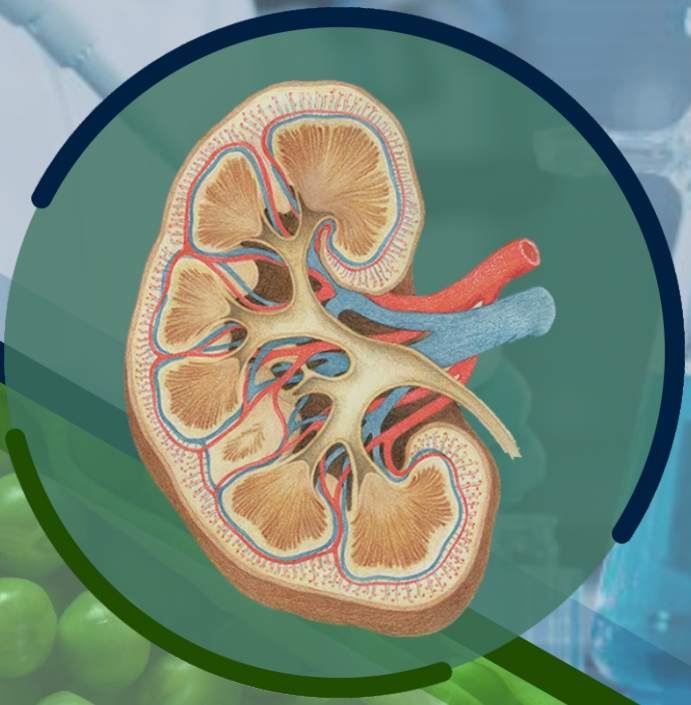
MEILINAH HIDAYAT

HIDROLISAT PROTEIN DARI KACANG POLONG HIJAU (*Pisum sativum.* L) UNTUK PENYAKIT GINJAL KRONIS



MONOGRAF

ALFABETA

Dr. dr. Meilinah Hidayat, M.Kes.

MONOGRAF
HIDROLISAT PROTEIN DARI KACANG POLONG (*Pisum sativum.* L) UNTUK TERAPI PENYAKIT GINJAL KRONIS

PENERBIT ALFABETA BANDUNG

UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA NOMOR 19 TAHUN 2002
TENTANG HAK CIPTA PASAL 72 KETENTUAN PIDANA
SANKSI PELANGGARAN

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak mengumumkan atau memperbanyak suatu ciptaan atau memberikan izin untuk itu, dipidana dengan pidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyerahkan, menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
Dilarang keras memperbanyak, memfotokopi sebagian atau seluruh isi buku ini, serta memperjualbelikannya tanpa mendapat izin tertulis dari Penerbit.

© 2018, Penerbit Alfabeta, Bandung

Kes38 (xx + 262) 14,5 x 20.5 cm

Judul Buku	:	Monograf Hidrolisat Protein dari Kacang polong (*Pisum sativum.* L) untuk Terapi Penyakit Ginjal Kronis
Penulis	:	Dr. dr. Meilinah Hidayat M.Kes.
Ilustrasi Gambar	:	Geary Giaviany, Luqyani Maryam
Desain Cover	:	Luqyani Maryam
Penerbit	:	ALFABETA, cv Jl. Gegerkalong Hilir No. 84 Bandung Telp. (022) 200 8822 Fax. (022) 2020 373 Website: www.cvalfabeta.com Email: alfabetabdg@yahoo.co.id
Cetakan Kesatu	:	Oktober 2018
ISBN	:	978-602-289-453-7

Anggota Ikatan Penerbit Indonesia (IKAPI)

PRAKATA

Pertama-tama kami panjatkan rasa syukur dan terima kasih kami ke hadirat Tuhan Yang Mahakuasa atas kebaikan, rahmat, karunia serta perkenan-Nya jika kami mendapat kesempatan hibah pendampingan penulisan buku "Hidrolisat Protein dari Kacang Polong (*Pisum sativum*. L) untuk Terapi Penyakit Ginjal Kronis" ini.

Penulisan buku ini dimaksudkan untuk membagikan hasil temuan penelitian (Hibah LPPM 2017 dan PDUPT 2018 tahun pertama) penulis dalam usaha mendapatkan terapi untuk penyakit ginjal kepada para ilmuwan, peneliti, mahasiswa kedokteran, ilmu kesehatan dan masyarakat yang tertarik pada bidang penyakit ginjal.

Penyakit ginjal dapat menyerang semua usia baik yang sebelumnya menderita penyakit serius atau mengalami gangguan langsung pada ginjal itu sendiri. Nutrisi yang baik berperan penting dalam memelihara kesehatan serta menghambat progresivitas penyakit ginjal. Penderita perlu mendapat saran diet yang sebaiknya disantap serta menghindari bahan makanan dan minuman yang dapat memperberat penyakitnya.

Buku ini menuliskan hasil temuan penelitian yang telah dilakukan dan sari pengetahuan mengenai penyakit ginjal yang diperoleh dari berbagai pustaka, jurnal, buku teks, dan thesis. Dalam pelaksanaan penulisan buku ini, kami banyak mendapat bantuan dan dukungan dari banyak pihak. Pada kesempatan ini kami ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang memberikan bantuan dalam penulisan hingga penerbitan buku ini.

Kami menghaturkan terima kasih atas kesempatan dan bantuan dana hibah LPPM 2017, Hibah PDUPT 2018 dan hibah penulisan/ pendampingan buku Dikti RI yang telah diberikan. Ucapan terima kasih kami haturkan kepada Kemenristek Dikti Republik Indonesia, dan kepada Prof Armijn Z.R Langi selaku Rektor Universitas Kristen Maranatha, dan kepada ketua LPPM UK Maranatha Dr. Teresa L. Wargasetia, S.Si., M.Si. Ucapan terima kasih secara khusus kami haturkan kepada Bapak Prof. Dr. Zeily Nurachman, yang telah bersedia membantu sepenuh hati sebagai pendamping dalam penulisan buku ini, juga kepada Prof. Dr. Soetijoso Soemitro, yang banyak memberi inspirasi kepada penulis. Kepada bapak Arlanda dari Penerbit Alfabeta, terima kasih atas kesediaannya untuk membantu penerbitan buku ini. Terima kasih kepada Luqyani Maryam dan Geary Giaviany, murid yang sekarang telah menjadi teman sejawat dokter yang banyak membantu dalam ilustrasi gambar dan cover buku. Terima kasih untuk kerja sama penelitian yang baik untuk dr. Sijani Prahastuti, M.Kes., Prof. Andreanus A. Soemardji, D.E.A., Dr. Afrilia N. Garmana, Nova Suliska, S.Farm., M.Si., Dr. Khomaini Hasan, dan Dr. Bobby F. Assiddiq. Terima kasih atas kerjasama untuk mahasiswa Karya Tulis Ilmiah yang berperan dalam penelitian tahap pertama, Kirana Nugraha, Gabriella Audrey, Janifer Gabriella, Petrisia Luvina, Cicilia Liempapas, Vincensius Ferdinand, Nathania Crista Sutanto; juga mahasiswa Karya Tulis Ilmiah yang berperan dalam penelitian tahap ke dua, Gabriella Widya Arina, Silvia Saraswati Somya, Ricki Febriansyah, Audrey Aurelia dan Destiya Ulfa Riany. Rasa syukur dan terima kasih tak terhingga untuk keluarga tercinta, Tjandra Heru suami yang penuh pengertian, tulus dan penuh kasih, juga kedua buah hati tersayang Agustian Surya dan Gradi Desendra.

Akhir kata, kami berharap agar buku “Hidrolisat Protein dari Kacang Polong (*Pisum sativum*) untuk Terapi Penyakit Ginjal Kronis"

ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan, dunia penelitian serta peningkatan kesehatan masyarakat Indonesia, khususnya penderita penyakit ginjal. Semoga Tuhan Yang Mahakuasa memberkati semua hasil usaha dan pekerjaan kita semua. Amin.

Bandung Oktober 2018

Penulis

Buku ini didedikasikan
untuk almarhumah ibunda terkasih,
Lies Hidayat,
yang menginspirasi dengan prinsipnya:
perempuan harus mampu berdaya dan berkarya.
Juga untuk kedua ananda tersayang,
Agustian dan Gradi,
semoga buku ini menjadi secercah cahaya yang menginspirasi untuk terus berdaya dan berkarya
sepanjang hayat.

DAFTAR ISI

PRAKATA ..... **iii**
DAFTAR ISI ..... **vii**
DAFTAR GAMBAR ..... **xiii**
DAFTAR TABEL ..... **xix**

BAB I
PENDAHULUAN **1**
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Tujuan 6
1.3. Ruang Lingkup 6
DAFTAR PUSTAKA **8**

BAB II
GINJAL DAN FUNGSI UTAMANYA **10**
2.1. Anatomi Ginjal 10
2.2. Fungsi Ginjal 17
2.2.1. Filtrasi Glomerulus 18
2.2.2. Reabsorpsi Tubulus 19
2.2.3. Sekresi Tubulus 20
2.2.4. Ekskresi Urine dan Klirens Plasma 20
2.2.5. *Renal Blood Flow* (RBF) 20
2.2.6. Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) atau *Glomerular Filtration Rate* (GFR) 21
2.2.7. Beberapa Nilai dalam Kondisi Berbeda yang Mempengaruhi GFR 23
DAFTAR PUSTAKA **26**

BAB III
PENYAKIT GINJAL KRONIK (PGK) 28
3.1. Definisi PGK 28
3.2. Epidemiologi PGK 29
3.3. Klasifikasi PGK 31
3.4. Penyebab PGK 33
3.5. Patogenesis PGK 34
3.6. Patofisiologi PGK 34
3.7. Manifestasi Klinis PGK..... 35
3.8. Penatalaksanaan Penderita PGK..... 43
3.9. Komplikasi PGK 62
DAFTAR PUSTAKA 68

BAB IV
PENELITIAN ILMUWAN TENTANG
HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG
UNTUK PENYAKIT GINJAL 74
4.1. Penelitian Tentang Hidrolisat Kacang Polong 75
4.2. Efek Hidrolisat Protein Kacang Polong Terhadap *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) Renin dan *Calmodulin Phosphodiesterase 1* (CaMPDE) 76
4.3. Beberapa Prosedur Hidrolisis Protein Kacang Polong terhadap Tekanan Darah 79
4.4. Penelitian Beberapa Target Terapi Baru PGK 81
4.5. Penelitian Hidrolisat Sumber Protein Lain Terhadap ACE inhibitor 83
4.6. Penelitian Kacang Polong di Indonesia 84
4.7. Tantangan Penelitian Hidrolisat Protein Kacang Polong di Masa Mendatang 85
DAFTAR PUSTAKA 86

BAB V
KARAKTERISTIK BAHAN PENELITIAN 88
5.1. Karakteristik Bahan Penelitian 88
5.1.1. Kacang Polong atau Kacang Ercis (*Pisum Sativum.* L) 88
5.1.2. Kacang Gude (*Cajanus Cajan)* 90
5.2. Pemeriksaan Karakteristik Bahan Penelitian 91
5.3. Kandungan Nilai Gizi Kacang Polong dan Kacang Gude 95
5.4. Enzim Protease untuk Menghidrolisis Protein Kacang 95
5.4.1. Bromelain 95
5.4.2. Neutrase® 97
DAFTAR PUSTAKA 99

BAB VI
PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG DAN KACANG GUDE MENGGUNAKAN ENZIM NEUTRASE ATAU BROMELAIN 100
6.1. Hidrolisat Protein 100
6.2. Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein 103
6.2.1. Tahap Pertama 104
6.2.2. Tahap Kedua 108
6.2.3. Tahap Ketiga 109
DAFTAR PUSTAKA 116

BAB VII
EFEK DARI 8 JENIS HIDROLISAT PROTEIN KACANG TERHADAP GINJAL TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CISPLATIN 118
7.1. Parameter Penelitian 118
7.2. Bahan dan Alat yang Digunakan 119

7.2.1. Cisplatin 119
7.2.2. Aspek Etik Penelitian 123
7.3. Lokasi Penelitian 123
7.4. Percobaan *In vivo* pada Tikus Wistar Betina yang diinduksi Cisplatin 124
7.5. Parameter Bobot Badan 126
7.6. Parameter Berat Organ (BO) 128
7.7. Parameter Histopatologis Ginjal Tikus 130
7.8. Parameter Fungsi Ginjal 137
7.8.1 Pemeriksaan Kadar Ureum 138
7.8.2. Pemeriksaan Kadar Kreatinin 141
7.8.3. Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total 144
7.8.4. Pemeriksaan Kadar HDL 146
7.8.5. Pemeriksaan Kadar LDL 147
7.8.6. Pemeriksaan Kadar Trigliserida 150
7.8.7. Pemeriksaan Kadar Asam Urat 152
7.9. Parameter ANP, COX-1 dan Renin 154
7.9.1. Pembuatan Homogenat Ginjal Tikus 155
7.9.2. Alat Pemeriksaan 155
7.9.3. Prosedur Pemeriksaan 155
7.9.4. Hasil Pengukuran Kadar ANP, COX 1 dan Renin 160
DAFTAR PUSTAKA 164

BAB VIII
PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG HIJAU MENGGUNAKAN BROMELAIN 167
8.1. Persiapan Pembuatan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau 168
8.1.1 Persiapan Larutan Enzim Bromelain 168
8.1.2 Pengukuran Aktivitas Spesifik Total Enzim Bromelain 169

8.2. Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein 172
8.2.1. Perhitungan Jumlah Kandungan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau dengan Metode Bradford 176
8.2.2. Karakterisasi Hidrolisat Protein Menggunakan SDS-PAGE 177
DAFTAR PUSTAKA 180

BAB IX
EFEK BEBERAPA DOSIS HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG HIJAU TERHADAP TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI GENTAMYCIN 181
9.1. Parameter Penelitian 181
9.2. Bahan dan Alat yang Digunakan 183
9.2.1. Gentamicin 184
9.2.2. Aspek Etik Penelitian 185
9.3. Lokasi Penelitian 185
9.4. Percobaan *In vivo* pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Gentamicin 185
9.5. Parameter Bobot Badan (BB) dan Indeks Organ (IO) 190
9.6. Parameter Histopatologis Ginjal Tikus 192
9.7. Parameter Hematologi 196
9.8. Parameter Fungsi Ginjal 199
9.8.1 Pemeriksaan Kadar Ureum 199
9.8.2. Pemeriksaan Kadar Kreatinin 200
9.8.3. Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total 201
9.8.4. Pemeriksaan Kadar LDL 202
9.8.5. Pemeriksaan Kadar Trigliserida 203
9.9. Pemeriksaan Kadar *Super Oxyde Dismutase* (SOD) 205
Parameter ANP, COX-1 dan Renin 206
DAFTAR PUSTAKA 212

BAB X
ANALISIS *PROTEOMIC* HIDROLISAT
PROTEIN KACANG POLONG HIJAU
MENGGUNAKAN METODE LC-MS/MS 215
10.1 *Proteomic* 215
10.2. Pendahuluan *Proteomic* 216
10.3. Rekayasa Protein 218
10.4. Situs Aktif dan Regulasi Protein 218
10.5. Karakterisasi Protein dalam Isolat Protein Kacang 220
10.6. Analisis *Proteomic* Hidrolisat
Protein Kacang Polong Hijau 221
DAFTAR PUSTAKA 225

BAB XI
SIMPULAN DAN RENCANA
PENELITIAN SELANJUTNYA 226

LAMPIRAN-LAMPIRAN 231
GLOSARIUM 242
INDEKS 254
TENTANG PENULIS 260

DAFTAR GAMBAR

Gambar	2.1.	Letak Anatomis Ginjal	12
Gambar	2.2.	Struktur Bagian Dalam Ginjal	13
Gambar	2.3.	Struktur Sebuah Nefron	15
Gambar	2.4.	Perdarahan Ginjal	16
Gambar	2.5.	Fungsi Utama Ginjal dalam Pembentukan Urine	18
Gambar	2.6.	Bagian Fungsional dari Satu Unit Nefron Ginjal	19
Gambar	2.7.	Tekanan Filtrasi Bersih	22
Gambar	3.1.	Perubahan Profil Asam Amino pada PGK	39
Gambar	3.2.	Faktor Risiko Aterosklerosis pada Uremia	42
Gambar	3.3.	Perjalanan Penyakit PGK Berdasarkan Penyebab dan Waktu	44
Gambar	5.1.	Kacang Polong Hijau Kering (*Pisum sativum)*	89
Gambar	5.2.	Kacang Polong Kuning Impor dari Kanada	90
Gambar	5.3.	*Pea Protein Isolate* (*Pisum sativum*) dari *Canadian Protein* dan Kandungan Nutrisinya	90
Gambar	5.4.	Kacang Gude atau Kacang Hiris (*Cajanus cajan*)	91
Gambar	5.5.	Buah Nanas dari Subang (*Ananas sativus*), blender/jus Nanas, Larutan Sari Nanas	97
Gambar	5.6.	Neutrase ®	98
Gambar	6.1.	Alur Penelitian Hidrolisat Protein untuk Terapi PGK	103
Gambar	6.2.	Grafik Persamaan Triptofan dengan y = 6.9462x	106

Gambar 6.3. Grafik Persamaan BSA dengan y = 0,7387x 107
Gambar 6.4. Penyaringan dan Penimbangan Serbuk Sampel Kacang 109
Gambar 6.5. Larutan 4 jenis Kacang di Atas *Stirrer* 109
Gambar 6.6. Peralatan untuk Pemeriksaan SDS PAGE 113
Gambar 6.7. *Marker* atau Penanda Berat Molekul dari PeqLab 114
Gambar 6.8. Hasil SDS-PAGE dari 8 Jenis Hidrolisat Protein Kacang 114
Gambar 7.1. Cisplatin Injeksi 50 mg 119
Gambar 7.2. Jalur Cisplatin Menginduksi Kematian Sel 120
Gambar 7.3. Tikus Wistar dan Pemberian Perlakuan Melalui Sonde Oral 124
Gambar 7.4. Tikus Dibunuh dalam Kotak CO_2 127
Gambar 7.5. Tikus Dibedah dan Diperiksa 8 Organ Penting 128
Gambar 7.6. Gambaran Sediaan Histopatologis Ginjal Berdasarkan 3 Parameter 136
Gambar 7.7. Pengambilan darah Tikus, disentrifuge 6000 rpm 10 menit 137
Gambar 7.8. Rerata Kadar Ureum Setelah Pemberian PHPKN dan PHPKB 139
Gambar 7.9. Rerata Kadar Ureum Setelah Pemberian PHKGN dan PHKGB 139
Gambar 7.10. Rerata Kadar Ureum Setelah Pemberian PHPHN dan PHPHB 140
Gambar 7.11. Rerata Kadar Ureum Setelah Pemberian PHPPIN dan PHPPIB 140
Gambar 7.12. Rerata Kadar Kreatinin Setelah Pemberian PHPKN dan PHPKB 142
Gambar 7.13. Rerata Kadar Kreatinin Setelah Pemberian PHKGN dan PHKGB 142

Gambar 7.14. Rerata Kadar Kreatinin Setelah Pemberian PHPHN dan PHPHB 143
Gambar 7.15. Rerata Kadar Kreatinin Setelah Pemberian PHPPIN dan PHPPIB 143
Gambar 7.16. Homogenat dari 10 Kelompok Perlakuan 156
Gambar 7.17. Persiapan Sumur Blanko, Sumur Standar dan Sumur Sampel Percobaan 156
Gambar 7.18. Persiapan Blanko dari 3 Pemeriksaan: ANP, COX-1 dan Renin 157
Gambar 7.19. Sampel dari 10 Kelompok Perlakuan Dimasukkan ke Tiap Sumur 157
Gambar 7.20. *Horse Radish Peroxidase* (HRP) Dimasukkan ke dalam Sumur 158
Gambar 7.21. Proses Inkubasi Selama 1 Jam pada Suhu Ruangan 158
Gambar 7.22. Penambahan 50 µl Chromogen A ke Tiap Sumur, Lalu Penambahan 50 µl Chromogen B ke Tiap Sumur 159
Gambar 7.23. Pengukuran Akhir pada ELISA *Reader* 159
Gambar 7.24. Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar ANP 161
Gambar 7.25. Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar COX-1 162
Gambar 7.26. Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar Renin 162
Gambar 8.1. Alur Penelitian Dosis Efektif Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau 168
Gambar 8.2. Buah Nanas dari Subang, Hasil Blender Nanas dan Filtrasi Nanas 168
Gambar 8.3. Filtrasi Nanas Disentrifus dan Aliquot Larutan Bromelain Nanas 169
Gambar 8.4. Kurva Baku Triptofan Persamaan: y = 24,44x +0,481 170
Gambar 8.5. Kurva Baku Kadar Protein BSA Standar Dengan Persamaan: y =1,3376x + 0,1471 172

Gambar 8.6. Kacang Polong Hijau kering Maica Leaf dari Magelang 173
Gambar 8.7. Penyaringan MESH 120 dan Penimbangan Serbuk Kacang Polong 173
Gambar 8.8. Penyaringan Larutan Serbuk Kacang polong yang Diberi Aquadest dan Bromelain dan Hasil Filtrasi 174
Gambar 8.9. Larutan Serbuk Kacang polong yang Diberi Aquadest dan Bromelain di Hidrolisis di atas Stirrer Selama 72 Jam 174
Gambar 8.10. Hasil Filtrasi Larutan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau 175
Gambar 8.11. Pengukuran pH Larutan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau 175
Gambar 8.12. Hasil SDS PAGE 177
Gambar 8.13. SDS PAGE *Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder* 179
Gambar 9.1. Gentamicin Injeksi 80 mg 184
Gambar 9.2. Sepuluh Kelompok Tikus Wistar Jantan 186
Gambar 9.3. Penimbangan Bobot Badan Tikus untuk Penentuan Dosis 187
Gambar 9.4. Pemberian Perlakuan Melalui Sonde Oral Tikus Sesuai Dosis yang Dihitung Berdasarkan Bobot Badan 187
Gambar 9.5. Kiri: Pemberian Sonde Oral Tikus; Kanan: Pengambilan Sampel Darah Melalui Vena Ekor 187
Gambar 9.6. Kiri: Sampel Darah dalam Eppendorf; Kanan: Hematologi 188
Gambar 9.7. Sampel Darah Tikus 188
Gambar 9.8. Pemeriksaan Centrifugasi Darah Tikus 6000 rpm selama 10 menit 188
Gambar 9.9 Simvastatin tablet 10 mg 188

Gambar 9.10 Fenofibrate tablet 300 mg 188
Gambar 9.11 Natural Vitamin E Kapsul Lunak 200 I.U 189
Gambar 9.12 Ketosteril, Asam Keto Analog 630 mg 189
Gambar 9.13. Penimbangan Tikus
dan Pembedahan *Post Mortem* 190
Gambar 9.14. Pengambilan Darah Intra Kardial
dan Pengambilan Organ Ginjal & Jantung 191
Gambar 9.15. Gambaran Sediaan Histopatologis
Ginjal Berdasarkan 3 Parameter 196
Gambar 9.16. Pemeriksaan Hematologi
Menggunakan Hematoanalyzer 197
Gambar 9.17. Kiri: Tikus dibunuh dalam Kotak CO2;
Kanan: Pengambilan Serum 199
Gambar 9.18. Grafik Perubahan Rerata Kadar Ureum
Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin
Selama 35 Hari 200
Gambar 9.19. Grafik Perubahan Rerata Kadar Kreatinin
Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin
Selama 35 Hari 201
Gambar 9.20. Grafik Selisih Rerata Kadar Kolesterol
Total H 35-H7 202
Gambar 9.21. Grafik Selisih Rerata Kadar LDL H 35-H7 203
Gambar 9.22. Grafik Selisih Rerata Kadar
Trigliserida H 35-H7 203
Gambar 9.23. Rerata Hasil Pemeriksaan ANP
pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal
Tikus Wistar yang Diinduksi
oleh Gentamicin 207
Gambar 9.24. Rerata Hasil Pemeriksaan COX-1
pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal
Tikus Wistar yang diinduksi
oleh Gentamicin 208

Gambar 9.25. Rerata Hasil Pemeriksaan Renin pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus Wistar yang diinduksi oleh Gentamicin 209
Gambar 9.26. Hipotesis Mekanisme HPPHB dalam Memperbaiki Fungsi Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin 210

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Klasifikasi penyakit PGK dan Komplikasinya (Kopple, 2014)	32
Tabel 3.2.	Klasifikasi PGK berdasarkan GFR (KDIGO, 2012)	33
Tabel 5.1.	Analisis Proksimat Makro nutrien dan Metabolit Sekunder	94
Tabel 5.2.	Perbandingan Nilai Gizi Beberapa Jenis Kacang Per 100 Gram Bahan	95
Tabel 7.1.	Kelompok Perlakuan Hidrolisat Protein Terhadap Tikus Wistar Betina yang Diinduksi Cisplatin	125
Tabel 7.2.	Prosedur Percobaan dan Jadwal Pemeriksaan Parameter Penelitian	126
Tabel 7.3.	Rerata Berat 8 Organ Penting Tikus Setelah 30 Hari Perlakuan	128
Tabel 7.4.	Rerata Indeks 8 Organ Penting pada Kelompok Tikus Laboratorium Setelah 30 Hari Perlakuan	129
Tabel 7.5.	Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh dari Sediaan Histopatologis Ginjal	133
Tabel 7.6.	Skor Median Nekrosis Inti dari Sediaan Histopatologis Ginjal	134
Tabel 7.7.	Skor Median *Hyaline Cast* dari Sediaan Histopatologis Ginjal	135
Tabel 7.8.	Rerata Kadar Ureum Tikus yang Diinduksi Cisplatin Sesudah Diberi Perlakuan	138
Tabel 7.9.	Rerata Kadar Kreatinin Tikus yang Diinduksi Cisplatin Sesudah Diberi Perlakuan	141

Tabel 7.10. Rerata Kadar Kolesterol Total Serum Tikus Hari ke-12 dan ke-30 144
Tabel 7.11. Rerata Kadar Trigliserida Serum Tikus Hari ke-12 dan ke-30 146
Tabel 7.12. Rerata Kadar HDL Hari ke-12 dan ke-30 148
Tabel 7.13. Rerata Kadar LDL Serum Hari ke-12 dan ke-30 150
Tabel 7.14. Rerata Kadar Asam Urat Serum Hari ke-12 dan ke-30 152
Tabel 7.15. Rerata Pengukuran ANP, COX-1 dan Renin 160
Tabel 8.1 Hasil Pengukuran Triptofan pada Panjang Gelombang 280 nm 170
Tabel 8.2. Hasil Pengukuran BSA pada Panjang Gelombang 595 nm 171
Tabel 9.1. Kelompok Perlakuan HPPHB Terhadap Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Gentamicin 186
Tabel 9.2. Prosedur Percobaan dan Jadwal Pemeriksaan Parameter Penelitian 190
Tabel 9.3. Hasil Analisis Data IO Ginjal dan Jantung 191
Tabel 9.4. Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh dari Sediaan Histopatologis Ginjal 193
Tabel 9.5. Skor Median Nekrosis Inti dari Sediaan Histopatologis Ginjal 194
Tabel 9.6. Skor Median *Hyaline Cast* dari Sediaan Histopatologis Ginjal 195
Tabel 9.7. Hasil Analisis Data Profil Hematologi 197
Tabel 9.8. Hasil Analisis Data Kadar SOD 205
Tabel 10.1 Daftar Protein Teridentifikasi pada Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dengan Bromelain dan Rehidrolisis Menggunakan Tripsin 223

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit ginjal dapat disebabkan oleh faktor genetik, aktivitas sehari-hari dan gaya hidup. Namun, penyakit ini dapat dicegah di antaranya melalui pola makan sehat. Perkembangan penyakit ginjal pada batas tertentu sangat dipengaruhi oleh jenis dan pilihan makanan yang disantap. Pada kondisi ini, nutrisi yang baik sangat berperan penting untuk memperbaiki fungsi ginjal, memperlambat progresivitas penyakit dan meningkatkan kualitas hidup kesehatan penderita. Salah satu risiko utama penyakit ginjal kronis (PGK) adalah hipertensi atau tekanan darah tinggi (Hidayat, Darsono, & Chandra, 2016). Penderita PGK ini perlu mendapat edukasi asupan diet yang baik sehingga tidak memperparah penyakitnya. Mencegah penyakit ginjal jauh lebih mudah dan murah daripada mengobati. Bagi mereka yang sudah menderita PGK, pengaturan asupan nutrisi dan pengelolaan pola makan perlu dilakukan agar penyakitnya tidak bertambah parah.

Ginjal merupakan sepasang organ yang berfungsi untuk menyaring dan mengeluarkan zat-zat racun hasil metabolisme yang dihantarkan lewat darah dan kemudian dibuang melalui urine. Ginjal

berwarna kemerahan, berbentuk seperti kacang, dan terletak pada retroperitoneal. Letak ginjal kanan 1-2 cm lebih rendah daripada letak ginjal kiri karena keberadaan organ hati. Setiap ginjal orang dewasa rata-rata memiliki panjang 11 cm, lebar 45 cm, dan tebal 1–2 cm (Wibowo & Widjaya, 2009).

Fungsi utama ginjal adalah memelihara keseimbangan homeostatik cairan elektrolit dan bahan-bahan organik dalam tubuh. Kerja ginjal meliputi empat proses, yaitu filtrasi molekul-molekul atau ion-ion dari darah, absorbsi kembali molekul-molekul atau ion-ion yang masih diperlukan tubuh, dan ekskresi molekul-molekul atau ion-ion yang tidak diperlukan. Di samping itu, ginjal mempunyai fungsi sekresi yang penting dalam bidang endokrin seperti sintesis hormon eritropoetin, sekresi renin dan aldosteron, mengubah vitamin D menjadi bentuk aktif, dan degradasi berbagai jenis hormon (Guyton & Hall, 2011).

Dalam proses filtrasi, ginjal bekerja membersihkan darah dari bahan-bahan sisa hasil pencernaan atau hasil metabolisme melalui mekanisme penyaringan. Filtrat yang diperoleh di absorbsi kembali agar volume cairan ekstra seluler, komposisi elektrolit, dan osmolaritas cairan tubuh tetap terjaga. Peran ginjal sangat penting dalam mempertahankan keseimbangan antara asupan pencernaan metabolit dan pengeluaran hasil ekskresi metabolit (Stevens, 2006) (Sherwood, 2010)

Gangguan fungsi ginjal dapat disebabkan oleh berbagai sebab seperti trauma, infeksi, dehidrasi, penyakit otoimmun, atau penyakit degeneratif. Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab utama mortalitas dan morbiditas pada penderita PGK (Chan, 2005). PGK dengan hiperlipidemia sekunder sangat aterogenik dan berbahaya (Breier, Lisch, Drexel, & Braunsteiner, 1983). Setelah fungsi ginjal mulai menurun, kelainan metabolisme lipid dan profil lipid segera terjadi (Breier et al., 1983). Banyak penderita PGK tersebut belum jatuh ke dalam stadium akhir gagal ginjal terminal

(end stage renal disease, ESRD) namun mengalami kematian akibat gangguan kardiovaskular. Lebih kurang 30% penderita PGK mengalami hipertrigliseridemia, yang merupakan ciri khas dari gejala klinik PGK (Attman, Samuelsson, & Alaupovic, 2011; Grundy, 1990; Cohen & Appel, 2015; Breier et al., 1983). Hal ini disebabkan karena pada penderita PGK enzim Lipoprotein Lipase (LPL) dan Hepatik Trigliserida Lipase (HTGL) kurang berfungsi (Attman et al., 2011). Menurut kelompok K/DOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)* tahun 2000, pedoman penanganan penderita PGK dengan dislipidemia adalah melalui evaluasi profil lipid darah secara berkala (Chan, 2005).

Sebuah penelitian di Kanada menemukan bahwa protein dalam kacang polong kuning (*Pisum sativum*. L) dapat menjadi obat alami terhadap tekanan darah tinggi dan PGK. Kebanyakan penderita PGK meninggal akibat komplikasi kardiovaskular yang timbul dari tekanan darah tinggi terkait kerusakan ginjal. Hasil penelitian menunjukkan protein hidrolisat kacang polong berefek mencegah proses lanjut kerusakan ginjal penderita tekanan darah tinggi, sehingga penderita dapat hidup lebih lama dengan tekanan darah terkontrol (Hoskins, 2017; Li & Aluko, 2010). Dalam tahap pemanfaatannya, kacang polong kuning dalam keadaan alami ternyata tidak memberikan manfaat kesehatan sebaik hidrolisat proteinnya karena protein yang bermanfaat tersebut hanya dapat diaktifkan dengan enzim khusus (Hoskins, 2009). Menurut Hoskins (2009), hidrolisat protein kacang polong *(Pisum sativum* L.) mengandung penghambat *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). ACE merupakan komponen utama dalam *renin-angiotensin system* (RAS) yang mengatur tekanan dengan meregulasi volume cairan tubuh. ACE secara tidak langsung meningkatkan tekanan darah dengan cara memperkecil pembuluh darah. Pada penelitian terhadap hewan uji tikus, dosis kecil hidrolisat protein kacang polong menurunkan tekanan darah sebanyak 20%, memperbaiki fungsi ginjal yang ditunjukkan dengan peningkatan urin sebesar 30%,

menurunkan kadar angiotensin II dan kadar renin sebesar 50%. Pengaturan pengeluaran renin oleh ginjal, akibat pemberian hidrolisat protein menghasilkan penurunan kadar Angiotensin II sebesar 45% melalui perubahan RAA sistem (Aluko, 2008). Kacang polong dapat berfungsi sebagai antioksidan, penurun kolesterol total dalam plasma darah dengan menurunkan kadar LDL secara signifikan, modulator kalsium/*calmodulin dependent protein kinase* II (CaMKII), anti kanker, antimikrobial, anti obesitas, dan kardioprotektif (Lim, 2012).

Di Indonesia, kacang polong kuning (*Pisum sativum* L.), jenis yang berasal dari Kanada jarang didapat. Kacang polong hijau bahkan belum umum ditanam dan dikonsumsi masyarakat serta pemanfaatannya masih terbatas. Di beberapa kota besar, kacang polong hijau dapat diperoleh di supermarket dalam bentuk beku atau dikemas dalam bentuk kaleng yang umumnya merupakan produk impor. Hidayat dkk dalam penelitiannya mengemukakan terdapat jenis kacang Indonesia yang berpotensi sebagai terapi bagi penderita PGK yaitu kacang polong hijau (*Pisum sativum*) dan kacang gude atau kacang hiris (*Cajanus cajan*) (Hidayat, M., et al., 2018a) Dalam persiapan pembuatan hidrolisat protein, digunakan 2 jenis enzim protease, yaitu Neutrase® dan bromelain (enzim pemecah protein yang didapat dari nenas, buah tropis yang banyak ditemukan di Indonesia).

Hidrolisat protein kacang polong kuning Kanada terbukti memiliki efek baik untuk mencegah proses lanjut kerusakan ginjal penderita PGK. Kandungan kacang polong dan kacang gude Indonesia tidak jauh berbeda dengan kacang polong asal Kanada, maka diharapkan hidrolisat protein kacang polong Indonesia memiliki efek yang serupa dengan kacang polong asal Kanada. Penelitian hidrolisat protein kacang polong asal Indonesia perlu dilakukan untuk mendapatkan terapi bagi penderita PGK.

Berdasarkan hal-hal yang sudah dipaparkan di atas, maka dirumuskan masalah penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakteristik dan prosedur pembuatan hidrolisat protein beberapa jenis dan sumber kacang (kacang polong kuning dari Kanada (*Pisum sativum.* L), kacang polong hijau (*Pisum sativum*), kacang gude (*Cajanus cajan*) dan protein isolat kacang polong kuning dari Kanada (*Pea Protein Isolate*, PPI) yang di hidrolisis menggunakan enzim Neutrase atau bromelain.
2. Bagaimana efek dari 8 jenis hidrolisat protein kacang yang dihasilkan pada penelitian ini terhadap fungsi ginjal tikus model PGK yang diinduksi dengan Cisplatin berdasarkan beberapa parameter serta jenis hidrolisat protein yang mempunyai efek paling baik
3. Bagaimana karakteristik dan prosedur pembuatan hidrolisat protein yang menunjukkan hasil yang paling baik dari hasil pengujian no 2.
4. Bagaimana efek beberapa dosis hidrolisat protein kacang polong hijau bromelain terhadap fungsi ginjal tikus model PGK yang diinduksi dengan Gentamycin berdasarkan beberapa parameter.

1.2 Tujuan

1.2.1 Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan hidrolisat protein dari kacang yang mempunyai efek memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal serta mencegah perburukan PGK. Pengetahuan yang didapat dari hasil penelitian ini adalah hidrolisat protein kacang yang bermanfaat untuk diet para penderita PGK serta dosis tepat yang digunakan agar dapat diaplikasikan pada penderita PGK sehingga fungsi ginjalnya tidak memburuk dan tidak jatuh ke dalam stadium akhir PGK.

1.2.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus yang dilakukan pada penelitian ini yaitu:

1. Tujuan penelitian tahap pertama adalah melakukan karakterisasi dan membuat hidrolisat protein dari beberapa jenis dan bahan kacang (kacang polong kuning dari Kanada (*Pisum sativum.* L), kacang polong hijau (*Pisum sativum*), kacang gude (*Cajanus cajan*) dan protein isolat kacang polong kuning dari Kanada (*Pea Protein Isolate* = PPI) yang di hidrolisis menggunakan enzim Neutrase atau bromelain.
2. Membandingkan efek dari 8 jenis hidrolisat protein yang dihasilkan pada penelitian ini terhadap fungsi ginjal tikus model PGK yaitu tikus Wistar betina yang diinduksi dengan Cisplatin serta menganalisis jenis hidrolisat protein yang mempunyai efek paling baik berdasarkan beberapa parameter: Ureum, Kreatinin, profil Lipid: Kolesterol total, Trigliserida, HDL, LDL, asam urat, histopatologi organ ginjal serta uji serologis ANP, COX-1 dan Renin.
3. Tujuan penelitian tahap ke dua adalah karakterisasi dan pembuatan hidrolisat protein yang menunjukkan hasil yang paling baik dari pengujian no 2, yaitu hidrolisat protein kacang polong hijau yang di hidrolisis menggunakan enzim bromelain.
4. Mengetahui efek beberapa dosis dan dosis paling efektif dari hidrolisat protein kacang polong hijau yang di hidrolisis menggunakan enzim bromelain pada tikus-tikus model gagal ginjal yaitu tikus Wistar jantan yang diinduksi dengan Gentamycin berdasarkan beberapa parameter.

1.3. Ruang Lingkup

Pada bab-bab selanjutnya dibahas lebih lanjut secara rinci penelitian yang dilakukan dan dasar pengetahuan mengenai PGK. Anatomi dan fungsi utama ginjal dibahas secara rinci di bab II, dan

pada bab III disampaikan penjelasan lengkap penyakit ginjal kronik, serta saran nutrisi. Pada bab IV hasil-hasil penelitian terkini para ilmuwan akan dipaparkan. Pada bab V dibahas secara rinci karakteristik bahan penelitian, dan pada bab VI dibahas prosedur pembuatan prosedur hidrolisat yang dilakukan pada penelitian ini. Pada bab VII dibahas secara rinci prosedur pengujian efek dari delapan jenis hidrolisat protein kacang dan analisis hasil pemeriksaan yang dilakukan. Pada bab VIII prosedur pembuatan hidrolisat protein kacang polong hijau bromelain dibahas secara rinci. Pengujian efek dari hidrolisat protein kacang polong hijau bromelain dan analisis hasil pemeriksaan parameter-parameter yang diperiksa dipaparkan pada bab IX. Bab X berisi tentang *proteomic* dan analisis *proteomic* dari hidrolisat protein kacang polong hijau menggunakan metode 2D LC-MS/MS. Bab terakhir, bab XI menutup buku ini dengan simpulan dan rencana penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

Attman, P. O., Samuelsson, O., & Alaupovic, P. (2011). The effect of decreasing renal function on lipoprotein profiles. *Nephrology Dialysis Transplantation*. https://doi.org/10.1093/ndt/gfq762

Breier, C., Lisch, H. J., Drexel, H., & Braunsteiner, H. (1983). [Lipoproteins, apolipoproteins, lipoprotein lipase, hepatic triglyceride lipase and lecithin cholesterol acyltransferase in patients with nephrotic syndrome]. *Lipoproteine, Apolipoproteine, Lipoproteinlipase, Hepatische Triglyceridlipase Und Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase Bei Patienten Mit Nephrotischem Syndrom.*

Chan, C. M. (2005). Hyperlipidaemia in chronic kidney disease. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*.

Cohen, S. D., & Appel, G. B. (2015). Chapter 37 – Approach to the Patient with Chronic Glomerular Disease. In *Chronic Renal Disease*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411602-3.00037-8

Grundy, S. M. (1990). Management of hyperlipidemia of kidney disease. *Kidney International*. https://doi.org/10.1038/ki.1990.57

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Edisi 12). *2011*. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Hidayat, M., Darsono, L., & Chandra, S. (2016). *Nutrisi Penderita Penyakit Ginjal* (1st ed.). Talenta Indonesia Mandiri.

Hoskins, I. (2017). Pea protein may prevent kidney disease. Retrieved from http://www.cabi.org/nutrition/news/19303

Li, H., & Aluko, R. E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein

hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(21), 11471–11476. https://doi.org/10.1021/jf102538g

Meilinah Hidayat, Sijani Prahastuti, Teresa L. Warga setia, Kirana Nugraha, Andreanus A. Soemardji, Siti F. Rahmawati, Nova Suliska, K. H. (2018a). Green Peas Protein Hydrolyzed by Bromelain in Simple Procedure to Improve Kidney Function in Cisplatin-induced Rats. Accepted in *Journal Research of Pharmaceutical Sciences*.

Sherwood, L. (2010). *Human Physiology: From Cells to Systems*. *Human Physiology* (7th ed, Vol. 7th edition). Yolanda Cossio. https://doi.org/9781111577438

Stevens, R. (2006). Gray's Anatomy for Students. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. https://doi.org/10.1308/003588406X116873b

Lim TK. (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants (pp. 849-864; p549-565). Heidelberg London New York: Springer Dordrecht.

Wibowo, D.S., Widjaya, P. (2009). *Anatomi Tubuh Manusia*. Bandung, Indonesia: Grasindo.

BAB II
GINJAL DAN FUNGSI UTAMANYA

Tubuh manusia terdiri dari berbagai organ yang saling bekerja sama dan menunjang untuk berjalannya fungsi tubuh yang sehat. Salah satu organ penting tubuh manusia adalah ginjal. Pembaca akan lebih mudah memahami penelitian yang dilakukan ini apabila mengetahui anatomi dan fungsi ginjal.

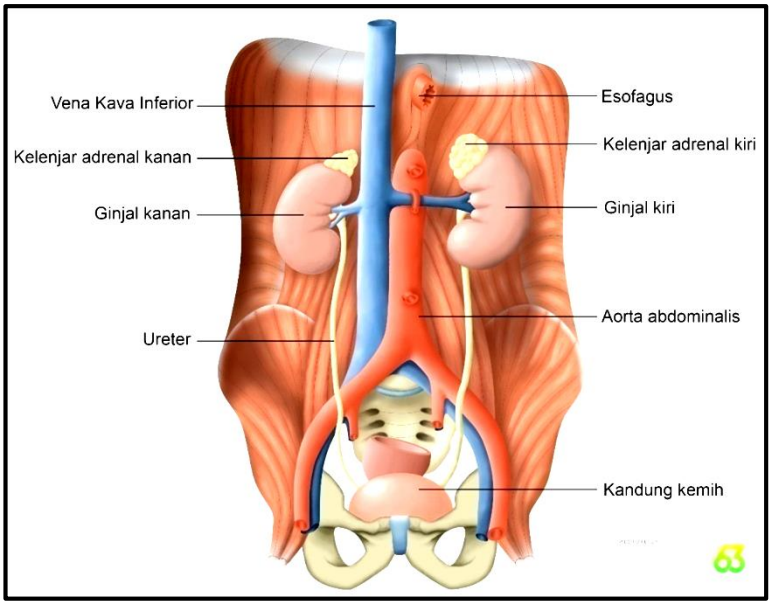
Berikut akan dibahas secara rinci anatomi dan fungsi utama ginjal.

2.1 Anatomi Ginjal

Ginjal manusia berjumlah dua buah, yaitu ginjal kiri dan kanan; berbentuk seperti biji kacang terletak di retroperitoneal pada dinding belakang abdomen. Organ ini menempel pada jaringan ikat ekstra peritoneal di sisi samping rangkaian ruas tulang belakang yang dikenal dengan *columna vertebralis*. Dari tampak depan, terlihat bahwa ginjal kiri dan kanan mengapit pembuluh darah besar aorta abdominalis dan vena kava inferior seperti yang terlihat pada gambar 2.1. Puncak organ ginjal terletak setinggi *vertebra Thoracal* XII dan bagian terbawah terletak setinggi *vertebra Lumbal* III. Pada gambar

2.1 dapat dilihat bahwa letak ginjal kanan lebih rendah 12 mm dari ginjal kiri karena pada sisi kanan tubuh terdapat organ hati. Pada sisi dalam bagian tengah masing-masing ginjal keluar pembuluh ureter, yaitu saluran yang berfungsi untuk mengalirkan hasil filtrasi ginjal ke kandung kemih. Ginjal manusia memiliki ukuran kira-kira panjang 11 cm, lebar 6 cm, dan tebal 4 cm(Harold E, 2006).

