, secondary lymphoid tissue chemokine; CXCL12, stromal cell-derived factor-1α; CXCL13, B lymphocyte chemoattractant; DN, diabetic nephropathy; LTB, lymphotoxin β; RANKL, receptor activator of NF-κB ligand.

Aktivasi IKK dan jalur kanonikal oleh rangsangan seluler membutuhkan *TGFβ-activated kinase 1* (TAK1), golongan MAP kinase kinase kinase (MAP3K) yang secara langsung memfosforilasi IKKβ. Karakteristik TAK1 dan aktivasi IKK adalah ubiquitinasi pada lisin 63 (K63) (Liu and Chen, 2011). Rangsangan seluler

memicu konjugasi rantai ubiquitin ke adaptor yang memfasilitasi rekrutmen TAK1 dan IKK. TAK1 dan IKK memiliki subunit yang berikatan dengan ubiquitin, TAB2 dan NEMO. Ikatannya dengan ubiquitin tidak hanya memfasilitasi penyusunan kompleks TAK1/IKK, namun juga berperan dalam aktivasi katalitik dari kinase ini. Penelitian menunjukkan bahwa TAK1 dan NEMO juga berkonjugasi dengan rantai ubiquitin, yang berperan dalam aktivasinya (Reiley *et al.*, 2007).

Selain rantai ubiquitin yang terikat dengan K63, terdapat rantai ubiquitin linear yang terikat M1 juga terlibat dalam aktivasi IKK oleh rangasangan tertentu (Elton *et al.*, 2015). Ranting ubiquitin M1 dikatalisis oleh kompleks perakitan ubiquitin LUBAC (*ubiquitin assembly complex*), yang terdiri dari *heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1* (HOIL-1 alias RBCK1), *HOIL-1-interacting protein* (HOIP alias RNF31), dan protein adaptor *SHANK-associated RH domain interacting protein* (SHARPIN). LUBAC mengikatkan rantai ubiquitin ke NEMO saat terjadi aktivasi melalui jalur TNF-receptor (TNFR). NEMO juga berikatan dengan rantai ubiquitin yang penting untuk aktivasi NFkB yang diinduksi TNF (Rahighi *et al.*, 2009). Faktor lain yang berikatan dengan ubiquitin pada jalur aktivasi melalui TNFR adalah RIP1 yang penting untuk aktivasi NFkB dan inhibisi kematian sel yang diinduksi TNF (Gerlach *et al.*, 2011).

Kontrol yang ketat terhadap ubiquitinasi merupakan hal yang penting untuk memelihara homeostasis NFkB. Jalur kanonikal NFkB diregulasi oleh protease khusus ubiquitin, atau deubiquitinase, seperti CYLD dan A20 (Sun, 2008). CYLD melepaskan konjugasi rantai ubiquitin dari berbagai molekul seperti NEMO, TAK1, RIP1, TRAF2, dan TRAF6 (Sun, 2010). Penelitian membuktikan bahwa CYLD berperan penting untuk mengontrol homeostasis aktivasi NFkB di limfosit. Hal ini penting untuk memelihara fungsi normal dari sel

B dan sel T untuk mencegah terjadinya autoimun dan inflamasi (Jin *et al.*, 2007).

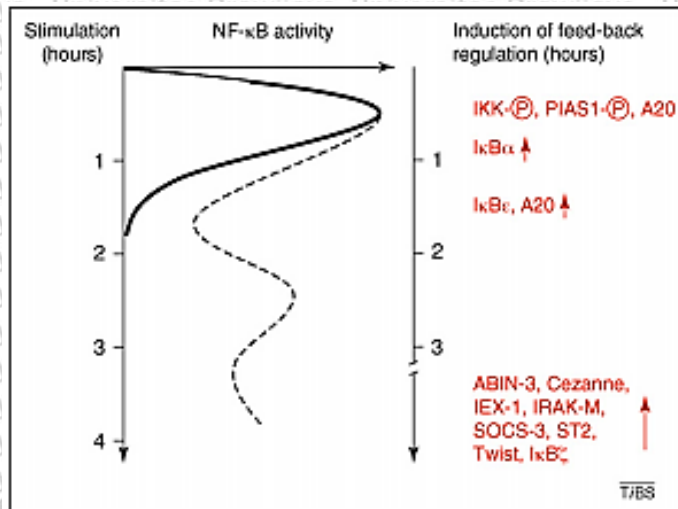
CYLD meregulasi ubiquitinasi non-degradatif dengan memotong ikatan pada K63 dan rantai ubiquitin linear. A20 berfungsi sebagai regulator umpan balik dari jalur kanonikal (Harhaj and Dixit, 2011). Saat teraktivasi, NF κ B akan memicu ekspresi A20, dan A20 yang terakumulasi akan menghambat aktivasi IKK dan NF κ B. A20 memiliki DUB yang spesifik terhadap K63 dan K48 dan berfungsi sebagai ligase E3. Hal ini menyebabkan A20 dapat mengedit ubiquitin dengan cara memutus rantai ubiquitin yang terikat pada K63 dan mengkonjugasikan rantai ubiquitin yang terikat K48 ke RIP1 dan Ubc13. Kedua hal ini akan menghambat proses penghantaran sinyal dan memicu degradasi oleh proteosom (Harhaj and Dixit, 2012). Namun demikian, penelitian menunjukkan bahwa mencit dengan mutan A20 dan DUB inaktif tetap mengalami aktivasi NF κ B yang tidak terganggu ketika diaktivasi oleh TNF atau LPS. Hal ini menunjukkan bahwa fungsi A20 tidak tergantung pada DUB (De *et al.*, 2014).

Jalur aktivasi nonkanonikal tidak membutuhkan kompleks trimerik IKK atau degradasi I κ B α , namun tergantung pada pemrosesan p100 (produk dari gen NF κ B2) (Sun, 2012). P100 merupakan protein prekursor dari p52 dengan C-terminal yang homolog dengan golongan I κ B (Gambar 2.25). Sebagaimana golongan I κ B, p100 berikatan dengan subunit NF κ B lainnya dan berfungsi sebagai inhibitor NF κ B (Sun *et al.*, 1994). Pemrosesan p100 melalui degradasi selektif terhadap C-terminal dari sekuens yang mirip I κ B sehingga memicu terjadinya translokasi kompleks NF κ B (terutama RelB) ke nukleus (Sun, 2012).

Komponen penting lain dari jalur aktivasi nonkanonikal adalah adanya NF κ B *inducing kinase* (NIK) yang bersama IKK α dapat memicu fosforilasi yang dependen terhadap pemrosesan p100 (Xiao *et al.*, 2001). Saat ini dikenal

berbagai reseptor yang dapat membangkitkan jalur NF κ B nonkanonikal, antara lain anggota superfamili TNFR, seperti lymphotoxin beta receptor (LT β R), B cell-activating factor (BAFF or BLys) yang termasuk golongan reseptor TNF (BAFFR), CD40, *receptor activator of NF κ B* (RANK), dan *tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis* (TWEAK). Berlawanan dengan jalur aktivasi NF κ B kanonikal yang cepat dan sementara, aktivasi melalui jalur nonkanonikal bersifat lambat dan persisten (Sun, 2012). Hal ini disebabkan oleh mekanisme yang mendasari aktivasi NIK. Kadar NIK yang stabil normalnya rendah karena didegradasi oleh mekanisme TRAF3-*dependet ubiquitination* yang konstan, dan induksi NF κ B nonkanonikal membutuhkan stabilisasi dan akumulasi NIK sebagai hasil dari degradasi TRAF3 (Liao *et al.*, 2004). Mekanisme regulasi NIK juga melibatkan TRAF2 dan ligase ubiquitin E3 c-IAP. Komponen berfungsi untuk membentuk kompleks E3, di mana TRAF3 berfungsi sebagai subunit yang mengikat substrat dan TRAF2 berfungsi sebagai adaptor yang merekrut c-IAP ke TRAF3 dan NIK (Sun, 2012).

Komplek TRAF3-TRAF2-cIAP mengontrol kadar NIK dan jalur nonkanonikal. Jalur nonkanonikal juga dipengaruhi oleh regulator negatif. Sebuah enzim deubiquitinase yang bernama Otud7b (atau Cezanne) dapat menghambat ubiquitinasi dan degradasi TRAF3. Hal ini menyebabkan hambatan pemrosesan p100 oleh TNFR di dalam sel B dan fibroblas (Hu *et al.*, 2013). Selain itu, NIK juga dihambat oleh dua kinase yang homolog, IKK α dan TBK1 (Razani *et al.*, 2010). Kinase ini memfosforilasi NIK dan memicu degradasi NIK (Zhang and Sun, 2015). Ekspresi NF κ B mengalami peningkatan saat terjadi inflamasi dan keganasan (Branca *et al.*, 2006; Fillerova *et al.*, 2014).



Gambar 2.26 Regulasi Aktivasi NFκB oleh Umpan Balik Negatif setelah Induksi TNF secara akut (garis tebal) dan persisten (garis putus-putus) (Renner dan Schmitz, 2009)

Table 2.5 Protein yang terlibat dalam umpan balik negatif NFκB (Renner dan Schmitz, 2009)

Protein	Function	Induction
A20	Deubiquitylation of signaling proteins	Transcription
A20	Ubiquitylation and degradation of RIP1	Transcription
ABIN-3	Inhibition downstream of TRAF6	Transcription
Cezanne	Deubiquitylation of signaling proteins	Transcription
COMMD1	Ubiquitylation and degradation of p65	Recruitment
Cyld	Deubiquitylation of signaling proteins	Recruitment
IEX-1	Inhibition of p65 transactivation	Transcription and recruitment
IRAK-1c	No phosphorylation by IRAK-4	Splicing
IRAK-M	Inhibition of dissociation of IRAK-1 and IRAK-4 from MyD88	Transcription
Itch	Regulation of A20 activity	Recruitment
IκB NS	Inhibition of NF-κB activity	Transcription
IκBα	Inhibition of NF-κB activity	Transcription
IκBβ	Inhibition of NF-κB activity	Transcription
IκBε	Inhibition of NF-κB activity	Transcription
IκBζ	Inhibition of NF-κB DNA binding	Transcription
Myd88s	No signal propagation from Myd88	Splicing
PIAS1	Inhibition of p65 transactivation	Phosphorylation
PP1	IKK dephosphorylation	Phosphorylation
RP105	Inhibition of LPS-TLR4 binding	Transcription
SIGIRR*	Sequestration of signaling proteins at the TIR domain of receptors	Recruitment
SINK ^b	No p65 phosphorylation	Transcription
SOCS-1	Degradation of Mal and p65	Transcription and recruitment
SOCS-3	Inhibition of TRAF6-TAK1 association	Transcription
ST2L	Sequestration of MyD88 and Mal	Transcription
TRIM30α	Degradation of TAB2 and TAB3	Transcription and recruitment
Twist	Inhibition of p65 transactivation	Transcription
β-TrCP	Lys48-linked Bcl10 ubiquitylation	Recruitment

*Single immunoglobulin IL-1-receptor-related molecule.
^bp65-interacting inhibitor of NF-κB.

Berbagai mekanisme umpan balik negatif terhadap aktivasi NFκB ditunjukkan berdasarkan waktu. Bermula dari inaktivasi IKK, lefek inhibisi A20, dan fosforilasi PIAS1. Kemudian dilanjutkan oleh sintesis IκB dan A20. Sedangkan peran protein lain seperti ABIN-3, Cezanne, IEX-1, IRAK-M, SOC-3,

ST2, Twist, dan I κ B masih perlu diteliti lebih lanjut (Renner dan Schmitz, 2008).

Stimulus akut akan menyebabkan aktivasi NF κ B yang diikuti deaktivasi NF κ B

secara total pada jam kedua setelah pemberian stimulus. Sedangkan stimulus

kronik akan menyebabkan terjadinya osilasi NF κ B. Aktivasi NF κ B yang terjadi

secara penuh pada awal stimulasi disebabkan oleh adanya kenyataan bahwa

regulator NF κ B, seperti protein A20 dan I κ B, juga merupakan produk aktivasi

NF κ B. A20 dan I κ B disintesis pada waktu yang berbeda. I κ B α merupakan protein

target transkripsi NF κ B yang disintesis paling awal. Sintesis I κ B α mencapai

puncak pada 1 jam pertama setelah stimulasi TNF. Protein ini kemudian

memasuki nukleus dan melepaskan NF κ B dari DNA. Mekanisme ini merupakan

tahap awal umpan balik negatif terhadap aktivasi NF κ B. I κ B ϵ dan A20 muncul

dalam waktu 90 menit setelah induksi NF κ B oleh TNF yang kemudian

memberikan efek umpan balik negatif tahap lanjut (Zhang dan Sun, 2015)

(Gambar 2.26).

2.4.2.2 NF κ B dan Ginjal

Jejas iskemia-reperfusi berkaitan dengan proses inflamasi dan respon

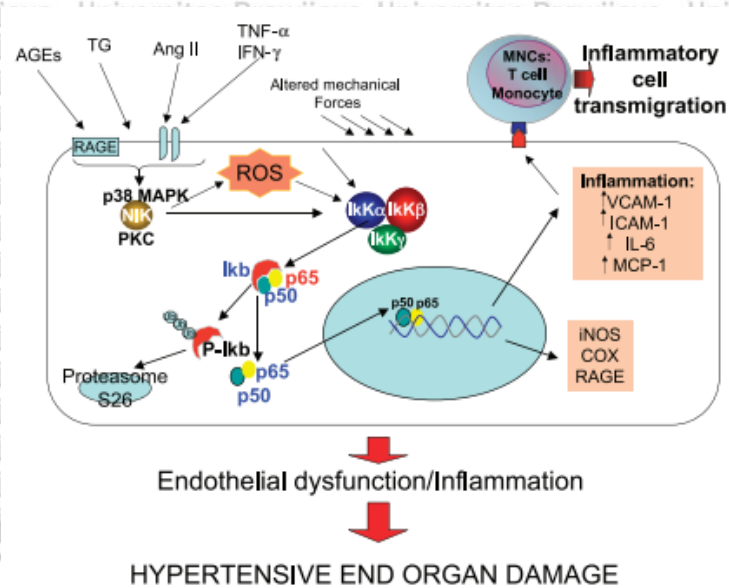
stres oksidatif terhadap hipoksia dan reperfusi yang mengganggu fungsi organ.

Pada ginjal iskemik dan kemudian mengalami reoksigenasi, munculnya *reactive*

oxygen species (ROS) pada fase reperfusi membangkitkan kaskade respon sel

yang berujung inflamasi, kematian sel, dan gagal ginjal akut (Malek dan

Nematbakhsh, 2015).



Gambar 2.27. Peran penting NFκB dalam regulasi inflamasi dan homeostasis sel endotel pada kondisi hipertensi. AGEs, *advanced Glycation End Product, post-pandrial triglyceride* (TG), sitokin dan angiotensin II (Ang II) berkerja pada sel endotel untuk mengaktivasi proses sinyal intraseluler tertentu. Proses ini diperkuat dengan *shear stress* yang terdapat pada hipertensi. Akibatnya terjadi peningkatan produksi radikal bebas intraseluler. Hal tersebut di atas menyebabkan aktivasi kompleks IKK yang memfosforilasi IκB sehingga lepas dari NFκB dan NFκB dapat bertranslokasi ke nukleus untuk mengaktivasi transkripsi gen proinflamasi. RAGE, AGE Receptor; COX, Cyclooxygenase; MNC: *mononuclear cells* (Guzik and Harrison, 2007).

Sitokin dan faktor-faktor patologis lain yang dihasilkan saat terjadi kerusakan ginjal akibat iskemia-reperfusion merupakan pemicu aktivasi NFκB (Ruiz-Ortega *et al.*, 2002). NFκB terlibat pada proses kerusakan vaskuler dan kerusakan organ akibat hipertensi (Henke *et al.*, 2007). Jejas iskemia-reperfusion memicu produksi TNF-α yang dependen terhadap NFκB. TNF-α selanjutnya akan berikatan dengan reseptornya untuk mengaktivasi NFκB. Hal ini akan menimbulkan mekanisme umpan balik positif terhadap NFκB. Selama terjadi kerusakan ginjal, akan dihasilkan Angiotensin II dalam kadar yang berlebihan. Angiotensin II akan mengaktivasi NFκB (Ruiz-Ortega *et al.*, 2002; Zhang and Sun, 2015) (Gambar 2.27). Angiotensin merupakan regulator vasokonstriksi dan tekanan darah; namun demikian, angiotensin yang mengalami deregulasi akan

memicu inflamasi dan terlibat dalam patogenesis hipertensi, aterosklerosis, kerusakan jantung dan ginjal. Aktivasi NFkB berperan penting terhadap ekspresi kemokin dan repon inflamasi yang dipicu oleh Angiotensin II (Esteban *et al.*, 2004; Zhang and Sun, 2015). NFkB dapat teraktivasi saat terjadi stres oksidatif (Birben *et al.*, 2012).

Pengaruh radikal bebas terhadap NF-kB dapat bersifat aktivasi maupun inhibisi (Morgan dan Liu, 2011). Radikal bebas dapat mempengaruhi suatu kaskade sinyal transduksi di banyak tempat, baik di *upstream* maupun *downstream*. Pengaruh radikal bebas dapat saling berlawanan, yaitu inhibisi maupun stimulasi (Morgan dan Liu, 2011).

ROS mempengaruhi kinerja NF-kB melalui reaksinya dengan sistein, terutama pada bagian katalitik, di mana sistein memiliki pKa yang rendah dan dalam bentuk tiolat. Oksidasi sistein menghasilkan asam sulfenik yang dapat direversibel oleh mekanisme antioksidan seluler, namun oksidasi lebih lanjut akan menghasilkan sulfinic dan asam sulfonat yang dapat menginaktivasi fosfatase secara irreversibel. *Sulfenic acid* bersifat tidak stabil dan dapat bereaksi dengan glutasion membentuk ikatan disulfida dan menghasilkan protein *S-glutathionated*. Enzim yang mengalami *S-glutathionated* biasanya inaktif dan dapat direduksi menjadi bentuk normalnya oleh glutaredoksin di sitoplasma. Jika gugus sistein dari glutasion memiliki kemiripan dengan sistein yang teroksidasi (berupa *sulfenic acid*), maka akan terbentuk ikatan intramolekuler yang menyebabkan perubahan konformasi protein dan dapat mempengaruhi (menghambat atau meningkatkan) aktivitas protein tersebut (Morgan dan Liu, 2011).

Penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa inhibitor NF- κ B dapat mengurangi reaksi inflamasi dan kerusakan ginjal (Zhang and Sun, 2015).

Penelitian juga menunjukkan bahwa NF- κ B berperan dalam regulasi kerusakan ginjal yang diinduksi oleh aldosteron/garam. Pada tikus model jejas ginjal, pemberian siRNA IKK β melalui injeksi arteri renalis mencegah ekspresi IKK β dan aktivasi NF- κ B, yang berkaitan dengan berkurangnya kerusakan dan inflamasi ginjal yang diinduksi oleh iskemia-reperfusi (Wan *et al.*, 2011). Inhibisi NF- κ B dengan *pyrrolidin dithio-carbamate ammonium* (PDTC) memperbaiki disfungsi ginjal. NF- κ B juga menyebabkan kerusakan ginjal yang disebabkan oleh hipertensi, kondisi medis kronis dengan peningkatan tekanan darah. Hambatan terhadap NF κ B tidak mempengaruhi hipertensi namun menghambat induksi sitokin proinflamasi dan molekul adesi yang dimediasi hipertensi dan terlibat dalam kerusakan ginjal. Penelitian dengan menggunakan tikus model hipertensi juga menunjukkan bahwa PDTC dapat menghambat kerusakan ginjal akibat reaksi inflamasi yang diinduksi oleh angiotensin II (Henke *et al.*, 2007).

Aktivasi NF κ B di sel ginjal memiliki regulator umpan balik negatif, salah satunya adalah nefrin. Nefrin merupakan anggota imunoglobulin yang terletak di lubang diafragma podosit glomerulus. Sesuai dengan letaknya, nefrin berfungsi sebagai regulator umpan balik negatif dari aktivasi NF κ B di sel podosit. Mekanisme nefrin dalam menghambat aktivasi NF κ B belum sepenuhnya dimengerti. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh inhibisi PKC. Aktivasi NF κ B yang tidak terkontrol pada podosit ginjal berkontribusi pada kerusakan ginjal (Hussain *et al.*, 2009). Regulator negatif lainnya adalah Cezanne (disebut juga Otud7b) yang mengontrol respon inflamasi di sel endotel glomerulus dengan cara mengontrol ubiquitinasi dan fungsi TRAF6 (Ie Luong *et al.*, 2013). Cezanne

merupakan DUB yang domain katalitiknya homolog dengan A20 (Panzer *et al.*, 2009). Cezanne memberikan umpan balik negatif pada aktivasi NFkB jalur kanonikal dan nonkanonikal, tergantung tipe selnya. Ekspresi cezanne di berbagai tipe sel ginjal nera dipicu oleh iskemia-reperfusion. Ablasi gen Cezanne pada mencit memicu inflamasi dan kerusakan ginjal yang diakibatkan oleh iskemia-reperfusion. Tidak adanya Cezanne akan meningkatkan VCAM-1 dan E-selectin serta fosforilasi RelA (le Luong *et al.*, 2013). Fungsi proinflamasi NFkB pada sel ginjal juga diregulasi oleh homodimer p50/p50, sebuah repressor yang spesifik terhadap kB yang dipicu selama terjadinya kerusakan ginjal dan berperan sebagai repressor inflamasi yang dimediasi NFkB (Panzer *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2010).

Beberapa inhibitor NFkB telah dikembangkan, antara lain pancypanadone, pyrrolidine dithiocarbamate (PDMC), dehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ), dan SP 100030. Obat-obatan ini belum digunakan untuk kepentingan klinis walaupun sudah digunakan pada hewan coba. BMS345541 (inhibitor IKK) dan kurkumin dapat menghambat Ikb dan p300. Obat-obatan ini digunakan untuk mencegah aktivasi NFkB dan mungkin bermanfaat untuk mencegah kerusakan ginjal akibat hipertensi. Statin dan insulin sensitizer seperti metformin juga memiliki efek inhibisi terhadap NFkB (Guzik and Harrison, 2007).

2.5 Ceplukan (*Physalis angulata* L.)

2.5.1 Klasifikasi dan Morfologi

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi : Spermatophyta -- tumbuhan berbiji

Divisi : Magnoliophyta – tumbuhan berbunga

Kelas : Magnoliopsida -- dikotiledonae

Subkelas : Asteridae

Ordo : Solanales

Famili : Solanaceae

Genus : *Physalis* L.

Spesies : *Physalis angulata* L. (USDA, 2016)

Sinonim : *Physalis minima* L., *Physalis capsicifolia* Dunal, *Physalis esquirolii* H. Lév. & Vaniot, *Boberella angulata* (L.) E.H.L. Krause, *Physalis angulata* fo. *ramosissima* (Mill.) Stehlé, *Physalis angulata* var. *capsicifolia* (Dunal) Griseb., *Physalis angulata* var. *ramosissima* (Mill.) O.E. Schulz, *Physalis ciliata* Sieb & Zucc., *Physalis lanceifolia* Nees, *Physalis linkiana* Nees, *Physalis ramosissima* Mill.

Nama Inggris : *Winter Cherry*, *Wild Tomato*, *Wild Physalis*, *Angular Winter Cherry*, *Annual Ground Cherry*, *Balloon Cherry*, *Bladder Cherry*, *Bladderberry*, *Bolsa Mulaca*, *Cow Pops*, *CherrylanceLeaf Ground Cherry*, *Cape Gooseberry*, *Fisalia*, *Tooth-Leaved Winter Cherry*, *Cut-Leaved Ground Cherry*, *Cutleaf Groundcherry*, *Fisalia Tooth-Leaved Bladder*, *Ground Cherry*, *Hog Weed*, *Husked Tomato*, *Mullaca*, *Dog tomato*, *Sunberry*, *Wild Cape Gooseberry*, *Wild Gooseberry* (Lim, 2013).

Nama umum : Ceplukan (Indonesia)

Nama daerah : *Ceplukan* (Jawa), *Cecenet* atau *cecendet* (bahasa Sunda), *nyurnyuran* (bahasa Madura), *kopok-kopokan* (bahasa Bali) (Latifah et al., 2014)



Gambar 2.28. *Physalis angulata*
(Xu et al., 2016)

Ceplukan merupakan tanaman herba tahunan (annual) yang termasuk ke dalam suku terung-terungan (*Solanaceae*). Tanaman ini biasanya berbuah dan berbunga pada bulan Maret-April dan berakhir pada bulan November (Compedium of Medicinal Plants used in Malaysia, 2002). Tumbuhan ini memiliki tinggi 0.5-1.5 m dengan morfologi sebagai berikut (Gambar 2.28):

Batang : Batang tegak atau sedikit rebah, berbulu.

Daun : Berbentuk jantung, berbulu, memiliki tulang daun menjari yang seperti anyaman dan tepi daun yang bergelombang. Permukaan belakang daun berwarna hijau tua, sedangkan permukaan ventralnya berwarna hijau muda

Bunga : Bunga bersifat hermafrodit, terletak di ketiak, dengan tangkai yang tegak, keunguan, dan dengan ujung yang menggantung. Kelopak berbagi lima, dengan taju yang bersudut tiga dan meruncing,

berwarna hijau dengan rusuk keunguan. Mahkota menyerupai lonceng, berlekuk lima dangkal, berwarna kuning muda dengan noda kuning tua dan kecoklatan di leher bagian dalam. Tangkai sari memiliki panjang 6-7 mm, berwarna kuning pucat dengan kepala sari berwarna kuning dan sedikit berwarna biru. Bunga ceplukan mekar saat musim kemarau.

Buah : Buah dibungkus kelopak yang menggelembung berbentuk telur berujung meruncing. Kelopak pembungkus buah memiliki anyaman pembuluh dan berwarna hijau muda kekuningan, dengan rusuk keunguan, 2–4 cm panjangnya. Buah buni di dalamnya berbentuk bulat memanjang, berukuran 1,5–2 cm, berwarna kekuningan jika masak dan terasa manis (Widiyastuti *dkk.*, 2008).

2.5.2 Habitat dan Sebaran

Ceplukan dapat hidup di daerah dengan ketinggian antara 0-1500 m di atas permukaan laut. Tanaman ini biasanya tumbuh liar di tepi jalan, di halaman rumah, dan di perkebunan. Tanah yang cocok untuk pertumbuhan tanaman ini adalah tanah jenis lempung berpasir yang berpengairan baik dan mengandung banyak bahan organik (subur) (Widiyastuti *et al.*, 2008). Tanaman ini dapat ditemukan di India, Baluchistan, Afganistan, Afrika Tropis, Singapura, Malaysia, dan Australia. Ceplukan dilaporkan sebagai tanaman obat herbal yang penting dalam *Indian Traditional System of Medicine* (Chothani and Vaghasiya, 2012).

2.5.3 Kandungan Kimia Ceplukan (*Physalis angulata* L.)

Buah ceplukan dapat dimakan dan banyak mengandung vitamin C (Lim, 2013). Analisis kualitatif pada kandungan ekstrak air dan ekstrak etanol daun

Physalis angulata menyebutkan adanya flavonoid, saponin, terpenoid, polifenol, tannin (Karpagasundari dan Kulothungan, 2014), alkaloid, dan steroid (Patel et al., 2011) (Tabel 2.6). Senyawa-senyawa ini sangat penting dalam pencegahan penyakit dan pemeliharaan kesehatan.

Table 2.6 Kandungan Fitokimia Daun dan Buah *Physalis minima* alias *Physalis angulata* dalam Berbagai Jenis Ekstrak (Angamuthu, 2014).

Phytochemicals	Extracts (<i>Physalis minima</i>)					
	Leaf			Fruit		
	Methanol	Ethyl Acetate	Diethyl ether	Methanol	Ethyl Acetate	Diethyl ether
Alkaloids						
Mayer's test	+	-	-	-	+	+
Wagner's test	+	-	-	-	-	-
Flavonoids						
Lead acetate test			+	+		
H ₂ SO ₄ test	+	-	+	+	-	-
	+	-	+		+	-
Steroids Liebermann-Burchard test	+	-	+	+	-	+
Terpenoids Salkowski test	+	-	-	-	-	+
Arthroquinone Borntrager's test	-	-	+	-	+	-
Phenols						
Ferric chloride test	+	+	-	-	-	+
Lead acetate test	+	-	-	-	-	-
Saponin	-	-	+	+	-	+
Tanin	+	+	-	+	-	-
Carbohydrates	+	-	-	-	-	-
Oils & Resins	-	+	+	+	+	+

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ekstrak daun *Physalis* memiliki aktivitas antioksidan DPPH (transfer hidrogen) dan FRAP (reduksi ion) secara *in vitro*, pengikat logam, dan reduktor logam. Ekstrak air dari daun *Physalis angulata* dilaporkan memiliki efek antioksidan yang kuat (Gupta et al., 2010). Hal tersebut memungkinkan manfaat ceplukan sebagai anti kanker, diabetes, penuaan, dan lain sebagainya (Karpagasundari dan Kulothungan, 2014). Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Kusumaningtyas et al. (2015) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun dan buah ceplukan mengandung komponen fenol

dan memiliki aktifitas antioksidan yang lebih tinggi dari pada ekstrak airnya.

Namun demikian, efek residu etanol dalam ekstrak tersebut perlu dianalisis lebih lanjut ketika ekstrak tersebut dikonsumsi. Tingginya kadar fenol berkaitan dengan kemampuan antioksidan karena gugus hidroksil fenol dapat menetralkan molekul radikal bebas (Tabel 2.7).

Table 2.7 Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Tanaman yang dinyatakan dengan BHA (Kusumaningtyas *et al.*, 2015)

	Antioxidant activity (mg · g ⁻¹ BHA)
Water extract of ciplukan fruit	1 575
Ethanollic extract of ciplukan fruit	2 258
Water extract of ciplukan leaves	2 875
Ethanollic extract of ciplukan leaves	4 311

Pelarut yang sering digunakan pada proses ekstraksi *Physalis angulata* adalah pelarut organik seperti metanol, etanol, dan heksan (Manggau *et al.*, 2010). Namun pelarut organik bersifat toksik, karsinogenik, dan berbahaya bagi lingkungan (Queenzland Government, 2014). Karena berbagai sebab, pelarut organik tidak dapat dihilangkan sepenuhnya dengan pengeringan maupun evaporasi. Maka dari itu, perusahaan farmasi bermaksud mengganti pelarut organik dengan pelarut yang lebih ramah lingkungan seperti air, CO₂ superkritikal, ion cair, dan lain sebagainya. Air pada suhu ruang bersifat sebagai pelarut polar, namun polaritasnya dapat disesuaikan menyerupai pelarut organik dengan cara mengatur suhu dan tekanan. Suatu keadaan di mana suhu air berada di atas titik didihnya dan di bawah suhu kritis pada tekanan tertentu untuk mempertahankan bentuk cairnya dinamakan air subkritis (Nakajima, 2013). Alasan penggunaan air subkritis sebagai pelarut adalah karena persediaan air sangat melimpah, tidak toksik, dan polaritasnya dapat disesuaikan (Susanti *et al.*, 2015). Dari Tabel 2.6 dan 2.7 diketahui bahwa daun *Physalis angulata* L. memiliki kandungan senyawa fitokimia lebih beragam jika dibandingkan bagian

batang dan buahnya. Dari berbagai senyawa fitokimia tersebut, prosentase terbesar adalah senyawa flavonoid, diikuti alkaloid dan saponin dengan prosentase yang sama (Tabel 2.8).

Table 2.8 Kandungan Senyawa Fitokimia di daun dan bagian kulit pohon *Physalis angulata* (Nnamani *et al.*, 2010)

Phytochemicals (%)	Plant Material	
	Leafy	Bark
Alkaloid	2.0	0.0
Cyanide	0.39	0.2
Flavonoid	15.5	13.2
Phytate	0.02	0.01
Saponin	2.0	1.0
Tannin	0.05	0.03

2.5.3.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar.

