

**UJI TOKSISITAS KOMBINASI *CURCUMIN* DENGAN VITAMIN E  
TERHADAP EKSPRESI *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS) DAN  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL KELINCI  
(*Oryctolagus cuniculus*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**DIMAS LEVIN YUSTIAN HARSONO**  
**105130101111049**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTER HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### UJI TOKSISITAS KOMBINASI *CURCUMIN* DENGAN VITAMIN E SEBAGAI TERAPI KANKER MAMMAE TERHADAP EKSPRESI *Inducible Nitric Oxide Synthase* (INOS) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)

Oleh :

**DIMAS LEVIN YUSTIAN HARSONO**  
**105130101111049**

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

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Dra. Herawati, MP**  
NIP. 19580127 198503 2 001

**drh. Dyah Ayu Oktavianie, M. Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : DIMAS LEVIN YUSTIAN HARSONO

NIM : 105130101111049

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Uji Toksisitas Kombinasi *Curcumin* Dengan Vitamin E Terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)* Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,  
Yang menyatakan,

**Dimas Levin Yustian Harsono**  
**NIM. 105130101111049**

**Uji Toksisitas Kombinasi *Curcumin* Dengan Vitamin E Terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos)* Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*)**

**ABSTRAK**

Pengembangan dan pemanfaatan obat herbal di Indonesia perlu mendapatkan substansi ilmiah yang lebih kuat, terutama melalui penelitian dan standarisasi sehingga obat herbal Indonesia dapat diintegrasikan dalam sistem pelayanan kesehatan nasional. *Curcumin* dan vitamin E merupakan obat herbal yang dipercaya dapat menghambat pertumbuhan sel kanker karena mengandung antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap ekspresi iNOS dan histopatologi ginjal. Penelitian ini menggunakan 20 ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dan betina berumur 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (P1), kelompok kelinci jantan diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari (P2), kelompok kelinci betina diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari (P3), kelompok kelinci jantan diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P4) dan kelompok kelinci betina diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P5). Kelinci diberi kombinasi *curcumin* dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU secara per oral. Ekspresi iNOS diamati dengan metode imunohistokimia dan pembuatan preparat histopatologi ginjal dengan metode pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari pada kelinci jantan maupun betina dapat meningkatkan ekspresi iNOS sebesar 0,065% dan 0,11%. Sedangkan pemberian kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari pada kelinci jantan maupun betina menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi iNOS sebesar 0,146% dan 0,087%. Gambaran histopatologi menunjukkan tidak terjadi perubahan gambaran histopatologi pada glomerulus dan tubulus organ ginjal kelinci jantan dan kelinci betina. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari dan 28 hari tidak bersifat toksik dan tidak merusak organ ginjal kelinci jantan dan betina.

Kata kunci: *Curcumin*, Vitamin E, Toksisitas, iNOS, Ginjal.

## Toxicity Test Curcumin Combination With Vitamin E toward Expression Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) And Renal Histopathology of Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*)

### ABSTRACT

The development and utilization of herbal medicine in Indonesia needs to get a stronger scientific substance, especially through research and standardization so that Indonesian herbal medicine can be integrated in the national health service system. Curcumin and vitamin E are herbal remedies that are believed to inhibit the growth of cancer cells because they have contain antioxidants. This study aimed to examine the effect of curcumin combination with vitamin E on iNOS expression and renal histopathology. This study used 20 tail males and females of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with 3 old month and divided into 5 groups: negative control group (P1), male rabbit group was given combination of curcumin and vitamin E for 14 days (P2), female rabbit group was given combination curcumin and vitamin E for 14 days (P3), male rabbit group was given combination of curcumin and vitamin E for 28 days (P4) and female rabbit group was given combination of curcumin and vitamin E for 28 days (P5). Rabbits were given a combination of curcumin dose of 72 mg/kgBW and vitamin E doses of 200 IU. The therapy conducted per-oral. Expression of iNOS was observed with immunohistochemical methods and the preparation of renal histopathology preparations using the Hematoxylin-Eosin (HE) staining method. The results showed that combination of curcumin and vitamin E for 14 days in both male and female rabbits increased iNOS expression by 0.065% and 0.11%. While combination of curcumin and vitamin E for 28 days in both male and female rabbits showed an increase in iNOS expression of 0.146% and 0.087. The histopathologic view shows no change in histopathologic features of the glomerulus and tubular renal organs of male and female rabbits. The conclusion of this research is combination therapy of curcumin and vitamin E for 14 days and 28 days is not toxic and does not damage the renal organ of male and female rabbits.

Keywords: *Curcumin*, Vitamin E, Toxicity, iNOS, Renal.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Uji Toksisitas Kombinasi Curcumin Dengan Vitamin E Terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase (INOS)* Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)**”. menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan terselesaikannya laporan skripsi ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing satu atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh. Dyah Ayu OAP., M Biotech selaku dosen pembimbing dua atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
3. drh. Aulia Firmawati, M.Vet. selaku dosen penguji satu atas tanggapan dan saran yang diberikan.
4. Agri Kaltaria Anisa, S.Farm, Apt. selaku dosen penguji dua atas tanggapan dan saran yang diberikan.
5. Prof.Dr.Aulanni'am,drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Analis dan Staf Laboratorium Biosains, Laboratorium Biokimia FMIPA, dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah membantu penulis dalam penelitian atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, waktu dan ilmu yang telah diberikan.
7. Anggota kelompok, Eka Hour dan Mufid Hadi Raharjo atas kebersamaan dan kerjasamanya selama penelitian.
8. Orangtua tercinta, ayah Dian Bambang H., Ibu Suparti serta adik tercinta Jessy Yolandita D. serta pasangan Fitka Putri A.D dalam dukungan, semangat, doa, dan motivasi yang diberikan kepada penulis.

9. Kolega di KELAS B 2010 yang selama ini senantiasa memberikan saran, kritik, motivasi, semangat, inspirasi, kebersamaan atas semua hal yang sangat luar biasa dan juga untuk semua kolega angkatan 2010.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Laporan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, Juni 2015

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Hewan Coba Kelinci ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) .....	6
2.2 Uji Preklinis Obat Herbal.....	8
2.3 Uji Toksisitas .....	12
2.4 Antioksidan.....	17
2.5 <i>Curcumin</i> .....	20
2.6 Vitamin E.....	21
2.7 Ginjal .....	23
2.8 <i>Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)</i> .....	28
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep.....	31
3.2 Hipotesis Penelitian.....	33
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	34
4.2 Sampel Penelitian.....	34
4.3 Rancangan Penelitian.....	34
4.4 Variabel Penelitian.....	35
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	36
4.6 Tahapan Penelitian.....	36
4.7 Cara Kerja Penelitian.....	37
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	37
4.7.2 Pemberian <i>Curcumin dan Vitamin E</i> .....	37
4.7.3 Pembedahan Dan Isolasi Organ Ginjal.....	37
4.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal.....	37
4.7.5 Pengamatan Ekspresi iNOS dengan Metode Imunohistokimia .....	39

4.7.6 Analisis Data .....	40
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Pengaruh Pemberian Obat Herbal Terstandart Berbahan Utama Kombinasi <i>Curcumin</i> Dan Vitamin E Terhadap Ekspresi <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) Pada Organ Ginjal Kelinci ( <i>Oryctolagus Cuniculus</i> ).....	41
5.2 Pengaruh Pemberian Obat Herbal Terstandart Berbahan Utama Kombinasi <i>Curcumin</i> Dan Vitamin E Terhadap Histopatologi Organ Ginjal Kelinci ( <i>Oryctolagus Cuniculus</i> ).....	47
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1 Kesimpulan .....	52
6.2 Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	53
<b>LAMPIRAN</b> .....	57



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kebutuhan nutrisi kelinci .....	8
4.1 Rancangan kelompok penelitian .....	35
5.1 Ekspresi iNOS pada organ ginjal kelinci .....	44



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Kelinci .....	6
2.2 Logo obat herbal .....	10
2.3 Struktur kimia <i>curcumin</i> .....	20
2.4 Struktur kimia vitamin E.....	22
3.1 Kerangka konseptual.....	31
5.1 Ekspresi iNOS pada organ ginjal kelinci (400x).....	42
5.2 Gambaran histopatologi ginjal pewarnaan HE (400x).....	48



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional .....	57
2. Pembuatan Larutan Kombinasi Vit E dan <i>Curcumin</i> .....	58
3. Pembuatan Larutan <i>Curcumin</i> .....	58
4. Pembuatan Pelarutan <i>Curcumin</i> .....	58
5. Dosis <i>Curcumin</i> dan Vit E .....	59
6. Pembuatan Preparat Histopatologi .....	59
7. Metode Imunohistokimia .....	61
8. Imunoratis iNOS .....	62
9. Uji statistika pengaruh kombinasi curcumin dan vitamin E Terhadap iNOS .....	63
10. Sertifikat Laik Etik .....	61



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol / Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
Sinar UV	<i>Sinar Ultraviolet</i>
ROO <sup>-</sup>	Radikal Peroksil
OH <sup>-</sup>	Radikal Hidroksil
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radikal Superoksida
NO	<i>Nitric oxide</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan keadaan abnormal yang disebabkan karena terjadinya pertumbuhan sel-sel tubuh yang tidak terkendali (Agustina, 2008). Salah satu kejadian kanker yang sering terjadi pada hewan betina adalah kanker mammae (Amstrong, 2009). Kanker mammae dapat dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain usia, jenis kelamin, nutrisi, ras, obesitas genetik, hormon, luka atau cidera, infeksi mikroorganisme, sinar UV, karsinogenesis, dan faktor lingkungan (Polton, 2009 ; Dore *et al.*, 2003). Anjing dengan usia 10-12 tahun beresiko lebih tinggi terkena kanker mammae. Ras anjing yang sering mengalami kanker mammae yaitu ras anjing *crossbreed*, *poodle*, dan *cocker spaniel* (Gupta *et al.*, 2012).

Sel-sel yang teraktivasi karena proses inflamasi akan menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang merupakan respon terhadap berbagai rangsangan (Caramori and Papi, 2004). Terbentuknya ROS dan RNS dipengaruhi oleh aktifitas fagositosis dari makrofag. *Nitric Oxide* (NO) merupakan salah satu produk ROS yang pembentukannya dikatalis oleh *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), iNOS merupakan suatu enzim yang diekspresikan dalam makrofag dan berfungsi mengontrol produksi NO (Lechner *et al.*, 2005). Menurut Aktan (2004), iNOS akan mengalami peningkatan produksi dan regulasi saat terjadi inflamasi.

Usaha untuk meminimalisir kanker pada hewan yang secara umum dilakukan adalah dengan terapi bedah dan eliminasi nodul kanker (Ferrari *et al.*, 2012).

Pengobatan atau pencegahan melalui bahan additif atau suplemenasi herbal, masih jarang digunakan dan dilaporkan hasil ilmiahnya. Di sisi lain, pengobatan herbal semakin populer digunakan untuk terapi dikarenakan obat-obatan herbal tidak mempunyai potensi untuk terapi karsinoma atau kanker (Pari, 2008). Salah satu obat herbal tradisional yang dapat digunakan untuk mengobati kanker adalah *curcumin* yang merupakan bahan aktif yang di ekstraksi dari *Curcuma longa*.

*Curcumin* dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. *Curcumin* dapat berperan aktif dalam menghambat proses karsinogenesis pada tahap inisiasi dan promosi atau progresi (Nurrochmad, 2004). Aktivitas antikanker *curcumin* dilaporkan berhubungan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas (Sandur *et al.*, 2005). Joe *et al.* (2004), menetapkan *curcumin* sebagai *broad spectrum anti cancer agent* dan menyatakan *curcumin* sebagai bahan yang hebat sebagai pencegah terapi kanker, dimana dapat menekan inisiasi tumor, promotion, dan metastasis.

Vitamin E mempunyai efek antioksidan dengan cara menetralkan radikal bebas, menghambat enzim peroxidase, melindungi asam lemak tidak jenuh pada fosfolipid dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif. Vitamin E juga mempunyai efek antiinflamasi. Penelitian juga membuktikan bahwa kombinasi vitamin E dengan obat antitumor menghasilkan respon sinergik secara signifikan dibandingkan dengan pemberian obat antitumor secara individual (misalnya pada penurunan resiko kanker payudara) (Martha *et al.*, 2013).

Sebagian besar masyarakat berpendapat bahwa obat herbal tidak mempunyai efek samping. Obat herbal meskipun berbahan alami bukan berarti tidak mempunyai

efek samping karena tanaman obat juga mengandung racun. Setiap obat yang dikonsumsi akan melewati sistem ekskresi. Ginjal merupakan organ ekskresi utama yang berperan penting dalam memfilter darah dan zat-zat toksik yang masuk bersama darah. Ginjal merupakan organ yang sangat sensitif terhadap kandungan yang bersifat toksik. Proses ekskresi obat di ginjal kadang berdampak buruk, misalnya nekrosis tubular akut dan nefritis interstitial (Katno dan Pramono, 2006).