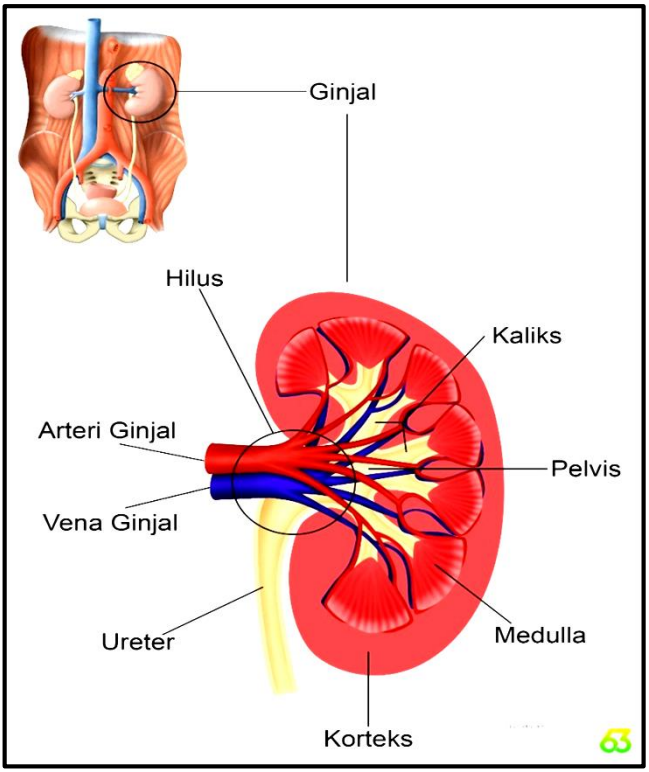
Ginjal menempel dan berbatasan dengan organ lain. Pada ginjal kanan sisi kutub atas tertutup oleh sebuah organ, yaitu kelenjar adrenal kanan yang berbentuk menyerupai segitiga terbalik (Moore, *et al.* 2014).Permukaan sisi atas ginjal kanan berhadapan dengan organ hati. Permukaan bagian tengah sisi dalam ginjal bersentuhan dengan bagian usus halus tengah yang mengarah ke bawah yang dikenal sebagai *pars descendens duodenum.* Sisi luar permukaan ginjal samping bersentuhan dengan lengkung usus besar sebelah kanan yang dikenal sebagai *flexura coli dextra.* Pada ginjal kiri sisi kutub atas tertutup oleh organ kelenjar adrenal kiri yang berbentuk menyerupai segi empat (Moore, *et al.*, 2014). Permukaan sisi atas ginjal bersentuhan dengan organ lambung dan limpa. Permukaan bagian tengah sisi luar ginjal tertutup oleh bagian bawah kelenjar pankreas. Separuh sisi samping bawah ginjal tertutup oleh lengkung usus besar sebelah kiri yang dikenal sebagai *flexura coli sinistra*, dan permukaan usus besar yang mengarah ke bawah yang dikenal sebagai *colon descendens.* Permukaan samping sisi dalam ginjal tertutup oleh sebagian usus kecil yang dikenal sebagai *jejunum.* Permukaan atas kedua ginjal, baik ginjal kanan maupun kiri berbatasan dengan sekat antara rongga dada dan rongga perut yang disebut sebagai *diafragma*. Pada sisi bawah ginjal dari arah tengah ke samping, terdapat beberapa otot, yaitu *psoas major, musculus quadratus lumborum*, dan *musculus transversus abdominis* (Drake, *et al.*, 2014).



Gambar 2.1.
Letak Anatomis Ginjal.
Copyright: Geary Giaviany, 2018.

Seluruh permukaan ginjal tertutup oleh selaput yang disebut *capsula fibrosa* yang memiliki permukaan depan dan belakang (*facies anterior* dan *posterior)*. Pada cekungan ginjal bagian tengah (*margo medialis)* terdapat lengkungan ke arah dalam pada bagian tepi ginjal yang disebut hilus, yaitu tempat masuknya pembuluh darah, pembuluh limfatik, pembuluh saraf, dan ureter ke ginjal. Hilus ginjal berlanjut menjadi sinus *(sinus renalis)* yaitu rongga berisi lemak yang membuka pada hilus dan akan mencapai seluruh bagian ginjal(Drake, *et al*., 2014).

Berikut dapat dilihat struktur bagian dalam ginjal pada Gambar 2.2



Gambar 2.2.
Struktur Bagian Dalam Ginjal.
Copyright: Geary Giaviany, 2018.

Bagian sebelah luar ginjal disebut korteks dan medula di bagian dalam, seperti tampak pada gambar 2.2. Korteks ginjal memiliki perpanjangan yang mengerucut yaitu *columnae renales* dan memisahkan medula menjadi piramid-piramid ginjal (*pyramides renales*). Piramid ini terdiri dari dasar (*basis)* yang mengarah ke *cortex* dan puncak (*apex)* yang mengarah ke dalam menuju *sinus.* Pada bagian puncak, terdapat papilla ginjal (*papillae renales*) merupakan titik temu beberapa kaliks kecil ginjal (*calyx renalis minor)*, ruangan yang akan dilalui urine. *Sinus renalis* dan beberapa

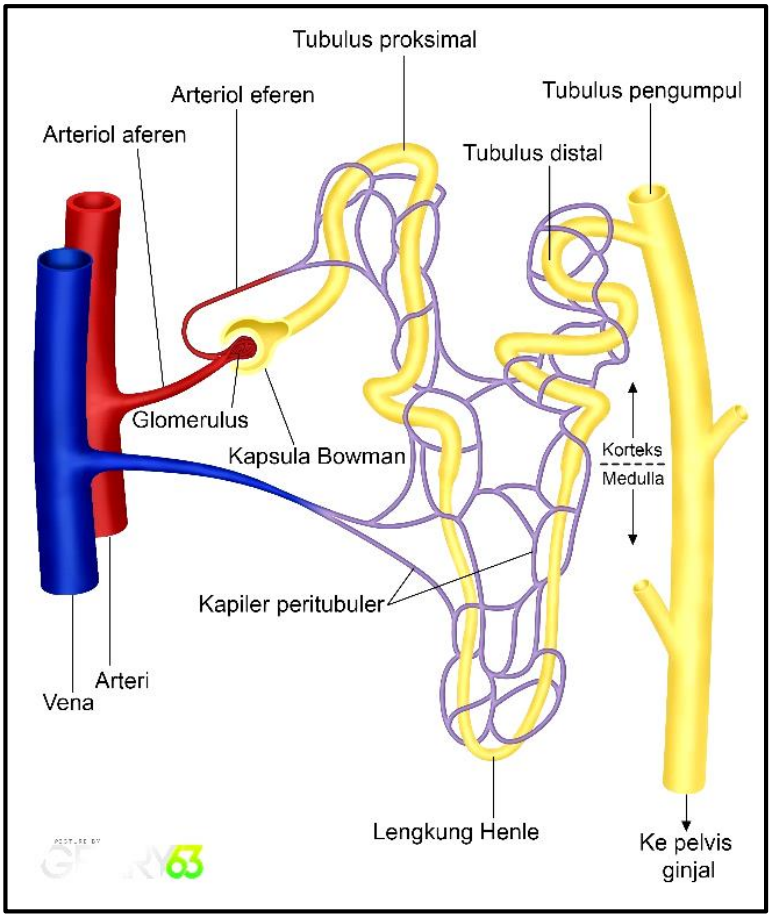
kaliks kecil bergabung membentuk kaliks besar dan 2-3 buah kaliks besar bergabung dan membentuk pelvis (Drake et al., 2014).

Masing-masing ginjal memiliki kurang lebih 1 juta *nefron* yang dipersatukan oleh jaringan pengikat. *Nefron* adalah unit terkecil ginjal yang memiliki fungsi utama untuk memfiltrasi dan sekresi. Setiap *nefron* terdiri atas komponen pembuluh darah (vaskular) dan komponen tubular (Sherwood, 2010; Guyton & Hall, 2011).

Komponen vaskular ginjal terdiri atas: (1) *arteriole afferent* yang berfungsi untuk membawa darah menuju glomerulus, (2) glomerulus (gumpalan simpul pertautan pembuluh darah kapiler di dalam kapsul bowman yang berfungsi dalam proses penyaringan dan pembentukan urine)yang kemudian akan disalurkan pada komponen tubular, (3) *efferent arteriole* berfungsi untuk membawa darah keluar dari glomerulus, (4) kapiler peritubular untuk mensuplai jaringan dan berperan dalam pertukaran dengan cairan dalam lumen tubular

Komponen tubular terdiri atas: (1) kapsula Bowman sebagai tempat pengumpulan hasil filtrasi glomerulus, (2) tubulus proksimal berfungsi untuk reabsorpsi dan sekresi substansi tertentu, (3) lengkung Henle berfungsi dalam membentuk gradien osmotik di medulla renal yang sangat penting untuk menghasilkan berbagai konsentrasi urin, (4) tubulus distal berfungsi mereabsorpsi Na^+ dan H_2O, sekresi ion K^+ dan H^+.

Lengkung Henle bersinggungan dengan arteri aferendi sebuah lokasi yang disebut *apparatus juxtaglomerular*, terdiri atas macula densa dan sel juxtaglomerular. Sel ini menghasilkan substansi yang berperan dalam mengkontrol fungsi ginjal (Sherwood, 2010). Berikut diperlihatkan struktur sebuah nefron (Gambar 2.3):

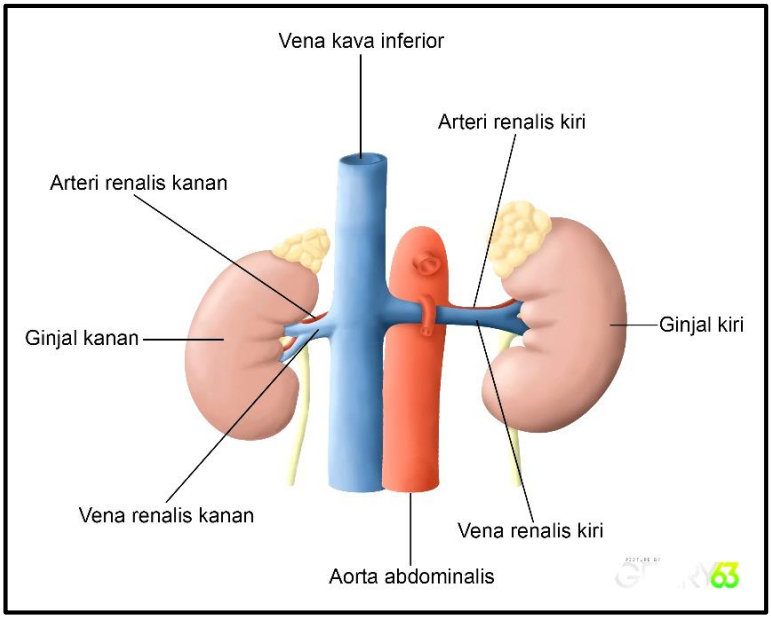


Gambar 2.3
Struktur Sebuah Nefron
Copyright: Geary Giaviany, 2018.

Ginjal diperdarahi oleh sistem perdarahan yang berasal dari *aorta abdominalis* yang kemudian bercabang menjadi arteri renalis kanan dan kiri. Volume darah dari seluruh tubuh mengalir ke dalam ginjal melalui pembuluh darah, sekira 22% dari volume curah jantung. Arteri renalis memasuki ginjal melalui hilus. Setiap arteri

renalis terbagi menjadi *rami anteriores* (depan) dan *posteriors* (belakang) kemudian bercabang-cabang secara progresif membentuk arteri interlobaris, arteri arkuata, arteri interlobularis, dan arteriol aferen, yang menuju ke kapiler glomerulus tempat sejumlah besar cairan dan zat terlarut di filtrasi untuk memulai pembentukan urine (Sherwood, 2010).

Berikut dapat dilihat perdarahan dari ginjal pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4.
Perdarahan Ginjal.
Copyright: Geary Giaviany, 2018.

Pembuluh darah balik *(Vena renales)* dibentuk dari dua buah cabang yaitu vena renalis kanan dan kiri. Vena renalis kiri lebih panjang daripada yang kanan Selanjutnya vena renalisakan bermuara ke pembuluh darah balik yang besar yaitu *vena cava inferior* (Drake RL, 2014).

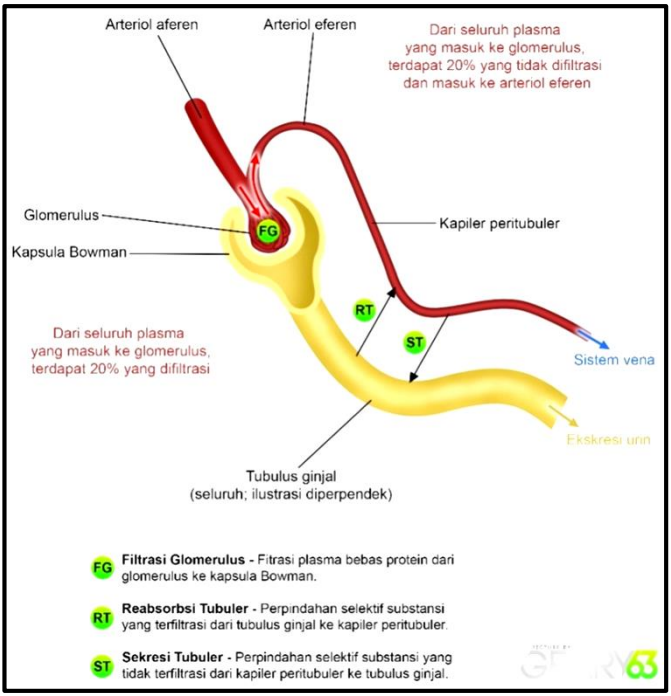
Aliran limfatik bermuara pada *nodi aortici laterals (lumbales)* pada pangkal *arteri renales*. Persarafan ginjal berasal dari *plexus nervosus renalis* dan terdiri dari serabut saraf simpatis dan parasimpatis (Sherwood, 2010).

2.2. Fungsi Ginjal

Ginjal memiliki empat fungsi utama, yaitu proses filtrasi, reabsorbsi, sekresi dan ekskresi. Pertama, dalam fungsi filtrasi, ginjal akan membuang sisa metabolisme dan sisa produk yang digunakan oleh tubuh. Untuk menjalankan fungsi ini, ginjal akan memfiltrasi plasma darah dan hasil filtrasi yang tidak diperlukan oleh tubuh akan dibuang bersama urin (Sherwood, 2010; Guyton & Hall, 2011). Fungsi kedua, reabsorbsi untuk mengontrol keseimbangan air dan elektrolit serta asam basa tubuh. Dalam fungsi sekresi ginjal memiliki fungsi untuk mengatur tekanan arteri dengan menghasilkan enzim renin, mengatur produksi eritrosit dengan menghasilkan hormoneritropoietin untuk menstimulasi produksi sel darah merah, mengubah vitamin D menjadi bentuk aktifnya yaitu 1,25 *dihydroxyvitamin* D_3 dan menyintesis glukosa (Sherwood, 2010).

Ginjal mengekskresikan hasil akhir metabolisme tubuh seperti urea (hasil pemecahan protein), asam urat (hasil metabolisme asam nukleat), kreatinin (hasil metabolisme kreatin otot), bilirubin (hasil pemecahan hemoglobin), dan hormon-hormon metabolit yang relatif toksik untuk otak, juga zat-zat asing seperti obat, makanan, pestisida, serta zat-zat yang tidak mengandung nutrisi (Sherwood, 2010).

Fungsi utama ginjal yang terdiri dari proses filtrasi dalam glomerulus, reabsorbsi tubulus dan sekresi tubulus ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.5 di bawah ini.

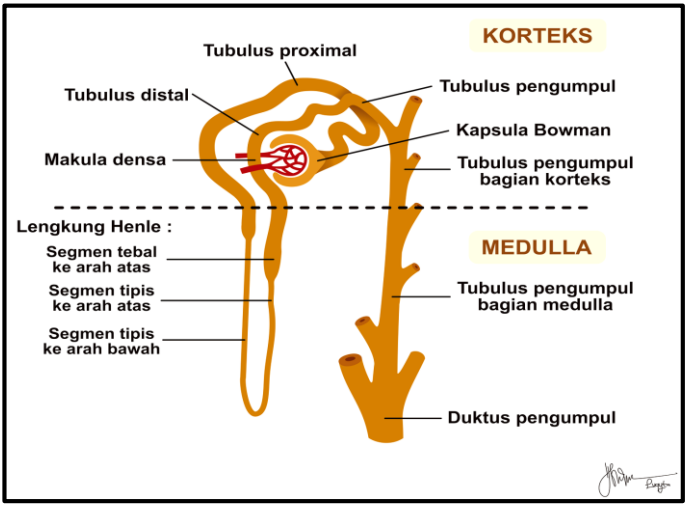


Gambar 2.5.
Fungsi Utama Ginjal dalam Pembentukan Urine.
Copyright: Geary Giaviany, 2018.

2.2.1. Filtrasi Glomerulus

Glomerulus memfiltrasi plasma darah dalam jumlah besar (Sherwood, 2010)sedangkan tubulus akan memfiltrasi cairan yang akan diubah dalam bentuk urine (Guyton & Hall, 2011). Glomerulus memiliki tekanan hidrostatik sebesar 60 mmHg. Hasil filtrasi (filtrat) glomerulus rata-rata 125 ml/menit, menghasilkan kurang lebih 180 liter/hari. Filtrat akan dialirkan ke kapsula Bowman melalui 3 lapis membran glomerulus agar tidak semua molekul dapat masuk ke dalam kapsula Bowman. Lapisan tersebut terdiri dari membran basal glomerulus, sel endotel, dan sel podosit atau lapisan dalam kapsula Bowman (Sherwood, 2010). Dari kapsula bowman akan dibawa

menuju tubulus proksimal pada korteks ginjal (Guyton & Hall, 2011).Dari tubulus proksimal, cairan akan mengalir ke lengkung henle pada *medulla* ginjal. Lengkung henle terdiri dari segmen yang mengarah ke atas (*ascending limb)* dan segmen ke bawah (*descending limb)*. Dinding pada tubulus yang mengarah ke bawah dan bagian bawah dari tubulus yang mengarah ke arah atas disebut sebagai segmen tipis, karena berdiameter kecil sedangkan pada bagian korteks ginjal disebut sebagai segmen tebal. Segmen pendek pada akhir saluran yang mengarah ke atas disebut sebagai makula densa. Makula densa ini akan mengontrol fungsi dari nefron. Cairan akan menuju *tubulus distal* yang terdapat pada korteks ginjal melalui tubulus pengumpul bagian korteks menuju saluran atau duktus pengumpul (Guyton & Hall, 2011).



Gambar 2.6.
Bagian Fungsional dari Satu Unit Nefron Ginjal.
Copyright: Luqyani Maryam, 2018.

2.2.2. Reabsorpsi Tubulus

Pada tubulus terjadi reabsorbsi zat-zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh seperti air, elektrolit (natrium yang

distimulasi oleh aldosteron), dan glukosa (Sherwood, 2010) dan sebanyak 80% hasil filtrasi dibawa kembali ke darah. Pada setiap substansi plasma terdapat kombinasi hasil filtrasi, reabsorbsi dan sekresi yang akan diekskresikan dalam urine. Hal tersebut disimpulkan dalam rumus di bawah ini: (Guyton & Hall, 2011).

2.2.3. Sekresi Tubulus

Substansi yang disekresikan oleh tubulus sangat penting seperti H^+ untuk mengatur tingkat keasaman dalam tubuh, K^+ yang dikontrol oleh aldosteron, serta anion dan kation organik (Sherwood, 2010).

2.2.4. Ekskresi Urine dan Klirens Plasma

Glomerulus memfiltrasi plasma sebanyak 180 liter/hari, namun urine yang di ekskresi ginjal hanya sebanyak 1,5 liter. Urine mengandung zat-zat yang sudah tidak dibutuhkan oleh tubuh. Klirens plasma didefinisikan sebagai volume dari plasma yang telah dibersihkan dari substansi-substansi yang tidak diperlukan oleh ginjal per menit (Sherwood, 2010).

2.2.5. *Renal Blood Flow* (RBF)

RBF adalah volume darah yang masuk ke ginjal per unit waktu (aliran darah ginjal normal, pria 70 kg sekira 1200 ml/menit, sumber lain menyebutkan sekira 1 liter/menit) (Douglas, 2016). Jumlah ini merupakan 20% dari *output* jantung saat istirahat. Volume masing-masing ginjal jumlahnya terbatas, kurang dari 150 mL, ini berarti bahwa setiap ginjal dialiri darah lebih dari 3 kali setiap menit. Semua darah ini dikirim ke korteks. Sekitar 10% dari aliran darah kortikal kemudian dialirkan ke medula. RBF berhubungan erat dengan aliran plasma ginjal (RPF), yang merupakan volume plasma darah yang dikirim ke ginjal per satuan waktu. (Guyton & Hall, 2011).

2.2.6. Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) atau *Glomerular Filtration Rate* (GFR)

LFG atau GFR adalah volume air yang disaring (filtrasi) dari plasma melalui dinding kapiler glomerulus ke kapsula Bowman per unit waktu ("The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary," 2002), biasa dinyatakan dalam berapa jumlah cairan dalam waktu satu menit per satuan luas permukaan tubuh (mL/menit/1,73 m^2). GFR bergantung dari Tekanan Filtrasi Bersih, luas permukaan glomerulus yang dapat melakukan penetrasi, dan permeabilitas dari membran glomerulus (Sherwood, 2010). LFG ditentukan oleh (1) tekanan osmotik dan hidrostatik membran glomerulus, dan kapsula Bowman (2) koefisien filtrasi kapiler glomerulus (Kf).

2.2.6.1. Koefisien filtrasi Glomerulus (Kf)

Kf ditentukan melalui konduktivitas hidrolik dan luas permukaan kapiler glomerulus, dapat dirumuskan dengan:

Kf = LFG/Tekanan Filtrasi Bersih

Koefisien filtrasi adalah 12.5 ml/min/mmHg.

2.2.6.2. Tekanan Filtrasi Bersih (*Net filtration pressure)*

Tekanan Filtrasi Bersih merupakan hasil penjumlahan dari tekanan hidrostatik dan tekanan osmotik koloid baik yang menuju atau meninggalkan kapiler glomerulus. Tekanan ini meliputi (1) tekanan hidrostatik pada kapiler glomerulus (P_G) yang menginisiasi proses filtrasi, (2) tekanan hidrostatik pada kapiler kapsula bowman P_B, di luar kapiler, yang berlawanan proses filtrasi (3) tekanan koloid osmotik pada kapiler glomerulus (π_G), (4) tekanan koloid osmotik dari protein pada kapiler kapsula bowman (π_B). Dalam keadaan normal, konsentrasi protein dalam filtrat glomerulus demikian rendah, sehingga cairan tekanan koloid osmotik kapsula bowman

mendekati nol. Tekanan Filtrasi Bersih dapat dihitung dari persamaan ini:

$$\textbf{Tekanan Filtrasi Bersih} = (P_G - P_B - \pi_G + \pi_B)$$

Besarnya Tekanan Filtrasi Bersih kurang lebih adalah 10 mmHg, berikut diperlihatkan perhitungannya:

Tekanan yang menuju proses filtrasi

Tekanan hidrostatik Glomerulus (P_G) 60 mmHg

Tekanan koloid osmotik kapsula Bowman (P_B) 0 mmHg

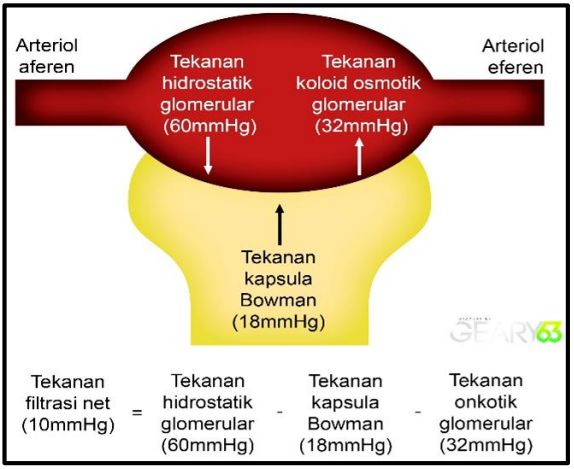
Tekanan yang meninggalkan proses filtrasi

Tekanan hidrostatik kapsula Bowman (π_B)18 mmHg

Tekanan koloid osmotik kapiler Glomerulus (π_G) 32 mmHg

Tekanan Filtrasi Bersih = 60 – 18 – 32 = 10 mm Hg

seperti diperlihatkan dalam gambar berikut:



Gambar 2.7.
Tekanan Filtrasi Bersih
(Copyright: Geary Giaviany, Modifikasi dari Guyton & Hall, 2011b)

2.2.6.3. Perhitungan LFG

LFG dihitung dari hasil koefisien filtrasi dan tekanan filtrasi bersih, dirumuskan dalam perhitungan:

LFG = Kf x Tekanan Filtrasi Bersih

Koefisien filtrasi adalah 12,5 ml/min/mmHg, sedangkan tekanan filtrasi bersih kurang lebih adalah 10 mmHg, sehingga LFG kurang lebih adalah 125 ml/min per luas permukaan tubuh.

Rentang nilai normal LFG adalah 90 – 120 mL/min/1.73 m^2.

Saat ini, tersedia banyak alat kalkulasi LFG/GFR yang dapat diperoleh melalui tautan di internet. Salah satu contoh adalah:

Kalkulator GFR (*http://easycalculation.com/medical/gfr.php*)

Rumus untuk menghitung GFR berdasarkan alat kalkulasi tersebut adalah sebagai berikut:

GFR untuk laki-laki = (140 – usia) x berat (kg)/[72 x Serum kreatinin]

GFR untuk perempuan = GFR (laki-laki) x 0.85

2.2.7. Beberapa Nilai dalam Kondisi Berbeda yang Memengaruhi GFR

2.2.7.1 Peningkatan Kf akan meningkatkan GFR

Total maksimal nilai GFR adalah 125 ml/menit dan tekanan filtrasi bersih adalah10 mmHg, sehingga nilai normal Kf adalah sekira 12,5 ml/min/mmHg; semakin tinggi Kf maka GFR makin tinggi. Penurunan Kf disebabkan karena adanya penurunan jumlah fungsi kapiler glomerulus atau meningkatnya ketebalan membran kapiler glomerulus dan menurunnya konduktivitas *hydraulic.* Kf yang menurun bisa terjadi pada: penyakit ginjal, diabetes mellitus dan hipertensi.

2.2.7.2. Peningkatan Tekanan Hidrostatik kapsula bowman (P_B) akan menurunkan GFR

Peningkatan tekanan hidrostatik kapsula bowman akan menurunkan GFR sehingga akan menyebabkan kerusakan ginjal (Guyton & Hall, 2011). Kondisi ini dapat ditemukan pada obstruksi saluran kemih, seperti batu ginjal.

2.2.7.3 Peningkatan Tekanan osmotik koloid kapiler glomerulus (π_G) akan menurunkan GFR

Tekanan osmotik koloid kapiler glomerulus dipengaruhi oleh dua faktor, yang pertama adalah tekanan koloid arteri plasma, yang kedua adalah filtrasi plasma melalui kapiler glomerulus sehingga peningkatan tekanan koloid arteri plasma akan meningkatkan tekanan osmotik koloid kapiler glomerulus akibatnya akan menurunkan GFR (Guyton & Hall, 2011). Kondisi ini dapat ditemukan pada penurunan aliran darah ke ginjal (RBV), peningkatan plasma protein.

2.2.7.4 Peningkatan tekanan hidrostatik kapiler glomerulus ($P_{G)}$ akan meningkatkan GFR

Tekanan hidrostatik kapiler glomerulus ditentukan oleh tekanan arteri, resistensi *arteriolar afferent*, dan resistensi *arteriolar efferent*. Peningkatan tekanan arteri, dilatasi arteriolar afferent dan konstriksi *arteriolar efferent* akan meningkatkan tekanan hidrostatik kapiler glomerulus sehingga GFR meningkat. Hal ini dijumpai sebagai efek dari beberapa hormon, yaitu Nitric Oxide (NO) derivat endotel, prostaglandin (Guyton & Hall, 2011).

Prostaglandin (PGE2 dan PGE1) dan bradikinin merupakan vasodilator yang dapat meningkatkan RBF dan GFR (Guyton & Hall, 2011).Dalam sel, asam arakidonat ditransformasi menjadi prostaglandin oleh enzim siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) dan terminal prostaglandin E synthases (PGES). Dogma klasik yang

berlaku adalah: COX-1 bertanggung jawab untuk kadar awal prostaglandin sedangkan stimulasi COX-2 akan menghasilkan prostaglandin. COX-1 dan COX-2 keduanya terdapat di pembuluh darah, lambung dan ginjal, Pada saat terjadi jejas dan peradangan, COX-2 menyebabkan kadar prostaglandin meningkat (Park, Pillinger, & Abramson, 2006).

Beberapa peneliti menghipotesiskan bahwa mekanisme kerja hidrolisat protein kacang polong dalam memperbaiki PGK adalah melalui peningkatan COX-1 (Li et al., 2011; Hoskins, 2017)

Sebaliknya penurunan $\mathbf{P_G}$ akan menurunkan GFR, dijumpai pada keadaan tekanan arterial yang menurun, perubahan kadar Angiotensin II, aktivitas simpatis yang meningkat, pengaruh hormon vasokonstriktor, seperti norepinefrin, epinefrin, dan endotelin. Dua hormon yang diproduksi oleh medulla adrenal, epinefrin dan norepinefrin akan mengaktifkan saraf simpatis pada pembuluh darah ginjal. Aktivasi saraf simpatis menyebabkan pengecilan diameter pembuluh darah (vasokontriksi) arteriol serta penurunan RBF dan GFR. Kerusakan endotel vaskular akan menyebabkan pengeluaran endotelin. Endotelin merupakan suatu vasokonstriktor kuat yang menyebabkan penurunan LFG. Angiotensin II diproduksi oleh ginjal dan bersifat vasokonstriktor atau memperkecil diameter pembuluh darah. (Guyton & Hall, 2011).

DAFTAR PUSTAKA

Douglas, C. Eaton, J. P. (2016.). *Vanders Renal Physiology* (8th ed.). Lange-Mc Graw Hill. [Cited 2018, March 24]. Available from https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2173&sectionid=163663040

Drake, R. L., Moses, K., Vogl, A. W., & Mitchell, A. W. (2014). Gray's Anatomy for Students, Third Edition. *Gray's Anatomy for Students*, 1–121. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Edisi 12). *2011*, *XXXIII*(2), 81–87. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Harold E. (2006). *Clinical Anatomy*. New York: Blackwell Publishing.

Hoskins, I. (2017). Pea protein may prevent kidney disease. Retrieved from http://www.cabi.org/nutrition/news/19303

Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebiyi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., … Aluko, R. E. (2011). Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. *J Agric Food Chem*. https://doi.org/10.1021/jf201911p

Moore Keith L., Dalley Arthur F., A. A. M. R. M. (2014). Kidney. In *Clinically Oriented Anatomy* (7th ed, pp. 290–292). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.016

Sherwood, L. (2010). *Human Physiology: From Cells to Systems*. *Human Physiology* (7th ed, Vol. 7th edition). Yolanda Cossio. https://doi.org/9781111577438

The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary.(2002). (97806168428991) (Copyright). Houghton Mifflin Company.

BAB III
PENYAKIT GINJAL KRONIS (PGK)

Nutrisi yang bergizi dan pola makan yang baik sangat penting untuk menjaga tubuh tetap sehat. Beberapa penyakit degeneratif, seperti penyakit jantung, diabetes, beberapa jenis kanker, osteoporosis, sangat berhubungan dengan diet yang kurang sehat. Penyakit diabetes dan jantung yang tidak dikelola dengan baik akan berdampak pada organ penting lain, yaitu ginjal. Penyebab PGK yang paling banyak adalah DM tipe I dan II yang tidak terkontrol dan penyebab kedua terbanyak adalah hipertensi (Hidayat, dkk., 2016). Penderita dengan penyakit dasar diabetes dan hipertensi sangat perlu menjaga kesehatan dan asupan nutrisi untuk menjaga agar penyakitnya tidak berkembang menjadi PGK. Berikut akan dibahas secara rinci seluk beluk mengenai PGK agar pembaca memahami saran-saran untuk menjaga kesehatan, saran asupan nutrisi untuk penderita PGK serta lebih mudah memahami penelitian yang disampaikan dalam buku ini.

3.1. Definisi PGK

PGK adalah kondisi penyakit dengan kelainan struktural atau fungsional pada ginjal, dapat berupa: (1). Kelainan struktur ginjal

yang dapat diperiksa melalui beberapa parameter laboratorium (albuminuria, sedimen urine, kelainan elektrolit akibat ginjal terganggu), pemeriksaan histopatologis, pencitraan atau riwayat transplantasi ginjal atau (2). Kriteria PGK yaitu kelainan fungsi ginjal atau kondisi ginjal dengan fungsi terganggu yang ditandai dengan laju filtrasi glomerulus (LFG) kurang dari 60 mL/menit/1,73 m^2 (satuan luas permukaan tubuh) yang berlangsung paling sedikit 3 bulan, dengan atau tanpa kerusakan struktur ginjal (Pradipta, *et al.*, 2014; Kopple, 2001).

Berbagai kondisi dapat menyebabkan terjadi PGK; dapat berupa penyakit dasar, penyakit genetik, infeksi atau berbagai kondisi yang menyebabkan terjadinya penurunan jumlah dan fungsi nefron ginjal, dan apabila tidak dilakukan intervensi, dapat jatuh ke dalam stadium akhir yaitu *end stage renal disease* (ESRD). ESRD merupakan gagal ginjal terminal, stadium klinis dengan fungsi ginjal yang sangat buruk dan bersifat *irreversible* (tidak dapat pulih kembali) sehingga perlu dilakukan transplantasi atau dialisis untuk mencegah terjadinya uremia. Uremia merupakan suatu kondisi toksik yang disebabkan oleh penumpukan atau retensi urea dalam darah yang seharusnya dibuang atau diekskresikan bersama urine. Uremia merupakan parameter kegagalan fungsi ginjal akibat penatalaksanaan penyakit ginjal yang gagal (Kasper, *et al*., 2015). Uremia akan dibahas lebih lanjut pada sub bab gejala klinik PGK. Proses terjadinya PGK berlangsung cukup lama, terjadi secara berangsur-angsur dalam beberapa bulan atau tahun, dimana terjadi penurunan kemampuan ginjal untuk melakukan fungsi utamanya.

3.2. Epidemiologi PGK (Pradipta, *et al,* 2014)

PGK merupakan penyakit yang sering dijumpai dalam praktek klinik sehari-hari. Hasil kajian dan metanalisis yang dilakukan oleh Hill et al, 2016, menunjukkan prevalensi PGK secara global di seluruh dunia adalah sebesar 13,4%. Menurut hasil *Global*

Burden of Disease 2010, PGK merupakan penyebab kematian peringkat ke-27 di dunia tahun 1990 dan meningkat menjadi urutan ke-18 pada tahun 2010 (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017). Prevalensinya di negara maju mencapai 10-13% dari seluruh populasi. Sejumlah 6% penduduk Amerika Serikat mengalami kerusakan ginjal kronik dengan LFG < 60 mL/min/1,73m^2 (PGK stadium 3 dan 4) dan 4,5% penduduk Amerika dengan LFG < 15 mL/min/1,73m^2 (PGK stadium 5). Penyebab utama PGK dan ESRD di Amerika adalah hipertensi. Data menunjukkan bahwa jumlah penderita PGK terus meningkat dalam 2 dekade terakhir di negara AS dan negara-negara lainnya. Tahun 2012 terdapat sejumlah 13% penderita PGK dari seluruh orang dewasa di AS, yaitu sekitar 26 juta orang penderita, padahal pada tahun 1990-an jumlahnya hanya sejumlah 10 persen, atau 20 juta penderita PGK(Kasper, 2010).

Perhimpunan Nefrolog ahli ginjal dan hipertensi (PERNEFRI), melaporkan bahwa setiap tahun di Indonesia terdapat 200.000 kasus baru gagal ginjal stadium akhir, namun tidak semua penderita terlayani kebutuhan cuci darahnya karena keterbatasan unit mesin dialisis (Dharmeizar, 2011). Menurut studi yang dilakukan oleh PERNEFRI, sejumlah 12,5% dari seluruh populasi di Indonesia mengalami penurunan fungsi ginjal **(**Pradipta, *et al.,* 2014). Data Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS, 2013), menunjukkan bahwa prevalensi penduduk Indonesia yang menderita gagal ginjal sebesar 0,2% atau 2 per 1000 orang penduduk (Kemenkes, 2013). Penyebab PGK terbanyak di Indonesia adalah nefropati diabetik (52%), di urutan kedua adalah hipertensi (24%). Berdasarkan strata pendidikan, prevalensi gagal ginjal tertinggi pada masyarakat yang tidak sekolah (0,4%) dan angka prevalensi di pedesaan (0,3%) lebih tinggi dibandingkan di perkotaan (0,2%). Faktor ketidaktahuan dan akses ke sarana kesehatan untuk berobat perlu mendapat perhatian karena dengan melakukan upaya pencegahan, pengendalian dan tatalaksana hipertensi dan diabetes melitus sesuai standar, penyakit ini sesungguhnya dapat dicegah (RISKESDAS, 2013). Prevalensi

PGK meningkat seiring meningkatnya jumlah penduduk usia lanjut, kejadian penyakit diabetes melitus serta hipertensi. Di Indonesia, biaya perawatan penyakit ginjal merupakan peringkat pembiayaan kedua terbesar (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017).

Penyakit ginjal sulit disembuhkan, sehingga banyak penderita jatuh ke dalam stadium akhir penyakit ginjal dengan konsekuensi harus menjalani cuci darah seumur hidup atau kemungkinan lain adalah menjalani transplantasi ginjal. Transplantasi ginjal merupakan tindakan yang cukup sulit, terutama dalam hal mencari donor ginjal yang sesuai dan tersedia. Para ilmuwan terus mencari terapi dan cara untuk mengobati PGK dan menjaga fungsi ginjal para penderita PGK agar tidak memburuk.

3.3. Klasifikasi PGK

Terdapat beberapa penggolongan klasifikasi, berdasarkan nilai LFG, komplikasi atau kondisi penderita, menurut beberapa institusi atau perkumpulan ahli penyakit ginjal. Berikut diperlihatkan beberapa klasifikasi yang sering digunakan.

3.3.1 Klasifikasi PGK menurut Kopple (Kopple, 2001)

Penggolongan klasifikasi menurut Kopple, PGK hanya digolongkan menjadi 5 stadium yang ditentukan berdasarkan nilai Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) atau *Glomerulo Filtration Rate* (GFR). Penderita dengan LFG lebih dari 60 cc/mnt dengan penyakit dasar (tergolong PGK stadium 1 dan 2), menandakan kerusakan ginjal masih ringan dan belum ada komplikasi. Namun apabila penyakit dasar yang menjadi penyebabnya tidak dikelola dengan baik maka dalam waktu sekitar 5 tahun akan berkembang menjadi PGK stadium 3 dan 4 atau GFR antara 15-59 cc/m. Selanjutnya jika PGK stadium 4 ini tidak dikelola dengan baik, dalam waktu sekitar 10 tahun kemudian, akan berkembang menjadi gagal ginjal terminal atau ESRD. Kadar GFR kurang dari 15 cc/m^2 tergolong PGK

stadium 5, dalam waktu kurang dari 5 tahun diperkirakan selanjutnya akan membutuhkan dialisis. Tabel klasifikasi stadium dan komplikasi PGK menurut Kopple, dapat dilihat pada tabel 3.1 berikut ini (J. D. Kopple, 2001)

Tabel 3.1
Klasifikasi penyakit PGK dan Komplikasinya
(Kopple, 2001)

Stadium	Keterangan GFR ml/min/1.73 m2	Komplikasi
1	Kerusakan ginjal dengan GFR Normal ≥ 90	Belum ada
2	Kerusakan ginjal dengan GFR Ringan/*Mild* GFR ↓ 60 – 89	Tekanan darah mulai meningkat
3	Kerusakan ginjal dengan GFR Sedang/*Moderate* GFR ↓ 30 – 59	Hiperfosfatemia, hipokalsemia, anemia, hiperparatiroid, hipertensi, hiperhomosisteinemia
4	Kerusakan ginjal dengan GFR Berat/*Severe* GFR ↓ 15 – 29	Malnutrisi, asidosis metabolik, cenderung hiperkalemia, dislipidemia
5	Gagal ginjal/*Renal faillure* GFR< 15	Gagal jantung, uremia

3.3.2 Klasifikasi PGK menurut *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO, 2012)

Stadium PGK diklasifikasikan oleh KDIGO berdasarkan nilai LFG secara lebih rinci pada penggolongan PGK penurunan ringan-sedang-berat. Klasifikasi PGK menurut KDIGO 2012 dapat dilihat pada tabel 3.2 berikut.

Tabel 3.2.
Klasifikasi PGK berdasarkan LFG
(KDIGO, 2012)

Stadium	Deskripsi	LFG (mL/menit/1,73m^2)
G1	Normal atau tinggi	≥ 90
G2	Penurunan ringan	60 – 89
G3a	Penurunan ringan-sedang	45 – 59
G3b	Penurunan sedang-berat	30 – 44
G4	Penurunan berat	15 – 29
G5	Gagal ginjal	< 15

3.4. Penyebab PGK

Beberapa penyakit dapat menjadi dasar kelainan terjadinya PGK, antara lain penyakit ginjal akibat diabetes (*diabetic kidney disease)*, penyakit glomerular bukan akibat diabetes (*non diabetic glomerular disease)*, penyakit ginjal polikistik *(cystic kidney disease)*, dan penyakit tubulointerstitial terganggu (*tubulointerstitial disease).* Faktor risiko terjadinya PGK adalah riwayat keluarga dengan penyakit ginjal, hipertensi, diabetes, penyakit autoimun, usia lanjut, stadium akhir *acute kidney disease*, dan kerusakan struktur ginjal baik pada LFG yang normal atau meningkat (Kasper, *et al*., 2010).

Penyebab PGK terbanyak adalah Diabetes Melitus (DM) tipe I dan II yaitu sejumlah 39% (terutama tipe I: 70%, tipe II: 30%), menyebabkan nefropati diabetik. Penyebab kedua terbanyak adalah Hipertensi, yaitu sebesar 28%, mengakibatkan nefrosklerosis. Penyebab lainnya adalah penyakit Glomerulo nefritis kronis, menjadi penyebab PGK sejumlah 13%, dan penyebab lain-lain sejumlah20%. Selain yang bersifat kronis, glomerulonefritis, akibat infeksi (endokarditis bakterial, hepatitis C, hepatitis B, HIV). Uropati obstruktif (batu saluran kemih, tumor dan lain-lain), Lupus eritematosus sistemik, amyloidosis, penyakit ginjal polikistik); Penggunaan obat-obatan (obat anti inflamasi non steroid, antibiotik, siklosporin, takrolimus) (Kasper, *et al.*, 2010).

3.5. Patogenesis PGK (Pradipta, *et al.*, 2014)

PGK merupakan penyakit berkelanjutan dengan berbagai pemicu, dikenal dengan istilah ***multihit process disease***. Sekali ginjal mengalami gangguan fungsi, selanjutnya banyak faktor yang akan memperberat perjalanan penyakit. Faktor-faktor yang berperan dalam perkembangan PGK dapat digolongkan menjadi dua, yaitu faktor yang tidak dapat dimodifikasi dan faktor yang dapat dimodifikasi. Faktor-faktor yang tidak dapat dimodifikasi antara lain: Usia (usia tua), jenis kelamin (laki-laki lebih berisiko menderita PGK), Ras tertentu (ras Afrika-Amerika lebih berisiko menderita PGK), genetik dan hilangnya massa ginjal. Faktor-faktor yang dapat dimodifikasi antara lain: Hipertensi, Proteinuria, Albuminuria, Glikemia, Obesitas, Dislipidemia, Merokok dan Kadar asam urat (Pradipta, *et al.*, 2014).

3.6. Patofisiologi PGK (Loo, M, 2014)

PGK terjadi karena terdapat gangguan atau kerusakan pada ginjal, terutama pada komponen filtrasi ginjal pada glomerulus, yaitu membran basal glomerulus, sel endotel, dan sel podosit, seperti yang sudah dijelaskan pada anatomi ginjal di Bab II. Kerusakan komponen-komponen ini dapat disebabkan secara langsung oleh kompleks imun, mediator inflamasi, atau toksin, selain itu dapat pula disebabkan oleh mekanisme progresif yang berlangsung dalam jangka waktu panjang (Pradipta, *et al,*, 2014).

PGK terjadi akibat berkurangnya massa fungsional ginjal karena terjadi hiper trofi ginjal sebagai kompensasi menurunnya jumlah dan fungsi nefron normal; hal tersebut dipicu oleh peningkatan molekul *vasoaktif*, sitokin, *growth factor*, dan hiper filtrasi akibat meningkatnya tekanan dan aliran dalam kapiler glomerulus. Beberapa sitokin dan *growth factor* berperan penting dalam menyebabkan kerusakan ginjal. Keadaan hiper filtrasi dapat

meningkatkan aktivitas renin angiotensin sehingga terjadi hipertrofi dan sklerosis pada ginjal (Kasper, *et al.*, 2010).

3.7. Manifestasi Klinis PGK (Pradipta, *et al.*, 2014)

Gejala klinis yang terjadi pada PGK tidak spesifik dan umumnya baru ditemukan pada tahap akhir penyakit, sehingga banyak penderita tidak waspada dan terlambat mencari pertolongan. Pada stadium awal, PGK seringkali asimptomatik atau tidak bergejala. Tanda dan gejala PGK melibatkan berbagai sistem organ, di antaranya:

- Gangguan keseimbangan cairan: edema perifer, efusi pleura, hipertensi, peningkatan *Jugular Venous Pressure* (JVP), asites;
- Gangguan elektrolit dan asam basa: tanda dan gejala hiperkalemia, asidosis metabolik (nafas Kussmaul, pendek dan dangkal), hiperfosfatemia;
- Gangguan gastrointestinal dan nutrisi: rasa kecap logam (*metalic taste*), mual, muntah, gastritis, ulkus peptikum, malnutrisi;
- Kelainan kulit: kulit terlihat pucat, kering, pruritus, pigmentasi kulit, ekimosis (bercak merah perdarahan);
- Gangguan neuromuskular: kelemahan otot, otot bergetar (fasikulasi), gangguan daya ingat, ensefalopati uremikum;
- Gangguan metabolik endokrin: dislipidemia, gangguan metabolisme glukosa, gangguan hormon seks;
- Gangguan hematologi: anemia (jenis mikrositik hipokrom atau normositik normokrom).

Penderita PGK sering menunjukkan gejala klinik sebagai berikut: merasa tidak ada nafsu makan, mual, muntah, pusing, sesak nafas, rasa lelah. Dari pemeriksaan fisik penderita PGK didapatkan edema perifer pada kaki dan tangan. Hasil pemeriksaan laboratorium penderita PGK ditemukan uremia, gangguan ekskresi dan konservasi

Natrium, retensi Fosfat dan Aluminium, gangguan ekskresi air, kalium dan kalsium, absorbsi kalsium, besi (Fe) dari GIT menurun, mungkin terdapat defisiensi vitamin B6, Vitamin C, Asam Folat dan vitamin D (Loo, *et.al.*, 1988).

Pada penderita PGK stadium lanjut dapat terjadi perubahan hormon-hormon, antara lain: *Parathyroid Hormone* (PTH), *Growth Hormone* (GH), Prolactin, *Luteinizing Hormone* (LH), *Folicle Stimulating Hormone* (FSH), Leptin, Insulin, Glukagon, Gastrin, Erythropoeitin (EPO), dan Renin. Selain itu pada saluran pencernaan penderita PGK didapatkan peningkatan flora usus, sehingga urea, kreatinin dan NH_3 meningkat. Gejala lain yang sering timbul pada PGK adalah malnutrisi atau Kurang Energi Protein (KEP),sangat kurus (*wasting)* terutama pada penderita dengan hemodialisis dan *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis* **(**CAPD), anoreksia, status katabolik, kehilangan asam amino selama proses dialisis (Loo, 1988).