Flavonoid mempunyai sifat yang khas yaitu bau yang sangat tajam, sebagian besar berupa pigmen warna kuning, dapat larut dalam air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi (Melderer, 2002). Flavonoid merupakan senyawa bioaktif dengan kadar tertinggi yang terdapat pada daun *Physalis angulata* (Nnamani *et al.*, 2010). Berdasarkan cincin aromatik yang terhubung

dengan cincin heterosikliknya, flavonoid diklasifikasikan menjadi tiga kategori: flavonoid (2-fenilbenzopiren), isoflavonoid (3-fenilbenzopiren), dan neoflavonoid (4-fenilbenzopiren). Flavonoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, dan dengan dinding sel (Viskupicova *et al.*, 2008).

Flavonoid dari tanaman dapat dimurnikan dengan menggunakan ekstrak alkohol (Robinson, 1995). Flavonoid lebih mudah larut dalam pelarut

polar dari pada nonpolar (Banothu *et al.*, 2017). Flavonoid merupakan antioksidan larut air yang kuat dan merupakan pemangsa radikal bebas sehingga mencegah kerusakan sel. Flavonoid juga merupakan antikanker (Okwu dan Josaiyah, 2006). Dua macam flavonoid yang ditemukan dalam *Physalis angulata* antara lain 5-Methoxy-6,7-methylenedioxyflavone dan 5,6,7-trimethoxyflavone (Ser, 1988). Ekstrak etanol *P. angulata* dapat menurunkan kadar malondialdehyde (MDA) secara *in vitro* pada liver kambing (Dinakaran *et al.*, 2011).

Absorpsi dan bioavailabilitas flavonoid sangat bervariasi. Absorpsi flavonoid dipengaruhi oleh dosis, *vehicle of administration*, diet sebelumnya, jenis kelamin, faktor genetik individu, serta populasi mikroba kolon (Viskupicova *et al.*, 2008). Flavonoid yang berasal dari diet terutama berada dalam bentuk glikosida. Glikosida harus mengalami deglikosilasi (hidrolisis gugus sakarida) sebelum dapat diabsorpsi. Proses ini dilakukan dengan bantuan enzim β -glukosidase yang terdapat di sitoplasma. Setelah mengalami deglikosilasi, flavonoid aglikon mengalami difusi pasif melalui sel epitel yang didukung oleh peningkatan hidrofobisitasnya (Hollman, 2004). Flavonoid tertentu (quercetin-4'-glucoside) dapat mengalami transport aktif dalam bentuk terglukosilasi melalui transporter glukosa yang dependen sodium (SGLT1) pada sel epitel. Walaupun demikian, sebagian besar flavonoid akan dihidrolisis menjadi aglikon sebelum dapat diabsorpsi oleh usus halus (Viskupicova *et al.*, 2008).

Satu-satunya golongan flavonoid dalam diet yang tidak terglukosilasi adalah flavan-3-ols. Flavan-3-ols merupakan flavonoid terbanyak dalam diet.

Oligomer dan polimer flavonoid perlu diubah dahulu menjadi senyawa dengan

berat molekul yang lebih rendah, misal catechin, untuk dapat diabsorpsi.

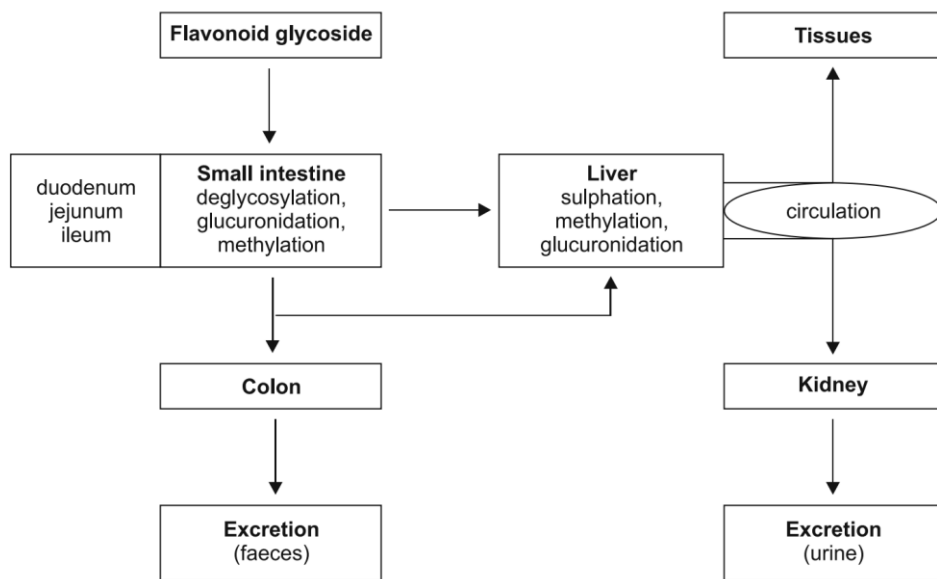
Depolimerisasi dapat terjadi di lambung dengan bantuan asam lambung.

Catechins dapat berdifusi secara pasif dan bergantung pada dosis (Viskupicova *et al.*, 2008).

Absorpsi flavonoid dibatasi oleh ekskresi zat tersebut di intestinal.

Absorpsi dan bioavailabilitas flavonoid dipengaruhi oleh transporter di membran sel. Beberapa transporter *ATP-binding cassette* (ABC), seperti *multidrug-resistance protein* (MRP), P-glikoprotein (P-gp) dan *breast cancer resistance protein* (BCRP) ikut terlibat dalam meregulasi efluks intestinal sehingga mempengaruhi jumlah flavonoid dalam sirkulasi sistemik.

Transporter ini berperan penting dalam farmakokinetik dan farmakodinamik flavonoid (Viskupicova *et al.*, 2008). Oleh karena transporter ABC ditemukan di membran semua sel organisme, maka interaksi antara flavonoid dengan transporter ABC tidak hanya mempengaruhi efluks dan bioavailabilitas flavonoid, namun juga distribusi dan eliminasi flavonoid (Hollman, 2004).



Gambar 2.29 Farmakokinetik Flavonoid (Viskupicova *et al.*, 2008)

Flavonoid yang telah diabsorpsi akan berikatan dengan albumin dan ditransport ke liver melalui vena porta. Sebelum memasuki sirkulasi sistemik, flavonoid mengalami metabolisme secara ekstensif. Liver merupakan organ yang paling bertanggung jawab terhadap biotransformasi flavonoid menjadi berbagai bentuk konjugatnya. Namun demikian, mukosa intestinal, ginjal, dan jaringan lain juga terlibat dalam metabolisme flavonoid (Gambar 2.29). Reaksi transformasi flavonoid tersering adalah oksidasi, reduksi, hidrolisis, dan konjugasi dengan sulfat, glukoronat, dan O-metilasi. Glukoronidasi flavonoid diperantarai oleh enzim uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs) (Hollman, 2004). Sementara itu, konjugasi dengan sulfat dan metilasi terjadi di sitosol dengan bantuan enzim sulfotransferase (SULTs) dan catechol-O-methyltransferase. Setelah mengalami absorpsi dan metabolisme di intestin, produk yang terbentuk terutama adalah glukoronida yang bersifat polar. Konjugat ini akan memasuki hepatosit dan dimetabolisme di hepatosit. Mekanisme *uptake* konjugat senyawa ini ke dalam hepatosit belum diketahui. Di liver, senyawa ini akan dimetabolisme lebih lanjut. Sementara itu, flavonoid yang tidak terabsorpsi akan didegradasi oleh mikroflora kolon dan diekskresikan bersama feses (Gambar 2.31). Ekskresi flavonoid juga dapat terjadi melalui empedu berupa metabolit yang terkonjugasi (Viskupicova *et al.*, 2008).

2.5.3.2 Saponin dan Terpenoid

Saponin merupakan metabolit sekunder tanaman berupa glikosida alami yang memiliki berbagai efek farmakologis, antara lain antiinflamasi, ekpektoran, vasoprotektif, hiperkolesterolemia, imunomodulator,

hipoglikemia, antifungi, antiparasit (Sparg *et al.* 2004; Sahu *et al.* 2008; Podolak *et al.* 2010). Saponin larut dalam air (Cowan, 1999). Banyak sekali penelitian yang menyebutkan tentang efek sitotoksik dari saponin (Podolak *et al.*, 2010).

2.5.3.3 Polifenol

Polifenol adalah asam fenolik dan flavonoid. Polifenol banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran serta biji-bijian. Rata-rata manusia bisa mengonsumsi polifenol dalam sehari-hari sampai 23 mg. Kandungan fenol pada ekstrak air daun ceplukan dinyatakan pada Tabel 2.9. Polifenol merupakan antioksidan jenis bioflavonoid yang 100 kali lebih efektif dari vitamin C dan 25 kali dari vitamin E. Manfaatnya:

- Menurunkan kadar kolesterol
- Menurunkan tekanan dan kadar gula darah
- Membantu kerja ginjal dan mencegah terjadinya batu empedu
- Memperlancar pencernaan
- Melarutkan lemak dan mencegah kolesterol jahat (Venturella, 2000).

Table 2.9 Kandungan Fenol Total pada Setiap Gram Ekstrak *Physalis angulata* setara dengan equivalen gallic acid (GA) dalam satuan miligram (mg GA/gram ekstrak) (Kusumaningtyas *et al.*, 2015)

	Total phenolic contents (mg of GA · g ⁻¹ of extract)
Water extract of ciplukan fruit	0.46
Ethanollic extract of ciplukan fruit	0.51
Water extract of ciplukan leaves	0.47
Ethanollic extract of ciplukan leaves	0.49

Polifenol memiliki sifat antioksidan lebih baik dibandingkan vitamin-vitamin dan menjadi obyek yang menarik perhatian para ahli nutrisi, epidemiologi, perusahaan agraria dan konsumen pada dekade terakhir.

Keuntungan utama polifenol adalah efek melindungi terhadap berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit kardiovaskular. Polifenol membantu melawan pembentukan radikal bebas dalam tubuh dan karenanya memperlambat penuaan sel. Polifenol ditemukan dalam kebanyakan produk konsumsi, utamanya dalam buah dan sayuran serta produk yang diproses seperti coklat, teh dan anggur (Venturella, 2000). Ekstraksi polifenol dapat dilakukan dengan pelarut seperti air, air panas, metanol, metanol/asa formiat, metanol/ air/ asam asetat dan asam formiat (Escribano-Bail, Buelga, 2003).

Diantara berbagai pelarut tersebut, fenol lebih mudah larut dalam pelarut non-polar daripada pelarut polar (Banothu *et al.*, 2017).

Salah satu contoh polifenol adalah tannin. Tannin memiliki berat molekul mulai dari 500 Da hingga lebih dari 3000 Da, dan dapat ditemukan di bagian daun, kulit, buah, kayu, dan akar. Tanin dapat membentuk kompleks dengan polisakarida, asam nukleat, steroid, alkaloid, dan saponin. Tanin merupakan polifenol yang larut air dan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan protein serta membentuk kompleks protein-tannin yang solubel maupun insolubel (Hassanpour, 2001). Tanin merupakan antiseptik alami, bersifat astringent, dan dapat mempercepat penyembuhan luka. Tanin dapat digunakan untuk melawan parasit (Tiger, 1980).

2.5.3.4 Alkaloid

Alkaloid merupakan sekelompok senyawa yang terdiri dari struktur cincin dan atom nitrogen. Alkaloid memiliki aktivitas biologi seperti meredakan efek efedrin pada asma, memiliki efek analgesik, dan antikanker (Lu *et al.*, 2012). Alkaloid lebih larut dengan pelarut etanol dibandingkan air

(Cowan, 1999). Daun ceplukan (*Physalis angulata*) mengandung alkaloid yang sama dengan standar Belladonna, antara lain alkaloid skopolamin dan atropine, di samping mengandung alkaloid yang lain (Efendi, 1998). Kandungan alkaloid *Physalis angulata* L. dilaporkan dapat menghambat sintesis DNA pada sel tumor mencit s-180 dan sel sumsum tulang mencit. Oleh karena itu, kandungan alkaloid *Physalis angulata* juga berpotensi sebagai agen kemoterapi leukemia (Kallianpur *et al.*, 2016). Phygrine merupakan jenis alkaloid yang terdapat di bagian batang *Physalis alkekengi* dan terdapat juga pada *P. angulata* (Rengivo-salgado and Vargas-arana, 2013).

2.5.3.5 Steroid

Beberapa senyawa steroid yang diisolasi dari daun *Physalis angulata* antara lain physalin B, physalin D, physalin E, physalin G, physalin F, 5 β ,6 β -Epoxyphysalin B yang merupakan 16 α ,24-cyclo-13,14-seco-steroid, withaphysalin A dan B, physangulidin A-C, yang kesemuanya termasuk ke dalam kelompok withanolide. Withaphysalin A memiliki 18,20-lakton, sedangkan withaphysalin B memiliki cincin 18,20-laktol. Efek antiinflamasi dan imunomodulator dari physalin B, D, E, F, G telah diteliti (Soares *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005; Jacobo-Herrera *et al.*, 2006; Magalhaes *et al.*, 2006; Damu *et al.*, 2007; Guimaraes *et al.*, 2009). Selain memiliki efek antiinflamasi, physalin B, D, F juga memiliki efek sitotoksik (Damu *et al.*, 2007), sedangkan physalin E tidak memilikinya (Magalhaes *et al.*, 2006).

Secara kimia, *withanolides* merupakan sekelompok ergostane tipe steroid yang teroksidasi secara alami, mempunyai *Lactone* pada tepi rantai

(*side chain*) dan *2-en-1-one system* pada cincin A. *Withanolide* terdapat pada semua bagian tanaman golongan *Solanaceae*, namun persentasinya terbesar terdapat pada bagian daun. *Physalin B*, berdasarkan hasil evaluasi biologi terhadap sel kanker manusia dan *murine cancer cell*, menunjukkan adanya aktifitas sitotoksik yang luas (Fang *et al.*, 2003). *Physalin B* juga memiliki efek antiinflamasi, antimikobakterial, antimikroba, antimalaria, antileishmania, antinociceptif, dan antikanker. *Physalin B* menawarkan alternatif terapi baru untuk pengobatan penyakit inflamasi melalui aktivasi reseptor glukokortikoid (Azlan dan Marziah, 2015). *Physalin B* (200 µg/ml) memiliki efek antimikroba terhadap *S. aureus* (Silva *et al.*, 2005). Penelitian oleh Pinto *et al.*, (2010) membuktikan bahwa *physalin E* pada *Physalis angulata* memiliki efek antiinflamasi topikal yang poten terhadap dermatitis. Sementara itu, golongan withanolide lain, yaitu withangulatin A, yang diisolasi dari *Physalis angulata*, dapat menekan proliferasi limfosit T pada tikus yang distimulasi dengan LPS. Pemberian withangulatin A dapat menghambat sitokin proinflamasi (IL-2, IFN-gamma, dan IL-6) secara signifikan. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa withangulatin A dapat memodulasi fungsi limfosit T mencit melalui hambatan terhadap ekspresi COX-2 melalui jalur MAPKs dan NFκB (Sun *et al.*, 2010). Sen dan Pathak (1995) telah membuktikan bentuk 13,14 seco 16, 24 *cyclosteroid* baru dari *Physalis angulata*, yaitu *physalin L*, di mana strukturnya adalah 6 β-ethoxy-5α, 13, 20,22 tetrahydroxy-1, 15-dioxo-16, 24-cyclo-13, 14-seco-ergost-2-ene 18, 24-dioic acid, 18-20, 27-22 dilactone. Formula molekuler dari *physalin L* adalah C₃₀H₃₆O₁₁ (Mr 572) dan bukan merupakan jenis *withaphysalin*. Pada penelitian yang dilakukan He *et al.*

(2014), physalin A yang dari *Physalis alkekengi* var. *franchetii* dapat menginduksi ekspresi inducible nitric oxide (iNOS) pada sel melanoma.

Nitrogen monoksida ini selanjutnya dapat memicu apoptosis dan autofagi pada sel tersebut.

Penelitian yang dilakukan oleh Ooi *et al.* (2013) menyebutkan bahwa *physalin F* dari *Physalis angulata* dapat memicu apoptosis sel melalui aktivasi jalur caspase-3 dan c-myc pada sel T-47D sehingga tanaman ini juga berpotensi sebagai agen kemoterapeutik. *Physalin F*, senyawa steroid dari *Physalis angulata* L., memiliki efek immunosupresif terhadap sel mononuklear dari darah perifer pasien myelopathi akibat infeksi HTLV-1 (Pinto *et al.*, 2016).

Efek relaksasi terhadap otot polos daun *Physalis angulata* L. ditunjukkan oleh penelitian dilakukan oleh Priyantoro d.k.k. (2004). Pada penelitian tersebut ekstrak etanol daun *Physalis angulata* L. memberikan efek positif terhadap relaksasi otot polos pada sediaan terpisah trakhea marmut yang dikontraksikan dengan histamin. Penelitian lain yang dilakukan oleh Tarannita *et al.* (2006) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Physalis minima* dapat menurunkan kontraksi otot polos ileum marmut.

Paparan ekstrak *P. angulata* yang mengandung physalin yang bersifat fitoestrogen, pada kultur sel endotel manusia (HUVECs) dapat meningkatkan pelepasan NO dari endotel yang diduga melalui efek genomik maupun efek non-genomik. Pada penelitian tersebut juga dibuktikan bahwa ekstrak *P. angulata* dapat meningkatkan kadar kalsium sitosolik sebagai efek non-genomik dan ekspresi eNOS maupun iNOS sebagai efek genomik (Permatasari *et al.*, 2010). Sulistyowati (2015) juga membuktikan bahwa efek

ekstrak air herba ceplukan (*P. angulata* L) terstandar fisalin pada jalur sintesis NO salah satunya adalah melalui peningkatan kadar VEGF (Sulistiyowati, 2015). Sebagai antiinflamasi, secara *in vivo*, ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata*) dapat mengurangi fibrosis ventrikel melalui inhibisi terhadap TNF- α (Lestari *et al*, 2016).

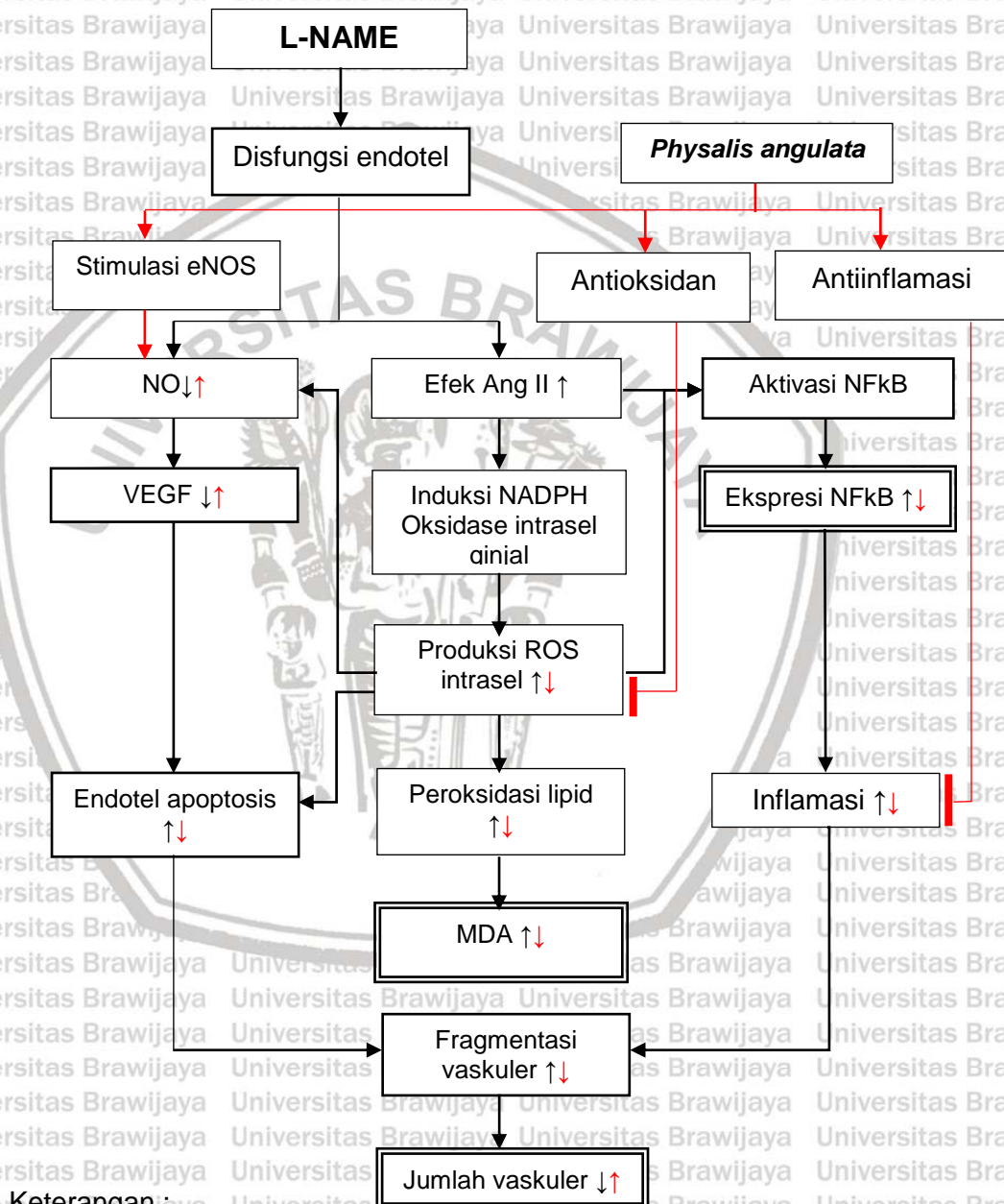
Ditemukan sembilan macam withanolide dengan tipe withaphysalin yang diberi nama physaminimin (G-O). Physaminimin G, H, dan K menunjukkan hambatan terhadap lipopolisakarida yang menginduksi NO pada makrofag (Xu *et al.*, 2016).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :
 → = menginduksi
 ← = menghambat
 → (red) = Efek ekstrak daun *Physalis angulata*
 [] = variabel yang diteliti

Pemberian analog L-arginin, L-NAME, menyebabkan terjadinya disfungsi endotel akibat penurunan kadar NO. Penurunan kadar NO akan mengganggu keseimbangan kadar vasodilator dan vasokonstriktor, salah satunya adalah Angiotensin II. Pemberian L-NAME itu sendiri juga menyebabkan peningkatan sensitivitas AT1R (reseptor AngII) sehingga efek Ang II meningkat (Figueroa-Guillén *et al.*, 2009). Ketidak seimbangan antara NO dan Ang II menyebabkan berbagai efek berikut:

1. Penurunan kadar NO dapat menurunkan VEGF (Chade, 2013) yang berfungsi mempertahankan integritas endotel. Penurunan VEGF akan meningkatkan apoptosis sel endotel (Gupta *et al.*, 1999). Apoptosis sel endotel akan menimbulkan fragmentasi vaskuler dan menurunkan jumlah pembuluh darah di ginjal (Kobayashi *et al.*, 2005).
2. Dominasi stimulasi Ang II melalui reseptor AT1 menyebabkan terbentuknya radikal bebas melalui induksi NADPH oksidase (Touyz *et al.*, 2002). Radikal bebas yang terbentuk akan semakin menurunkan bioavailabilitas NO karena akan bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrit. Peroksinitrit merupakan senyawa radikal (Endemann dan Schiffrin, 2014). Radikal bebas dapat secara langsung menyebabkan kerusakan sel ginjal (glomerulus dan tubulus) dengan menyerang protein dan lipid yang merupakan penyusun membran sel. Salah satu produk akhir yang dihasilkan dari kerusakan sel akibat peroksidasi lipid oleh senyawa radikal bebas adalah malondialdehid (Gawel *et al.*, 2004). Oleh karena itu, pada kondisi stres oksidatif seperti di atas akan terjadi peningkatan kadar malondialdehid. Radikal bebas juga dapat mengaktivasi NF κ B sehingga menimbulkan efek proinflamasi (Guzik and Harrison, 2007). Stres oksidatif juga dapat menyebabkan apoptosis sel

endotel yang berujung pada fragmentasi vaskuler dan penurunan jumlah vaskuler (Kobayashi *et al.*, 2005).

3. Stimulasi Angiotensin II pada reseptor AT1 akan menyebabkan efek proinflamasi akibat peningkatan ekspresi faktor transkripsi NFkB p65 (Mitra *et al.*, 2010; Giani *et al.*, 2011). NFkB yang teraktivasi akan bertranslokasi ke nukleus dan menyebabkan transkripsi berbagai sitokin proinflamasi (Harrison dan Bernstein, 2017; (Goligorsky, 2010; Mohammed *et al.*, 2015).

Peningkatan ekspresi mediator inflamasi menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi. Sitokin proinflamasi ini akan menyebabkan fragmentasi vaskuler (Harrison dan Bernstein, 2017; (Goligorsky, 2010; Mohammed *et al.*, 2015)

Ekstrak daun ceplukan mengandung bahan aktif *physalin* yang secara *in vitro* dapat meningkatkan eNOS dan kadar NO (Permatasari *et al.*, 2010).

Meningkatnya kadar NO dapat meningkatkan kadar VEGF yang diharapkan akan memicu neovaskularisasi (peningkatan jumlah vaskuler) sebagai respon jaringan terhadap ancaman iskemia. Selain itu, kandungan polifenol dan flavonoid dalam daun ceplukan juga memiliki efek antioksidan secara *in vitro* (Susanti *et al.*,

2015). Menurunnya stres oksidatif secara *in vivo* ditandai dengan menurunnya

kadar malondialdehid yang merupakan produk peroksidasi lipid oleh radikal bebas. Efek antiinflamasi ekstrak daun ceplukan juga sudah diteliti oleh Lestari *et*

al. (2016), yaitu melalui inhibisi TNF- α . TNF- α merupakan salah satu sitokin aktivator NFkB. Oleh karena itu diharapkan pemberian ekstrak air daun ceplukan

(*Physalis angulata* L.) dapat mencegah peningkatan ekspresi NFkB. Tripel mekanisme ini diharapkan mampu merestorasi eNOS, mempertahankan

keseimbangan oksidan dan antioksidan, mencegah inflamasi, serta memicu

perbaiki jaringan melalui neovaskularisasi sehingga mencegah kerusakan ginjal akibat disfungsi endotel.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang, tinjauan pustaka, dan kerangka konsep diatas, maka dapat dirumuskan hipotesis penelitian secara umum adalah:

“Pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal melalui pencegahan stres oksidatif dan inflamasi”, dengan rincian subhipotesis sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata* L) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal.
2. Pemberian ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata* L) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah peningkatan kadar (malondialdehid) MDA ginjal
3. Pemberian ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata* L) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah ekspresi NFκB pada ginjal.
4. Terdapat hubungan antara dosis ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dengan kadar MDA, ekspresi NFκB, dan jumlah vaskuler ginjal.
5. Terdapat hubungan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)

6. Terdapat hubungan antara ekspresi NFkB dengan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata L.*)



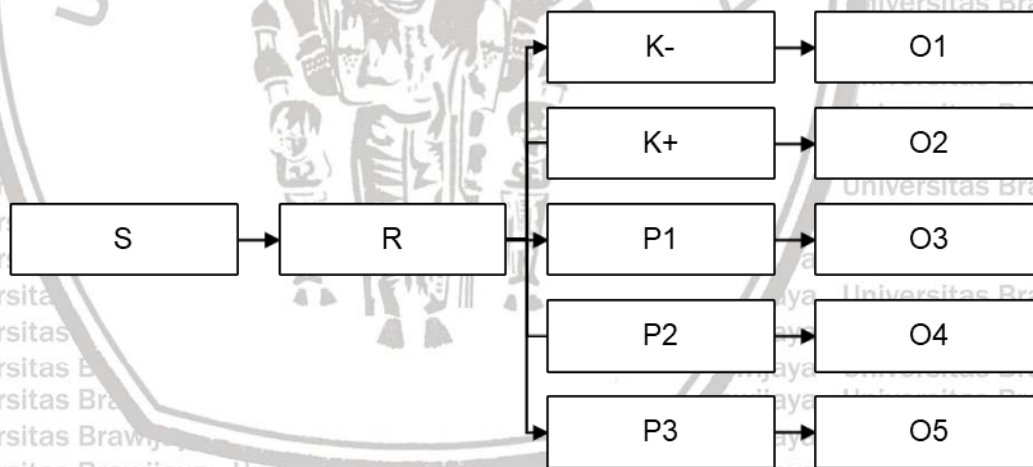
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini penulis menggunakan desain penelitian eksperimental murni dengan uji laboratorium dan rancangan *control group post test only*.

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* pada hewan coba tikus wistar *Ratus norvegicus* jantan model hipertensi yang diinduksi L-NAME untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap ekspresi NFkB ginjal, kadar MDA ginjal, dan jaringan ginjal. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan:

S : Sampel

R : Alokasi random

K-: Kelompok kontrol negatif (Larutan garam fisiologis 40 mg/kgBB i.p)

K+ : Kelompok kontrol positif (L-NAME 40 mg/kgBB i.p)

P1 : L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 500 mg/kgBB p.o.

P2 : L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 1500 mg/kgBB p.o.

P3 : L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 2500 mg/kgBB p.o.

O1 : Data hasil pengukuran K-

O2 : Data hasil pengukuran K+

O3 : Data hasil pengukuran P1

O4 : Data hasil pengukuran P2

O5 : Data hasil pengukuran P3

Penelitian menggunakan beberapa kelompok perlakuan untuk mengetahui apakah perbedaan yang terjadi benar-benar merupakan akibat dari pemberian ekstrak *Physalis angulata* dan juga untuk meningkatkan validitas internal.

Perlakuan berlangsung selama dua minggu (15 hari) (Talas, *et al.*, 2013; Talas *et al.*, 2015).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Nopember 2016 - Januari 2017

4.2.2 Tempat Penelitian

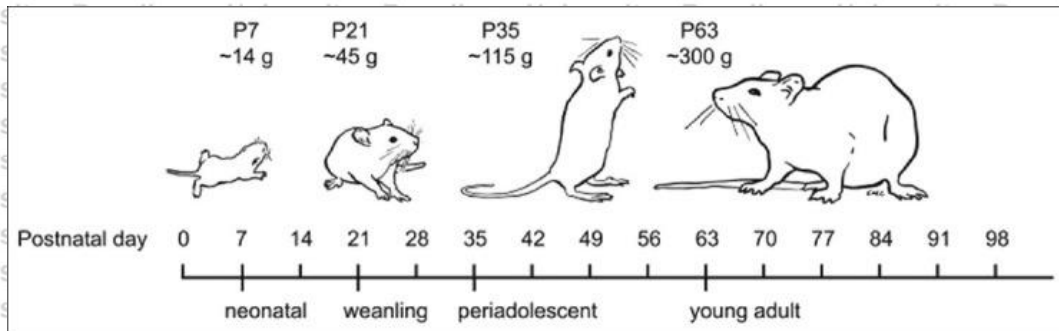
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Sampel dan Jumlah Pengulangan

Sampel yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah tikus wistar putih dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- Jenis kelamin jantan
- Umur 2-3 bulan. Dipilih tikus berusia 2-3 bulan karena saat usia tersebut, tikus wistar sedang dalam fase dewasa muda (Sengupta, 2013). Dipilih fase dewasa muda karena pada kondisi tersebut diharapkan tikus berada dalam kondisi optimum.

- Berat tikus ± 250-300 gram (berat ideal untuk tikus dalam fase dewasa muda)



Gambar 4.1 Korelasi berat badan tikus dengan fase kehidupannya (Sengupta, 2013).