Pengembangan dan pemanfaatan obat bahan alam/obat herbal Indonesia perlu mendapatkan substansi ilmiah yang lebih kuat, terutama melalui penelitian dan standarisasi sehingga obat herbal Indonesia dapat diintegrasikan dalam sistem pelayanan kesehatan nasional (Sampurno, 2011). Umumnya penelitian bahan alam yang diduga berpotensi sebagai obat maupun secara empiris telah digunakan masyarakat sebagai obat, diawali dengan uji pre-klinis toksisitas untuk memprediksi tingkat keamanannya, kemudian dilanjutkan dengan uji farmakologi lainnya. Metode uji toksisitas dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* (Frengki *et al* 2014).

Berdasarkan hal-hal di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian obat herbal terstandart berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap histopatologi dan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) organ ginjal.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang akan penulis bahas dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian obat herbal terstandart berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap histopatologi organ ginjal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian obat herbal terstandart berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ ginjal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) umur 3 bulan dengan rata-rata berat badan 1500 g yang diperoleh dari Peternakan Kelinci di daerah Dau Malang dengan jumlah 20 ekor kelinci jantan dan betina. Yang telah mendapatkan persetujuan laik etik dari KEP UB, dengan nomor 189-KEP-UB.
2. Hewan coba yang digunakan akan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Kelompok pertama kelinci jantan akan diberikan *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari, kelompok kedua kelinci betina akan diberikan *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari, kelompok ketiga kelinci jantan akan diberikan *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari, kelompok keempat kelinci betina akan diberikan *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari sedangkan kelompok kelima digunakan sebagai kontrol negatif. Dosis *Curcumin* yang diberikan pada kelinci

sebesar 72 mg/kg BB/hari yang dikombinasikan dengan vitamin E dengan dosis 200 IU sediaan kapsul Nature E (100 IU). *Curcumin* kemudian akan dilarutkan dalam NaCl.

3. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah perubahan gambaran histopatologi organ ginjal dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) dan pengukuran ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ ginjal dengan metode imunohistokimia.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pemberian obat herbal terstandart berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ ginjal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).
2. Mengetahui pengaruh pemberian obat herbal terstandart berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E terhadap histopatologi organ ginjal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai kajian ilmiah uji preklinis dan produksi obat herbal terstandar berbahan utama kombinasi *curcumin* dengan vitamin E sebagai terapi kanker mammae pada hewan peliharaan (*pet animal*) terhadap histopatologi dan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ ginjal.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hewan Coba Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Kelinci telah dijinakkan sejak 2000 tahun silam dengan tujuan keindahan, penghasil bulu, kulit, wol dan hewan percobaan. Taksonomi kelinci menurut Damron (2003) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animal
Phillum	: Chordata
Sub phillum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Logomorpha
Famili	: Leporidae
Genus	: <i>Oryctolagus</i>
Spesies	: <i>Cuniculus</i>



**Gambar 2.1** Kelinci (Sumadi *dkk.*, 2013)

Kelinci memiliki kebiasaan unik yaitu memakan feses yang sudah dikeluarkan yang disebut *copropaghy*. Sifat *copropaghy* biasanya terjadi pada malam atau pagi hari berikutnya. Feses yang berwarna hijau muda dan konsistensi lembek itu dimakan lagi oleh kelinci. Hal ini memungkinkan kelinci memanfaatkan secara penuh pencernaan bakteri disaluran bagian bawah yaitu mengkonversi protein asal hijauan menjadi protein bakteri yang berkualitas tinggi, mensintesis vitamin B dan memecahkan selulosa atau serat energi menjadi energi yang berguna.

Protein sangat dibutuhkan oleh kelinci baik kualitatif maupun kuantitatif untuk pertumbuhannya. Kebutuhan protein ini hanya dapat dipenuhi apabila diberi tambahan konsentrat, karena sifat kelinci berlambung tunggal sehingga tidak memungkinkan mengkonsumsi pakan hijauan sebanyak-banyaknya. Pemberian pakan dengan kandungan protein kasar 12% 15% sudah cukup bagi pertumbuhan kelinci lokal (Sumadi *dkk.*, 2013).

Jumlah cairan sperma yang dihasilkan kelinci jantan sebanyak  $\pm 0,5 - 1,5$  mL sedangkan jumlah sperma sebanyak  $0,5 \times 10^8/\text{mL} \sim 3,5 \times 10^8/\text{mL}$ . Cairan sperma mengandung *fructose* 40~400 mg/100 ml; sedikit glukosa dan *glycerylphosphorylcholine* 215 ~370 mg/100 ml. Sperma kelinci tahan terhadap hydrogen proksida (Sumadi *dkk.*, 2013). Periode masa kebuntingan kelinci adalah 24-34 hari, sebagian besar kelinci melahirkan anaknya pada hari ke-31 dan 32 masa kebuntingan. Kebuntingan dapat diketahui dengan cara meraba perut bagian/belakang dan akan teraba adanya perkembangan fetus di dalam uterus pada saat kebuntingan mencapai usia 12-14 hari.

Kelinci bersifat *prolifik* (beranak banyak), dalam satu tahun dapat melahirkan 4-8 kali dengan 4-12 ekor anak pada setiap kelahirannya. Anak kelinci akan disusui oleh induknya dan disapih pada umur 3-4 minggu. Anak kelinci akan mengalami dewasa kelamin pada usia 3-6 bulan. Studi tentang *litter size* kelinci, menunjukkan bahwa *litter size* kelinci paling rendah 6,49 dan paling tinggi 8,07 ekor per kelahiran dengan rata-rata dari 2.447 sampel diperoleh besar *litter size* rata-rata 7,39 (Damron, 2003).

Kelinci hanya memerlukan ransum dengan kadar lemak rendah. Bahan pakan seperti: jagung, sorghum, bekatul, dedak dan menir sangat cocok untuk

kelinci. Protein sangat penting untuk pertumbuhan anak, pembentukan daging dan pertumbuhan bulu. Banyaknya ransum untuk induk bunting dan induk menyusui per ekor dewasa per hari adalah: hijauan sekitar 1 – 2 kg dan konsentrat 6.7% dari bobot hidupnya. Sedangkan untuk induk kering, induk muda dan anak kelinci yang telah disapih banyaknya: rumput/hijauan sekitar 1 – 2 kg dan konsentrat 3,8% dari berat hidup (Damron, 2003). Kandungan zat makanan atau nutrisi yang dibutuhkan oleh kelinci dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

**Tabel 2.1** Kandungan zat makanan atau nutrisi kelinci.

No	Nutrisi	Jumlah
1	Air	12 % (maks)
2	Protein	16 % (maks)
3	Lemak	4 % (maks)
4	Serat kasar	14 % (maks)
5	Kalsium	1,36 %
6	Phosphor	0,7 %

Sumber : Sumadi *dkk.*, (2013)

Peralatan kandang untuk kelinci meliputi *spring clip* untuk tempat pakan, botol air, dan kandang hewan. Bahan untuk pembuatan *cage* dapat berasal dari besi *galvanis*, *sheet steel*, *steel zinc*, *aluminium*, *stainless steel*, kayu, bahan plastik (*fiber glass*, *polycarbonate*, *polypropylene*, *linear (high density) polyethylene*, dan *styrene*. Ukuran kandang sebesar 4 ft x 18 inchi x 18 inchi untuk induk dan anak. Sedangkan untuk pemeliharaan kelinci direkomendasikan pada suhu 8,3°C dengan kelembaban relatif 50 % atau pada suhu 16,67°-20,0°C) dengan kelembaban relatif 45 – 55% (Sumadi *dkk.*, 2013).

## 2.2 Uji Preklinis Obat Herbal

Obat herbal merupakan campuran bahan alami yang berbentuk racikan atau ramuan dalam formulasinya tanpa penambahan bahan kimia sintetis. Bahan yang

digunakan untuk pembuatan obat herbal berasal dari tanaman, bisa berupa daun, akar, tangkai, buah, biji-bijian yang memiliki khasiat untuk pengobatan penyakit pada manusia, tanaman dan hewan. Obat herbal pada dasarnya dapat diklasifikasikan dalam tiga kategori, yaitu jamu, herbal terstandar, dan fitofarmaka. Kelompok tersebut memiliki logo yang berbeda dan sangat spesifik sesuai dengan standar (**Gambar 2.2**) (Sampurno, 2011 ; Hemani, 2011):

1) Jamu

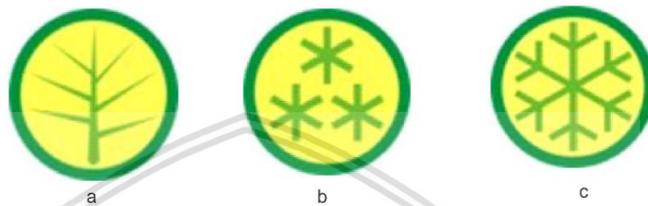
Jamu merupakan ramuan atau bahan – bahan alami yang digunakan dalam pengobatan. Khasiat jamu sebagai obat herbal selama ini didasarkan pengalaman turun temurun/empirik. Bahan baku yang digunakan umumnya sudah dikeringkan atau disebut simplisia. Sediaan jamu dalam bentuk rebusan/cairan dan serbuk.

2) Obat herbal terstandar (Telah lolos uji praklinik)

Obat herbal terstandar adalah sediaan obat herbal berbahan baku alami yang telah dilakukan standarisasi dan telah dilakukan uji praklinik. Uji keamanan yang dilakukan berupa uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis. Dari hasil pengujian praklinik dapat diketahui khasiat, dosis yang tepat untuk terapi, keamanan dan efek samping yang mungkin ditimbulkan. Standarisasi simplisia merupakan upaya menyeluruh dimulai dengan pemilihan lahan (unsur tanah) yang tepat untuk tumbuhan obat tertentu, budi daya yang baik sampai pasca panen (*good agriculture practices*). Setiap simplisia mengandung komponen yang kompleks. Untuk standarisasi bagi setiap simplisia maka perlu ditetapkan zat penanda (*finger print*) yang digunakan sebagai parameter.

### 3) Fitofarmaka (Lolos uji klinik)

Fitofarmaka adalah adalah obat herbal yang telah dilakukan uji klinik secara lengkap. Dengan uji klinik yang lengkap dan mengikuti prinsip-prinsip uji klinik yang baik, maka fitofarmaka dapat digunakan dalam pelayanan kesehatan formal karena memiliki *evidence base* dan dukungan data ilmiah yang kuat.



**Gambar 2.2** Logo obat herbal a) jamu, b) obat herbal terstandar, dan c) fitofarmaka (Hemani, 2011)

Komponen bioaktif atau senyawa fitokimia yang terkandung dalam obat herbal dapat memberikan dampak fisiologis serta metabolisme secara endogen dan eksogen melalui berbagai mekanisme reaksi tubuh. Senyawa ini secara biologis efektif menghambat pertumbuhan kanker, pertumbuhan mikroba, menurunkan kolesteraol darah, kadar glukosa darah, bersifat antibiotik dan menimbulkan efek kekebalan tubuh. Standarisasi obat herbal Indonesia terutama standarisasi simplisia dan sediaan ekstrak mempunyai arti yang penting untuk menjaga mutu obat herbal. Upaya untuk menjamin mutu dan keamanan obat herbal harus dilakukan sejak awal proses mulai dari pemilihan dan penggunaan simplisia, seluruh proses produksi sampai produk-produk tersebut beredar di masyarakat (Sampurno, 2011).

Standarisasi termasuk mengkombinasi beberapa herbal yang mempunyai senyawa marker yang berbeda. Proses pencampuran ini akan menghasilkan ekstrak dengan komponen terstandar yang diinginkan. Pada prinsipnya, obat herbal juga memiliki potensi efek samping yang sama dengan obat sintetis. Tubuh tidak dapat

membedakan antara pengobatan menggunakan herbal atau pengobatan sintesis. Dalam penggunaan obat herbal, perlu juga diperhatikan keamanan obat herbal pada umumnya, kandungan racun yang mungkin terdapat pada obat herbal, efek merugikan pada organ tertentu seperti sistem kardiovaskuler, sistem saraf, hati, ginjal serta organ lainnya. Efek toksik obat herbal dapat dihindari apabila cara penggunaannya benar, sudah diuji praklinik dan uji klinik. Beberapa kriteria yang perlu diperhatikan apabila menggunakan obat herbal antara lain (Preethi *et al*, 2010; WHO, 2003) :

1. Kebenaran bahan

Kebenaran bahan yang digunakan akan memberikan efek terapi yang diinginkan, karena tanaman obat terdiri dari beragam spesies yang kadang kala sulit untuk dibedakan. Tanaman yang mempunyai kemiripan harus bisa diidentifikasi dan dipisahkan.

2. Ketepatan dosis

Takaran yang tepat sampai saat ini belum banyak didukung oleh data hasil penelitian. Penggunaan takaran yang lebih pasti dalam satuan gram dapat mengurangi ke mungkinan terjadinya efek yang tidak diharapkan karena batas antara racun dan obat dalam bahan tradisional sangat tipis.

3. Ketepatan waktu penggunaan

Ketepatan waktu penggunaan obat tradisional menentukan tercapai atau tidaknya efek yang diharapkan.

4. Ketepatan cara penggunaan

Tanaman obat mengandung banyak zat aktif yang berkhasiat di dalamnya dan masing-masing membutuhkan perlakuan yang berbeda dalam penggunaannya.

#### 5. Ketepatan telaah informasi

Ketidaktahuan dapat menyebabkan obat herbal berbalik menjadi membahayakan.