Terdapat beberapa cara untuk mengevaluasi penderita PGK antara lain: (1). wawancara secara mendalam (anamnesis) dan pemeriksaan fisik yang berhubungan dengan penyebab dari PGK (2). dilakukan pemeriksaan penunjang seperti hematologi rutin, urine rutin, kreatinin, urea, GFR, gula darah, profil lipid, elektrolit (HCO_3^-, Ca^{2+}, dan PO_4^{3-}), alkali fosfatase, USG ginjal, dan (3). biopsi ginjal apabila benar-benar dibutuhkan data mengenai histopatologisnya (Kasper, 2010). Albuminuria merupakan penanda kerusakan nefron dan indikator penatalaksanaan PGK; Albuminuria diperiksa menggunakan *albumin specific dipstick* atau dengan *albumin creatinine ratio* dengan bahan pemeriksaan urine pagi hari (Kasper, et al., 2010).

3.7.1 Gangguan Keseimbangan Cairan

Pada penderita PGK sering terjadi gangguan keseimbangan cairan. Keseimbangan cairan penderita PGK perlu dipantau secara ketat dengan cara membatasi asupan air, sehingga meringankan kerja

ginjal dan terjadi perbaikan aliran per nefron. Pada PGK yang progresif, terjadi penurunan kemampuan untuk mengekskresi air menyebabkan terjadinya hipo osmolaritas (osmolaritas menurun). Pembatasan asupan air pada penderita PGK cukup berisiko karena bila asupan air dikurangi dikhawatirkan penderita akan mengalami dehidrasi. Penderita PGK sangat berisiko mengalami kelebihan atau kekurangan cairan. Nokturia (sering kencing di malam hari) terjadi pada awal PGK karena kemampuan ginjal mengonsentrasikan urine menurun. Pembatasan asupan air dilakukan pada penderita PGK stadium 4 dan 5, dan jumlah air yang boleh dikonsumsi disesuaikan menurut kondisi penderita dan pengeluaran air dari tubuh secara keseluruhan (Kidney Professional, 2005).

3.7.2 Gangguan Keseimbangan Natrium

Asupan Natrium yang berlebihan pada penderita PGK dapat menyebabkan edema, sebaliknya kekurangan asupan Natrium dapat menyebabkan *volume depletion* (kekurangan volume cairan tubuh). Asupan Natrium perlu diatur secara ketat untuk menjaga keseimbangannya yang seringkali terganggu akibat penurunan LFG. Pada PGK, ginjal tidak mampu memberi respons segera (menurunkan ekskresi Na) terhadap konsentrasi Natrium yang rendah atau pengeluaran ekstrarenal (misal pengeluaran melalui saluran pencernaan). Dapat dikatakan bahwa pada PGK, respons terhadap perubahan asupan air dan elektrolit melambat.

Pada orang normal, asupan Natrium yang tinggi menyebabkan perubahan cairan ekstra sel atau *Extra Cellular Fluid* (ECF) yang tidak berarti. Humoral *natriuretic factor* seperti *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP) dapat membantu meningkatkan ekskresi Natrium. Pada penderita PGK, ekskresi Natrium terhambat sehingga terjadi pergeseran cairan ekstra sel. Pada orang normal pada kondisi Natrium sangat rendah segera terjadi respons penyesuaian berupa penurunan ekskresi Natrium urine hingga 20 mEq dalam waktu 48

jam, sedangkan pada penderita PGK membutuhkan waktu hingga 1-2 minggu (Kidney Professional, 2005).

3.7.3 Gangguan Keseimbangan Kalium

Pada penderita PGK stadium lanjut terjadi peningkatan sekresi Kalium pada tubulus sebagai kompensasi tubuh untuk menjaga keseimbangan Kalium. Pada orang normal, 90% Kalium di ekskresi melalui urine, dan 10% melalui feses. Pada PGK lanjut, ekskresi Kalium melalui feses meningkat hingga 50%. Kalium plasma dan cairan tubuh perlu dipertahankan pada rentang normal; sedangkan penderita PGK sangat rentan terhadap keadaan hiperkalemia, apabila asupan Kalium tiba-tiba meningkat (Kidney Professional, 2005).

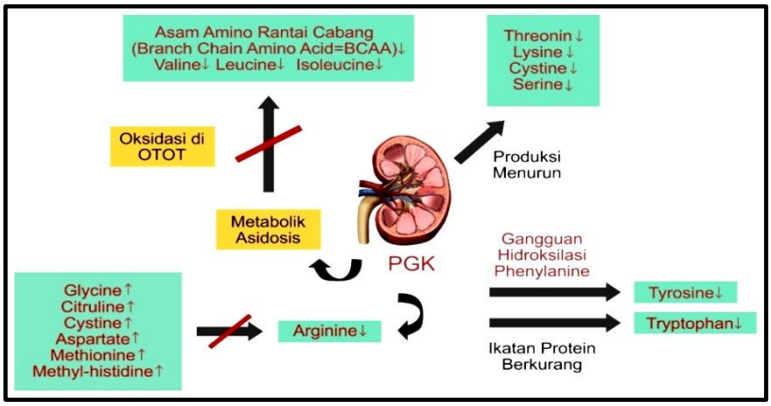
3.7.4 Gangguan Keseimbangan Kalsium dan Fosfat

Gangguan keseimbangan Kalsium dan Fosfat terjadi sebagai akibat dari hiperparatiroidisme sekunder dimana peningkatan Paratiroid Hormon (PTH) menyebabkan ekskresi fosfat meningkat dan terjadi penyakit pada tulang dan kegagalan fungsi sistem lainnya (Kidney Professional, 2005).

3.7.5 Gangguan Metabolisme Asam Amino pada PGK

Gangguan kadar asam amino plasma pada PGK berupa penurunan rasio asam amino esensial terhadap non esensial seperti pola yang terjadi pada keadaan malnutrisi. Asam amino esensial merupakan zat yang tidak dapat disintesis dalam jumlah yang memadai dalam tubuh, oleh karena itu harus ditambah dari asupan makanan dalam jumlah yang memadai sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan tubuh. Sebaliknya asam amino non-esensial dapat disintesis dalam tubuh. Pendapat ini tidak sepenuhnya benar karena ada jenis asam amino yang sintesisnya memerlukan asam amino lainnya. (Mitch, 2004; Giordano, C., 1963).Kelainan pola ini tetap terlihat walaupun asupan sudah terpenuhi, diduga hal ini karena pada PGK terjadi gangguan metabolisme asam amino.

Kadar plasma asam amino rantai panjang *(branch-chained amino acid, BCAA*) seperti valine, leucine, dan iso leucine menurun pada penderita PGK (Pernefri, 1995; Locatelli, F., et al., 2000). Kadar BCAA menurun karena pada PGK terjadi asidosis metabolik mengakibatkan terjadi oksidasi pada otot. Pada PGK terjadi juga penurunan konsentrasi dari threonine, lysine, dan serine akibat produksi asam amino dalam ginjal berkurang. Kadar tyrosine menurun akibat gangguan hidroksilasi phenylalanin. Pada kondisi uremia kadar Tryptophan menurun karena ikatannya dengan plasma protein melemah. Pada PGK kadar beberapa asam amino justru meningkat seperti glycine, citruline, cystine, aspartate, methionine dan metylhistidine. Konsentrasi asam amino citruline meningkat disebabkan karena menurunnya konversi asam amino ini menjadi arginine (Mitch, 2003; Mitch, 2004).



Gambar 3.1.
Perubahan Profil Asam Amino pada PGK
(Adaptasi dari Mitch, W.E., 2004).

Pada penderita PGK seluruh metabolisme asam amino signifikan terganggu. Ambilan glutamin dan prolin menurun hingga 80-90% di bawah normal, ambilan citruline menurun hingga 70%, produksi serine menurun hingga 80-90% dan tyrosine, arginine dan lysine menurun sampai 60-70% dari normal. Metabolisme

phenylalanine, taurine dan ornithine juga terganggu pada PGK. Seperti sudah dikatakan di atas, PGK juga menyebabkan keadaan asidosis metabolik yang mengakibatkan pemecahan protein otot meningkat sehingga metabolisme asam amino terganggu. Gangguan metabolisme asam amino yang terjadi pada PGK menjadi salah satu penyebab malnutrisi protein. Baik asam amino baik esensial maupun non esensial dibutuhkan untuk menghasilkan sintesis protein yang optimal dalam kadar yang memadai (Mitch, 2003; Mitch, 2004).

3.7.6 Gangguan Metabolisme Glukosa pada Penderita PGK

Pada penderita PGK dapat terjadi intoleransi glukosa, kadar glukosa meningkat, sebagai akibat resistensi insulin yang menghambat masuknya glukosa ke dalam sel. Dalam keadaan seperti ini pada penderita PGK harus dilakukan pemantauan kadar glukosa darah secara ketat. Pada PGK dengan kondisi hipoglikemia karena intoleransi glukosa akut, penderita memerlukan glukosa parenteral. Intoleransi glukosa dapat diperbaiki pada proses dialisis karena toksin uremik dapat di ekskresi dan dibuang. Toksin uremik ini diduga menjadi penyebab terjadinya resistensi insulin. Faktor lain yang berperan dalam gangguan metabolisme glukosa adalah peninggian kadar glukagon dan hormon pertumbuhan (Sekarwana, 2002).

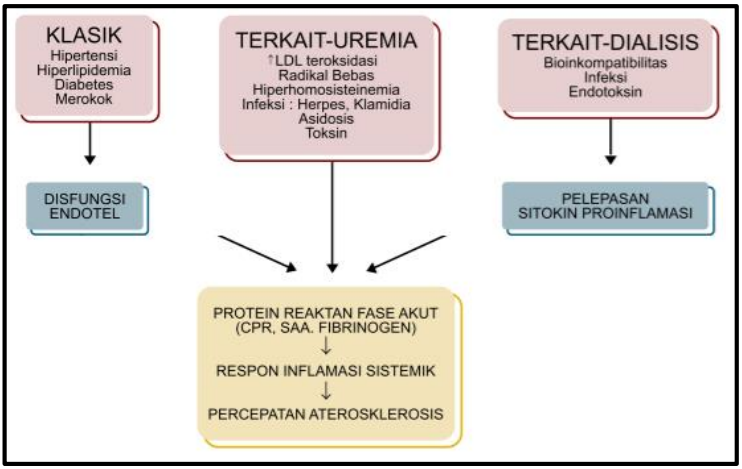
3.7.7 Gangguan Metabolisme Lemak pada Penderita PGK

Pada penderita PGK, sering terjadi hiperlipidemia terutama pada PGK yang disertai sindrom nefrotik. Hiperlipidemia yang umum terjadi adalah hipertrigliseridemia, peningkatan VLDL dan penurunan LDL sedangkan kadar kolesterol total dapat tetap normal atau meningkat. Peningkatan kadar trigliserida terjadi di hepar akibat hiperinsulinisme, penurunan fungsi ginjal dan penurunan katabolisme trigliserida pada LFG<40 ml/menit/1,73m^2. Peningkatan kadar trigliserida mengikuti peningkatan progresivitas PGK. Kondisi ini diduga terjadi akibat terganggunya jalur *catabolic pathway trigliserida* dan menurunnya aktivitas protein lipase dan lipase hati

(Swinford, R.D., 1996). Pada penderita PGK enzim Lipoprotein Lipase (LPL) dan Hepatik Trigliserida Lipase (HTGL) kurang berfungsi dengan baik (Attman, 2011). Kadar trigliserida yang tinggi dapat meningkatkan progresivitas PGK serta menyebabkan terjadinya aterosklerosis.

3.7.7.1 Aterosklerosis

Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada penderita PGK (Chan, 2005). Aterosklerosis merupakan penumpukan lemak, sel radang dan jaringan ikat pada dinding pembuluh arteri yang selanjutnya dapat berkembang menjadi penyakit kardiovaskular. Aterosklerosis merupakan komplikasi yang sering terjadi pada penderita PGK. Proses aterosklerosis yang cepat dapat meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular. Jalur aterosklerosis terbagi menjadi 2 bagian yaitu klasik yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskular dan non klasik yang berhubungan dengan PGK (Arif, 2016). Jalur klasik dipicu oleh beberapa sebab, seperti hipertensi, hiperlipidemia, diabetes dan merokok. Jalur klasik ini akan menyebabkan disfungsi endotel, selanjutnya meningkatkan protein reaktan fase akut dan terjadi respons radang menyeluruh atau sistemik sehingga terjadi percepatan aterosklerosis. Jalur non klasik yang berhubungan dengan PGK ada 2, pertama yang terkait Uremia, seperti: peningkatan LDL teroksidasi, hiperhomosisteinemia, infeksi herpes, infeksi klamidia, asidosis dan toksin. Jalur non klasik yang kedua, terkait dialisis seperti: bioinkompatibilitas, infeksi dan endo toksin yang selanjutnya menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi sehingga terjadi percepatan aterosklerosis. Faktor risiko dan perubahan metabolik pada kondisi uremia penderita PGK berkontribusi terhadap faktor risiko penyakit kardiovaskular karena adanya proses inflamasi, disfungsi endotel, hiper aktivasi simpatis, malnutrisi, stress oksidatif, pengapuran pembuluh darah, dan cairan berlebihan (*volume overload*) (Arif, 2016).



Gambar 3.2.
Faktor Risiko Aterosklerosis pada Uremia
(Modifikasi dari Arif, 2014).

Proses uremia mengakibatkan terjadi respons peradangan yang diperantarai oleh monosit, makrofag dan endotel vaskular. Proses radang yang terus menerus akan menimbulkan respons pembuluh darah yang diperantarai oleh mediator inflamasi lewat jalur kemotaktik dan haptotatik. Pada penderita PGK terjadi penimbunan urea yang mengakibatkan keadaan toksik. Toksik urea dapat menyebabkan perubahan sel endotel sehingga lebih mudah menyintesis dan mengekspresikan *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), protein yang menyebabkan penempelan (adhesi) limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil ke endotel pembuluh darah dan berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis. Konsentrasi *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), molekul protein adhesi antar sel yang selalu terdapat dalam membran leukosit dan sel endotel meningkat akibat stimulasi sitokin dan kemokin seperti *Interleukin-8* (IL-8), polipeptida yang diproduksi oleh sel-sel monosit, neutrofil, sel T, fibroblast, sel endothelial dan sel epithelial, setelah terpapar antigen atau stimulan radang (iskemia dan trauma),

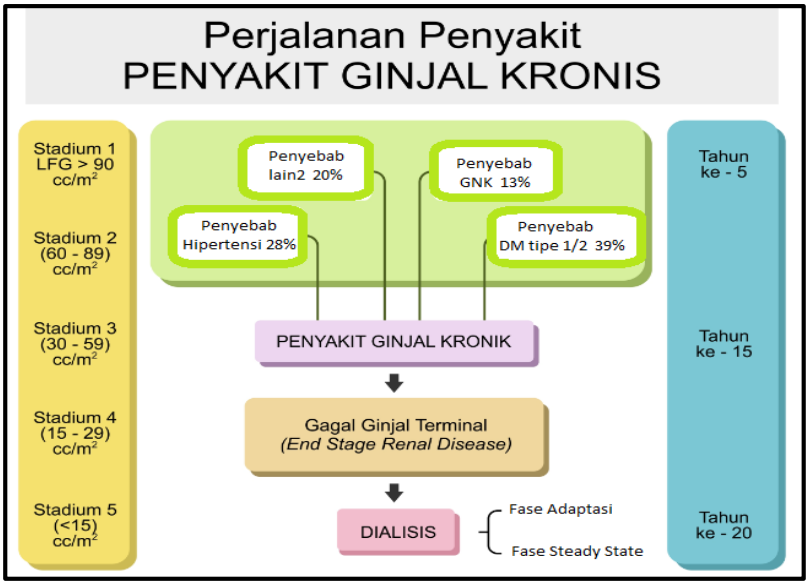
dan *monocyte chemo attractant protein-1* (MCP-1). Pada penderita PGK dengan uremia, terjadi peningkatan kadar IL-1β dan TNFα sehingga merangsang endotel mengekspresikan ICAM-1 dan berikatan dengan *Leucocyte Functioning Antigen* (LFA) sehingga monosit akan masuk ke endotel dan berubah menjadi makrofag. Monosit yang sudah menjadi makrofag akan memakan lipid (LDL) sehingga menjadi sel busa *(foam cell)*. Sel busa akan mengekspresikan *growth factor* dan sitokin lain selanjutnya membentuk plak aterosklerosis (Arif, 2016).

3.8. Penatalaksanaan Penderita PGK

Pengelolaan penderita PGK, meliputi terapi medikamentosa (obat-obatan) dan terapi non-medikamentosa, seperti nutrisi dan pengelolaan berat badan. Pada tiap stadium PGK terjadi patofisiologis maupun gangguan metabolik yang berbeda, sehingga masing-masing perlu penanganan yang berbeda dan tidak dapat disamaratakan. Tujuan dari pengelolaan PGK adalah untuk memperlambat progresivitas penyakit. Pada tahap-tahap awal PGK menunjukkan gejala klinis yang tidak khas, sering kali penderita tidak menyadari hingga penyakitnya bergejala saat sudah mencapai stadium lanjut. Gangguan metabolisme maupun gejala klinis PGK stadium 1 dan 2 biasanya tidak begitu menonjol, justru kelainan penyakit dasar, seperti diabetes atau hipertensi yang muncul dan perlu dikelola yang baik. Pengelolaan stadium 1 dan 2, diutamakan aspek pencegahan terhadap progresivitas dan penyakit dasar penyebab PGK, penurunan risiko penyakit kardiovaskuler, serta perkiraan prognosisnya. Pengelolaan PGK stadium 3 terutama ditujukan pada komplikasi penyakit dasar penyebab PGK, selain memperlambat progresivitas PGK. Pada PGK stadium 4 dan 5, dilakukan pengelolaan yang difokuskan terhadap komplikasi PGK, termasuk persiapan dan pengobatan terapi ginjal pengganti (TGP)

seperti dialisis, transplantasi, dan lain-lain (Dharmeizar, 2011; System, 2013).

Perjalanan PGK sejak terdiagnosis penyakit dasar (misalnya; diabetes, hipertensi, dll.) hingga terjadi PGK stadium terminal berlangsung antara 5 hingga 20 tahun (Pernefri, 1995; Locatelli, F., *et al.*, 2000). Perjalanan penyakit PGK, penyakit dasar yang menjadi etiologinya, maupun tahapan PGK berdasarkan pemeriksaan LFG, secara skematis dapat dilihat pada gambar 3.3 berikut ini (Necosad Study Group., 2001).



Gambar 3.3.
Perjalanan Penyakit PGK berdasarkan Penyebab dan Waktu
(Modifikasi dari Necosad, 2011).

Penderita PGK dengan penyakit dasar hipertensi dapat diberikan obat anti hipertensi yang dapat memperbaiki hipertrofi dan hipertensi intraglomerulus sehingga memperlambat kerusakan nefron. Target terapi bergantung dari kadar proteinuria dan tekanan

darah. Tekanan darah yang meningkat menyebabkan peningkatan kadar proteinuria yang dapat menjadi faktor risiko kerusakan nefron dan penyakit kardiovaskular. Obat hipertensi yang direkomendasikan untuk penderita PGK adalah penghambat ACE dan *Angiotensin receptors blockers* (ARB) yang berefek sebagai *antiproteiuric agent.* Kontra indikasi obat tersebut adalah batuk, riwayat reaksi anafilaksis, dan hiperkalemia. (Kasper, et al., 2010).

Pencegahan primer PGK stadium 1 dan 2 adalah mengelola obesitas dan mengobati dengan baik penyakit yang mendasari seperti diabetes dan hipertensi. Saran penatalaksanaan untuk PGK stadium ini adalah mengendalikan faktor risiko seperti proteinuria dan tekanan darah. Obat terpilih untuk proteinuria dan tekanan darah tinggi penderita diabetes dan hipertensi adalah penghambat ACE dan ARB (Xie, 2008). Obat lini kedua untuk penderita PGK dengan hipertensi adalah *calcium channel blocker* (CCB) yang berefek *antiproteiuric agent* dan berefek sebagai *renal protective* (Kasper, et al., 2010).

Diabetic nephropathy sering menyebabkan terjadinya PGK dan mudah berkembang menjadi stadium ESRD sehingga prognosisnya lebih buruk. Beberapa strategi untuk mencegah dan memperlambat progresivitas *diabetic nephropathy* adalah dengan menjaga kadar gula darah terkontrol dengan obat *antihyperglicemic agent* yaitu Sulfonil Urea atau Metformin sehingga dapat menurunkan albuminuria. Pemberian metformin pada PGK harus berhati-hati dan di bawah pengawasan dokter. Metformin hanya boleh diberikan jika LFG lebih besar dari 30 mL/mnt, mengingat ekskresi metformin adalah melalui ginjal dan risiko asidosis laktat yang mungkin terjadi pada penderita DM type II (Heaf, 2014). Kontrol tekanan darah dan proteinuria perlu dilakukan secara teliti karena pada 80% penderita diabetes tipe II ditemukan irama *sirkardian* tekanan darah yang abnormal sehingga berpotensi menyebabkan gangguan kardiovaskular yang parah (Kasper, 2010).

Obat anti hipertensi penghambat ACE dan ARB yang digunakan pada penderita diabetes dengan mikro albuminuria dan proteinuria mempunyai efek renoprotektif karena menurunkan tekanan intraglomerulus dan menghambat perubahan faktor sitokin *Transforming Growth Factor-beta* (TGF-*β*) yang memediasi jalur sklerosis.

Tindakan transplantasi ginjal dan dialisis pada penderita PGK stadium 5 masih diperdebatkan. Transplantasi ginjal memiliki potensi untuk penyembuhan pada penderita PGK, sedangkan dialisis hanya memperbaiki 10-15% fungsi ginjal dalam hal membuang sisa metabolit molekul kecil dan yang lebih kecil lagi. Penderita dengan gagal ginjal akut bersifat *reversible* dan harus segera dilakukan dialisis selama beberapa waktu supaya fungsi ginjal tidak memburuk dan berkembang menjadi PGK (Kasper, Braunwald et al., 2010).

3.8.1 Tujuan Tata Laksana PGK

Tujuan tata laksana pada PGK antara lain: 1. Mencegah atau menghambat penurunan LFG; 2. memelihara dan mempertahankan status gizi optimal dengan memperhitungkan sisa fungsi ginjal agar tidak memperberat kerja ginjal yang masih ada; 3. mencegah dan menurunkan kadar urea darah yang tinggi (uremia); 4. mengontrol edema dan ketidakseimbangan elektrolit dengan mengontrol asupan air, Na, K; 5. mencegah atau memperlambat perkembangan renal *osteodystrophy* dengan mengontrol asupan kalsium, Fosfat, dan Vitamin D (Altmatsier, 2006) dan mengatasi komplikasi PGK stadium akhir (stadium 4 dan 5). **(**Pradipta, *et al.,* 2014).

Tata laksana untuk menghambat progresivitas PGK:

- **Kontrol tekanan darah:** target tekanan darah: < 130/80 mmHg (tanpa proteinuria), < 125/75 mmHg (dengan proteinuria). Obat anti hipertensi yang disarankan adalah: penghambat ACE,ARB, dan *Calcium Channel Blocker* (CCB) non-hidropiridin.

- **Pembatasan asupan protein,** yaitu Diet Rendah Protein (DRP). Saran asupan protein secara umum untuk mencegah risiko malnutrisi, adalah sebagai berikut:
  * Jumlah protein untuk PGK pre-dialisis: 0,6–0,75 g/kgBB ideal/hari
  * Jumlah protein untuk PGK hemodialisis: 1,2 g/kgBB ideal/hari
  * Jumlah protein untuk PGK dialisis peritoneal: 1,2–1,3 g/kgBB ideal/hari
  * Jumlah protein untuk PGK yang menjalani transplantasi ginjal: 1,3 g/kg BB ideal/hari pada 6 minggu pertama pasca transplantasi dilanjutkan 0,8-1 g/kgBB ideal/hari.
  * Protein yang dipilih adalah yang memiliki kandungan biologis tinggi (protein hewani), minimal 50%. Fokus nutrisi penderita PGK yang terutama adalah diet rendah protein (DRP) pada stadium 3, 4, dan 5 (LFG di bawah 60 ml/mnt). Pembatasan protein pada PGK sangat perlu dilakukan, asupan yang protein tinggi dapat membahayakan karena menyebabkan hiper filtrasi pada ginjal dan meningkatkan tekanan intra glomerulus sehingga nefron akan semakin rusak. DRP dapat memperlambat progresivitas PGK.
- **Kontrol kadar glukosa darah.** Target glukosa darah berdasarkan parameter HbA1C adalah kurang dari 7%. Penyesuaian dosis obat hipoglikemik oral dilakukan untuk mencapai target tersebut. Penderita PGK dengan DM tidak disarankan pemberian obat golongan Metformin, sebagai alternatif dapat dipilih golongan Glitazon.
- **Pembatasan cairan.** Rekomendasi asupan cairan pada PGK adalah:
  * Jumlah cairan untuk PGK pre-dialisis: cairan tidak dibatasi dengan syarat jumlah produksi urine dalam rentang normal
  * Jumlah cairan untuk PGK yang menjalani hemodialisis: 500 mL/hari ditambah jumlah produksi urine

* Jumlah cairan untuk PGK dialisis peritoneal: 1500-2000 mL/ hari, harus dilakukan pemantauan jumlah urine harian selama 24 jam.
* Jumlah cairan untuk PGK yang menjalani transplantasi ginjal: pada fase akut pasca transplantasi, cairan penderita dipertahankan euvolemik/sedikit hipervolemik dengan *insensible water loss* diperhitungkan sebesar 30-60 mL/jam. Untuk penderita normovolemik dan *graft* berfungsi baik, asupan cairan dianjurkan minimal 2000 mL/hari. Untuk penderita oliguria asupan cairan harus seimbang dengan produksi urine ditambah *insensible water loss*es besar 500-750 mL.

- **Pembatasan asupan garam:** rekomendasi asupan NaCl per hari:
  * Jumlah asupan garam untuk PGK pre-dialisis: < 5 g/hari
  * Jumlah asupan garam untuk PGK hemodialisis: 5-6 g/hari
  * Jumlah asupan garam untuk PGK dialisis peritoneal: 5-10 g/hari
  * Jumlah asupan garam untuk PGK yang menjalani transplantasi ginjal: disarankan kurang dari 6 ─7 g/hari. Natrium hanya dibatasi pada periode akut pasca operasi dimana mungkin terjadi fungsi graft yang buruk atau hipertensi pasca transplantasi (Almatsier, 2006).
- **Terapi Dislipidemia:** Target kadar LDL < 100 mg/dL, kadar trigliserida ≤ 200 mg/dL, target kolesterol non-HDL < 130 mg/dL. Kolesterol non-HDL ialah kadar kolesterol total dikurangi kadar HDL. Terapi untuk dislipidemia adalah obat golongan statin; dan sebaiknya dipilih statin yang aman terhadap ginjal, yaitu jenis yang diekskresikan bukan melalui ginjal, melainkan lewat organ hepar (hati); misalnya Atorvastatin. Pola makan yang disarankan adalah rendah lemak jenuh. Jumlah asupan lemak yang disarankan adalah sejumlah 25-30% dari total kalori dengan jumlah lemak jenuh dibatasi kurang dari 10%. Apabila pada

penderita PGK terdapat dislipidemia, jumlah asupan kolesterol dalam makanan dianjurkan kurang dari 300 mg/hari.

- **Modifikasi gaya hidup.** Penderita PGK perlu memperhatikan berat badannya dan perlu menghindari kegemukan atau obesitas. Indeks masa tubuh ideal adalah antara 20-22,9 kg/m^2. Jika berat badan penderita PGK berada di luar rentang tersebut harus dilakukan pengaturan berat badan dan olah raga 30 menit minimal 3 hari dalam seminggu, serta berhenti merokok.
- **Edukasi.** Penderita PGK sebaiknya diberi pengertian mengenai penyakitnya, faktor yang berpengaruh terhadap progresivitas penyakit, pilihan makanan yang disarankan, serta kemungkinan terapi pengganti ginjal (Dharmeizar, 2011).

3.8.2 Komposisi Diet PGK (Altmatsier, 2006; Christine, 2008; Suzuki, 2007; Maurice, 2006)

Nutrisi untuk penderita PGK diutamakan asupan yang diberikan melalui oral. Pada kondisi penderita yang tidak memungkinkan asupan melalui oral, diberikan nutrisi enteral dan parenteral. Rencana pola diet disesuaikan dengan kondisi tiap kasus penderita (Byham-Gray, 2005) (Byham Gray, 2014).

- **Energi**. Kebutuhan energi penderita PGK diberikan dalam jumlah cukup dan adekuat sejumlah 35 kkal/kgBB/hari. Penderita PGK dengan BB kurang dari 60 kg, diberikan energi sejumlah 35 kkal/kgBB/hari. Untuk penderita BB lebih dari 60 kg, sejumlah 30 kkal/kgBB/hari. Pada PGK geriatri yaitu penderita yang berusia lebih dari 60 tahun, cukup diberikan energi sejumlah 30 kkal/kg BB/hari (Byham Gray, 2014).
- **Karbohidrat (KH)** sebagai sumber tenaga, diberikan sejumlah 50%-60% dari total kalori. Jumlah pemberian KH dapat dihitung dari kebutuhan Energi (E) total dikurangi Energi yang berasal dari protein dan lemak. Jenis KH yang diberikan untuk penderita PGK terutama bentuk karbohidrat kompleks.

- **Protein.** Diet Rendah Protein (DRP).

  Protein sebagai fokus utama sumber makanan yang harus dikontrol dan dibatasi pada penderita PGK. Protein diberikan dalam jumlah terbatas yaitu, untuk penderita PGK stadium 3 jumlah protein yang direkomendasikan sejumlah 0,6 g/kgBB/hari dan suplemen asam amino esensial ≥ 0,35 g/kgBB/hari, minimal 50%-60% protein *High Biological Value* (HBV) atau protein hewani.

  Jumlah protein yang disarankan untuk penderita PGK stadium 4 dan 5 sejumlah 0,6g/kgBB/hari dan suplemen asam amino esensial ≥ 0,35 g/kgBB/hari atau 0,3 g/kgBB/hari suplemen asam ketoanalog (Kasper, et al., 2010).

  Pada PGK stadium 5 fase progresif dan belum menjalani dialisis, jumlah protein yang diberikan adalah sangat rendah (0,3 gr/kgBB/hari), namun perlu selalu dipantau dan dipertimbangkan pemberian suplemen asam amino esensial atau asam ketoanalog. Kebutuhan protein untuk penderita yang sudah menjalani hemodialisis adalah sejumlah 1,2 g/kgBB/hari, sedangkan untuk penderita peritoneal dialisis adalah 1,2-1,3 g/kgBB/hari. Komposisi protein yang disarankan untuk penderita PGK yang belum menjalani dialisis, adalah 50% protein nabati dan sisanya protein hewani. Pada DRP dengan jumlah protein kurang dari 40 gram/hari, kacang-kacangan tidak dianjurkan dikonsumsi dalam jumlah berlebihan (Cupisti et al., 2014)

  Diet penderita PGK disebut sebagai Diet Rendah Protein (DRP) karena protein perlu diberi dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan penderita sehat. Pemberian DRP disesuaikan kondisi penyakit PGK. Jumlah protein untuk tujuan pemeliharaan jaringan tubuh dan mengganti sel-sel yang rusak minimal adalah 0,6 g/kg BB. Akan tetapi apabila asupan energi tidak tercapai, jumlah protein dapat ditingkatkan dan diberikan hingga 0,75 g/kg BB. Pustaka yang lama menyebutkan bahwa proporsi protein *High Biological Value* (HBV) atau protein bernilai biologi

tinggi/hewani adalah ≥ 60 %, akan tetapi saat ini anjuran proporsi protein hewani berbanding nabati cukup 50% (Byham Gray, 2014).

Pustaka sebelumnya menyebutkan bahwa tidak disarankan asupan protein lebih dari *Dietary Reference Intakes* (DRI) yaitu 0,8 g/kgBB/hr. Untuk penderita PGK stadium 1-3, disarankan protein sejumlah 0,8 g/kgBB/hr dengan minimal 50%-60% protein *high-biologic-value* (HBV) untuk mencukupi kebutuhan asam amino esensial. Jumlah protein ini cukup rendah jika dibandingkan dengan konsumsi rerata protein orang dewasa dalam diet barat yang rata-rata mengonsumsi sejumlah 1,0-1,5 g protein/kgBB/hr (Byham Gray, 2014). NKF KDOQI *Clinical Practice Guidelines for Nutrition in Chronic Renal Failure* 2000 menyebutkan bahwa jika GFR <25 mL/mnt/1,73 m^2, atau penderita yang tergolong ke dalam PGK stadium 4-5 jumlah protein diberikan sejumlah 0,6 g/kgBB/hr, namun jika asupan energi tidak memadai asupan protein dapat dinaikkan hingga 0,75 g/kgBB/hr (Kopple, 2001).

Saran terkini dari *The National Kidney Disease Education Programme* (NKDEP) untuk memperlambat perburukan penyakit adalah pembatasan protein maksimal 0,8 g/kgBB/hr untuk penderita tanpa diabetes dan antara 0,8-1,0 g/kgBB/hr untuk penderita dengan diabetes (NKDEP, 2010). NKDEP dibentuk oleh *National Institutes of Health* (NIH), *United States* didirikan pada tahun 2001.

Catatan: cara mudah untuk perhitungan protein HBV yaitu **7 gram protein HBV** terdapat dalam 28,3 gram daging atau ikan atau ayam (1 potong sedang) atau 1 butir telur atau 1 gelas (206,5 ml) susu *full cream* atau skim (Almatsier, 2006). **Protein** (Life Technologies, 2013)

Protein adalah sumber makanan yang dibutuhkan oleh tubuh untuk membangun, memperbaiki dan memelihara jaringan tubuh. Jumlah asupan protein harus memadai kebutuhan tubuh tersebut.

Apabila jumlah asupan protein tidak memadai, maka protein diperoleh dari hasil pemecahan otot, sehingga terjadi kehilangan massa otot, penurunan berat badan dan kondisi *wasting* (sangat kurus). Selama penderita PGK menjalani proses dialisis, protein banyak sekali terbuang dan penderita mudah mengalami malnutrisi, disertai gejala anoreksia, hiper katabolisme, kehilangan asam amino (AA).

Mengacu pada kelengkapan asam amino esensial, protein diklasifikasikan sebagai 1. Protein Lengkap 2. Protein Sebagian Lengkap dan 3. Protein Tidak Lengkap.

1. Protein Lengkap

Protein hewani merupakan protein lengkap, karena mengandung semua AA esensial dalam kadar yang cukup untuk memelihara, memperbaiki sel dan dapat menunjang pertumbuhan. Protein lengkap dari sumber protein hewani mempunyai nilai biologis tinggi (*high biological value/HBV*).

2. Protein Sebagian Lengkap

Protein sebagian lengkap umumnya berupa protein nabati yang mengandung semua AA esensial, namun kadar salah satu AA esensialnya kurang lengkap = *partially incomplete protein*. Protein ini hanya dapat memelihara dan memperbaiki sel, tetapi tak dapat menunjang pertumbuhan. Contoh: Protein kacang-kacangan mengandung metionin yang kurang memadai, sedangkan protein padi-padian kandungan asam amino lisin yang kurang.

3. Protein Tidak Lengkap

Protein Tidak Lengkap adalah protein yang mengandung 2 atau 3 AA esensial dengan kadar yang kurang memadai. Protein ini hanya berfungsi sebagai sumber energi saja dan tidak dapat dipakai untuk memelihara dan memperbaiki sel yang rusak apalagi menunjang pertumbuhan. Contoh: sayur-sayuran dan buah-buahan.

Kelebihan asupan protein dari yang dibutuhkan oleh tubuh tidak dapat disimpan, namun akan dipecah menjadi urea dan substansi Nitrogen. Tahap penguraian protein adalah pertama protein dipecah menjadi polipeptida, selanjutnya polipeptida dipecah menjadi asam amino. Asam amino kemudian akan diuraikan menjadi air (H_2O), CO_2, NH_2 dan Energi. Penguraian lengkap dari protein sejumlah 1 gram akan menghasilkan energi sebesar 4 Kkal. Substansi CO_2-dikeluarkan melalui paru-paru sedangkan NH_2 akan diubah menjadi urea dan perlu dikeluarkan dari tubuh bersama H_2O melalui ginjal. Ginjal yang berfungsi dengan baik sangat berperan dalam pengeluaran urea ini (Maurice, 2005).

- **Lemak.** Jumlah lemak untuk penderita PGK diberikan dalam jumlah cukup, dibatasi sejumlah20-30% dari kebutuhan energi total. Lemak yang dipilih diutamakan jenis *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) atau asam lemak tidak jenuh. Konsumsi lemak jenuh dan kolesterol harus dibatasi.
- **Cairan.** Pada keadaan *renal insufficiency* cairan belum perlu dibatasi sampai timbul gejala penurunan *output* urine. Cairan dibatasi sebanyak jumlah urine sehari ditambah pengeluaran cairan melalui keringat dan pernafasan (ditambah 500-750 ml).
- **Vitamin.** Vitamin diberikan apabila ada kecurigaan gejala defisiensi vitamin sehingga diperlukan suplemen, misalnya piridoksin (Vitamin B6), asam folat (Vitamin B9), Vitamin C (maksimal 100 mg/hr) dan Vitamin D. Vitamin larut lemak lain selain Vitamin D tidak diperlukan.
- **Fosfat (P), Kalsium (Ca).** Zat ini umumnya perlu ditambahkan namun bergantung pada kondisi tiap kasus. Saran umum untuk Kalsium adalah 1400-1600 mg/hari. Fosfat yang dianjurkan $\leq$ 10 mg/kg BB/hari.
- **Natrium.** Natrium dibatasi apabila terdapat hipertensi edema, asites, oliguria atau anuria. Banyaknya Natrium yang diberikan antara 1-3 g/hari setara dengan garam antara 2,5-7,6 g/hari.

- **Kalium.** Kalium diberikan sejumlah 2,5-3,5 gr/hr atau 40-70 meq/hari disesuaikan dengan kondisi ada tidaknya hiperkalemia. Pada penderita PGK dengan hiperkalemia (kalium darah > 5,5 mEq), oliguria atau anuria, kalium diberikan antara 1,5-3,0 gr/hr.

Catatan:

Semua sayur-sayuran dan buah-buahan diperbolehkan disantap oleh penderita PGK, kecuali jika penderita mengalami hiperkalemi. Pada kondisi kadar Kalium dalam darah yang tinggi, penderita PGK perlu menghindari buah dan sayur yang mengandung tinggi kalium. Sayur dan buah untuk penderita PGK dengan hiperkalemia perlu disiapkan secara khusus yaitu dengan cara merendam sayur yang segar (jenis yang tidak direbus) dan buah dalam air hangat selama 2 jam, setelah itu air rendaman dibuang. Sayur/buah dicuci kembali dengan air yang mengalir. Untuk sayuran yang direbus, setelah matang sayur ditiriskan dan air rebusan dibuang. Buah dapat dimasak menjadi stup buah/coktail buah. Bahan makanan tinggi kalium antara lain adalah pisang, durian dan nangka, alpukat, bayam, gambas (waluh siam), daun singkong, leci, daun pepaya, kelapa muda (Almatsier, 2006; Kresnawan, 2014).

Menurut *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2014, pola diet Mediteranian mampu menurunkan risiko PGK sebesar 50%. Diet ini terutama menganjurkan konsumsi tinggi buah-buahan, sayuran, ikan, kacang-kacangan, dan lemak yang sehat untuk jantung, yaitu *Mono Unsaturated Fatty Acid* (MUFA), dan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Penderita disarankan untuk mengurangi konsumsi daging merah, makanan yang diproses juga permen atau gula. Penelitian ini mengevaluasi hubungan antara konsumsi diet Mediteranian dengan fungsi ginjal dalam jangka waktu lama dari 900 orang partisipan dengan rerata usia 64 tahun, diberi kuesioner konsumsi diet Mediteranian, kemudian dipantau selama 6,9 tahun. Pada akhir penelitian, kadar kreatinin serum seluruh subjek penelitian diperiksa. Hasil

penelitian menunjukkan bahwa mereka yang rutin mengonsumsi diet Mediteranian ini mengalami penurunan skor dan kadar kreatinin serum sejumlah 42% dibanding yang tidak mengonsumsi. Disimpulkan bahwa diet Mediteranian ini baik untuk penderita PGK karena fungsi ginjalnya terbukti membaik (Khatri, 2014).

3.8.1 Efek Diet Tinggi Protein Terhadap PGK

Asupan protein berlebihan dapat memengaruhi progresivitas dari penyakit ginjal yang mendasarinya. Diet tinggi protein dapat menambah parah proteinuria, dan meningkatkan progresivitas penyakit PGK. Secara keseluruhan penderita PGK mempunyai ‘intoleransi terhadap protein' dan diet tinggi protein menimbulkan efek metabolik yang merugikan. Diet tinggi protein dapat memicu hiperfosfatemia, yang mengakibatkan terjadinya hiperparatiroidisme, kondisi ini mungkin terjadi pada PGK stadium dini dan meningkatkan mortalitas (Cupisti et al., 2014). Hiperparatiroidisme mungkin terjadi jika LFG turun hingga di bawah 80ml/menit. Hiperparatiroidisme bahkan dapat terjadi walaupun kadar serum fosfat tidak meningkat. Patogenesis hiperparatiroidisme bergantung dari ketidakmampuan ginjal mengekskresi fosfat yang banyak terdapat dalam makanan, sehingga mengakibatkan peningkatan PTH sekunder (Kerstenbaum, 2005; Khosla, 2005). Diet tinggi protein memberi pengaruh yang tidak menguntungkan terhadap metabolisme PGK stadium dini.

3.8.2. Peningkatan kadar Urea akibat Diet Tinggi Protein pada Penderita PGK

Kadar urea yang normal dalam darah mencerminkan keseimbangan antara produksi dan ekskresi urea. Apabila terjadi gangguan fungsi ginjal, kadar urea dalam darah akan meningkat yang disebut uremia, dengan segala konsekuensi gejala penyakitnya. Metode penetapan urea adalah dengan cara mengukur kadar nitrogen

atau sering disebut *Blood Urea Nitrogen* (BUN). Nilai BUN akan meningkat apabila seseorang mengonsumsi protein dalam jumlah banyak, namun sumber makanan yang baru disantap tidak secara langsung berpengaruh terhadap nilai urea (Koulouridis & Koulouridis, 2011).

Pada penderita PGK terjadi ‘intoleransi protein' apabila menyantap protein dalam jumlah berlebihan, hampir sama dengan yang terjadi pada penderita penyakit hati atau penyakit metabolisme nitrogen herediter. Protein yang masuk ke dalam tubuh mengalami dua tahap metabolisme. Pertama, pemecahan protein yang menghasilkan asam amino yang diperlukan untuk cadangan sintesis protein tubuh yang baru. Kedua, pemecahan protein menghasilkan nitrogen, yang merupakan sisa metabolisme protein yang harus di ekskresi oleh ginjal. Pada kondisi ginjal terganggu, nitrogen yang terus terakumulasi ini cukup berbahaya dan menimbulkan gejala-gejala uremia.

Kandungan yang tinggi dari sisa metabolisme protein lain dalam darah seperti guanidine, asam amino aromatik/alifatik dapat menimbulkan efek toksik. Kandungan nitrogen urea yang tinggi dalam darah umumnya konsisten berbanding lurus dengan akumulasi sisa metabolisme protein yang lain, sehingga urea dipilih menjadi penanda adanya akumulasi bahan-bahan toksik dalam tubuh. Apabila seorang penderita PGK mengonsumsi banyak makanan yang mengandung protein, maka terakumulasi juga zat-zat lain seperti phenol, asam urat, asam dan fosfat. Kondisi diet tinggi protein meningkatkan progresivitas PGK (Khosla,2007; Nair, 2005; Noer, 2002).

3.8.2.1 Urea

Kadar urea dalam darah dapat menggambarkan fungsi dari ginjal. Sel-sel tubuh yang menghancurkan protein akan menghasilkan amonia (NH_3) yang mengandung nitrogen di hepar, nitrogen akan berikatan dengan elemen lain seperti karbon, hidrogen, dan oksigen

untuk menghasilkan urea $(NH_2)_2CO$yang merupakan bahan toksik untuk tubuh manusia (Laboratories, 2017a). Urea yang dihasilkan akan diangkut dari hepar ke ginjal melalui peredaran darah. Ginjal yang sehat menyaring dan mengekskresikan bahan toksik tersebut keluar melalui urine. Pada ginjal yang terganggu fungsi untuk menyaring dan mengekskresi urea akan menurun, sehingga nilainya dalam darah akan meningkat. Nilai normal dari urea pada manusia adalah 7-20 mg/dL (2,5-7,1 mmol/L) (Laboratories, 2017a). Nilai normal urea untuk tikus betina 13,2-27,1 mg/dL (Giknis, 2008).

3.8.2.2 Uremia (Azotemia) (Lola K, 2005)

Uremia adalah sindrom atau kumpulan gejala komplikasi serius dari PGK yang terjadi ketika kadar urea dalam tubuh sangat tinggi sehingga bisa menjadi racun bagi tubuh. Uremia merupakan salah satu penanda bahwa telah terjadi kegagalan fungsi ginjal. Gejala uremia ditandai oleh peningkatan dari *nitrogen waste products*, terutama kadar urea dalam darah meningkat. Hal ini disebabkan karena urea gagal di ekskresi oleh ginjal ke dalam urine; keadaan tersebut sangat berbahaya bagi kesehatan karena urea bersifat toksik (Lola, 2006). Uremia terjadi setelah LFG berkurang sebesar 90%. Sebelum GFR turun sebesar 90% tubuh masih mampu melakukan beberapa adaptasi berupa mekanisme kompensasi. Kondisi ini sering ditemukan pada penderita PGK stadium 3 dan 4.

Urea dalam cairan tubuh secara spontan diubah menjadi amonia dan sianat. Sianat berikatan dengan protein dalam sel secara irreversible, dan mempengaruhi fungsi sel. Pemberian sianat pada hewan akan menimbulkan gejala letargi, anoreksia, diare, dan kejang. Peran sianat pada sindrom uremia tidak berarti sedangkan urea sangat berpotensi untuk menyebabkan toksisitas sehingga terjadi *uremic syndrome*. Kondisi berikut dapat mempengaruhi dan dipengaruhi kondisi uremia:

1. *Over* Produksi Hormon *Counter-Regulatory*

Respon tubuh terhadap hipokalsemia dan *natriuretic hormon* (NP) menyebabkan produksi *Parathyroid Hormone* (PTH) berlebih sehingga terjadi kelebihan volume cairan tubuh selanjutnya memperberat kondisi uremia.

2. Produksi Hormon Ginjal Menurun

Uremia dapat menyebabkan produksi hormon eritropoietin menurun dan menyebabkan anemia, selain itu uremia menyebabkan berkurangnya 1-25 hydroxylation dari vitamin D_3 sehingga pada penderita PGK rawan terjadi penyakit tulang (*osteodystrophy*).