- Kondisi sehat fisik (ditandai dengan nafsu makan baik dan berperilaku normal)

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah tikus yang mati selama masa penelitian atau tikus dengan kelainan bawaan yang ditemukan saat otopsi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Tikus yang memenuhi kriteria eksklusi diganti dengan tikus lain sesuai kriteria inklusi sehingga jumlah tikus sesuai dengan jumlah sampel. Hewan coba tersebut dibagi secara random menjadi lima kelompok perlakuan. Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus *Federer* (1967) berikut:

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.75 atau dibulatkan menjadi

5.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

1. Dosis ekstrak daun *Physalis angulata* L.

b. Variabel Tergantung

1. Kadar MDA ginjal
2. Jumlah sel yang tercat positif dengan antibodi p65 NFkB
3. Jumlah vaskuler di korteks ginjal

c. Variabel Kendali

1. Jenis kelamin hewan coba (jantan)
2. Umur hewan coba
3. Berat badan hewan coba
4. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba, seperti : cara pemberian makanan, air minum yang diberikan secara *ad libitum*
5. Cara penyuntikan L-NAME (secara intraperitoneal)
6. Cara pemberian ekstrak (lewat sonde)

4.4.2 Definisi Operasional

Di dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui yaitu :

1. Daun *Physalis angulata* L. yang dipakai dalam penelitian ini berumur ± 3 bulan, diperoleh dari badan penelitian tanaman tradisional dan obat

(BALITRO) (Lampiran 2), yang sudah dikonfirmasi spesiesnya oleh Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB (Lampiran 3). Daun tersebut selanjutnya dikeringkan dengan oven dan dihaluskan menjadi serbuk.

2. Ekstrak daun *Physalis angulata* adalah ekstrak yang dibuat dalam konsentrasi 10 gram/ 100 ml (10%) dan diberikan dengan dosis tertentu (500 mg/kgBB, 1500 mg/kgBB, 2500 mg/kgBB). Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Lestari *et al.* (2016). Ekstrak diberikan secara peroral melalui sonde. Pemberian ekstrak dilakukan selama 15 hari dan dalam periode yang bersamaan dengan induksi L-NAME.

3. Induksi L-NAME dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 40 mg/kgBB selama 15 hari (Talas, *et al.*, 2013; Talas *et al.*, 2015). Injeksi intraperitoneal dilakukan di kuadran kanan bawah abdomen, sebelah distal dari garis tengah untuk menghindari tertusuknya kandung kemih atau caecum (Turner *et al.*, 2011).

4. Jumlah vaskuler ginjal dievaluasi dengan cara menghitung jumlah vaskuler yang terdapat di korteks ginjal dengan perbesaran 400x pada 10 lapang pandang yang dipilih secara acak di daerah korteks ginjal. Yang dihitung sebagai vaskuler adalah lumen berisi eritrosit dan dilapisi endotel (Moreno *et al.*, 2006).

5. Pengukuran kadar MDA sebagai indikator stres oksidatif diukur pada organ ginjal yang telah dihaluskan dan dilakukan menurut metode TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) kemudian dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm (Ganie *et al.*, 2011).

Konsentrasi dihitung berdasarkan kurva MDA standar (Lampiran 9).

6. Ekspresi NFkB dievaluasi dengan imunohistokimia menggunakan antibodi p65 rabbit-poliklonal dari Santa Cruz Biotechnology sc-109 yang reaktif terhadap gugus N-terminal protein p65 tikus (Spandou *et al.*, 2006).
7. Pengamatan ekspresi NFkB p65 dilakukan secara *double-blind* oleh dua pengamat. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada 10 lapang pandang di korteks ginjal yang dipilih secara acak. Penghitungan sel dilakukan dengan perbesaran 400x (Meteoglu *et al.*, 2008). Dihitung jumlah sel glomerulus maupun tubulus yang tercat positif dengan antibodi p65, baik di inti dan atau di sitoplasma (Spandou *et al.*, 2006). Sel yang positif adalah sel berinti dan intinya tercat coklat, dan sel berinti yang sitoplasmanya tercat coklat (Giani *et al.*, 2011). Nilai akhir dinyatakan sebagai rata-rata jumlah sel yang tercat positif dengan antibodi NFkB p65 per lapang pandang besar (Spandou *et al.*, 2006).

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

1) Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang tikus berukuran 40 x 30 x 20 cm
- Penutup kandang tikus (terbuat dari anyaman kawat)
- Botol air untuk minum tikus
- Rak tempat menaruh kandang
- Tempat makanan (pellet)
- Timbangan torbal (*torsion balance*) untuk menimbang berat badan tikus dengan satuan gram.

2) Alat Pembuat Pakan Hewan Coba

- Timbangan
- Gelas ukur
- Baskom plastik
- Pembuat pelet
- Pengaduk.

3) Alat Induksi L-NAME

- S spuit 1 cc
- Neraca ohaus
- Tabung plastik
- Sarung tangan
- Duk steril
- kapas alkohol

4) Alat Pembuatan Ekstrak Daun *Physalis angulata* L.

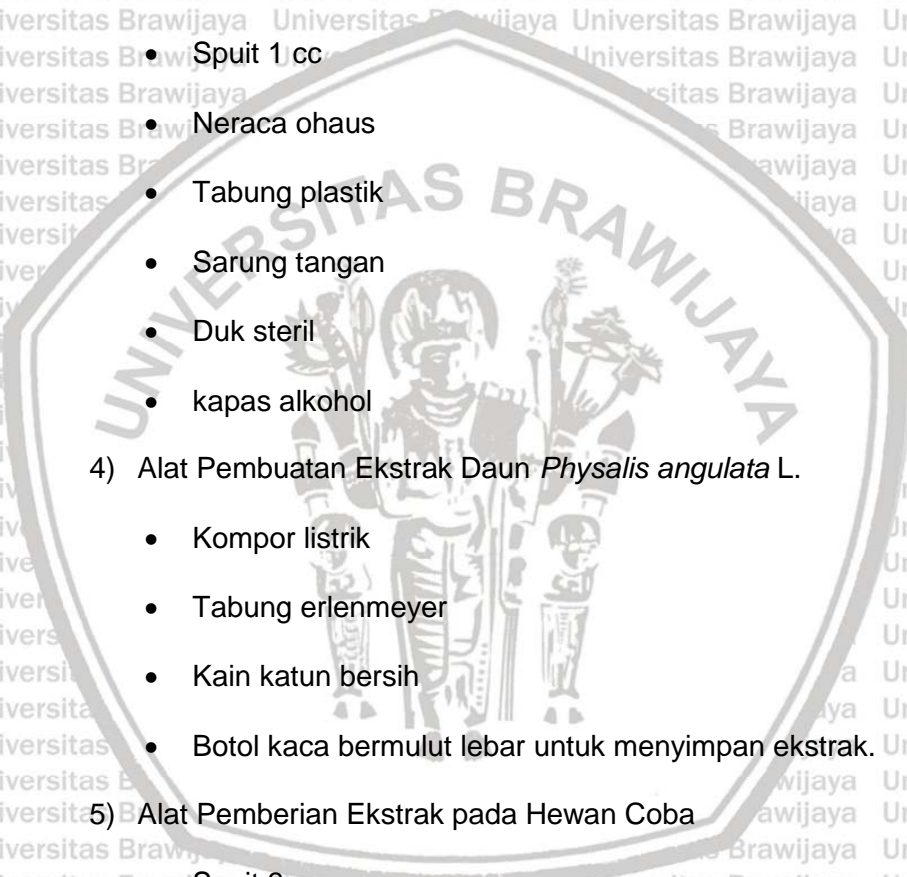
- Kompor listrik
- Tabung erlenmeyer
- Kain katun bersih
- Botol kaca bermulut lebar untuk menyimpan ekstrak.

5) Alat Pemberian Ekstrak pada Hewan Coba

- S spuit 3 cc
- Sonde

6) Alat untuk Mengorbankan Hewan Coba

- S spuit 1 cc
- S spuit injeksi 3 cc
- Gelas beker
- Bak instrumen



- Gunting iris bengkok 11 cm
 - Gunting operasi lurus 14 cm
 - Handlescaple
 - Sarung tangan
 - Pisau bedah
 - Pinset anatomis 14 cm
 - Pinset chirurgis 14 cm
 - Papan tempat pembedahan tikus
 - Jarum untuk fiksasi tikus 23 gg x ¼"
 - Tabung penyimpanan organ
 - Vacutainer
 - Formalin 10%
- 7) Alat untuk Memeriksa Kadar MDA
- Mikropipet dan *bluetip*
 - Alu dan Mortar
 - Tabung reaksi
 - Neraca ohaus
 - Waterbath
 - Vortex
 - Kuvet
 - Spektrofotometer UV-VIS
- 8) Alat untuk Membuat Sediaan Histopatologi
- Mikrotom
 - Automatic processor
 - Parafin block

9) Alat untuk Pewarnaan Imunohistokimia

- Tabung eppendorf
- Mikropipet
- Tabung erlenmeyer
- Wadah kotak
- Tissue
- Water-bath

10) Alat untuk pengamatan preparat histopatologi

- Mikroskop cahaya Olympus CX22
- *Dotslide scanner*
- *Counter*

4.5.2 Bahan

1) Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

- Sekam

2) Bahan Pembuat Pakan Hewan Coba

- *Comfeed PAR-S*
- Terigu
- Air

3) Bahan Induksi L-NAME

- Serbuk L-NAME yang diperoleh dari Sigma Aldrich
- Normal salin

4) Bahan Pembuatan Ekstrak Daun *Physalis angulata* L.

- Daun *Physalis angulata* yang diperoleh dari BALITRO
- Air

5) Bahan untuk Mengorbankan Hewan Coba

- Ketamin 200 mg/20 mL (10 mg/ mL)
- Formaldehid 10%

6) Bahan untuk Memeriksa Kadar MDA

- Larutan buffer Tris KCl pH 7.5
- 0.37% asam tiobarbiturat (TBA)
- 0.25 mol/L larutan HCl
- 15% larutan *trichloroacetic acid* (TCA)
- Larutan MDA standar 500 ng/ml
- Akuades

7) Bahan untuk Membuat Sediaan Histopatologi

- Parafin
- *Cover glass* dan *object glass*
- Pewarna HE (Harris hematoxyline, alcohol, amonium air, counter staining)
- Entellan
- Xylol

8) Bahan untuk Pewarnaan Imunohistokimia

- Slide jaringan : ginjal tikus
- Antibodi primer :
 - NfκB p65 *rabbit polyclonal antibody* sc-109 dari Santa Cruz Biotechnology
- Antibodi sekunder: Biotin
- PBS (*Phosphat Buffer Saline*):
 - NaH₂PO₄·2H₂O 2.4 gram

- Na₂HPO₄ 1.2 gram
- KH₂PO₄ 0.7 gram
- KCl 6.8 gram

Dilarutkan dalam aquades 1000 ml, diukur pada pH 7.4

- H₂O₂ 3% = 100ml H₂O₂ 30% + 900ml metanol → vortex
- Blocking buffer = 3% FBS + 0,25% Triton x-100 (dalam PBS)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Sodium sitrat buffer

- Na₃C₆H₅O₇ 2.94 gram

Dllarutkan dalam aquades 1000 ml, diukur pada pH 6.0

kemudian ditambahkan 0.5 mL Tween 20

- SAHRP (Strep-Avidin Horse Raddish Peroxidase)
- Aquades
- DAB (Diethyl Amine Benzene)
- Mayer's
- Air mengalir

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak

Di dalam penelitian ini digunakan bahan uji berupa ekstrak air daun

Physalis angulata L. yang dibuat dengan cara sebagai berikut:

1. Daun *Physalis angulata* L. dikeringkan dengan cara dikering-anginkan selama lebih kurang tiga hari hingga layu.
2. Daun *Physalis angulata* L. yang telah layu tersebut selanjutnya dihaluskan hingga menjadi serbuk.

3. Sebanyak 10 gram serbuk *Physalis angulata* L. dicampur dengan 100 ml air mendidih dan didiamkan selama satu jam dalam wadah tertutup.
4. Campuran tersebut kemudian disaring dengan menggunakan kain katun / kain mori sehingga kurang lebih akan mendapatkan 80 ml filtrat.
5. Serbuk yang tersisa di kain dicampur kembali dengan 30 ml air mendidih dan didiamkan selama 1 jam dalam wadah tertutup,
6. Campuran tersebut disaring dengan menggunakan kain katun / kain mori sehingga kurang lebih akan mendapatkan 20 ml filtrat.
7. Akhirnya akan didapatkan 100 ml ekstrak air daun *Physalis angulata* dengan konsentrasi 10%.

4.6.2 Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

Sebelum perlakuan, hewan coba terlebih dahulu diaklimatisasikan dengan kondisi tempat penelitian, makanan dan minum selama 7 hari. Tikus dipelihara dalam ruangan yang bersuhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dan mengikuti siklus 12 jam siang dan 12 jam malam. Kandang yang digunakan berjumlah 5 buah. Tikus dibagi dalam 5 kelompok dengan cara randomisasi, yaitu kelompok K-, K+, P1, P2, dan P3. Masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus. Kandang diberi tutup yang terbuat dari anyaman kawat dan diberi sekam sebagai alasnya. Kandang dibersihkan setiap 3 hari sekali. Kandang juga dilengkapi dengan botol air untuk minum dan pellet sebagai tempat makanan. Kelima kelompok tikus diberi pakan standar, yaitu kombinasi konsentrat pakan ayam dan terigu dengan komposisi 2 : 1, dan diberi minum air bersih *ad libitum* selama masa penelitian.

Setelah aklimatisasi selesai tikus diberi perlakuan berdasarkan kelompoknya; K- merupakan kelompok tikus tanpa perlakuan, kelompok K+

diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB tanpa diberi ekstrak daun *Physalis angulata*, sedangkan seluruh kelompok P (perlakuan) diberi injeksi L-NAME 40 mg/kgBB tikus secara intraperitoneal dan diberi ekstrak daun *Physalis angulata* dengan dosis sesuai kelompoknya. Kelima perlakuan tersebut dilakukan selama 15 hari (Talas *et al.*, 2015).

4.6.3 Pengorbanan Hewan Coba

Pengorbanan hewan coba dilakukan dengan cara pembedahan. Sebelum dilakukan pembedahan, dilakukan anestesia dengan cara menyuntikkan ketamine 100 mg/kg secara intramuskular. Hal ini akan membuat tikus cepat lemas sehingga mudah untuk dilakukan pembedahan. Pembedahan menggunakan gunting dilakukan secara vertikal dimulai dari abdomen mengikuti linea mediana menuju thorax. Masing-masing organ, termasuk ginjal, diambil kemudian ditimbang. Organ yang akan dibuat sediaan histopatologi disimpan dalam wadah tertutup yang berisi cairan formaldehid 10%.

4.6.4 Pemeriksaan Kadar MDA Ginjal

Dalam Ganie *et.al* (2011) dinyatakan bahwa kadar MDA sebagai salah satu indikator peroksidasi lipid diukur berdasarkan pembentukan senyawa asam tiobarbiturat yang reaktif sesuai dengan metode Niehaus dan Samuelson sebagai berikut:

- Menimbang jaringan ginjal sebanyak 100 mg kemudian digerus dengan mortar dan diberi *buffer* Tris-KCl sebanyak 1 ml
- Homogenat jaringan dicampur dengan 2 ml reagen TBA-TCA-HCL dengan perbandingan 1:1:1.
- Campuran homogenat jaringan dan reagen divorteks supaya tercampur

- Selanjutnya campuran direndam dalam waterbath selama 15 menit kemudian didinginkan.
- Campuran disentrifus 3500 rpm selama 10 menit pada temperatur ruang dan diambil supernatannya.
- Supernatan diperiksa dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 535 nm

4.6.5 Preparasi Preparat Histopatologi

4.6.5.1 Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Jaringan atau spesimen penelitian difiksasi dengan formalin 10 % atau dengan buffer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
4. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual
6. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit

4.6.5.2 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron

4.6.5.3 Proses Deparafinasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

4.6.6 Proses Pewarnaan Hematoxilin Eosin

1. Cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 Menit
2. Cuci dengan air mengalir selama 15 Menit
3. Alkohol asam 1 % 2-5 Celup
4. Amonia lithium karbonat 3-5 Celup (bila kurang biru)
5. Eosin 10-15 Menit
6. Selanjutnya dicelupkan dalam alokohol bertingkat sebagai berikut:
 - Alkohol 70% 3 menit
 - Alkohol 80% 3 menit
 - Alkohol 96% 3 menit
 - Alkohol Absolut 3 menit
7. Penjernihan (Clearing) :
 - Xylol 15 menit
 - Xylol 15 menit
8. Mounting dengan entelan dan deckglass.

Slide / *objectglass* ditutup dengan *cover glass* dan biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering siap untuk diberi label dan diamati.

4.6.7 Proses Immunohistokimia

a) Deparafinisasi, dengan cara :

- o Memanaskan slide pada suhu 60°C selama 60 menit, kemudian merendamnya dalam larutan di bawah ini secara berurutan:
 - o xylol (2x10 menit)
 - o Etanol absolut (2x10 menit)
 - o Etanol 90% (1x5 menit)
 - o Etanol 80% (1x5 menit)
 - o Etanol 70% (1x5 menit)
 - o Aquades 3x5 menit

b) Melakukan *antigen retrieval* dengan buffer sitrat, caranya:

- o Merendam slide dalam *chamber* yang berisi buffer sitrat pH 6.0 kemudian memanaskannya di dalam *waterbath* suhu 95°C selama 20 menit
- o Mengeluarkan slide dari *waterbath* dan mendinginkannya sampai suhu ruang \pm 20 menit
- o Mencuci slide dengan PBS (3 x 5 menit)

c) *Blocking endoperoxidase*

- o Menetesi slide dengan H₂O₂ 3% dalam metanol
- o Inkubasi selama 15 menit (suhu ruangan)
- o Mencuci dengan PBS 3x5 menit

c) *Blocking unspecific protein*

- o Menetesi *blocking buffer* (3% FBS + triton x-100 0,25% dalam PBS)
- o Inkubasi selama 1 jam
- o Mencuci dengan PBS 3x5 menit

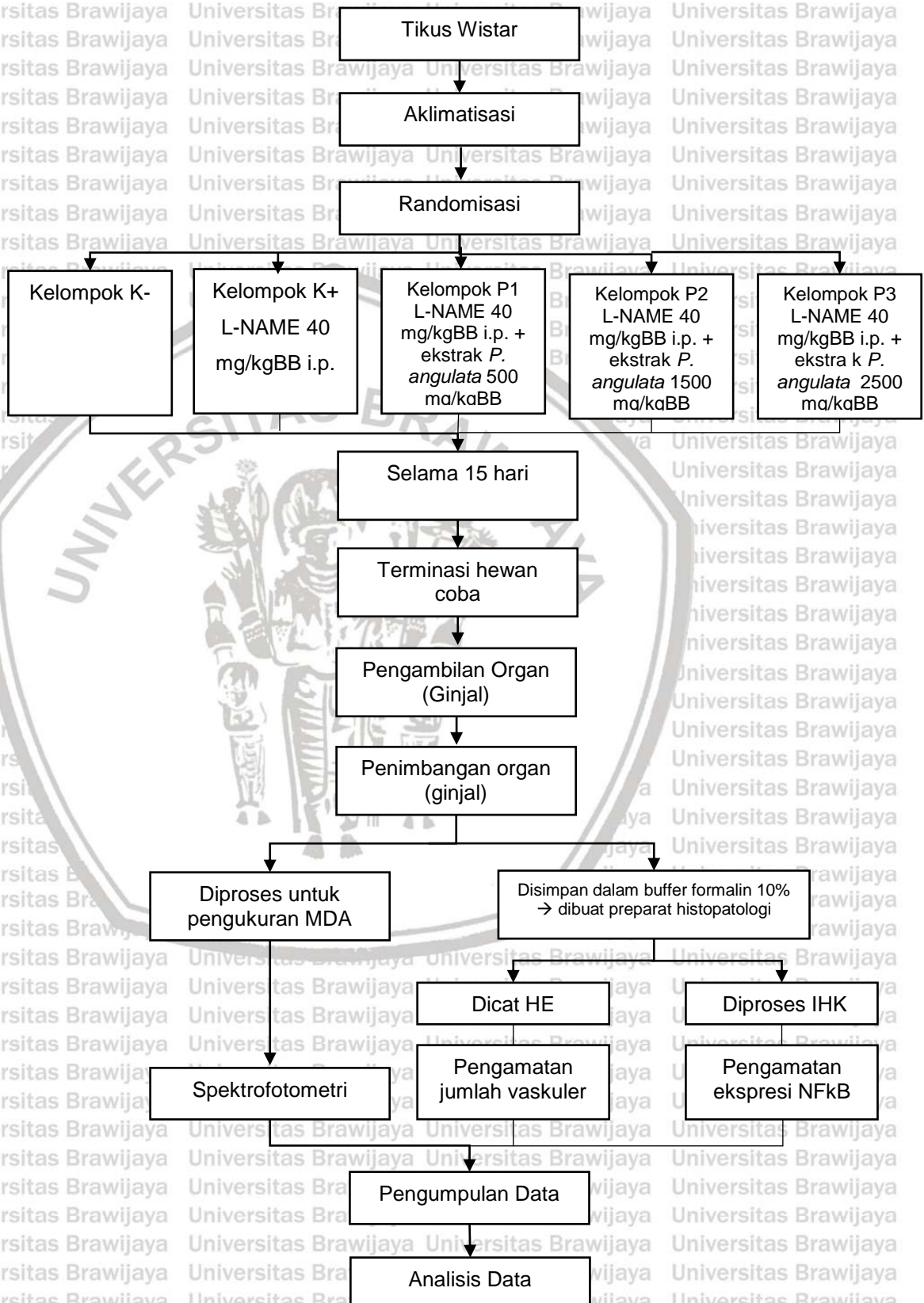
- Mengeringkan dengan tisu
- d) Blocking antibodi primer
 - Menetesi slide dengan Ab primer (Ab primer : pelarut/BSA = 1 : 100)
 - Inkubasi semalam dalam 4°C
 - Esok harinya dikeluarkan dari 4°C, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS 3 x5 menit
- e) Blocking antibodi sekunder
 - Menetesi slide dengan Ab. Sekunder (*Biotin conjugate*), inkubasi 60 menit pada suhu ruang
 - Inkubasi selama 1 jam
 - Mencuci dengan PBS 3x5 menit
 - Mengeringkan dengan tisu
- f) Blocking enzim SAHRP
 - Menetesi SAHRP @ 100µl/slide
 - Inkubasi selama 40 menit
 - Mencuci dengan PBS 3x5 menit
 - Mencuci aquades 2x5 menit
 - Mengeringkan dengan tisu
- g) Substrat DAB
 - Menetesi DAB (DAB : buffer DAB = 1 : 50)
 - Inkubasi selama 20 menit
 - Mencuci dengan PBS 3x5 menit
 - Mencuci aquades 2x5 menit
 - Mengeringkan dengan tisu
- h) Mayer's

- Meneteskan mayer's (mayer's : tap water = 1 : 100)
- Inkubasi selama 5 menit
- Mencuci dengan tap water
- Dikeringanginkan
- Dicover dengan entelan
- i) Pembacaan hasil
 - Lihat dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x

4.6.8 Pembacaan Preparat Histopatologi

- Jumlah vaskuler ginjal dievaluasi dengan cara menghitung jumlah vaskuler yang terdapat di korteks ginjal dengan perbesaran 400x pada 10 lapang pandang yang dipilih secara acak di daerah korteks ginjal dengan menggunakan *dot slide scanner*. Yang dihitung sebagai vaskuler adalah lumen berisi eritrosit dan dilapisi endotel (Moreno *et al.*, 2006).
- Pengamatan ekspresi NFkB p65 dilakukan secara *double-blind* oleh dua pengamat. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya Olympus CX22 pada 10 lapang pandang di korteks ginjal yang dipilih secara acak. Penghitungan sel dilakukan dengan perbesaran 400x (Meteoglu *et al.*, 2008). Dihitung jumlah sel glomerulus maupun tubulus yang tercat positif dengan antibodi p65, baik di inti dan atau di sitoplasma (Spandou *et al.*, 2006). Sel yang positif adalah sel berinti dan intinya tercat coklat, dan sel berinti yang sitoplasmanya tercat coklat (Giani *et al.*, 2011). Nilai akhir dinyatakan sebagai rata-rata jumlah sel yang tercat positif dengan antibodi NFkB p65 per lapang pandang besar (Spandou *et al.*, 2006).

4.6.9 Alur Penelitian



4.6.10 Analisis Data

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif tersebut digunakan uji *t*-tidak berpasangan. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji *t*-tidak berpasangan. Uji normalitas data dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (karena jumlah sampel < 50). Jika data berdistribusi normal ($p > 0.05$) dan varians data homogen ($p > 0.05$), maka digunakan uji *t*-tidak berpasangan dengan varians data homogen, sedangkan jika data berdistribusi normal namun varians data tidak homogen, maka dilakukan uji *t*-tidak berpasangan dengan varians data tidak homogen (Erceg-Hurn *et al.*, 2008; Gastwirth *et al.*, 2009).

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata kadar MDA antara masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji komparasi. Oleh karena jumlah kelompok perlakuan data lebih dari dua (empat kelompok) dan variabel yang akan diuji adalah variabel numerik, maka uji komparasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* yang signifikan ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok data berbeda secara signifikan. Untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang berbeda signifikan maka dilakukan uji *post Hoc*. Oleh karena itu, uji *post Hoc* hanya dilakukan bila hasil uji ANOVA-nya adalah signifikan ($p < 0.05$) (Dahlan, 2017).

Syarat uji ANOVA adalah sebaran data normal. Sedangkan varians data boleh sama dan boleh tidak. Jika varians data sama, maka digunakan uji ANOVA yang dilanjutkan uji *post Hoc Bonferroni*, sedangkan jika varians data berbeda digunakan uji ANOVA *welch* yang dilanjutkan uji *post hoc Games Howell* (Erceg-

Hurn *et al.*, 2008; Gastwirth *et al.*, 2009). Analisis normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel < 50 . Data dikatakan memiliki sebaran normal bila $p > 0.05$. Uji homogenitas varians dilakukan dengan Uji *Levene*. Data dikatakan homogen bila $p > 0.05$. Jika data berdistribusi normal (uji *Shapiro-Wilk* $p > 0.05$) dan varians data homogen (uji *Levene* $p > 0.05$), maka dilakukan uji *one way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc Bonferroni*. Namun jika data berdistribusi normal (uji *Shapiro-Wilk* $p > 0.05$) dan varians data tidak homogen (uji *Levene* $p < 0.05$) dilakukan uji *one way Anova Welch* yang dilanjutkan uji *post Hoc Games-Howell* (Gastwirth *et al.*, 2009). Jika sebaran data tidak normal (uji *Shapiro wilk* < 0.05), maka dilakukan transformasi data. Jika setelah dilakukan transformasi namun sebaran data masih tidak normal, maka dilakukan uji komparasi non-parametrik *Kruskal-wallis* yang dilanjutkan dengan uji *pos Hoc Mann-Whitney*. Hasil uji beda dikatakan signifikan bila $p < 0.05$ (Dahlan, 2017).

Untuk mencari tahu hubungan variabel dependent terhadap variabel independen, dalam hal ini adalah *dose-response relationship* digunakan uji korelasi. Syarat uji korelasi adalah terpenuhinya asumsi linearitas antara kedua variabel. Bila syarat linearitas tidak terpenuhi, maka tidak dilakukan uji korelasi. Linearitas dapat dicek dengan cara membuat grafik *scatter* ataupun dengan analisis statistik. Dikatakan linear apabila pada grafik *scatter* terbentuk pola titik-titik yang membentuk garis linear. Uji linearitas juga dapat dilakukan secara analitik dengan bantuan *software SPSS*. Jika pada hasil uji linearitas didapatkan $p > 0.05$, artinya terdapat hubungan linear yang signifikan antara variabel 'x' dengan variabel 'y'. Normalitas data juga mempengaruhi pemilihan jenis uji korelasi. Bila salah satu variabel berdistribusi normal dan syarat linearitas

terpenuhi, maka digunakan uji korelasi *Pearson*. Jika kedua variabel tidak berdistribusi normal maka dilakukan transformasi. Uji hipotesis yang digunakan tergantung pada hasil transformasi. Jika kedua variabel tidak normal namun syarat linearitas terpenuhi, maka digunakan uji korelasi *Spearman*. Berikut adalah panduan interpretasi uji hipotesis korelatif (tabel 4.1)

Tabel 4.1 Panduan interpretasi uji hipotesis korelatif (Dahlan, 2017)

No.	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan korelasi secara statistik	0,0 - < 0,2	Sangat lemah
		0,2 - < 0,4	Lemah
		0,4 - < 0,6	Sedang
		0,6 - < 0,8	Kuat
		0,8 - < 1,0	Sangat kuat
2	Arah korelasi	Positif	Semakin tinggi variabel A semakin tinggi variabel B
		Negatif	Semakin tinggi variabel A semakin rendah variabel B
3	Nilai p	Nilai p > 0,05	Korelasi tidak bermakna
		Nilai p < 0,05	Korelasi bermakna

Untuk mengetahui besarnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung, dilakukan uji regresi linear. Syarat uji regresi linear adalah:

1. Jumlah sampel harus sama
2. Jumlah variabel bebas adalah satu
3. Nilai residu harus berdistribusi normal
4. Terdapat hubungan yang linear antara variabel bebas dengan variabel tergantung
5. Tidak terjadi gejala heteroskedastisitas
6. Tidak terjadi gejala autokorelasi (untuk data *time series*).



BAB 5

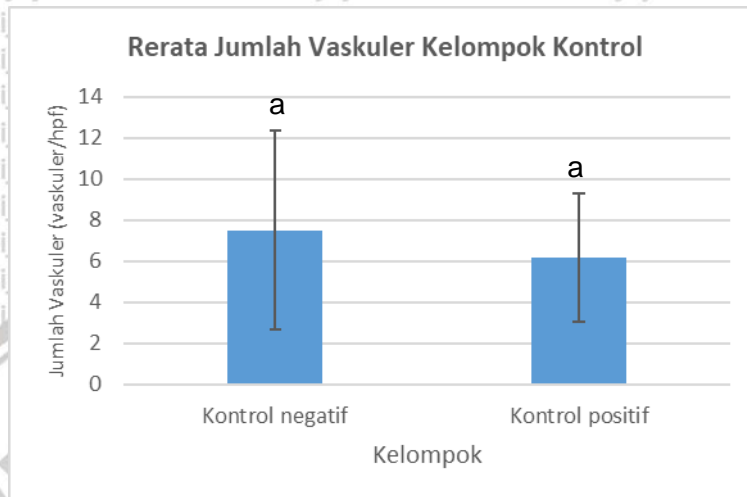
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penghitungan Vaskuler Ginjal

Pada penelitian ini, jumlah vaskuler dianalisis pada preparat ginjal yang dicat dengan haematoxilín-eosin. Pengamatan vaskuler ginjal dilakukan dengan *dot slide scanner* perbesaran 400x. Penghitungan dilakukan pada 10 lapang pandang yang dipilih secara acak. Area yang dianalisis fokus pada daerah korteks. Yang dianggap sebagai vaskuler adalah lumen berlapis endotel (walaupun hanya ditemukan satu sel endotel) dan berisi eritrosit.

Untuk mengetahui apakah rerata jumlah vaskuler di korteks ginjal antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif tersebut berbeda secara signifikan maka dilakukan uji *t*-tidak berpasangan. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji *t*-tidak berpasangan. Uji normalitas data jumlah vaskuler dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (karena jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok data berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 5). Sedangkan hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data pada kelompok kontrol positif dan negatif adalah homogen dengan $p = 0.616$ ($p > 0.05$) (Lampiran 6a). Berdasarkan uji normalitas dan uji varians, maka untuk uji beda dilakukan dengan tidak berpasangan. Hasil uji *t* menunjukkan nilai $p = 0.611$ ($p > 0.05$) (Lampiran 7), yang artinya terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif (Gambar 5.1). Dari Gambar 5.1 tampak bahwa induksi L-NAME sebesar 40 mg/kgBB secara intraperitoneal

selama 15 hari dapat menurunkan jumlah vaskuler di korteks ginjal namun tidak signifikan.