#### 6. Ketepatan pemilihan obat untuk indikasi tertentu

Dalam satu jenis tanaman dapat ditemukan beberapa zat aktif yang berkhasiat dalam terapi. Rasio antara keberhasilan terapi dan efek samping yang timbul harus menjadi pertimbangan dalam pemilihan jenis tanaman obat yang akan digunakan dalam terapi.

### 2.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu zat/bahan yang akan digunakan sebagai obat. Hasil yang diperoleh dari pelaksanaan uji toksisitas dapat memberikan informasi tentang tingkat keamanan suatu zat/bahan pada hewan coba atau bahan biologi lainnya sebelum zat/bahan tersebut digunakan di klinik. Sedangkan uji aktivitas (khasiat) obat adalah suatu uji untuk menentukan kebenaran khasiat suatu bahan uji yang dibuktikan secara ilmiah dengan menggunakan metodologi dan parameter yang ditentukan berdasarkan tujuan penggunaan bahan uji yang akan dipakai di klinik (Subarnas et al., 2008).

Dalam penelitian obat, baik bahan obat yang berbasis bahan alam maupun bahan kimia yang akan dikembangkan sebagai obat baru harus melalui tahapan penelitian berdasarkan prosedur pengujian yang telah disepakati WHO yaitu melalui Uji praklinik dan uji klinik. Uji praklinik adalah suatu uji yang dilakukan pada hewan coba dengan tujuan untuk menentukan keamanan dan khasiat suatu bahan uji secara ilmiah sebelum dilakukan uji klinik. Sedangkan uji klinik adalah suatu uji yang dilaksanakan pada manusia yang meliputi 4 tahapan fase uji, yang

dilaksanakan pada orang sehat dan orang sakit yang disesuaikan dengan tujuan penggunaan bahan uji untuk dipakai di klinik, termasuk uji monitoring efek samping obat (MESO). (Depkes, 2000).

### **2.3.1 Uji Toksisitas in Vitro**

Secara umum uji toksisitas obat dibagi dalam 2 bagian yakni uji toksisitas in vitro (suatu uji yang dilaksanakan diluar tubuh hewan coba) dan uji toksisitas in vivo (di dalam tubuh hewan coba). Uji toksisitas in vitro adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu bahan yang di uji menggunakan media biakan bahan biologi tertentu yang merupakan subjek dari pengujian. Pada umumnya uji toksisitas in vitro hanya untuk obat terbatas saja, sebagai contoh uji obat antiinfeksi (antibiotik) menggunakan kultur media bakteri penyebab penyakit, obat antivirus menggunakan kultur jaringan untuk perkembangbiakan virus tertentu, obat antikanker menggunakan kultur jaringan sel kanker (sel myeloma) atau sel normal (fibroblas) dan anthelmintik (obat cacing) menggunakan kultur/media cacing dapat tumbuh dan berkembang, demikian pula terhadap obat antijamur. Informasi yang diperoleh dari hasil uji toksisitas in vitro adalah mengetahui besarnya konsentrasi bahan uji yang dapat membunuh 50% (lethal concentration 50% = LC50) dari bahan biologi yang di kultur/di benihkan, disamping juga dapat menentukan aktivitas suatu bahan uji dalam menghambat atau membunuh penyebab penyakit secara in vitro. Sedangkan untuk mengetahui keamanan bahan uji yang telah lolos melalui uji toksisitas in vitro, masih dilakukan tahapan uji toksisitas in vivo sebelum pelaksanaan uji lebih lanjut. (Radji, 2004).

### 2.3.2 Uji Toksisitas in Vivo

Uji toksisitas in vivo adalah suatu uji toksisitas yang dilakukan pada hewan coba, dengan tujuan untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan terhadap perubahan fungsi fisiologis maupun perubahan yang bersifat patologis pada organ vital dalam kurun waktu tertentu. Uji toksisitas in vivo meliputi uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Berdasarkan lama waktu terjadinya efek toksik maka uji toksisitas umum dibagi atas tiga bagian yakni uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis, sedangkan uji toksisitas khusus meliputi uji teratogenik, uji kasinogenik dan uji mutagenik (Donatus, 2001).

#### 1. Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan yang dilakukan dalam kurun waktu tidak lebih dari 24 jam, dengan dosis tunggal atau dosis berulang. Tujuan dilakukan uji toksisitas akut adalah disamping untuk menentukan bahaya pemaparan suatu bahan secara akut, juga untuk menentukan batas keamanan (margin of safety) suatu bahan dengan menentukan dosis yang menyebabkan kematian 50% pada hewan coba (lethal dose 50% = LD50). Rute pemberian dalam pelaksanaan uji toksisitas akut pada hewan coba dilakukan dengan 2 cara yakni (1) Cara pemberian yang di sarankan untuk dipakai di klinik, (2) Cara pemberian intravena, jika memungkinkan, hal ini dimaksudkan untuk meyakinkan bila terjadi pemaparan bahan uji secara sistemik. Hewan coba yang dipakai sedikitnya dua spesies mamalia, termasuk spesies nonrodent jika memungkinkan, serta dibedakan berdasarkan jenis kelamin. Untuk bahan uji yang mempunyai daya toksisitas rendah dimulai dengan dosis maksimum yang tidak menimbulkan efek toksik.

Pengamatan terhadap hewan coba dilakukan dalam jangka waktu 24 jam setelah pemberian bahan uji terhadap timbulnya gejala keracunan seperti kejang, diare, vomit, sesak nafas dan lainnya, jumlah kematian, mula kerja obat, lama kerja obat serta perubahan fungsi organ vital tubuh hewan coba. Terhadap hewan coba yang masih hidup dilakukan pengamatan sampai maksimal 14 hari. Dalam waktu 14 hari semua hewan coba yang masih hidup dikorbankan, untuk dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis terhadap organ vital seperti hepar, ginjal, paru, limpa, dan organ system pencernaan serta fungsi hemopoetik. Hal ini dimaksudkan untuk mengungkapkan kerusakan pada struktur organ vital dan menjelaskan kerusakan yang diakibatkannya. Data yang di peroleh dilakukan analisis menggunakan statistik non parametrik untuk mengetahui tingkat signifikansi kerusakan organ yang timbul (Eatau & Klaassen, 2001)..

## **2. Uji Toksisitas Subkronis**

Uji toksisitas subkronis adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan dengan dosis berulang dalam kurun waktu 14–90 hari namun WHO menyarankan sampai 180 hari tergantung dari lama waktu pemakaian obat yang akan digunakan di klinik. Untuk bahan uji digunakan di klinik dalam waktu berkisar 1–3 hari seperti penggunaan obat cacing (anthelmintik) maka lama uji toksisitas subkronis berlangsung 14 hari. Untuk bahan uji yang dipakai di klinik berkisar 5–7 hari, seperti obat antibiotika, maka lama uji toksisitas subkronis berlangsung 28 hari. Untuk bahan uji yang akan dipakai di klinik dalam kurun waktu 28 hari, maka lama uji toksisitas subkronis 90 hari, dan untuk pemakaian di klinik lebih dari 30 hari seperti bahan uji untuk terapi penyakit degeneratif yakni obat hipertensi, obat diabetes mellitus, obat tuberkulosis, obat kanker dan terapi

supporting lainnya maka lama pengujian toksisitas subkronis berkisar 90–180 hari. Tujuan dari pelaksanaan uji toksisitas subkronis adalah untuk mengetahui adanya efek toksik setelah pemberian bahan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu khususnya terhadap organ yang berfungsi vital di dalam tubuh hewan coba, serta untuk mempelajari efek kumulatif bahan uji dalam tubuh. Rute pemberian harus sama dengan yang disarankan dipakai di klinik, sedangkan hewan coba yang digunakan pada uji toksisitas subkronis adalah dua spesies hewan mamalia berbeda termasuk nonrodensia bila memungkinkan. Pada akhir dari periode pengujian toksisitas subkronis semua hewan coba dikorbankan dan dilakukan otopsi, selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis terhadap organ vital termasuk organ metabolisme, organ ekskresi, pencernaan dan sistem kardiovaskuler serta sistem hemopoitik (Eatau & Klaassen, 2001).

Hasil uji toksisitas subkronis akan memberikan informasi yang bermanfaat tentang efek utama senyawa uji, organ sasaran yang dipengaruhinya serta perkembangan efek toksik yang tidak teramati pada uji toksisitas akut (Donatus, 2001). Tujuan utama dari uji ini adalah untuk mengungkapkan dosis tertinggi yang diberikan tanpa memberikan efek merugikan serta untuk mengetahui pengaruh senyawa kimia terhadap badan dalam pemberian berulang (Eatau & Klaassen, 2001).

### **3. Uji Toksisitas Kronis**

Uji toksisitas kronis adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu bahan uji pada hewan coba dengan dosis berulang dalam kurun waktu sepanjang umur hewan coba. Tujuan dari uji toksisitas kronis adalah untuk mengetahui profil toksisitas suatu bahan uji secara berulang dalam jangka panjang.

Karena waktu yang diperlukan untuk pelaksanaan uji toksisitas kronis sangat panjang maka dalam pelaksanaannya dilakukan bersamaan dengan uji klinik. Persyaratan yang berlaku pada pelaksanaan uji toksisitas kronis seperti hewan coba, dosis bahan uji serta rute pemberian sama dengan persyaratan seperti pada pelaksanaan uji toksisitas subkronis (Donatus, 2001).

## 2.4 Antioksidan

### 2.4.1 Definisi

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Venkatesan *et al.*, 2003).

Senyawa kimia dan reaksi yang dapat menghasilkan spesies oksigen yang potensial bersifat toksik dapat dinamakan pro-oksidan. Sebaliknya, senyawa dan reaksi yang mengeluarkan spesies oksigen tersebut, menekan pembentukannya atau melawan kerjanya disebut antioksidan. Dalam sebuah sel normal terdapat keseimbangan oksidan dan antioksidan yang tepat. Meskipun demikian, keseimbangan ini dapat bergeser ke arah pro-oksidan ketika produksi spesies oksigen tersebut sangat meningkat atau ketika kadar antioksidan menurun. Keadaan ini dinamakan "stress oksidatif" dan dapat mengakibatkan kerusakan sel yang berat jika stress tersebut masif atau berlangsung lama (Pokorny, *et al.* 2001). Enzim yang bersifat antioksidan mengeluarkan atau menyingkirkan superoksida dan hidrogen

peroksida. Vitamin E, vitamin C, dan mungkin karotenoid, biasanya disebut sebagai vitamin antioksidan, dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas.

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavonol dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain (Afifah, 2003).

#### **2.4.2 Mekanisme Kerja**

Antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid ( $R\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan ( $A\cdot$ ) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipid (Afifah, 2003). Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai

autooksidasi dengan perubahan radikal lipid ke bentuk lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipid dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi.

Radikal-radikal antioksidan ( $A\bullet$ ) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain membentuk radikal lipid baru. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipid sebagai berikut (Tantalo,2009) :



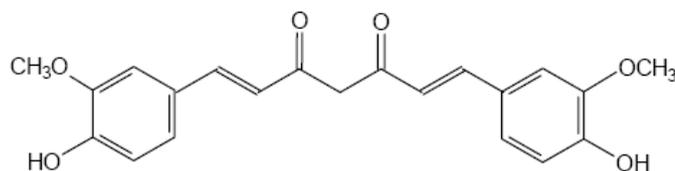
Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Venkatesan, et al., 2003). Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Tantalo,2009).



## 2.5 Curcumin

*Curcumin* merupakan senyawa aktif dari tanaman *Curcuma sp.* Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas biologis yang penting terutama aktivitas antioksidan dari gugus hidroksi aromatic terminal, gugus  $\beta$  diketon dan ikatan rangkap yang

berperan sebagai antikanker dan antimutagenik (**Gambar 2.3**). *Curcumin* juga telah diteliti dan mampu menginduksi respon imun dan non imun antiradang pada tikus (Yuniarti dkk., 2006).



**Gambar 2.3** Struktur kimia *curcumin* (*1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)*) (Nurrohmah, 2004)

*Curcumin* merupakan senyawa polifenolik yang memberikan warna kuning dan merupakan senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi seperti, melancarkan peredaran darah dan vital energi, menghilangkan sumbatan, peluruh haid, antiradang, antibakteri, memperlancar pengeluaran empedu, astringent dan antikanker. Dari beberapa penelitian dilaporkan bahwa *curcumin* dan analognya mempunyai efek kemopreventif dan kemoterapeutik. Selain aktivitas antikanker, *curcumin* antara lain juga dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiproliferasi dan pemacu proses apoptosis (Aggarwal *et al.*, 2005, Widjayakusuma, 2005).

*Curcumin* yang diisolasi dari *Curcuma longa* (turmeric) sangat potensial sebagai antioksidan yang diduga disebabkan oleh gugus fenolik dan 1,3-diketon. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini bersifat multifungsional dan dapat berfungsi sebagai (1) penangkal radikal bebas seperti superoksida dan radikal hidroksil, (2) pengkelat logam seperti besi (Fe) (3) menghambat aktivitas enzim oksidatif seperti sitokrom p-450, dan (4) peredam terbentuknya oksigen radikal. Sifat *curcumin* dapat menghambat lipid peroksidasi yang terinduksi oleh berbagai agent selular atau zat asing sangat berperan dalam mekanisme aktivitas *curcumin*

sebagai antiinflamasi, antitumor dan aktivitas farmakologi lainnya (Nurrochmad, 2004).