Uremia dapat menimbulkan masalah parah apabila terjadi akumulasi asam, demikian yang ditemukan Lyon dkk pada tahun 1931. Akumulasi asam menyebabkan asidosis metabolik yang mengakibatkan terjadinya gangguan hormonal (seperti penurunan aktivitas hormon tiroid, hormon pertumbuhan, peningkatan hormon paratiroid (PTH), resistensi insulin serta gangguan metabolisme tulang). Asidosis metabolik dalam waktu lama akan memicu katabolisme protein otot dan menyebabkan keseimbangan protein negatif (Khosla, 2005).

3.8.3 Pengaruh Protein Terhadap Kadar Kreatinin dan Sel Tubuh Penderita PGK

Hasil penelitian Noer (2006) menyatakan bahwa peningkatan kadar Kreatinin serum menunjukkan penurunan klirens Kreatinin serum dan LFG. Asupan daging matang dalam jumlah banyak meningkatkan kadar kreatinin serum, karena terjadi penambahan kreatinin eksogen. Setiap 1 gram daging yang dikonsumsi akan menghasilkan 3,5 sampai 5,0 µg kreatinin (Noer., 2006).

Salah satu penyusun tubuh manusia adalah protein. Dalam tubuh, protein disimpan dalam bentuk protein otot. Pada proses katabolisme, sel otot dipecah menjadi kreatinin dalam darah. Ginjal membuang kreatinin dari darah ke urine. Bila fungsi ginjal menurun, kemampuan membuang kreatinin berkurang dan akibatnya kreatinin

dalam darah meningkat. Nilai rata-rata "*turnover*" protein bervariasi bergantung dari jenis jaringan dan organ. Pada sel-sel hepatosit (hati), siklus *turnover* terjadi setiap beberapa hari. Sedangkan pada otot dan sel otak terjadi setiap satu atau dua minggu. Jumlah *turnover* protein intra seluler setiap hari sangat besar. Sebagai contoh pada orang dewasa normal dengan berat 70 kg sejumlah 280 gram protein disintesis dan di degradasi setiap hari. Sebagian besar protein yang disintesis dan didegradasi berasal dari intra seluler (Mandayam S., 2005; Nura, dkk., 2012).

3.8.3.1 Kreatinin

Kreatinin adalah hasil metabolisme pemecahan otot serta konsumsi daging yang terbentuk dari kreatin pada tubuh manusia. Kadar kreatinin pada serum bergantung dari beberapa faktor, seperti usia, jenis kelamin, ras, dan ukuran tubuh seseorang sehingga kadar kreatinin dalam darah bukan tolok ukur gambaran fungsi ginjal (Laboratories, 2017b). Nilai normal dari kreatinin serum pada manusia adalah 0,84-1,21 mg/dL (74,3-107 mikromol/L) (Laboratories, 2017b), sedangkan untuk tikus betina memiliki nilai normal antara 0,2-0,6 mg/dL. (Giknis, 2008).

Parameter yang paling baik untuk mengetahui fungsi ginjal adalah LFG atau eGFR. Nilai Kreatinin diperlukan untuk perhitungan LFG. Rumus penghitungan LFG telah dibahas dalam bab II. Rentang nilai normal LFG adalah 90 – 120 mL/min/1.73 m^2.

3.8.4 Keseimbangan Kreatinin dan Urea. (Kidney Professional, 2005)

Kreatinin dan urea disekresi dan direabsorbsi pada tubulus ginjal, keseimbangannya bergantung dari kemampuan filtrasi ginjal. Keseimbangan kreatinin dan urea dipertahankan dengan cara meningkatkan jumlah kreatinin dan urea plasma sehingga hasil ekskresi ginjal sama dengan produksi. Metabolisme urea oleh bakteri usus akan meningkat bila urea darah meningkat dan produksi

kreatinin dikurangi dengan cara menekan metabolisme (Kidney Professional, 2005).

3.8.5. Diet Rendah Protein (DRP) untuk Penderita PGK

Pengaturan diet adalah strategi penting dalam mengelola penderita PGK. Penderita PGK sangat disarankan untuk membatasi asupan protein dalam pola makannya. Saran ini berdasarkan hasil penelitian dan efek metabolik, dalam hal perbaikan tekanan darah, gejala uremia dan profil fungsi ginjal (Pradipta, E.A.,*et al*,2014). DRP berperan penting dalam mencegah dan memperbaiki hiperfosfatemia dan hiperparatiroidisme sekunder yang menjadi penyebab utama dari kalsifikasi vaskuler dan risiko mortalitas pada penderita PGK dengan uremia (Thomas and Otherson, 2012). DRP akan menyebabkan penurunan produk sisa Nitrogen dan serum PTH, sehingga terjadi peningkatan sensitivitas insulin dan kontrol metabolik pada penderita DM. DRP juga meningkatkan respons terhadap terapi eritropoietin untuk memperbaiki anemia yang terjadi pada PGK. Pada tikus model PGK pembatasan asupan protein menunjukkan peningkatan efek anti inflamasi dan antioksidan, selain penurunan tekanan pada kapiler glomerulus, albuminuria, dan fraksi klirens IgG. Pada subjek manusia, beberapa penelitian membuktikan bahwa DRP mempunyai efek yang baik dalam menurunkan ekskresi protein dan memperlambat progresivitas PGK.

Pembatasan protein semula dikhawatirkan menyebabkan kelelahan, malnutrisi dan pengecilan massa otot, namun ternyata kekhawatiran tersebut tidak terbukti (Bandiara, 2004). Hasil penelitian menunjukkan bahwa atrofi otot dan penurunan cadangan protein pada PGK bukan akibat pembatasan kalori atau asupan protein namun berhubungan dengan aktivasi jalur proteolitik. Pada beberapa kasus PGK, dilaporkan terjadi pengecilan massa otot. Menurut analisis para ahli pengecilan massa otot disebabkan karena progresivitas dari penyakitnya sendiri dan bukan akibat malnutrisi (Cupisti et al., 2014). Kehilangan massa otot yang terjadi pada

penderita PGK adalah proses katabolisme protein yang terjadi akibat jalur proteolitik seluler teraktivasi dan bukan akibat kurangnya asupan protein. Sampai saat ini terdapat anggapan bahwa hipoalbuminemia pada PGK disebabkan karena terbatasnya asupan protein dan gejala klinik mirip dengan keadaan malnutrisi. Pada penderita PGK terutama yang menjalani dialisis, penurunan serum albumin sebenarnya bukan disebabkan karena asupan nutrisi yang tidak adekuat namun disebabkan karena meningkatnya sitokin-sitokin inflamasi. Demikian pula penurunan berat badan, kelemahan (*fatigue*) dan kehilangan massa otot merupakan akibat proses metabolik kronis yang terjadi pada PGK. Pada keadaan penurunan berat badan dan kehilangan massa otot, meningkatkan asupan protein bukan merupakan solusi, namun justru terbukti menyebabkan gangguan metabolik dan tidak meningkatkan massa otot (Khosla, UM, *et.al.*, 2005).

Untuk memperjelas jalur yang berhubungan dengan anoreksia dan katabolisme otot pada penderita PGK yang menjalani dialisis diperlukan lebih banyak penelitian. Pemberian DRP pada tikus terbukti menunjukkan efek perbaikan jaringan parut, namun hal ini belum terbukti pada manusia. Penelitian membuktikan bahwa DRP bermanfaat pada PGK mulai stadium 3 dan 4 (LFG antara 60-15 ml/mnt/1,73 m^2). Pada PGK stadium 3 dan 4, protein sebaiknya dibatasi sejumlah 0,6-0,8 g/kgBB/hari. Pengaturan diet, termasuk protein, fosfat, pembatasan Natrium disertai diet vegetarian dan suplemen asam ketoanalog terbukti dapat memperbaiki risiko kardiovaskuler dan progresivitas penyakit ginjal (Bandiara, 2004).

Menurut *National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse*, hemodialisis merupakan terapi yang paling sering digunakan pada penderita PGK. Menurut *Clinical Practice Guideline on Adequacy of Hemodialysis*, kecukupan dosis hemodialisis yang diberikan diukur dengan istilah adekuasi hemodialisis (NKF-K/DOQI, 2000). Hemodialisis yang tidak adekuat dapat menjadi penyebab terjadinya malnutrisi (Bandiara, 2004). Kejadian malnutrisi

dapat dideteksi dengan pengukuran status gizi. Status gizi dapat diketahui melalui penilaian diet (asupan makan) dan penilaian antropometri (Thomas LK and Otherson J.B., 2012).

3.9. Komplikasi PGK

Komplikasi dari PGK dapat berupa gangguan kardiovaskular, gangguan *neuromuscular*, gangguan endokrin, anemia, kehilangan energi, penurunan dan gangguan status gizi, gangguan metabolisme kalsium dan fosfat yang dapat menimbulkan *metabolic bone disease* (gangguan tulang), gangguan kulit, serta gangguan keseimbangan garam (Natrium), air, Kalium dan konsentrasi asam basa (Kasper, 2010).

Komplikasi banyak terjadi terutama pada penurunan LFG yang cukup parah, misalnya pada PGK stadium lebih dari 3. Kondisi yang mungkin timbul antara lain: Hiperfosfatemia, hipokalsemia, anemia, hiperparatiroid, hipertensi, hiperhomosisteinemia. Semakin rendah LFG, kemungkinan terjadi komplikasi semakin besar. Pada PGK stadium 4 sering terjadi asidosis metabolik, kecenderungan menjadi keadaan hiperkalemia, dislipidemia dan malnutrisi. Pada penderita PGK stadium akhir, komplikasi yang mungkin terjadi adalah gagal jantung dan uremia.

3.9.1 Malnutrisi

Malnutrisi sering terjadi pada penderita PGK akibat hemodialisis. Malnutrisi akan meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas penderita PGK (Gunes, 2013). Penderita yang menjalani dialisis harus selalu dipantau dan dilakukan penilaian status gizi berdasarkan penilaian antropometri sesuai yang direkomendasikan oleh KDOQI (2000). Pengukuran antropometri adalah pengukuran yang dianggap sesuai sebagai indikator status kecukupan energi-protein pada penderita PGK yang rutin menjalani hemodialisis.

Status gizi penderita PGK sebaiknya diperiksa dan dievaluasi secara berkala.

3.9.1.1 Indikator Malnutrisi pada Penderita PGK (Suzuki, 2007)

Terdapat beberapa parameter untuk memantau terjadinya malnutrisi pada penderita PGK antara lain: asupan makanan, sekresi Urea Nitrogen 24 jam, berat badan dan pengukuran antropometrik dan hasil beberapa parameter laboratorium.

Asupan makanan perlu diperhatikan dan dipantau, misalnya jika asupan penderita sangat sedikit, akibat rasa mual sehingga jatah makanan sering tidak habis dimakan. Sekresi Urea Nitrogen 24 jam, diperiksa dengan metode pengumpulan urine selama 24 jam, kadar normalnya < 7g/kg/hr). Berat badan dan pengukuran antropometrik perlu diwaspadai apabila penderita kehilangan berat badan lebih dari 10% berat badan semula dalam kurun waktu 1 bulan, atau berat badan saat ditimbang < 85% Berat Badan Ideal (BBI) dan terjadi penurunan 10% tebal lipat kulit (TLK, pengukuran pada area otot triceps, biceps dan sub-scapular), penurunan Lingkar Lengan Atas (LLA) dan kekuatan otot. Hasil pemeriksaan laboratorium. Penderita PGK dicurigai menderita malnutrisi, apabila hasil pemeriksaan laboratorium, seperti berikut: kadar serum albumin < 3,5 g/dL, kadar serum kreatinin rendah pada kondisi PGK parah (hal ini jangan dianggap fungsi ginjal membaik, namun patut dicurigai adanya malnutrisi), kadar serum prealbumin rendah (<30 mg/dL), kadar transferrin serum rendah< 200 mg/dL, kadar asam amino esensial dalam plasma dan otot rendah, kadar hormon paratiroid immuno reaktif relatif rendah pada penderita PGK stadium lanjut.

Penyebab malnutrisi yang utama adalah 1. anoreksia dan 2. asupan makanan tidak adekuat. Kejadian anoreksia dipengaruhi oleh beberapa hormon, antara lain ghrelin, *orexin* atau *neuropeptide* Y. Ghrelin adalah peptida *profagic* yang dihasilkan oleh lambung dan bekerja pada pusat hipotalamus untuk meningkatkan aktivitas neuron

orexigenic (meningkatkan nafsu makan). Pada penderita PGK kadar Ghrelin plasma meningkat sebagai efek kompensasi menurunnya fungsi filtrasi ginjal. Akan tetapi pada penderita PGK terjadi resistensi mediator inflamasi dari pusat hipotalamus ke sinyal perifer sehingga asupan makanan penderita berkurang secara signifikan. Penurunan kadar ghrelin dapat diatasi dengan pemberian ghrelin eksogen. Ghrelin dapat digunakan untuk meningkatkan asupan makanan pada penderita PGK dengan malnutrisi. Penelitian uji klinis perlu dilakukan untuk memastikan manfaat dari pemberian ghrelin eksogen (Laviano et al., 2010).

Penyebab asupan makanan penderita PGK tidak adekuat dapat berupa: (1) penurunan asupan energi atau protein; (2) penyakit kronis yang terjadi bersamaan, dan penyakit akut dan meningkatkan sitokin inflamasi; (3) stimulus katabolik dari hemodialisis; (4) terbuangnya nutrisi selama proses dialisis dari cairan yang di dialisat, terutama asam amino, peptida, protein (dialisis peritoneal), glukosa (jika hemodialisis dilakukan dengan dialisat bebas glukosa) dan vitamin larut dalam air; dan (5) prosedur diagnostik atau terapi (misalnya, terapi prednison); obat golongan glukokortikoid dapat mengurangi asupan nutrisi atau menyebabkan kerusakan protein netto. (6) perdarahan kronis; (7) gangguan endokrin (terutama resistensi terhadap insulin dan faktor yang berhubungan dengan hormon seperti insulin-I, hyperglucagonemia, hiperparatiroidisme dan defisiensi 1,25 di hidroksi kolekalsiferol atau vitamin D); (8) produk metabolisme terakumulasi dalam gagal ginjal dan dapat menyebabkan katabolisme atau pemecahan, seperti asam organik dan anorganik; (9) turunnya fungsi ginjal dalam hal metabolisme normal; dan (10) akumulasi senyawa toksik dari lingkungan (misalnya, aluminium) (Kopple, 1999). Malnutrisi berdampak buruk terhadap kelangsungan hidup penderita.

Malnutrisi mudah terjadi pada penderita PGK stadium lanjut dan penyakit ginjal stadium akhir apalagi yang rutin menjalani

hemodialisis. Menurut Kopple, penderita PGK stadium lanjut yang belum di dialisis dan penderita PGK stadium akhir yang sudah menjalani hemodialisis atau terapi dialisis peritoneal menunjukkan prevalensi malnutrisi yang tinggi. Penderita dialisis yang mengalami malnutrisi kekurangan energi protein (KEP) ringan hingga sedang sejumlah 33%, dan sejumlah 6-8 % di antaranya mengalami kekurangan gizi yang parah (Kopple, 1999).

3.9.2 Progresivitas dari PGK (Kidney Professional, 2005)

Semua penderita PGK berpotensi menjadi gagal ginjal terminal (ESRD), *chronic glomerulonephritis, diabetic nephropathy*, dan *polycystic kidney disease*. Hal ini disebabkan karena penyakit yang mendasari sering tidak dikelola dengan baik, namun berdasarkan penelitian, progresivitas PGK lebih sering disebabkan faktor sekunder yang tidak berkaitan dengan penyakit yang mendasarinya. Faktor-faktor tersebut meliputi faktor sistemik keseluruhan, hipertensi intraglomerular, hipertrofi glomerular, presipitasi intrarenal dari kalsium fosfat, hiperlipidemia, dan perubahan metabolisme prostanoid.

3.9.3 Hipertensi Intraglomerular dan Hipertrofi Glomerular (Beto, *et al.*, 2014).

Penelitian pada hewan coba menunjukkan respons mekanisme kompensasi terhadap hilangnya nefron atau terhadap vasodilatasi pembuluh darah ginjal (seperti pada diabetes mellitus) menyebabkan peningkatan tekanan intraglomerular dan terjadi pembentukan jaringan parut pada glomerulus secara progresif. Mekanisme terjadinya hipertensi intraglomerular dalam menyebabkan jaringan parut belum dipahami secara jelas; setidaknya terdapat 2 faktor yang terlibat: Faktor yang pertama kerusakan langsung sel endotel. Faktor yang kedua adalah peningkatan tekanan aliran darah menyebabkan perubahan pergerakan makro molekul (seperti Ig M, dan komplemen) melalui celah *fenestrasi* sel endotel

ke dalam ruang sub-endothelial dinding kapiler glomerulus. Akumulasi "*hyaline*" secara progresif dapat menyebabkan deposit *hyaline cast* yang menyebabkan lumen kapiler menyempit, sehingga perfusi dan filtrasi glomerulus menurun. *Hyaline cast* menunjukkan penurunan eGFR, dan berguna untuk penapisan dan deteksi dini PGK yang berisiko tinggi (Adachi, *et al.*, 2013). Pada bab VII dan IX diperlihatkan hasil penelitian efek hidrolisat protein dari kacang polong terhadap histopatologis *hyaline cast* ginjal tikus yang diinduksi cisplatin atau gentamicin.

Faktor non-hemodinamik juga berperan dalam berkembangnya glomerulosklerosis sekunder. Pada hewan coba kehilangan nefron yang berfungsi normal (ablasi nefron) dapat berkembang menjadi proliferasi sel glomerulus**,** influks makrofag dan akumulasi komponen pada matriks ekstra seluler sehingga menyebabkan penyempitan diameter lumen kapiler. Mekanisme yang terjadi sesungguhnya belum sepenuhnya dipahami, tetapi sitokin seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor*-β (TGF-β) dianggap berperan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa TGF-β berkontribusi dalam meningkatkan produksi matriks ekstra seluler dan timbulnya glomerulosklerosis pada PGK. Disimpulkan bahwa glomerulosklerosis terjadi karena hipertensi glomerulus atau karena meningkatnya aliran dan filtrasi pada kapiler glomerulus (Lola, 2006).

Proses lain yang juga berperan adalah penyakit tubulointerstitial. Penyakit ini sering tidak diperhatikan, padahal filtrasi glomerulus dan prognosis jangka panjang lebih berkaitan dengan derajat kerusakan tubulointerstitial daripada kerusakan pada glomerulus (Kidney Professional, 2005).

3.9.4 Penyakit Tubulointerstial

Semua proses yang terjadi pada PGK berkaitan dengan kerusakan tubulointerstial (tubulus dilatasi, fibrosis interstitial), walaupun proses primernya adalah *glomerulopathy* (mekanisme

kerusakan pada glomerulus yang belum dapat dijelaskan secara pasti). Derajat kerusakan tubulointerstitial merupakan prediktor yang baik untuk menentukan LFG dan prognosis PGK (Lola, 2005).

Mekanisme terjadinya penyakit tubulointerstitial masih belum sepenuhnya dipahami. Kemungkinan terjadinya penyakit tubulointerstitial adalah akibat akumulasi kalsium fosfat dan asidosis metabolik disertai akumulasi amonia sekunder; hal ini menunjukkan bahwa proses imunologi juga berperan. Pada beberapa penelitian ditemukan bahwa terapi kortikosteroid dapat mengurangi kerusakan tubulointerstitial, namun terapi tersebut tidak mencegah progresivitas penyakit. Penyembuhan dapat terjadi apabila fibrosis interstitial dapat dicegah, yaitu dengan menurunkan pelepasan sitokin seperti TGF–β (Suzuki, 2007). Salah satu efek yang diharapkan dari hidrolisat protein kacang polong hijau adalah menurunkan kadar TGF–β.

DAFTAR PUSTAKA

Adachi M, Hoshi M, Ushimaru S, Hayashi A, Nakamoto K, Kanbe A, Furuta N, Inagaki I, Ito H, S. M. (2013). Clinical significance of hyaline casts in the new CKD risk classification (KDIGO 2009). *Rinsho Byori. 2013 Feb;61(2):104-11*, *61*(2), 104–111. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672087

Almatsier, S. (2006). *Penuntun Diet Edisi Baru*. (I. P. R. D. C. dan A. D. Indonesia, Ed.). Jakarta, Indonesia: PT Gramedia Pustaka Utama.

Arif, P. (2016). Pengaruh Methylcobalamine Terhadap TGF β1 dan Ketebalan Intima Media Arteri Carotis Pada Pasien Penyakit Ginjal Kronis Stadium V di RSUD DR. Moewardi Surakarta. Retrieved March 26, 2017, from http://abstrak.ta.uns.ac.id/wisuda/upload/S501102007_.pdf.

Attman, P. O., Samuelsson, O., & Alaupovic, P. (2011). The effect of decreasing renal function on lipoprotein profiles. *Nephrology Dialysis Transplantation*. https://doi.org/ 10.1093/ndt/gfq762

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (2013). Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. *Laporan Nasional 2013*, 1–384. https://doi.org/1 Desember 2013

Bandiara, R. (2004). Should we still Prescribe a Reduction in Protein Intake for Chronic Kidney Disease (CKD) patients. In *Annual Meeting Perhimpunan Nefrologi Indonesia*.

Beto, J. A., Ramirez, W. E., & Bansal, V. K. (2014). Medical nutrition therapy in adults with chronic kidney disease: Integrating evidence and consensus into practice for the generalist registered dietitian nutritionist. *Journal of the*

Academy of Nutrition and Dietetics. https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.12.009

Byham-Gray, L. D. (2005). Outcomes research in nutrition and chronic kidney disease: Perspectives, issues in practice, and processes for improvement. *Advances in Chronic Kidney Disease*. https://doi.org/10.1053/j.ackd.2004.10.012

Byham Gray, L. D. (2014). *Nutrition in Kidney Disease*. (G. M. Byham-Gray, Laura D., Burrowes, Jerrilynn D., Chertow, Ed.) (Second edi). Humana Press. Medical Health Series: Bendich A. Retrieved from https://www.springer.com/us/book/9781627036849

Chan, C. M. (2005). Hyperlipidaemia in chronic kidney disease. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*.

Cupisti, A., D'Alessandro, C., Fumagalli, G., Vigo, V., Meola, M., Cianchi, C., & Egidi, M. F. (2014). Nutrition and physical activity in CKD patients. *Kidney and Blood Pressure Research*. https://doi.org/10.1159/000355784

Dharmeizar, Widodo, Arwanto A, Sudhana IW, Azmi S, P. S. (2011). Penyakit ginjal kronik. In *Konsensus nutrisi pada penyakit ginjal kronik*. Jakarta, Indonesia: PERNEFRI Perhimpunan Nefrologi Indonesia.

Giknis MLA, C. C. (2008). *Clinical Laboratory Parameters for Crl: WI (Han)*. Montreal: Charles River Accelerating drug development.

Gunes, E. F. (2013). *Medical Nutrition Therapy for Hemodialysis Patients*. https://doi.org/10.5772/53473

Heaf, J. (2014). Metformin in chronic kidney disease: time for a rethink. *Peritoneal Dialysis International : Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. https://doi.org/10.3747/pdi.2013.00344

Hidayat, M., Darsono, L., & Chandra, S. (2016). *Nutrisi Penderita Penyakit Ginjal* (1st ed.). Talenta Indonesia Mandiri.Jogjakarta.

Lola,K. (2005). *Nutrisi pada Chronic Renal Failure Tanpa Dialisa*. Bandung.

Kasper, Braunwald, Fauci, H., & Longo, J. (2010). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (16th ed.). USA: McGraw-Hill Companies.

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. *Mc GrawHill*. https://doi.org/0.1036/007149619X

KDIGO. (2012). Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements*, *2*(1), 138. Retrieved from http://www.kdigo.org

RISKESDAS. (2013). Prevalensi Nasional Penderita Gagal Ginjal Kronis. *Pusat Data Dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia*. Retrieved from www.depkes.go.id/download.php?file=download/

Kerstenbaum, B, Sampson, JN, Rudser, K. (2005). Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *Kidney International*, *95*, S21-27.

Khatri M, Moon YP, Scarmeas N, Gu Y, Gardener H, C. K. (2014). Association between a Mediterranean-Style Diet and Kidney Function in the Northern Manhattan Study Cohort. *Clinical Journal of American Sociiety of Nephrology*, *9*(11), 1868–1875. https://doi.org/10.2215/CJN.01080114

Khosla UM, Zharikov S, F. J. (2005). Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney International.67:*, *67*(5), 1739–1742. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840020

Kidney Professional. (2005). Retrieved from http//www.kidney/professional.com

Kopple, J. D. (1999a). Pathophysiology of protein-energy wasting in chronic renal failure. *The Journal of Nutrition*. https://doi.org/10.1093/jn/129.1.247S

Kopple, J. D. (1999b). Pathophysiology of protein-energy wasting in chronic renal failure. *The Journal of Nutrition*, *129*(1S Suppl), 247S–251S. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915908

Kopple, J. D. (2001). Modern Nutrition in Health and disease. In *Modern Nutrition in Health and disease* (p. 1475). Manhattan USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Kopple, J. D. (2001). National kidney foundation K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*. https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.20748

Kopple, J. D. (2001). Nutrition, Diet and The Kidney. In *Modern Nutrition in Health and Disease* (Tenth, p. 1475). Lippincot William & Wilkins. Philadelphia.

Koulouridis, E., & Koulouridis, I. (2011). Is the dietary protein restriction achievable in chronic kidney disease? The impact upon quality of life and the dialysis delay. *Hippokratia*.

Kresnawan T, M. H. (n.d.). No Title. In A. G. RSCM (Ed.), *Diet Rendah Protein dan Penggunaan Protein Nabati pada Penyakit Ginjal Kronik*. Jakarta: Instalasi Gizi Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo.

Laboratories, M. M. (2017a). Blood urea nitrogen (BUN), serum. Retrieved May 19, 2017, from http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/blood-urea-nitrogen/home/ovc-20211239

Laboratories, M. M. (2017b). Creatinine test. Retrieved May 19, 2017, from http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/blood-urea-nitrogen/home/ovc-20211239

Laviano, A., Krznaric, Z., Sanchez-Lara, K., Preziosa, I., Cascino, A., & Rossi Fanelli, F. (2010). Chronic renal failure, cachexia, and ghrelin. *International Journal of Peptides*. https://doi.org/10.1155/2010/648045

Life Teachnologies. (2013). Protein Handbook. *Life Technologies*.

Lola, K. (2006). *Nutrisi pada Chronic Renal Failure Tanpa Dialisa*. Bandung, Indonesia.

Loo, M, Felsen, D, W. S. (1988). Pathophysiology of obstructive nephropathy. *World Journal of Urology*, *6*, 53–60.

Mandayam S, M. W. (2005). Requirements for Protein, Calories and Fat in the Predialysis patients. In S. Mitch, WE, Klahr (Ed.), *Handbook of Nutrition and Kidney* (5th ed., pp. 115–137). Philadelphia: Lippincot William & Wilkins.

Maurice ES, Moshe S, Catharine R, Benyamin C, R. J. (2005). Nutrition Diet and TheKidney. In M. ES (Ed.), *Modern Nutrition in Health and Disease 2* (2nd ed., p. 1475–87,1499–51.). Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins.

Nura, M., Sufiati, B., Erma, H. (2012). Hubungan Asupan Protein dengan Kadar Ureum, Kreatinin dan Kadar Hemoglobin Darah pada Penderita Gagal Ginjal Kronik Hemodialisa Rawat jalan di RS Tugurejo Semarang. *Jurnal Gizi Universitas Muhammadiyah Semarang*, *3*(1), 22–32.

Pradipta, E.A., Tanto, C., Liwang, F., Hanifati, S. (2014). Penyakit Ginjal Kronis. In *Kapita Selekta Kedokteran* (pp. 644–651). Jakarta, Indonesia: Jakarta: Media Aesculapius. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. (2017). Situasi Penyakit Ginjal Kronis. *InfoDATIN*, 10–11. https://doi.org/2442-7659

Suzuki, H., Kimmel, P.. (2007). Nutrition and Kidney Disease: A New Era. In C. Ronco (Ed.), *Contributions to Nephrology. Vol 155*. Switzerland: Karger. Basel.

System, U. S. R. D. (2013). Morbidity and mortality in patients with CKD. In *USRDS 2013 Annual Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States* (pp. 63–72).

Thomas LK and Otherson JB. (2012). *Nutrition Therapy for Chronic Kidney Disease*. London New York: CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton. Retrieved from https://www.crcpress.com/Nutrition-Therapy-for-Chronic-Kidney-Disease/

BAB IV
PENELITIAN ILMUWAN TENTANG HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG UNTUK PENYAKIT GINJAL

Penyakit tekanan darah tinggi merupakan masalah kesehatan yang sulit diatasi di seluruh negara berbagai belahan dunia. Menurut Riskesdas 2013, terjadi peningkatan prevalensi hipertensi berdasarkan wawancara subjek penelitian (pernah didiagnosis hipertensi oleh tenaga kesehatan dan riwayat minum obat hipertensi) dari 7,6% tahun 2007 menjadi 9,5% tahun 2013 (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013). Penyakit ini apabila tidak dikelola dengan baik, dapat berefek buruk terhadap berbagai organ penting, salah satunya terhadap ginjal, yang pada akhirnya dapat menyebabkan PGK. Penyakit ginjal merupakan masalah kesehatan dengan beban biaya kesehatan yang tinggi. Prevalensi PGK di Indonesia berdasarkan wawancara subjek pernah didiagnosis dokter sebesar 0,2% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013). Berbagai obat untuk pencegahan dan pengobatan penyakit ginjal telah diupayakan, dan banyak dicapai kemajuan penting dalam

identifikasi senyawa protein yang dapat berkontribusi terhadap kesehatan jantung dan pembuluh darah.

Pembaca akan lebih mudah memahami penelitian yang dilakukan ini apabila mengetahui penelitian para ilmuwan tentang hidrolisat protein kacang polong sebelumnya. Berikut akan disampaikan hasil-hasil penelitian ilmuwan tentang hidrolisat protein kacang polong untuk penyakit ginjal.

4.1. Penelitian Tentang Hidrolisat Protein Kacang Polong

Dalam 15 tahun terakhir senyawa-senyawa peptida dengan sifat anti hipertensi diteliti dan diperhatikan secara khusus oleh para ilmuwan dan peneliti. Sumber utama peptida anti hipertensi diketahui berasal dari sumber susu, namun telah didapat penemuan luar biasa, peptida anti hipertensi yang berasal dari sumber makanan lain, yaitu kacang polong. Sebagian besar peptida kacang polong telah terbukti memiliki efektivitas secara *in vitro*, namun bukti efek anti hipertensi yang lebih meyakinkan harus berdasarkan percobaan pada hewan dan uji klinis (Aluko, *et al*., 2015).

Sebuah penelitian di Kanada menemukan bahwa protein dalam kacang polong kuning dapat menjadi obat alami terhadap tekanan darah tinggi dan PGK. Protein dalam kacang polong digunakan sebagai suplemen makanan untuk membantu pengobatan jutaan penderita penyakit ginjal di seluruh dunia. Kacang polong saat ini menjadi populer karena mengandung protein dalam jumlah cukup banyak, serat, vitamin, rendah lemak, dan bebas kolesterol. Pada penderita dengan tekanan darah tinggi, protein polong berpotensi mencegah timbulnya kerusakan ginjal, sehingga membantu penderita hidup lebih lama dengan tekanan darah terkontrol (Hoskins, 2017; Li and Aluko, 2010)

Prosedur dalam penelitian tersebut adalah sebagai berikut: ekstrak hidrolisat protein dari kacang polong kuning diberikan dalam dosis kecil setiap hari pada tikus laboratorium yang dibuat menjadi

sakit ginjal polikistik. Setelah 8 minggu hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberi protein kacang polong mengalami penurunan tekanan darah 20% lebih besar dibandingkan dengan tikus yang hanya diberi diet normal. Kebanyakan penderita PGK meninggal akibat komplikasi kardiovaskular yang timbul dari tekanan darah tinggi yang terkait dengan kerusakan ginjal. Pada tikus dan manusia penderita penyakit ginjal polikistik pengeluaran urine sangat berkurang, karena ginjal tidak mampu melakukan fungsinya sebagai penyaring darah dan cairan. Dalam penelitian tersebut tikus yang diberi hidrolisat protein kacang polong kuning menunjukkan peningkatan produksi air seni sebesar 30%, tekanan darah kembali ke tingkat normal selain itu tidak menunjukkan efek samping dari pemberian protein kacang polong pada tikus (Hoskins, 2017) (Hoskins, 2009; Aluko, 2015b).

4.2. Efek Hidrolisat Protein Kacang Polong Terhadap *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE), Renin dan *Calmodulin Phosphodiesterase 1* (CaMPDE)

Li dan kawan-kawan tahun 2010 melaporkan hasil penelitiannya tentang hidrolisat dari isolat protein kacang polong (PPI) yang di hidrolisis menggunakan enzim alcalase, disaring melalui membran ultra filtrasi dengan *cut off* (ambang) 1 kDa. Bentuk beku kering dari hidrolisat protein ini kemudian di fraksinasi pada kolom kationik ekstraksi fase padat = *Solid Phase Extraction* (SPE). Semua hasil fraksinasi diuji aktivitas penghambatannya terhadap ACE, renin, dan phosphodiesterase 1 yang bergantung pada calmodulin (CaMPDE). Fraksi yang dielusi menggunakan ammonium hidroksida (1%) memiliki kandungan peptida tertinggi selanjutnya diperiksa menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase-terbalik atau *ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS). Tiga di peptida menunjukkan sifat penghambatan yang lemah terhadap CaMPDE tetapi menunjukkan

inhibisi kuat terhadap ACE dan renin. Secara umum, peptida hidrolisat kacang polong memiliki efek inhibisi yang lebih kuat terhadap ACE daripada terhadap renin. Dari hasil penelitian ini diharapkan peptida hidrolisat kacang polong dapat menjadi produk makanan yang bermanfaat untuk penderita PGK (Huan Li and Aluko, 2010).

Bentuk alami dari kacang polong tidak berefek sebaik hidrolisat protein, karena yang mempunyai efek pengobatan adalah bentuk bioaktif peptidanya dan peptida yang terikat dalam protein ini perlu dilepaskan dari protein utama melalui proses pemecahan ikatan peptida atau hidrolisis oleh protease sehingga peptida bebas menjadi bentuk aktif. Fokus penelitian selanjutnya adalah mencari peptida dalam hidrolisat protein kacang polong dan kacang lain yang berpotensi untuk digunakan sebagai pengobatan dan pencegahan berbagai penyakit (Li & Aluko, 2010)

Pada proses pemecahan protein secara enzimatik dihasilkan peptida yang lebih efisien tanpa pembentukan produk samping beracun atau penghancuran asam amino, seperti yang terjadi pada pemecahan protein secara kimiawi; sehingga metode yang saat ini banyak digunakan untuk memproduksi hidrolisat protein kacang polong adalah hidrolisis secara enzimatik. Tujuan pembuatan peptida ini untuk mencapai 3 sifat bioaktif utama, yaitu (1) penghambatan aktivitas *angiotensin converting enzyme* (ACE); (2) penghambatan enzim-enzim dependen calmodulin (CaM); dan (3) aktivitas pemerangkapan tembaga (*Copper-chelating*). ACE merupakan penanda utama untuk hipertensi; sedangkan CaM merupakan faktor risiko untuk berbagai penyakit termasuk kanker dan penyakit Alzheimer. Konsentrasi tembaga yang tinggi pada pembuluh darah dapat memicu terjadinya aterosklerosis. Ketiga hal ini sangat penting untuk dihambat dalam upaya mencegah terjadinya PGK (Aluko, 2015b).

Hipotesis mekanisme protein kacang polong menurunkan tekanan darah adalah dengan cara merangsang produksi cyclooxygenase-1 (COX-1), protein yang dapat meningkatkan fungsi ginjal, bekerja serupa dengan obat anti hipertensi ACE inhibitor (Li, *et al*., 2011) (Aluko, 2015b). Mekanisme kerja dari peptida aktif dalam kacang polong masih perlu diteliti.

Penghambat renin dan ACE berbasis protein yang pertama kali diproduksi sebagai hidrolisat protein enzimatis, mengandung peptida berbagai ukuran berat molekul dan efektivitas. Fraksi hidrolisat protein yang terdiri dari peptida dengan berat molekul rendah (terutama yang berukuran lebih kecil dari 3 kDa) merupakan penghambat renin dan ACE yang lebih efektif daripada peptida dengan berat molekul yang lebih besar. Pemurnian hidrolisat protein telah berhasil menghasilkan beberapa peptida yang mampu menghambat aktivitas renin dan ACE secara *in vitro* selain berpotensi menurunkan tekanan darah dalam percobaan *in vivo*. Terdapat beberapa hipotesis teori untuk meningkatkan aktivitas peptida tetapi umumnya peptida yang mengandung proline, asam amino rantai cabang dan asam amino aromatik memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap renin dan ACE (Aluko et al., 2015).

Penelitian Pownall melaporkan prosedur pembuatan peptida dari biji kacang polong kuning atau *Pea Protein Isolate* (PPI), yang dihasilkan melalui proses hidrolisis enzimatik dan dilanjutkan dengan proses ultra filtrasi untuk mengisolasi peptida ukuran <3kDa sehingga didapat hidrolisat protein kacang polong (PHKP). PHKP dipisahkan berdasarkan pertukaran kation menggunakan kromatografi menjadi lima fraksi peptida (F1-F5). F1 mengandung peptida dengan jumlah asam amino kationik paling sedikit (7,5%) sementara F5 mengandung peptida dengan kandungan asam amino kationik paling banyak, yaitu lebih dari 50%. Selanjutnya aktivitas anti oksidan fraksi peptida F1-F5 diuji secara *in vitro* dan dibandingkan dengan kontrol pembanding glutathione (GSH), suatu

antioksidan peptida endogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi peptida dengan kandungan kationik paling sedikit (F1) memiliki aktivitas pemerangkapan terhadap radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang paling kuat ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang lain (F2-F5). Pemerangkapan radikal bebas O2-dan H_2O_2 berbanding terbalik dengan kandungan asam amino kationik dalam fraksi peptida. Proses fraksinasi terbukti mampu meningkatkan efek anti oksidan. Berdasarkan kandungan asam amino kationik, fraksi peptida (F1-F5) berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan PHKP yang tidak terfraksinasi. Disimpulkan bahwa PHKP dan fraksi-fraksinya memiliki potensi terapi untuk penyakit kronis yang diawali oleh kerusakan oksidatif, dan jumlah kandungan asam amino kationik dari fraksi peptida berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan (Pownall, *et al.*, 2011).

4.3. Beberapa Prosedur Hidrolisis Protein Kacang Polong Terhadap Tekanan Darah

Penelitian Li melaporkan, hidrolisat protein kacang polong (HPKP= *Pea Protein Hydrolysate* = PPH) yang mengandung peptida dengan berat molekul <3 kDa mempunyai efek menurunkan tekanan darah. Peptida ini didapat dari hasil hidrolisis *pea protein isolate* (PPI), menggunakan thermolysin dan melalui membran ultra filtrasi selanjutnya diujikan pada hewan coba model tikus hipertensi serta subjek manusia hipertensi. HPKP menunjukkan aktivitas *in vitro* yang lemah terhadap renin dan *angiotensin converting enzyme* (ACE) dengan aktivitas penghambatan masing-masing, 17 dan 19%, pada konsentrasi bahan uji 1 mg/mL. Pemberian HPKP secara oral untuk tikus hipertensi spontan (THS) pada dosis 100 dan 200 mg/kgBB menyebabkan penurunan tekanan darah sistolik dengan penurunan maksimum 19 mmHg setelah 4 jam pemberian. Sedangkan PPI yang tidak di hidrolisis yang diberikan secara oral tidak memiliki

efek penurunan tekanan darah pada hewan coba. Hal ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis thermolysin mungkin menyebabkan lepasnya peptida bioaktif dari protein utama. Pemberian HPKP secara oral ke tikus SPRD-cy (tikus model PGK) selama periode waktu 8 minggu menyebabkan penurunan tekanan darah sistolik sebesar 29 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 25 mmHg. Tikus yang diberi HPKP menunjukkan kadar plasma angiotensin II (vasopresor utama yang terlibat dalam hipertensi) yang lebih rendah, namun tidak menunjukkan efek pada aktivitas plasma atau kadar mRNA ACE ginjal. Ekspresi renin tahap mRNA berkurang sekitar 50% pada tikus yang diberi HPKP, menunjukkan bahwa penurunan renin berpengaruh terhadap penurunan kadar angiotensin II. Dalam perlakuan uji acak terkontrol plasebo ganda (*randomized double blind placebo-controlled crossover*) pada 7 relawan (manusia) pemberian PHKP selama 3 minggu, menyebabkan terjadi penurunan kadar angiotensin II yang signifikan ($p < 0,05$). Penurunan tekanan darah sistolik sebesar 5 dan 6 mmHg terjadi pada minggu kedua dan ketiga, masing-masing, untuk kelompok PHKP; dan hasilnya berbeda signifikan serta jauh lebih baik dibandingkan plasebo. Hipotesis saat ini, mekanisme kerja peptida bioaktif yang berasal dari thermolysin HPKP menurunkan tekanan darah pada tikus hipertensi dan subyek manusia, melalui mekanisme sistem angiotensin di ginjal (Li, *et al.*, 2011)

Girgih dan timnya melakukan penelitian pada tikus hipertensi spontan (*Spontan Hypertension Rats* =SHR) yang diberi hidrolisat protein permeate 5 kDa (PPH-5); PPH-5 didapat dari isolat protein kacang polong (*Pea Protein Isolate* = PPI) melalui proses hidrolisis termoase. Proses hidrolisis termoase merupakan proses hidrolisis menggunakan enzim yang dipanaskan. Girgih meneliti efek PPH-5 terhadap tekanan darah sistolik tikus jangka pendek (24 jam) dan jangka panjang (5 minggu). Setelah pemberian oral tunggal (100 mg/kg berat badan), tikus yang diberi PPI yang tidak dipanaskan menunjukkan efek penurunan tekanan darah sistolik yang paling

lemah (p <0,05) (penurunan maksimum 4 mmHg) bila dibandingkan dengan PPI yang dipanaskan (penurunan 25 mmHg) dan PPH-5 (penurunan 36 mm Hg). Pemberian kombinasi PPH-5 0,5% dengan kasein 1% (w/w) dalam diet tikus selama 3 minggu menghasilkan penurunan tekanan darah sitolik 22-26 mm Hg (p <0,05). Sebagai perbandingan, PPI yang tidak di hidrolisis hanya menurunkan tekanan darah sitolik 17 mm Hg setelah 3 minggu. Potensi hidrolisat kacang menurun pada minggu ke-4 dan ke-5, meskipun nilai tekanan darah sistolik tikus yang diberi perlakuan masih lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diobati. Potensi anti hipertensi PPH-5 mungkin disebabkan oleh adanya peptida hidrofilik yang mudah diserap (Girgih, *et al.*, 2016).

Hasil analisis asam amino menunjukkan bahwa PPH-5 memiliki kandungan sulfur yang lebih rendah daripada PPI. Hasil pemeriksaan kromatografi eksklusi menunjukkan bahwa PPH-5 terutama mengandung peptida dengan berat molekul rendah (<10 kDa) berbeda dengan PPI. PPH-5 memiliki efek inhibisi terhadap renin dan ACE dengan nilai IC 50 masing-masing sebesar 0,57 dan 0,10 mg/mL (p <0,05). Analisis spektrofotometri massa PPH-5 menunjukkan sekuens tetrapeptida hidrofilik (Girgih et al., 2016).

Peneliti belum mempromosikan pemanfaatan kacang polong kuning ini kepada masyarakat walaupun hasil penelitian telah menunjukkan manfaat positif. Kacang polong kuning dalam keadaan alami tidak memberi manfaat kesehatan sebaik hidrolisat protein yang dibuat di laboratorium, karena protein peptida dibuat menjadi bioaktif menggunakan enzim khusus melalui proses yang cukup rumit dan kompleks (Aluko, 2015a; Aluko, 2015b).

4.4. Penelitian Beberapa Target Terapi Baru PGK

Penelitian de Chatel dkk melaporkan tentang *Anti Natriuretic Peptide* (ANP), suatu peptida hormon jantung yang dapat bertindak sebagai pengatur homeostasis cairan tubuh yang penting. Dua puluh penderita dan hemodialisis diperiksa profil ANP sebelum

dan sesudah prosedur dialisis menggunakan dialisis kapiler. Kadar ANP ditentukan menggunakan alat *Radio Immuno Assay* (RIA). Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi rerata ANP adalah 146 ± 51 pg/ml dan terjadi penurunan yang signifikan selama prosedur dialisis, sehingga kadar ANP turun menjadi 68 ± 38 pg/ml ($p < 0,001$). Kadar ANP plasma berbanding lurus dengan perubahan berat badan ($r^2 = 0,764$; $p < 0,001$ dan $r = 0,558$; $p < 0,01$.). Kadar serum kreatinin, tekanan darah atau serum elektrolit tidak menunjukkan perubahan. Simpulan dari penelitian tersebut adalah kadar ANP meningkat pada penderita PGK disebabkan karena kelebihan cairan, sedangkan penurunan kadar ANP selama hemodialisis disebabkan karena telah terjadi homeostasis berupa pengeluaran kelebihan cairan (de Chatel, *et.al.*, 1991).

Menurut tulisan Santos Araujo dkk, peptida natriuretic (NP) adalah komponen utama dalam aksis jantung-ginjal yang berperan dalam kondisi penurunan hemodinamik jantung, mengatur homeostasis Natrium, tekanan darah dan fungsi vaskular. NP adalah suatu peptida yang memiliki struktur kimia, fungsi biologis, fisiologis dan patologis serupa hormon terhadap sistem kardiovaskular (KV). Peran fisiologis dari NP antara lain meningkatkan ekskresi Natrium dan air pada ginjal, regulasi tekanan darah, autokrin dan parakrin dalam sirkulasi, yaitu efek vasodilatasi melalui relaksasi sel-sel otot vaskular, efek anti-fibrotik, anti-proliferasi, regulasi renin, progesteron, endotelin dan sekresi vasopressin (Santos-Araújo, *et al.*, 2015). NP terbukti berperan dalam perbaikan kerusakan massa ginjal, namun dipengaruhi banyak faktor serta bergantung dari jenis dan tingkat kehilangan massa fungsional ginjal. Dalam beberapa tahun terakhir, NP sering digunakan sebagai alat diagnosis, pemantau pengobatan, dan penentu prognosis dari beberapa penyakit kardiovaskular (KV). Nilai prediktif NP sebagai penanda PGK dalam kasus penyakit jantung dan pembuluh darah, masih kontroversial (de Chatel et al., 1991).