Gambar 5.1 Rerata Jumlah Vaskuler Kelompok Kontrol

Keterangan:

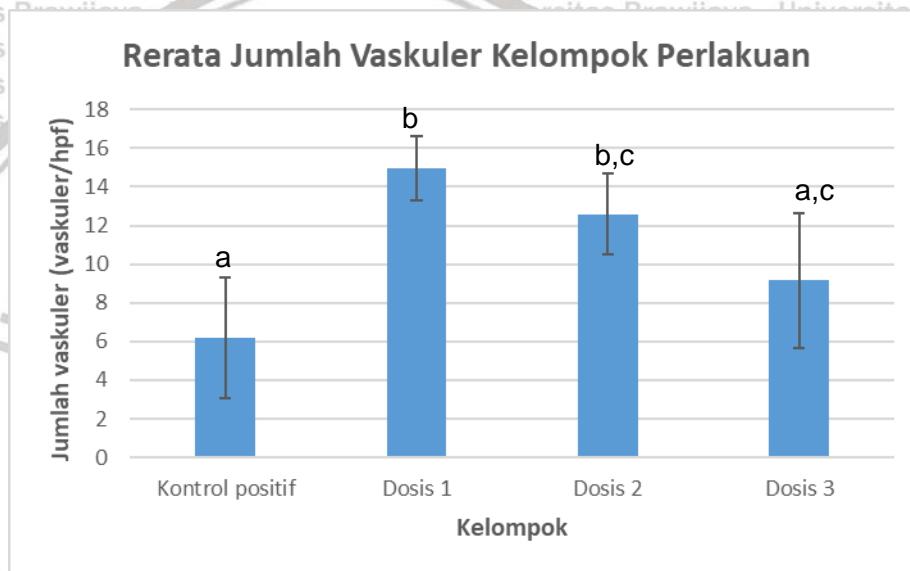
Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan rerata yang signifikan berdasarkan uji *t*-tidak berpasangan. Data menunjukkan perbedaan rerata yang tidak signifikan.

Kontrol negatif: Diinjeksi larutan garam fisiologis 40mg/kgBB i.p

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Untuk mengetahui apakah rerata jumlah vaskuler di korteks ginjal antar kelompok perlakuan berbeda secara signifikan maka dilakukan uji *one way* ANOVA. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji ANOVA. Uji normalitas data jumlah vaskuler dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (karena jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok data perlakuan berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 5). Sedangkan hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data pada kelompok perlakuan adalah homogen dengan $p = 0.656$ ($p > 0.05$) (Lampiran 6b). Berdasarkan uji normalitas dan uji varians, maka untuk uji beda dilakukan ANOVA. Hasil uji ANOVA menunjukkan signifikansi dengan nilai $p = 0.001$ ($p < 0.05$) (Lampiran 8), yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada

minimal antara dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok data mana yang memiliki perbedaan signifikan, maka dilakukan analisis *post Hoc* *Bonferroni*. Dari analisis *post Hoc* didapatkan perbedaan bermakna pada jumlah vaskuler di korteks antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang mendapatkan dosis 1 ($p = 0.000$), antara kelompok kontrol positif dengan dosis 2 ($p = 0.002$), antara kelompok perlakuan dosis 1 dengan dosis 3 ($p = 0.004$) (Lampiran 9).



Gambar 5.2. Rerata Jumlah Vaskuler Kelompok Perlakuan

Keterangan:

Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan rerata yang signifikan berdasarkan uji *post Hoc*

Kontrol positif: L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Dosis 1: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 500 mg/kgBB p.o

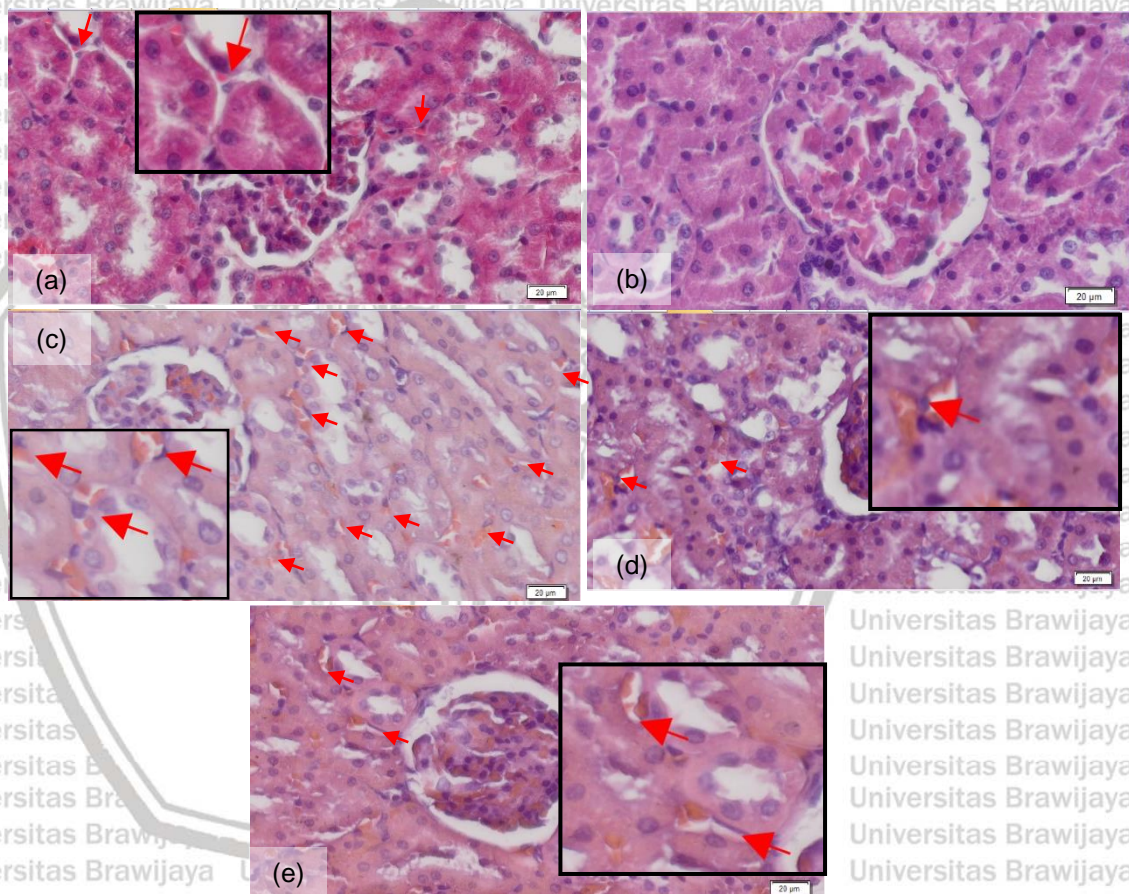
Dosis 2: LNAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 1500 mg/kgBB p.o

Dosis 3: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan 2500 mg/kgBB p.o

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Physalis angulata* pada tikus Wistar yang diinduksi L-NAME dapat meningkatkan jumlah vaskuler ginjal. Jumlah vaskuler ginjal meningkat secara signifikan terhadap kontrol positif pada pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* L. 500 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB dan meningkat secara tidak signifikan pada pemberian dosis ekstrak

Physalis angulata L. 2500 mg/kgBB. Peningkatan pemberian dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* pada dosis 2 dan 3 cenderung menurunkan jumlah vaskuler di korteks ginjal dibandingkan dosis 1. Penurunan jumlah vaskuler pada dosis 3 signifikan terhadap dosis 1, namun tidak signifikan terhadap dosis 2.

Gambar 5.3 berikut adalah gambaran histopatologi jaringan ginjal yang dicat HE untuk melihat vaskuler (perbesaran 400x):



Gambar 5.3 Pengamatan Jumlah Vaskuler Ginjal, HE, 400x, insert 1000x. Anak panah merah menunjukkan vaskuler (a). Kontrol Negatif ; (b). Kontrol positif, (c). Dosis 1, (d) Dosis 2, (e). Dosis 3.

Keterangan:

Anak panah merah menunjukkan vaskuler.

Kontrol negatif: Diinjeksi larutan garam fisiologis 40mg/kgBB i.p

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Dosis 1: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 500 mg/kgBB

Dosis 2: LNAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 1500 mg/kgBB

Dosis 3: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 2500 mg/kgBB

Untuk mencari hubungan antara besar dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* dengan jumlah vaskuler di korteks ginjal, maka digunakan uji korelasi *Pearson* (karena variabel numerik-numerik). Syarat uji korelasi adalah sebaran data dari salah satu variabel adalah normal dan terdapat linearitas. Telah disebutkan sebelumnya bahwa sebaran data adalah normal (Lampiran 5). Sedangkan untuk mengetahui apakah kedua variabel memenuhi asumsi linearitas atau tidak dilakukan uji linearitas dengan hasil $p = 0.709 (> 0.05)$ (lampiran 10) yang artinya kedua variabel memiliki hubungan linear secara signifikan. Oleh karena syarat uji korelasi terpenuhi, maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa signifikansi $p = 0.002 (p < 0.05)$ dan koefisien korelasi $r = -0.721$ (Lampiran 11) yang artinya terdapat hubungan negatif kuat yang signifikan antara besarnya dosis ekstrak daun *Physalis angulata* dengan jumlah vaskuler di korteks ginjal. Hubungan negatif berarti bahwa peningkatan dosis akan diikuti penurunan jumlah vaskuler di korteks ginjal. Hasil uji regresi menunjukkan signifikansi $p = 0.002 (p < 0.05)$, artinya bahwa peningkatan dosis ekstrak daun *Physalis angulata* menyebabkan penurunan jumlah vaskuler korteks ginjal. Nilai $R^2 = 0.52$ (Lampiran 12b) berarti bahwa pengaruh dosis terhadap sel ginjal adalah sebesar 52%, sedangkan 48% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

5.2 Hasil Pengukuran MDA Ginjal

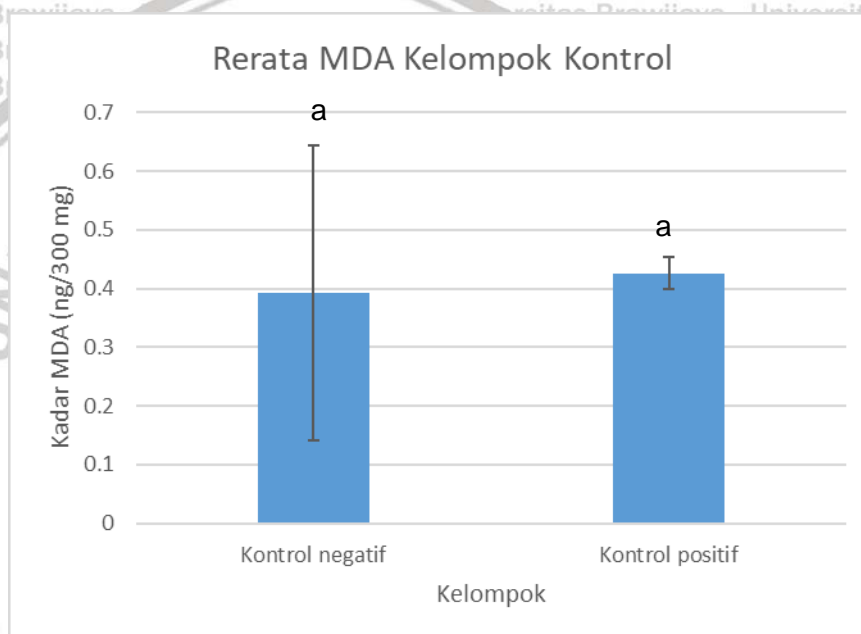
Pada penelitian ini, pengukuran kadar MDA ginjal dilakukan secara spektrofotometri untuk mendapatkan nilai absorbansi. Untuk mendapatkan kadar MDA, nilai absorbansi selanjutnya dimasukkan dalam persamaan linear yang diperoleh dari kurva standar MDA yang telah dibuat sebelumnya (Lampiran 13).

Untuk mengetahui apakah rerata antara kelompok kontrol negatif dan kontrol

positif tersebut berbeda signifikan atau tidak maka dilakukan uji *t*-tidak berpasangan. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji *t*-tidak berpasangan. Uji normalitas data kadar MDA dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 14). Hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data tidak homogen $p = 0.001$ ($p < 0.05$) (Lampiran 15a). Oleh karena data tidak homogen, maka dilakukan transformasi dengan menggunakan fungsi akar kuadrat. Hasil uji normalitas terhadap data hasil transformasi tetap menunjukkan bahwa data tidak homogen ($p = 0.002$) (Lampiran 15b), maka untuk uji beda dilakukan dengan uji *t*-tidak berpasangan dengan varians data tidak homogen. Hasil uji *t-tidak berpasangan* menunjukkan nilai $p = 0.701$ ($p > 0.05$) (Lampiran 16), yang artinya terdapat perbedaan tidak bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok kontrol positif, induksi L-NAME sebesar 40 mg/kgBB secara intra peritoneal selama 15 hari cenderung meningkatkan kadar MDA ginjal tikus bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, namun tidak signifikan (Gambar 5.4).

Untuk mengetahui apakah rerata antar kelompok perlakuan berbeda signifikan atau tidak maka dilakukan uji komparasi *one way ANOVA*. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji ANOVA. Uji normalitas data kadar MDA dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 14). Hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data tidak homogen $p = 0.018$ ($p < 0.05$) (Lampiran 15c) sehingga dilakukan transformasi data dengan fungsi akar kuadrat. Setelah dilakukan

transformasi, ternyata data hasil transformasi tetap tidak homogen ($p = 0.024$) (Lampiran Lampiran 15d) sehingga dilakukan uji ANOVA *Welch* untuk varians data yang tidak homogen. Hasil uji ANOVA *Welch* menunjukkan nilai $p = 0.376$ ($p > 0.05$) (Lampiran 17), yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan yang satu dengan yang lain. Oleh karena hasil uji ANOVA *Welch* tidak signifikan, maka tidak perlu dilakukan uji *post Hoc Mann whitney*.



Gambar 5.4 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Ginjal pada Kelompok Kontrol
Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi $p < 0.05$ berdasarkan uji *t*-tidak berpasangan. Data menunjukkan perbedaan rerata yang tidak signifikan.

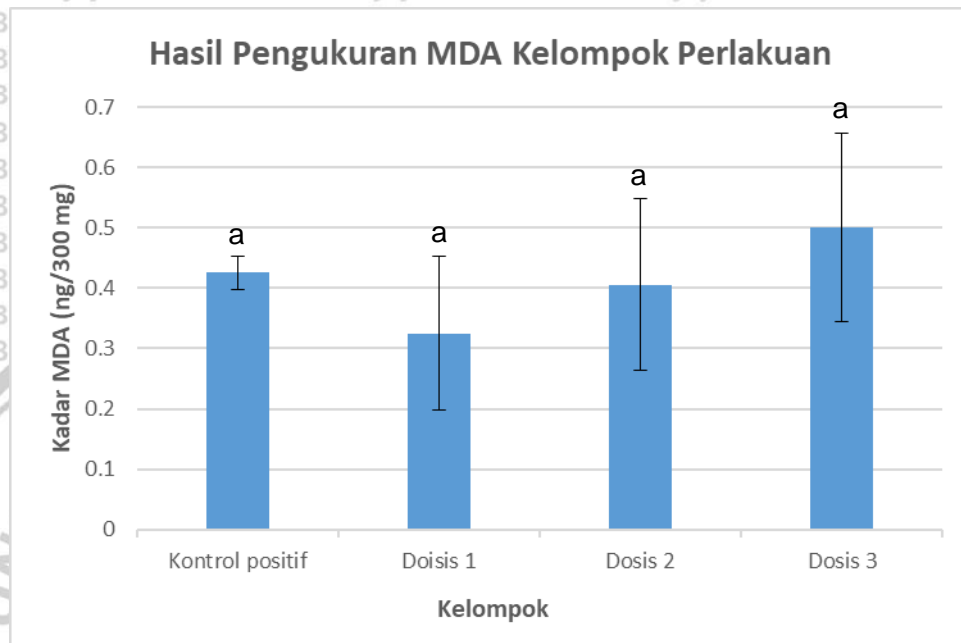
Kontrol negatif: Diinjeksi larutan garam fisiologis 40mg/kgBB i.p

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* pada dosis 500 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB secara peroral dapat menurunkan kadar MDA ginjal tikus bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, namun tidak signifikan ($p > 0.05$). Namun, pemberian ekstrak daun

Physalis angulata pada dosis 2500 mg/kgBB meningkatkan kadar MDA ginjal

tikus bila dibandingkan dengan kontrol positif, namun peningkatan ini tidak signifikan ($p > 0.05$).



Gambar 5.5 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Ginjal pada Kelompok Perlakuan

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi $p < 0.05$. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kadar MDA kelompok perlakuan yang satu dengan kelompok yang lain.

Data diuji dengan *Kruskal wallis*

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Dosis 1: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 500 mg/kgBB

Dosis 2: LNAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 1500 mg/kgBB

Dosis 3: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 2500 mg/kgBB

Untuk mencari hubungan antara besar dosis dengan kadar MDA, maka digunakan uji korelasi *Pearson* (untuk variabel numerik-numerik). Syarat dari uji korelasi adalah sebaran data dari salah satu variabel adalah normal dan terdapat linearitas. Telah disebutkan sebelumnya bahwa sebaran data adalah normal.

Sedangkan untuk mengetahui apakah kedua variabel memenuhi asumsi linearitas atau tidak, dilakukan uji linearitas dengan hasil $p > 0.05$ (lampiran 18)

yang artinya kedua variabel memiliki hubungan linear secara signifikan. Oleh

karena syarat uji korelasi terpenuhi, maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa nilai $p = 0.063$ ($p > 0.05$) (Lampiran 19) yang artinya ada hubungan yang tidak signifikan antara besarnya dosis ekstrak daun *Physalis angulata* dengan kadar MDA ginjal. Koefisien korelasi $r = 0.491$ (Lampiran 19) berarti bahwa peningkatan dosis akan diikuti peningkatan kadar MDA dengan kekuatan hubungan sedang. Hasil uji regresi menunjukkan nilai $p = 0.063$ ($p > 0.05$), artinya bahwa peningkatan dosis ekstrak daun *Physalis angulata* tidak menyebabkan peningkatan kadar MDA secara signifikan. Nilai $R^2 = 0.241$ (Lampiran 20b) berarti bahwa pengaruh dosis terhadap kadar MDA ginjal adalah sebesar 24.1%, sedangkan 75.9% kadar MDA dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diteliti.

Untuk mengetahui hubungan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler ginjal dilakukan uji korelasi *Pearson* antar kedua variabel tersebut. Syarat normalitas dan linearitas telah terpenuhi (Lampiran 5, 14, 21). Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan nilai $p = 0.025$ ($p < 0.05$) dan koefisien korelasi $r = 0.575$ (Lampiran 22) yang artinya terdapat hubungan positif sedang yang signifikan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler di korteks ginjal. Hasil uji regresi menunjukkan signifikansi $p = 0.020$ ($p < 0.05$), artinya bahwa ada pengaruh kadar MDA terhadap jumlah vaskuler korteks ginjal. Nilai $R^2 = 0.352$ (Lampiran 23b) berarti bahwa pengaruh dosis terhadap sel ginjal adalah sebesar 35,2%, sedangkan 64.8% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

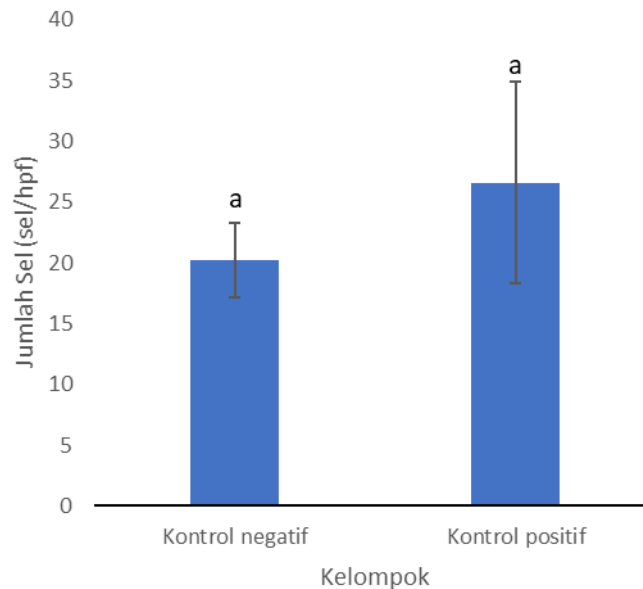
5.3 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Protein p65 NFkB

Pada penelitian ini, ekspresi protein p65 diperiksa dengan teknik imunohistokimia. Sedangkan analisis ekspresi protein p65 dilakukan dengan

mikroskop cahaya Olympus CX22 perbesaran 400x. Pengamatan ekspresi NFkB p65 dilakukan secara double-blind oleh dua pengamat. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada 10 lapang pandang di korteks ginjal yang dipilih secara acak. Penghitungan sel dilakukan dengan perbesaran 400x (Meteoglu *et al.*, 2008). Dihitung jumlah sel glomerulus maupun tubulus yang tercat positif dengan antibodi p65, baik di inti dan atau di sitoplasma (Spandou *et al.*, 2006). Sel yang positif adalah sel berinti dan intinya tercat cokelat, dan sel berinti yang sitoplasmanya tercat coklat (Giani *et al.*, 2011). Nilai akhir dinyatakan sebagai rata-rata jumlah sel yang tercat positif dengan antibodi NFkB p65 per lapang pandang besar (Spandou *et al.*, 2006).

Untuk mengetahui apakah rerata antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tersebut berbeda signifikan atau tidak maka dilakukan uji *t*-tidak berpasangan. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji *t*-tidak berpasangan. Uji normalitas data ekspresi NFkB dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 24). Hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data tidak homogen $p = 0.017$ ($p < 0.05$) (Lampiran 25a) sehingga dilakukan transformasi dengan fungsi akar kuadrat. Setelah ditransformasi, data tetap tidak homogen (Lampiran 25b) dengan $p = 0.021$ ($p < 0.05$) sehingga untuk uji beda dilakukan dengan uji *t*-tidak berpasangan tanpa memperhatikan homogenitas data. Hasil uji *t*-tidak berpasangan menunjukkan nilai $p = 0.164$ ($p > 0.05$) (Lampiran 26), yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Gambar 5.6 menunjukkan bahwa induksi L-NAME

sebesar 40 mg/kgBB secara intraperitoneal selama 15 hari pada kelompok kontrol positif belum dapat meningkatkan ekspresi p65 NFkB secara signifikan.



Gambar 5.6 Rerata Ekspresi p65 NFkB Ginjal pada Kelompok Kontrol.

Keterangan:

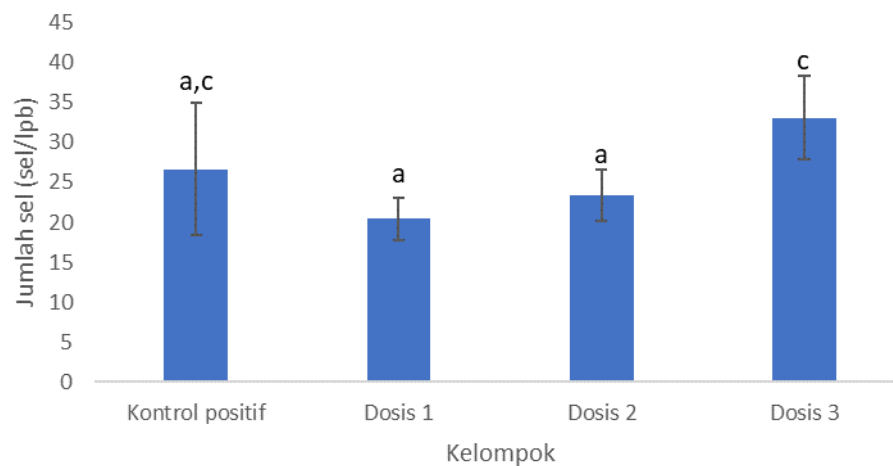
Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi $p < 0.05$ berdasarkan uji t -tidak berpasangan. Data menunjukkan perbedaan rerata yang tidak signifikan.

Kontrol negatif: Diinjeksi larutan garam fisiologis 40mg/kgBB i.p

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Untuk mengetahui apakah rerata sel yang mengekspresikan p65 antar kelompok perlakuan tersebut berbeda signifikan atau tidak maka dilakukan uji komparasi one way ANOVA. Untuk itu perlu dilakukan uji normalitas dan uji varians sebagai syarat uji ANOVA. Uji normalitas data ekspresi p65 NFkB dilakukan dengan metode analitik *Shapiro wilk* (jumlah sampel < 50). Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok data berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 24). Sedangkan hasil uji varians menunjukkan bahwa varians data tidak homogen dengan $p = 0.008$ ($p < 0.05$) (Lampiran 25c) sehingga dilakukan transformasi data dengan fungsi akar kuadrat. Hasil uji varians terhadap data hasil transformasi menunjukkan bahwa varians data tetap tidak homogen ($p < 0.05$) (Lampiran 25d). Dengan demikian untuk uji komparasi

dilakukan uji ANOVA *Welch*. Uji ANOVA *Welch* menunjukkan nilai $p = 0.011$ ($p < 0.05$) (Lampiran 27), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada minimal antara dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda signifikan maka dilakukan uji post Hoc *Games-howell* (Lampiran 28).



Gambar 5.7 Rerata Ekspresi p65 NFkB Ginjal pada Kelompok Perlakuan.

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi $p < 0.05$. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kadar MDA kelompok perlakuan yang satu dengan kelompok yang lain.

Data diuji dengan *Kruskal wallis*.

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Dosis 1: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 500 mg/kgBB

Dosis 2: LNAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 1500 mg/kgBB

Dosis 3: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 2500 mg/kgBB

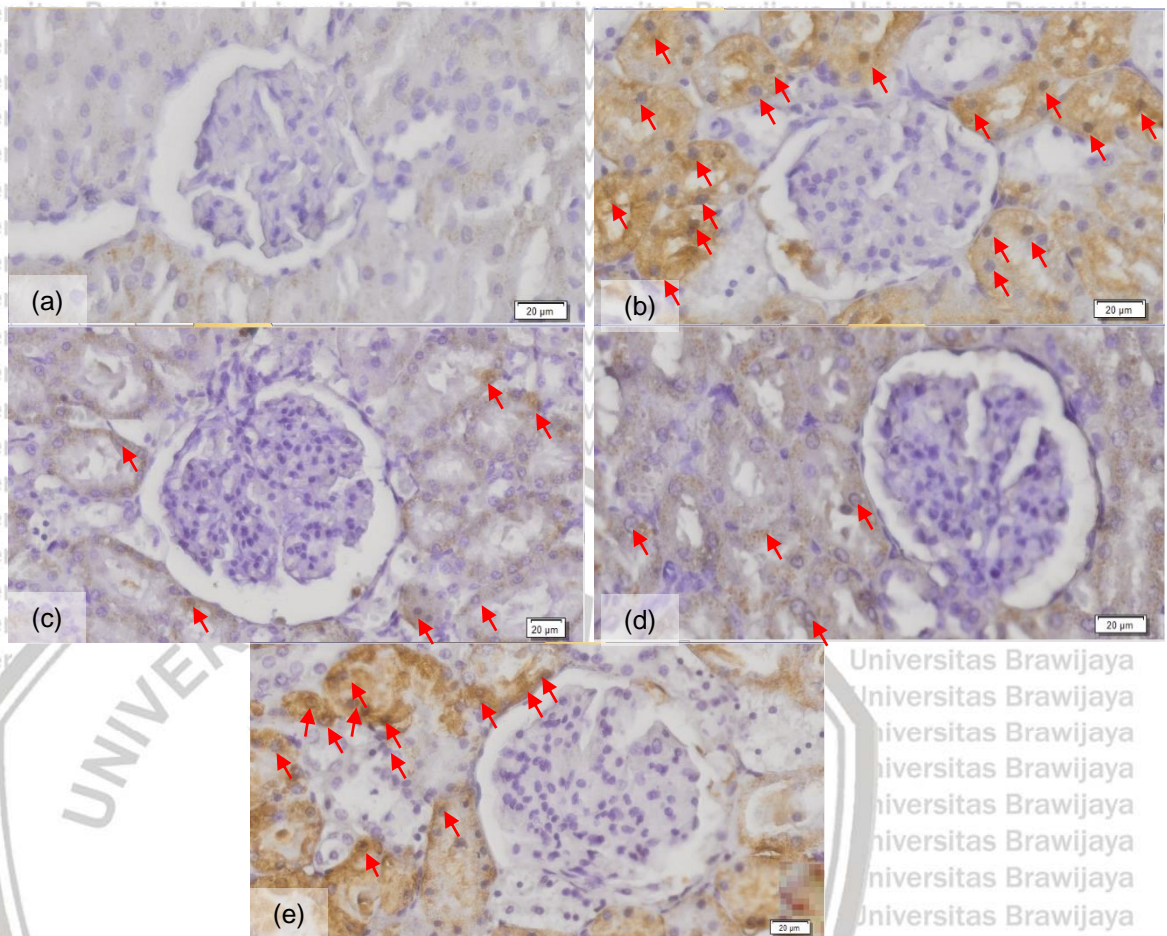
Gambar 5.6 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif, induksi L-NAME sebesar 40 mg/kgBB secara intra-peritoneal selama 15 hari dapat meningkatkan ekspresi p65 NFkB sel ginjal, namun tidak signifikan ($p > 0.05$).

Gambar 5.7 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* sebanyak 500 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB secara peroral dapat menurunkan ekspresi p65 pada ginjal tikus bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, namun penurunan ini tidak signifikan ($p > 0.05$) terhadap kontrol positif.

Pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* dengan dosis yang lebih besar (dosis

2500 mg/kgBB) secara peroral cenderung meningkatkan ekspresi p65 NFkB sel ginjal tikus bila dibandingkan dengan dosis 1, namun peningkatan ini tidak signifikan terhadap kontrol positif dan signifikan terhadap dosis 1 dan dosis 2.

Untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara besar dosis dengan ekspresi NFkB, maka digunakan uji korelasi *Pearson* (untuk variabel numerik-numerik). Syarat dari uji korelasi adalah sebaran data dari salah satu variabel adalah normal dan terdapat linearitas. Telah disebutkan sebelumnya bahwa sebaran data adalah normal. Sedangkan untuk mengetahui apakah kedua variabel memenuhi asumsi linearitas atau tidak dilakukan uji linearitas dengan hasil $p > 0.05$ (lampiran 29) yang artinya kedua variabel memiliki hubungan linear secara signifikan. Oleh karena syarat uji korelasi terpenuhi, maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa signifikansi $p < 0.05$ dan koefisien korelasi $r = 0.808$ (Lampiran 30) yang artinya terdapat hubungan positif kuat yang signifikan antara peningkatan besarnya dosis ekstrak daun *Physalis angulata* dengan ekspresi p65 NFkB. Hubungan positif berarti bahwa peningkatan dosis akan diikuti peningkatan jumlah sel ginjal yang mengekspresikan p65 NFkB. Uji regresi menunjukkan nilai $p = 0.000$ (Lampiran 31b) yang artinya, peningkatan dosis ekstrak daun *Physalis angulata* menyebabkan peningkatan ekspresi NFkB di ginjal tikus. Nilai $R^2 = 0.653$ (Lampiran 31b) berarti bahwa pengaruh dosis terhadap ekspresi p65 sel ginjal adalah sebesar 65.3%, sedangkan 34.7% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.



Gambar 5.8 Hasil immunohistokimia p65 NFkB (a). Kontrol Negatif , (b). Kontrol positif, (c). Dosis 1, (d) Dosis 2, (e). Dosis 3. 400x

Keterangan:

Kontrol negatif: Diinjeksi larutan garam fisiologis 40mg/kgBB i.p

Kontrol positif: Diinjeksi L-NAME 40 mg/kgBB i.p

Dosis 1: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 500 mg/kgBB

Dosis 2: LNAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 1500 mg/kgBB

Dosis 3: L-NAME 40 mg/kgBB i.p + ekstrak air daun ceplukan sebanyak 2500 mg/kgBB

Untuk mengetahui hubungan antara ekspresi p65 NFkB dengan jumlah vaskuler ginjal dilakukan uji korelasi *Pearson* antar kedua variabel tersebut.