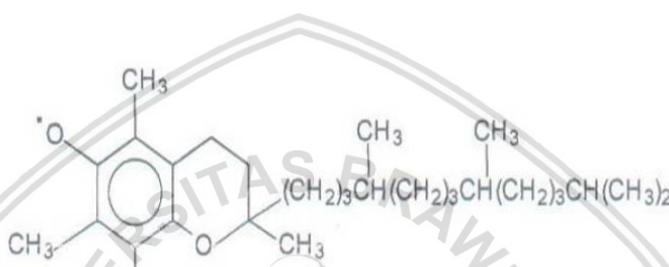
Aktivitas antiinflamasi dari *curcumin* selain melalui penghambatan enzim siklooksigenase (COX) dapat juga melalui enzim lipoksigenase (LOX). Penghambatan enzim LOX akan mengurangi produk LOX seperti 12 (S)-HETE (asam hidroksieikosatetraenat) yang terbukti memacu penyebaran sel kanker dan berpotensi merangsang terjadinya metastasis (Nurrohmad, 2004). Di beberapa penelitian tentang hewan, rata-rata dosis yang diberikan 100-200 mg/kg berat badan memaparkan kondisi baik untuk anti inflamasi dan memaparkan efek buruk yang di abaikan pada manusia. LD<sub>50</sub> per oral di temukan lebih dari 2.0 g/kg berat badan (Kohli *et al.*, 2005).

Mekanisme antiproliferasi *curcumin* pada sel myeloma dikaitkan dengan kemampuan *curcumin* menghambat nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dan I $\kappa$ B $\alpha$  kinase (Bharti *et al.*, 2003). NF- $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi gen-gen seperti Bcl-2 dan Bcl-XL yang bersifat anti-apoptosis dan cyclin D1 yang bersifat antiproliferatif. Efek *curcumin* pada penghambatan NF- $\kappa$ B dapat memacu terjadinya apoptosis dan menekan terjadinya proliferasi.

## 2.6 Vitamin E

Vitamin E merupakan antioksidan, zat penyapu radikal bebas dan bersifat lipofilik. Vitamin E terdiri dari struktur *tocopherol* dengan berbagai gugus metil yang melekat, serta sebuah rantai sisi fitil (**Gambar 2.4**). Vitamin E memiliki 4 golongan famili yaitu  $\alpha$ -*tocopherol*,  $\beta$ -*tocopherol*,  $\gamma$ -*tocopherol*, dan  $\delta$ -*tocopherol*. Secara biologis diketahui bahwa  $\alpha$ -*tocopherol* merupakan antioksidan yang paling aktif dan kuat dibanding yang lain (Budiyanto, 2002). Vitamin E merupakan

vitamin yang larut lemak dan dijumpai pada semua membran sel. Sebagai antioksidan, vitamin E akan mengurangi peroksidasi dari asam lemak yang tidak tersaturasi oleh radikal bebas. Vitamin E melalui percobaan in vitro, ternyata diketahui mempunyai efek anti oksidan dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroxidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif (Ela, 2005). Dosis toksisitas akut pemberian vitamin E per oral pada tikus > 4000 mg/kgBB (Science Lab., 2013).



**Gambar 2.4** Struktur kimia vitamin E (Vasanthi *et al.*, 2012)

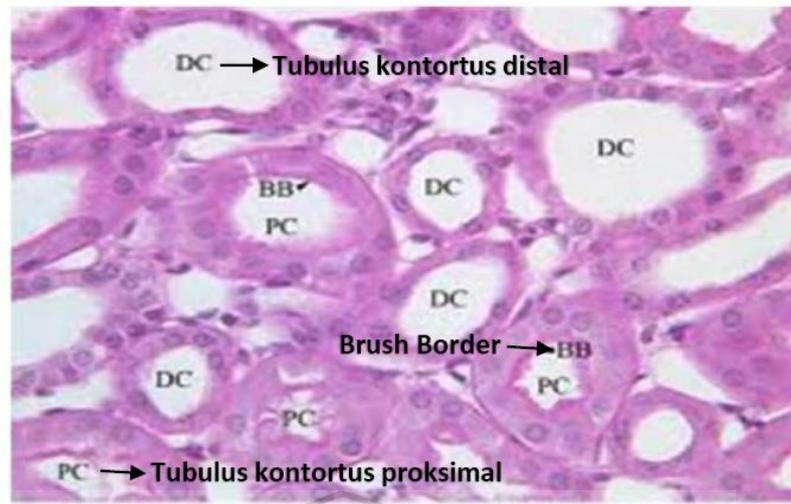
Di dalam lapisan fosfolipid, vitamin E berfungsi melindungi asam lemak jenuh ganda kan komponen membran sel dari oksidasi radikal bebas dengan cara memutus rantai peroksidasi lipid dan menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH pada cincin radikal bebas, sehingga terbentuk radikal vitamin E stabil dan tidak merusak. Vitamin E berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksida lipid dalam membran serta berinteraksi secara langsung dengan radikal peroksida lipid sehingga atom hidrogen lainnya berkurang dan menjadi *tocopherol quinon* yang teroksidasi sempurna. Vitamin E mengendalikan peroksida lipid dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi, menyekat aktivitas tambahan yang dilakukan oleh peroksida, memutus reaksi berantai dan membatasi kerusakan (Houghton Mifflin Company, 2003).

## 2.7 Ginjal

Ginjal merupakan suatu organ yang terletak retroperitoneal pada dinding abdomen di bagian kanan dan kiri. Ginjal dibungkus oleh tiga lapis jaringan. Jaringan yang terdalam adalah kapsula renalis, jaringan pada lapisan kedua adalah adiposa, dan jaringan terluar adalah fascia renal. Ketiga lapis jaringan ini berfungsi sebagai pelindung dari trauma dan memfiksasi ginjal (Tortora, 2011).

Ginjal dibagi dua dari atas ke bawah, dua daerah utama yang dapat digambarkan yaitu korteks dibagian luar berwarna coklat terang dan medulla dibagian dalam berwarna coklat gelap (Guyton & Hall, 2008). Korteks ginjal mengandung jutaan alat penyaring disebut nefron. Setiap nefron terdiri dari korpuskulum renal, tubulus kontortus proksimal, ansa henle dan tubulus kontortus distal. Medulla ginjal terdiri dari beberapa massa-massa triangular disebut piramida ginjal dengan basis menghadap korteks dan bagian apeks yang menonjol ke medial. Piramida ginjal berguna untuk mengumpulkan hasil ekskresi yang kemudian disalurkan ke tubulus kolektivus menuju pelvis ginjal (Tortora, 2011).

Ginjal diperdarahi oleh arteri renalis. Arteri renalis memasuki ginjal melalui hilum dan kemudian bercabang membentuk arteri interlobaris, arteri arkuata, arteri interlobularis dan arteriol aferen yang menuju ke kapiler glomelurus (Guyton & Hall, 2008). Sistem vena pada ginjal berjalan paralel dengan sistem arteriol dan membentuk vena interlobularis, vena arkuata, vena interlobaris dan vena renalis (Guyton & Hall, 2008). Persarafan ginjal berasal dari pleksus renalis dari serabut simpatis dan parasimpatis (Moore & Anne, 2012).



**Gambar 2.5** Histologi ginjal (Slomianka, 2009)

Berikut karakteristik masing-masing bagian ginjal secara histologi (Junqueira & Carneriro, 2007) :

a. Korpuskulum renal

Korpuskulum renal bergaris tengah kira-kira 200  $\mu\text{m}$ , terdiri atas seberkas kapiler yaitu glomerulus, dan dikelilingi oleh kapsula epitel berdinding ganda yang disebut kapsula bowman.

b. Tubulus kontortus proksimal

Tubulus kontortus proksimal dilapisi oleh sel-sel selapis kuboid atau silindris. Sel-sel ini memiliki sitoplasma asidofilik yang disebabkan oleh adanya mitokondria panjang dalam jumlah besar, apeks sel memiliki banyak mikrovili dengan panjang kira-kira satu  $\mu\text{m}$  yang membentuk suatu *brush border*.

c. Lengkung henle

Lengkung henle merupakan struktur yang berbentuk lengkungan yang terdiri atas ruas tebal desenden, ruas tipis desenden, ruas tipis asenden dan ruas

tebal asenden. Lumen ruas nefron ini lebar karena dindingnya terdiri atas sel epitel gepeng yang intinya hanya sedikit menonjol ke dalam lumen.

d. Tubulus kontortus distal

Tubulus kontortus distal merupakan bagian terakhir dari nefron yang dilapisi oleh sel epitel selapis kuboid. Sel-sel tubulus distal lebih gepeng dan lebih kecil dibandingkan dengan tubulus proksimal, maka tampak lebih banyak sel dan inti pada tubulus distal.

e. Tubulus koligentes

Tubulus koligentes dilapisi epitel sel kuboid dan bergaris tengah lebih kurang 40  $\mu\text{m}$ , sewaktu tubulus masuk lebih dalam ke dalam medula, sel-selnya meninggi sampai menjadi sel silindris.

Ginjal menjalankan fungsi yang vital sebagai pengatur volume dan komposisi kimia darah dan lingkungan dalam tubuh dengan mengekskresikan zat terlarut dan air secara selektif. Fungsi vital ginjal dicapai dengan filtrasi plasma darah melalui glomerulus dengan reabsorpsi sejumlah zat terlarut dan air dalam jumlah yang sesuai di sepanjang tubulus ginjal. Kelebihan zat terlarut dan air di ekskresikan keluar tubuh dalam urin melalui sistem pengumpulan urin (Price dan Wilson, 2012). Menurut Sherwood (2011), ginjal memiliki fungsi yaitu:

- a. Mempertahankan keseimbangan H<sub>2</sub>O dalam tubuh.
- b. Memelihara volume plasma yang sesuai sehingga sangat berperan dalam pengaturan jangka panjang tekanan darah arteri.
- c. Membantu memelihara keseimbangan asam basa pada tubuh.
- d. Mengekskresikan produk-produk sisa metabolisme tubuh antara lain ureum, kreatinin, asam urat, zat toksik dan hasil metabolisme lainnya.

- e. Mengekskresikan senyawa asing seperti obat-obatan.

Ginjal mendapatkan darah yang harus disaring dari arteri. Ginjal kemudian akan mengambil zat-zat yang berbahaya dari darah. Zat-zat yang diambil dari darah pun diubah menjadi urin. Urin lalu akan dikumpulkan dan dialirkan ke ureter. Setelah ureter, urin akan ditampung terlebih dahulu di kandung kemih. Bila orang tersebut merasakan keinginan berkemih dan keadaan memungkinkan, maka urin yang ditampung dikandung kemih akan di keluarkan lewat uretra (Sherwood, 2011).

Tiga proses utama akan terjadi di nefron dalam pembentukan urin, yaitu filtrasi, reabsorpsi, dan sekresi. Pembentukan urin dimulai dengan filtrasi sejumlah besar cairan yang hampir bebas protein dari kapiler glomerulus ke kapsula Bowman. Kebanyakan zat dalam plasma, kecuali protein, di filtrasi secara bebas sehingga konsentrasinya pada filtrat glomerulus dalam kapsula bowman hampir sama dengan plasma. Awalnya zat akan difiltrasi secara bebas oleh kapiler glomerulus tetapi tidak difiltrasi, kemudian di reabsorpsi parsial, reabsorpsi lengkap dan kemudian akan dieksresi (Sherwood, 2011).

Beberapa obat diekskresi melalui ginjal. Fungsi ekskresi disini merupakan resultan dari 3 proses, yaitu filtrasi di glomerulus, sekresi aktif di tubuli proksimal, dan reabsorpsi pasif di tubuli proksimal dan distal. Sebelum memasuki ginjal, di dalam tubuh obat mengalami berbagai macam proses hingga akhirnya obat dikeluarkan lagi dari tubuh. Proses-proses tersebut meliputi, absorpsi, distribusi, metabolisme (biotransformasi), dan eliminasi, atau biasa dikenal dengan ADME. Absorpsi merupakan proses penyerapan obat dari tempat pemberian, menyangkut kelengkapan dan kecepatan proses. Setelah diabsorpsi obat akan didistribusi

keseluruh tubuh melalui sirkulasi darah, karena selain tergantung dari aliran darah, distribusi obat juga ditentukan oleh sifat fisikokimianya (Putradewa, 2010). Darah dari arteri masuk ke jaringan kapiler melalui arteri afferent. Apabila tekanan intrakapiler lebih tinggi daripada tekanan dalam tubulus lumen, cairan yang mengandung senyawa terlarut pada plasma disaring menembus dinding kapiler dan melalui pori-pori epitelium kapsul Bowman menuju lumen tubulus. Filtrasi glomerulus dibatasi oleh suatu ukuran molekul senyawa yaitu kurang dari 20.000 dan dalam bentuk bebasnya. Selanjutnya filtrat akan melalui lumen tubulus proksimal, lengkung Henle dan tubulus distal memasuki duktus kolektifus. Selama proses ini senyawa obat dapat mengalami reabsorpsi ke sirkulasi sistemik kembali (Neal, 2005).