Saat ini diketahui bahwa fungsi ginjal dipengaruhi oleh kadar NP plasma secara signifikan dan pada kondisi gagal ginjal didapat kadar NP plasma yang sangat tinggi. Dalam mengelola penderita PGK dengan komplikasi kardiovaskular penting diperhatikan hubungan antara kadar NP plasma, jantung & pembuluh darah dengan fungsi ginjal. Dalam kondisi volume cairan tubuh berlebihan baik yang terjadi secara akut maupun kronis, NP berperan penting sebagai hormon pengatur keseimbangan cairan dengan cara mengkompensasi efek vasokonstriktor-mitogenik-natrium, mempertahankan hormon yang dilepaskan oleh sistem saraf simpatik dan sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAA), menjaga homeostasis peredaran darah. Selain itu, NP berperan sebagai mediator dari respon ginjal yang fungsinya terganggu akibat kehilangan massa fungsional nefron. Beratnya PGK berhubungan dengan kadar NP plasma yang tinggi dalam sirkulasi darah. Kadar NP yang tinggi pada penderita PGK menggambarkan tingkat keparahan disfungsi ginjal dan penurunan kadar NP menunjukkan perbaikan penyakit ginjal kronis (PGK) (Santos-Araújo, *et al.* 2015; Santos, Krieger, & Pereira, 2012).

4.5. Penelitian Hidrolisat Sumber Protein Lain Terhadap ACE Inhibitor

Penelitian yang dilakukan oleh Jamhari dan kawan-kawan bertujuan untuk mengidentifikasi peptida dari hidrolisat protein daging kambing kacang *(Capra aegagrus hircus)* yang memiliki efek penghambatan terhadap *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Daging kambing kacang di hidrolisis menggunakan enzim pepsin, trypsin dan chymotrypsin. Selanjutnya dilakukan uji konsentrasi protein dan aktivitas penghambat ACE dari hidrolisat protein daging kambing dan hasilnya hidrolisat daging kambing kacang terbukti menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap ACE (IC 50) sebesar 190 mg/mL atau 120 mM. Peptida ACE inhibitor dari daging

kambing kacang ini dimurnikan melalui serangkaian purifikasi, selanjutnya sekuen atau urutan asam aminonya diidentifikasi menggunakan asam amino *sequencer*. Hasil purifikasi menunjukkan bahwa urutan asam amino peptida ACE inhibitor dari hidrolisat protein daging kambing kacang adalah **leu-thr-glu-ala-pro-leu-asn-pro-lys-ala-asn-arg-glu-lys.** Peptida tersebut mempunyai berat molekul (BM) sebesar 1581 dan berada pada posisi residu ke-20 sampai ke-33 dari protein b-actin daging kambing (*Capra hircus*) (Jamhari et al., 2013).

4.6. Penelitian Kacang Polong di Indonesia

Di Indonesia, kacang polong jenis kuning (*Pisum sativum* L) jarang didapat, bahkan jenis kacang polong hijau belum umum dikonsumsi rakyat dan masyarakat pun terbatas memanfaatkannya. Di kota besar kacang polong hijau dapat diperoleh di toko/ supermarket dalam bentuk beku atau dalam kaleng, yang kebanyakan merupakan produk impor; sedangkan di pasar tradisional jarang sekali dijumpai. Berdasarkan pemikiran tersebut, peneliti mencoba membandingkan kacang polong kuning dari Kanada dengan kacang polong yang ada di Indonesia serta mencari kemungkinan jenis kacang lain yang umum, mudah didapat dan khas Indonesia; akan tetapi memiliki efek yang serupa dengan kacang jenis polong kuning seperti hasil penelitian di Kanada, untuk kemudian di hidrolisis menjadi bentuk hidrolisat protein.

Terdapat beberapa jenis kacang Indonesia yang diperkirakan memiliki efek yang baik terhadap fungsi ginjal, antara lain kacang hiris atau kacang gude (*Cajanus cajan*), dan kacang polong hijau (*Pisum sativum*).

4.7. Tantangan Penelitian Hidrolisat Protein Kacang Polong di Masa Mendatang

Hingga saat ini, fakta yang telah diketahui adalah hidrolisat protein kacang polong dengan berat molekul kecil memiliki efek yang baik dan menjanjikan sebagai terapi PGK. Dari hasil-hasil penelitian yang sudah ada mekanisme hidrolisat protein kacang polong dalam menurunkan tekanan darah melalui sistem pengaturan COX-1, mempunyai efek pemerangkapan terhadap radikal bebas serta berefek baik terhadap fungsi ginjal melalui beberapa gen atau enzim terkait seperti ACE, renin, *Calmodulin Phosphodiesterase* (CamPDE), *Anti Natriuretic Peptide* (ANP).

Pertanyaan mendasar tentang bagaimana mekanisme yang jelas dari hidrolisat protein kacang polong dalam mempengaruhi sistem pengaturan tekanan darah serta peptida aktif yang mana dalam hidrolisat protein kacang polong yang paling berperan, masih perlu diteliti. Penelitian hidrolisat protein kacang polong asal Indonesia perlu dilakukan untuk mendapatkan terapi bagi penderita PGK.

DAFTAR PUSTAKA

Aluko, R. E. (2015a). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*(1), 235–262. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520

Aluko, R. E. (2015b). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.002

Aluko, R. E., Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Li, H., Offengenden, M., & Wu, J. (2015). Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. *Food Research International*, *77*, 10–16. https://doi.org/ 10.1016/j.foodres.2015.03.029

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (2013). Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. *Laporan Nasional 2013*, 1–384. https://doi.org/1 Desember 2013

de Chatel, R., Mako, J., Toth, M., Barna, I., & Lang, R. E. (1991). Atrial natriuretic peptide (ANP) in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Int Urol Nephrol*, *23*(2), 177–183. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1830872

Hoskins, I. (2017). Pea protein may prevent kidney disease. Retrieved from http://www.cabi.org/nutrition/news/19303

Jamhari, Yusiati, L. M., Suryanto, E., Cahyanto, M. N., Erwanto, Y., & Muguruma, M. (2013). Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Kacang Goat Meat Protein Hydrolysate. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, *38*(4), 239–246.

Li, H., & Aluko, R. E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(21), 11471–11476. https://doi.org/10.1021/jf102538g

Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebiyi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., … Aluko, R. E. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1038/13423

Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Research International*, *44*(4), 1069–1074. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.017

Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab,A., Pestana, M. (2015). Clinical value of natriuretic peptides in chronic kidney disease. *Nefrologia*, *35*(3), 227–233. Retrieved from w w w.revistanefrologia.com

Santos, P. C. J. L., Krieger, J. E., & Pereira, A. C. (2012). Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *Journal of Pharmacological Sciences*. https://doi.org/10.1254/jphs.12R03CR

BAB V
KARAKTERISTIK BAHAN PENELITIAN

Penelitian Potensi Hidrolisat Kacang polong hijau menggunakan bromelain ini bertujuan untuk mendapatkan suatu bahan makanan yang dapat berfungsi sebagai terapi bagi penderita Penyakit Ginjal Kronik (PGK). Dalam penelitian tahun pertama untuk mendapatkan jenis hidrolisat protein yang paling berpotensi sebagai terapi PGK dilakukan penelitian uji beberapa jenis sampel kacang yang bersumber dari 2 jenis kacang, yaitu Kacang Polong (*Pisum sativum*) dan Kacang Pembanding (*Cajanus cajan* = Gude).

5.1. Karakteristik Bahan Penelitian

5.1.1. Kacang Polong atau Kacang Ercis (*Pisum Sativum. L*)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida (*Dicots*)
Anak Kelas	: Rosidae
Bangsa /Ordo	: Fabales
Upafamili	: Fabiodeae
Nama suku/familia	: Papilionaceae/Fabaceae
Bangsa	: Vicieae

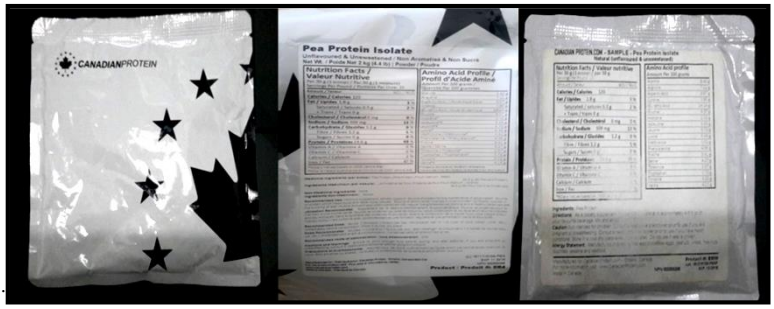
Genus : Pisum
Nama jenis/spesies : *Pisum Sativum* L.
Sinonim : -
Nama umum : *pea* (Inggris), kacang polong, kacang kapri (Indonesia) (Ogata, 1989; Davies, 1989; Cronquist, 1955).

Biji kacang polong kaya karbohidrat serta protein dan cepat menimbulkan rasa kenyang saat dikonsumsi. Tumbuhan ini berasal dari Asia Kecil dan masih sejenis dengan kapri (sehingga penamaannya sering dicampur-adukkan). Berbeda dengan kapri, ercis hanya dimakan bijinya dan hampir tidak pernah dimakan dengan polong (kulit) nya seperti kapri. Sejak ribuan tahun lalu kacang polong telah dimanfaatkan sebagai bahan pangan.

Kacang polong belum banyak dijual dalam bentuk segar di pasar tradisional, namun sekarang banyak dijual dalam kemasan di pasar swalayan, baik dalam kaleng, dikeringkan, maupun dibekukan. Pembekuan dianggap proses pengawetan yang paling baik karena dapat mempertahankan kandungan gizi di dalam biji ercis. Biji yang dikeringkan sering dijadikan camilan atau makanan kecil. Kacang polong banyak ditanam dan tumbuh subur di negara Kanada (AAFC, 2011).

Gambar 5.1.
Kacang Polong Hijau (*Pisum sativum*) Kacang Polong Hijau Kering

Gambar 5.2.
Kacang Polong Kuning (*Pisum sativum*. L) Impor dari Kanada



Gambar 5.3.
***Pea Protein Isolate* (*Pisum sativum*) dari *Canadian Protein* dan Kandungan Nutrisinya**

5.1.2. Kacang Gude (*Cajanus Cajan)*

Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida (Dicots)
Anak Kelas	: Rosidae
Bangsa	: Fabales
Nama suku/familia	: Papilionaceae/Fabaceae
Nama jenis/spesies	: *Cajanus cajan* (L.) Millsp
Sinonim	: *Cytisus cajan* L.
	Cayanus indicus Spreng

Nama umum : *Pigeon pea* (Inggris), kacang bali, kacang gude, kacang kayu, kacang hiris (Sunda) (Baker & Bakhuizen, 1963).

Gambar 5.4.
Kacang Gude (*Cajanus Cajan*) dari Cijengkol, Bandung Utara

5.2. Pemeriksaan Karakteristik Bahan Penelitian

5.2.1. Analisis Proksimat Bahan Penelitian

Salah satu cara untuk menentukan kandungan gizi suatu bahan makanan yaitu menggunakan analisis proksimat yang meliputi penentuan kadar air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat.

a. Penentuan Kadar Air (AOAC 1995)

   Prinsip penentuan kadar air yaitu berdasarkan proses penguapan air dari suatu bahan dengan cara pemanasan. Prosedurnya adalah: Pertama cawan kosong dikeringkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 105˚C, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Sebanyak 5 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100-102˚C selama 6 jam. Cawan didinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian ditimbang kembali.

b. Kadar Abu (AOAC 1995)

   Prinsip penentuan kadar abu yaitu berdasarkan proses pembakaran senyawa organik sehingga didapat residu anorganik yang disebut abu. Pengukuran kadar abu ditentukan dengan gravimetri. Cawan porselin dipanaskan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 105 ˚C, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sebanyak 3-5 g sampel dimasukkan dalam cawan porselin lalu dibakar sampai tidak berasap lagi selanjutnya diabukan pada suhu 600ºC sampai berwarna putih (semua sampel berubah menjadi abu) dan berat konstan. Setelah itu abu didinginkan dalam desikator dan ditimbang.

c. Kadar Protein (AOAC 1995)

   Prinsip analisis kadar protein yaitu berdasarkan proses pembebasan nitrogen dari protein dalam bahan menggunakan asam sulfat dengan pemanasan. Penentuan total kadar protein menggunakan metode mikro Kjeldahl. Prosedur analisis kadar protein adalah sebagai berikut: sebanyak 0,2 g sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan 1,9 gram K_2SO_4, 40 mg HgO dan 2,5 ml H2SO4. Selanjutnya sampel dididihkan sampai cairan jernih. Larutan jernih ini lalu dipindahkan ke dalam alat destilasi. Labu Kjeldahl dicuci dengan air (1-2) ml kemudian air cucian dimasukkan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan 8-10 ml larutan NaOH 40 %. Di bawah kondensor diletakkan Erlenmeyer yang berisi 5 ml larutan H_3BO_3

dan 2-4 tetes indikator. Ujung tabung kondensor harus terendam dalam larutan H_3BO_3. Setelah itu isi Erlenmeyer diencerkan sampai 50 ml dan dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Proses yang sama dilakukan terhadap blanko.

d. Kadar Lemak (AOAC 1995)

   Prinsip analisis kadar lemak adalah ekstraksi, yaitu pemisahan lemak dari sampel dengan cara mensirkulasikan pelarut lemak ke dalam sampel, sehingga senyawa-senyawa lain tidak dapat larut dalam pelarut tersebut. Metode yang digunakan dalam analisis lemak adalah metode ekstraksi soxhlet. Pertama kali labu lemak yang akan digunakan dikeringkan di dalam oven, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang beratnya. Sampel sebanyak 5 g dibungkus dengan kertas saring, setelah itu kertas saring yang berisi sampel tersebut dimasukkan dalam alat ekstraksi soxhlet. Alat kondensor diletakkan di atasnya dan labu lemak diletakkan di bawahnya. Pelarut heksana dimasukkan ke dalam labu lemak secukupnya. Selanjutnya dilakukan refluks selama minimal 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke dalam labu lemak berwarna jernih. Pelarut yang ada dalam labu lemak didestilasi, sedangkan pelarut ditampung kembali. Labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi kemudian dipanaskan di dalam oven pada suhu 105^{o}C hingga mencapai berat tetap dan setelah itu didinginkan dalam desikator. Selanjutnya labu beserta lemak di dalamnya ditimbang dan berat lemak dapat diketahui

e. Kadar karbohidrat (AOAC 1995)

   Perhitungan kadar karbohidrat dilakukan menggunakan metode *by difference*, yaitu pengurangan 100 % dengan jumlah dari hasil analisis kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak.

5.2.2. Metabolit Sekunder Total Fenol dan Tanin

Analisis metabolit sekunder menggunakan metode Folin Ciocalteu yang dijelaskan dalam Makkar (2003) dengan prinsip spektrofotometer yang dibaca pada panjang gelombang 725 nm. Spetrofotometer yang digunakan adalah UV-Vis Spectrophotometer Cary 50 Conc Varian. Standar ekuivalensi Fenol dan Tanin yang digunakan adalah *Tannic acid* (Sigma Aldrich, Germany). Sampel diekstrak menggunakan acetone 70% (v/v).

Didapat hasil analisis proksimat sebagaimana yang tercantum dalam tabel di bawah ini:

Tabel 5.1.
Hasil Analisis Proksimat Makro Nutrien dan Metabolit Sekunder

Jenis	Polong Kuning	Polong Hijau	Kacang Gude	*Pea Protein Isolate*
PROKSIMAT				
Air (%)	7.72	8.87	**10.37**	6.54
Abu (%)	2.04	1.29	**2.96**	1.86
Protein Kasar (%	**26.66**	**25.71**	**23.87**	**70.21**
Serat Kasar (%)	5.93	6.38	**6.94**	0.00
Lemak Kasar (%)	**10.78**	9.28	4.12	6.24
Energi Brutto (kkl/kg)	4015	**4209**	3472	3086
Berat kering (g/kg)	922.80	911.30	896.30	**934.60**
Total Fenol				
Berat Kering (g/kg)	3.93	3.60	**7.05**	1.06
(% Berat Kering)	0.39	0.36	0.70	0.11
Fenol Sederhana				
Berat Kering (g/kg)	1.43	**2.16**	2.02	1.86
(% Berat Kering)	0.14	0.22	0.20	0.19
Total Tannin				
Berat Kering (g/kg)	2.50	1.44	**5.03**	0
(% Berat Kering)	0.25	0.14	0.50	0

5.3. Kandungan Nilai Gizi Kacang Polong dan Kacang Gude

Perbandingan nilai gizi kacang per 100 gram bahan ditampilkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2.
Perbandingan Nilai Gizi Beberapa Jenis Kacang Per 100 Gram Bahan

JENIS	Kalori kcal	Protein g	Lemak g	KH g	Kalsium mg	Fosfor mg	Fe Mg	Vit A SI	Vit C mg
Kc polong (*Pisum sativum.* L)	42	3,27	0,23	7,05	42	55	1,97	1030	47,9
Kacang Gude (*Cajanus cajan*)	**336**	**20,7**	**1,4**	**62**	**12,5**	**275**	**4,0**	**150**	**5**

Sumber: Departemen Kesehatan RI 1995

Kc mekah, polong (*Pisum sativum.* L)	22	1,1	1,0	3,4	63	296	1,0	0	0

Sumber: Dirjen Pembinaan Kesehatan Masyarakat Departemen Kesehatan RI 1995

5.4. Enzim Protease untuk Menghidrolisis Protein Kacang

5.4.1. Bromelain

Bromelain merupakan campuran protease dari tanaman nanas (*Ananas comosus L.)* dan menjadi salah satu jenis enzim protease yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein atau polipeptida menjadi molekul yang lebih kecil yaitu asam amino. Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptodase. Eksopeptidase terdiri atas karboksi-ekso-peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino-eksopeptidase dari gugus amino terminal, sedang endopeptidase memecah ikatan peptida dari dalam (Bergmann, 1942; Mubarik et al., 2000). Jenis

protease dalam bromelain terutama protease sulfhidril (Naiola, dkk., 2007). Berdasarkan struktur biokimianya, bromelain terdiri dari campuran beberapa endopeptidase berbeda dan komponen-komponen lain seperti fosfatase, glukosidase, peroksidase, selulase, escharase, glikoprotein, karbohidrat, dan beberapa penghambat protease inhibitor. Bromelain juga mengandung asam fosfatase, dan kalsium yang terikat secara organik dan tetap stabil selama rentang antara pH 2 hingga 9. (Tochi, *et al.*, 2008).

Bromelain mudah didapatkan dari nanas yang dihaluskan, kemudian disentrifugasi, ultra filtrasi, dan liofilisasi (Aluko, 2009). Enzim bromelain yang diisolasi dari daging buah nanas matang memiliki aktivitas yang lebih tinggi. Bromelain yang diekstrak dari buah nanas mengandung beberapa zat yang menyerupai proteinase, zat fibrinolitik, anti-edema, anti-trombotik, dan anti-inflamasi. Bromelain sangat mudah diserap di dalam tubuh tanpa kehilangan aktivitas proteolitiknya dan tanpa menyebabkan efek samping yang berarti. Bromelain menyumbang banyak manfaat terapeutik terhadap sinusitis, trauma bedah, dan tromboflebitis, debridemen luka, meredakan osteoarthritis, diare, dan berbagai gangguan kardiovaskular. Sumber lain menyebutkan bahwa bromelain memiliki efek terhadap inhibisi agregasi platelet, pyelonephritis, *angina pectoris*, bronkhitis, serta meningkatkan absorbsi dari obat-obatan terutama antibiotik. Bromelain juga memiliki beberapa aktivitas anticancer dan merangsang sel apoptosis (Pavan, *et al.*, 2012; Maurer, 2001). Bukti menunjukkan bromelain dapat diserap dengan baik secara oral dengan efek terapeutik yang meningkat sesuai peningkatan dosis, terbukti aman dan merupakan suplemen makanan yang efektif. Namun, semua mekanisme aksinya belum jelas sepenuhnya (Tochi et al., 2008). Bromelain dimanfaatkan sebagai pengempuk daging, obat gangguan pencernaan, dan anti inflamasi. Enzim ini banyak digunakan dalam produksi hidrolisat protein (Maryam S, 2009; Rita O, 2017).

Dalam penelitian ini, bromelain digunakan sebagai enzim untuk memecah protein kacang polong kuning, kacang polong hijau, kacang gude, dan *pea protein isolate* menjadi hidrolisat protein; memotong di residu asam amino Lysin, Alanin dan Tyrosin (Lys, Ala, Tyr).

Gambar 5.5.
Buah Nanas dari Subang (*Ananas sativus*), Blender/jus Nanas, Larutan Sari Nanas *(Dokumentasi Pribadi)*.

5.4.2. Neutrase®

Neutrase merupakan endoprotease yang dapat memecahkan protein menjadi polipeptida atau peptide. Neutrase® adalah *bacterial protease* yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* yang dapat memecah protein menjadi peptida. Aktivitas Neutrase® optimal pada pH 5,5-7,5 dan pada suhu 30-55ºC, diperlukan ion Zn agar Neutrase dapat teraktivasi. Aktivitas Neutrase dapat dihambat oleh Asam etilenadiaminatetra asetat (*Ethylenediaminetetraacetic acid*/EDTA) (NCBE, 2016). Neutrase digunakan untuk mendegradasi protein sel hewan dan tumbuhan menjadi ekstrak DNA, denaturasi enzim, dan sebagai pengganti Trypsin untuk memurnikan susu. Neutrase efektif untuk menghidrolisis protein makanan, seperti protein kedelai, glutten, atau kolagen (NCBE 2016; Zambrowicz, *et al*., 2015); Pokora, 2013).

Dalam penelitian ini, Neutrase yang digunakan adalah Neutrase ® produksi Brenntag Connecting Chemistry Batch PWN10173, sebagai enzim untuk memecah protein kacang polong kuning, kacang polong hijau, kacang gude, dan *pea protein isolate* menjadi hidrolisat protein.

Gambar 5.6. Neutrase ®

DAFTAR PUSTAKA

AAFC. Agriculture and Agri-Food Canada. (2011). No 116341ND. Canadian Horticultural Council. www.hortcouncil.ca

Cronquist, A. (1955). Phylogeny and Taxonomy of the Compositae. *American Midland Naturalist*, *53*(2), 478–511. https://doi.org/10.2307/2422084

Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(9), 1234–1245. https://doi.org/10.1007/PL00000936

Naiola, Elidar ; Widhyastuti, N. (2007). Semi Purifikasi Dan Karakterisasi Enzim Protease Bacillus sp. *Berkala Penelitian Hayati: 13 (51–56), 2007*, *13*, 51–56.

NCBE. (2016). Neutral protease. *Ncbe*, 22974. Retrieved from http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/neutrase.html

Ogata, Y. (1989). *Medicinal Herb Index in Indonesia* (Second). Jakarta, Indonesia: PT. Eisai Indonesia.

Pavan, R., Jain, S., Shraddha, & Kumar, A. (2012). Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International*. https://doi.org/10.1155/2012/976203

Tochi, B. N., Wang, Z., Xu, S. Y., & Zhang, W. (2008). Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain): A review. *Pakistan Journal of Nutrition*. https://doi.org/10.3923/pjn.2008.513.520

Zambrowicz, A., Eckert, E., Pokora, M., Dąbrowska., A., Szoltysik, M., Bobak, L., … Chrzanowska, J. (2015). Biological activity of egg-yolk protein by-product hydrolysates obtained with the use of non-commercial plant protease. *Italian Journal of Food Science*, *27*(4), 450–458.

BAB VI
PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG DAN KACANG GUDE MENGGUNAKAN ENZIM NEUTRASE ATAU BROMELAIN

Protein merupakan komponen struktural, fungsional, dan reproduksi dari makhluk hidup. Protein menyediakan asam amino untuk membangun unit bagi biosintesis protein. Asam amino merupakan prekursor hormon, enzim, dan berbagai biomolekul lainnya (Mishra, 2010). Tujuan penelitian tahap ini adalah membuat hidrolisat protein dari kacang polong dan kacang gude menggunakan enzim Neutrase atau bromelain.

6.1. Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein merupakan suatu campuran asam amino yang diperoleh melalui degradasi hidrolisis protein menggunakan asam, basa, atau enzim proteolitik. Proses hidrolisis memecah molekul protein menjadi gugus asam amino atau melalui pemutusan rantai ikatan peptida. Hidrolisat mengandung peptida dengan bobot

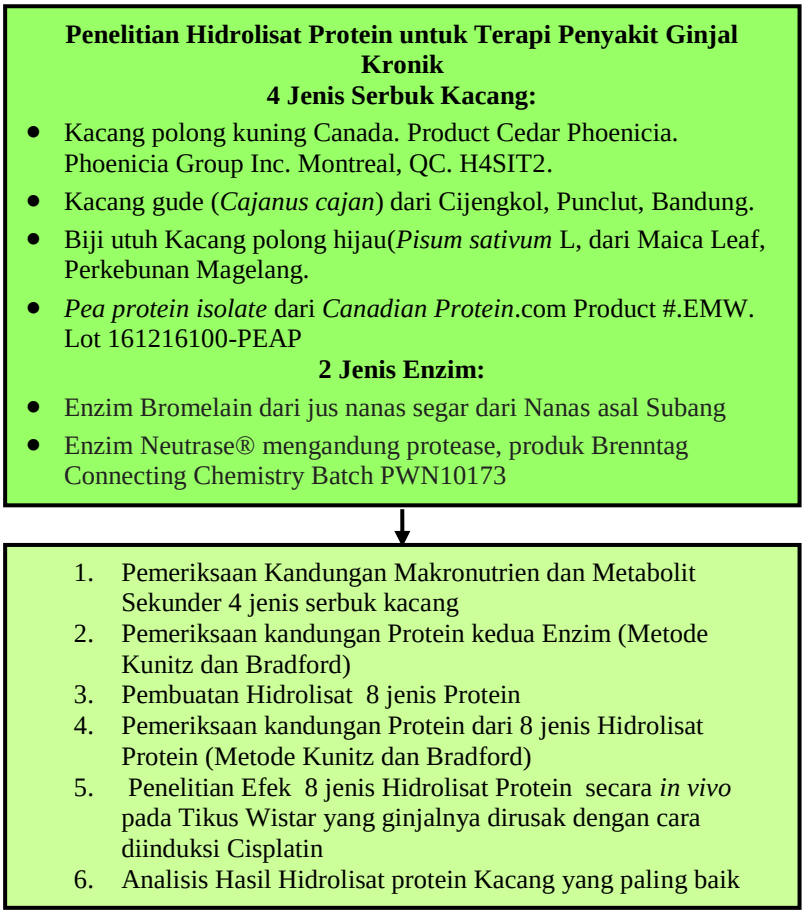
molekul rendah yang terdiri atas 2 sampai 4 residu amino. Hidrolisis sempurna akan menghasilkan hidrolisat yang kurang lebih terdiri dari 18-20 asam amino (Tavano, 2013).

Hidrolisis asam dapat menggunakan HCl atau H_2SO_4 pekat dan dipanaskan pada suhu mendidih dengan tekanan di atas 1 atmosfir dan berlangsung beberapa jam. Hidrolisis alkali menggunakan NaOH atau KOH pada suhu tinggi dengan tekanan di atas 1 atmosfer dan berlangsung beberapa jam. Penambahan asam maupun basa pada proses hidrolisis dapat merusak gugus asam amino (Restiani, 2015).

Proses hidrolisis secara enzimatis merusak dan memutuskan ikatan peptida oleh enzim dengan bantuan air. Ikatan peptida yang terbentuk dari protein mempunyai kecenderungan untuk putus secara spontan jika terdapat air, namun proses pemutusan ini berlangsung sangat lambat. Proses ini dapat dipercepat dengan adanya enzim, seperti yang umum terjadi pada makhluk hidup (Choudhary & Raines, 2011). Enzim pemecah protein dikenal sebagai protease. Protease mengkatalisis pemutusan ikatan peptida yang akan menghasilkan unit peptida dan molekul kecil sehingga akan lebih mudah larut. Peptida dengan kelarutan tinggi merupakan sumber protein yang serbaguna dan potensial dalam sistem pangan. Hasil pemecahan protease dapat menurunkan hiperkolesterolemia dengan mengekspresikan *Low density lipoprotein* reseptor (LDL-R) sehingga meningkatkan *uptake* dan degradasi LDL (Pownall, *et al.*, 2011). Hasil sebuah penelitian, peptida dalam protein kedelai hidrolisat (*Soy Protein Hydrolysate*, SPH) yang dibuat menggunakan protease tertentu terbukti memiliki efek hipokolesterolemik. Hipotesis mekanisme SPH dalam menurunkan kolesterol adalah SPH menstimulasi transkripsi LDL-R sehingga menghambat penyerapan asam empedu dan kolesterol, dan menghambat sintesis kolesterol (Cho., et al, 2007).

Hidrolisat protein dapat diperoleh dari hidrolisis enzimatik protein sumber makanan, seperti protein kedelai, susu (misalnya, *whey*, kasein), gandum, canola, jagung, protein nabati, dan protein hewani. Berat molekul hidrolisat protein rata-rata sekitar 2.000 sampai sekitar 10.000 Dalton. Secara umum, hidrolisat protein yang lebih kecil cenderung memiliki nilai Q yang lebih besar, dan memiliki rasa pahit. Semakin besar persentase produk hidrolisat yang memiliki berat molekul yang lebih kecil (misalnya, kurang dari sekitar 2.000 Dalton), semakin besar rasa pahit. Sebagai contoh molekul produk hidrolisat dengan kadar< 45% dengan berat molekul kurang dari 2.000 Dalton, memiliki sedikit atau tidak ada rasa pahit (Gajanan, and Shamasundar, 2016)

Peptida bioaktif, yang diperoleh dengan enzimatik hidrolisis protein makanan, telah terbukti menunjukkan efek yang baik pada kesehatan dan penyakit manusia, seperti efek anti hipertensi, aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan sebagai penurun kadarlipid darah. Produksi peptida di masa mendatang sebaiknya didasari atas parameter fungsi organ penting (Udenigwe, 2012). Kacang polong dikatakan sebagai sumber protein yang baik dan murah, mengandung antioksidan tinggi, tinggi energi, sumber nutrisi mikro nutrien, tidak mengandung kolesterol, tinggi protein, tinggi serat makanan, indeks glisemik rendah, dan bebas gluten serta mempunyai sifat sebagai anti diabetes dan anti kanker (Maphosa, 2017).



Gambar 6.1.
Alur Penelitian Hidrolisat Protein Kacang Polong untuk Terapi PGK

6.2. Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein

Pembuatan dilakukan dalam 3 tahap. **Tahap pertama** adalah pengukuran aktivitas spesifik total dari enzim yang digunakan dan analisis bahan sampel. **Tahap kedua** adalah pembuatan hidrolisat

protein kacang. **Tahap ketiga** adalah pemeriksaan kadar protein dari hidrolisat protein yang dihasilkan.

6.2.1. Tahap Pertama

Tahap ini dilakukan untuk mengukur aktivitas spesifik total dari enzim yang dipakai untuk pembuatan hidrolisat protein, yaitu Neutrase dan Bromelain dan memeriksa kandungan makronutrient dan metabolit sekunder dari 4 jenis kacang.

6.2.1.1. Pengukuran Konsentrasi Protein dengan Metode Bradford (Harlow & Lane, 2006).

Bradford protein assay adalah prosedur analisis spektroskopi yang digunakan untuk mengukur konsentrasi protein dalam larutan. Total aktivitas enzim spesifik adalah aktivitas enzim yang dibagi dengan jumlah produk protease dalam larutan. Uji ini untuk mengetahui adanya protein dalam suatu bahan. Uji Bradford menggunakan pereaksi *coomassie brilliant blue* yang terdapat dalam reagen Bradford. *Coomassie blue* tersebut mengikat protein membentuk kompleks berwarna biru. Ekstrak 0,1 ml ditambah dengan 1 ml pereaksi Bradford. Tabung ditutup rapat dengan para film dan dikocok dengan cara membalikkan tabung perlahan-lahan beberapa kali. Kemudian didiamkan selama lima menit atau paling lama satu jam. Apabila terbentuk warna biru, berarti positif mengandung protein.

Pertama kandungan protein enzim diperiksa dengan uji Kunitz, selanjutnya dibuat kurva Triptofan (bisa juga Tirosin atau Fenilalanin) untuk mencari kesetaraan antara protein yang diperiksa dengan Triptofan karena mempunyai panjang gelombang yang sama. Terakhir hasil dimasukkan ke dalam persamaan kurva Bradford, untuk menghitung berapa banyak kandungan protein di dalam larutan.

6.2.1.2. Uji Kunitz (Uji Protease) (Kunitz, 1950).

Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim total. Sebanyak 900 µL aquadest dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL. Kemudian, sebanyak 500 µL kasein 0,1% (b/v) ditambahkan ke aquadest. Setelah itu, sebanyak 100 µL enzim (Neutrase/bromelain) ditambahkan ke larutan dan di inkubasi pada suhu 37 ° C selama 30 menit. Setelah inkubasi, 500 µL TCA (Asam Trikloroasetat) 10% (b/v) ditambahkan ke larutan. Endapan dan supernatan yang terbentuk dalam larutan dipisahkan dengan menggunakan metode sentrifugasi pada laju 6000 G selama 10 menit pada suhu 4 ° C. Supernatan dimasukkan ke kuartet kuarsa 1 mL dan diukur serapan pada panjang gelombang **280 nm** dengan menggunakan visual spektrofotometer UV.

6.2.1.3. Pembuatan Kurva Larutan Standar Triptofan (Harlow & Lane, 2006)

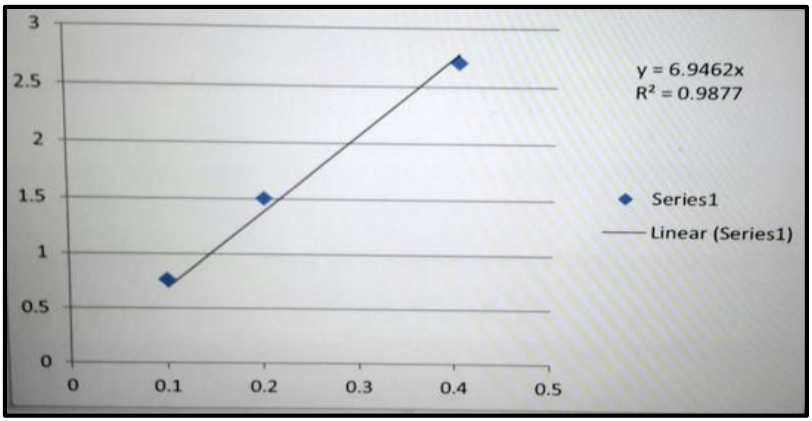
Reaksi ini menunjukkan jumlah produk sebagai hasil aktivitas enzim Neutrase/Bromelain. Pertama TSS standar 3.2 mg/3mL aquadest diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; Dan 0,1 mg/mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL TSS standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL Bradford Protein Assay Dye Reagent, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian diperoleh kurva standar dengan persamaan regresi (y = bx + a). Prosedur ini dilakukan dua kali, dan hasil absorbansi dimasukkan ke dalam kurva triptofan.

6.2.1.4. Pembuatan Kurva Baku *Bovine Serum Albumin* (BSA) Standar

Reaksi tahap ini bertujuan untuk menunjukkan jumlah produk sebagai hasil aktivitas enzim Neutrase/Bromelain. BSA standard 2 mg/mL diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; Dan 0,1

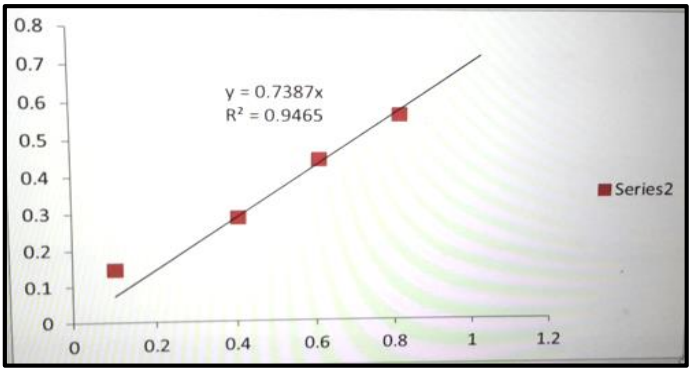
mg/mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL BSA standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL Bradford *Protein Assay Dye Reagent*, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prosedur BSA ini dilakukan dua kali, kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam kurva BSA dengan persamaan regresi (y = bx + a).

Yang pertama adalah dibuat kurva baku dari Triptofan sebagai dasar perhitungan selanjutnya. Prosedur pembuatan kurva baku triptofan ini dilakukan dua kali, dan hasil absorbansi diproyeksikan ke dalam kurva seperti terlihat di bawah ini dan didapat persamaan rumus triptofan adalah: **y = 6.9462x**



Gambar 6.2.
Grafik Persamaan Triptofan dengan y = 6.9462x

Tahap selanjutnya adalah membuat kurva baku *Bovine Serum Albumin* (BSA), sesuai cara kerja yang tertulis sebelumnya, didapat hasil pemeriksaan absorbansi BSA, selanjutnya diproyeksikan ke dalam kurva BSA seperti terlihat di bawah ini



Gambar 6.3.
Grafik Persamaan BSA dengan y = 0,7387x

6.2.1.5. Total Aktivitas Spesifik Enzim

Total aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas enzim total dibagi dengan jumlah produk protein dalam larutan, artinya jumlah protease dalam larutan. Aktivitas enzim total adalah absorbansi enzim yang dibagi dengan persamaan triptofan kemudian dibagi dengan konsentrasi triptofan. Jumlah protease dalam larutan adalah absorbansi enzim yang dibagi dengan persamaan rumus BSA

- **Neutrase.**

  Aktivitas Neutrase: 1.418/6.9462/204.23 = 0.499 ~ 0.5UM, jumlah protein dalam Neutrase adalah 0,913/0,7387 = 1,23;

  Jadi total aktivitas spesifik Neutrase adalah 0,5/0,0123 = 40,650 U/mg

- **Bromelain.**

  Aktivitas Bromelain: 0.610/6.9462/204.23 = 0,215 UM, jumlah protein dalam Bromelain adalah 0,601; Jadi total aktivitas spesifik bromelain adalah 0,215/0,00601 = 35,773 U/mg.

  Disimpulkan bahwa aktivitas spesifik total antara kedua enzim hampir sama.

6.2.2. Tahap Kedua

Tahap ini dilakukan untuk membuat 8 jenis hidrolisat protein kacang dari 4 jenis bahan kacang menggunakan enzim Neutrase atau bromelain sebagai berikut:

- Biji utuh Kacang polong kuning Canada. Product Cedar Phoenicia. Phoenicia Group Inc. Montreal, QC. H4SIT2; selanjutnya dibuat menjadi serbuk.
- Biji utuh Kacang gude (*Cajanus cajan*) dari Cijengkol, Punclut, Bandung Utara; selanjutnya dibuat menjadi serbuk.
- Biji utuh Kacang polong hijau (*Pisum sativum* L) dari Maica leaf, Perkebunan Magelang; selanjutnya dibuat menjadi serbuk.
- Serbuk *Pea protein isolate* dari *Canadian Protein*.com Product #.EMW. Lot 161216100-PEAP

6.2.2.1. Proses Pembuatan Hidrolisat protein

Proses hidrolisis 4 jenis kacang menggunakan 2 jenis enzim: Enzim Bromelain dari jus nanas segar dari Nanas asal Subang dan Enzim Neutrase® mengandung protease, produk Brenntag Connecting Chemistry Batch PWN10173. Empat jenis kacang tersebut pertama-tama dibuat menjadi serbuk (kecuali PPI dari Kanada, sudah dalam bentuk serbuk), kemudian disaring melalui saringan MESH no 120, ditimbang masing-masing 50 g dan dimasukkan ke dalam gelas beaker, ditambahkan 200 ml aquadest (kecuali serbuk PPI 400 ml aquadest, karena sulit sekali larut) setelah itu ditambahkan 5 ml Neutrase atau Bromelain (10% berat serbuk sampel kacang). Kemudian dibiarkan di atas pengaduk (*stirrer*) pada suhu kamar selama 72 jam. Cairan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disentrifugasi pada 6000 g selama 10 menit. Cairan supernatan diambil, dan disaring menggunakan kertas saring(Hidayat, M., Hak Cipta EC00201810615, 2018).

Gambar 6.4.
Penyaringan dan Penimbangan Serbuk Sampel Kacang

Gambar 6.5.
Larutan 4 jenis Kacang di atas *Stirrer* *(Dokumentasi Pribadi).*

6.2.3. Tahap Ketiga

Tahap ini bertujuan untuk memeriksa kandungan protein dari 8 jenis hidrolisat protein yang dihasilkan dari protein 4 jenis kacang.

6.2.3.1. Uji Kandungan Protein dari Sampel Hidrolisat Protein Kacang

Sebanyak 30 µL sampel hidrolisat (4x2) (terpisah) ditentukan kadar proteinnya dengan cara yang sama seperti perlakuan standar BSA. Setelah diketahui absorbansi, maka data dimasukkan ke dalam persamaan regresi (y = absorbansi) kurva

standar BSA, sehingga diketahui kadar proteinnya. Untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim tertentu, dapat dihitung dengan membagi total aktivitas enzim dengan jumlah protein dalam larutan, hal ini menunjukkan jumlah protease dalam larutan.

6.2.3.2. Hasil Perhitungan Jumlah Kandungan Hidrolisat Protein dari Kacang Polong

Setelah 72 jam, jumlah total produk larutan, pH dan jumlah protease dihitung berdasarkan persamaan BSA. Jumlah protein dihitung dengan membagi absorbansi sampel hidrolisat pada diencerkan 50x (0,02 sampel + 0,98 aquadest) pada panjang gelombang A280 dengan persamaan BSA. Hasilnya adalah:

1. HPPKN 142,5 ml. pH 3.9; Jumlah protein: 0,8169/0,7387 = 40,84 mg/mL
2. HPPKB 150 ml, pH 3.8; Jumlah protein: 0,408/0,7387 = 27,61 mg/mL
3. HPKGN 145 ml, pH 4.2; Jumlah protein: 0,4865/0,7387 = 32,93 mg/mL
4. HPKGB 135 ml, pH 4.2; Jumlah protein: 0,3295/0,7387 = 22,30 mg/mL
5. HPPHN 145 ml, pH 3.6; Jumlah protein: 0,8375/0,7387 = 56,69 mg/mL
6. HPPHB 115 ml, pH 3.7; Jumlah protein: 0,699/0,7387 = 47,31 mg/mL
7. HPPPIN 350 ml, pH 7,3; Jumlah protein: 0,91/0,7387 = 61,59 mg/mL
8. HPPPIB 300 ml, pH 7.2; Jumlah protein: 0,555/0,7387 = 37,56 mg/mL

6.2.3.3. Pemeriksaan Berat Molekul dari Delapan Jenis Hidrolisat protein menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

1. Prosedur Karakterisasi Protein SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

- **SDS 10%.** SDS 10% dibuat dengan cara melarutkan 2 gram SDS dalam akuades hingga 20 mL.
- ***Ammonium Persulfate* (APS) 10%.** APS 10% dibuat dengan melarutkan 2 gram APS dalam akuades hingga 20 mL.
- **Bufer Sampel 5x**
  Bufer sampel 5x dibuat dengan mencampurkan 0,06 mL tris-HCl 1M (pH 6,8); 0,5 mL gliserol 50%; 0,2 mL SDS 10%; 0,05 mL 2-mercaptoetanol; 0,1 mL *coomassie brilliant blue* 1% serta 0,09 mL akuades**.**
- **Bufer tris-HCl 1,5 M pH 8,8**
  Bufer tris-HCl 1,5 MpH 8,8 dibuat dengan melarutkan 18,171 gram tris dalam 80 mL akuades, kemudian ditambahkan HCl hingga pH 8,8. Selanjutnya, akuades ditambahkan hingga volume 100 mL.
- **Bufer tris-HCl 0,5 M pH 6,8**
  Bufer tris-HCl 0,5 MpH 6,8 dibuat dengan melarutkan 6,057 gram tris dalam 80 mL akuades, kemudian HCl ditambahkan hingga pH 6,8. Selanjutnya, akuades ditambahkan hingga volume 100 mL.
- **Bufer elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3**
  Bufer elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3 dibuat dengan cara melarutkan 3 gram tris, 14,4 gram glisin, dan 1 gram SDS dalam 800 mL akuades, kemudian HCl di+kan hingga pH 8,3. Selanjutnya di+hkan akuades hingga vol 1 liter.

- **Bufer *staining***
  Bufer *staining* dibuat dengan mencampurkan 0,5 gram *coomassie brilliant blue*, 225 mL metanol teknis, 50 mL asam asetat glasial, dan 225 mL akuades.
- **Bufer *destaining***
  dibuat dengan mencampurkan 50 mL asam asetat glasial, 50 mL metanol teknis, dan 400 mL akuades.

2. Pembuatan Gel

- **S*eparating gel* (12%)**
  Larutan *separating gel* dibuat dengan mencampurkan 3 mL 40% bis-akrilamid; 4,35 mL akuades; 2,5 mL buffer Tris-Cl 1,5 M (pH 8,8); 100 µL SDS 10%; 50 µL APS 10% dan 5 µL TEMED. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam cetakan dan dibiarkan memadat (sekira 60 menit).
- ***Stacking gel* (4%)**
  Larutan *stacking gel* dibuat dengan mencampurkan 500 µL 40% bis-akrilamid; 3,18 mL akuades; 1,26 mL buffer Tris-Cl 0,5 M (pH 6,8); 50 µL SDS 10 %; 25 µL APS 10% dan 5 µL TEMED. Larutan *stacking gel* dituangkan ke atas *separating gel* yang sudah memadat. Sebelum larutan *stacking gel* memadat, kemudian sisir dipasang dan didiamkan sampai gel memadat (sekitar 60 menit).

3. Preparasi Sampel

Sebanyak 30 µL sampel x dicampur dengan 5 µL buffer sampel pada tabung mikro 1,5 mL dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 g dan suhu 4 ˚C, selama 2 menit.

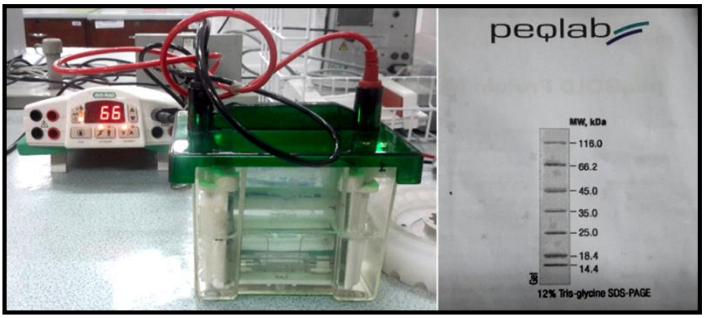
4. Elektroforesis

Gel yang sudah memadat dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis dan ditambahkan *running buffer* (buffer elektroforesis

SDS-PAGE pH 8,3). Sebanyak 25 µL sampel dimasukkan ke dalam sumur pada gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan tetap 100 V selama 100 menit. Marka protein, sebagai standar, dimasukkan ke salah satu sumur pada gel. Alat elektroforesis dipadamkan setelah *blue dyes* berjarak sekira 0,5 cm di atas ujung bawah gel.