Syarat normalitas dan linearitas telah terpenuhi (Lampiran 5, 24, 32). Hasil uji

korelasi *Pearson* menunjukkan nilai $p = 0.025$ ($p < 0.05$) dan koefisien korelasi

$r=0.575$ (Lampiran 33) yang artinya terdapat hubungan positif sedang yang

signifikan antara ekspresi NFkB dengan jumlah vaskuler di korteks ginjal. Hasil

uji regresi menunjukkan signifikansi $p = 0.002$ ($p < 0.05$), artinya bahwa

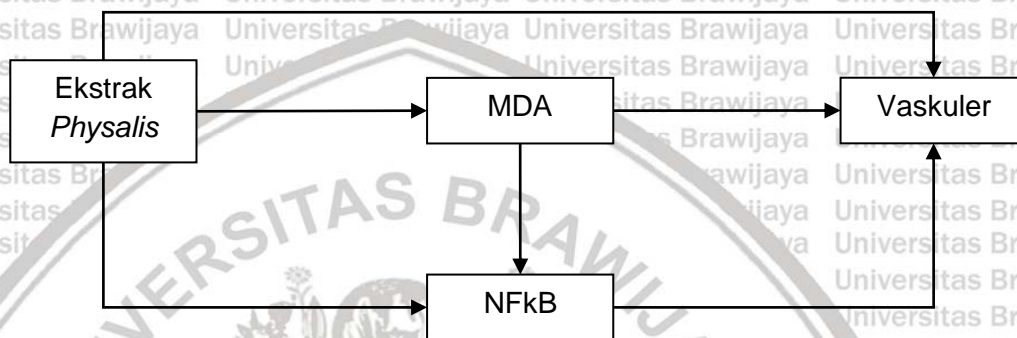
peningkatan ekspresi NFkB menyebabkan penurunan jumlah vaskuler korteks ginjal. Nilai $R^2 = 0.52$ (Lampiran 34b) berarti bahwa pengaruh ekspresi NFkB terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah sebesar 52%, sedangkan 48% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

Untuk mengetahui hubungan antara kadar MDA dengan ekspresi NFkB ginjal dilakukan uji korelasi *Pearson* antar kedua variabel tersebut. Syarat normalitas dan linearitas telah terpenuhi (Lampiran 14, 24, 35). Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan nilai $p = 0.025$ ($p < 0.05$) dan koefisien korelasi $r = 0.575$ (Lampiran 36) yang artinya terdapat hubungan positif sedang yang signifikan antara kadar MDA dengan jumlah vaskuler di korteks ginjal. Hasil uji regresi menunjukkan signifikansi $p = 0.002$ ($p < 0.05$), artinya bahwa peningkatan kadar MDA menyebabkan peningkatan ekspresi NFkB ginjal. Nilai $R^2 = 0.52$ (Lampiran 37b) berarti bahwa pengaruh dosis terhadap sel ginjal adalah sebesar 52%, sedangkan 48% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

5.4 Analisis Jalur

Analisis jalur digunakan untuk menguji pengaruh langsung yang diberikan variabel bebas terhadap variabel terikat dan menguji pengaruh tak langsung yang diberikan variabel bebas melalui variabel intervening terhadap variabel terikat. Analisis jalur digunakan untuk menguji pengaruh antar variabel, yaitu ekstrak daun *Physalis angulata*, kadar MDA, ekspresi NFkB, terhadap jumlah vaskuler. Syarat analisis jalur dengan smartPLS adalah Cronbach's Alpha > 0.7 dan AVE > 0.5 , multikolinearitas (Inner VIF values < 5). Pada penelitian ini, semua syarat tersebut tersebut (Lampiran 38a, 38b). Pengembangan diagram jalur dapat digambarkan sebagai berikut sesuai dengan koefisien diagram jalur

pada Lampiran 38c yang menunjukkan pengaruh langsung masing-masing variabel independen terhadap variabel dependen.



Gambar 5.9 Diagram Analisis Jalur

5.4.1 Pengaruh Langsung

Hasil analisis path dengan *software* smartPLS didapatkan pengaruh langsung untuk masing-masing variabel independen terhadap variabel dependen adalah sebagai berikut:

- Pengaruh langsung pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.510$ ($p > 0.05$), besar pengaruhnya adalah 26.6%, dan bersifat negatif. Artinya, semakin tinggi dosis ekstrak, semakin menurun jumlah vaskuler.
- Pengaruh langsung pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* terhadap kadar MDA ginjal adalah signifikan dengan nilai $p = 0.011$ ($p < 0.05$). Besar koefisien jalur adalah 0.494 artinya besar pengaruh pemberian ekstrak air daun *Physalis angulata* terhadap peningkatan kadar MDA adalah sebesar

49.4%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak daun *Physalis angulata*, semakin meningkat pula kadar MDA ginjal.

- Pengaruh langsung kadar MDA terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.414$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur adalah -0.213 artinya besar pengaruh kadar MDA ginjal terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah sebesar 21.3%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi kadar MDA ginjal, semakin menurunkan jumlah vaskuler ginjal.
- Pengaruh langsung pemberian ekstrak daun *Physalis angulata* terhadap ekspresi NFkB ginjal adalah signifikan dengan $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Besar koefisien jalur adalah 0.691 artinya besar pengaruh pemberian ekstrak air daun *Physalis angulata* terhadap peningkatan ekspresi NFkB adalah sebesar 69.1%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak daun *Physalis angulata*, semakin meningkat pula ekspresi NFkB ginjal.
- Pengaruh langsung kadar MDA ginjal terhadap ekspresi NFkB ginjal adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.202$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur adalah $\beta = 0.236$ artinya besar pengaruh peningkatan kadar MDA terhadap peningkatan ekspresi NFkB adalah sebesar 23.6%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi kadar MDA ginjal, semakin meningkat pula ekspresi NFkB ginjal.
- Pengaruh langsung ekspresi NFkB ginjal terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.291$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur adalah -0.433 artinya besar pengaruh ekspresi NFkB terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah sebesar 43.3%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi ekspresi NFkB ginjal, semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.

5.4.2 Pengaruh Tak Langsung

Sementara itu, pengaruh spesifik dari masing-masing jalur dapat dilihat pada Lampiran 39e dengan penjelasan sebagai berikut:

- Pengaruh pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) melalui stres oksidatif (kadar MDA) adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.289$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur 0.117 artinya, besar pengaruh dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) melalui stres oksidatif (kadar MDA) adalah sebesar 11.7%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin meningkat pula inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal.
- Pengaruh pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui inflamasi (ekspresi NFkB) adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.290$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur -0.299 artinya, besar pengaruh dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui inflamasi (ekspresi NFkB) adalah sebesar 29.9%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.
- Pengaruh pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui stres oksidatif (kadar MDA) kemudian melalui inflamasi (ekspresi NFkB) adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.641$ ($p > 0.05$). Besar koefisien jalur -0.051 artinya, besar pengaruh dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui stres oksidatif (kadar MDA) kemudian melalui inflamasi (ekspresi NFkB) adalah sebesar 5.1%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.

- Pengaruh pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui melalui stres oksidatif (kadar MDA) adalah tidak signifikan dengan nilai $p = 0.511$ ($p > 0.05$). Koefisien jalur -0.105 artinya, besar pengaruh dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler melalui stres oksidatif (kadar MDA) adalah sebesar 10.5%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.

5.4.3 Pengaruh Total

Selain pengaruh direk dan indirek, diketahui bahwa pengaruh total masing-masing variabel independen terhadap variabel dependen adalah sebagai berikut (Lampiran 39f):

- Terdapat pengaruh total yang signifikan ($p = 0.000$) dari pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal. Koefisien jalur 0.808 menunjukkan bahwa besar pengaruh total dari pemberian ekstrak *Physalis angulata* terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal adalah sebesar 80.8%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin meningkat pula inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal.
- Terdapat pengaruh total yang signifikan ($p = 0.000$) dari pemberian dosis ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler ginjal. Koefisien jalur -0.721 menunjukkan bahwa besar pengaruh total dari pemberian ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah sebesar 72.1%. Arah koefisien jalur negatif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.

- Terdapat pengaruh total yang signifikan ($p = 0.011$) dari pemberian ekstrak *Physalis angulata* terhadap stres oksidatif (kadar MDA) ginjal. Koefisien jalur 0.494 menunjukkan bahwa besar pengaruh total dari pemberian ekstrak *Physalis angulata* terhadap stres oksidatif (Kadar MDA) ginjal adalah sebesar 49.4%. Arah koefisien jalur positif artinya, semakin tinggi dosis ekstrak *Physalis angulata* semakin meningkat pula stres oksidatif (kadar MDA) ginjal.
- Terdapat pengaruh total yang tidak signifikan ($p = 0.291$) dari inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal terhadap jumlah vaskuler ginjal. Koefisien jalur -0.433 menunjukkan bahwa besar pengaruh total dari inflamasi (ekspresi NFkB) terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah sebesar 43.3%. Arah koefisien jalur negatif, artinya semakin tinggi inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal, semakin menurun jumlah vaskuler ginjal.
- Terdapat pengaruh total yang tidak signifikan ($p = 0.202$) dari stres oksidatif (kadar MDA) terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal. Koefisien jalur 0.236 menunjukkan bahwa besar pengaruh stres oksidatif (kadar MDA) terhadap inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal 23.6%. Arah koefisien jalur positif, artinya semakin tinggi stres oksidatif akan meningkatkan inflamasi (ekspresi NFkB) ginjal.
- Terdapat pengaruh total yang tidak signifikan ($p = 0.213$) dari stres oksidatif (kadar MDA) terhadap jumlah vaskuler ginjal. Koefisien jalur -0.315 menunjukkan bahwa besar pengaruh stres oksidatif (kadar MDA) terhadap jumlah vaskuler ginjal adalah 31.5%. Arah koefisien jalur negatif, artinya semakin tinggi stres oksidatif (kadar MDA) ginjal akan menurunkan jumlah vaskuler ginjal.

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari ekstrak *Physalis angulata* terhadap jumlah vaskuler ginjal, namun pengaruh ini tidak melalui jalur stres oksidatif (kadar MDA) maupun inflamasi (ekspresi NFkB). Peningkatan dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* akan menurunkan



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Jumlah Vaskuler Ginjal

6.1.1 Pengaruh Induksi L-NAME terhadap Jumlah Vaskuler Ginjal

Ginjal dalam menjalankan fungsinya sangat dipengaruhi oleh integritas endotel vaskuler (Malyszko, 2010). Berbicara tentang endotel, maka tidak bisa lepas dari molekul penting yang mempengaruhi kondisi homeostasisnya, yaitu NO. Kadar fisiologi NO sangat penting untuk memelihara fungsi ginjal yang normal dan homeostatis (Sasser, 2015). Salah satu akibat dari inhibisi sintesis NO di ginjal pada tikus model disfungsi endotel adalah remodelling vaskuler yang memicu fragmentasi mikrovaskuler. Fragmentasi mikrovaskuler ini merupakan fenomena patologis penting pada penyakit ginjal karena menentukan progresifitas penyakit (Chade, 2013). Fragmentasi vaskuler dicirikan oleh penurunan kepadatan / jumlah vaskuler (Olufsen *et al.*, 2012). Pemberian L-NAME pada penelitian ini bertujuan untuk memicu terjadinya fragmentasi vaskuler yang diduga melalui inflamasi dan stres oksidatif akibat menurunnya NO.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian L-NAME secara i.p dengan dosis 40 mg/kgBB/hari selama 15 hari dapat menurunkan jumlah vaskuler di korteks ginjal namun tidak signifikan. Hasil yang tidak signifikan ini dapat disebabkan oleh durasi perlakuan yang kurang lama dan / atau dosis L-NAME yang digunakan kurang besar sehingga inflamasi dan stres oksidatif belum dapat menurunkan VEGF secara signifikan. Penelitian oleh Cipolla *et al.* (2010) menunjukkan bahwa pemberian L-NAME selama 5 minggu dengan dosis

(0.5g/L air minum) menyebabkan hilangnya struktur vaskuler (*rarefaction*) di kapiler otak tikus Sprague-Dawley (Cipolla *et al.*, 2010). Selain itu, dalam literatur disebutkan bahwa VEGF sebagai mediator proangiogenik memiliki sifat bifasik. Pada tahap awal hipoksia, terjadi mekanisme kompensasi berupa aktivasi HIF-1 α dan peningkatan VEGF sehingga neovaskularisasi meningkat. Namun, ketika hipoksia berlangsung kronik, maka VEGF justru akan turun. Hal ini salah satunya dapat disebabkan oleh kerusakan sel akibat hipoksia yang berlangsung lama sehingga tidak mampu memproduksi VEGF lagi (Chade, 2013; Kumar *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini, kemungkinan belum terjadi kerusakan sel yang luas sehingga sel-sel ginjal yang sehat masih dapat mensintesis VEGF. Oleh karena itu belum terjadi penurunan kadar VEGF yang signifikan, sehingga jumlah vaskuler belum menurun secara signifikan. Dengan demikian dibutuhkan durasi perlakuan yang lebih lama.

6.1.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Jumlah Vaskuler Ginjal

Iskemia jaringan merupakan tahapan penting dalam patofisiologi penyakit ginjal kronik. Iskemia ini dapat dipicu salah satunya oleh disfungsi endotel. Iskemia menyebabkan munculnya mekanisme kompensasi, antara lain neovaskularisasi. Neovaskularisasi menjadi indikator penting terjadinya mekanisme perbaikan jaringan (Kumar *et al.*, 2013). Hanya saja saat terjadi disfungsi endotel (penurunan NO), mekanisme kompensasi ini akan terganggu, sehingga dapat terjadi *microvascular remodelling* yang memicu fragmentasi vaskuler (Chade, 2013).

Pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada penelitian ini dimaksudkan untuk mencegah penurunan jumlah vaskuler akibat

pemberian L-NAME. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun ceplukan pada dosis 500 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB dapat meningkatkan jumlah vaskuler di korteks ginjal secara signifikan dibandingkan kontrol positif. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Permatasari *et al.* (2010) yang menyebutkan bahwa ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata L.*) dapat meningkatkan kadar NO. Selanjutnya, Dulak *et al.* (2000) menyebutkan bahwa NO dapat meningkatkan kadar VEGF secara *in vitro*. Diketahui bahwa VEGF merupakan mediator yang berperan penting dalam neovaskularisasi. Sehingga dapat diduga bahwa peningkatan jumlah vaskuler pada pemberian ekstrak air daun ceplukan pada dosis 500 dan 1500 mg/kgBB tersebut disebabkan oleh peningkatan kadar NO yang dapat memicu ekspresi VEGF (Dulak *et al.*, 2000).

6.2 Kadar MDA Ginjal

6.2.1 Pengaruh Induksi L-NAME terhadap Kadar MDA Ginjal

Pemberian L-NAME melalui intravena dan kronik dapat meningkatkan tekanan perfusi ginjal (Xavier *et al.*, 2000). Peningkatan tekanan perfusi ginjal akan meningkatkan produksi ROS vaskuler melalui aktivasi NADPH-oksidade, sementara itu Ang II dapat meningkatkan ROS intrarenal karena memicu disfungsi mitokondria yang berujung pada aktivasi NADPH-oksidade dan pembentukan peroksinitrit (Hamza dan Dyck, 2014). Pemberian L-NAME secara sistemik pada tikus akan meningkatkan resistensi vaskuler ginjal. Peningkatan resistensi vaskuler ginjal ini tidak tergantung pada peningkatan tekanan darah (Sasser, 2015). Peningkatan resistensi vaskuler terjadi akibat hambatan L-NAME terhadap NO (Vite cek *et al.*, 2012) sehingga memicu vasokonstriksi.

Peningkatan resistensi vaskuler ginjal akan memicu iskemia jaringan. Iskemia

memicu pembentukan radikal bebas yang berlebihan sehingga terjadi kondisi stres oksidatif. Radikal bebas dapat mengoksidasi lipid membentuk produk akhir yang bernama malondialdehid (Talas *et al.*, 2014).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Talas *et al.*, dosis L-NAME 40 mg/kgBB i.p yang diberikan selama 15 hari sudah dapat meningkatkan kadar MDA secara signifikan pada berbagai organ seperti otak, paru-paru (Talas *et al.*, 2013), hepar (Talas *et al.*, 2015), testis (Talas, 2014), termasuk jantung dan ginjal (Talas *et al.*, 2014). Namun, pada penelitian ini menunjukkan bahwa metode induksi L-NAME yang diadaptasi dari penelitian Talas *et al.*, (2014) belum dapat meningkatkan kadar MDA ginjal secara signifikan. Namun, pada testis, kadar MDA kelompok kontrol positifnya meningkat secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (Aziz *et al.*, 2017). Hal ini diduga akibat perbedaan metode pemeriksaan MDA dan perbedaan ketahanan hewan coba (tikus wistar) yang digunakan pada penelitian ini dibandingkan dengan penelitian acuan. sehingga pada penelitian ini diperlukan dosis induksi L-NAME yang lebih besar dari 40 mg/kgBB dan / atau durasi induksi yang lebih lama dari 15 hari. Respon individu terhadap stres oksidatif sangat variatif tergantung kemampuan adaptasi individu terhadap stres.

Ginjal merupakan organ yang memiliki mekanisme autoregulasi sebagai bentuk adaptasi apabila terdapat perubahan aliran darah sistemik. Mekanisme autoregulasi berfungsi untuk mempertahankan agar aliran darah ke ginjal (*renal blood flow* / RBF) dan laju filtrasi glomerulus (GFR) tetap konstan walaupun terjadi perubahan pada tekanan perfusi ginjal (*renal perfusion pressure* / RPP).

Mekanisme autoregulasi ini akan tetap intak selama RPP berada dalam rentang tertentu (80-180 mmHg) (Carlström *et al.*, 2015). Mekanisme ini diregulasi oleh

faktor miogenik dan *macula densa-tubuloglomerular feedback* (MD-TGF) yang mempengaruhi tonus vasomotor preglomerular, terutama arteriol aferen. Radikal bebas dan NO merupakan modulator mekanisme miogenik dan MD-TGF. Gangguan pada autoregulasi sering kali menyebabkan kerusakan ginjal pada penyakit ginjal, diabetes, dan hipertensi, namun tidak selalu (Carlström *et al.*, 2015). NO berperan penting dalam mempengaruhi umpan balik tubuloglomerular. nNOS diekspresikan oleh makula densa. NO dilepaskan saat terjadi aktivasi umpan balik tubuloglomerular yang berlebihan. Inhibisi sintesis NO oleh L-NAME akan meningkatkan respon tubuloglomerular (Burke *et al.*, 2014). Namun, penelitian oleh Obst *et al.* (2003) menyebutkan bahwa pemberian L-NAME selama 1 minggu dengan dosis 130 mg/kgBB/hari secara peroral belum dapat menurunkan aliran darah ke ginjal dan GFR secara signifikan (Obst *et al.*, 2003), yang mengisyaratkan bahwa mekanisme autoregulasi ginjal masih intact.

Berdasarkan uraian di atas maka dapat diduga bahwa kenaikan perfusi ginjal pada penelitian ini masih berada dalam rentang yang bisa dikompensasi dengan baik oleh mekanisme autoregulasi ginjal sehingga walaupun kadar NO berkurang, aliran darah ginjal tetap konstan dan tidak sampai mengalami hipoksia berat dan stres oksidatif yang signifikan.

Selain itu, keseimbangan efek angiotensin II terhadap reseptor AT1R dan AT2R juga berperan penting dalam menimbulkan stres oksidatif di ginjal akibat induksi L-NAME. Stimulasi angiotensin II terhadap reseptor AT1R bersifat prooksidan, namun hal ini dikompensasi oleh stimulasi reseptor AT2R bersifat anti-oksidan (Chabrashvili *et al.*, 2003). Telah disebutkan sebelumnya bahwa stimulasi AT2R dapat meningkatkan kadar NO (Matavelli *et al.*, 2011).

Sehingga pada penelitian ini dapat diduga bahwa penurunan kadar NO akibat

induksi L-NAME masih dapat dikompensasi oleh stimulasi AT2R sehingga tidak menimbulkan stres oksidatif yang berlebihan. Oleh karena itu, peningkatan kadar MDA sebagai indikator stres oksidatif pada kelompok L-NAME tidak signifikan jika dibanding kelompok kontrol.

Penelitian lain menunjukkan bahwa pemberian L-NAME baru akan menyebabkan penurunan aliran darah ke medula ginjal sebesar 30% bila diberikan secara kronik. Dalam hal kinerja tubulus, pemberian inhibitor NOS intrarenal menyebabkan penurunan transport natrium di tubulus Henle (Hamza dan Dyck, 2014). Inhibisi NOS oleh L-NAME (50 mg/kg/hari p.o.) secara kronik (12 minggu) dapat menyebabkan kerusakan ginjal yang progresif dan hipertensi sistemik. Kerusakan ginjal yang dimaksud berupa proteinuria, peningkatan kreatinin serum, glomerulosklerosis, fibrosis interstitial, dan infiltrasi makrofag. Aktivasi lokal sistem renin-angiotensin-aldosteron di korteks ginjal merupakan proses utama yang menyebabkan infiltrasi makrofag (Ikeda *et al.*, 2009).

Terdapat berbagai metode untuk menginduksi tikus Wistar dengan L-NAME agar terjadi stres oksidatif dan peningkatan kadar MDA ginjal. Sebuah penelitian menggunakan L-NAME dengan dosis 40 mg/kgBB yang diberikan selama 28 hari secara peroral untuk mendapatkan peningkatan kadar MDA ginjal secara signifikan (Valentine *et al.*, 2016). Penelitian oleh Abd-Eldayem *et al.* (2016) menggunakan L-NAME dengan dosis 10 mg/kgBB i.p selama 12 minggu untuk mendapatkan peningkatan kadar MDA ginjal secara signifikan pada tikus Wistar jantan. Sedangkan penelitian lain menyebutkan bahwa peningkatan kadar MDA ginjal secara signifikan terjadi pada tikus Wistar yang diinduksi L-NAME dengan dosis 60 mg/kgBB secara peroral selama 6 minggu (Khattab *et al.*, 2004). Absorpsi L-NAME yang diberikan secara intraperitoneal dilakukan oleh

vena mesenterika yang selanjutnya menuju ke vena porta. Sehingga farmakokinetik L-NAME pada pemberian intraperitoneal sama dengan pemberian peroral. Keduanya sama-sama mengalami *first-pass effect* melalui liver. Selain itu, pada pemberian intraperitoneal terdapat kemungkinan obat akan merembes melalui diafragma masuk ke duktus limfatikus di thoraks (Turner *et al.*, 2011).

Jika diamati, penelitian-penelitian tersebut di atas melakukan perlakuan minimal 28 hari untuk meningkatkan kadar MDA ginjal secara signifikan. Selain itu, setiap sel, termasuk sel ginjal memiliki kemampuan untuk melindungi diri dari stres oksidatif dengan mensintesis enzim antioksidan. Suatu penelitian menyebutkan bahwa kondisi iskemia ginjal justru meningkatkan kadar enzim-enzim antioksidan ginjal (Singh *et al.*, 1993). Sehingga diduga, pada akhir perlakuan selama 15 hari tersebut, enzim-enzim antioksidan dan efek dari AT2R masih bisa mengkompensasi radikal bebas yang terbentuk akibat induksi L-NAME. Oleh karena itu, kadar MDA pada kelompok L-NAME tidak meningkat secara signifikan. Maka dari itu, untuk penelitian selanjutnya perlu diukur juga variabel yang mewakili antioksidan kemudian dihitung rasio antara penanda antioksidan dengan oksidan.

6.2.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis terhadap Kadar MDA Ginjal

Diketahui bahwa ekstrak air daun ceplukan memiliki efek antioksidan lebih tinggi dari pada ekstrak air buah ceplukan (Kusumaningtyas *et al.*, 2015).

Ekstrak daun ceplukan juga mengandung senyawa aktif yang lebih beragam dibandingkan buah serta batangnya (Angamuthu, 2014). Prosentase terbesar dari berbagai kandungan fitokimia tersebut adalah senyawa flavonoid (Susanti *et al.*, 2015). Dua macam flavonoid yang ditemukan dalam *Physalis angulata* antara

lain 5-Methoxy-6,7-methylenedioxyflavone dan 5,6,7-trimethoxyflavone (Ser, 1988).

Flavonoid dapat mencegah kerusakan jaringan akibat radikal bebas melalui berbagai mekanisme. Pertama, bereaksi dengan molekul radikal bebas secara langsung karena flavonoid memiliki gugus hidroksil dengan reaktivitas tinggi. Berikut adalah persamaan reaksi kimianya:



R adalah radikal bebas dan O• adalah radikal oksigen

Kedua, menghambat xantin oksidase. Xantin oksidase akan bereaksi dengan oksigen membentuk superoksid saat terjadi reoksigenasi. Flavonoid berfungsi menghambat proses ini (Nijveldt *et al.*, 2001).

Penelitian yang dilakukan oleh Permatasari *at al.*, (2010) membuktikan bahwa ekstrak daun *Physalis angulata* yang mengandung bahan aktif fisalin, secara *in vitro* dapat meningkatkan pelepasan NO dari sel endotel. Fisalin merupakan golongan secosteroid. Peningkatan pelepasan NO ini diduga terjadi melalui efek genomik (peningkatan ekspresi eNOS dan iNOS) dan efek non-genomik (peningkatan kalsium sitosolik). Penelitian ini juga didukung oleh penelitian lain oleh Sulistyowati (2015) yang membuktikan bahwa sasaran aksi ekstrak air herba ceplukan (*P. angulata* L) terstandar fisalin pada jalur sintesis NO melalui peningkatan kadar VEGF dan eNOS.

Pemberian ekstrak air daun ceplukan pada kondisi stres oksidatif akibat disfungsi endotel diharapkan dapat menurunkan kadar MDA ginjal melalui peningkatan kadar NO dan scavenger langsung terhadap radikal bebas yang terbentuk. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun ceplukan dengan dosis 500 mg/kgBB pada tikus model disfungsi endotel tidak

dapat mencegah peningkatan kadar MDA ginjal secara signifikan (dibandingkan dengan kontrol positif). Peningkatan dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* L. juga tidak menyebabkan perbedaan yang signifikan pada kadar MDA ginjal walaupun tampak pada grafik bahwa kadar MDA ginjal cenderung naik dengan peningkatan dosis. Hal ini kemungkinan akibat durasi perlakuan yang kurang lama sehingga perbedaan tersebut kurang signifikan, namun polanya sudah nampak, yakni menurun pada dosis 500 mg/kgBB dan justru akan meningkat pada dosis 1500 mg/kgBB dan 2500 mg/kgBB. Sehingga dapat diduga dosis optimal yang memberikan efek antioksidan adalah 500 mg/kgBB, sedangkan dosis 1500 mg/kgBB kemungkinan sudah termasuk dosis toksik. Namun untuk sampai pada kesimpulan ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan durasi perlakuan yang lebih lama.

Pola peningkatan kadar MDA dengan peningkatan pemberian dosis ekstrak *Physalis ini* diduga disebabkan oleh hal-hal berikut:

- a. Efek peningkatan kadar NO yang berlebihan justru menimbulkan kerusakan sel akibat stres oksidatif. Walaupun NO berperan penting dalam memelihara vasodilatasi, kadar NO yang terlalu tinggi (terutama yang dihasilkan oleh iNOS makrofag) dapat menyebabkan kerusakan oksidatif. NO akan bereaksi dengan radikal bebas membentuk peroksinitrit yang sangat destruktif (Nijveldt *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2013). Peningkatan MDA yang terjadi pada dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* 1500 mg/kgBB dan 2500 mg/kgBB diduga akibat peningkatan kadar NO yang berlebihan sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif pada dosis tersebut.
- b. Literatur menyebutkan bahwa antioksidan eksogen dapat berperan sebagai pedang bermata dua, yaitu bersifat antioksidan pada dosis rendah, dan akan

berubah menjadi prooksidan pada dosis tinggi. Vitamin C pada dosis rendah (30 dan 100mg/kg BB) akan bersifat antioksidan, sedangkan pada dosis tinggi (1000 mg/kg BB) bersifat sebagai prooksidan (Rahal *et al.*, 2014). Golongan flavonoid (quercetin dan fisetin) pada dosis rendah (10-25 μ M) bersifat antioksidan dengan cara melindungi sel H4IIE tikus dari kerusakan DNA dan apoptosis akibat H₂O₂, sedangkan pada konsentrasi tinggi (50-250 μ M) bersifat sitotoksik (Bouayed dan Bohn, 2010). Peningkatan MDA yang terjadi pada dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* 1500 mg/kgBB dan 2500 mg/kgBB diduga akibat komponen flavonoid berubah sifatnya menjadi prooksidan pada dosis tersebut.

- c. Berdasarkan literatur juga disebutkan bahwa terdapat kandungan sianida pada daun *Physalis angulata* (Nnamani *et al.*, 2010). Telah diketahui bahwa sianida dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat mengaktifasi NF κ B pada sel neuron (Shou *et al.*, 2000) sehingga menyebabkan kematian sel (Prabhakaran *et al.*, 2002). Peningkatan MDA yang terjadi pada dosis ekstrak air daun *Physalis angulata* 1500 mg/kgBB dan 2500 mg/kgBB diduga akibat efek komponen sianida yang lebih dominan pada dosis tersebut dibandingkan efek antioksidannya.

6.3 Ekspresi p65 NF κ B

6.3.1 Induksi L-NAME dan Ekspresi p65 NF κ B

Mekanisme endotel untuk melindungi dirinya sendiri adalah dengan cara melepaskan NO (Perrault *et al.*, 2003). Salah satu fungsi NO dalam memproteksi endotel adalah melalui efek antiinflamasi (Melo *et al.*, 2004). Inflamasi merupakan proses yang mendasari semua mekanisme penyakit, termasuk

penyakit ginjal akibat disfungsi endotel (Libby, 2007). Pada inflamasi terjadi aktivasi leukosit yang akan mengeluarkan sitokin proinflamasi (Kumar *et al.*, 2013). Faktor-faktor transkripsi, salah satunya adalah *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) berperan penting dalam ekspresi mediator proinflamasi tersebut (Chyng *et al.*, 2011). Pechanova *et al.* (2010) menyebutkan bahwa peningkatan aktivitas NF κ B akan meningkatkan ekspresi eNOS sebagai respon terhadap penurunan NO dan peningkatan tekanan darah akibat pemberian L-NAME 40 mg/kg/hari selama 7 minggu.

Pada penelitian ini, pemberian L-NAME sebagai inhibitor sintesis NO dimaksudkan agar terjadi kondisi proinflamasi yang diduga melalui peningkatan ekspresi p65 NF κ B. Digunakan p65 karena p65 terlibat dalam aktivasi NF κ B jalur klasik. Aktivasi NF κ B melalui jalur klasik ini salah satunya dipicu oleh TNF α , IL1, dan IL6, yang sering terjadi saat stres oksidatif seperti pada kondisi penurunan NO (akibat inhibisi oleh L-NAME) (Ruiz-Ortega *et al.*, 2002). NF κ B juga dapat teraktivasi oleh *shear stress* pada kondisi hipertensi (Grumbach *et al.*, 2005).

Peningkatan aktivasi NF κ B p65 paralel dengan peningkatan ekspresi p65 (Liu *et al.*, 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa induksi L-NAME sebesar 40 mg/kgBB i.p selama 15 hari dapat meningkatkan ekspresi NF κ B p65 namun peningkatan ini tidak signifikan. Hal tersebut dapat disebabkan oleh berbagai hal, antara lain sebagai berikut:

Pertama, diduga bahwa durasi perlakuan pada penelitian ini kurang lama jika dibandingkan dengan penelitian lain oleh Pechanova *et al.* (2010) yang melakukan pemberian L-NAME 40 mg/kgBB/hari selama 7 minggu sehingga terjadi peningkatan ekspresi NF κ B p65 di ginjal, jantung, dan aorta tikus wistar.

Proteinuri dan perubahan histologi ginjal akan terjadi setelah pemberian L-NAME selama 8 minggu dengan dosis 1 g/L (Tsuchiya *et al.*, 2010). Pemberian L-NAME secara intraperitoneal dengan dosis 10 mg/kgBB akan menyebabkan kerusakan ginjal bila diberikan selama 8 minggu (Peeri *et al.*, 2010). Kerusakan ginjal tersebut ditandai oleh peningkatan MDA (Peeri *et al.*, 2010; Moosavi *et al.*, 2015) dan peningkatan mediator inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α (Moosavi *et al.*, 2015). Gonzalez *et al.* (2000) menunjukkan bahwa diperlukan dosis L-NAME sebesar 50 mg/kg/ml air minum yang diberikan selama 8 minggu untuk dapat meningkatkan ekspresi NFkB p65 secara signifikan pada aorta tikus wistar jantan. Untuk meningkatkan ekspresi NFkB di jantung tikus wistar, diperlukan dosis L-NAME sebesar 40 mg/kgBB/hari yang diberikan selama 7 minggu (Vrankova *et al.*, 2010). Jika melihat penelitian-penelitian tersebut, sebagian besar durasi induksi L-NAME adalah selama 7-8 minggu baru menyebabkan kerusakan ginjal yang signifikan. Sehingga dapat diduga bahwa induksi L-NAME yang dilakukan kurang dari waktu tersebut belum dapat merusak ginjal secara signifikan karena ginjal masih dapat mengkompensasi melalui mekanisme yang akan dijelaskan kemudian.