Setiap bahan obat yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami proses farmakokinetik, yaitu absorpsi di usus, distribusi ke seluruh tubuh, kemudian dimetabolisme oleh hepar, dan kemudian diekskresikan baik melalui empedu dalam feses maupun ginjal dalam urin. Hal ini memungkinkan terjadinya suatu efek medik maupun efek toksik pada organ-organ tersebut, termasuk ginjal, yang disebabkan oleh bahan obat yang masuk ke tubuh.

Pada ginjal, sisa metabolisme akan disaring oleh membran yang berpori sekitar 0,07 mm sehingga hanya bahan yang lebih kecil dari 0,07 mm saja yang dapat lolos. Sementara bahan yang lebih besar tidak akan lolos melewati membran karena mengakibatkan kerusakan ginjal. Jika proses ekskresi ini terganggu maka sampah metabolisme tersebut akan terakumulasi dan menyebabkan toksis bagi tubuh. Proses ekskresi obat di ginjal kadang berdampak buruk, misalnya nekrosis tubular akut dan nefritis interstitial yang secara morfologik ditandai dengan destruksi epitel tubulus proksimal. Sel epitel tubulus proksimal ini peka terhadap anoksia dan mudah hancur

karena keracunan akibat kontak dengan bahan-bahan yang diekskresikan melalui ginjal.

## 2.8 *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)*

Nitrit oksida (NO) merupakan suatu radikal bebas yang disintesa oleh enzim *Nitric Oxide Synthase* (NOS) melalui reaksi yang kompleks yang dapat menguntungkan dan dapat juga merugikan. *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada manusia (dan tikus) mempunyai tiga macam bentuk, yaitu *Neuron Nitric Oxide* (nNOS atau NOS-1) yang ditemukan pada sel saraf, *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS atau NOS-2) yang ditemukan pada makrofag, dan *Endothelial Nitric Oxide* (eNOS atau NOS-3) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah. Kadar nNOS dan eNOS dalam tubuh relatif stabil, sedangkan untuk kadar iNOS dipengaruhi oleh rangsangan. nNOS berfungsi sebagai neurotransmitter yang berperan dalam pengaturan sistem autonom pada sistem kardiovaskuler, terdapat di ginjal, otot rangka, miokard dan pankreas. eNOS bekerja lokal pada endotel pembuluh darah untuk mengatur tekanan darah dan beberapa ditemukan pada sel imun (Ariesta, 2011).

iNOS pada kondisi normal biasanya tidak aktif, meskipun kadang dapat ditemukan pada beberapa sel. iNOS diekspresikan pada sel imun, eritrosit, otot polos pembuluh darah, ginjal, pankreas dan paru-paru. Aktivasi iNOS diakibatkan oleh adanya agen proinflamasi yang spesifik seperti endotoksin, *tumor necrosis factor* (TNF-  $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), dan interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) yang akan memacu transkripsi gen yang menyebabkan peningkatan kadar *Nitric Oxide Synthase* (NOS). Sekresi NO akan meningkat mengikuti peningkatan NOS. Proses transkripsi dari *messenger ribonucleic acid* (mRNA) memiliki peran dalam

mengaktivasi iNOS, mRNA akan berikatan dengan faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) dan *IFN regulatory factors-1* (IRF-1) (Ariesta, 2011).

*Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) adalah enzim pengkatalisis arginin menjadi *nitric oxide* (NO). *Nitric oxide* (NO) adalah radikal bebas yang tidak bermuatan, molekulnya berukuran kecil, bersifat lipofilik dan hidrofilik sehingga mudah melewati membran plasma dan sitoplasma untuk menuju sel target tanpa butuh reseptor (Ariesta, 2011). Menurut Weetman (2002) dikatakan bahwa *nitric oxide* memiliki waktu paruh hanya beberapa detik secara *in vivo*. Berdasarkan dari toksisitas *nitric oxide* (NO) berkaitan dengan kemampuan dalam bergabung dengan *singlet oxygen* ( $O_2^-$ ) untuk membentuk peroksnitric ( $ONOO^-$ ), yaitu sebuah radikal bebas pengoksidasi yang mampu menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA, oksidasi lipid dan protein. Aktivitas *nitric oxide* (NO) yang berlebih serta akan memacu terjadinya kerusakan sel dan jaringan akibat stress oksidatif dan inflamasi.

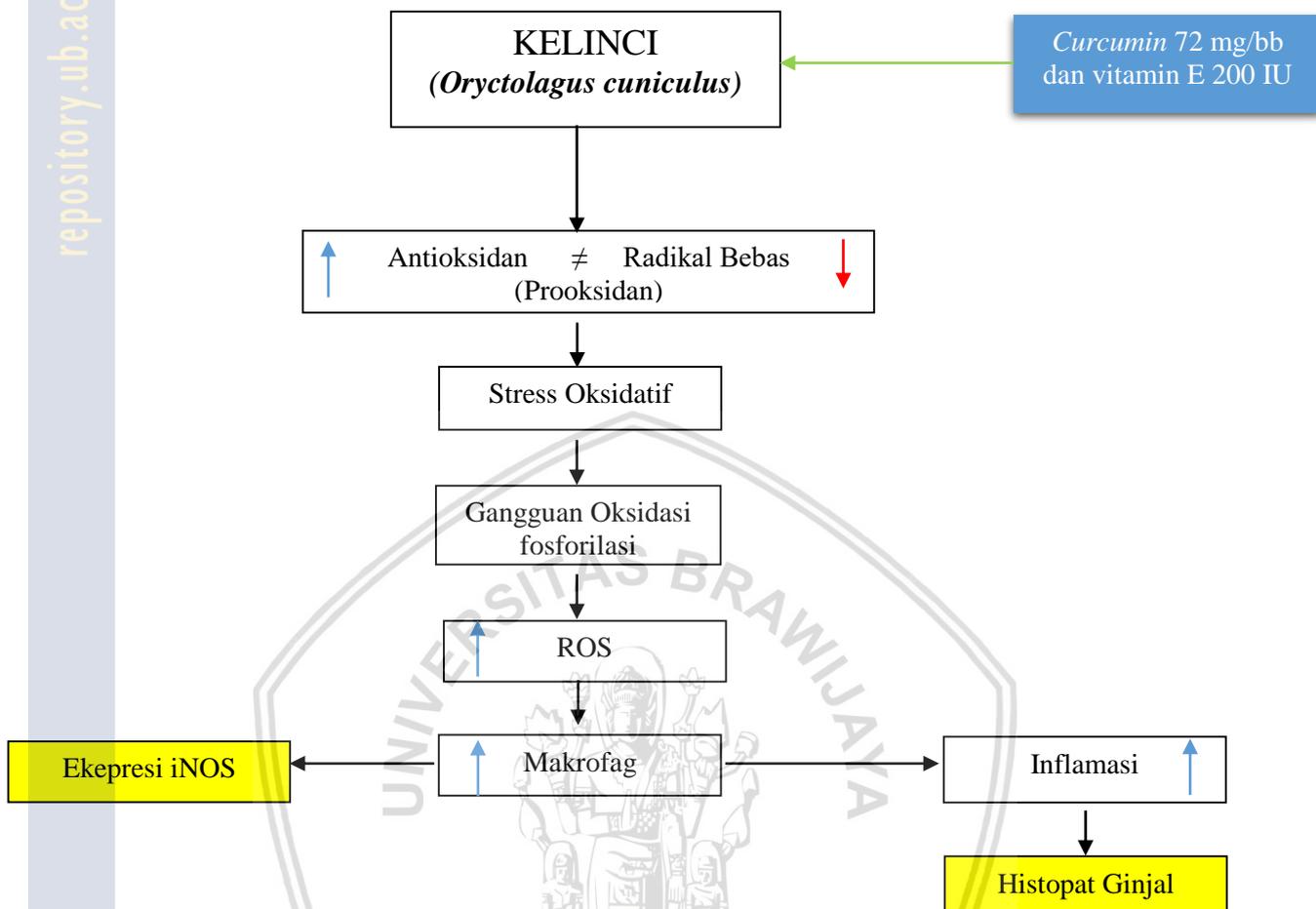
Pada sistem imun seluler, sel T yang terstimulasi oleh antigen akan mengaktivasi makrofag untuk melakukan proses fagositosis. Menurut Tomer (2003), makrofag dapat melaksanakan fungsi efekturnya setelah diaktivasi oleh *macrophage activating factors* (MAP). Aktivasi MAP mampu mengkonversikan molekul *reactive oxygen intermediate* (ROI) dan memproduksi *nitric oxide* (NO) (Tomer, 2003). Proses dalam menghasilkan ROI ini disebut *respiratory burst* (Baratawidjaya, 2010). *Nitric oxide* (NO) yang selanjutnya dimetabolisme menjadi *reactive nitrogen intermediate* (RNI). *Reactive oxygen intermediate* (ROI) dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) memiliki peranan penting sebagai mediator sitotoksik makrofag melawan antigen intraseluler (Bogdan *et al.*, 2000).

Secara biologis *nitric oxide* (NO) bertindak sebagai mediator inflamasi untuk mempertahankan fungsi homeostasis tubuh. Pada kondisi inflamasi, NO dihasilkan sebagai regulator dan efektor. Salah satu fungsi efektor nitric oxide adalah toksisitasnya terhadap tumor, antigen dan sel tubuh yang tampak pada patogenesis kerusakan jaringan. Banyak tipe sel yang merespon penyebab inflamasi dengan mengekspresikan iNOS (Ariesta, 2011).



## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1** Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan gambar :

- : Terapi *curcumin* dan vitamin E
- : Parameter yang diamati ( Ekepresi *iNOS* dan Histopatologi ginjal)
- : Menstimulasi
- : peningkatan (efek *curcumin* dan vitamin E)
- : penurunan akibat aktivitas peningkatan antioksidan
- : induksi

Secara farmakokinetik, obat yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi. Ginjal merupakan organ ekskresi utama yang sangat penting untuk mengeluarkan sisa-sisa metabolisme tubuh, termasuk zat-zat toksik yang tidak sengaja masuk ke dalam tubuh (Agustie, 2006).

*Curcumin* merupakan senyawa polifenolik dan memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiproliferasi dan pemacu proses apoptosis. Vitamin E melalui percobaan *in vitro*, ternyata diketahui mempunyai efek antioksidan dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroxidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Prooksidan merupakan sifat senyawa yang dapat mendorong oksidasi pada komponen sel yang melibatkan senyawa radikal bebas dan berujung terjadinya reaksi berantai. Hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif.

Dalam tubuh kelinci dapat terbentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terdiri atas radikal superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $OH^-$ ), radikal peroksil ( $ROO^-$ ). Stres oksidatif menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi ROS. Peningkatan produksi ROS meningkatkan fagositosis dari makrofag. Peningkatan ROS akan mengaktivasi makrofag dan memediasi munculnya mediator inflamasi dan kerusakan pada jaringan.

Produksi *nitric oxide* (NO) menunjukkan adanya pertahanan imun yang dapat dilihat melalui ekspresi *nitric oxide synthase* (iNOS). NO dihasilkan oleh makrofag teraktivasi berperan dalam vasodilatasi lokal dan inhibisi agregasi

trombosit. Ito *et al.*, (2003) menyatakan bahwa aktivasi iNOS akan menyebabkan terbentuknya NO dalam jumlah yang besar dan menunjukkan bahwa *Larginine* tersedia dalam jumlah yang cukup. Pada ginjal ekspresi iNOS terjadi pada kondisi patologis dimana terjadi infiltrasi makrofag pada glomerulus dan tubulus.

Peningkatan jumlah radikal bebas disebabkan oleh peningkatan aktivasi sel-sel inflamatori seperti makrofag. Peningkatan jumlah radikal bebas di dalam jaringan mengakibatkan terjadinya kerusakan terhadap struktur membran jaringan ginjal. Perubahan struktur membran yang terjadi akibat kerusakan mempengaruhi fungsi jaringan secara normal. Menurut Noer (2010), ROS dapat mengakibatkan fibrosis pada sel-sel epitel organ ginjal.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E tidak berpengaruh toksik terhadap ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan perubahan histopatologi ginjal Kelinci.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni - Juli 2015. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dan betina, umur 10 - 12 minggu, berat badan 1500 g. Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, sehingga estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok. Sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (P1) yang terdiri dari 4 ekor kelinci, 2 jantan dan 2 betina, kelompok

kelinci jantan yang diberi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari (P2), kelompok kelinci betina yang diberi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari. (P3), kelompok kelinci jantan yang diberi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P4), kelompok kelinci betina pemberian kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P5). Kelompok P1 merupakan kelinci yang tidak diberi kombinasi *curcumin* dan vitamin. Dosis *curcumin* yang digunakan adalah 72 mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU.