5. *Staining* dan *Destaining*

Gel dikeluarkan dari plat kaca kemudian dicuci 3 kali selama 5 menit dalam 20 mL air, lalu di inkubasi dalam larutan *staining* (*coomassie brilliant blue* 0,25 % b/v, asam asetat glasial 10 % v/v, metanol 45 % v/v, dan akuades) hingga terendam (selama 18 jam). Kemudian gel dipindahkan ke dalam larutan *destaining* (asam asetat glasial 10 % v/v glasial, metanol 45 % v/v, dan akuades) dan dibiarkan sampai pita-pita pada gel menjadi jelas (60 menit sampai semalam). Gel yang sudah bersih dipindai dan ditentukan berat molekul proteinnya dengan cara dibandingkan terhadap marka protein.



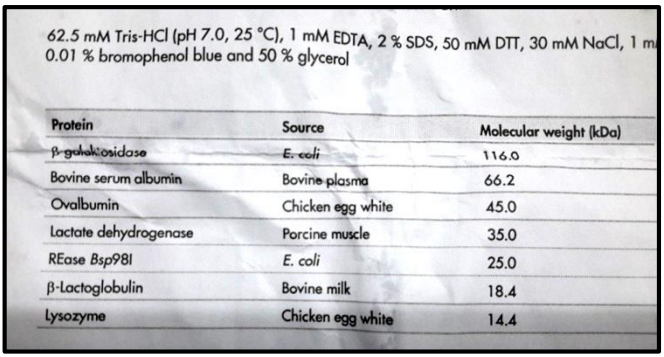
Gambar 6.6.
Peralatan untuk Pemeriksaan SDS PAGE

Pemeriksaan SDS-PAGE ini dilakukan berdasarkan metode Laemmli (Laemmli, 1970). Konsentrasi protein pertama kali diukur dengan menggunakan kit protein assay BSA (Pierce, Rockfold, IL) dengan BSA sebagai standar. SDS-PAGE dilakukan pada gel slab vertikal 80-(tinggi) x 100-(lebar) x 1 mm (mm) yang terdiri dari gel

susun akrilamida 4%, dan gel lajur utama akrilamida 20% pada pH 8,8 dari 12% Tris-HCl (peqGOLD Protein Marker peqlab).

Tiga puluh µL hidrolisat protein dijalankan pada elektroforesis pada 100 v dan 400 mA dengan arus listrik konstan selama 100 menit. Visualisasi pita protein dilakukan dengan pewarnaan 0,05% *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (Alu'datt, 2017).

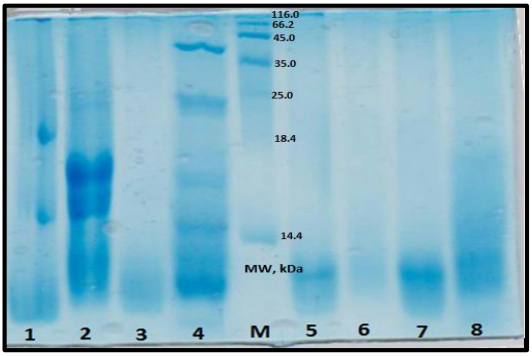
Penanda protein yang digunakan adalah beta galaktosidase 116,0 kDa, albumin serum Bovine 66,2 kDa, ovalbumin 45,0 kDa, Laktat dehidrogenase 35,0 kDa, REase *B*sp 981 25,0 kDa, β-Lacto globulin 18,4 kDa dan Lysozyme 14,4 kDa.



62.5 mM Tris-HCl (pH 7.0, 25 °C), 1 mM EDTA, 2 % SDS, 50 mM DTT, 30 mM NaCl, 1 m
0.01 % bromophenol blue and 50 % glycerol

Protein	Source	Molecular weight (kDa)
β-galaktosidase	*E. coli*	116.0
Bovine serum albumin	Bovine plasma	66.2
Ovalbumin	Chicken egg white	45.0
Lactate dehydrogenase	Porcine muscle	35.0
REase *Bsp*98I	*E. coli*	25.0
β-Lactoglobulin	Bovine milk	18.4
Lysozyme	Chicken egg white	14.4

Gambar 6.7.
***Marker* atau Penanda Berat Molekul dari PeqLab.**



Gambar 6.8.
Hasil SDS-PAGE dari 8 Jenis Hidrolisat protein Kacang

1. Hidrolisat protein Kacang Polong Kanada menggunakan Neutrase (HPPKN)
2. Hidrolisat protein Kacang Gude menggunakan Neutrase (HPKGN)
3. Hidrolisat protein Kacang Hijau PHK menggunakan Neutrase (HPPHN)
4. Hidrolisat protein *Pea Protein Isolate* menggunakan Neutrase (HPPPIN)

M = Marker

5. Hidrolisat protein Kacang Polong Kanada menggunakan Bromelain (HPPKB)
6. Hidrolisat protein Kacang Gude menggunakan Bromelain (HPKGB)
7. Hidrolisat protein Kacang Hijau menggunakan Bromelain (HPPHB)
8. Hidrolisat protein *Pea Protein Isolate* menggunakan Bromelain (HPPPIB)

Hidrolisat protein yang menggunakan enzim neutrase umumnya memiliki rentang berat molekul yang lebar dari<14,4 kDa sampai 25,0 kDa. HPPKN memiliki beberapa protein, menandai pita sekitar 18,4 kDa, sedikit di atas dan di bawah 14,4 kDa. HPKGN terlihat pada pita antara 14,4 sampai 18,4 kDa. HPPHN menunjukkan pita di bawah 14,4 kDa dan HPPPIN menunjukkan pita di bawah 14,4 kDa hingga 25,0 kDa.

Hidrolisat protein yang di hidrolisis menggunakan enzim bromelain umumnya memiliki berat molekul kecil, di bawah 14,4 kDa. HPPKB menunjukkan sebuah pita di bawah 14,4 kDa sehingga memiliki protein dengan berat molekul lebih kecil dari 14,4 kDa. Demikian pula HPKGB, HPPHB, dan HPPPIB menunjukkan pita-pita di bawah 14,4 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

Cho, S.-J., Juillerat, M. A., & Lee, C.-H. (2007). Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf071903f

Choudhary, A., & Raines, R. T. (2011). An Evaluation of Peptide-Bond Isosteres. *ChemBioChem*. https://doi.org/10.1002/cbic.201100272

Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7618-9

Harlow, E., & Lane, D. (2006). Bradford Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(6), pdb.prot4644-pdb.prot4644. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4644

Hidayat, M. Pembuatan dan Pengajuan Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau untuk Terapi Perbaikan Fungsi Ginjal. Hak Cipta (2018). *EC00201810615*. Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia Direktur Jenderal Kekayaan Intelektual Republik Indonesia. 1 Mei 2018.

Kunitz, M. (1950). Crystalline Desoxyribonuclease: I. Isolation and General Properties Spectrophotometric Method for the Measurement of Desoxyribonuclease Activity. *The Journal of General Physiology*. https://doi.org/10.1085/jgp.33.4.349

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Mishra, N. (2010). *Methodology for Separation and Identification of Proteins and their Interactions*. *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*.

Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.017

Restiani, R. (2015). Hidrolisis secara Enzimatis protein Bungkil Biji Nyamplung (Calophyllum inophyllum) menggunakan Bromelain. *Biota*, *1*(3), 86–91.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011

BAB VII
EFEK DARI 8 JENIS HIDROLISAT PROTEIN KACANG TERHADAP GINJAL TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CISPLATIN

Pemeriksaan tahap ini bertujuan untuk menguji efek pemberian delapan jenis hidrolisat protein kacang yang sudah dipersiapkan sebelumnya terhadap organ-organ utama, fungsi ginjal dan peptida terkait ginjal dari tikus Wistar betina, dengan beberapa parameter.

7.1. Parameter Penelitian

Parameter yang diperiksa untuk menguji efek pemberian delapan jenis hidrolisat protein terhadap organ-organ utama tikus Wistar betina adalah: Bobot badan, Berat Organ (BO), Indeks Organ (IO) dan analisis sediaan histopatologis ginjal, Parameter yang diperiksa untuk menguji efek terhadap fungsi ginjal adalah: Ureum, Kreatinin; Profil lipid: Kolesterol Total, Trigliserida, *Low Density Lipoprotein* (LDL), *High Density Lipoprotein* (HDL); dan Asam Urat. Parameter peptida terkait ginjal yang diperiksa untuk menguji

hipotesis mekanisme hidrolisat protein dalam memperbaiki fungsi ginjal adalah: *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), *Cyclooxygenase*-1 (COX-1) dan Renin.

7.2. Bahan dan Alat yang Digunakan

Sebagai subjek penelitian digunakan 50 ekor tikus Wistar betina, berusia 5-6 minggu, bobot antara 148-190 g, nullipara (belum pernah melahirkan) dan tidak sedang hamil. Tikus diperoleh dari Fakultas Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (SITH) ITB Bandung. Selanjutnya hewan-hewan tersebut dibagi menjadi 10 kelompok masing-masing 5 ekor tikus.

Untuk membuat model tikus menderita penyakit ginjal kronik(PGK)**,** tikus diinduksi dengan **Cisplatin** yang diinjeksikan secara intra peritoneal sebanyak 10mg/kgBB**.**

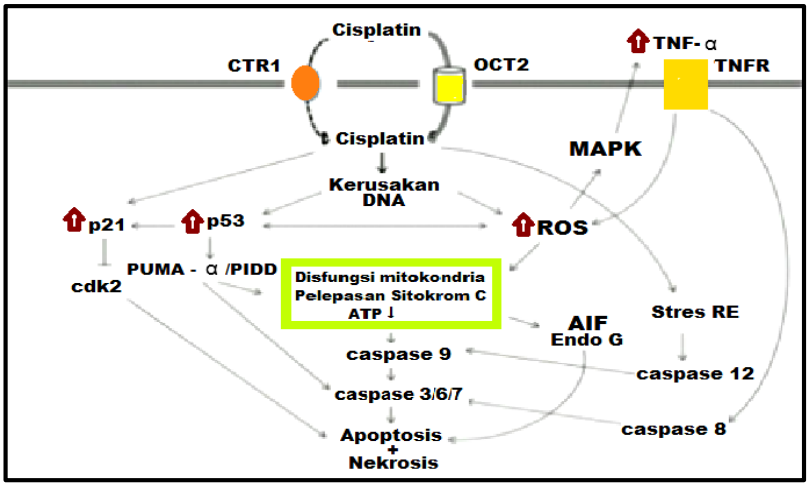
7.2.1. Cisplatin

Cisplatin adalah obat anti neoplastik yang sering digunakan untuk pengobatan kanker. Mekanisme kerja Cisplatin adalah dengan cara menghambat pembelahan sel, dengan efek samping utama berupa toksisitas terhadap sel ginjal (nefrotoksik).

Gambar 7.1.
Cisplatin Injeksi 50 mg *(Dokumentasi Pribadi)*

Mekanisme Cisplatin menyebabkan toksik terhadap ginjal melalui jalur ekstrinsik yaitu *death receptors* (TNF *receptors* atau Fas) dan jalur intrinsik yaitu jalur mitokondria dan jalur *stress endoplasmic reticulum* sehingga menyebabkan kematian sel epitel ginjal. Kerusakan sel ginjal akan mengeluarkan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) melalui produksi kemokin dan sitokin sehingga terjadi *up regulation* adhesi molekul dan menarik sel inflamasi (Miller et al., 2010).

Mekanisme transduksi sinyal Cisplatin dalam merusak epitel tubulus ginjal dijelaskan pada gambar 7.2 sebagai berikut.



Gambar 7.2.
Jalur Cisplatin Menginduksi Kematian Sel
(*Adaptasi dari Miller, 2010).*

Cisplatin masuk ke dalam sel melalui membran transport *copper transporter* 1 (Ctrl) dan *organic cation transporter* (OCT2) (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). Ctrl merupakan protein membran plasma yang memediasi ambilan Cisplatin pada sel mamalia. Regulasi *DBOn* dari ekspresi Ctrl akan menurunkan ambilan Cisplatin dan toksisitas sel. Mekanisme Ctrl yang

menyebabkan nefrotoksisitas secara *in vivo* masih belum jelas diketahui. OCT2 akan membawa Cisplatin serta meningkatkan ambilan Cisplatin pada ginjal. Hal ini terjadi melalui 2 cara yaitu menurunkan ekskresi Cisplatin melalui urine dan *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada OCT2 sehingga terjadi penurunan ekskresi Cisplatin pada urine sehingga menimbulkan toksik (Basu, Krishnamurthy, 2010). Reseptor kematian atau *Death receptors* akan aktif karena adanya defisit TNFR1 dan Fas pada sel epitel ginjal sehingga meningkatkan jalur kematian yaitu caspase 8 yang menyebabkan kematian sel. TNF-α akan berikatan dengan reseptor TNF pada sel epitel ginjal sehingga menimbulkan respon inflamasi dan nefrotoksik; namun mekanisme yang pasti masih belum diketahui. Pada jalur intrinsik, translokasi Bax dalam mitokondria, aktivasi caspase 2, keluarnya cytochrome C, AIF, SMAC/Diablo, Omi/HtrA2, dan endonuclease G dari mitochondria, serta aktivasi jalur transduksi caspase 9 akan menyebabkan sel epitel ginjal terpapar Cisplatin. Aktivasi jalur caspase 3,8,9 menyebabkan kematian sel tubular ginjal. Gen p53 dependent akan mengekspresi caspase 6,7 dan aktivasi p53 independent akan memediasi Bax/Bak untuk mengeluarkan cytochrome C sehingga menyebabkan kematian sel epitel tubular ginjal. Jalur *reticulum endoplasmic stress* (RES) akan mengaktivasi jalur caspase 12 dan Ca^{2+} dependent phospholipase A2 dan akan menginhibisi enzim untuk menurunkan apoptosis. Target regulasi transkripsi p53 adalah p53 *up regulated modulator of apoptosis-alpha* (PUMA-alfa) dan p53 *induced protein with a death domain* (PIDD). Aktivasi p53 akibat kerusakan DNA dan stres oksidatif akan menginduksi PIDD sehingga terjadi aktivasi jalur caspase 2 dan menyebabkan pelepasan *Apoptosis Initiating Factor* (AIF) oleh mitokondria (Miller, 2010). Kerusakan DNA akibat produksi DNase I atau Cisplatin akan menyebabkan endonuclease G hancur sehingga menimbulkan kerusakan DNA, aktivasi onkogen dan hipoksia yang memicu terjadinya apoptosis sel. Produksi radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) akan

menyebabkan aktivasi jalur MAPK sehingga menyebabkan toksisitas sel (Miller, 2010).

Efek samping yang mungkin terjadi akibat Cisplatin terhadap ginjal adalah hipomagnesemia, *Fanconi-like syndrome*, asidosis tubulus distal ginjal, hipokalsemia, hiperurisemia, proteinuria, dan gagal ginjal kronis (Guyton & Hall, 2011). Pemberian Cisplatin dengan dosis rendah menginduksi apoptosis dan pemberian dosis tinggi mengakibatkan nekrosis organ (Davies, 2002). Kondisi nefrotoksisitas pada penggunaan Cisplatin meningkat seiring peningkatan dosis, frekuensi pemberian, dan dosis kumulatif dari Cisplatin. Pemberian Cisplatin di atas 50 mg/m^2 luas permukaan tubuh menyebabkan LFG dan konsentrasi magnesium plasma menurun, tetapi pada pemberian yang lebih kecil dari 20 mg/m^2, LFG tidak mengalami perubahan.

Pemberian injeksi larutan Cisplatin secara intra peritoneal dalam konsentrasi lebih besar dari 0,5 mg/mL menyebabkan kerusakan sel dan jaringan, fibrosis dan nekrosis ginjal (Dugbartey, Peppone, & de Graaf, 2016) (Miller, *et al.*, 2010). Keadaan nefrotoksik yang paling sering terjadi adalah *acute kidney injury* (AKI) yang dialami 20-30% penderita. Kerusakan ginjal dimulai beberapa hari setelah pemberian cisplatin ditandai dengan meningkatnya serum kreatinin dan konsentrasi *Blood Urea Nitrogen* (BUN). Cisplatin diekskresi bersamaan dengan urine melalui filtrasi glomerulus dan sekresi tubulus sehingga terjadi konsentrasi cisplatin berlebihan pada sel parenkim ginjal (Miller et al., 2010).

Cisplatin juga memiliki efek toksik terhadap jantung, sehingga berhubungan dengan dislipidemia. Sel jantung dalam kegiatannya juga memroduksi radikal bebas sehingga terjadi oksidasi lemak yang meningkatkan kolesterol, *Low density lipoprotein-Cholesterol (LDL-C)*, trigliserida dan menurunkan kadar *high density lipoprotein* (Hanchate, *et al.*, 2017).

Variabilitas penderita yang diketahui berhubungan dengan peningkatan risiko nefrotoksisitas adalah jenis kelamin perempuan, usia tua, perokok, dan hipoalbuminemia (Guyton & Hall, 2011) (Arany & Safirstein, 2003). Penelitian pada tikus menunjukkan pengaruh gender pada nefrotoksisitas Cisplatin yaitu OCT2 di ekspresi lebih banyak pada tubulus proksimal tikus jantan daripada tikus betina sehingga tikus jantan yang diinduksi Cisplatin menunjukkan kerusakan ginjal yang lebih parah dibandingkan tikus betina. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan tikus betina (Nematbakhsh, M., *et al*., 2013; Pezeshki, Z., *et al*., 2013) dan Cisplatin diberikan secara tunggal pada dosis 10 mg/kgBB untuk membuat kerusakan ginjal tikus (Hidayat, M., *et al*., 2018b).

7.2.2. Aspek Etik Penelitian

Studi eksperimental terhadap tikus Wistar betina yang diinduksi dengan Cisplatin ini, telah disetujui untuk izin etis dari Komisi Etik Universitas Kristen Maranatha SK No.031/KEP FK UKM-RSI/II/2017 dan SK no 084/KEP/III/2017.

7.3. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Farmakologi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung pada bulan April 2017, Laboratorium Puri Medika Purwakarta dan Laboratorium Patologi Klinik RS Hasan Sadikin Bandung.

7.4. Percobaan *In vivo* pada Tikus Wistar Betina yang Diinduksi Cisplatin (Hidayat, M., *et al.*, 2018a).

Gambar 7.3.
Tikus Wistar dan Pemberian Perlakuan melalui Sonde Oral

Seluruh subjek penelitian, lima puluh ekor tikus Wistar betina diadaptasikan selama 7 hari, selanjutnya dibagi menjadi 10 kelompok yang masing-masing kelompok diberi perlakuan, seperti yang tercantum dalam tabel 7.1 di bawah ini:

Tabel 7.1.
Kelompok Perlakuan Hidrolisat Protein terhadap Tikus Wistar Betina yang Diinduksi Cisplatin

Kelompok	Pemberian	Dosis
I	Hidrolisat protein Polong Kuning Neutrase (HPPKN)	100 mg/kgBB
II	Hidrolisat protein Polong Kuning bromelain (HPPKB)	100 mg/kgBB
III	Hidrolisat protein Kacang Gude Neutrase (HPKGN)	100 mg/kgBB
IV	Hidrolisat protein Kacang Gude bromelain (HPKGB)	100 mg/kgBB
V	Hidrolisat protein Polong Hijau Neutrase (HPPHN)	100 mg/kgBB
VI	Hidrolisat protein Polong Hijau bromelain (HPPHB)	100 mg/kgBB
VII	Hidrolisat protein Pea Protein Isolate Neutrase (HPPPIN)	100 mg/kgBB
VIII	Hidrolisat protein Pea Protein Isolate bromelain (HPPPIB)	100 mg/kgBB
IX	Kontrol Sehat (=Kontrol Normal= Kontrol Negatif) Pelarut CMC 0,5%	
X	Kontrol Cisplatin (1 × pemberian)	10 mg/kgBB

Penelitian dilakukan selama 30 hari, pada hari ke 5 setiap kelompok disuntik dengan Cisplatin secara intra peritoneal 10 mg/kgBB, kecuali kelompok 9 (Kontrol Negatif). Sejak hari pertama sampai dengan hari 30, kelompok 1 sampai 8 diberikan masing-masing hidrolisat 100 mg/kgBB/hari. Bobot badan tikus ditimbang setiap minggu (7 hari). Parameter fungsi ginjal: Ureum (Urea Darah Nitrogen = *Blood Urea Nitrogen* = BUN) dan Kreatinin, diperiksa setiap minggu (4 kali). Pada hari ke 30, semua tikus dibunuh dengan cara memasukkan ke dalam kotak CO_2.

Tabel 7.2.
Prosedur Percobaan dan Jadwal Pemeriksaan Parameter Penelitian

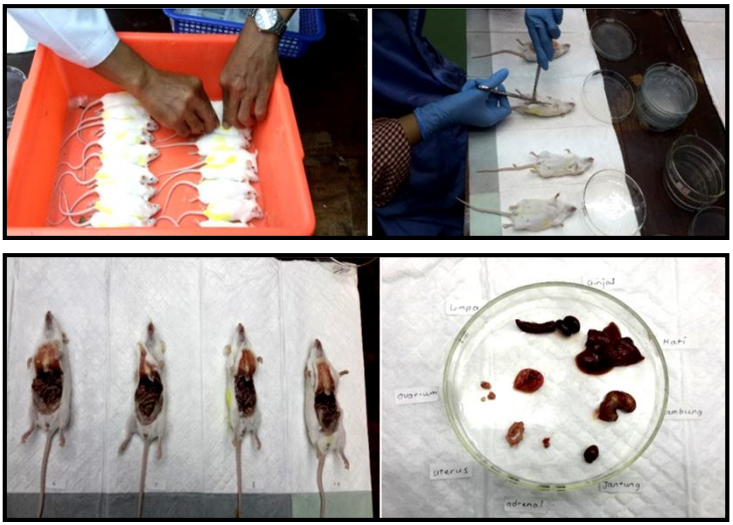
Data *Baseline*	Induksi Cisplatin 10 mg/kgBB	Minggu I Setelah induksi 5 hari	Minggu II 7 hari	Minggu III 12 hari	Minggu IV 30 hari
	H-5	H 0	H 7	H 12	H 30
Pemeriksaan Bobot Badan Tikus	**Pemeriksaan** Bobot Badan Tikus	**Pemeriksaan I** Ureum Kreatinin Kolesterol Total LDL Trigliserida	**Pemeriksaan IV** Ureum Kreatinin	**Pemeriksaan V** Ureum Kreatinin	**Pemeriksaan VI** Ureum Kreatinin Kolesterol Total LDL Trigliserida Histopatologis ginjal ANP, COX-1, Renin

7.5. Parameter Bobot Badan

Bobot badan tiap tikus ditimbang setiap 2 hari sekali untuk menentukan dosis dan volume bahan uji yang diberikan. Secara umum, semua kelompok tikus mengalami penurunan bobot badan setelah pemberian induksi Cisplatin, kecuali kelompok kontrol negatif. Pada minggu ke 3 mulai tampak kenaikan bobot badan kembali. Hasil pengukuran bobot badan untuk masing-masing tikus, dosis dan volume pemberian bahan uji selama penelitian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Tahap Terminasi Tikus Setelah 30 Hari Perlakuan

Gambar 7.4.
Tikus dibunuh dalam kotak CO_2 *(Dokumentasi Pribadi)*



Gambar 7.5.
Tikus dibedah dan diperiksa 8 Organ Penting
(Dokumentasi Pribadi)

7.6. Parameter Berat Organ (BO)

Tabel 7.3.
Rerata Berat 8 Organ Penting Tikus setelah 30 Hari Perlakuan

Kelom	Hati	Jantung	Paru[2]	Limpa	Ginjal	Adrenal	Uterus	Ovarium
HPPKN	6.25±0.74	0.70±0.07	1.32±0.17	0.83±0.30	1.24±0.14	0.06±0.02	0.35±0.18	0.08±0.02
HPPKB	6.41±0.81	0.71±0.04	1.27±0.19	1.01±0.38	1.27±0.08	0.07±0.01	0.32±0.11	0.10±0.01
HPKGN	5.99±1.17	0.72±0.07	1.16±0.15	0.71±0.16	1.15±0.12	0.07±0.01	0.36±0.14	0.09±0.02
HPKGB	6.12±1.17	0.76±0.12	1.03±0.21	0.71±0.24	1.33±0.31	0.07±0.01	0.37±0.20	0.09±0.01
HPPHN	6.59±0.88	0.75±0.05	1.26±0.25	0.81±0.16	1.28±0.16	0.07±0.01	0.42±0.14	0.12±0.01
HPPHB	6.65±0.68	0.74±0.07	1.33±0.19	0.87±0.26	1.30±0.17	0.08±0.02	0.45±0.11	0.11±0.01
HPPPIN	6.73±0.71	0.77±0.06	1.27±0.14	0.74±0.05	1.45±0.12	0.70±0.05	0.49±0.18	0.11±0.02
HPPPIB	6.51±1.08	0.78±0.06	1.17±0.09	0.65±0.07	1.36±0.09	0.58±0.06	0.53±0.18	0.12±0.01
K Neg	5.82±0.48	0.66±0.08	1.17±0.30	0.68±0.10	1.55±0.34	0.33±0.05	0.37±0.20	0.08±0.03
K Cisp	5.63±0.72	0.66±0.09	1.07±0.08	0.66±0.17	1.47±0.36	0.29±0.05	0.36±0.07	0.08±0.02
Kolmogorov Smirnov	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal
Levenne	1.151	0.776	0.859	1.640	3.625	15.888	0.746	1.287
Signifikasi	0.352	0.639	0.568	0.137	0.002*	0.000**	0.665	0.274
ANOVA	0.524	0.157	0.207	0.220	0.184	0.148	0.493	0.015*

Tabel 7.4.
Rerata Indeks 8 Organ Penting Tikus setelah 30 Hari Perlakuan

Kel	Hati	Jantung	Paru[2]	Limpa	Ginjal	Adrenal	Uterus	Ovarium
HPPKN	0.035±0.002	0.004±0.000	0.007±0.000	0.005±0.001	0.007±0.000	0.000±0.000	0.002±0.000	0.000±0.000
HPPKB	0.034±0.002	0.004±0.000	0.007±0.001	0.005±0.002	0.007±0.001	0.000±0.001	0.002±0.001	0.000±0.000
HPKGN	0.034±0.002	0.005±0.001	0.007±0.000	0.004±0.000	0.007±0.001	0.000±0.001	0.002±0.000	0.000±0.000
HPKGB	0.037±0.005	0.005±0.000	0.006±0.000	0.004±0.001	0.008±0.000	0.000±0.000	0.002±0.001	0.000±0.000
HPPHN	0.035±0.004	0.004±0.000	0.007±0.001	0.004±0.000	0.007±0.001	0.000±0.001	0.002±0.000	0.000±0.000
HPPHB	0.036±0.003	0.004±0.000	0.007±0.000	0.004±0.001	0.007±0.000	0.000±0.000	0.002±0.000	0.000±0.000
HPPPIN	0.035±0.003	0.004±0.000	0.007±0.000	0.004±0.000	0.008±0.000	0.004±0.001	0.003±0.000	0.000±0.000
HPPPIB	0.003±0.005	0.004±0.000	0.006±0.000	0.004±0.000	0.007±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000	0.000±0.000
K Neg	0.032±0.005	0.003±0.001	0.006±0.001	0.004±0.000	0.009±0.002	0.002±0.002	0.002±0.001	0.000±0.000
K Cisp	0.030±0.002	0.005±0.000	0.007±0.000	0.004±0.000	0.008±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.000±0.000
Kolmo	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal	Distribusi Normal
Leven	2.026	1.669	1.203	2.285	3.235	18.591	0.949	0.601
Signify	0.061	0.129	0.320	0.036	0.005	0.000	0.495	0.789
ANOV	0.212	0.015*	0.417	0.258	0.374	0.130	0.622	0.086

7.6.1 Analisis Statistika Berat Organ (BO) dan Indeks Organ (IO)

Nilai Indeks Organ (IO) didapat dengan cara menghitung berat organ (BO) tertentu dibagi dengan bobot badan hewan itu sendiri. Nilai disajikan sebagai rerata ± SD. Nilai IO yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan uji lanjut post Hoc *Least Significance Difference* (LSD). Perbedaan dianggap bermakna secara statistik bila p <0,05 dan sangat bermakna jika p <0,01.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian hidrolisat protein tidak mempengaruhi berat organ, kecuali BO ovarium dan IO jantung kelompok perlakuan HPPKB, HPPHN dan HPPPIN. Hasil BO Ovarium kelompok HPPKB, HPPHN dan HPPPIN menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol Cisplatin, namun antara kelompok kontrol negatif dan kontrol Cisplatin juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

Efek nefrotoksisitas akibat induksi Cisplatin dilaporkan berhubungan jenis kelamin. Beberapa zat yang mengandung antioksidan tinggi, seperti delima dan vitamin E memiliki efek perlindungan terhadap nefrotoksisitas akibat Cisplatin pada tikus jantan, namun tidak memiliki efek pencegahan pada tikus betina. Hal

ini terkait dengan hormon wanita, estrogen. Estrogen dapat menginduksi stres oksidatif pada ginjal, yang justru menyebabkan toksik pada organ ginjal dan tidak melindungi nefron terhadap nefrotoksisitas akibat Cisplatin. (Arini, 2016; Jilankhi, 2014; Nematbakhsh, 2013; Pezeshki, 2013).

Indeks organ jantung antara kelompok kontrol negatif dan HPKGN, kelompok HPKGB menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini mungkin terkait dengan toksisitas organ jantung akibat pemberian Cisplatin (Yenita, 2012). Pada toksisitas jantung akibat Cisplatin dilaporkan terjadi miokarditis, perikarditis, dan angina Bano, 2013).

7.7. Parameter Histopatologis Ginjal Tikus

7.7.1 Prosedur Penelitian

Setelah pemberian perlakuan selama 30 hari, pada hari ke 30, semua tikus dibunuh. Semua organ ditimbang dan ginjal kanan dibuat menjadi preparat histopatologis dan dilihat di bawah mikroskop cahaya perbesaran 40 kali dari 5 bidang tampilan dengan parameter dan skor: Degenerasi tubulus bengkak keruh (*Cloudy Swelling*): 0 tidak ada; 1 *focal*; 2 tersebar. Nekrosis inti: 0 tidak ada; 1 focal; 2 tersebar. *Hyaline Cast*: 0 tidak ada; 1 *focal*; 2 tersebar.

Degenerasi tubulus bengkak keruh adalah gangguan metabolisme energi di dalam sel, terutama pada mekanisme transport aktif pada Na/K/ATPase sehingga sel tidak dapat memompa ion Na dari sel. Kondisi ini terjadi akibat Cisplatin, yang memiliki berat molekul ringan sehingga mudah disaring oleh glomerulus, dibawa oleh sel tubulus ginjal dan mencapai gradien tertinggi pada tubulus contortus proksimal ginjal. Nekrosis inti adalah degenerasi lebih lanjut, dengan kematian sel inti dimulai dengan gambaran piknotik ditunjukkan dengan kromatin inti yang mengental, karioeksis (pecah) kemudian kariolisis (hancur). Terjadi pelepasan hibrid karena

peradangan sel tubulus kemudian terjadi kebocoran protein dan sedimen seperti dikeluarkan (Dugbartey, *et al.*, 2016).

7.7.2 Analisis Sediaan Histopatologis Ginjal Tikus

Pertama dilakukan pembuatan sediaan histopatologis dari ginjal kanan tikus Wistar yang sudah diberi perlakuan selama 30 hari. Selanjutnya dari hasil sediaan histopatologis dilakukan interpretasi dan dilihat melalui mikroskop, dan dikonversi dalam bentuk skor. Dari skor median dari sediaan histopatologis ginjal tikus dilakukan uji statistik menggunakan Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), bermakna bila $p < 0,05$ dan sangat bermakna jika $p < 0,01$.

Masing-masing ginjal kanan tikus ditimbang, direndam dalam larutan formalin 1%, dengan pewarnaan hematoxylin-eosin untuk dibuat preparat histopatologis. Preparat histopatologis yang telah dibuat dianalisis menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 dan x 400 dan dilakukan interpretasi semi kuantitatif dengan penilaian sistem skor. Parameter yang digunakan untuk menilai adalah modifikasi dari sebuah studi di Jember, Jawa Timur, Indonesia (Arini, 2016). Tubulus kontortus proksimal dan distal diamati apakah terdapat degenerasi bengkak keruh (*cloudy swelling*), nekrosis inti dan degenerasi hyaline pada tubulus. Perbandingan kerusakan masing-masing kelompok dan hasil interpretasi dikonversi menjadi skor dan disimpulkan. Dari masing-masing kelompok, 3 preparat histopatologis ginjal tikus l diperiksa 3 parameter (degenerasi bengkak keruh (*cloudy swelling*), nekrosis inti dan degenerasi tubulus hyalin) dilihat pada lima bidang pandang dan hasilnya dicatat dalam bentuk skor antara 0-2. Berdasarkan nilai yang diperoleh, diambil nilai tengah (median). Hasil resume yang diperoleh dari masing-masing kelompok tercantum pada Tabel 3.

7.7.3 Prosedur Pewarnaan Haematoksilin-Eosin pada Sediaan Ginjal

Spesimen blok ginjal disiapkan dan dipotong pada posisi horizontal ginjal proksimal 1 x 0,5 x 0,5 cm^3 kemudian diikat dengan formalin 10% selama 3 hari untuk mempertahankan morfologi sel dan komposisi molekul. Kandungan air dalam spesimen tersebut didehidrasi menggunakan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut masing-masing selama 3 jam. Spesimen dimasukkan ke dalam parafin masing-masing selama 1 jam di inkubator pada suhu 60^0C dan selanjutnya dibiarkan pada suhu kamar. Blok parafin dipotong dengan mikrotom 5 irisan setiap blok dan direndam di air dingin dan hangat secara terpisah kemudian dilekatkan pada kaca objek. Sediaan dikeringkan dalam inkubator dan diwarnai dengan Hematoksilin Eosin dengan memasukkan kaca objek ke dalam larutan Hematoksilin selama 5 menit lalu dicuci dengan aquadest dan air mengalir selama 30 menit setelah itu dimasukkan ke dalam larutan Eosin selama 1 menit dan didehidrasi menggunakan alkohol 70%, 80%, 90% dan alkohol absolut. Hasil sediaan histopatologis tersebut dicuci dua kali dengan xylol.

7.7.4 Parameter Gambaran Histopatologis Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Cisplatin.

Parameter yang diperiksa adalah degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline cast*. Pada setiap kelompok diambil nilai median dari skor parameter untuk setiap kelompok perlakuan. Setelah median ditentukan, dilakukan uji homogenitas *Levene Statistic* dengan hasil p=0,00 dan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dengan hasil p=<0,05. Hasil dari skor degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline cast* menunjukkan hasil yang tidak homogen dan tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan analisis statistik menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis.*

Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline cast* menunjukkan nilai masing-

masing p = 0,007, p = 0,045 dan p = 0,026; nilai bermakna yang digunakan adalah α = 5%. Nilai p menunjukkan hasil bermakna, yang berarti terdapat minimal satu perlakuan yang berbeda. Berikutnya dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan α = 0,05 dengan batas kemaknaan p<0,05 dan sangat bermakna jika p<0,01.

7.7.4.1 Parameter Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh (Meilinah Hidayat, et al., 2018).

Tabel 7.5.
Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Tikus 1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2
Tikus 2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2
Tikus 3	0	0	1	1	1	0	1	1	0	2

Keterangan:

I : Hidrolisat protein kacang polong kuning Neutrase (HPPKN) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
II : Hidrolisat protein kacang polong kuning bromelain (HPPKB) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
III : Hidrolisat protein kacang gude Neutrase (HPKGN) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
IV : Hidrolisat protein kacang gude bromelain (HPKGB) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
V : Hidrolisat protein polong hijau Neutrase (HPPHN) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
VI : Hidrolisat protein polong hijau bromelain (HPPHB) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
VII : Hidrolisat protein *pea protein isolate* Neutrase (HPPPIN) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
VIII : Hidrolisat protein *pea protein isolate* bromelain (HPPPIB) 100mg/kgBB/hari selama 30 hari
IX : Kontrol negatif
X : Kontrol Cisplatin 10mg/kgBB (1x)

Hasil analisis statistika antara skor median kelompok 9 kontrol negatif dan 10 kelompok Cisplatin, kontrol positif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sahih. Hasil analisis antara kelompok 6 dengan kelompok 9 menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p>0,05$), hal ini menunjukkan bahwa kelompok HPPHB mempunyai efek menurunkan skor degenerasi bengkak keruh, sama dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok 1 dan 2 dibandingkan dengan kelompok 10 menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa gambaran degenerasi tubulus bengkak keruh pada kelompok HPPKN dan HPPKB mempunyai efek menurunkan skor degenerasi bengkak keruh namun lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

7.7.4.2 Parameter Nekrosis Inti (Meilinah Hidayat, et al, 2018).

Tabel 7.6.
Skor Median Nekrosis Inti dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Tikus 1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	2
Tikus 2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2
Tikus 3	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2

Hasil analisis statistika antara skor median kelompok 9 kontrol negatif dan 10 kelompok Cisplatin, kontrol positif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sahih. Hasil semua kelompok perlakuan berbeda sangat bermakna dengan kelompok Cisplatin (($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan mempunyai efek menurunkan skor nekrosis inti. Akan tetapi nilai skor kelompok 1, 2, 3, 4, 5, 7 dan 8 namun lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hasil analisis antara kelompok 6 dengan

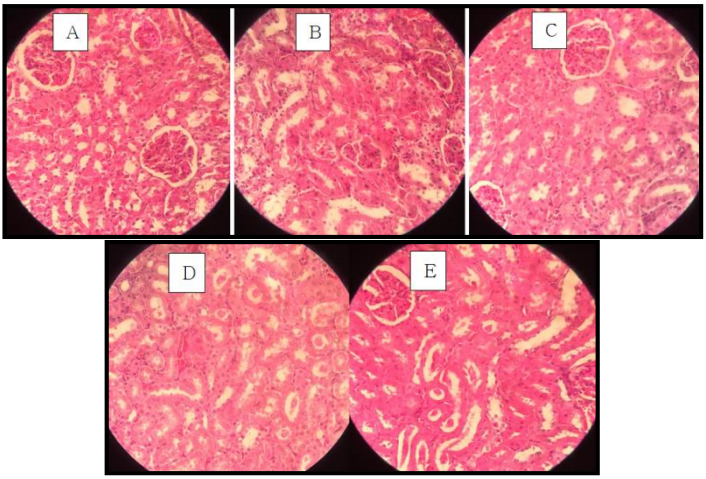
kelompok 9 menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna (p>0,05), hal ini menunjukkan bahwa kelompok HPPHB mempunyai efek menurunkan skor nekrosis inti, sama dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun.

7.7.4.3 Parameter *Hyaline Cast*

Tabel 7.7.
Skor Median *Hyaline Cast* dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan									
	I	**II**	**II**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**	**X**
Tikus 1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	2
Tikus 2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Tikus 3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2

Hasil analisis statistika antara skor median kelompok 9 kontrol negatif dan 10 kelompok Cisplatin, kontrol positif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna (p<0,01). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sahih. Hasil semua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna dengan kelompok Cisplatin ((p<0,01). Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan mempunyai efek menurunkan skor *hyaline cast*. Akan tetapi nilai skor kelompok 2, 4, 5, 7 dan 8 namun lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hasil analisis antara kelompok 1, 3 dan 6 dengan kelompok 9 menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna (p>0,05), hal ini menunjukkan bahwa kelompok HPPKN, HPKGN, dan HPPHB mempunyai efek menurunkan skor *hyaline cast*, sama dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun..



Gambar 7.6.
Gambaran Sediaan Histopatologis Ginjal Berdasarkan 3 Parameter

A. Skor Degenerasi Bengkak Keruh, Nekrosis inti dan *Hyaline Cast* = 0,
B. Degenerasi Bengkak Keruh = 1,
C. Nekrosis inti = 1,
D. *Hyaline Cast* = 1,
E. Degenerasi Bengkak Keruh, Nekrosis inti dan *Hyaline Cast* = 2.

Pada penelitian ini terjadi degenerasi tubulus bengkak keruh pada ginjal tikus karena Degenerasi bengkak keruh adalah bentuk degenerasi paling ringan dan reversibel karena jejas yang terjadi masih belum parah. Cisplatin memiliki berat molekul yang rendah sehingga mudah di filtrasi oleh glomerulus, dialirkan melalui sel-sel tubulus ginjal dan mencapai gradien tertinggi pada tubulus kontortus proksimal. Hal ini berdampak pada gangguan metabolisme energi dalam sel, terutama mekanisme transpor aktif pada Na^+/K^+ ATPase sehingga sel tidak mampu memompa ion Na keluar sel. Penumpukan albumin di sitoplasma terlihat keruh dan bengkak, paling sering ditemukan pada sel tubulus ginjal. Kondisi seperti ini selain

disebabkan oleh Cisplatin dapat akibat keadaan demam, anoksia, gizi buruk, dan keracunan.

Pada proses kerusakan lebih lanjut, konsentrasi klorida dalam sel menurun, ikatan klorida dari cisplatin terganggu, dan bagian yang kosong terisi oleh molekul air dari sitoplasma sel sementara ikatan pada Cisplatin menjadi sangat reaktif. Cisplatin reaktif dapat dengan mudah mengikat *guanine* dari DNA sel ginjal yang pecah. Kondisi ini merangsang gen p53 untuk mendeteksi kerusakan DNA. Sel yang tidak dapat diperbaiki oleh gen p53 akan diapoptosis dan menyebabkan nekrosis. (Dugbartey, 2010; Yenita dan Aswiyanti, 2012).

Nekrosis inti yang terjadi dimulai dari piknosis yang ditandai kromatin inti menebal kemudian karioeksis dan kariolisis. *Hyaline cast* yang terbentuk karena adanya inflamasi sel tubulus ginjal yang berlangsung lama sehingga terjadi kebocoran protein (Dugbartey, 2010).

Pada penelitian ini, HPPHB menunjukkan gambaran histopatologis ginjal yang baik pada tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin.

7.8. Parameter Fungsi Ginjal

Gambar 7.7.
Pengambilan Darah Tikus, disentrifuge 6000 rpm selama 10 menit *(Dokumentasi Pribadi)*

Pada tikus yang sudah dibunuh darah diambil secara intra kardial selanjutnya disentrifuge 6000 rpm selama 10 menit dan didapat serumnya. Serum darah tikus diperiksa menggunakan metode Fotometri dengan alat COBAS ROCHE 311.

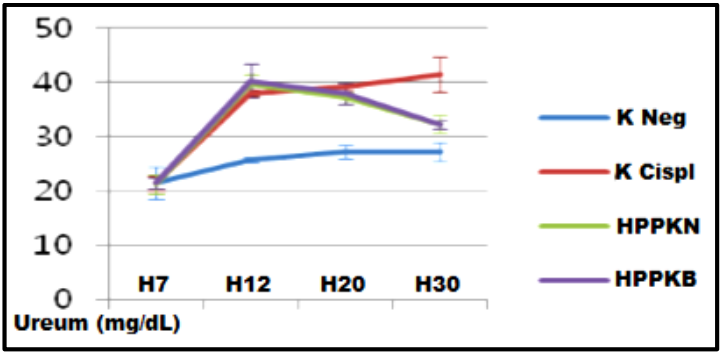
7.8.1 Pemeriksaan Kadar Ureum (Meilinah Hidayat, *et al,* 2018).

Serum darah tikus diperiksa kadar ureum menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 4 kali yaitu pada hari ke 7,12, 20 dan 30. Hasil pengukuran rerata kreatinin, ditunjukkan pada Gambar 7.8, 7.9, 7.10, dan 7.11 yang membandingkan masing-masing jenis hidrolisat protein dengan Neutrase atau Bromelain, dengan kontrol Negatif dan kontrol Cisplatin:

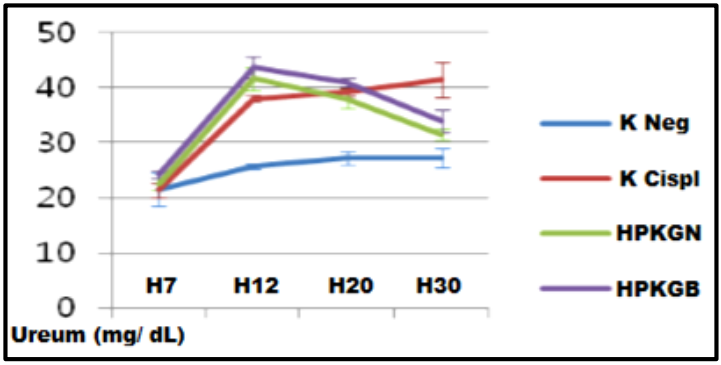
Tabel 7.8.
Rerata Kadar Ureum Tikus yang Diinduksi Cisplatin Sesudah Diberi Perlakuan

Kelompok		H7	SD	H12	SD	H20	SD	H30	SD
1	HPPKN	21.2	1.72	39.6	1.85	37	1.10	32.2**	1.60
2	HPPKB	21.4	1.02	40.2	3.12	38	2.00	32.2**	0.75
3	HPKGN	22.4	1.02	41.6	2.15	37.8	1.72	31.4**	1.02
4	HPKGB	24.2	0.75	43.6	1.96	40.8	0.75	34**	2.00
5	HPPHN	23.0	0.63	43.2	2.32	40.4	1.20	33**	1.41
6	**HPPHB**	**21.2**	**3.76**	**37.4**	**5.00**	**35.2****	**3.71**	**30.6****	**2.58**
7	HPPPIN	21.4	2.50	39.4	4.96	37.2	4.71	31.2**	2.56
8	HPPPIB	20.6	2.06	38.4	3.44	36.0	2.97	30.8**	1.72
9	Neg K	21.4	3.01	25.6	0.49	27.2**	1.17	27.2**	1.72
10	Cispl K	21.4	1.36	38.0	0.63	39.2	0.75	41.4	3.26

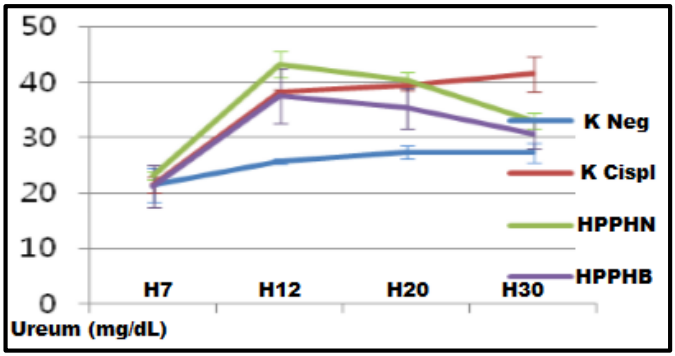
Harga Normal BUN: 9-21 mg/dL
H7 : Pengukuran kadar Ureum pertama sebelum induksi Cisplatin
H12 : Pengukuran kadar Ureum kedua sesudah 5 hari induksi Cisplatin
H20 : Pengukuran kadar Ureum ke tiga sesudah 12 hari induksi Cisplatin
H30 : Pengukuran kadar Ureum ke empat sesudah 23 hari induksi Cisplatin
****** Berbeda sangat bermakna dengan kelompok Cisplatin



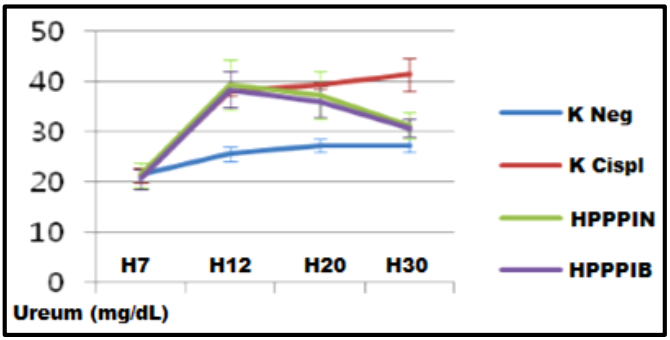
Gambar 7.8.
Rerata Kadar Ureum setelah Pemberian HPPKN dan HPPKB



Gambar 7.9.
Rerata Kadar Ureum setelah Pemberian HPKGN dan HPKGB



Gambar 7.10.
Rerata Kadar Ureum setelah Pemberian HPPHN dan HPPHB



Gambar 7.11.
Rerata Kadar Ureum setelah Pemberian HPPPIN dan HPPPIB

Hasil pengukuran rerata ureum, pada H7 tidak ada perbedaan yang bermakna pada semua kelompok (p = 0,379). Hasil analisis ANOVA pada H12, H20 dan H30 terdapat perbedaan bermakna (p = 0.000), (p = 0.000), (p = 0.000), masing-masing. Semua kelompok perlakuan pada H30 memiliki perbedaan yang sangat bermakna dengan kelompok kontrol Cisplatin (p = 0.000), dan pada H30 tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol negatif (p>0,05). Kadar ureum terendah pada H12, H20 dan H30 ditunjukkan oleh kelompok 6 (HPPHN).