Kedua, bahwa fungsi ginjal tidak hanya dipengaruhi oleh NO. Ginjal merupakan organ yang fungsinya juga dipengaruhi oleh angiotensin II (Peluso *et al.*, 2017). Angiotensin II merupakan efektor utama dari sistem renin-angiotensin (Chow dan Allen, 2016). Inflamasi dan aliran darah ginjal juga dipengaruhi oleh angiotensin II. Angiotensin II bekerja melalui dua reseptor utama, yaitu reseptor Angiotensin-II tipe 1 (AT1R) dan tipe 2 (AT2R) (Sohn *et al.*, 2000). Diketahui bahwa L-NAME dapat meningkatkan sensitifitas reseptor Angiotensin II Tipe 1 (AT1R) (Figueroa-Guillén *et al.*, 2009). AT1R memperantarai efek pro-inflamasi,

prooksidan, dan aterosklerosis (Sohn *et al.*, 2000). Sementara itu, AT2R memiliki efek fisiologis yang berperan sebagai penyeimbang efek dari AT1R. AT2R memicu internalisasi transporter Na-H dan Na/K di tubulus proksimal ginjal sehingga menurunkan reabsorpsi ion dan air serta meningkatkan natriuresis/diuresis (Chow dan Allen, 2016; Matavelli *et al.*, 2011). AT2R di ginjal dapat ditemukan di pembuluh darah, glomerulus, dan tubulus (Matavelli *et al.*, 2011). Stimulasi AT2R akan menurunkan respon inflamasi, melalui inhibisi terhadap JAK/STAT, inhibisi NFkB, dan inhibisi sintesis COX2 (Kaschina *et al.*, 2017). AT2R dapat meningkatkan kadar NO kemungkinan melalui stimulasi langsung terhadap NOS dan melalui jalur bradikinin (Abadir *et al.*, 2011). Stimulasi AT2R juga berperan dalam peningkatan cGMP pada hipertensi renovaskuler (Matavelli *et al.*, 2011). Sehingga dapat diduga bahwa efek antiinflamasi angiotensin II melalui reseptor AT2R berperan sebagai regulator negatif terhadap ekspresi NFkB p65 agar tidak teraktivasi secara berlebihan.

Ketiga, peran NFkB sebagai faktor transkripsi (bukan produk akhir dari suatu signal transduksi) menyebabkan NFkB diregulasi ketat oleh tubuh. Berbagai protein ditemukan berfungsi sebagai regulator negatif dari aktivasi NFkB (Tabel 2.5). Aktivasi NFkB di sel ginjal memiliki regulator umpan balik negatif, salah satunya adalah nefrin. Nefrin merupakan anggota imunoglobulin yang terletak di lubang diafragma podosit glomerulus. Sesuai dengan letaknya, nefrin berfungsi sebagai regulator umpan balik negatif dari aktivasi NFkB di sel podosit. Mekanisme nefrin dalam menghambat aktivasi NFkB belum sepenuhnya dimengerti. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh inhibisi PKC. Aktivasi NFkB yang tidak terkontrol pada podosit ginjal berkontribusi pada kerusakan ginjal (Hussain *et al.*, 2009). Protein regulator NFkB menyebabkan bentuk kurva

ekspresi NFkB terhadap waktu meningkat di waktu awal stimulasi, lalu menurun setelah terdapat inhibisi dari protein-protein regulator. Jika stimulasi bersifat kronik, maka grafik aktivasi NFkB terhadap waktu akan membentuk gelombang yang berosilasi dan memiliki puncak tidak setinggi stimulus akut (Gambar 2.28) (Renner dan Schmitz, 2009). Oleh karena itu, peningkatan ekspresi NFkB yang tidak signifikan pada kelompok kontrol positif diduga dipengaruhi oleh waktu pemeriksaan sampel yang tidak tepat pada puncak aktivitas NFkB. Sedangkan pemberian L-NAME yang dilakukan secara subakut menyebabkan peningkatan aktivitas NFkB tidak setinggi induksi L-NAME secara akut.

6.3.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Ekspresi p65 NFkB

Penurunan NO pada disfungsi endotel dapat menggeser homeostasis vaskuler ke arah proinflamasi. Dari penelitian yang dilakukan oleh Lestari *et al.* (2016) disebutkan bahwa daun ceplukan memiliki efek antiinflamasi melalui inhibisi terhadap TNF- α . Diketahui bahwa TNF- α dapat memicu aktivasi NFkB jalur klasik sehingga terjadi respon inflamasi. Hal ini diperkuat oleh penelitian Grumbach *et al.* (2005) bahwa NO dapat menghambat aktivasi NFkB secara *in vitro*. Peningkatan aktivasi NFkB salah satunya akan termanifestasi sebagai peningkatan ekspresi p65 yang merupakan salah satu protein penyusun kompleks NFkB (Giani *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, pemberian ekstrak air daun ceplukan yang dilakukan bersamaan dengan induksi L-NAME diharapkan dapat mencegah penurunan kadar NO sehingga mencegah inflamasi yang diduga melalui penurunan ekspresi

NFKB. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun ceplukan dengan dosis 500 mg/ kgBB dan dosis 2500 mg/kgBB pada tikus Wistar jantan model disfungsi endotel dapat menurunkan ekspresi NFKB, namun tidak signifikan. Hasil yang tidak signifikan ini dapat dikarenakan butuh waktu induksi yang lebih lama. Penelitian oleh Gonzalez *et al.*, (2000) menyebutkan bahwa dibutuhkan waktu 8 minggu untuk meningkatkan ekspresi NFKB p65 aorta pada tikus Wistar jantan dengan induksi L-NAME sebesar 50 mg/kgBB peroral.

Fakta menarik yang ditemukan dalam penelitian ini adalah bahwa induksi L-NAME 40 mg/kgBB selama 15 hari tidak meningkatkan ekspresi NFKB di glomerulus ginjal. Hal ini mengisyaratkan peran autoregulasi arteriol aferen- aferen ginjal masih tetap intak untuk melindungi glomerulus dari ischemia dan inflamasi.

6.4 Pengaruh Ekstrak Air Daun *Physalis angulata* Dosis 2500 mg/kgBB terhadap Ketiga Variabel

Dari hasil penelitian tampak bahwa pada dosis ekstrak 2500 mg/kgBB (dosis 3) justru terjadi penurunan jumlah vaskuler ginjal yang signifikan terhadap dosis 500 mg/kgBB (dosis 1), sehingga jumlah vaskuler ginjal pada dosis 3 tidak berbeda dengan kelompok kontrol positif (L-NAME). Penurunan jumlah vaskuler ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya peningkatan kadar NO yang berlebihan pada dosis 2500 mg/kgBB. Kadar NO yang berlebihan dapat memicu stres oksidatif sebagaimana yang dipaparkan dalam subbab 6.2. Stres oksidatif ini akan memicu kerusakan sel, sehingga sel tersebut tidak mampu mensintesis VEGF sebagai sitokin pemicu vaskularisasi (Chade, 2013). Kadar NO eksogen yang berlebihan juga bersifat proapoptosis (Stefanec, 2000), sehingga diduga bahwa peningkatan dosis ekstrak justru menyebabkan endotel mengalami

apoptosis. Hasil ini juga didukung oleh adanya kecenderungan peningkatan kadar MDA pada dosis 3 (walaupun tidak signifikan).

Pada dosis ekstrak ceplukan 2500 mg/kgBB juga terjadi peningkatan ekspresi p65 NFkB yang signifikan bila dibandingkan kontrol positif. Hasil ini menunjukkan bahwa proses inflamasi akan semakin meningkat pada dosis ekstrak 2500 mg/kgBB. Pola ekspresi NFkB p65 yang meningkat seiring meningkatnya dosis ekstrak air daun ceplukan menunjukkan adanya proses inflamasi yang semakin hebat. Sementara itu, kadar MDA ginjal juga meningkat pada dosis ekstrak 2500 mg/kgBB. Peningkatan ekspresi NFkB ginjal ini secara teoritis dapat berhubungan dengan peningkatan kadar MDA ginjal. Berdasarkan kajian teoritis, stres oksidatif yang ditandai oleh peningkatan kadar MDA dapat memicu ekspresi NFkB (Sesti *et al.*, 2012). Stres oksidatif ini sesuai dengan penjelasan pada subbab 6.2 diduga akibat peningkatan kadar NO yang berlebihan pada dosis ekstrak 2500 mg/kgBB sehingga justru menimbulkan stres oksidatif (Nijveldt *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2013). Selain itu, efek sianida yang bersifat sitotoksik pada daun *Physalis angulata* (Nnamani *et al.*, 2010) diduga menjadi lebih prominen pada dosis 2500 mg/kgBB. Efek ini kemungkinan dapat menyebabkan apoptosis sel pembuluh darah sehingga menurunkan jumlah vaskuler pada dosis tersebut.

6.5 Pengaruh Langsung dan Tidak Langsung Kadar MDA dan NFkB terhadap Jumlah Vaskuler Ginjal

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan radikal bebas (yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA) secara langsung maupun tak langsung (melalui peningkatan inflamasi yang diukur dari peningkatan ekspresi p65 NFkB) akan menurunkan jumlah vaskuler. Namun hal ini tidak signifikan. Sehingga

diduga ada keterlibatan *pathway* lain selain stres oksidatif dan inflamasi yang juga berperan pada kerusakan mikrovaskuler ginjal (Zhu dan Lerman, 2017).

Sinyal transduksi di dalam sistem biologi tidak berjalan sendiri secara linier, namun seringkali tumpang tindih, berjalan secara simultan, kompleks, saling mengaktivasi ataupun saling menghambat terhadap sinyal transduksi yang lain (Gilbert, 2000). *Pathway* lain yang kemungkinan ikut terlibat dalam hilangnya struktur mikrovaskuler ginjal adalah fibrosis dan apoptosis sel endotel (Zhu dan Lerman, 2017). Namun demikian, hilangnya struktur vaskuler ginjal yang melalui proses fibrosis akan mengalami fase inflamasi yang melibatkan NFkB terlebih dahulu (Liu, 2011).

Lain halnya dengan apoptosis. Apoptosis dapat terjadi tanpa melalui inflamasi (Elmore, 2011). Berbagai senyawa dan kondisi dapat menyebabkan kondisi proapoptosis dan antiapoptosis. Inhibisi NOS oleh L-NAME dan hipoksia dapat menjadi penyebab apoptosis sel endotel ginjal tikus pada penelitian ini. Hal yang menarik dari tabel tersebut adalah kenyataan bahwa NO dapat menjadi senyawa proapoptosis dan antiapoptosis tergantung sumber (eksogen atau endogen) dan kadarnya. NO endogen dan NO eksogen dengan konsentrasi rendah dapat mencegah apoptosis sel endotel (Stefanec, 2000) dengan menghambat caspase melalui S-nitrosilasi residu sistein (Dimmerler dan Zeiher, 2000). Apoptosis sel endotel akibat penurunan NO oleh L-NAME ini dapat terjadi akibat penurunan VEGF (Abe *et al.*, 2013; Dulak *et al.*, 2000). Mekanisme hilangnya struktur vaskuler ginjal yang terjadi melalui apoptosis tidak melibatkan inflamasi atau ekspresi NFkB p65. Sehingga pada penelitian selanjutnya perlu diamati tentang kadar VEGF dan jumlah apoptosis sel endotel.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan kajian teoritis dan statistik, maka:

1. Hipotesis bahwa pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dapat mencegah penurunan jumlah vaskuler ginjal adalah terbukti. Akan tetapi bahwa pencegahan penurunan jumlah vaskuler ginjal tersebut melalui penurunan stres oksidatif dan inflamasi adalah tidak terbukti.
2. Pemberian ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dosis 2500 mg/kgBB pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME tidak dapat mencegah peningkatan kadar MDA dan ekspresi NFκB pada ginjal.
3. Pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME, ada hubungan antara peningkatan pemberian dosis ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dengan penurunan jumlah vaskuler ginjal dan peningkatan ekspresi NFκB namun tidak ada hubungan antara peningkatan pemberian dosis ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) dengan kadar MDA ginjal.
4. Ada hubungan antara peningkatan kadar MDA dengan penurunan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.).

5. Ada hubungan antara peningkatan ekspresi NFkB dengan penurunan jumlah vaskuler ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.)
6. Ada hubungan antara peningkatan kadar MDA dengan peningkatan ekspresi NFkB ginjal pada tikus wistar jantan model disfungsi endotel yang diinduksi L-NAME dan diberi ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.).
7. Penurunan jumlah vaskuler ginjal pada tikus Wistar jantan akibat induksi L-NAME kemungkinan terjadi melalui mekanisme lain selain stres oksidatif dan inflamasi, yaitu melalui penurunan NO yang diikuti penurunan VEGF atau apoptosis sel endotel.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka saran peneliti untuk penelitian berikutnya adalah:

1. Dilakukan pengembangan metode penelitian untuk mendapatkan model tikus Wistar dengan disfungsi endotel di ginjal.
2. Digunakan *lead compound* dari berbagai kandungan yang ada pada ekstrak air daun ceplukan (*Physalis angulata* L.) kemudian diujikan dengan sampel dan metode yang sama dengan penelitian ini sehingga bisa diketahui senyawa apa yang paling berpengaruh pada penelitian.
3. Dilakukan pengembangan pengembangan penelitian terhadap variabel lain yang belum diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai S., 2010, *Celullar and Molecular Immunology*, 6th Ed., W.B Saunders Company, Philadelphia.
- Abd-Eldayem, A.M., Farghaly, H.S.M., Abdel-Zaher, A.O., 2016. The nephroprotective effects of ginkgo biloba extract (EGb761) against I-NG-nitroarginine methyl ester-induced hypertension in rats: role of oxidative stress and inflammatory markers. *J Curr Med Res Pract* 1:79-85
- Abe H, Ishikawa W, Kushima T, Nishimura T, Mori C, Onuki A, Suzuki T, Ishii Y, Kansaku N, Miyazaki Y, Tanaka K, Morita H, Takizawa T., 2013. Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(5):971-6.
- Aldámiz-Echevarría, L. and Andrade, F. (2012) 'Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), pp. 11288–11311. doi: 10.3390/ijms130911288.
- Angamuthu, J., Ganapathy, M., Evanjelene, V.K., Ayyavuv, N., Padamanabhan, V., 2014. Evaluation of Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Leaf and Fruit Extracts of *Physalis Minima*. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*. 4 (1): 462-465.
- Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B, 2001. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12: 2747–2752
- Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, article ID 360438, 31 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azlan, G.I.J., Marziah, M., 2015. Production of Anti-Cancer Compound, Physalin B from Callus Cultures of *Physalis Minima* (Linn.). *Journal of Advanced Research Design* | Vol. 6, No.1. Pages 21-36. ISSN (online): 2289-7984
- Banothu, V., Adepally, U, Lingam, J., 2017. *In Vitro* Total Phenolics, Flavonoids Contents, *Antioxidant* And Antimicrobial Activites Of Various Solvent Extracts From The Medicinal Plant *Physalis Minima* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(3) 192-198
- Bastos, GNT., Silveira A.J.A.,Salgado, C.G., Picanc, D.L.W., o-Diniz, do Nascimento, J.L.M., 2008. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 118: 246–251
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackensen, C., Ersurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 5:9–19.
- Boden, W. E. et al. (2015) 'Role of short-acting nitroglycerin in the management of ischemic heart disease', *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp. 4793–4805. doi: 10.2147/DDDT.S79116.
- Bouayed J, Bohn T., 2010. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(4): 228-237.
- Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al., 2006. Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of



- high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer, *Diagn Cytopathol.* 34(8):555-63.
- Cai, H., dan Harrison, D.G., 2000. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* (87):840-844
- Cao C, Wang S, Fan L, Wan X, Liu X, Chen X., 2010. Renal protection by ischemic preconditioning is associated with p50/p50 homodimers. *Am J Nephrol.* 31(1):1-8.
- Carlström, M., Wilcox, C.S., and Arendshorst, W.J., 2015. Renal Autoregulation in Health and Disease. *Physiol Rev.* 95(2): 405-511.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2011) 'Molecular Mechanisms and clinical applications of angiogenesis', *Nature*, 473(7347), pp. 298-307. doi: 10.1038/nature10144.Molecular.
- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS., 2003. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285(1):R117-24.
- Chade, A. (2013) 'Renal vascular structure and rarefaction', *Comprehensive Physiology*, 3(2), pp. 817-831. doi: 10.1002/cphy.c120012.Renal.
- Chade, A. R. (2011) 'YOUNG INVESTIGATOR AWARD LECTURE OF THE APS WATER AND ELECTROLYTE HOMEOSTASIS SECTION', 2010 Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis'. doi: 10.1152/ajpregu.00657.2010.
- Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT (July 2000). "Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin". *Journal of Immunology.*
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL: Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38: 606-611, 2001
- Choi, J.H., Kim, K.L., Huh, W., Kim, B., Byun, J., Suh, W., et al., 2004. Decreased Number and Impaired Angiogenic Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Chronic Renal Failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (24):1246-1252.
- Chothani, D.L., Vaghasiya, H.U., 2012. A Phyto-pharmacological Overview on *Physalis minima* Linn. *Indian Journal of Natural Products and Resources* vol. 3(4): 477-482
- Chow, BS., Allen TJ., 2016. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 1;130(15):1307-26. doi: 10.1042/CS20160243.
- Chung, H.Y., Lee, E.K., Choi, Y.J., Kim, J.M., Kim, D.H., Zou, Y., et al, 2011, Molecular Inflammation as an Underlying Mechanism of the Aging Process and Age-related Diseases, *J Dent Res* 90(7), 830-840.
- Cipolla, M.J., Bishop, N., Vinke, R.S., Godfrey, J.A., 2010. PPAR γ Activation Prevents Hypertensive Remodeling of Cerebral Arteries and Improves Vascular Function in Female Rats. *Stroke*; 41(6): 1266-1270. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.576942
- Compendium of Medicinal Plants used in Malaysia, 2002. Herbal Medicine Research Centre, Institute of Kuala Lumpur Vol. 2: 221.
- Costa-hong, V. et al. (2009) 'Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease', *Arq Bras Cardiol*, 92(5), pp. 381-386.

- Cowan, M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Cross JM, Donald AE, Nuttall SL, Deanfield JE, Woolfson RG, Macallister RJ, 2003. Vitamin C improves resistance but not conduit artery endothelial function in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 63: 1433-1442
- Dahlan, M.S., 2017. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan, Edisi 6. Epidemiologi Indonesia: Jakarta
- Damu, A.G., Kuo, P.C., Su, C.R., Kuo, T.H., Chen, T.H., Bastow, K.F., Lee, K.H., Wu, T.S., 2007. Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *J. Nat. Prod.* 70, 1146-1152.
- Davel, A.P., Wenceslau, C.F., Akamine, E.H., Xavier, F.E., Couto, G.K., Oliveira, H.T., and Rossoni, L.V., 2011. Endothelial Dysfunction In Cardiovascular And Endocrine-Metabolic Diseases: An Update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44: 920-932. ISSN 0100-879X
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J., 2007. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* 115:1285-1295.
- Dimmeler, S., Zeiher, A.M., 2000. Endothelial Cell Apoptosis in Angiogenesis and Vessel Regression. *Circ Res.* 87:434-439
- Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL, 2002. PPAR_α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40: 866-871
- Dinakaran, S.K., Saraswathi, N.R., Nalini, V.R., Srisudharson, Bodanapu, V.R., Avasarala, H., Banji, D., Anti-lipid Peroxidation Activity of *Piper trilocum* Roxb. And *Physalis minima* L Extracts, *Pak J Pharm Sci*, 2011, 24(3), 411-413.
- Dinh, Q.H., Drummond, G.R., Sobey, C.G., and Chrissobolis, S., 2014. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *BioMed Research International* Vol: 2014, Article ID 406960, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/406960>
- Dixit, M., Doan, T., Kirschner, R., Dixit, N., 2010. Significant acute kidney injury due to non-steroidal antiinflammatory drugs: Inpatient setting, *Pharmaceuticals*, 3(4), pp. 1279-1285. doi: 10.3390/ph3041279.
- Donato, A.J., Pierce, G.L., Lesniewski, L. A., Seals, D.R., 2009. Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging* Vol.1 No.8
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Review. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-95.
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M, 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly-(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112: 1049-1057, 2003
- Eardley, K.S., Kubal, C., Zehnder, D., Quinkler, M., Lepenies, J., Savage, C.O., et al., 2008. The Role Of Capillary Density, Macrophage Infiltration and Interstitial Scarring In The Pathogenesis of Human Chronic Kidney Disease. *Kidney International* (74) : 495-504
- Efendi M, 1998. Pengaruh Alkaloid Daun Ceplukan (*Physalis minima* L) terhadap Kontraktilitas Sediaan Aorta Terpisah Kelinci dengan Stimulasi Noradrenalin Eksogen. Skripsi S1. Malang: Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

- Eibel B, Rodrigues CG, Giusti II, Nesralla IA, Prates PR, Sant'Anna RT, Nardi NB, Kalil RA. 2011. 'Gene therapy for ischemic heart disease : review of clinical trials', 26(4), pp. 635–646. doi: 10.5935/1678-9741.20110056.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*35(4): 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
- Elton L, Carpentier I, Verhelst K, Staal J, Beyaert R., 2015. The multifaceted role of the E3 ubiquitin ligase HOIL-1: beyond linear ubiquitination. *Immunol Rev.* 266(1):208–21.
- Endemann, D.H., Schiffrin, E.L., 2004. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1983–1992,
- Erceg-Hurn, D.M., Mirosevich, V.M., 2008. Modern Robust Statistical Methods: An Easy Way to Maximize the Accuracy and Power of Your Research. *American Psychological Association* (63) 7:591– 601 DOI: 10.1037/0003-066X.63.7.591
- Escribano-Bail, M A., Buelga, S., 2003. Polyphenol Extraction from Foods. <http://www.globalspec.com/reference/70419/203279/chapter-1-polyphenol-extraction-from-foods>
- Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, et al. 2004. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol JASN.*;15(6):1514–29.
- Fang, L., Chai, H.B., Castillo, J.J., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2003. Cytotoxic constituents of *Brachistus stramonifolius*. *Phytotherapy Research.* 17 (5): 439–578.
- Federer WT, 1967. Experimental design, theory and application. IBH Publishing Company: Oxford.
- Ferreira, JCB., Mocly-Rosen, D., 2012. Nitroglycerin Use in Myocardial Infarction Patients: Risks and Benefits. *Circ J.* 2012; 76(1): 15–21.
- Figueroa-Guillén, E.S., Castro-Moreno, P., Rivera-Jardón, F.F., Gallardo-Ortiz, I.A., Ibarra-Barajas, M., Godínez-Hernández, D., 2009. Angiotensin II pressor response in the L-NAME-induced hypertensive pithed rat: Role of the AT 1 receptor. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 52: 54-56.
- Freire, M.A.M., Guimarães, J.S., Leal, W.G., Pereira, A., 2009. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Frontiers in Neuroscience.* 3 (2): 175-181.
- Ganie, S.A., Haq, E., Hamid, A., Qurishi, Y., Mahmood, Z., Zargar, B.A., Masood, A., Zargar, M.A., 2011. Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11:17
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas P., 2004. Malondialdehyde (MDA) As A Lipid Peroxidation Marker. *Wiad Lek* 57 (9-10): 453-5.
- Gastwirth, J.L., Gel, Y.R., and Miao, W., 2009. The Impact of Levene's Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice. *Statistical Science* (24) 3: 343-360
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Review. Cell Signal.* 2007; 19: 1807-1819
- Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, Emmerich CH, Rieser E, Haas TL, et al., 2011. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature.* 2011;471(7340):591–6.

- Giani, J.F., Muñoz, M.C., Pons, R.A., Cao, R., Toblli, J.E., Turyn, D., and Dominici, F.P., 2011. Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F272-F282
- Gilbert, S.F., 2000. *Developmental Biology* 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Goligorsky MS. 2010. Microvascular rarefaction: The decline and fall of blood vessels. *Organogenesis*. (6): 1-10.
- Goligorsky MS. 2015. Pathogenesis Of Endothelial Cell Dysfunction In Chronic Kidney Disease: A Retrospective and What The Future May Hold'. *Kidney Research and Clinical Practice*. 34(2): 76-82. doi: 10.1016/j.krcp.2015.05.003.
- Gonzalez, W., Fontaine, V., Pueyo, M.E., Laquay, N., Messika-Zeitoun, D., Philippe, M., et al., 2000. Molecular Plasticity of Vascular Wall During NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Induced Hypertension. *Hypertension* 36:103-109
- Govers, R., Rabelink, T.J., 2001. Cellular Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F193-F206
- Granger DN, Senchenkova E., 2010. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences;
- Griendling KK, FitzGerald GA, 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916
- Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., Garcia, GSSC, Rocha, J.B., Pomblum, V.J., Farina, M., 2009. Importance Of The Lipid Peroxidation Biomarkers And Methodological Aspects For Malondialdehyde Quantification. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 169-174.
- Grumbach IM, Chen W, Mertens SA, Harrison DG., 2005. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J Mol Cell Cardiol*. 39(4):595-603.
- Guimaraes, E.T., Lima, M.S., Santos, L.A., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.B., Dos Santos, R.R., Dos Santos, W.L., Soares, M.B., 2009. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 84-87.
- Gupta AK, Shivalinge Gowda KP, Umashankar RN, Nandeesh R, Sreedhar S. 2010. In-vitro Antioxidant Activity of Aqueous Extract of *Physalis minima* Linn. *Research J. Pharmacology and Pharmacodynamics*. 5:332-34.
- Gupta, A., Gowda, S.K.P., Mahesh, C.M., 2010. Antiulcer Effect of Aqueous Extract of *Physalis minima* in Ethanol Induced Acute Gastric Ulcer In Rats, *J Pharm Res* 3(4), 671-674.
- Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P.Y., Hebbel, R.P., 1999. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Experimental Cell Research* 242 (12): 495-504
- Guzik, T. J., Harrison, D.G., 2007. Endothelial NF- κ B As a Mediator of Kidney Damage The Missing Link Between Systemic Vascular and Renal Disease?. *Circ Res*. 101:227-229

- Haase, V.H., 2013. Regulation of Erythropoiesis by Hypoxia-Inducible Factors. *Blood Rev.*; 27(1): 41–53. doi:10.1016/j.blre.2012.12.003.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35: 1147-1150.
- Halliwell B., 2000. The antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-1180.
- Hamza, S.M., Dyck, JRB., 2014. Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Front Physiol.* 2014; 5: 292. doi: 10.3389/fphys.2014.00292
- Harhaj EW, Dixit VM., 2011. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 21(1):22–39.
- Harhaj EW, Dixit VM., 2012. Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol Rev.* 246(1):107–24.
- Harrison, D.G., Bernstein, K., 2017. *Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease 3rd edition*. Elsevier: Philadelphia. p 60-68
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhan, B., and Mehmandar, F.B., 2001. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 1 (1):47-53
- Hayden MS, Ghosh S., 2012. NF-kappaB, The First Quarter-Century: Remarkable Progress And Outstanding Questions. *Genes Dev.* 26 (3):203–34.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T, 2001. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104: 2673–2678
- Henke N, Schmidt-Ullrich R, Dechend R, Park JK, Qadri F, Wellner M, et al., 2007. Vascular endothelial cell-specific NF-kappaB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ Res.* 101(3):268–76.
- Hill, N. R. et al. (2016) 'Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis', pp. 1–18. doi: 10.5061/dryad.3s7rd.Funding.
- Ho, E., Karimi, K., Galougahi, Liu, C., Bhindi, R., Figtree, G.A., 2013. Biological Markers of Oxidative Stress: Applications To Cardiovascular Research And Practice. *Redox Biology* 483–491
- Hollman, P.C.H., 2004. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology.* (42) Supplement, pp. 74–83.
- Houben, A.J.H.M., Martens, R.J.H, Stehouwer, C.D.A., 2017. Assessing Microvascular Function in Humans from a Chronic Disease Perspective. *J Am Soc Nephrol.* ASN.2017020157. doi: 10.1681/ASN.2017020157.
- Hu H, Brittain GC, Chang JH, Puebla-Osorio N, Jin J, Zal A, et al., 2013 OTUD7B controls non-canonical NF-kappaB activation through deubiquitination of TRAF3. *Nature* 494(7437):371–4.
- Hussain S, Romio L, Saleem M, Mathieson P, Serrano M, Moscat J, et al., 2009. Nephron deficiency activates NF-kappaB and promotes glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* JASN. 20(8):1733–43.
- IHME, 2016. *Global Burden of Disease Results*. University of Washington.
- Ikeda H1, Tsuruya K, Toyonaga J, Masutani K, Hayashida H, Hirakata H, Iida M., 2009. Spironolactone suppresses inflammation and prevents L-NAME-induced renal injury in rats. *Kidney Int.* 2009 Jan;75(2):147-55. doi: 10.1038/ki.2008.507. Epub 2008 Oct 15.

- Jacobo-Herrera, N.J., Bremner, P., Marquez, N., Gupta, M.P., Gibbons, S., Muñoz, E., Heinrich, M., 2006. Physalins from *Witheringia solanacea* as modulators of the NF-kappaB cascade. *J. Nat. Prod.* 69, 328–331.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW., 2013. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* 20;382(9888):260-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
- Jin W, Reiley WR, Lee AJ, Wright A, Wu X, Zhang M, et al., 2007. Deubiquitinating enzyme CYLD regulates the peripheral development and naïve phenotype maintenance of B cells. *J Biol Chem.* 282:15884–93.
- Jover, B., Mimran, A., 2001. Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38 Suppl 2:S65-70
- Kallianpur, S. S., Gokarn, R.A., and Rajashekhar, N., 2016. Identity of *Tankāri (Physalis Minima Linn.)* in Ayurvedic Classics: A Literature Review. *Anc Sci Life.* 2016 Jul-Sep; 36(1): 6–11. Doi: 10.4103/0257-7941.195408.
- Kang, D.H., Anderson, S., Kim, Y.G., Mazzalli, M., Suga, S., Jefferson, J.A., et al., 2001. Impaired angiogenesis in the aging kidney: Vascular endothelial growth factor and Thrombospondin-1 in renal disease. *Am J of Kidney Disease* 37 (3): 601–611
- Kao, M. P. C. et al. 2010. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options', *Journal of Human Hypertension.* Nature Publishing Group, 24(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/jhh.2009.70.
- Karpagasundari, C., Kulothungan, S., 2014. Free radical scavenging activity of *Physalis minima Linn.* leaf extract (PMLE). *Journal of Medicinal Plants Studies;* 2(4): 59-64.
- Kaschina, E., Namsolleck, P., Unger, T., 2017. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Research,* Volume 125: 39-47
- Khan, M. A., Khan, H., Khan, S., Mahmood, T., Khan, P.M., Jabar, A., Anti-inflammatory, Analgesic, and Antipyretic Activities of *Physalis minima Linn.*, *J Enzyme Inhibit Med Chem,* 2009, 24, 632-637.
- Khattab, M., Ahmad, M., Al-Shabanah, O.A., Raza, M., 2004. Effects of Losartan on Blood Pressure, Oxidative Stress, and Nitrate/Nitrite Levels in the Nitric Oxide Deficient Hypertensive Rats. *Journal Receptors and Channels* Volume 10, 2004 - Issue 5-6
- Kietadisorn, R., Juni, R.P., and Moens, A.L., 2012. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E481–E495
- Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, Cho CG, Choi JS, Chung HY (2002). Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging, *Mech Ageing Dev,* 12, 1589-1595.
- Kim YK, Lee MS, Son SM, Kim IJ, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD, 2002. Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 522–527
- Kobayashi, N., DeLano, F.A., Schmid-Schoenbein, G.W., 2005. Oxidative Stress Promotes Endothelial Cell Apoptosis and Loss of Microvessels in the Spontaneously Hypertensive Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (25): 2114-2121

Kumar, Abbas, Aster, 2013. *Robbin Basic Pathology* 9th Edition. Elsevier: Philadelphia.