**Tabel 4.1** Rancangan kelompok penelitian

Kelompok	Variabel yang diamati			
	Ekspresi iNOS dan histopatologi ginjal			
	1	2	3	4
kelompok kontrol negatif (P1)				
kelompok jantan diberi kombinasi <i>curcumin</i> dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari (P2)				
kelompok betina diberi kombinasi <i>curcumin</i> dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari (P3)				
kelompok jantan diberi kombinasi <i>curcumin</i> dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 28 hari (P4)				
kelompok betina diberi kombinasi <i>curcumin</i> dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 28 hari (P5)				

#### 4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Lama pemberian terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E
- Variabel tergantung : Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan gambaran histopatologi ginjal
- Variabel kendali : jenis kelamin, umur dan berat badan kelinci, lingkungan, pakan dan minum

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang kelinci, timbangan, tempat pakan, tempat minum, alat sonde lambung, gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, *microtube*, *micropipete*, tabung reaksi, labu ukur (10 ml, 50 ml, 100 ml), pipet tetes, mikro pipet (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L), alat sentrifugasi, erlenmeyer, rak tabung reaksi, penangas air, spuit, *scalpel*, tempat fiksasi, penjepit, neraca analitik, objek glass, lemari pendingin, oven, alat sentrifugasi, inkubator, vortex, mikroskop dan *autoclave*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dan betina dengan berat rata-rata 1500 gram, kloroform 10%, *curcumin*, vitamin E, pakan kelinci, alkohol 70%, *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4, PFA 10%, NaCl fisiologis, akuades, plastik klip, kit iNOS, xylol, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, antibodi anti-rat iNOS, Dako *labeled streptavidin biotin* (Denko) *system-HRP* (berisi *anti rabbit IgG biotin labeled* dan Strepto-avidin peroksidase), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hematoksilinn, Eosin, Entellan dan Parafin.

#### 4.6 Tahapan Penelitian

Skema kerja pada penelitian ini dapat dilihat dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Persiapan hewan coba
2. Pemberian obat kombinasi *curcumin* dan vitamin E
3. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ ginjal
4. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi ginjal
5. Pengamatan ekspresi iNOS dengan pewarnaan imunohistokimia
6. Analisis data

#### 4.7 Cara Kerja Penelitian

#### 4.7.1. Persiapan Hewan Coba

Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor, dibagi menjadi 5 kelompok (**Tabel 4.1**). Kelinci diaklimatisasi selama 1 minggu. Pada masing-masing kandang, diberi makan satu hari dua kali dan diberi air minum secara *ad libitum*. Selama penelitian kelinci ditempatkan di kandang hewan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.

#### 4.7.2. Pemberian Obat Kombinasi *Curcumin* Dan Vitamin E

Pemberian kombinasi *curcumin* dosis 72 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU dilakukan secara sonde lambung per oral dengan volume pemberian sebanyak 2 ml per ekor. Perhitungan dosis yang diberikan tertera pada **Lampiran 5**. Pemberian obat dilakukan selama 14 hari untuk kelompok P2 dan P3, sedangkan untuk P4 dan P5 obat diberikan selama 28 hari.

#### 4.7.3. Pembedahan Hewan Coba Dan Isolasi Organ Ginjal

Hewan coba dieuthanasi dengan cara memasukkan ke dalam wadah berisi kloroform 10%. Setelah kondisi hewan mati, hewan diposisikan rebah dorsal kemudian disayat pada bagian abdomen dari cranial ke caudal. Kemudian diambil organ ginjal. Organ ginjal yang telah diambil, dicuci dengan NaCl fisiologis untuk selanjutnya disimpan dan direndam dalam pot berisi PFA 10%. Harus dipastikan bahwa organ benar-benar terendam seluruhnya dalam larutan PFA.

#### 4.7.4. Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal

Proses pembuatan preparat histopatologi organ ginjal diawali dengan fiksasi organ ginjal, yang dilakukan dengan perendaman ginjal dalam larutan PFA 4%. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan

materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam larutan PFA 4%.

Dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95% dan 100%.

Tahap penjernihan dilakukan mulai pemindahan jaringan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II, dan Xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator). Proses infiltrasi kemudian dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C (Junquiera dan Carneiro, 2007).

*Embedding* dilakukan dengan cetakan yang didalamnya diisi paraffin cair, setelah membeku cetakan tersebut dipotong-potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 µm. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberi warna biru (basofilik). Eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberi warna merah muda. Diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan selama 3 menit. Sediaan dicuci dengan

air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan air akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Sediaan kemudian dapat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Setelah sediaan terwarnai dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik lalu dilanjutkan dengan alkohol proses *clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit kemudian dikering anginkan, selanjutnya dilakukan *mounting* (perekatan) dengan *entellan* (Suntoro, 1983).

Pengamatan histopatologi ginjal yaitu dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi ginjal dilakukan dengan mengamati perubahan dari jaringan ginjal dengan perbandingan kontrol negative yang ada dalam perlakuan

#### **4.7.5. Pengamatan ekspresi iNOS dengan metode imunohistokimia**

Imunohistokimia diawali dengan tahapan pada xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (98%, 95%, 90%, 80%, 70%), dan aquades. Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Preparat ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Bloking dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang mengandung 0,25% teilon x-100 selama 1 jam. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibody primer (*anti rat iNOS*) selama semalam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Diinkubasi menggunakan antibody sekunder berlabel biotin (*goat anti rat biotin labeled*) selama 1 jam pada suhu

ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Ditetesi dengan SAHRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 40 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama lima menit tiga kali.

Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Henotoxylen* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringanginkan. Preparat *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat positif mengekspresikan iNOS apabila terdapat warna coklat pada preparat. Pengamatan dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan 5 lapang pandang, kemudian dihitung menggunakan program *ImmunoRatio*.

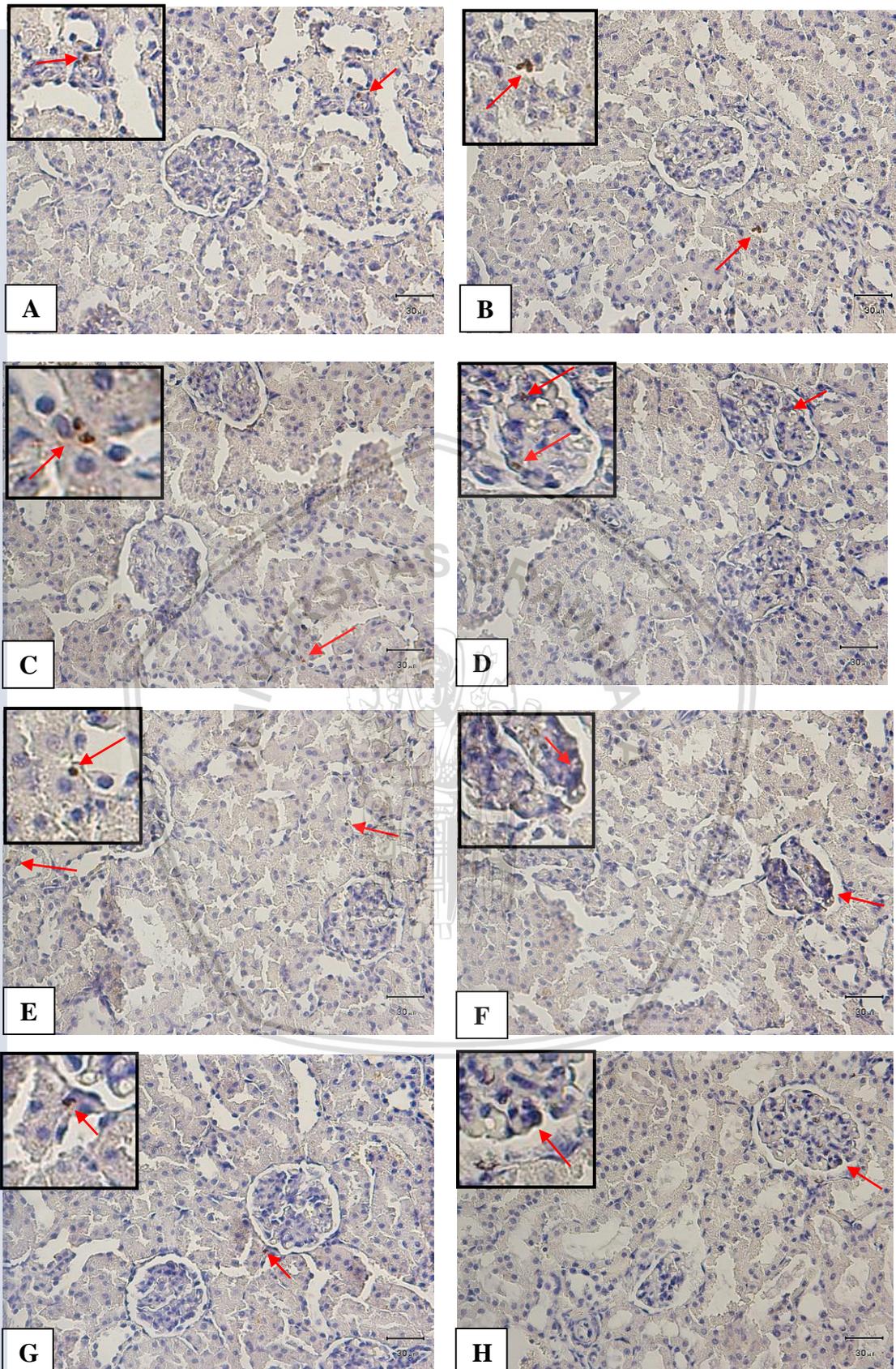
#### **4.7.6. Analisis data**

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi glomerulus ginjal dan kuantitatif untuk ekspresi iNOS menggunakan *software Immunoratio*. Data rata-rata ekspresi iNOS yang diperoleh ditabulasi menggunakan *Microsoft Excel 2010* kemudian di analisa secara statistika kuantitatif dengan uji Uji T (*T test*) parametrik tidak berpasangan dengan bedanya nyata  $\alpha=0,05$  (Kusriningrum, 2008).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Pengaruh Pemberian Obat Herbal Terstandart Berbahan Utama Kombinasi *Curcumin* Dan Vitamin E Terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) Pada Organ Ginjal Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*)

*Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) merupakan respon terhadap tekanan yang dapat menyebabkan radang pada banyak tipe sel. Keberadaan iNOS menunjukkan adanya produksi NO dalam jumlah besar sebagai pertahanan imun. Menurut Ferrini *et al.* (2003), pada kondisi normal iNOS yang diaktifkan oleh *interferon-gamma* (IFN- $\gamma$ ) berperan dalam fagositosis. iNOS mengkatalis pembentukan *nitric oxide* (NO). *Nitric oxide* (NO) berperan untuk homeostasis pembuluh dengan menghambat kontraksi otot polos pembuluh darah, agregasi platelet, dan adesi leukosit pada endotel. Nilai rata-rata ekspresi iNOS pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Pengamatan pengaruh pemberian kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU terhadap ekspresi iNOS pada penelitian ini dapat diamati dengan menggunakan metode imunohistokimia. Ekspresi iNOS pada organ ginjal kelinci dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



**Gambar 5.1** Ekspresi iNOS pada organ ginjal kelinci (400x)

Keterangan: (A) Kelompok kontrol negatif 14 hari, jantan (P1a); (B) Kelompok pemberian 14 hari, jantan (P2); (C) Kelompok kontrol negatif 14 hari, betina (P1b); (D) Kelompok pemberian 14 hari betina (P3); (E) Kelompok kontrol negatif 28 hari, jantan (P1c); (F) Kelompok pemberian 28 hari, jantan (P4); (G) Kelompok kontrol negatif 28 hari, betina (P1d); (H) Kelompok pemberian 28 hari, betina (P5). Tanda panah (↗) menunjukkan ekspresi iNOS.

Ekspresi iNOS pada ginjal ditunjukkan dengan adanya warna coklat (**Gambar 5.1**). Hasil tersebut diamati menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia (IHK) yang ditunjukkan dengan area berwarna kecoklatan pada irisan jaringan. Area berwarna kecoklatan muncul disebabkan adanya ikatan antara antigen pada jaringan yaitu iNOS dengan antibodi rat anti iNOS yang ditambahkan. Menurut Duerr (2006) antibodi primer berikatan dengan antigen pada jaringan dan antibodi sekunder berlabel biotin. Pemberian antibodi sekunder diikuti penambahan *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) dan substratnya berupa *Diaminobenzidine* (DAB). *Diaminobenzidine* (DAB) merupakan substrat dari peroksidase yang menghasilkan warna kecoklatan pada jaringan.

Hasil imunohistokimia pada ginjal kelompok kelinci jantan kontrol negatif 14 hari (P1) didapatkan ekspresi iNOS dalam jumlah sedikit yang ditunjukkan dengan sedikitnya warna coklat pada jaringan (**Gambar 5.1-A**). Pada kelompok kelinci jantan yang diberi kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 14 hari (P2), menunjukkan ekspresi iNOS dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan kelompok jantan P1 (**Gambar 5.1-B**). Hasil imunohistokimia pada ginjal kelompok kelinci jantan kontrol negatif 28 hari (P1), terlihat ekspresi iNOS dalam jumlah sedikit yang ditunjukkan dengan sedikitnya warna coklat pada jaringan (**Gambar 5.1-E**). Pada kelompok kelinci jantan yang diberi kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 28 hari (P4), menunjukkan ekspresi iNOS dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan kelompok jantan P1 (**Gambar 5.1-F**).