7.8.2. Pemeriksaan Kadar Kreatinin (Meilinah Hidayat, *et al.*, 2018)

Serum darah tikus diperiksa kadar kreatinin menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 4 kali yaitu pada hari ke 7, 12, 20 dan 30. Hasil pengukuran rerata kreatinin, ditunjukkan pada Gambar 7.12, 7.13, 7.14, 7.15 yang membandingkan masing-masing jenis hidrolisat protein dengan Neutrase atau Bromelain, dengan kontrol Negatif dan kontrol Cisplatin:

Tabel 7.9.

Rerata Kadar Kreatinin Tikus yang diinduksi Cisplatin sesudah diberi Perlakuan

Kelompok		H7	SD	H12	SD	H20	SD	H30	SD
1	HPPKN	0.510	0.03	0.916	0.08	0.872	0.06	0.808**	0.04
2	HPPKB	0.542	0.02	0.948	0.08	0.914	0.08	0.826**	0.05
3	HPKGN	0.536	0.04	0.968	0.05	0.942	0.05	0.828**	0.04
4	HPKGB	0.612	0.01	0.982	0.06	0.940	0.05	0.838**	0.06
5	PHKHN	0.546	0.01	1.008	0.05	0.934	0.05	0.810**	0.06
6	**PHKHB**	**0.480**	**0.08**	**0.904**	**0.15**	**0.838****	**0.12**	**0.754****	**0.07**
7	HPPPIN	0.482	0.06	0.944	0.12	0.920	0.13	0.798**	0.10
8	HPPPIB	0.470	0.05	0.906	0.08	0.854**	0.08	0.762**	0.04
9	Neg K	0.76	0.06	0.692**	0.03	0.784**	0.02	0.738**	0.05
10	Cispl K	0.512	0.06	0.940	0.02	0.968	0.03	0.986	0.08

Harga Normal Kreatinin Tikus: 0,05 ─ 0,65 mg/dL

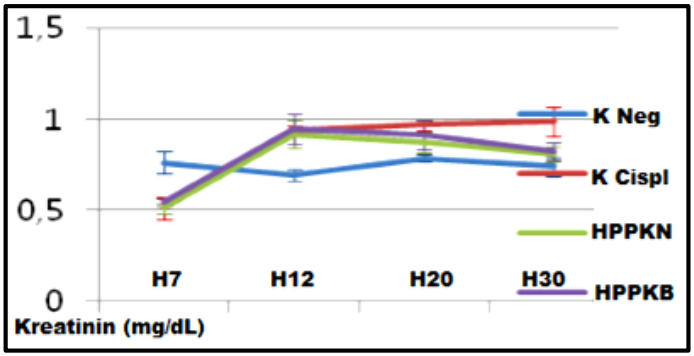
H7 : Pengukuran kadar Ureum pertama sebelum induksi Cisplatin

H12 : Pengukuran kadar Ureum kedua sesudah 5 hari induksi Cisplatin

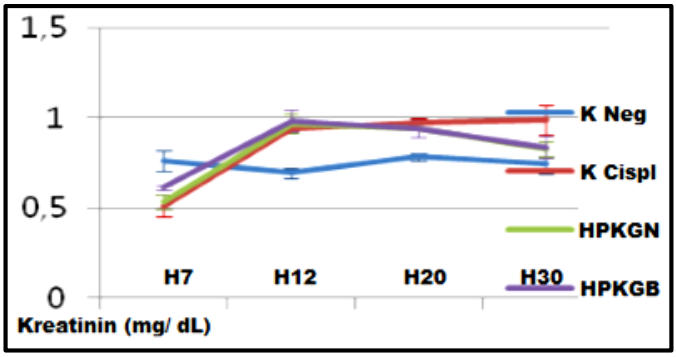
H20 : Pengukuran kadar Ureum ke tiga sesudah 12 hari induksi Cisplatin

H30 : Pengukuran kadar Ureum ke empat sesudah 23 hari induksi Cisplatin

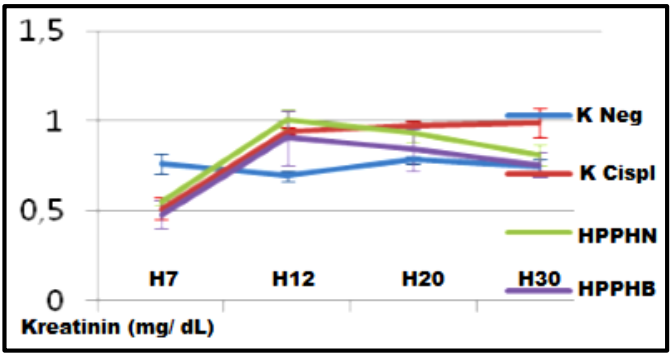
****** Berbeda sangat bermakna dengan kelompok Cisplatin



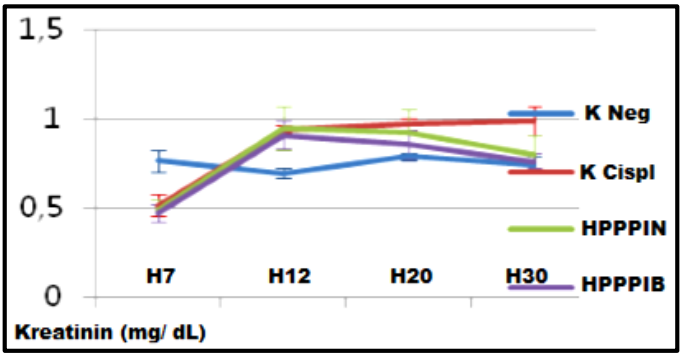
Gambar 7.12.
Rerata Kadar Kreatinin setelah Pemberian HPPKN dan HPPKB



Gambar 7.13.
Rerata Kadar Kreatinin setelah Pemberian HPKGN dan HPKGB



Gambar 7.14.
Rerata Kadar Kreatinin setelah Pemberian HPPHN dan HPPHB



Gambar 7.15.
Rerata Kadar Kreatinin setelah Pemberian HPPPIN dan HPPPIB

Hasil pengukuran rerata kreatinin, pada H7, H12, H20 dan H30 terdapat perbedaan bermakna hasil ANOVA (p = 0,003), (p = 0,000), (p = 0,030), (p = 0,000). Pada H20 hanya kelompok 6 (HPPHN) yang menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna terhadap kelompok kontrol Cisplatin (p = 0,00). Semua kelompok perlakuan di H30 memiliki kadar kreatinin yang berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Cisplatin (p = 0,00). Kadar kreatinin terendah pada H12, H20 dan H30 ditunjukkan oleh kelompok 6 (HPPHB).

Hasil terendah dalam parameter fungsi ginjal (baik ureum dan kreatinin) tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin, ditunjukkan oleh kelompok 6 yang diberi hidrolisat protein kacang polong hijau yang di hidrolisis oleh bromelain (HPPHB). Hasil pengukuran ureum dan kreatinin pada kelompok tersebut pada minggu keempat adalah 30,6 mg/dL dan 0,754 mg/dL, berturut-turut.

7.8.3. Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total

Serum darah tikus diperiksa menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 2 kali yaitu pada hari ke 12 dan ke 30 dengan prinsip spektrofotometri, menggunakan enzim *Cholesterol-oxidasephenol aminophenazone* (CHOD-PAP). Hasil Rerata Kadar Kolesterol Total Serum Tikus pada Hari ke-12 dan ke-30 dapat dilihat pada table 7.10 di bawah ini.

Tabel 7.10.
Rerata Kadar Kolesterol Total Serum Tikus pada Hari ke-12 dan ke-30

Perlakuan	Rerata H_{12}	SD H_{12}	Rerata H_{30}	SD H_{30}	F hitung	p Value
HPPKN	61,80	3,114	55,80	3,768	4,019	0,001
HPPKB	61,60	3,647	56,60	3,647	(H 12)	
HPKGN	70,40	8,081	62,00	8,832		
HPKGB	65,20	2,168	59,40	3,130		
HPPHN	70,20	7,918	62,80	6,760		
HPPHB	70,40	4,827	60,20	5,450		
PHPPPIN	72,40	6,986	63,40	6,504	4,019	0,001
PHPPPIB	71,00	3,808	65,00	3,082	(H30)	
Kontrol Negatif	60,60	1,140	63,60	3,362		
K Cisplatin	73,00	6,892	73,60	6,107		

Harga Normal Kolesterol Tikus: 20-92 mg/dL (Giknis, M.L.A., 2008)

Dari hasil rerata kadar kolesterol total serum tikus setelah tikus diinduksi Cisplatin pada hari ke-7, pada hari ke 12 didapatkan kelompok yang paling rendah kadar kolesterolnya adalah HPPKB dan pada hari ke-30 didapatkan kelompok yang paling rendah kadar

kolesterolnya adalah kelompok HPPKN. Hasil uji normalitas data menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan peningkatan data kolesterol total serum berdistribusi normal ($p>0,05$). Hasil penelitian pada uji statistik ANAVA menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan pada hari ke-12 dan hari ke-30 ($p<0,01$). Pada hari ke-12 kelompok Cisplatin dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif didapatkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian induksi Cisplatin terbukti merusak ginjal yang selanjutnya meningkatkan kadar kolesterol total serum tikus Wistar. Hasil kelompok HPPKN dan HPPKB yang dibandingkan dengan kontrol Cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$) sedangkan kelompok HPKGN, HPPHN, HPPHB, PHKPIN, PHKPIB dibandingkan dengan kelompok kontrol Cisplatin menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian hidrolisat HPPKN & HPPKB berefek dalam menjaga kadar kolesterol total serum tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin. Disimpulkan bahwa pemberian hidrolisat protein kacang polong kuning, dengan enzim Neutrase dan bromelain pada hari ke-12 berefek paling baik dalam menurunkan kadar kolesterol total serum tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin.

Pada hari ke-30 perbandingan kelompok Cisplatin dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Semua kelompok perlakuan yang diberi 8 jenis hidrolisat protein dibandingkan kelompok Cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Disimpulkan bahwa pemberian hidrolisat protein kacang polong kuning, kacang gude, kacang polong hijau, kacang polong isolat dengan enzim Neutrase dan bromelain menurunkan kadar kolesterol total serum pada tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin.

7.8.4. Pemeriksaan Kadar HDL

Serum darah tikus diperiksa menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 2 kali yaitu pada hari ke 12 dan ke 30 dengan prinsip spektrofotometri, menggunakan enzim *Cholesterol-oxidasephenol aminophenazone* (CHOD-PAP). Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel 7.11 berikut ini.

Tabel 7.11.
Rerata Kadar HDL pada Hari ke-12 dan ke-30

Perlakuan	Rerata H_{12}	SD H_{12}	Rerata H_{30}	SD H_{30}	F hitung	p Value
HPPKN	11,20	1,483	11,80	0,837	23,762	0,001
HPPKB	10,60	1,713	12,40	0,843		
HPKGN	11,80	1,464	14,00	0,775		
HPKGB	11,60	1,789	13,60	1,536		
HPPHN	11,60	0,764	13,20	1,225		
HPPHB	12,20	2,458	14,40	1,495		
PHKPIN	10,60	0,907	12,00	1,035		
PHKPIB	11,60	1,033	12,40	1,215		
Kontrol negatif	12,00	0,405	10,80	0,495		
K Cisplatin	11,41	0,639	12,00	0,904		

Kelompok yang diberikan hidrolisat protein kacang polong hijau dengan enzim bromelain menunjukkan hasil yang paling baik dalam meningkatkan kadar HDL. Rerata kadar HDL serum hari ke-12 adalah 12,20 dan hari ke-30 adalah 14,40.

Hasil uji statistik ANAVA satu arah didapatkan hasil yang sangat bermakna ($p<0,05$) antar kelompok. Uji statistik lebih lanjut dengan uji beda rata-rata metode Tukey's HSD menunjukkan kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan. Analisis statistik hasil rerata kadar HDL serum kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna dengan kontrol Cisplatin ($p<0,01$).

Kelompok kontrol Cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna dengan HPKGN, HPKGB, HPPHN, dan HPPHB ($p<0,01$) namun berbeda tidak bermakna ($p>0,05$) dengan kelompok HPPKN, HPPHB, PHKPIN, dan PHKPIB, berarti dengan pemberian kacang gude dan kacang polong hijau menggunakan enzim Neutrase dan bromelain terbukti dapat meningkatkan kadar HDL serum lebih baik dibandingkan kacang polong kuning dan protein isolat kacang polong menggunakan enzim Neutrase dan bromelain.

Hidrolisat protein kacang polong dan kacang gude diberikan sejak awal penelitian yaitu hari ke-1 sampai hari ke-30, dimaksudkan untuk mengetahui efek protektifnya terhadap ginjal.

Hidrolisat protein kacang polong mempunyai banyak khasiat, seperti antimikrobial, penurunan tekanan darah (efek ACE inhibitor), penurunan kadar kolesterol, anti trombotik, aktivitas antioksidan, peningkatan penyerapan atau bioavailabilitas mineral, imunomodulator, dan aktivitas opioid. Famili *Fabaceae*, yang dikenal sebagai biji legume bermanfaat untuk pencegahan hiperkolesterolemia dan hipertensi (Aluko, 2015). Manfaat Legume dapat berkurang akibat pengaruh beberapa faktor seperti degradasi bioaktif peptida aktif saat dicerna, atau tidak diabsorpsi, atau tidak mencapai jaringan target (Li, 2011).Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme dan komponen efektif yang terdapat pada legume.

7.8.5. Pemeriksaan Kadar LDL

Serum darah tikus diperiksa menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 2 kali yaitu pada hari ke 12 dan ke 30 dengan prinsip spektrofotometri, menggunakan enzim *Cholesterol-oxidasephenol aminophenazone* (CHOD-PAP). Hasil pemeriksaan kadar LDL dapat dilihat pada tabel 7.12 di bawah ini.

Tabel 7.12.

Rerata Kadar LDL Serum pada Hari ke-12 dan ke-30

Perlakuan	Rerata H_{12}	SD H_{12}	Rerata H_{30}	SD H_{30}	F hitung	p Value
HPPKN	38,20	2,280	34,20	1,304	4,212	0,001
HPPKB	38,20	4,087	35,00	2,550	(H 12)	
HPKGN	46,60	10,114	39,20	7,727		
HPKGB	43,20	3,271	38,00	1,581		
HPPHN	43,80	9,149	38,60	6,107		
HPPHB	45,80	4,817	39,60	4,658		
HPPPIN	51,80	4,817	44,60	4,722	7,472	0,001
HPPPIB	45,60	2,302	42,60	3,578	(H 30)	
K Negatif	39,20	1,304	42,20	3,271		
K Cisplatin	51,60	6,107	53,00	4,416		

Hasil uji statistik ANAVA terhadap rerata kadar LDL menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, baik pada hari ke-12 dan hari ke-30 ($p<0,05$). Uji statistik dilanjutkan dengan uji lanjut beda rata-rata LSD. Pada hari ke-12, antara kelompok cisplatin dibandingkan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Induksi cisplatin terbukti menyebabkan peningkatan kadar LDL tikus Wistar. Pemberian HPPKN dan HPPKB dibandingkan dengan kelompok cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,05$). Pemberian HPKGN, HPKGB, HPPHN, HPPHB, HPPPIN, HPPPIB tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p>0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol cisplatin. Hal ini disebabkan pada hari ke-12 tikus belum diberi hidrolisat protein, sehingga belum terjadi perbaikan terhadap kadar LDL serum tikus Wistar yang diinduksi cisplatin.

Pada hari ke-30, tikus yang diinduksi cisplatin dibandingkan dengan kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan induksi cisplatin memang

merusak fungsi ginjal sehingga meningkatkan kadar LDL tikus Wistar. Hasil pemeriksaan LDL serum tikus Wistar yang diberi HPPKN, HPPKB, HPKGN, HPKGB, HPPHN, HPPHB menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna bila dibandingkan dengan kontrol cisplatin ($p<0,01$). Kadar LDL serum tikus Wistar yang diberikan HPPPIN dan HPPPIB menunjukkan perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kontrol cisplatin ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa semua pemberian hidrolisat protein memiliki efek menurunkan kadar LDL serum tikus Wistar yang diinduksi cisplatin.

Rerata kadar LDL serum tikus Wistar betina pada hari ke-12 dan hari ke-30 yang paling rendah pada kelompok HPPKN meskipun secara statistik tidak berbeda bermakna dengan kelompok HPPKB.

Target utama obat anti hipertensi dari peptida adalah renin dan *angiotensin converting enzyme* (ACE). Fraksi hidrolisat protein yang paling penting terdiri dari peptida dengan berat molekul kecil (<3 kDa); fraksi ini merupakan inhibitor renin dan ACE yang jauh lebih efektif daripada peptida dengan berat molekul besar. Usaha pemurnian hidrolisat protein telah berhasil memroduksi peptida yang mampu menghambat aktivitas renin dan ACE selain menurunkan tekanan darah yang terbukti secara *in vivo* pada hewan coba. Banyak dasar teori yang menjelaskan mekanisme aktivitas peptida tetapi umumnya peptida dengan berat molekul kecil, seperti proline, asam amino rantai cabang dan asam amino aromatik memiliki aktivitas renin dan ACE inhibitor yang kuat (Aluko, 2015).

Protein isolate merupakan bentuk protein yang dimurnikan dan digunakan secara luas dalam proses formulasi pangan untuk menghasilkan sifat fungsional yang diinginkan dalam produksi pangan. *Pea protein isolate* akan meningkatkan reseptor LDL sehingga menyebabkan *hypolipidemia*. Data tentang efek penurun lipid dari protein kacang polong telah ada namun hasilnya masih kontroversial dan mekanisme kerjanya belum sepenuhnya dipahami.

Hidrolisat protein kacang tampaknya memengaruhi homeostasis lipid di tingkat seluler dengan dua cara; yang pertama dengan cara mengaktifkan gen yang terlibat dalam pengambilan kolesterol hepatik dan yang kedua, dengan cara meregulasi gen yang menyintesis asam lemak (Rigamonti et al, 2010).

Protease dapat menurunkan kadar lemak darah dengan cara mengekspresikan *low density lipoprotein* (LDL) reseptor sehingga meningkatkan *uptake* dan degradasi dari LDL (Udenigwe & Aluko, 2012).

7.8.6. Pemeriksaan Kadar Trigliserida

Serum darah tikus diperiksa menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 2 kali yaitu pada hari ke 12 dan ke 30 dengan prinsip spektrofotometri, menggunakan enzim Glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone (GPO-PAP).Hasil pemeriksaan kadar Trigliserida dapat dilihat pada tabel 7.13 di bawah ini

Tabel 7.13.
Rerata Kadar Trigliserida Serum Tikus pada Hari ke-12 dan ke-30

Perlakuan	Rerata H_{12}	SD H_{12}	Rerata H_{30}	SD H_{30}	F hitung	p Value
HPPKN	48,60	1,342	43,20	1,643	4,212	0,001
HPPKB	48,60	4,159	43,60	2,881	(H12)	
HPKGN	56,60	5,857	48,20	5,450		
HPKGB	53,80	1,643	48,40	2,510	8,199	0,000
HPPHN	55,00	7,517	48,80	6,760	(H30)	
HPPHB	55,00	3,082	47,20	3,114		
HPPPIN	58,00	5,292	52,20	5,404		
HPPPIB	57,00	4,743	51,20	2,588		
Kontrol Negatif	48,80	2,490	51,40	2,510		
K Cisplatin	63,20	9,338	62,80	6,380		

Harga Normal Trigliserida Tikus: 27-108 mg/dL

Hasil penelitian pada uji statistik ANAVA menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan pada hari ke-12 dan hari ke-30 ($p<0,01$). Uji statistik dilanjutkan dengan uji beda rata-rata Tukey's HSD untuk menunjukkan kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan. Pada hari ke-12, kelompok Cisplatin dibandingkan kelompok negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Induksi Cisplatin terbukti menyebabkan peningkatan kadar trigliserida tikus Wistar. Pemberian HPPKN dan HPPKB (kelompok 1 dan 2) dibandingkan dengan kelompok Cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Pemberian HPKGN, HPKGB, HPPHN, HPPHB, HPPPIN, dan HPPPIB menurunkan kadar trigliserida namun tidak berbeda bermakna ($p>0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Pemberian hidrolisat protein pada hari ke-12 belum menunjukkan efek terhadap kadar trigliserida serum tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin.

Pada hari ke-30, kelompok tikus yang diinduksi Cisplatin dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Kadar trigliserida serum tikus Wistar yang diberi HPPKN, HPPKB, HPKGN, HPKGB, HPPHN, HPPHB, HPPPIN, dan HPPPIB menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna bila dibandingkan dengan kontrol Cisplatin ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa semua hidrolisat protein kacang polong dan kacang gude mampu menurunkan kadar trigliserida serum tikus Wistar yang diinduksi Cisplatin. Rerata kadar trigliserida serum tikus Wistar hari ke-30 yang paling rendah pada kelompok HPPKN walaupun hasil analisis statistika menunjukkan tidak berbeda bermakna dengan kelompok hidrolisat protein yang lain.

Pada uji t berpasangan kelompok kontrol Cisplatin antara hari ke 12 dan hari 30 tidak menunjukkan penurunan kadar trigliserida serum yang bermakna ($p>0,05$), demikian juga kontrol

negatif. Pemberian semua jenis hidrolisat protein kacang polong dan kacang gude menunjukkan penurunan kadar trigliserida serum yang bermakna (p<0,05). Kelompok yang diberikan HPPHB menunjukkan penurunan yang paling bermakna (p=0,000).

Hidrolisat protein kacang polong meningkatkan produksi COX-1 dalam ginjal, yang dapat menyebabkan dilatasi pembuluh darah dan memperbaiki kemampuan ginjal dalam memfiltrasi darah dan memproduksi urine. Menurut Hörl, Perbaikan fungsi ginjal dapat mencegah kehilangan albumin, penurunan produksi lipoprotein dan trigliserida (Hörl, 2010).

7.8.7. Pemeriksaan Kadar Asam Urat

Serum darah tikus diperiksa menggunakan alat COBAS ROCHE 311 dilakukan 2 kali yaitu pada hari ke 12 dan ke 30 dengan prinsip spektrofotometri. Hasil pemeriksaan rerata kadar asam urat dapat dilihat pada tabel 7.14 berikut.

Tabel 7.14.
Rerata Kadar Asam Urat Serum Hari ke-12 dan ke-30

Perlakuan	Rerata H_{12}	SD H_{12}	Rerata H_{30}	SD H_{30}	F hitung	p Value
HPPKN	3,64	0,34351	3,32	0,22804	4,127	0,001
HPPKB	3,60	0,29155	3,20	0,18708	(H 12)	
HPKGN	3,18	0,08367	2,94	0,05477		
HPKGB	3,38	0,29496	3,04	0,15166		
HPPHN	3,68	0,37014	3,28	0,37014		
HPPHB	3,60	0,24495	3,14	0,11402		
HPPPIN	3,34	0,11402	3,14	0,18166	4,127	0,001
HPPPIB	3,28	0,32711	2,94	0,20736	(H30)	
K Negatif	3,18	0,19235	3,24	0,20702		
K Cisplatin	3,62	0,26833	3,64	0,32094		

Harga Normal Asam Urat Tikus: 0,8-4,4 mg/dL

Hasil uji statistik ANAVA satu arah terhadap rerata kadar asam urat menunjukkan hasil yang sangat bermakna ($p<0,01$). Uji statistik dilanjutkan dengan uji beda rata-rata Post Hoc LSD untuk menunjukkan kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan.

Pemberian semua jenis hidrolisat protein kacang polong dan kacang gude menyebabkan penurunan kadar asam urat pada hari ke 30. Kelompok HPPKB, HPKGN, HPKGB, HPPHB, HPPPIN, dan HPPPIB dibandingkan dengan kelompok kontrol cisplatin menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Kelompok HPPKN dan HPPHN dibandingkan dengan kontrol cisplatin menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hal ini berarti pemberian kacang polong kuning dengan enzim bromelain, kacang gude dengan enzim neutrase, kacang gude dengan enzim bromelain, kacang polong hijau dengan enzim bromelain, pea protein isolate dengan enzim neutrase, dan pea protein isolate dengan enzim bromelain menurunkan kadar asam urat serum lebih baik dibandingkan kacang polong kuning dengan enzim neutrase dan kacang polong hijau dengan enzim neutrase.

Pada uji t berpasangan, kelompok PHYPN, PHYPB, PHGBN, PHGBB, PHGPN, PHGPB antara kadar asam urat serum antara hari ke-12 dan hari ke-30 menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$), sedangkan kelompok HPPPIN dan HPPPIB menunjukkan hasil yang bermakna ($p<0,05$). Hal ini berarti pemberian semua jenis hidrolisat protein mempunyai efek menurunkan kadar asam urat serum.

Penelitian menunjukkan bahwa kacang polong hijau maupun kuning mempunyai efek nefroprotektif. Hidrolisat protein dari kacang polong mempunyai efek antioksidan dan inhibisi terhadap *angiotensin I-converting enzyme* (ACE). ACE adalah enzim yang mengkonversi angiotensin I menjadi angiotensin II yang menghasilkan efek vasokontriksi sehingga terjadi peningkatan tekanan darah, inhibisi dari enzim ini mengakibatkan penurunan

tekanan darah dan vasodilatasi sehingga terjadi peningkatan aliran darah ginjal, dan aliran nutrisi ke ginjal meningkat sehingga fungsi ginjal membaik. Kadar asam urat serum yang tinggi terdapat pada pasien penderita PGK karena asam urat tidak diekskresikan dengan baik oleh ginjal, dengan membaiknya fungsi ekskresi ginjal akan menurunkan kadar asam urat (Li, 2011; Aluko, 2015).

7.9. Parameter ANP, COX-1 dan Renin

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSHS 19 April 2018. Hipotesis mekanisme hidrolisat protein kacang polong dalam menurunkan tekanan darah adalah dengan merangsang produksi COX-1 (cyclooxygenase-1), sebuah protein yang dapat meningkatkan fungsi ginjal (Li et al., 2011). Protein ini bekerja sama dengan penghambat *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) obat anti-hipertensi. Akan tetapi zat aktif dalam kacang polong ini masih belum diselidiki. Di sisi lain, dalam tahap pemanfaatan, hasil menunjukkan bahwa kacang kuning dalam keadaan alami tidak memberikan manfaat kesehatan yang sama dengan ekstrak hidrolisat protein kacang kuning. Bioaktif peptida dalam protein harus dilepaskan dari protein utama dengan perlakuan khusus. PGK terkait erat dengan diabetes dan tekanan darah tinggi atau hipertensi. Natriuretik peptida telah terbukti memiliki efek menguntungkan pada hipertensi dan ekspansi volume plasma. Penelitian tentang fungsi fisiologis dan patofisiologi peptida natriuretik dan implikasinya sedang dipelajari secara ekstensif untuk pengobatan pasien dengan penyakit kardiovaskular yang terkait dengan PGK (Levin, Gardner, & Samson, 1998). Kadar *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP) plasma meningkat pada pasien PGK yang parah dengan fungsi ginjal yang memburuk, tetapi hubungan antara tingkat plasma ANP dan kerusakan CKD masih perlu diselidiki. Hal ini kemungkinan terjadi mekanisme kompensasi tubuh. Efek perlindungan dari ANP pada

ginjal karena ANP telah secara eksperimental terbukti menghambat proliferasi sel mesangial dan fibrosis ginjal (Ogawa, *et al.*, 2015).

Peningkatan sistem Renin (Renin-Angiotensin system = RAS) dikaitkan dengan perkembangan kerusakan ginjal. Sekitar 80% pasien PGK mengalami hipertensi, dan gangguan fungsi ginjal dan tekanan darah; dan ini terkait dengan kondisi fisiologis dan patologis dari Renin dan ACE dalam "lingkaran setan"(Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab,A., Pestana, 2015).

7.9.1. Pembuatan Homogenat Ginjal Tikus

Bahan: Ginjal tikus Wistar yang sudah diberi perlakuan selama 30 hari, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), larutan penyangga yang umum digunakan dalam penelitian biologi, karena bersifat isotonis dan tidak toksik terhadap hampir semua sel hidup. PBS adalah larutan garam berbasis air yang mengandung disodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), dan natrium klorida (NaCl), dalam beberapa formulasi ditambahkan kalium klorida (KCl) dan kalium di hidrogen fosfat (KH_2PO_4). Buffer membantu menjaga pH tetap konstan. Konsentrasi osmolaritas dan konsentrasi ionnya sesuai dengan cairan tubuh manusia (isotonis).

7.9.2. Alat Pemeriksaan

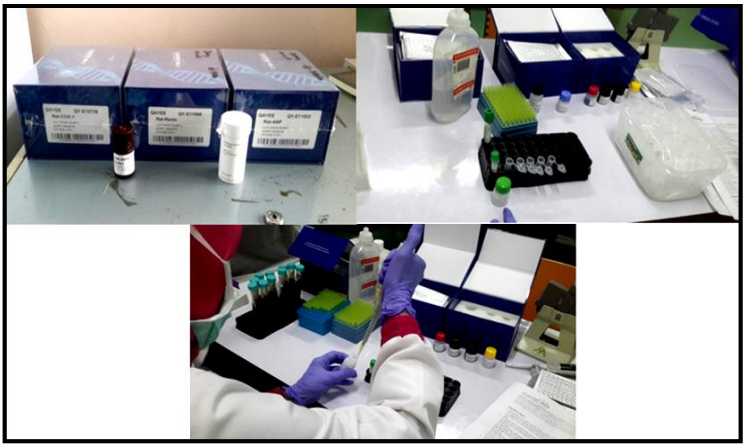
Mincer/penghancur homogenate, *Centrifuge* dingin suhu 4^0C, tabung falcon dan *Microtube* tip putih

7.9.3. Prosedur Pemeriksaan

Ginjal dipotong-potong dan kemudian dimasukkan ke dalam gelas kuvet khusus, di bawahnya diberi penangas es, dan kemudian ditambahkan 2 ml PBS buffer untuk setiap gram ginjal. Potongan-potongan ginjal dihaluskan menggunakan blender sampai hancur berupa cairan kental. Selanjutnya cairan kental ginjal disentrifus pada 7000 rpm dalam 4 ^{0}C selama 15 menit. Supernatan diambil untuk diukur kadar ANP, COX 1 dan Renin menggunakan kit

dengan metode ELISA. Pengukuran akhir dibaca oleh ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Gambar 7.16.
Homogenat dari 10 Kelompok Perlakuan (*centrifuge* 3000 rpm selama 10 menit, diambil supernatannya).



Gambar 7.17.
Persiapan Sumur Blanko, Sumur Standar dan Sumur Sampel Percobaan

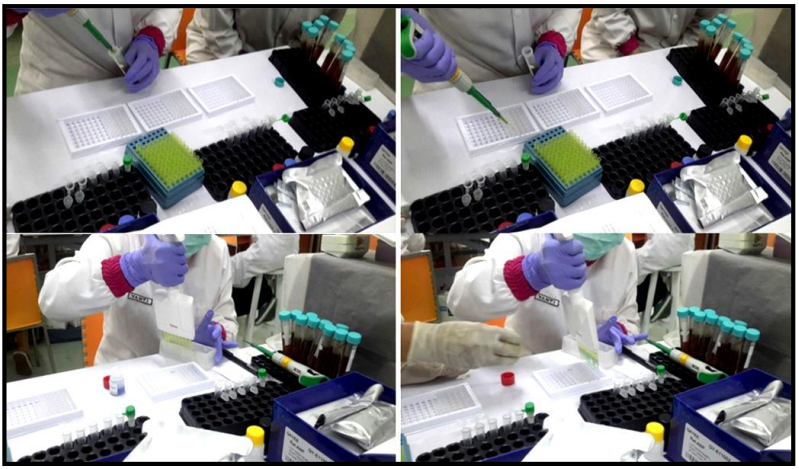
Sumur blanko tidak dimasukkan sampel dan HRP

Sumur standar: ditambahkan 50 µl larutan Standar

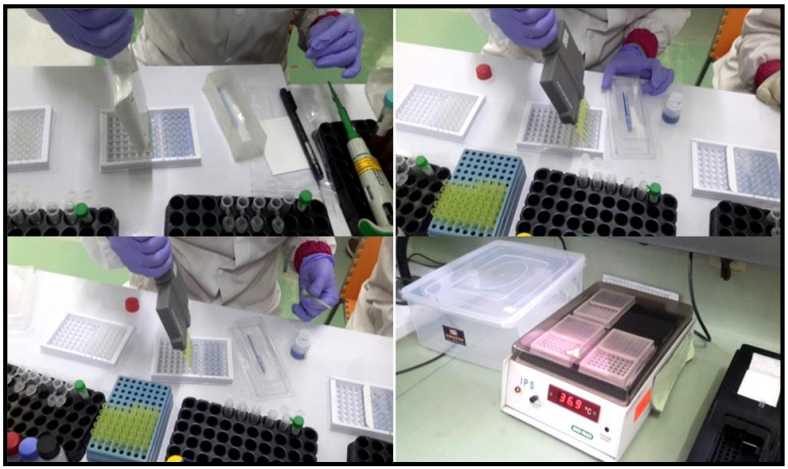
Sumur sampel ditambahkan 40 µl Special diluent lalu ditambahkan 10 µl supernatan sampel. Diperiksa 3x.

Gambar 7.18.
Persiapan Blanko dari 3 pemeriksaan: ANP, COX-1 dan Renin

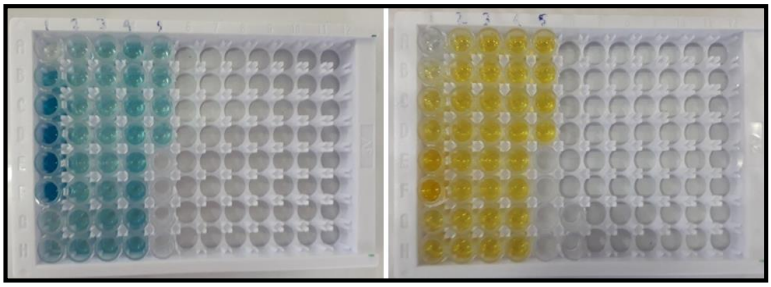
Gambar 7.19.
Sampel dari 10 kelompok Perlakuan Dimasukkan ke Tiap Sumur (sebanyak 10 µl)



Gambar 7.20.
***Horse Radish Peroxidase* (HRP) Dimasukkan ke dalam Sumur (sebanyak 50 µl)**



Gambar 7.21.
Proses Inkubasi Selama 1 jam pada Suhu Ruangan 36,9^{0}C



Gambar 7.22.
Penambahan 50 µl Chromogen A ke Tiap Sumur, Lalu Penambahan 50 µl Chromogen B ke Tiap Sumur

Digoyang perlahan dan di inkubasi 10 menit suhu 37^0C selama 10 menit di ruangan gelap Diberi larutan stop (*Stop solution*) pada tiap sumur sebanyak 50 µl, dan warna biru seketika akan berubah menjadi kuning.

Gambar 7.23.
Pengukuran akhir pada ELISA *Reader*

Sumur blanko diatur pada angka 0, dan setelah 15 menit larutan stop, *Plate* dibaca dengan alat ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

7.9.4. Hasil Pengukuran Kadar ANP, COX 1 dan Renin (Meilinah Hidayat, *et al.*, 2018).

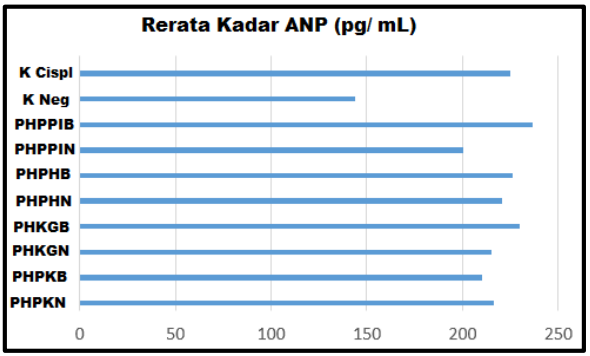
Pengukuran kadar ANP, COX 1 dan Renin dilakukan pada homogenat ginjal tikus kanan, menggunakan metode ELISA dengan kit produksi Qayee-bio, dengan pengulangan sebanyak 3 kali (triplo). Rerata hasil pengukuran dapat dilihat pada tabel 7.15. Terdapat keterbatasan penelitian, yaitu keterbatasan alat, gelas kuvet pada alat pemecah jaringan (mincer) hanya dapat bekerja pada volume standard minimal (50 ml), maka jaringan ginjal terpaksa diperiksa per kelompok sehingga hasil data hanya bisa dihitung hasil rata-rata per kelompok sebanyak 3 kali kemudian dianalisis secara deskriptif.

Tabel 7.15.
Rerata Pengukuran ANP, COX-1 dan Renin *(Hidayat., et al, 2018b).*

No/ Group	HASIL PENGUKURAN		
	ANP	COX-1	RENIN
Rerata HPPKN	**216.2**	**196.5**	**307.5**
Rerata HPPKB	**210.1**	**196.7**	**230.4**
Rerata HPKGN	**215.3**	**205.0**	**257.6**
Rerata HPKGB	**230.1**	**201.9**	**245.4**
Rerata HPPHN	**220.6**	**191.2**	**224.1**
Rerata HPPHB	**226.4**	**207.4**	**244.8**
Rerata HPPPIN	**200.4**	**192.4**	**373.4**
Rerata HPPPIB	**236.7**	**207.0**	**404.8**
Rerata K Neg	**144.1**	**211.4**	**153.8**
Rerata K Cispl	**225.1**	**151.9**	**227.4**

Hasil rerata kadar ANP kontrol negatif menunjukkan hasil 144,1 pg/ml sementara kontrol Cisplatin menunjukkan hasil yang sangat berbeda, yaitu 225,1 pg/ml. Kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang buruk, tidak ada hasil di bawah atau mendekati hasil kontrol Negatif. Lima kelompok menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada kelompok kontrol Cisplatin, sementara 3

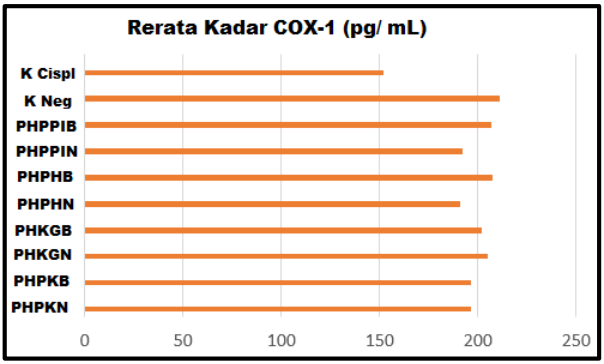
kelompok menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol Cisplatin, yaitu kelompok HPKGB. HPPHB dan HPPPIB (Gambar 7.24).



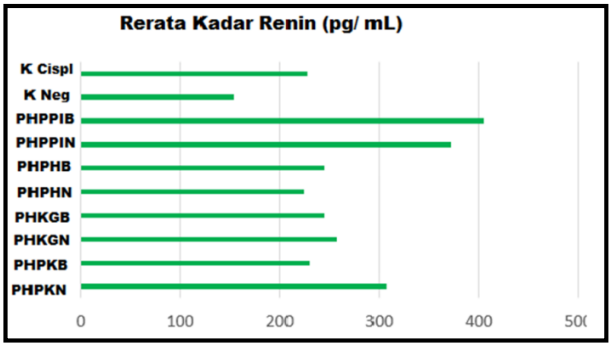
Gambar 7.24.
Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar ANP (Hidayat, *et al*, 2018b).

Dalam pengukuran kadar COX-1 kelompok kontrol negatif menunjukkan rerata kadar 211,4 pg/ml sedangkan kontrol Cisplatin menunjukkan hasil yang sangat berbeda, yaitu 151,9 pg/ml. Kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang cukup baik, meskipun tidak ada hasil yang lebih tinggi daripada kontrol negatif. Semua kelompok menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada kontrol Cisplatin dan hasil rerata kadar COX-1 tertinggi yang ditunjukkan oleh kelompok PHGPB (207,4 pg/ml) (Gambar 7.25).

Dalam pengukuran kadar Renin, kontrol negatif menunjukkan rerata 153,8 pg/ml sementara kontrol Cisplatin menunjukkan hasil yang sangat berbeda jauh, yaitu 227,4 pg/ml. Kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang buruk. Semua kelompok menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol Cisplatin. Kelompok yang menunjukkan hasil lebih rendah daripada kontrol Cisplatin hanya kelompok HPPHN dengan rerata 224,1 pg/ml (Gambar 7.25).



Gambar 7.25.
Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar COX-1(Hidayat., *et al*, 2018b).



Gambar 7.26.
Rerata Hasil Pemeriksaan Kadar Renin (Hidayat, *et al.*, 2018b).

Target utama peptida anti hipertensi adalah Renin dan ACE (Li., *et al*, 2011). Renin berarti kadar kontrol Negatif seharusnya rendah. Kelompok Cisplatin menunjukkan rerata kadar Renin yang tinggi (Gambar 7.25). Namun demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian hidrolisat protein tidak menunjukkan kadar rerata renin serendah kontrol Negatif. Hal ini mungkin karena waktu penelitian yang terbatas, atau memang kerusakan nefron ginjal yang disebabkan oleh Cisplatin sangat parah dan tidak dapat diperbaiki.

Demikian pula dengan hasil pemeriksaan ANP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian hidrolisat protein tidak menghasilkan kadar ANP yang rendah. Rerata kadar ANP kontrol negatif diharapkan tinggi, tetapi hasilnya menunjukkan rerata kadar yang rendah (Gambar 7.24), sedangkan kelompok Cisplatin menunjukkan rerata kadar ANP yang tinggi. Hasil ini sulit dijelaskan. Hasil dari semua kelompok perlakuan hampir sama dengan kelompok Cisplatin. Kadar ANP meningkat pada pasien CKD yang rumit dengan fungsi ginjal yang memburuk (Santos-Araújo, C., *et al*, 2015), kondisi ini dapat berkorelasi dengan mekanisme kompensasi tubuh.

Kadar kontrol negatif COX-1 menunjukkan kadar yang jauh lebih tinggi daripada hasil kelompok Cisplatin. Semua kelompok perlakuan menunjukkan kadar rerata COX-1 lebih tinggi daripada kelompok Cisplatin (Gambar 7.25). Di antara tiga hasil pengukuran (ANP, COX-1 dan Renin), hanya penilaian COX 1 yang menunjukkan hasil yang menjanjikan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Li et al, di mana hidrolisat protein kacang dapat meningkatkan produksi COX-1 yang dapat meningkatkan fungsi ginjal (Li et al., 2011). COX-1 bertanggung jawab untuk produksi prostaglandin (PG) yang penting untuk fungsi homeostatik, seperti menjaga integritas mukosa lambung, dan mengatur aliran darah ginjal (Crofford, 1997). Hipotesis mekanisme kerja dari HPPHB dalam meningkatkan fungsi ginjal adalah melalui aktivitas COX-1, bukan oleh aktivitas RAS atau ANP.

DAFTAR PUSTAKA

Akiko, R.E. (2015a) Anti hypertensive Peptide from food proteins. Annual Review of Food Science and Technology, 6 (1), 235-262

Arany, I., & Safirstein, R. L. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*. https://doi.org/10.1016/S0270-9295(03)00089-5

Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*.

Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/ j.ejphar.2014.07.025

Davies, D. R. (2002). Pisum sativum L No 1 Pulses. In S. van der Maesien, L.J.G.& Somaatmadja (Ed.), *Plant Resources of South-East Asia* (pp. 63–64). Bogor, Indonesia: Prosea Foundation.

Dugbartey, G. J., Peppone, L. J., & de Graaf, I. A. M. (2016). An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology*. https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.10.001

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Edisi 12). 2011. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Hanchate, L. P., Sharma, S. R., & Madyalkar, S. (2017). Cisplatin induced acute myocardial infarction and dyslipidemia.

Journal of Clinical and Diagnostic Research, *11*(6). https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25546.10025

Levin, E. R., Gardner, D. G., & Samson, W. K. (1998). Natriuretic peptides. *The New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJM199807303390507

Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebiyi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., … Aluko, R. E. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf201911p

Hidayat, M., Prahastuti, S., Wargasetia, T.L., Ferdinand, V., Soemardji, A.A., Rahmawati, S.F., Suliska, N., Hasan, K. (2018). Role of Pea Protein Hydrolysates as Antinephrotoxicity.Accepted in *Journal Research of Pharmaceutical Sciences*.