Kumar, S.D., Raju, S.N., Harani, A., Banji, D., Rao, K.N.V., Banji, O., Alpha-glucosidase Inhibitory And Hypoglycemic Activitis of *Physalis minima* Extract, *Phcog J*, 2009, 1(4), 273-278.

Kumar, S., Molitoris, B.A., 2015. Renal Endothelial Injury and Microvascular Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.*; 35(1): 96–107. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.01.010.

Kusumaningtyas, R.W., Lailya, N., Limandha, P., 2015. Potential of Ceplukan (*Physalis angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. *Procedia Chemistry* 14: 367 – 372.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG, 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111: 1201–1209

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H, 2002. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106: 3073–3078

Latifah N, Hidayati AA, Yunas SR, Sulistyorini E., 2014. Ceplukan (*Physalis angulata* L.). https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=193. Didownload pada 27 Juli 2018.

Lestari, B., Permatasari, N., Rohman, M.S., Methanolic Extract of Ceplukan Leaf (*Physalis minima* L.) Attenuates Ventricular Fibrosis through Inhibition of TNF- α in Ovariectomized Rats. *Hindawi Publishing Corporation Advances in Pharmacological Sciences*. Volume 2016, Article ID 2428052, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2428052>

Levey, A. S. and Coresh, J. 2012. *Chronic kidney disease*, The Lancet. Elsevier Ltd, 379(9811), pp. 165–180. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.

Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC., 2004. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem*. 279(25):26243–50.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.

Libby, P., 2007, Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease, *Nutrition Review*, 65(12), 140-146.

Lim, T.K., 2013. *Physalis Angulata*. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer Science+Business Media: *Dordrecht*. DOI 10.1007/978-94-007-5628-1_34

Liu S, Chen ZJ., 2011. Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling. *Cell Res*. 21:6–21

Liu, Y., 2011. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol* 7, 684–696; doi:10.1038/nrneph.2011.149

Liu, Y., Zhou, G., Wang, Z., Guo, X., Xu, Q., Huang, Q., Su, L., 2015. NF- κ B signaling is essential for resistance to heat stress-induced early stage apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Scientific Reports* volume 5, Article number: 13547. doi:10.1038/srep13547

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126. doi: 10.4103/0973-7847.70902

- Lu, J.J., Bao, J.L., Chen, X.P., Huang, M., and Wang, Y.T., 2012. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 485042, 12 pages. doi:10.1155/2012/485042
- M. Pratheeba*, K. Umaa Rani and B. Ramesh, 2014. Original Research Article Hepatoprotective Activity of *Physalis minima* against Paracetamol Induced Hepatic Damage in Rats. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 1(1): 61-69
- Magalhaes, H.I.F., Veras, M.L., Pessoa, O.D.L., Silveira, E.R., Moraes, M.O., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., 2006. Preliminary investigation of structure-activity relationship of cytotoxic physalin. *Lett. Drug Des. Discovery* 3, 625–632.
- Malek, M., Nematbakhsh, M., 2015. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *Journal of Renal Injury Prevention* 4(2): 20-27.
- Malyszko, J. (2010) 'Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 411(19–20), pp. 1412–1420. doi: 10.1016/j.cca.2010.06.019.
- Manggau, M., Alam, G., Mufidah, Bahar, A., & Wahyudin, E., 2010. *Selektivitas Penghambatan COX 1-2 dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Ceplukan (Physalis Angulata Linn.)*. Majalah Obat Tradisional: Fakultas Farmasi UGM, Indonesia.
- Matavelli, L.C., Huang, J., Siragy, H.M., 2011. Angiotensin AT2 Receptor Stimulation Inhibits Early Renal Inflammation in Renovascular Hypertension. *Hypertension* 57(2): 308–313. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164202.
- Melderer, Laurence, 2002. *Molecular Interaction of The Ccdb Poison With Its Bacterial Target, The DNA Gyrase*. *IJMM*, 291, 537 – 544.
- Melo, L.G., Gnechi, M., Pachori, A.S., Kong, D., Wang, K., Liu, X., Pratt, R.E., Dzau, V.J., 2004. Endothelium-Targeted Gene and Cell-Based Therapies for Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1761-1774
- Metoglu, I., Erdogdu, I.H., Meydan, N., Erkus, M., and Barutca, S., 2008. NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 27:53. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-53>
- Mitra, A.K., Gao, L., Zucker, I.H., 2010. Angiotensin II-induced upregulation of AT1 receptor expression: sequential activation of NF-κB and Elk-1 in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299(3): C561–C569.
- Moosavi SJ, Habibian M, Peeri M, Azarbayjani MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Sureda A., 2015. Protective Effect Of Ferula Gummosa Hydroalcoholic Extract Against Nitric Oxide Deficiency-Induced Oxidative Stress And Inflammation In Rats Renal Tissues. *Clin Exp Hypertens.* 37(2):136-41. doi: 10.3109/10641963.2014.913609.
- Moreno, P. R. Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V., 2006. Neovascularization in human atherosclerosis, *Circulation*, 113(18), pp. 2245–2252. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955.
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 2011 Jan; 21(1): 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178.
- Nakajima, H., 2013. Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling. *In Tech.* 459. <http://dx.doi.org/10.5772/3372>

- Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, Van Leeuwen PA, 2003 Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: High plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 22: 23–30
- Nijveldt, R.J., Nood, E.V., Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K.V., and Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418–25.
- Nnamani, C., Ani, O. and Belunwu, G. 2010. Larvicidal Effects of Ethanol Extracts on Leaves and Fruits of *Physalis angulata* L. on The Larvae of Anopheles Mosquitoes from Ebonyi State, Nigeria. *Animal Research International*, 6(3), pp. 1059–1062. doi: 10.4314/ari.v6i3.55984.
- Noori, S., 2012. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Scientific Report* 1:413. doi:10.4172/scientificreports.413
- Nurfitriani, S., Permatasari, N., Ratnawati, R., 2015. Anxiolytic Effect Evaluation of Methanol Extract of Ceplukan Leaves in the Elevated Plus Maze Test through IL-6 Level Changes in Ovariectomized Rat. *The Journal Of Tropical Life Science Open Access* VOL. 5, NO. 1, pp. 08-13
- Obst, M., Gross, V., Janke, J.R., Wellner, M., Schneider, W., Luft, F.C., 2003. Pressure Natriuresis in AT2 Receptor-Deficient Mice with L-NAME Hypertension, *J Am Soc Nephrol* 14: 303–310,
- Oeckinghaus, A. and Ghosh, S., 2009. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000034
- Okwu DE, Josaiah C., 2006. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 357 – 361.
- Olufsen MS, Hill NA, Vaughan GDA, Sainsbury C, Johnson M., 2012. Rarefaction and Blood Pressure in Systemic and Pulmonary Arteries. *J Fluid Mech* 705: 280–305.
- Ooi, K.L., Sifzizul, T., Muhammad, T., Sulaiman, S.F., 2013. Physalin F from *Physalis minima* L. triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3- and c-myc-dependent pathways. *Journal of Ethnopharmacology*. 150 (1): 382-388.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 315-424.
- Panzer U, Steinmetz OM, Turner JE, Meyer-Schwesinger C, von Ruffer C, Meyer TN, et al. Resolution of renal inflammation: a new role for NF- κ B1 (p50) in inflammatory kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(2):F429–39
- Patel, T., Shah, K., Jiwan, K., and Shrivastava, N., Study on The Antibacterial Antibacterial Potential of *Physalis minima* Linn, *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73(1), 111-115.
- Pechanova, O; Barta, A; Vrankova, S., 2010. The Role Of Nuclear Factor Kappa B In L-Name-Induced Hypertension. *Journal of Hypertension: Volume 28 - Issue - p e491–e492*. doi: 10.1097/01.hjh.0000379677.86954.78
- Peeri M1, Habibian M, Azarbayjani MA, Hedayati M., 2013. Protective effect of aerobic exercise against L-NAME-induced kidney damage in rats. *Arh Hig Rada Toksikol*. 64(2):43-9. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2260.
- Peluso AA, Santos RA, Unger T, Steckelings UM., 2017. The angiotensin type 2 receptor and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 26(1):36-42.
- Perkins ND, 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8 (1): 49–62.



- Permatasari, N., Nurdiana, Karyono, S., Efek Non Genomik Dan Genomik Ekstrak Daun Ceplukan (*Physalis Minima* L) Pada Kultur Sel Endotel Manusia (HUVECs). *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Sciences)* Vol 22, p 14-19, Desember 2010.
- Perrault LP, Malo O, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM., 2003. Inhibiting the NO pathway with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 22(4):439-51.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health *Int J Biomed Sci* ; 4 (2): 89-96
- Pinto NB, Morais TC, Carvalho KM, Silva CR, Andrade GM, Brito GA, Veras ML, Pessoa OD, Rao VS, Santos FA., 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine* 17(10):740–743
- Pinto, L.A., Meira, C.S., Villarreal, C.F., Santos, M.A.V., de Souza, C.V.C., Ribeiro, I.M., et al., 2016. Physalin F, a seco-steroid from *Physalis angulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 79 Pages 129-134
- Podolak, I, Galanty, A., and Sobolewska, D, 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev.* 9(3): 425–474. doi: 10.1007/s11101-010-9183-z
- Polichnowski, J.J., Lu, L., Cowley, A.Jr., 2011. Renal injury in angiotensin II+L-NAME-induced hypertensive rats is independent of elevated blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 300 (4): F1008-16. doi: 10.1152/ajprenal.00354.2010.
- Prabhakaran K, Li L, Borowitz JL, Isom GE., 2002. Cyanide induces different modes of death in cortical and mesencephalon cells. *J Pharmacol Exp Ther*;303(2):510-9.
- Priyantoro, S.T.Y., Sudjari., Karyono, S.S., 2004. Efek Ekstrak Daun Ceplukan (*Physalis minima* L) terhadap Relaksasi Otot Polos Terpisah Trakea Marmut (*Cavia Porcellus*). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XX, No.1.
- Pubchem, 2017. L-NAME. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-name#section=Top>
- Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI (2017) 'Situasi Penyakit Ginjal Kronis', InfoDATIN. Available at: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjmltCm4r_VAhXHkZQKHVn_CpQQFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.depkes.go.id%2Fdownload.php%3Ffile%3Ddownload%2Fpusdatin%2Finfodatin%2Finfodatin%2520ginjal%25202017.pdf&usq=A.
- Pusdatin Kemenkes RI, 2014. Hipertensi www.pusdatin.kemkes.go.id/pdf.php?id.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, Article ID 761264, 19 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, et al., 2009 Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell.* 136(6):1098–109.

- Rahman, I., Marwick, J., & Kirkham, P., 2004, Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression, *Biochem. Pharmacol.* 68, 1255–1267.
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I., 2013. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci* 9(10):1057-1069. doi:10.7150/ijbs.7502. Available from <http://www.ijbs.com/v09p1057.htm>
- Razani B, Zarnegar B, Ytterberg AJ, Shiba T, Dempsey PW, Ware CF, et al., 2010. Negative feedback in non-canonical NF- κ B signaling modulates NIK stability through IKK α -mediated phosphorylation. *Sci Sig.* 3(123):ra41.
- Reiley WW, Jin W, Lee AJ, Wright A, Wu X, Tewalt EF, et al. 2007. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med.* 204:1475–85.
- Rengifo-Salgado E, Vargas-Arana G. 2013. *Physalis angulata* L. (Bolsa mullaca): A Review of Its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(5): 431 – 445.
- Renner F, Schmitz ML., 2009. Autoregulatory feedback loops terminating the NF- κ B response. *Trends Biochem Sci.* 2009 Mar;34(3):128-35. doi: 10.1016/j.tibs.2008.12.003.
- Ribatti, D. et al. (2001) 'Postnatal vasculogenesis', 100, pp. 157–163.
- Robinson, Treves, 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (Edisi 6), Prof Dr Kosasih Padmawinata (penterjemah). Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia, Hal 57, 157, 192 dan 208.
- Sahu NP, Banerjee S, Mondal NB, Mandal D., 2008. Review Steroidal saponins. *Fortschr Chem Org Naturst.* 89:45-141.
- Santos, F. M. d, Dias, D.P.M., Silva, C.A.A., Fazan Jr., R., and Salgado, H.C., 2010. Sympathetic activity is not increased in L-NAME hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R89–R95.
- Sanz AB1, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A., 2010. NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 21(8):1254-62. doi: 10.1681/ASN.2010020218. Epub 2010 Jul 22.
- Sasser, J.M., 2015. *Nitric Oxide in the Kidney*. Morgan & Claypool Life Sciences: Mississippi. DOI: 10.4199/C00117ED1V01Y201408ISP056
- Schiffrin EL, Park JB, Pu Q, 2002. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens* 20: 71–78
- Schiffrin EL, Touyz RM, 2003. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol* 42: 911–913
- Schmitt, R., Melk, A., 2017. Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney International* 92, 569–579
- Semenza, G.L., 2007. Vasculogenesis, Angiogenesis, and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry* 102:840–847.
- Sen, Pathak, 1995. Physalin L, a 13,14-seco-16,24 cyclosteroid from *Physalis minima*. *Phytochemistry* 39(5) : 1245-1246.
- Sengupta, 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 4(6): 624–630.

- Ser, N.A., 1988. Flavonoids from *Physalis minima*. *Phytochemistry* 27 (11): 3708-3709.
- Sesti F, Tsitsilonis OE., Kotsinas A., Trougakos IP, 2012. Oxidative Stress-mediated Biomolecular Damage and Inflammation in Tumorigenesis. *in vivo* 26: 395-402
- Shou, Y., Gunarsekar, P.G., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2000. Cyanide-Induced Apoptosis Involves Oxidative-Stress-Activated NF- κ B in Cortical Neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164(2): 196-205
- Silva, M.T.G; Simas, S.M.; Batista, T.G; Cardarelli, P; Tomassini, T.C., 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.100 no.7 <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>
- Simons, M. (2005) 'Angiogenesis: Where do we stand now?', *Circulation*, 111(12), pp. 1556–1566. doi: 10.1161/01.CIR.0000159345.00591.8F.
- Soares, M.B., Bellintani, M.C., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C., Ribeiro dos Santos, R., 2003. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *Eur. J. Pharmacol.* 459, 107–112.
- Spandou, E., Tsouchnikas, I., Karkavelas, G., Dounousi, E., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., *et al.*, 2006. Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. *Nephrol Dial Transplant* (2006) 21: 330–336 doi:10.1093/ndt/gfi177
- Sparg SG, Light ME, van Staden Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 2004 Oct; 94(2-3):219-43.
- Stefanec, T. 2000. Endothelial Apoptosis. *Chest Journal.* 117 (3): 841–854. <https://doi.org/10.1378/chest.117.3.841>
- Suda, O., Tsutsui, M., Morishita, T., Tanimoto, A., Horiuchi, M., Tasaki, H., Huang, P.L., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., Nakashima, Y., 2002. Long-Term Treatment With N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester Causes Arteriosclerotic Coronary Lesions in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *Circulation* 106:1729-1735. DOI: 10.1161/01.CIR.0000029749.16101.44
- Sulistiyowati,y., 2015. Sasaran Aksi Ekstrak Air Herba Ceplukan (*Physalis Angulata* L) Terstandar Fisalin pada Jalur Sintesis Nitric Oxide Tikus Sprague Dawley Diinduksi Nicotinamide Dan Streptozotocin. Disertasi, Universitas Gadjah Mada
- Sun L, Liu J, Cui D, Li J, Yu Y, Ma L, Hu L., 2010. Anti-inflammatory function of Withangulatin A by targeted inhibiting COX-2 expression via MAPK and NF-kappaB pathways. *J Cell Biochem* 109 (3):532–541
- Sun S-C, Ganchi PA, Beraud C, Ballard DW, Greene WC., 1994. Autoregulation of the NF- κ B transactivator Rel A (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:1346–50.
- Sun SC., 2008. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol.* 8:501–11.
- Sun SC., 2010. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation. *Cell Death Differ.* 17:25–34
- Sun SC., 2012. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev.* 246(1):125–40

- Susanti, R.F., Kurnia, K., Vania, A., Reynaldo, I.J., 2015. Total Phenol, Flavanoid and Antioxidant Activity of *Physalis angulata* Leaves Extract by Subcritical Water Extraction. *Modern Applied Science*; Vol. 9, No. 7.
- Suzuki T, Fukuo K, Suhara T, Yasuda O, Sato N, Takemura Y, Tsubakimoto M, Ogihara T, 2003. Eicosapentaenoic acid protects endothelial cells against anoikis through restoration of cFLIP. *Hypertension* 42: 342–348
- Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT, 2002. Part I: Pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: Studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med* 8: 571–580
- Talas, Z. S., 2014. Propolis reduces oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats, *Cell Biochem Funct* 32: 150–154.
- Talas, Z.S., Ozdemir, I., Ciftci, O., Cakir, O., Gulhan, M.F., and Pasaoglu, O.M., 2014. Role of Propolis On Biochemical Parameters In Kidney And Heart Tissues Against L-NAME induced oxidative injury in rats. *Clin Exp Hypertens*, Early Online: 1–5. ISSN: 1064-1963 (print), 1525-6006 (electronic)
- Talas, Z.S., Ozdemir, I., Ciftci, O., Cakir, O., 2013. Propolis Attenuates Oxidative Injury In Brain And Lung of Nitric Oxide Synthase Inhibited Rats. *J Pharm Care* 1(2):45-50.
- Talas, Z.S., Ozdemir, I., Ciftci, O., Gulhan, M.F., Savci, A., 2015. Antioxidant Effect of Ethanolic Extract of Propolis in Liver of L-NAME Treated Rats. *Adv Clin Exp Med*, 24, 2, 227–232 DOI: 10.17219/acem/40461
- Taniyama Y, Griending KK, 2003. Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension* 42: 1075–1081
- Tarannita, C., Permatasari, N., Sudiarto, S., Efek Hambatan Ekstrak Daun Ceplukan (*Physalis Minima* L) terhadap Kontraktilitas Otot Polos Usus Halus Terpisah Marmut dengan Stimulasi Metakolin Eksogen. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXII, No.1, April 2006
- Tepper, O. M., Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. 2005. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow – derived cells, *Blood*:105(3): 1068–1078. doi: 10.1182/blood-2004-03-1051.initiates
- The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (2016) Kidney Disease Statistics for the United States | NIDDK. Available at: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/kidney-disease>.
- Toby Lawrence, 2009. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001651
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL., 2002. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: Regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90: 1205–1213
- Touyz, R.M., 2004. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 37(8).
- Touyz, R.M., Briones, A.M., 2011. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research* (34): 5–14

- Tsuchiya K, Tomita S, Ishizawa K, Abe S, Ikeda Y, Kihira Y, Tamaki T., 2010. Dietary nitrite ameliorates renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric Oxide* 15;22(2):98-103. doi: 10.1016/j.niox.2009.12.002. Epub 2009 Dec 22.
- Turner, P.V., Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M.A., 2011. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 50(5): 600–613.
- Ungvari, Z., Kaley, G., de Cabo, R., Sonntag, W.E., Csiszar, A., 2010. Mechanisms of Vascular Aging: New Perspectives. *Gerontol A Biol Sci Med Sci.*65A(10):1028–1041
- Valentine, T. M., Charles, F.N., Estella, T.A., Mauricette, M.A., Anatole, A.E., Julius, O.E., *et al.*, 2016. Hydroethanolic Extract of *Eriobroma oblongum* (Malvaceae) Stem Bark Prevents Hypertension, Oxidative Stress and Dyslipidemia in L-NAME Induced Hypertension in Wistar Rats, *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, 2(4), p. 43. doi: 10.11648/j.jdmp.20160204.11.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R, 2002. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension* 39: 135–141
- Vaziri, N.D., Iturbe, B. R., 2006. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature Clinical Practice Nephrology* Vol 2 No 10
- Venturella, VS. *Natural Product* in: Gardner H, 2000. *Remington The Science and Practice of Pharmacy 20th edition*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia hal 675-683.
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I, 2002. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 106: 1439–1441
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ, 2002. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106: 913–919
- Verma S, Wang CH, Li SH, et al., 2002. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913–9.
- Verma, S., Buchanan, M.R., Anderson, T.J., 2003. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* 108:2054-2059
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S., 2004. The antioxidants and proantioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 10: 1677-1694.
- Vieira, A.T., Pinho, V., Lepsch, L.B., Scavone, C., Ribeiro, I.M., Tomassini, T., Ribeiro dos-Santos, R., Soares, M.B., Teixeira, M.M., Souza, D.G., 2005. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 146, 244–251.
- Viskupičová, J., Ondrejovič, M., Šturdík, E., 2008. Bioavailability and Metabolism of Flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 47 (4): 151–162

- Viteček, J., Lojek, A., Valacchi, G. and Kubala, L., 2012. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. *Hindawi* Volume 2012, Article ID 318087, 22 pages doi:10.1155/2012/318087
- Vrankova S, Parohova J, Barta A, Janega P, Simko F, Pechanova O., 2010. Effect of nuclear factor kappa B inhibition on L-NAME-induced hypertension and cardiovascular remodelling. *J Hypertens*. 2010 Sep;28 Suppl 1:S45-9. doi: 10.1097/01.hjh.0000388494.58707.0f.
- Wan X, Fan L, Hu B, Yang J, Li X, Chen X, et al., 2011. Small interfering RNA targeting IKKbeta prevents renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300(4):F857–63
- WHO, 2016. Raised Blood Pressure: situation and trends. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/
- Widiyastuti, Y., Fauzi, Sugiarso., S., 2008. Pengaruh Konsentrasi dan Interval Pemberian Pupuk Daun terhadap Pertumbuhan Ceplukan (*Physalis minima* Linn) di Pembibitan. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* Vol: ; No: 1
- Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J.F., Vita, J.A., 2003 The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149–60
- Wikipedia, 2015. Ceplukan. <https://id.wikipedia.org/w/index.php?title=Ceplukan&oldid=8753667> Diakses 07 Januari 2017
- Wolf G1, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F., 2002. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 61(6):1986-95.
- Xavier, F., Magalhães, A.M.F., Gontijo, J.A.R., 2000. Effect Of Inhibition Of Nitric Oxide Synthase On Blood Pressure And Renal Sodium Handling In Renal Denervated Rats. *Braz J Med Biol Res* vol.33 n.3 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000000300014>
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC., 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*. 7:401–9
- Xu, X.M., Guan, Y.Z., Shan, M., Luo, J.G., Kong, L.Y., 2016. Withaphysalin-type withanolides from *Physalis minima*. *Phytochemistry Letters*. 15: 1-6
- Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q., 2000. Corin, A Transmembrane Cardiac Serine Protease, Acts As A Pro-Atrial Natriuretic Peptide-Converting Enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8525–8529. [PubMed: 10880574]
- Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*. 2001; 54: 176-186.
- Yu, B.P., & Chung, H.Y., 2006, Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging, *Mech Ageing Dev*, 127,436-443.
- Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y, 2003. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 108: 472–478
- Zhu, XY., Lerman, L.O., 2017. ROS in Atherosclerotic Renovascular Disease. Springer Science+Business Media New York

LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 114 / EC / KEPK / 03 / 2017

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

- JUDUL** : Pengembangan *Physalis minima* sebagai Obat Herbal Terstandar untuk Hipertensi melalui Target Kerja pada Perbaikan Disfungsi Endotel.
- PENELITI UTAMA** : Dr. drg. Nur Permatasari, MS
- ANGGOTA** : dr. Dian Nugrahenny, M.Biomed
Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes
Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc
Dr. Ciptati, MS., M.Sc
dr. Ayu Munawaroh Aziz
dr. Zahrah Febianti
- UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

21 MAR 2017
Malang,
Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIP. 19460516 197111 1 001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 2. Pernyataan Keaslian Tanaman



Kementerian Pertanian
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERKEBUNAN
BALAI PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT



KEBUN PERCOBAAN MANOKO

Jl. Manoko Kotak Pos 8405 Lembang 40391 Tlp. (022)2786069

Nomor : 04/KL.311/1.4/06/2017
Lampiran :-
Perihal : Keterangan Tanaman Ceplukan

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dedi Suheryadi SP
NIP. : 1962010619986031001
Jabatan : Kepala Kebun

Menyatakan bahwa tanaman yang dikirim ke Manok adalah betul-betul tanaman Ceplukan yang berasal dari Kebun Percobaan Manoko yang bernama latinnya ***Physalis angulata***.

Demikian surat keterangan ini agar yang berkepentingan dapat memahami dan mengetahui untuk dipergunakan sebagaimana mestinya

Lembang, 7 Juni 2017

Kepala Kebun Percobaan
Manoko

Dedi Suheryadi, SP
NIP. 1962010619986031001



Lampiran 3. Surat Determinasi Tumbuhan dari ITB



INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
SEKOLAH ILMU DAN TEKNOLOGI HAYATI

Jalan Ganesha 10 Bandung 40132, Telp: (022) 251 1575, 250 0258, Fax (022) 253 4107
e-mail : sith@itb.ac.id http://www.sith.itb.ac.id

Nomor : 3538/II.CO2.2/PL/2016.
Hal : Determinasi tumbuhan

13 Oktober 2016.

Kepada yth.
Ketua Research Group Physalis
Universitas Brawijaya
Jln. Veteran Malang
Jawa Timur

Memperhatikan surat permintaan Saudara dalam surat No. 024/RG-Phisalis/IX/2016 tanggal 13 September 2016 mengenai determinasi tumbuhan, dengan ini kami sampaikan bahwa setelah dilakukan determinasi oleh staf kami, sampel tumbuhan daun ciplukan yang dibawa oleh Sdr. Dr. drg. Nur Permatasari, MS., adalah :

- | | |
|---------------------|--|
| Divisi | : Magnoliophyta |
| Kelas | : Magnoliopsida (Dicots) |
| Anak kelas | : Asteridae |
| Bangsa | : Solanales |
| Nama suku / familia | : Solanaceae |
| Nama jenis/species | : <i>Physalis angulata</i> L. |
| Sinonim | : |
| Nama umum | : Gooseberry, hogweed, ballon cherry Inggris), ceplukan (Indonesia), cecendetan (Sunda). |
| Buku acuan | : 1. Backer, C.A.& Bakhuizen van den Brink, Jr., R.C.1965.Flora of Java. Volumoe . II. N.V.P. Noordhoff –Groningen, the Netherlands. pp : 468.
2. Ogata, Y. et. al. (Committee Members) 1995. Medicinal Herb Index in Indonesia (Second Edition). PT. Eisai Indonesia. Jakarta. pp : 234.
3. Rahayu, S. S. B. 2001. <i>Physalis</i> L. In : Valkenburgh, J. L C. H. & Bunyapraphatsara, N.(eds.): Plant Resources of South – East Asia No. 12 (2). Medicinal and poisonousplants 2. Backhuys Publishers, Leiden the Netherlands. pp. 423 – 426.
4. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia Press, New York. pp.Xiii - XViii |

Demikian yang kami sampaikan. Atas perhatian dan kerjasama yang diberikan, kami ucapkan terima kasih.



Wakil Dekan Bidang Sumber Daya,

Drs. Irjawati
NIP. 196205071988032001

Tembusan:
Dekan SITH ITB, sebagai laporan.

Lampiran 4. Datasheet Antibodi p65 NFκB

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

NFκB p65 (A): sc-109



The Power to Question

BACKGROUND

Proteins encoded by the v-Rel viral oncogene and its cellular homolog, c-Rel, are members of a family of transcription factors that include the two subunits of the transcription factor NFκB (p50 and p65) and the *Drosophila* maternal morphogen, dorsal. Both proteins specifically bind to DNA sequences that are the same or slight variations of the 10 bp κB sequence in the immunoglobulin κ light chain enhancer. This same sequence is also present in a number of other cellular and viral enhancers. The DNA binding activity of NFκB is activated and rapidly transported from the cytoplasm to the nucleus in cells exposed to mitogens or growth factors. cDNAs encoding precursors for two distinct proteins have been described, designated p105 and p100. The p105 precursor contains p50 at its amino-terminus and a C-terminal region that when expressed as a separate molecule, designated PDI, binds to p50 and regulates its activity.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: RELA (human) mapping to 11q13.1; Rela (mouse) mapping to 19 A.

SOURCE

NFκB p65 (A) is available as either **rabbit (sc-109)** or **goat (sc-109-G)** polyclonal affinity purified antibody raised against a peptide mapping within the **N-terminus of NFκB p65 of human origin**.

PRODUCT

Each vial contains 100 μg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-109 P, (100 μg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as TransCruz reagent for Gel Supershift and ChIP applications, sc-109 X, 200 μg/0.1 ml; and as agarose conjugate for immunoprecipitation, sc-109 AC, 500 μg/0.25 ml agarose in 1 ml.

APPLICATIONS

NFκB p65 (A) is recommended for detection of NFκB p65 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), **immunoprecipitation** (1-2 μg per 100-500 μg of total protein (1 ml of cell lysate)), **immunofluorescence** (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), **immunohistochemistry** (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and **solid phase ELISA** (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

NFκB p65 (A) is also recommended for detection of NFκB p65 in additional species, including equine, canine and bovine.

Suitable for use as control antibody for NFκB p65 siRNA (h): sc-29410, NFκB p65 siRNA (m): sc-29411, NFκB p65 shRNA Plasmid (h): sc-29410-SH, NFκB p65 shRNA Plasmid (m): sc-29411-SH, NFκB p65 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29410-V, NFκB p65 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29411-V.

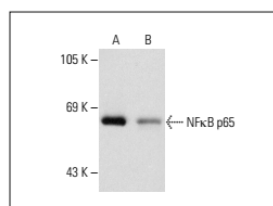
NFκB p65 (A) X TransCruz antibody is recommended for Gel Supershift and ChIP applications.

Molecular Weight of NFκB: 65 kDa.

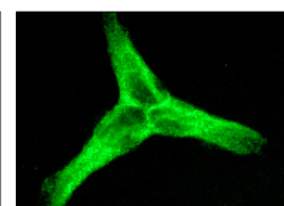
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



NFκB p65 (A): sc-109. Western blot analysis of NFκB p65 expression in HeLa (A) and MIA PaCa-2 (B) whole cell lysates.



NFκB p65 (A)-G: sc-109-G. Immunofluorescence staining of methanol-fixed A-431 cells showing cytoplasmic staining.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Perkins, N.D., et al. 1997. Regulation of NFκB by cyclin dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275: 523-527.
- Yao, L., et al. 2013. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J. Neuroinflammation* 10: 23.
- Plewka, A., et al. 2013. Immunohistochemical localization of selected pro-inflammatory factors in uterine myomas and myometrium in women of various ages. *Folia Histochem. Cytobiol.* 51: 73-83.
- Zara, S., et al. 2013. NF-κB involvement in hyperoxia-induced myocardial damage in newborn rat hearts. *Histochem. Cell Biol.* 140: 575-583.
- Zhang, N.N., et al. 2013. Homeostatic regulatory role of Pokemon in NF-κB signaling: stimulating both p65 and IκBα expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 372: 57-64.
- Carracedo, J., et al. 2013. Cellular senescence determines endothelial cell damage induced by uremia. *Exp. Gerontol.* 48: 766-773.
- Poggi, M., et al. 2013. Palmitoylation of TNF α is involved in the regulation of TNF receptor 1 signalling. *Biochem. Biophys. Acta* 1833: 602-612.
- Huang, K.J., et al. 2013. 5-Epispineuleptolide acetate, a norcembranoid diterpene from the formosan soft coral *Sinularia sp.*, induces leukemia cell apoptosis through Hsp90 inhibition. *Molecules* 18: 2924-2933.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.



Try **NFκB p65 (F-6): sc-8008** or **NFκB p65 (A-12): sc-514451**, our highly recommended monoclonal alternatives to NFκB p65 (A). Also, for AC, HRP, FITC, PE, Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor® 647 conjugates, see **NFκB p65 (F-6): sc-8008**.