Pada ginjal kelinci betina kontrol negatif 14 hari (P1), ekspresi iNOS dalam jumlah sedikit ditunjukkan dengan sedikitnya warna coklat pada jaringan (**Gambar**

**5.1-C).** Pada kelompok kelinci betina yang diberi kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 14 hari (P3), ekspresi iNOS dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan kelompok betina P1 (**Gambar 5.1-D**). Pada ginjal kelinci betina kontrol negatif (P1) 28 hari ekspresi iNOS dalam jumlah sedikit ditunjukkan dengan sedikitnya warna coklat pada jaringan(**Gambar 5.1-G**). Pada kelompok kelinci betina yang diberi kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 28 hari (P4), ekspresi iNOS dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan kelompok betina P1 (**Gambar 5.1-H**). Perbandingan rata-rata ekspresi iNOS pada organ ginjal disetiap perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Ekspresi iNOS pada organ ginjal kelinci

Kelompok	Ekspresi iNOS ± Standar Deviasi	peningkatan ekspresi iNOS (%)
Jantan kontrol (-) 14 hari (P1a)	4,70 ± 0,031	-
Jantan terapi 14 hari (P2)	5,025 ± 0,330	0,065
Betina kontrol (-) 14 hari (P1b)	4,625 ± 0,462	-
Betina terapi 14 hari (P3)	5,197 ± 0,201	0,11
Jantan kontrol (-) 28 hari (P1c)	5,25 ± 0,557	-
Jantan terapi 28 hari (P4)	6,15 ± 0,676	0,146
Betina kontrol (-) 28 hari (P1d)	6,245 ± 0,482	-
Betina terapi 28 hari (P5)	6,84 ± 0,237	0,087

Berdasarkan hasil analisa statistika menggunakan uji T tidak berpasangan (*Independent sample T test*), ekspresi iNOS antara kelompok P1a (kelinci jantan tanpa diberikan terapi selama 14 hari) dengan kelompok P2 (kelinci jantan diberi terapi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) (**Lampiran 9**). Pada kelompok jantan P2 ( $5,025 \pm 0,330$ ) apabila dibandingkan dengan kelompok P1a ( $4,70 \pm 0,031$ ), terjadi peningkatan

ekspresi iNOS sebesar 0,065% setelah diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian obat herbal berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari tidak meningkatkan ekspresi iNOS organ ginjal pada kelinci jantan secara signifikan.

Berdasarkan nilai rata-rata ekspresi iNOS organ ginjal kelinci betina pada perlakuan tanpa diberikan terapi selama 14 hari ( $P1b = 4,625 \pm 0,462$ ) hampir sama dengan rata-rata ekspresi iNOS organ ginjal kelinci betina pada perlakuan pemberian terapi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari ( $P3 = 5,197 \pm 0,201$ ). Berdasarkan hasil analisa statistika, peningkatan yang terjadi pada kelompok P3 sebesar 0,11% menunjukkan bahwa pemberian obat herbal berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari tidak meningkatkan ekspresi iNOS organ ginjal pada kelinci betina secara signifikan ( $p > 0,05$ ) (**Lampiran 9**).

Berdasarkan nilai rata-rata ekspresi iNOS organ ginjal kelinci jantan pada perlakuan tanpa diberikan terapi selama 28 hari ( $P1c = 5,25 \pm 0,557$ ) hampir sama dengan rata-rata ekspresi iNOS organ ginjal kelinci jantan pada perlakuan pemberian terapi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari ( $P4 = 6,15 \pm 0,676$ ). Berdasarkan hasil analisa statistika, peningkatan yang terjadi pada kelompok P3 sebesar 0,146% menunjukkan bahwa pemberian obat herbal berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari tidak meningkatkan ekspresi iNOS organ ginjal pada kelinci jantan secara signifikan ( $p > 0,05$ ) (**Lampiran 9**).

Berdasarkan hasil analisa statistika menggunakan uji T tidak berpasangan (*Independent sample T test*), ekspresi iNOS antara kelompok P1d (kelinci betina tanpa diberikan terapi selama 28 hari) dengan kelompok P5 (kelinci betina diberi terapi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari) menunjukkan perbedaan yang tidak

signifikan ( $p > 0,05$ ) (**Lampiran 9**). Pada kelompok betina P5 ( $6,84 \pm 0,237$ ) apabila dibandingkan dengan kelompok P1d ( $6,245 \pm 0,482$ ), terjadi peningkatan ekspresi iNOS sebesar 0,087% setelah diberikan kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian obat herbal berbahan utama kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari tidak meningkatkan ekspresi iNOS organ ginjal pada kelinci betina secara signifikan.

Peningkatan ekspresi iNOS pada setiap kelompok perlakuan dapat terjadi karena peningkatan konsentrasi antioksidan dari *curcumin*, sehingga terjadi prooksidan. Prooksidan yang terjadi dapat menyebabkan stress oksidatif dalam jaringan akan tetapi kemudian dapat distabilkan oleh  $\alpha$ -tocopherol dari vitamin E. Senyawa  $\alpha$ -tocopherol yang merupakan antioksidan aktif membersihkan radikal bebas, dan melindungi membran sel dari degenerasi oksidatif. Hal tersebut menyebabkan terjadinya perbedaan yang tidak signifikan ( $p > 0.05$ ).

Venkatesan *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa *curcumin* merupakan senyawa polifenolik yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiproliferasi dan pemacu proses apoptosis. Pemberian *curcumin* dengan dosis yang tepat dapat mengurangi radikal bebas di dalam tubuh, sedangkan pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Prooksidan yang meningkat dapat menyebabkan stress oksidatif, hal ini dapat menyebabkan adanya kenaikan ROS. Peningkatan ROS akan mengaktivasi makrofag dan dapat menyebabkan terjadinya peningkatan *Nitric oxide* (NO).

*Inducible nitric oxide synthase* (iNOS) merupakan katalisator produksi NO oleh makrofag yang membantu proses fagositosis. Peningkatan jumlah NO akan

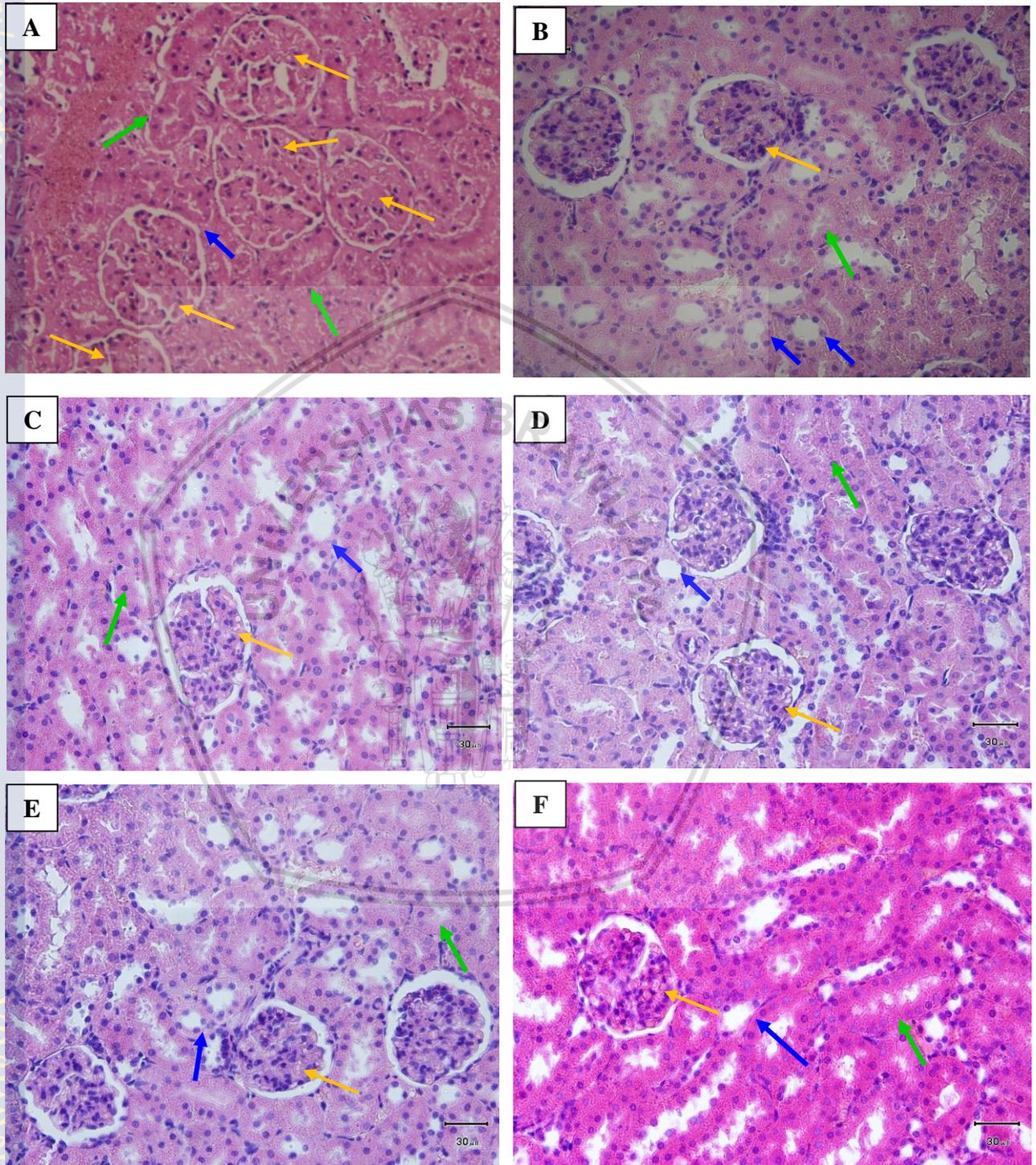
menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada jaringan (Velkeen *et al.*, 2000). Percobaan *in vitro* vitamin E, menunjukkan bahwa vitamin E mempunyai efek antioksidan dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroxidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif (Ela, 2005). Vitamin E diketahui mengandung senyawa *α-tocopherol* yang merupakan antioksidan yang dapat menstabilkan radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga terbentuk molekul yang stabil dan mengakhiri reaksi radikal bebas (Bucioli *et al.*, 2011).

Antioksidan tidak hanya penting untuk menghalangi terjadinya stres oksidatif dan kerusakan jaringan, tetapi juga berperan dalam mencegah peningkatan produksi sitokin proinflamasi. Hal tersebut akan menyeimbangkan jumlah radikal bebas (NO), sehingga stres oksidatif akan terhenti dan respon inflamasi yang diakibatkan peroksidasi lipid tidak akan terjadi (Youngson, 2005). Penurunan jumlah NO akan berbanding lurus dengan ekspresi iNOS (Velkeen *et al.*, 2000).

## **5.2. Pengaruh Pemberian Obat Herbal Terstandart Berbahan Utama Kombinasi *Curcumin* Dan Vitamin E Terhadap Histopatologi Organ Ginjal Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*).**

Pengaruh pemberian kombinasi *curcumin* dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 14 hari dan 28 hari terhadap organ ginjal kelinci diamati melalui gambaran histologi menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) secara mikroskopis dengan perbesaran 400x. Perbandingan hasil pengamatan preparat pada penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan pada penampang bagian korteks ginjal, perubahan struktur sel yang terjadi seperti glomerulus dengan Arenal corpusclenya dengan bagian – bagian sel kapiler dan inti selnya masih

tampak kompak, Tubulus Proximal juga terlihat sel – sel simpel kuboid, demikian juga dengan Tubulus Distal. (**Gambar 5.2**).



**Gambar 5.2** Gambaran histopatologi organ ginjal dengan pewarnaan HE (400x).

Keterangan: (A) kelompok kelinci jantan kontrol negatif (P1); (B) kelompok kelinci betina kontrol negatif (P1); (C) kelompok kelinci jantan terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari (P2); (D) kelompok kelinci betina terapi kombinasi *Curcumin* dan Vitamin E selama 14 hari (P3); (E) kelompok kelinci jantan terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P4); (F) kelompok kelinci betina terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 28 hari (P5). ↑ = glomerulus; ↑ = tubulus proksimal; ↑ = tubulus distal

Gambaran histologi organ ginjal pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada keadaan normal (kelompok P1/kontrol negatif) menunjukkan gambaran glomerulus dan tubulus ginjal tersusun beraturan dan memiliki batas yang jelas (**Gambar 5.2-A, dan Gambar 5.2-B**). Menurut Dellman and Eurel (2006), sel epitel selapis merupakan salah satu penyusun glomerulus dan lapisan parietal kapsula bowman. Menurut Noer (2010) berdasarkan histologi glomerulus (bersama *capsula bowman*) terletak di korpus malpighi, glomerulus pada keadaan normal merupakan kapiler-kapiler khusus yang berfungsi sebagai penyaring. Tubulus proksimal terlihat normal dengan memiliki *brush border* tampak jelas, serta tubulus distal normal terlihat dengan sel sel penyusunnya berbentuk kuboid.

Gambaran histopatologi organ ginjal hasil pemberian terapi kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 14 hari jantan (P2) (**Gambar 5.2-C**) dan betina (P3) (**Gambar 5.2-D**) tidak menunjukkan perbedaan jika dibandingkan dengan hasil histopatologi kelompok P1. Penampang bagian korteks ginjal terlihat normal dan tidak ada perubahan struktur sel yang terjadi seperti glomerulus dengan areal corpusclenya dengan bagian – bagian sel kapiler (podocyte, epithelial lamina basalis dan mesangial selnya) dan inti selnya masih tampak terlihat normal, Tubulus proksimal juga terlihat sel – sel simpel kuboid dengan inti sel yang normal demikian juga dengan tubulus distal.

Gambaran histopatologi organ ginjal hasil pemberian terapi kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dengan dosis 200 IU selama 28 hari jantan (P4) (**Gambar 5.2-E**) dan betina (P5) (**Gambar 5.2-F**) tidak

menunjukkan perbedaan jika dibandingkan dengan hasil histopatologi Kelompok negatif (P1). Bagian glomerulus terlihat masih kompak, sel epitel selapis kuboid masih jelas, dan masih terdapat *brush border* pada tubulus proksimal. Pada bagian tubulus distal, epitel kuboid dengan lumen tampak jelas.

*Curcumin* merupakan gugus polifenolik, pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Venkatesan, *et al.*, 2003). Prooksidan yang meningkat dapat menyebabkan stress oksidatif, hal ini dapat menyebabkan adanya kenaikan radikal bebas. Stres oksidatif menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi ROS. Peningkatan produksi ROS meningkatkan fagositosis dari makrofag. Peningkatan ROS akan mengaktivasi makrofag dan memediasi munculnya mediator inflamasi dan kerusakan pada jaringan (Thayyullathil *et al.*, 2008).

Keadaan ini dapat menyebabkan kelompok terapi 14 hari dan 28 hari baik jantan maupun betina mengalami stres oksidatif pada sel-sel organ ginjal, sehingga terjadi inflamasi pada ginjal, akan tetapi dari **Gambar 5.2** adanya perubahan yang tidak berbeda jauh pada perlakuan terapi 14 hari dan 28 hari di bandingkan kelompok kontrol negatif P1. Hal ini bisa terjadi karena adanya kombinasi dengan vitamin E. Di dalam lapisan fosfolipid, vitamin E berfungsi melindungi asam lemak jenuh menggandakan komponen membran sel dari oksidasi radikal bebas dengan cara memutus rantai peroksidasi lipid dan menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH pada cincin radikal bebas, sehingga terbentuk radikal vitamin E stabil dan tidak merusak. Vitamin E mengendalikan peroksida lipid dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi, menyekat aktivitas tambahan yang

dilakukan oleh peroksida, memutus reaksi berantai dan membatasi kerusakan (Houghton Mifflin Company, 2003).

Berdasarkan gambaran histopatologi ginjal ditunjukkan bahwa pemberian kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 dan 28 hari pada hewan coba tidak menunjukkan perubahan berarti ditinjau dari struktur jaringan glomerulus dan tubulus ginjal dengan tidak terdapatnya infiltrasi sel inflamasi sehingga dosis yang diberikan tergolong aman dan tidak bersifat toksik terhadap fungsi fisiologis jaringan ginjal. Sehingga penggunaan obat kombinasi *curcumin* dan vitamin E aman di gunakan untuk pemakaian obat terapi pada klinik.



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Peningkatan ekspresi iNOS yang terjadi pada pemberian terapi kepada kelinci jantan dan betina, kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari dan 28 hari menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari dan 28 hari tidak bersifat toksik pada organ ginjal kelinci jantan dan betina.
2. Pemberian terapi kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari dan 28 hari tidak menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi pada glomerulus dan tubulus organ ginjal kelinci jantan dan kelinci betina.

### 6.2 Saran

Penelitian ini dapat di jadikan sebagai acuan produksi obat herbal terstandart kombinasi *curcumin* dan vitamin E sehingga kedepan dapat di produksi obat herbal secara masal.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Peningkatan ekspresi iNOS yang terjadi pada pemberian terapi kepada kelinci jantan dan betina, kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari dan 28 hari menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi *curcumin* dan vitamin E selama 14 hari dan 28 hari tidak bersifat toksik pada organ ginjal kelinci jantan dan betina.
2. Pemberian terapi kombinasi *curcumin* dengan dosis 72mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 IU selama 14 hari dan 28 hari tidak menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi pada glomerulus dan tubulus organ ginjal kelinci jantan dan kelinci betina.

### 6.2 Saran

Penelitian ini dapat di jadikan sebagai acuan produksi obat herbal terstandart kombinasi *curcumin* dan vitamin E sehingga kedepan dapat di produksi obat herbal secara masal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina Konginan. 2008. Depresi Pada Penderita Kanker. [http://www.palliativesurabaya.com/gambar/pdf/buku\\_pkb\\_vibagian\\_1408082008.pdf](http://www.palliativesurabaya.com/gambar/pdf/buku_pkb_vibagian_1408082008.pdf).14 Agustus 2008.
- Aktan, F. 2004. INOS-mediated Nitric Oxide Production and Its Regulation Sciences 75: 639-653
- Alderton, W.K., C.E. Cooper and R.G. Knowles. 2001. Nitric Oxide Synthases: Structure, Fuction and Inhibition. *Biochem J*,357: 593-615.
- Allen SW, Mahaffey EA. 1989. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *J.Am.Anim.Hos. Ass.*;25 (5):540–546.
- Amstrong W.P. 2009. Chemical Stucture and Antioaxidant Effect Of Flavonoid. <http://waynesword.palomar.edu/chemid2.htm>. 22 Agustus 2006
- Ariesta, R.L. 2011. Aktifitas Superoksida Dismute (SOD), Kadar Malondialdehid (MDA), Ekspresi INOS dan Gambaran Histopatologi Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Melitus tipe I yang Mendapat Terapi Ekstrak Temu Giring [M.Sc. Thesis]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.
- Baba AI, Rotaru O, Cristea I, Elefterescu H. *Diagnosticul histopatologic postoperator al tumorilor mamare la cățea*. Bul. Inst. Agronomic, Zoot. - Med. Vet. Cluj-Napoca. 1985:43–50.
- Baratawidjaja, K. G., dan I. Rengganis. 2010. Imunologi Dasar. Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bauman, L. and E. Weisberg. 2002. Antioxidants. Mc Graw Hill. New York
- Burek, C. Lynne and N. R. Rose. 2008.Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmunity Rev* 7:530–537.
- Besselsen, D.G. 2004. Biology of Laboratory Rodent. <http://www.arizona.edu/>
- Bucioli, S.A., L.C. De Abreu, V.E. Valenti, C. Leone and H. Vannuchi. 2011. Effect of Vitamin E Supplementation on Renal Non-enzymatic Antioxidant in Young Rats Submitted to Exhaustive Exercise Stress. *Journal BMC Complementary Medicine*,11:133-138.
- Budyanto, K.A.M.H. 2002. Dasar-dasar ilmu gizi. UMM Press. Malang.
- Bostock DE. Canine and feline mammary neoplasm. *Br. Vet. J.* 1986;142

- Bostock DE, Moriarty J, Crocker J. *Correlation between Histologic Diagnosis Mean Nucleolar Organizer Region Count and Prognosis in Canine Mammary Tumours*. *Vet. Pathol.* 1992;29:381–385. [PubMed]
- Brearley MJ. *Mammary gland tumours in the dog. Practice*, Nov. 1989:248–253.
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma. Thorax Vol 59(2):170-173*
- Chatzantinou, C. and J.C. Dussaule. 2005. Insight into Mechanism of Renal Fibrosis : is it Possible to Achieve Agression. *American Journal Phisiology*,289: F227-F234.
- Chow, F. Y., D. J. N. Paterson., R. C. Atkins and G. H. Tesch. 2004. Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2987–2996 doi:10.1093/ndt/gfh441
- Cho, M. H. 2010. Renal Fibrosis. *Korean Journal of Pediatr.* Kyungpook National University School of Medicine Daegu. p.735-740.
- Colombo, M.L. 2010. An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol Perspective. *Molecules Journal*,15: 2103-2113
- Damron, F., E. Skarmoutsou and F. Stivala. 2003. State of The Art in Antigen retrieval for Immunohistochemistry. *Journal of Immunological methods*: 1-18.
- Dellmann, H.D and J.A. Eurell. 2006. Textbook of Veterinary Histology. 6<sup>th</sup> edition. USA: Blackwell Publishing.
- Duerr, J.S. 2006. Immunohistochemistry. Department of Biological sciences Ohio University. USA.
- Eddy, E.A. 2000. A Molecular Basis of Renal Fibrosis. *Pediatr Nephro Journal*,15:290-301.
- Fisbach, Frances and M.B. Dunning III. 2009. A Manual of Laboratory and Diagnostic Test. US : The Point
- Fogo, A.B. 2012. Inflammation and Fibrosis: Interaction and Impact on the kidney. Department of Pathology, Microbiology and Immunology Vanderbilt University Medical Center. Nashville.
- Fogo, A.B. and V. Kon. 2004. Pathophysiology of Progressive Renal Disease. In Avner E.D., Harmon W.E., Niaudet P. Eds. *Pediatric Nephrology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- Fryer, M.J . 2000. Vitamin E as a Protective Antioxidant in Progressive Renal Failure. *Journal of Renal Patophysiology* 5: 1-5.

- Galiano, R.D. and T.A. Mustoe. 2007. Wound Care. In Thorne, C.H. Grabb and Smith's Plastic Surgery 6<sup>th</sup> Ed. Lippincot and Williams. Philadelphia.
- Gurtner, G.C. 2007. Wound Healing: Normal and Abnormal. in Thorne CH, Editing. Grabb and Smith's Plastic Surgery. Edisi ke-6. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hancock, J.T., R. Desikin, and S.J. Neil. 2001. Biochemical Transaction. Biochem. Soc. Trans 29:345-350.
- Hirschberg, R. 2005. Wound Healing in the Kidney: Complex Interactions In Renal Interstitial Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 9–11.
- Hu, Kebin, M.M. Wendy and L. Youhua. 2008. Novel actions of tissue-type plasminogen activator in chronic kidney disease. *Frontiers in Bioscience* 13: 5174-5186.
- Jones, L.K. , K. M. O'Sullivan, T. Semple, M. P. Kuligowski, K. Fukami, F. Y. Ma, D. J. Nikolic-Paterson , S. R. Holdsworth and A. R. Kitching. 2009. *IL-1 R1* Deficiency ameliorates Early Experimental Renal Interstitial Fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2009) 24 (10): 3024-3032.
- Kathryne, M.J. and B. Robaire. 2004. The Effect of Long-term Vitamin E Treatment on Gene Expressions and Oxidative Stress Damage in The Aging Brown Norway Rat Epididimis. *Journal Biology of Reproduction* 71: 1088-1095.
- Katzung B. G. 2006. Basic and Clinical Pharmacology, 10<sup>th</sup> Edition. San Fransisco.
- Klahr. S., and J. Morrissey. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *American Journal of Physiology* Vol. 283 no. F861-F87
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lee, J.U. 2008. Nitric Oxide in the Kidney : Its Phisiological Role and Patophysiological implications. *Electrolite and Blood Pressure* 6: 27-34.
- Lefebvre, S. 2011. Literature Review – Epidemiology of Feline Chronic Kidney Disease. Banfield Applied Research and Knowledge (BARK) Team
- Liu, Y. 2006. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213–217, 2006.
- Lukito, P.F. 2013. Studi Ekspresi ECadherin dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Fibrosis Ginjal Pasca Induksi Streptokinase.
- Mescher, A.L. 2012. Jonquiera's Basics Histology Text and Atlas, 13<sup>th</sup>. Ed. Mc-Graw Hill. New York.

- Noer, M.S., 2010. Evaluasi Fungsi Ginjal secara Laboratorik (Laboratoric Evaluation on Renal Function). Lab-SMF Ilmu Kesehatan Anak FK Unair. Surabaya.
- Pardede, S. O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus. Divisi Nefrologi Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pranay, K. and M.C. Stoppler. 2010. Chronic Kidney Disease. Available from: < <http://www.emedicinehealth.com> > [Diakses tanggal 12 Desember 2013].
- Sampurno. 2011. Obat herbal dalam prespektif medik dan bisnis. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Saran, R., J.E. Novak, A. Desai, E. Abdulhayoglu, J.S. Warren, R. Bustami, G.J. Handelman, D. Barbato, W. Weitzel, L.G. D'Alecy and S. Rajagopalan. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD). *Oxford medicine journal* 18: 2415-2420.
- Sumadi. Sadar Rasidan, Budi Rachman, Dan Deni Ramdani 2013. Gambaran Biologik Hewan Percobaan Kelinci. Unit Hewan Percobaan dan Limbah Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor, 16340
- Veelken, R., K.F. Hilgers, A. Hartner, A. Hass, K.P. Bohmer and R.B. Sterzel. 2000. Nitric Oxide Synthase Isoform and Glomerular Hyperfiltration in Early Diabetic Nephropaty. *J Am Soc Nephrol* 11: 71-79.
- Vega, F.N., P. Majano, E. Larranaga, B.J.Miguel, R.R. Rodriguez, R.A. Gonzales, and M. Marazuela. 2008. *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Exspression in Autoimmune Thyroid Disorders (AITD)*. *Journal Endocrinology Rev.I*.
- Wati I.P, Aulanni'am dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease Dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cyclosporine-A*. *Kimia Student journal*, Vol. 1, No. 2, Pp. 257-263 Universitas Brawijaya. Malang.
- Widiastuti. 2010. *Perbedaan Kadar Nitric Oxide dan Derajat Stenosis pada Penderita Penyakit Jantung Koroner dengan dan tanpa Diabetes Melitus*. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.Semarang
- Youngson, Robert. 2005. Antioksidan: Manfaat Vitamin E dan C bagi Kesehatan. Arcan. Jakarta.