Lampiran 5. Uji Normalitas Jumlah Vaskuler

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Kontrol		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah	kontrol negatif	.368	5	.026	.799	5	.079
	kontrol positif	.218	5	.200*	.902	5	.423
	Dosis 500	.222	5	.200*	.908	5	.454
	Dosis 1500	.211	5	.200*	.950	5	.734
	Dosis 2500	.295	5	.177	.905	5	.437

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 6. Uji Homogenitas Jumlah Vaskuler

a. Homogenitas kontrol positif dan negatif

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.272	1	8	.616

b. Homogenitas kelompok perlakuan

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Vaskuler

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.550	3	16	.656

Lampiran 7. Uji t-tidak berpasangan kelompok kontrol positif dan negatif

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Jumlah	Equal variances assumed	.272	.616	.529	8	.611	1.36000	2.56846	-4.56289	7.28289
	Equal variances not assumed			.529	6.854	.613	1.36000	2.56846	-4.73981	7.45981

Lampiran 8. Hasil uji ANOVA kelompok perlakuan

ANOVA

Jumlah Vaskuler

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	224.546	3	74.849	10.316	.001
Within Groups	116.092	16	7.256		
Total	340.638	19			

Lampiran 9. Uji post Hoc *Bonferroni* Kelompok Perlakuan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Vaskuler

Bonferroni

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Dosis 0	Dosis 500	-8.82000*	1.70361	.001	-13.9450	-3.6950
	Dosis 1500	-6.44000*	1.70361	.010	-11.5650	-1.3150
	Dosis 2500	-3.00000	1.70361	.584	-8.1250	2.1250
Dosis 500	Dosis 0	8.82000*	1.70361	.001	3.6950	13.9450
	Dosis 1500	2.38000	1.70361	1.000	-2.7450	7.5050
	Dosis 2500	5.82000*	1.70361	.021	.6950	10.9450
Dosis 1500	Dosis 0	6.44000*	1.70361	.010	1.3150	11.5650
	Dosis 500	-2.38000	1.70361	1.000	-7.5050	2.7450
	Dosis 2500	3.44000	1.70361	.363	-1.6850	8.5650
Dosis 2500	Dosis 0	3.00000	1.70361	.584	-2.1250	8.1250
	Dosis 500	-5.82000*	1.70361	.021	-10.9450	-.6950
	Dosis 1500	-3.44000	1.70361	.363	-8.5650	1.6850

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

Lampiran 10. Uji linearitas Jumlah Vaskuler terhadap Dosis Ekstrak

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Jumlah Vaskuler * Dosis	Between (Combined) Groups	85.617	2	42.809	6.663	.011
	Linearity	84.681	1	84.681	13.180	.003
	Deviation from Linearity	.936	1	.936	.146	.709
Within Groups		77.100	12	6.425		
Total		162.717	14			

Lampiran 11. Uji Korelasi Pearson Jumlah Vaskuler

		Dosis	Jumlah Vaskuler
Dosis	Pearson Correlation	1	-.721**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	15	15
Jumlah Vaskuler	Pearson Correlation	-.721**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 12. Uji Regresi Jumlah Vaskuler

a. Uji heteroskedastisitas

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.091	.850		1.283	.222
	Dosis	.000	.000	.225	.834	.419

a. Dependent Variable: RES2

b. Uji Regresi

Model Summary

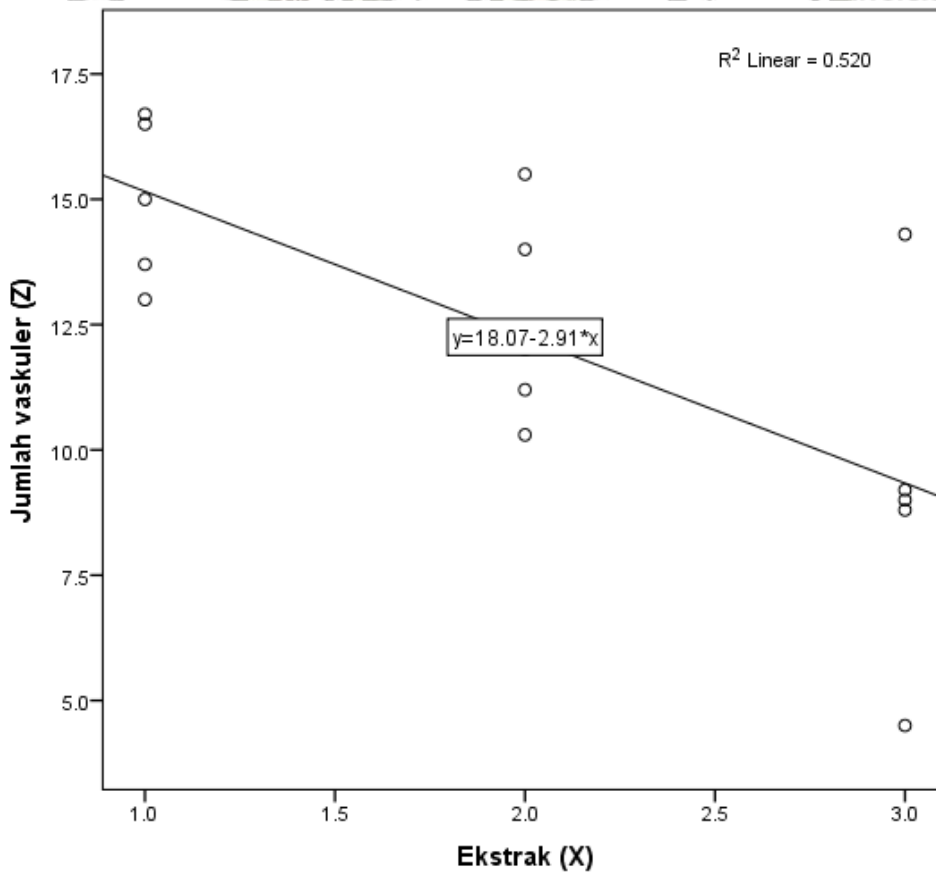
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.721 ^a	.520	.484	2.4501

a. Predictors: (Constant), Ekstrak (X)

Coefficients^a

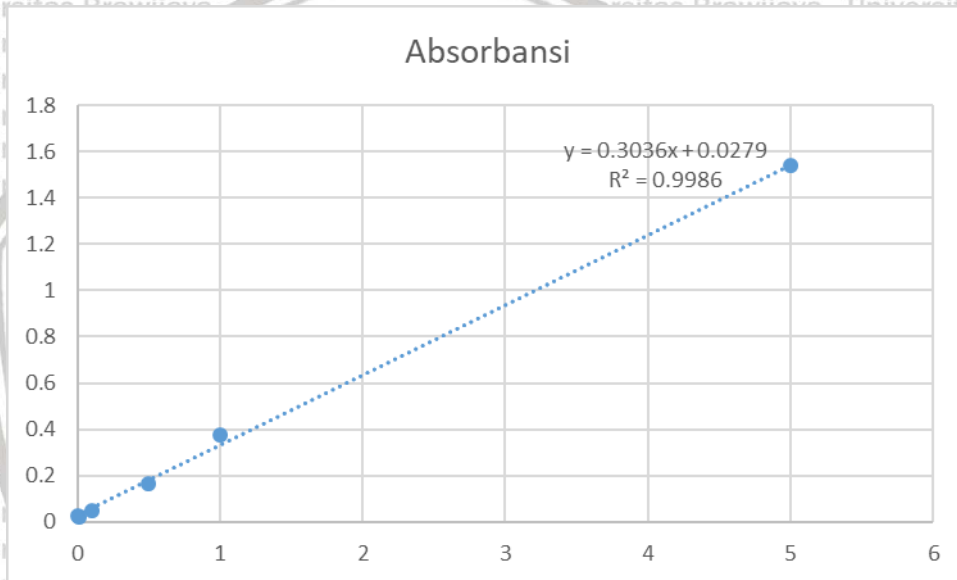
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	18.067	1.674		10.794	.000
	Ekstrak (X)	-2.910	.775	-.721	-3.756	.002

a. Dependent Variable: Jumlah vaskuler (Z)



Lampiran 13. Kurva Standard MDA

Kadar	Absorbansi
0.001	0.024
0.01	0.02
0.1	0.048
0.5	0.167
1	0.377
5	1.538



Lampiran 14. Hasil Uji Normalitas MDA

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar MDA Kontrol negatif	.248	5	.200*	.908	5	.454
Kontrol positif	.132	5	.200*	.993	5	.990
Dosis 500	.184	5	.200*	.983	5	.950
Dosis 1500	.294	5	.183	.852	5	.202
Dosis 2500	.301	5	.157	.840	5	.164

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 15. Uji Homogenitas MDA

a. Uji homogenitas Kadar MDA Kelompok Kontrol (sebelum ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

MDA kontrol

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
23.996	1	8	.001

b. Uji homogenitas Kadar MDA Kelompok Kontrol (setelah ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

TransKontrolMDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
21.675	1	8	.002

c. Uji homogenitas Kadar MDA Kelompok Perlakuan (sebelum ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

MDA perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.523	3	16	.018

d. Uji homogenitas Kadar MDA Kelompok Perlakuan (setelah ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

TransMDAperlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.130	3	16	.024

Lampiran 16. Uji uji t-tidak berpasangan Kadar MDA Kelompok Kontrol

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
TransKontrolMDA	Equal variances assumed	21.675	.002	-.412	8	.691	-.02444	.05929	-.16115	.11227
	Equal variances not assumed			-.412	4.085	.701	-.02444	.05929	-.18770	.13882

Lampiran 17. Uji ANOVA *Welch* Kelompok Perlakuan

Robust Tests of Equality of Means

MDA perlakuan

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1.203	3	7.089	.376

a. Asymptotically F distributed.

Lampiran 18. Uji Linearitas MDA terhadap Dosis Ekstrak

ANOVA Table

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA *	Between	(Combined)	.077	2	.038	1.911	.190
Dosis	Groups	Linearity	.076	1	.076	3.813	.075
		Deviation from Linearity	.000	1	.000	.008	.929
Within Groups			.241	12	.020		
Total			.317	14			

Lampiran 19. Uji Korelasi Pearson Dosis Ekstrak Physalis dan Kadar MDA

Correlations

		Dosis	MDA
Dosis	Pearson Correlation	1	.491
	Sig. (2-tailed)		.063
	N	15	15
MDA	Pearson Correlation	.491	1
	Sig. (2-tailed)	.063	
	N	15	15

Lampiran 20. Uji Regresi Kadar MDA dan Dosis

a. Uji Heteroskedastisitas

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.077	.039		1.972	.070
	Dosis	.018	.018	.268	1.003	.334

a. Dependent Variable: RES_2

b. Uji Regresi MDA

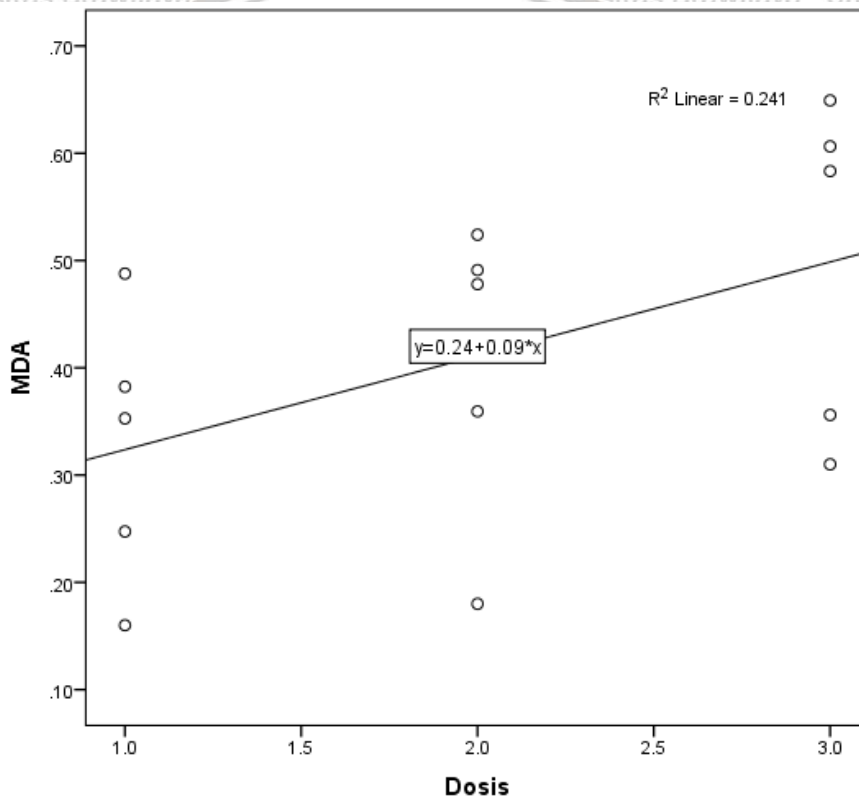
Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.236	.093		2.540	.025
	Dosis	.087	.043	.491	2.032	.063

a. Dependent Variable: MDA

Measures of Association

	R	R Squared	Eta	Eta Squared
MDA * Dosis	.491	.241	.491	.242



Lampiran 21. Uji Linearitas Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: Vaskuler

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	.352	7.054	1	13	.020	17.768	-13.428

The independent variable is MDA.

Lampiran 22. Uji Korelasi Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler

		MDA	NFKB
MDA	Pearson Correlation	1	.575*
	Sig. (2-tailed)		.025
	N	15	15
NFKB	Pearson Correlation	.575*	1
	Sig. (2-tailed)	.025	
	N	15	15

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 23. Uji Regresi Kadar MDA dan Jumlah Vaskuler

a. Uji Heteroskedastisitas

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.816	1.489		1.219	.244
	MDA	.339	3.414	.028	.099	.922

a. Dependent Variable: RES2

b. Uji Regresi

Coefficients^a

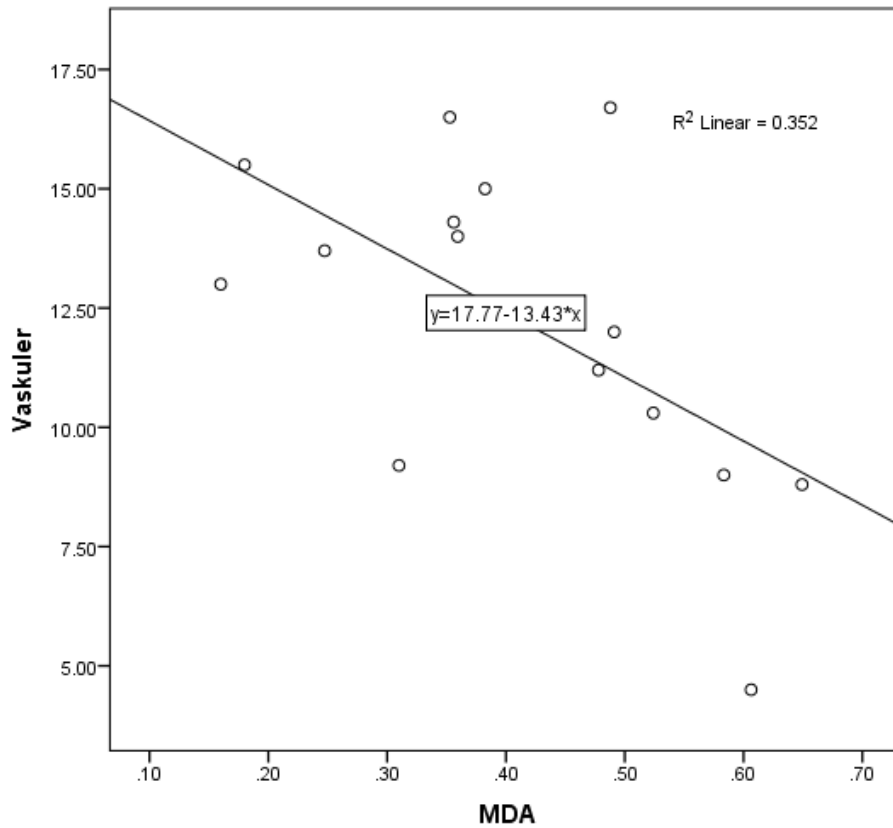
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	17.768	2.205		8.058	.000
	MDA	-13.428	5.056	-.593	-2.656	.020

a. Dependent Variable: Vaskuler

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.593 ^a	.352	.302	2.84850

a. Predictors: (Constant), MDA



Lampiran 24. Uji Normalitas Ekspresi p65 NFkB

Tests of Normality

	Semua kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah	Kontrol negatif	.146	5	.200*	.992	5	.985
	Kontrol positif	.221	5	.200*	.910	5	.466
	Dosis 500	.221	5	.200*	.902	5	.421
	Dosis 1500	.191	5	.200*	.958	5	.794
	Dosis 2500	.302	5	.152	.879	5	.306

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 25. Uji Varians / homogenitas Ekspresi p65 NFkB

a. Uji Homogenitas Kelompok Kontrol Ekspresi p65 NFkB (sebelum ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.926	1	8	.017

b. Uji Homogenitas Kelompok Kontrol Ekspresi p65 NFkB (setelah ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

Tkontrol

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.276	1	8	.021

c. Uji Homogenitas Kelompok Perlakuan Ekspresi p65 NFkB (sebelum ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.530	3	16	.008

d. Uji Homogenitas Kelompok Perlakuan Ekspresi p65 NFkB (setelah ditransformasi)

Test of Homogeneity of Variances

Tperlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.790	3	16	.007

Lampiran 26. Uji *t*-tidak berpasangan antara kelompok kontrol positif dan negatif

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Jumlah Sel	Equal variances assumed	8.926	.017	-1.626	8	.143	-6.4000	3.9370	-15.4787	2.6787
	Equal variances not assumed			-1.626	5.058	.164	-6.4000	3.9370	-16.4854	3.6854

Lampiran 27. Uji *One-way ANOVA* Kelompok Perlakuan Ekspresi p65 NFkB

Robust Tests of Equality of Means

Jumlah

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	7.093	3	8.429	.011

a. Asymptotically F distributed.

Lampiran 28. Uji PostHoc Kelompok Perlakuan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah
Games-Howell

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol positif	Dosis 500	6.20000	3.87556	.457	-8.3476	20.7476
	Dosis 1500	3.20000	3.96485	.849	-11.2353	17.6353
	Dosis 2500	-6.46000	4.36504	.497	-21.0630	8.1430
Dosis 500	Kontrol positif	-6.20000	3.87556	.457	-20.7476	8.3476
	Dosis 1500	-3.00000	1.84932	.421	-8.9797	2.9797
	Dosis 2500	-12.66000*	2.59877	.012	-21.7062	-3.6138
Dosis 1500	Kontrol positif	-3.20000	3.96485	.849	-17.6353	11.2353
	Dosis 500	3.00000	1.84932	.421	-2.9797	8.9797
	Dosis 2500	-9.66000*	2.73013	.040	-18.8187	-5.013
Dosis 2500	Kontrol positif	6.46000	4.36504	.497	-8.1430	21.0630
	Dosis 500	12.66000*	2.59877	.012	3.6138	21.7062
	Dosis 1500	9.66000*	2.73013	.040	.5013	18.8187

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

Lampiran 29. Uji Linearitas Ekspresi NFkB p65 dan Dosis

ANOVA Table

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Jumlah Sel * Dosis	Between Groups	(Combined)	437.652	2	218.826	14.897	.001
		Linearity	400.689	1	400.689	27.278	.000
		Deviation from Linearity	36.963	1	36.963	2.516	.139
Within Groups			176.272	12	14.689		
Total			613.924	14			

Lampiran 30. Uji Korelasi Pearson Ekspresi NFkB p65

Correlations

		Dosis	Jumlah Sel
Dosis	Pearson Correlation	1	.808**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Jumlah Sel	Pearson Correlation	.808**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 31. Uji Regresi Ekspresi NFkB p65

a. Uji Heteroskedisitas

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.608	1.213		1.325	.208
	Dosis	.001	.001	.349	1.343	.202

a. Dependent Variable: RES_2

b. Uji Regresi

Coefficients^a

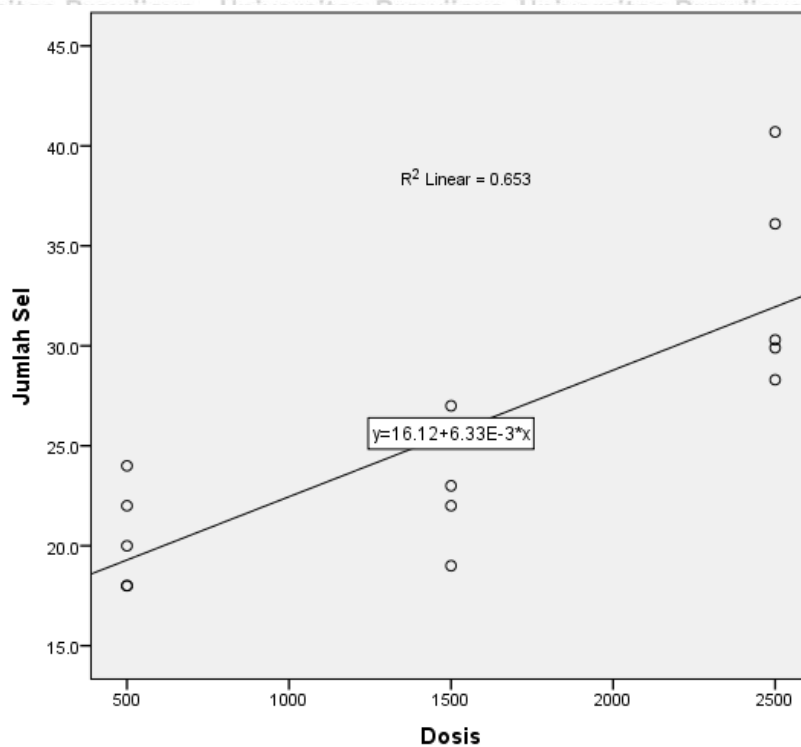
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	16.125	2.187		7.372	.000
	Dosis	.006	.001	.808	4.942	.000

a. Dependent Variable: Jumlah Sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.808 ^a	.653	.626	4.0500

a. Predictors: (Constant), Dosis



Lampiran 32. Uji Linearitas Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: Vaskuler

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	.595	19.089	1	13	.001	22.420	-.397

The independent variable is NFkB.

Lampiran 33. Uji Korelasi Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler

Correlations

		Vaskuler	NFkB
Vaskuler	Pearson Correlation	1	-.771**
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	15	15
NFkB	Pearson Correlation	-.771**	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 34. Uji Regresi Ekspresi NFkB dan Jumlah Vaskuler

a. Uji heteroskedastisitas

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.593	1.105		1.441	.173
	NFkB	.010	.042	.069	.249	.807

a. Dependent Variable: RES2

b. Uji Regresi

Coefficients^a

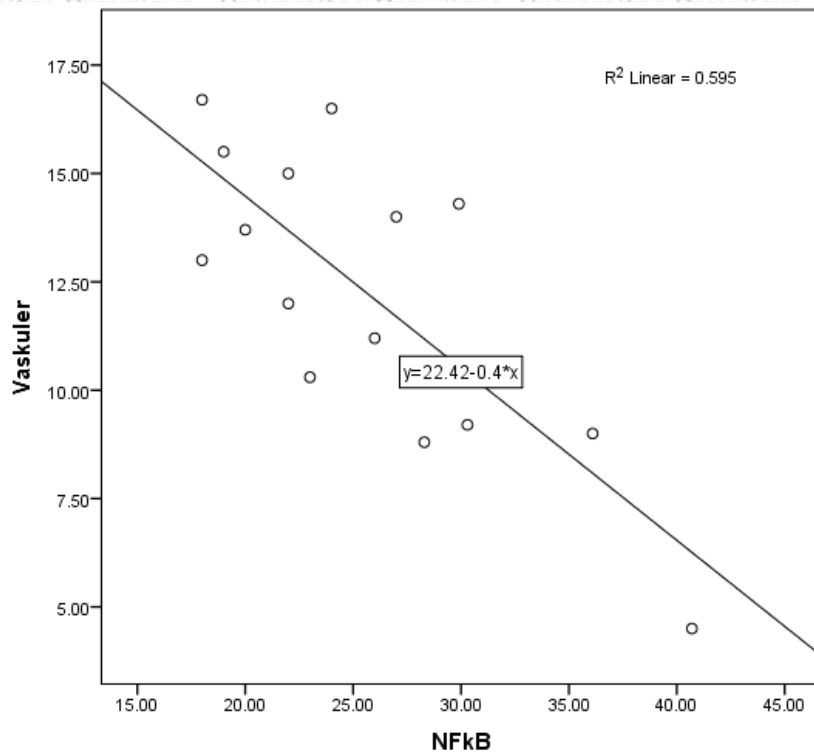
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	22.420	2.400		9.342	.000
	NFkB	-.397	.091	-.771	-4.369	.001

a. Dependent Variable: Vaskuler

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.771 ^a	.595	.564	2.25185

a. Predictors: (Constant), NFkB



Lampiran 35. Uji Linearitas MDA dan Ekspresi NFkB

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: NFkB

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	.330	6.417	1	13	.025	15.225	25.282

The independent variable is MDA.

Lampiran 36. Uji Korelasi MDA dan Ekspresi NFkB

Correlations

		MDA	NFkB
MDA	Pearson Correlation	1	.575*
	Sig. (2-tailed)		.025
	N	15	15
NFkB	Pearson Correlation	.575*	1
	Sig. (2-tailed)	.025	
	N	15	15

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 37. Uji Regresi MDA dan Ekspresi NFkB

a. Uji heteroskedastisitas

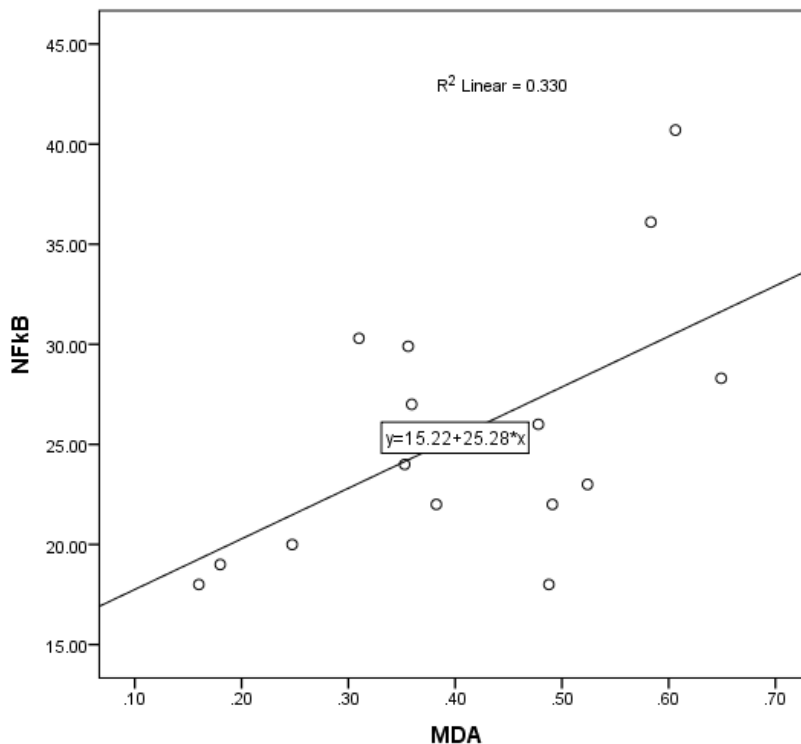
Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-4.737E-16	4.353		.000	1.000
	MDA	.000	9.980	.000	.000	1.000

a. Dependent Variable: Unstandardized Residual

b. Uji regresi

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	15.225	4.353		3.497	.004
	MDA	25.282	9.980	.575	2.533	.025

Dependent Variable: NFkB



Lampiran 38. Analisis Jalur

a. Reliabilitas dan Validitas

Construct Reliability and Validity

Matrix	Cronbach's Alpha	rho_A	Composite Reliability	Average Variance Extract...	Copy
	Cronbach's Alpha	rho_A	Composite Reliability	Average Variance Extracted (AVE)	
Dosis	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Inflamasi	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Jumlah va...	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Stres Oksi...	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

b. Multikolinearitas

Collinearity Statistics (VIF)

	Dosis	Inflamasi	Jumlah v...	Stres Oks...
Dosis		1.324	2.888	1.000
Inflamasi			3.278	
Jumlah va...				
Stres Oksi...		1.324	1.507	

c. Pengaruh direk

Path Coefficients

	Original Sample (O)	Sample ...	Standard ...	T Statistic...	P Values
Dosis -> Inflamasi	0.691	0.705	0.140	4.935	0.000
Dosis -> Jumlah vaskuler	-0.266	-0.328	0.404	0.659	0.510
Dosis -> Stres Oksidatif_	0.494	0.484	0.195	2.538	0.011
Inflamasi -> Jumlah vaskuler	-0.433	-0.344	0.410	1.057	0.291
Stres Oksidatif_ -> Inflamasi	0.236	0.224	0.185	1.276	0.202
Stres Oksidatif_ -> Jumlah vaskuler	-0.213	-0.234	0.269	0.791	0.429

d. Pengaruh tidak langsung total

Total Indirect Effects

	Mean, STDEV, T-Values, P-...		Confidence Intervals		Confidence Intervals Bias ...		Samples	
	Original Sample (O)	Sample ...	Standard ...	T Statistic...	P Values			
Dosis -> Inflamasi	0.117	0.109	0.110	1.062	0.289			
Dosis -> Jumlah vaskuler	-0.455	-0.391	0.349	1.303	0.193			
Dosis -> Stres Oksidatif_								
Inflamasi -> Jumlah vaskuler								
Stres Oksidatif_ -> Inflamasi								
Stres Oksidatif_ -> Jumlah vaskuler	-0.102	-0.104	0.175	0.586	0.558			

e. Pengaruh masing-masing jalur

Specific Indirect Effects

	Mean, STDEV, T-Values, P-...		Confidence Intervals		Confidence Intervals Bias ...		Samples		Copy to Clipboard: E
	Original Sample (O)	Sample ...	Standard ...	T Statistic...	P Values				
Dosis -> Stres Oksidatif_ -> Inflamasi	0.117	0.109	0.110	1.062	0.289				
Dosis -> Inflamasi -> Jumlah vaskuler	-0.299	-0.230	0.283	1.058	0.290				
Dosis -> Stres Oksidatif_ -> Inflamasi -> Jumlah vaskuler	-0.051	-0.053	0.109	0.466	0.641				
Dosis -> Stres Oksidatif_ -> Jumlah vaskuler	-0.105	-0.108	0.160	0.658	0.511				

f. Pengaruh total

Total Effects

	Mean, STDEV, T-Values, P-...		Confidence Intervals		Confidence Intervals Bias ...		Samples		Copy
	Original Sample (O)	Sample ...	Standard ...	T Statistic...	P Values				
Dosis -> Inflamasi	0.808	0.814	0.064	12.679	0.000				
Dosis -> Jumlah vaskuler	-0.721	-0.719	0.138	5.219	0.000				
Dosis -> Stres Oksidatif_	0.494	0.484	0.195	2.538	0.011				
Inflamasi -> Jumlah vaskuler	-0.433	-0.344	0.410	1.057	0.291				
Stres Oksidatif_ -> Inflamasi	0.236	0.224	0.185	1.276	0.202				
Stres Oksidatif_ -> Jumlah vaskuler	-0.315	-0.337	0.253	1.248	0.213				

Lampiran 39. Dokumentasi Penelitian



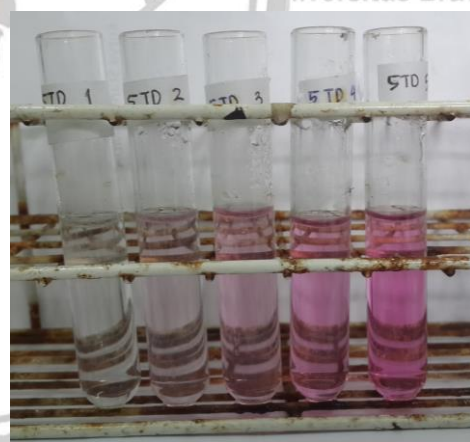
39a. Terminasi Hewan Coba



39b. Ginjal Tikus Wistar



39c. Sentrifugasi Organ Ginjal



39d. Gradasi warna post TBARS assay



39e. Larutan Untuk Rehidrasi Bertingkat saat Proses Pewarnaan HE dan IHK



39d. Water-bath