Hidayat, M., Prahastuti, S., Wargasetia, T.L., Nugraha, K., Soemardji, A.A., Rahmawati, S.F., Suliska, N., Hasan, K. (2018a). Green Peas Protein Hydrolyzed by Bromelain in Simple Procedure to Improve Kidney Function in Cisplatin-induced Rats. Accepted in *Journal Research of Pharmaceutical Sciences*.

Hidayat, M., Prahastuti, S., Wargasetia, T.L., Ferdinand, V., Soemardji, A.A., Rahmawati, S.F., Suliska, N., Hasan, K. (2018b). Role of Pea Protein Hydrolysates as Antinephrotoxicity. *Journal Research of Pharmaceutical Sciences*.

Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*. https://doi.org/10.3390/toxins2112490

Nematbakhsh M., Ebrahimian S., Tooyserkani M., Eshraghi-Jazi F, Talebi A, Ashrafi F. (2013). Gender difference in Cisplatin-

induced nephrotoxicity in a rat model: Greater intensity of damage in male than female. Nephro-Urol Monthly.5(3), 818–21.

Ogawa, N., Komura, H., Kuwasako, K., Kitamura, K., & Kato, J. (2015). Plasma levels of natriuretic peptides and development of chronic kidney disease. *BMC Nephrology*. https://doi.org/10.1186/s12882-015-0163-9.

Pezeshki Z, Nematbakhsh M, Nasri H, Talebi A, Pilehvarian A, Safari, *et al*. (2013).Evidence against protective role of sex hormone estrogen in cisplatin-induced nephrotoxicity in ovarectomized rat model. Toxicol Int.20(1).

Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab, A., Pestana, M. (2015). Clinical value of natriuretic peptides in chronic kidney disease. *Nefrologia*, *35*(3), 227–233. Retrieved from w w w.revistanefrologia.com

BAB VIII
PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG HIJAU MENGGUNAKAN BROMELAIN

Pada bab VII diperlihatkan analisis hasil pemeriksaan bahwa HPPHB menunjukkan efek paling baik terhadap tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin berdasarkan beberapa parameter. Tujuan penelitian tahap ini adalah membuat hidrolisat protein kacang polong hijau menggunakan enzim bromelain.

Penelitian Hidrolisat Protein untuk Terapi Penyakit Ginjal Kronis
Bahan:
Serbuk Kacang polong hijau (*Pisum sativum* L), Maica Leaf, Perkebunan Magelang.
Enzim: Bromelain dari jus nanas segar dari Nanas asal Subang

↓

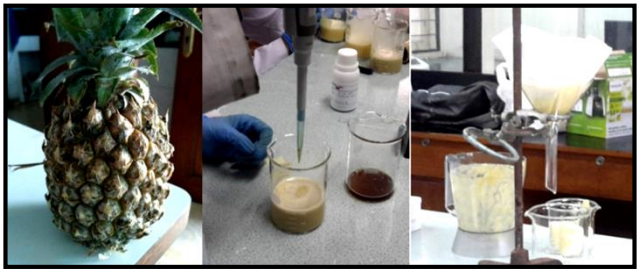
1. Pemeriksaan kandungan protein enzim bromelain (metode Kunitz dan Bradford)
2. Pembuatan hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*)
3. Pemeriksaan kandungan protein dari hidrolisat protein kacang polong hijau (metode Kunitz, Bradford dan SDS PAGE)
4. Penelitian efek hidrolisat protein kacang polong hijau dosis 50 mg, 100 mg dan 200 mg/kgBB secara *in vivo* selama 28 hari pada Tikus Wistar yang diinduksi Gentamicin

Gambar 8.1.
Alur Penelitian Dosis Efektif Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau Bromelain

8.1. Persiapan Pembuatan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau

8.1.1 Persiapan Larutan Enzim Bromelain

Disiapkan 1 buah nanas asal Subang yang belum terlalu matang. Selanjutnya nanas di blender lalu disaring (filtrasi) menggunakan kertas saring kemudian didapat larutan brome lain.



Gambar 8.2
Buah Nanas dari Subang, Hasil Blender Nanas dan Filtrasi Nanas *(Dokumentasi Pribadi).*

Gambar 8.3.
Filtrasi Nanas Disentrifus dan Aliquot Larutan Bromelain Nanas
(*Dokumentasi Pribadi*).

8.1.2 Pengukuran Aktivitas Spesifik Total Enzim Bromelain

Pada tahap pertama dilakukan pengukuran aktivitas spesifik total dari enzim yang dipakai untuk pembuatan hidrolisat protein (bromelain) berdasarkan metode Bradford(Harlow & Lane, 2006)**.**Uji Kunitz dilakukan selanjutnya untuk mengetahui aktivitas spesifik total dari enzim bromelain (Kunitz, 1950)**.**

- **Hasil Uji Kunitz terhadap larutan enzim bromelain:**

Hasil uji Kunitz di lihat dengan panjang gelombang A280 bromelain: 0,626

$$Aktivasi = \frac{Serapan\ Sampel - Serapan\ Blanko}{0{,}001\ x\ waktu\ hidrolisis\ (menit) x\ volume\ enzim\ (mL)}$$

$$Aktivasi = \frac{0{,}626 - 0{,}000}{0{,}001\ x\ 30\ menit\ x\ 0{,}1\ mL}$$

$$Aktivasi = \frac{0{,}626}{0{,}003}$$

$$Aktivasi = 208{,}67\ U/mL$$

*unit aktivitas adalah jumlah enzim yang menyebabkan kenaikan 0,001 A unit/menit di atas blanko

Aktivitas total bromelain (U) = aktivitas bromelain (U/mL) x V total enzim (mL)

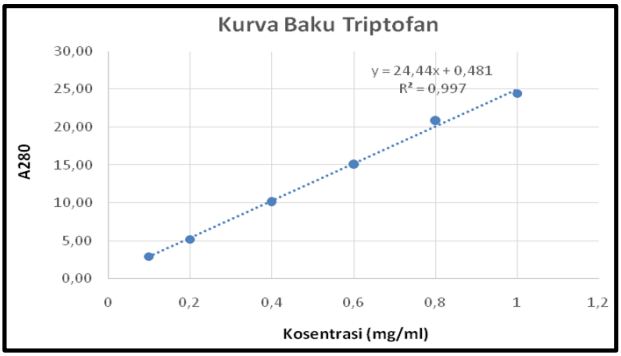
Aktivitas total bromelain (U) = 208,07 U/mL x 246 mL

8.1.2.3 Pembuatan Kurva Baku Triptofan (Harlow & Lane, 2006)

Pertama TSS standar 3,2 mg/3mL aquadest diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; Dan 0,1 mg/mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL TSS standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL *Bradford Protein Assay Dye Reagent*, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, absorbansi di ukur pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian diperoleh kurva standar dengan persamaan regresi (y = bx + a). Prosedur ini dilakukan dua kali, dan hasil absorbansi dimasukkan ke dalam kurva baku triptofan.

Tabel 8.1
Hasil Pengukuran Triptofan pada Panjang Gelombang 280 nm

Triptofan(mg/mL)	A280
0,01	0,297
0,02	0,520
0,04	1,017
0,06	1,512
0,08	2,085
0,1	2,436



Gambar 8.4.
Kurva Baku Triptofan Persamaan: y = 24,44x +0,481

8.1.2.4 Perhitungan Aktivitas Spesifik Bromelain

$$Aktivasi\ spesifik\ bromelain\ (U/mg) = \frac{Aktivasi\ Total\ Bromelain\ (U)}{Protein\ Total\ Bromelain\ (mg)}$$

$$Aktivasi\ spesifik\ bromelain\ (U/mg) = \frac{51.185{,}22\ (U)}{90{,}282\ (mg)}$$

$$Aktivasi\ spesifik\ bromelain\ \left(\frac{U}{mg}\right) = 556{,}94\ U/mg$$

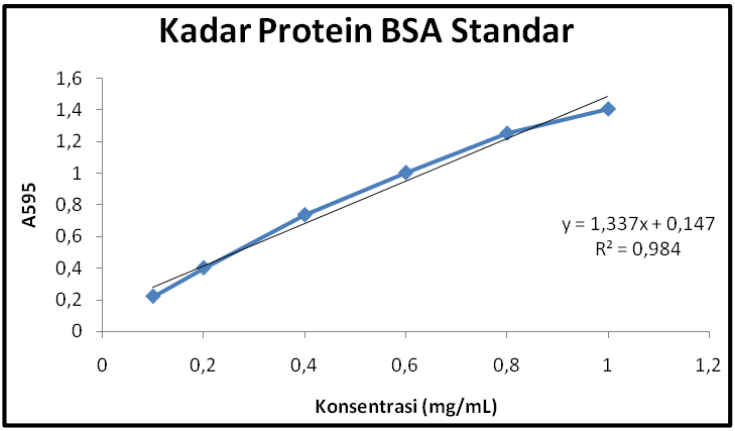
Jadi, total aktivitas spesifik bromelain sebesar 556,94 U/mg

8.1.2.5 Pembuatan Kurva Baku *Bovine Serum Albumin* (BSA) Standar (Harlow & Lane, 2006)

BSA sandar sebanyak 2 mg/mL diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; dan 0,1 mg/mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL BSA standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL Bradford *Protein Assay Dye Reagent*, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prosedur BSA ini dilakukan dua kali, kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam kurva BSA dengan persamaan regresi (y = bx + a).

Tabel 8.2.
Hasil Pengukuran BSA pada Panjang Gelombang 595 nm

BSA (mg/mL)	A595
1	1,408
0,8	1,254
0,6	1,005
0,4	0,738
0,2	0,402
0,1	0,222



Gambar 8.5.
Kurva Baku Kadar Protein BSA Standar Dengan Persamaan:
y =1,3376x + 0,1471

Perhitungan konsentrasi bromelain (mg/mL)

A595 bromelain: 0,638

y = bx + a

y = 1,3376x + 0,1471(y: A595 dan x: konsentrasi (mg/ml))

0,638 = 1,3376x + 0,1471

x = 0,3670 mg/mL

Jadi kadar protein bromelain adalah 0,3670 mg/mL

Kadar protein total bromelain (mg) = kadar protein bromelain (mg/ml) x V total enzim (mL)

Kadar protein total bromelain (mg) = 0,3670mg/mL x 246 mL

Kadar protein total bromelain (mg) = 90,282 mg

8.2. Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein

Pembuatan hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) dilakukan berdasarkan metode yang telah disampaikan pada

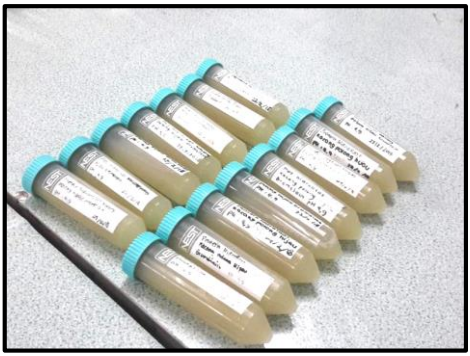
bab VI sesuai dengan Hak Cipta Meilinah Hidayat tentang Pembuatan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau menggunakan enzim Bromelain (EC00201810615, 2018)**.**

Gambar 8.6.
Kacang Polong Hijau Kering Maica Leaf dari Magelang
(Dokumentasi Pribadi)

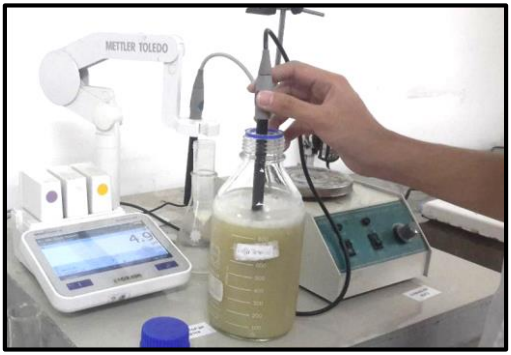
Gambar 8.7
Penyaringan dengan MESH 120 dan Penimbangan Serbuk Kacang Polong
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 8.8
Penyaringan Larutan Serbuk Kacang Polong yang Diberi Aquadest dan Bromelain dan Hasil Filtrasi
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 8.9.
Larutan Serbuk Kacang Polong dengan Bromelain di atas *Stirrer* Selama 72 jam
(Dokumentasi Pribadi)



Gambar 8.10
Hasil Filtrasi Larutan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau
(Dokumentasi Pribadi)



Gambar 8.11.
Pengukuran pH Larutan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau (pH: 4,9).
(*Dokumentasi Pribadi*)

Proses pencampuran serbuk kacang polong hijau dengan enzim bromelain dan aquadest dilakukan perlahan-lahan dan sedikit demi sedikit karena serbuk kacang polong cukup sulit dilarutkan. Botol A yang dicampur dengan pengadukan keras menghasilkan larutan yang lebih gelap dan menghasilkan pH yang lebih tinggi dari pada botol B.

8.2.1. Perhitungan Jumlah Kandungan Hidrolisat Protein dari Kacang Polong Hijau dengan Metode Bradford

Setelah didapat larutan hidrolisat protein, dihitung jumlah total produk larutan, pH dan jumlah protease berdasarkan persamaan BSA. Jumlah protein dihitung dengan membagi absorbansi sampel hidrolisat pada diencerkan 50x (0,02 sampel + 0,98 aquadest) pada panjang gelombang A280 dengan persamaan BSA. Hasilnya adalah sebagai berikut:

Botol A 388 ml pH 5,2, Botol B 412 ml pH 4,4. Total 800 ml, pH 4,9

Pengukuran Absorbansi hidrolisat protein: 1,452

Penentuan kadar hidrolisat protein:

y = bx + a

y = 1,3376x + 0,1471 (y: A595 dan konsentrasi (mg/x: ml))

1,452 = 1,3376x + 0,1471

x = 0,9756 mg/mL

x = 0,9756 mg/mL x 50 = 48,778 mg/mL

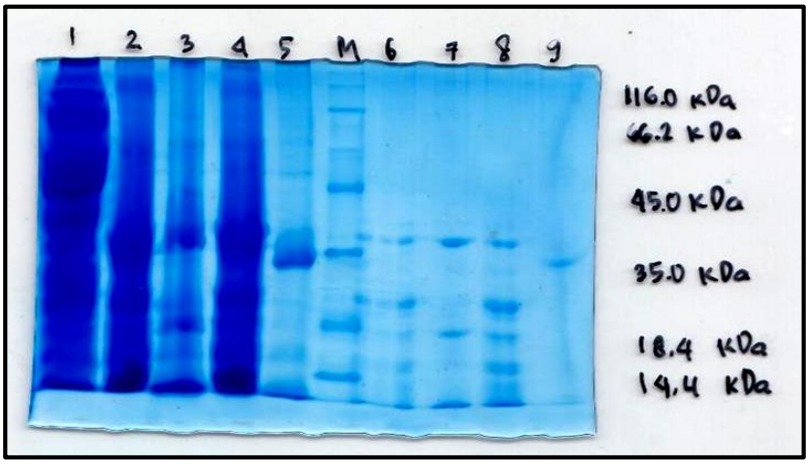
Kandungan protein HPPHB adalah 48,778 mg/mL

Jumlah protein HPPHB yang didapat adalah =

kandungan protein tiap mL × total volume yang didapat dari botol A dan B = 48,778 mg/mLx 800 mL (Total volume botol A + B) = 39.022,12 mg = 39,02 gram

8.2.2. Karakterisasi Protein Menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)



Gambar 8.12.
Hasil SDS PAGE
(*Dokumentasi Pribadi*)

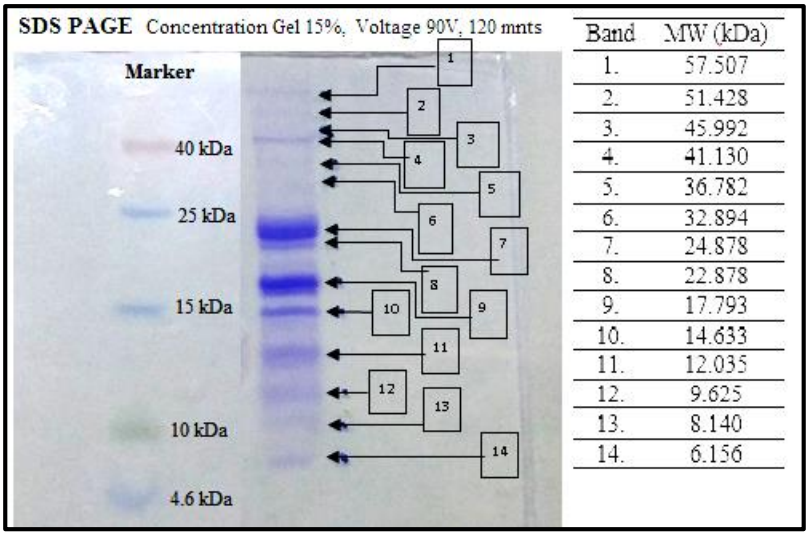
Keterangan**:**

#1. Serbuk kacang polong hijau (*Pisum sativum*)
#2. Hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A
#3. Hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol B
#4. Hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A &B
#M. Marker
#5. Larutan enzim bromelain
#6. Hidrolisat protein kacang polong hijau botol A pengenceran 10x
#7. Hidrolisat protein kacang polong hijau botol B pengenceran 10x
#8. Hidrolisat protein kacang polong hijau botol A&B pengenceran 10x
#9. Protein Bromelain pengenceran 10x

Kacang polong hijau (*Pisum sativum*) dalam bentuk serbuk mengandung protein yang sangat tinggi sehingga pita yang tampak kurang begitu jelas dan bertumpuk. Demikian pula dengan hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A, hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol B, hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A &B dan Larutan enzim bromelain; semuanya memiliki kandungan protein yang sangat tinggi sehingga pita yang tampak kurang begitu jelas dan sulit di interpretasi. Dengan demikian perlu dilakukan pengenceran sebanyak 10 x.

Setelah dilakukan pengenceran 10x, semua hidrolisat protein kacang polong menunjukkan pita yang lebih jelas dan dapat di interpretasi. Hidrolisat protein kacang polong botol A dengan pengenceran 10x (#6) tampak memiliki beberapa pita tebal antara lain pita di bawah 14,4 kDa, antara 14,4 kDa dan 18,4 kDa, antara 18,4 kDa dan 35,0 kDa, dan pita di atas 35,0 kDa, namun tidak tampak pita di atas 45 kDa. Hidrolisat protein kacang polong botol B dengan pengenceran 10x (#7) terlihat pita di bawah 14,4 kDa, antara 14,4 kDa dan 18,4 kDa, antara 18,4 kDa dan 35,0 kDa, dan pita antara 35,0 kDa dan 45,0 kDa, juga tidak tampak pita di atas 45 kDa. Hidrolisat protein kacang polong botol A dan B dengan pengenceran 10x (#8) tampak banyak sekali pita di bawah 14,4 kDa, juga di antara 14,4 kDa dan 18,4 kDa, tampak pita tebal antara 18,4 kDa dan 35,0 kDa, dan 1 buah pita di antara 35,0 kDa dan 45,0 kDa. Tidak tampak pita di atas 45 kDa. Diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk menentukan protein dengan berat molekul di bawah 14,4 kDa. Larutan enzim Bromelain dengan pengenceran 10 x (#9) tampak satu buah pita di garis marka 35,0 kDa.

Untuk memperjelas hasil pita dengan berat molekul rendah, hidrolisat protein diperiksa kembali menggunakan SDS PAGE ***Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder.*** Hasil Running SDS PAGE dengan konsentrasi gel 15%, Voltase 90 V, Waktu 120 menit adalah sebagai berikut:



Band	MW (kDa)
1.	57.507
2.	51.428
3.	45.992
4.	41.130
5.	36.782
6.	32.894
7.	24.878
8.	22.878
9.	17.793
10.	14.633
11.	12.035
12.	9.625
13.	8.140
14.	6.156

Gambar 8.13.
SDS PAGE *Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder*

DAFTAR PUSTAKA

Hale LP, Greer PK, T. C. (2005). Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*, *5*(4), 783–793.

Harlow, E., & Lane, D. (2006). Bradford Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(6), pdb.prot4644-pdb.prot4644. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4644

Hidayat, M. (2018). Hak Cipta. EC00201810615. Kementrian Hukum dan Hak Asasi Manusia Republik Indonesia.

Kunitz, M. (1950). Crystalline Desoxyribonuclease: I. Isolation and General Properties Spectrophotometric Method for the Measurement of Desoxyribonuclease Activity. *The Journal of General Physiology*. https://doi.org/10.1085/jgp.33.4.349

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebiyi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., … Aluko, R. E. (2011). Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. *J Agric Food Chem*. https://doi.org/10.1021/jf201911p

Poh S.S and Abdul Majid, F.. (2011). Thermal stability of free bromelain and bromelain-plyphenol complex in pineapple juice. *International Food Research Journal*, *18*(3), 1051–1060.

Restriani, R. (2015). Hidrolisis secara Enzimatis protein Bungkil Biji Nyamplung (Calophyllum inophyllum) menggunakan Bromelain. *Biota*, *1*(3), 86–91.

BAB IX
EFEK BEBERAPA DOSIS HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG HIJAU BROMELAIN TERHADAP TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI GENTAMICIN

Tahap penelitian ini bertujuan untuk menguji efek pemberian beberapa dosis hidrolisat protein kacang polong hijau bromelain yang sudah dipersiapkan sebelumnya terhadap organ ginjal, fungsi ginjal dan mekanisme kerjanya pada tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin, berdasarkan beberapa parameter. Tujuan penelitian yang lain adalah mengetahui dosis yang mempunyai efek yang paling baik terhadap parameter-parameter tersebut.

9.1. Parameter Penelitian

Parameter yang diperiksa untuk menguji efek beberapa dosis HPPHB terhadap organ utama tikus Wistar jantan adalah: Bobot Badan (BB), Indeks Organ (IO) Ginjal dan Jantung dan analisis sediaan histopatologis ginjal. Parameter yang diperiksa untuk

menguji efek HPPHB terhadap fungsi ginjal adalah: Ureum, Kreatinin; Hematologi, Profil lipid: Kolesterol Total, Trigliserida, *Low Density Lipoprotein (LDL)*, *High Density Lipoprotein (HDL)*. Parameter yang diperiksa untuk menguji mekanisme kerja HPPHB dalam memperbaiki fungsi ginjal adalah: *Super Oxide Dismutase (SOD)*, *Atrial Natriuretic Peptide (ANP)*, *Cyclooxygenase-1 (COX-1)* dan Renin.

Hipotesis mekanisme hidrolisat protein kacang polong dalam menurunkan tekanan darah menurut beberapa peneliti adalah melalui produksi *cyclooxygenase-1* (COX-1), protein yang dapat meningkatkan fungsi ginjal (Li et al. 2011). Gen COX-1 disebut sebagai gen pemelihara untuk berbagai jaringan tubuh, salah satu fungsinya adalah memelihara homeostasis dan aliran darah ginjal (Crofford 1997). Aliran darah sangat berhubungan dengan penyakit hipertensi yang sering menjadi penyebab PGK. Hipertensi dan volume plasma dapat membaik salah satunya disebabkan efek dari peptida natriuretik. Fungsi fisiologi, patofisiologi dan pengaruh ANP untuk pengobatan penderita PGK yang terkait dengan penyakit kardiovaskular telah diteliti secara ekstensif (Levin,1998). Penderita PGK yang parah dengan fungsi ginjal yang memburuk menunjukkan peningkatan kadar plasma ANP, akan tetapi hubungan antara kadar plasma ANP dan kerusakan akibat PGK masih belum jelas dan perlu diteliti lebih lanjut. Efek perlindungan ANP terhadap ginjal kemungkinan karena ANP menghambat proliferasi sel mesangial dan fibrosis ginjal (Ogawa et al., 2015).

Hipertensi dan kerusakan ginjal sangat berkaitan dengan sistem Renin-angiotensin (RAS) yang hiperaktif. Sekitar 80% pasien PGK menderita hipertensi, gangguan fungsi ginjal dan tekanan darah; terkait dengan kondisi fisiologis dan patologis dari Renin dan Angiotensin Converting Enzyme (ACE) yang saling mempengaruhi satu sama lain (Santos-Araújo, C., 2015). Sistem renin-angiotensin berperan sangat penting dalam pengaturan tekanan darah. Sistem ini

juga memiliki peran dalam patogenesis peradangan dan perkembangan PGK. Pada proses peradangan terdapat banyak sel T, sel natural killer, dan monosit yang memiliki kemampuan untuk mengekspresikan angiotensin II dan reseptor AT1. Angiotensin II dan reseptor AT1 akan merangsang dan meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas dan selanjutnya berkembang menjadi stres oksidatif. Stres oksidatif sering terjadi pada penderita PGK karena pada kondisi ginjal terganggu terjadi peradangan yang kronis. Stres oksidatif memiliki peran dalam terjadinya proteinuria melalui aktivitas asimetrik dimetilarginin (ADMA), yang menyebabkan disfungsi endotel, hingga terjadi komplikasi penyakit kardiovaskular, yang pada akhirnya menyebabkan perburukan PGK (Putri, 2014).Menurut penelitian Pownall dkk, peptida dari protein kacang polong kuning memiliki aktivitas antioksidan yang dapat digunakan sebagai agen terapeutik melawan penyakit-penyakit kronik yang disebabkan kerusakan oksidatif (Pownall, 2010). Dalam penelitian ini akan diuji kadar antioksidan SOD, ANP, COX-1 dan Renin sebagai hipotesis mekanisme HPPHB dalam memperbaiki fungsi ginjal

9.2. Bahan dan Alat yang Digunakan

Subjek penelitian yang digunakan adalah 70 ekor tikus Wistar jantan, berusia 5-6 minggu, bobot antara 148-190 g, dan sehat. Tikus diperoleh dari Fakultas Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (SITH) ITB Bandung. Gentamicin injeksi dalam flacon 80 mg/ampul 2 ml diperoleh dari beberapa apotik dan Rumah Sakit di kota Bandung**.**

9.2.1. Gentamicin

Gambar 9.1.
Gentamicin injeksi 80 mg (*Dokumentasi Pribadi*)

Gentamicin adalah antibiotika yang tergolong ke dalam jenis Aminoglikosida (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999). Aminoglikosida telah lama menjadi salah satu penyebab paling umum dari nefrotoksisitas akibat obat. Kondisi toksik pada ginjal atau nefrotoksisitas yang disebabkan oleh aminoglikosida menunjukkan kelainan klinis sebagai kegagalan ginjal nonoligurik atau tidak disertai penurunan urine. Kelainan yang terjadi berupa peningkatan kreatinin serum yang lambat dan pengeluaran urine hypoosmolar yang terjadi setelah beberapa hari pemberian gentamicin. Aminoglikosida bersifat nefrotoksik karena terakumulasi pada sel epitel yang melapisi segmen S1 dan S2 dari tubulus proksimal setelah filtrasi glomerulus. Aminoglikosida tetap dipertahankan selain pada sel-sel vakuola endosomal dan lisosom juga terlokalisasi di kompleks Golgi. (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999). Gentamicin menyebabkan kerusakan tubulus melalui mekanisme nekrosis dari sel epitel tubulus, terutama pada segmen proksimal, dan perubahan fungsi dari komponen sel utama yang melibatkan keseimbangan air dan elektrolit. Aspek utama dari nefrotoksisitas gentamicin adalah sitotoksisitas tubulus atau kerusakan sel tubulus. Efek paling jelas terlihat dari nekrosis sel

tubulus serta adanya kerusakan morfologi adalah penurunan fungsi ginjal (Randjelović, 2017).Gentamicin menyebabkan perubahan morfologi dan fungsional dari ginjal (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999).

Dalam penelitian ini Gentamicin yang digunakan adalah dosis 80 mg/kgBB/hari selama 7 hari berturut-turut untuk membuat ginjal tikus Wistar terganggu, merupakan modifikasi dari penelitian yang dilakukan di Mumbai, India (Sawardekar & Patel., 2015).

9.2.2. Aspek Etik Penelitian

Studi eksperimental terhadap tikus Wistar jantan yang diinduksi dengan Gentamicin ini, telah disetujui untuk izin etis dari Komisi Etik Universitas Kristen Maranatha SK No.185/KEP/III/2018.

9.3. Lokasi Penelitian

Penelitian *in vivo* terhadap tikus Wistar dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Farmakologi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung pada bulan April 2018. Pemeriksaan Hematologi dilakukan di Laboratorium Toksikologi Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung. Pemeriksaan Ureum, Kreatinin, Kolesterol Total, LDL, Trigliserida dan SOD dilakukan di Laboratorium Puri Medika Purwakarta. Pemeriksaan Kadar ANP, COX-1 dan Renin dilakukan di Laboratorium Klinik Patologi RS Hasan Sadikin Bandung. Pemeriksaan histopatologis sediaan ginjal dilakukan di RS Kebon Jati Bandung.

9.4. Percobaan *In Vivo* pada Tikus Wistar Jantan yang di Induksi Gentamicin (Hidayat, et al. 2018a)

Setelah larutan hidrolisat protein kacang polong hijau tersedia, selanjutnya dilakukan uji *in vivo* terhadap 70 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 10 kelompok. Semua

kelompok diinduksi Gentamicin 80 mg/kgBB yang diberikan melalui injeksi intraperitoneal selama 7 hari berturut-turut, kecuali kelompok kontrol Negatif (K IV), selanjutnya diberi perlakuan selama 28 hari. Kelompok perlakuan tikus dalam penelitian ini seperti yang tercantum dalam tabel 9.1. berikut:

Tabel 9.1.
Kelompok Perlakuan HPPHB terhadap Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Gentamicin

Kelompok	Pemberian	Dosis
I	Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau	50 mg/kgBB
II	Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau	100 mg/kgBB
III	Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau	200 mg/kgBB
IV	Kontrol Sehat (=Kontrol Normal= Kontrol Negatif) Pelarut CMC 0,5%	
V	Kontrol Sakit (Kontrol positif = hanya Gentamicin)	80 mg/kgBB
VI	Kontrol Simvastatin pelarut CMC 0,5%	10 mg/kgBB
VII	Kontrol Fenofibrate pelarut CMC 0,5%	300 mg/kgBB
VIII	Kontrol Ketosteril pelarut CMC 0,5%	630 mg/kgBB
IX	Kontrol Vitamin E pelarut CMC 0,5%	200 IU/kgBB

Gambar 9.2.
Sepuluh Kelompok Tikus Wistar Jantan (masing-masing 7 ekor tikus) *(Dokumentasi Pribadi)*

Gambar 9.3.
Penimbangan Bobot Badan Tikus untuk Penentuan Dosis

Gambar 9.4.
Pemberian Perlakuan melalui Sonde Oral Tikus sesuai Dosis yang dihitung berdasarkan Bobot Badan *(Dokumentasi Pribadi)*

Gambar 9.5.
Kiri: Pemberian Sonde Oral Tikus; Kanan: Pengambilan Sampel Darah melalui Vena Ekor *(Dokumentasi Pribadi)*

Gambar 9.6.
Kiri: Sampel Darah Tikus dalam Eppendorf; Kanan: Pemeriksaan Hematologi *(Dokumentasi Pribadi)*

Gambar 9.7.
Sampel Darah Tikus
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 9.8.
Proses Sentrifugasi Darah 6000 rpm 10 menit
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 9.9. Simvastatin tablet 10 mg
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 9.10. Fenofibrate tablet 300 mg
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 9.11.
Natural Vitamin E kapsul lunak 200 IU *(Dokumentasi Pribadi)*

Gambar 9.12
Ketosteril, Asam Keto Analog 630 mg *(Dokumentasi Pribadi)*

Prosedur perlakuan tikus dan jadwal pengambilan sampel darah diperlihatkan pada tabel 9.2 di bawah ini.

Tabel 9.2.

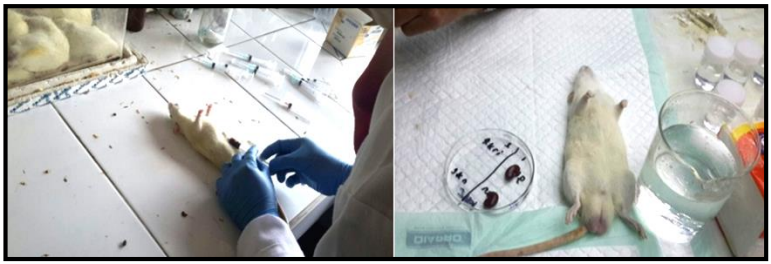
Prosedur Percobaan dan Jadwal Pemeriksaan Parameter Penelitian

Induksi Gentamicin 7 hr		**Perlakuan Selama 4 Minggu**			
Data Awal H0	**Minggu 0 H7**	**Minggu I H14**	**Minggu II H21**	**Minggu III H28**	**Minggu IV H35**
12/3/2018	19/3/2018	26/3/2018	2/4/2018	9/4/2018	16/4/2018
Pemeriksaan I	**Pemeriksaan II**	**Pemeriksaan III**	**Pemeriksaan IV**	**Pemeriksaan V**	**Pemeriksaan VI**
Ureum	Ureum	Ureum	Ureum	Ureum	Ureum
Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin
Kreatinin	Hematologi				Hematologi
Kolesterol	Kolesterol				Kolesterol
Total	Total				Total
LDL	LDL				LDL
Trigliserida	Trigliserida				Trigliserida
SOD	SOD				SOD
					ANP, COX-1 dan renin

9.5. Parameter Bobot Badan (BB) dan Indeks Organ (IO) (Hidayat, et al., 2018b)

BB tiap tikus ditimbang setiap hari sekali untuk menentukan dosis dan volume bahan uji yang diberikan pada hari tersebut. Secara umum, semua kelompok tikus mengalami penurunan BB setelah pemberian induksi Gentamicin, kecuali kelompok kontrol negatif. Pada minggu ke 3 mulai tampak peningkatan BB. Hasil pengukuran BB untuk masing-masing tikus, dosis dan volume pemberian bahan uji selama penelitian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Gambar 9.13.
Penimbangan Tikus dan Pembedahan *Post Mortem*



Gambar 9.14.
Pengambilan Darah Intra Kardial dan Pengambilan Organ Ginjal dan Jantung

Berikut hasil pengolahan data dari Indeks Organ (IO), yaitu bobot organ (BO) dibandingkan dengan BB dari masing-masing tikus (Hidayat, et al., 2018b).

Tabel 9.3.
Hasil Analisis Data IO Ginjal dan Jantung

Kelompok	Indeks Organ	
	Ginjal	Jantung
Dosis 50	0,38±0,03a	0,36±0,02
Dosis 100	0,42±0,04	0,36±0,04
Dosis 200	0,40±0,03	0,37±0,03
Kontrol Negatif	0,35±0,02a	0,37±0,02
Kontrol Positif/Gentamicin	0,43±0,04	0,36±0,02
Simvastatin	0,41±0,04	0,35±0,35
Fenofibrat	0,46±0,04	0,35±0,04
Ketosteril	0,42±0,04	0,37±0,02
Vitamin E	0,43±0,03	0,35±0,03

Ket: a = berbeda bermakna terhadap data kelompok kontrol positif

Hasil analisis statistik ANAVA, IO ginjal kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan IO kelompok kontrol positif, dimana kelompok kontrol positif menunjukkan IO yang jauh lebih besar; hal ini menandakan induksi gentamicin memberi pengaruh terhadap IO ginjal. Hasil

analisis kelompok HPPHB dosis 50 mg/kgBB menunjukkan perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kelompok perlakuan lain termasuk kelompok kontrol pembanding (Ketosteril dan Vitamin E) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini menandakan, HPPHB dosis 50 mg/kgBB memberikan efek yang baik terhadap indeks organ ginjal, sehingga dapat meredam kerusakan akibat Gentamicin dan IO kelompok HPPHB dosis 50 mg/kgBB tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok sehat yang tidak diberi perlakuan apapun.

Hasil analisis statistik ANAVA indeks organ jantung menunjukkan semua kelompok tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif maupun kelompok kontrol negatif; hal ini menandakan induksi gentamicin tidak memberi pengaruh terhadap IO jantung.

9.6. Parameter Histopatologis Ginjal Tikus (Hidayat, et al., 2018b)

Parameter yang diperiksa dalam gambaran histopatologis ginjal tikus Wistar yang diinduksi gentamicin adalah degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan hyaline cast. Pengamatan histopatologis dilakukan pada 3 preparat setiap kelompok perlakuan melalui mikroskop cahaya perbesaran objektif 10 dan 40 kali, pada 5 lapang pandang selanjutnya di interpretasi dalam bentuk skor. Pada setiap kelompok diambil nilai median dari skor parameter yang didapat. Setelah median ditentukan, dilakukan uji homogenitas Levene Statistic dengan hasil p=0,00 dan uji normalitas Saphiro-Wilk dengan hasil p=<0,05. Hasil dari skor degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan hyaline cast menunjukkan hasil yang tidak homogen dan tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan analisis statistik menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis.

Hasil analisis uji Kruskal-Wallis degenerasi tubulus bengkak keruh, menunjukkan nilai p > 0,05. Hasil analisis uji Kruskal-Wallisnekrosis inti dan hyaline cast menunjukkan nilai masing-masing p= 0,045 dan p= 0,026.

9.6.1 Parameter Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh (Hidayat, et al., 2018b)

Tabel 9.4.
Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Kelompok								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tikus 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tikus 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tikus 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan:

I. Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau dosis 50 mg/kgBB
II. Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau dosis 100 mg/kgBB
III. Hidrolisat protein Kacang Polong Hijau dosis 200 mg/kgBB
IV. Kontrol Sehat (=Kontrol Normal= Kontrol Negatif) Pelarut CMC 0,5%
V. Kontrol Sakit (Kontrol positif = hanya induksi Gentamicin)
VI. Kontrol Simvastatin 10 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
VII. Kontrol Fenofibrate 300 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
VIII. Kontrol Ketosteril 630 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
IX. Kontrol Vitamin E 200 IU pelarut CMC 0,5%

Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* degenerasi tubulus bengkak keruh menunjukkan nilai p > 0,05. Nilai p > 0,05 menunjukkan hasil yang tidak bermakna, berarti tidak terdapat hasil perlakuan yang berbeda di antara semua kelompok. Hal ini menandakan semua kelompok menunjukkan hasil yang serupa, yaitu memperoleh nilai skor 1. Pada semua kelompok terjadi gambaran bengkak keruh akibat

jejas intraselular, mengakibatkan gangguan pada pompa ion Natrium. Hidrolisat protein terutama berefek pada sistem RAA dan COX-1, yang mempengaruhi sistem vaskular atau pembuluh darah, dan bukan sel epitel tubulus.

9.6.2. Parameter Nekrosis Inti (Hidayat, et al., 2018b)

Tabel 9.5.
Skor Median Nekrosis Inti dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tikus 1	1	0	0	0	1	1	2	1	0
Tikus 2	0	0	1	0	2	0	1	1	0
Tikus 3	0	0	0	0	1	0	1	1	0

Nekrosis inti terjadi pada kerusakan sel yang parah, sehingga inti sel menjadi pecah dan menghilang yang dikenal sebagai karioeksis dan kariolisis. Induksi gentamicin selama 7 hari menyebabkan kerusakan sel yang jelas pada ginjal tikus Wistar. Kelompok kontrol gentamicin menunjukkan gambaran nekrosis inti yang parah, hampir seluruh inti sel menghilang, difus sehingga diberi skor 2 (Gambar 9.15 D, halaman 196). Hasil analisis nekrosis inti antara skor median kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol Gentamicin, menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sahih. Hasil analisis skor kelompok HPPHB dosis 100 mg/kgBB dan Vitamin E tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p > 0,05$); hampir tidak terlihat gambaran nekrosis inti pada kelompok ini. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian HPPHB dosis 100 mg/kgBB dan vitamin E mempunyai efek menurunkan skor nekrosis inti. Hasil analisis skor kelompok HPPHB dosis 50, 200 mg/kgBB dan Ketosteril berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Gentamicin ($p < 0,05$), akan tetapi nilai skor kelompok ini masih lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pemberian HPPHB

dosis 100 mg/kgBB dan Vitamin E mempunyai efek paling baik dalam menurunkan skor nekrosis inti.

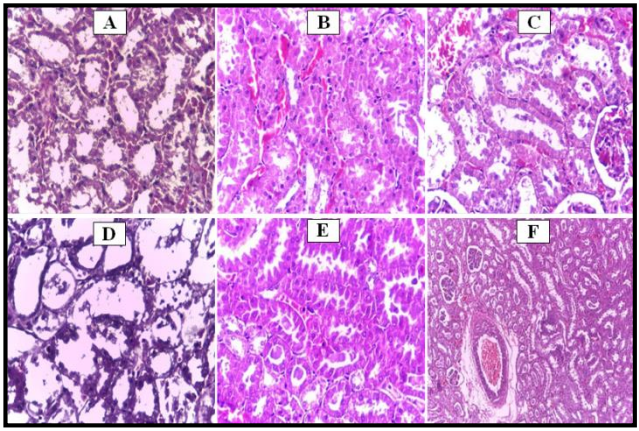
9.6.3 Parameter *Hyaline Cast* (Hidayat, et al., 2018b)

Tabel 9.6.
Skor Median *Hyaline Cast* dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan								
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**
Tikus 1	1	1	0	0	2	0	2	2	2
Tikus 2	0	1	0	0	2	1	1	2	1
Tikus 3	1	0	0	0	2	1	1	1	2

Hyaline cast umum ditemukan pada kerusakan ginjal tahap lanjut atau kronis. Hyaline cast terbentuk dari pengendapan mucoprotein Tamm-Horsfall yang di sekresi oleh sel-sel tubulus renalis. Pembentukan hyaline cast ini dipengaruhi oleh keadaan lingkungan di mana terjadi proses denaturasi protein dan presipitasi (misalnya aliran urine yang lambat, kadar garam urine yang tinggi, atau pH yang rendah). Kelompok kontrol gentamicin menunjukkan banyak gambaran *hyaline cast*, sehingga diberi skor 2 (Gambar D). Hasil analisis antara skor median hyaline cast kelompok kontrol negatif dan kelompok Gentamicin, menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sahih. Hasil analisis skor kelompok HPPHB dosis 200 mg/kgBB tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p > 0,05$); hampir tidak terlihat gambaran *hyaline cast* pada kelompok ini. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian HPPHB dosis 200 mg/kgBB mempunyai efek memperbaiki sel epitel tubulus ginjal ditandai dengan skor *hyaline cast* menurun. Hasil analisis skor kelompok HPPHB dosis 50,100 mg/kgBB dan Ketosteril berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Gentamicin ($p < 0,05$), akan tetapi nilai skor kelompok ini masih lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Pemberian HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan efek paling baik dalam menurunkan skor *hyaline cast* dan nilai skornya sama dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun.



Gambar 9.15.
Gambaran Sediaan Histopatologis Ginjal Berdasarkan 3 Parameter

A. Skor Degenerasi Bengkak Keruh 1, Nekrosis inti 1 dan *Hyaline Cast* = 0,
B. Degenerasi Bengkak Keruh = 1,
C. Nekrosis inti = 1,
D. Nekrosis inti = 2,
E. *Hyaline Cast* = 1,
F. *Hyaline Cast* = 2

9.7. Parameter Hematologi (Hidayat, et al., 2018b)

Parameter hematologi tikus Wistar yang diinduksi Gentamicin diperiksa pada hari ke 7 dan 35 menggunakan alat hematoanalyzer.

Gambar 9.16.
Pemeriksaan Hematologi menggunakan Hematoanalyzer

Tabel 9.7.
Hasil Analisis Data Profil Hematologi (Hidayat, et al., 2018b)

Tabel 9.7. Hasil Analisis Data profil Hematologi

Kelompok	Lekosit (10^3/mm^3)		Hb (g/dL)		Eritrosit (x10^6/mm^3)		Trombosit (10^3/mm^3)	
	H7	H35	H7	H35	H7	H35	H7	H35
1	8.1±0,31	7.0±0,51	13.4±0,13	12.1±0,23	6.7±0,05[a]	6.5±0,08	546,0±59,07	489,3±54,11[c]
2	7.7±0,53	7.20±0,37	13.7±0,14	11.6±0,40[b]	7.6±0,08	6.2±0,03[bc]	475,6±57,37	548,0±96,97[c]
3	8.6±0,40	7,9±0,65	14.0±0,16	13.5±0,20	8.3±0,07	7.0±0,07	397.0±33,79	525,1±53,98[c]
4	8.1±0,31	9.2±1,19	14.1±0,21	13.5±0,08	7.8±0,08	5.8±0,09[c]	466,5±22,30	647,8±75,39[b]
5	10.4±0,43[a]	7.1±0,50c	14.3±0,14	13.7±0,12	8.6±0,05	7.1±0,07[c]	420,6±49,53	474,5±52,24
6	8.9±0,57	6.7±0,39	14.4±0,45	13.3±0,08	7.4±0,12	6.5±0,05	560.5±36,86	556.2±105,27[b]
7	7.1±0,40[a]	6.4±0,59	12.9±0,17	12.6±0,16	6.6±0,08	6.3±0,06[b]	492.1±100,55	466,1±78,37
8	8.4±0,53	8.1±0,33	13.8±0,19	13.1±0,08	7.6±0,06	6.6±0,06[b]	479.8±52,30	547,7±62,49[c]
9	5.0±0,59[a]	6.1±0,30	11.3±0,26[a]	12.7±0,26	5.5±0,07	5.7±0,08[b]	477.3±84,69	609,7±97,88[c]

Keterangan:
[a] Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol negatif
[b] Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif
[c] Berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Hasil analisis rerata kadar Lekosit pada hari ke 35, hanya kontrol positif (*Gentamicin*) yang berbeda bermakna dari kontrol negatif. Semua kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Hasil analisis rerata kadar Hb, tidak terdapat perbedaan bermakna antara kontrol negatif dan kontrol positif. Pada hari ke 35 semua kelompok perlakuan menunjukkan penurunan kadar rerata Hb, kelompok HPPHB 50 dan 100 mg/kgBB menunjukkan

perbedaan bermakna dengan kontrol positif, namun tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

Hasil analisis rerata kadar Eritrosit pada hari ke 35, kontrol negatif berbeda dengan kontrol positif, demikian pula dengan kelompok HPPHB dosis 100 mg/kgBB, Ketosteril, Vitamin E, Simvastatin dan Fenofibrate. Pada hari ke 35 semua kelompok perlakuan menunjukkan penurunan kadar rerata eritrosit. Hal ini menunjukkan telah terjadi penurunan eritropoetik akibat fungsi ginjal terganggu, namun masih dalam taraf yang dapat dikompensasi karena hasilnya tidak berbeda dengan kelompok pembanding Ketosteril dan Vitamin E

Hasil analisis rerata kadar Trombosit pada hari ke 35, kontrol negatif, kelompok HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB, Ketosteril dan vitamin E menunjukkan peningkatan dibandingkan hari ke 7. Hanya kelompok HPPHB dosis 50 mg/kgBB yang menunjukkan penurunan kadar trombosit. Kontrol negatif berbeda dengan kontrol positif, demikian pula dengan Vitamin E, dan Simvastatin.

(Lanjutan Tabel 9.7)

	MCH (pg/cell)		MCHC (g/dL)		MCV(µm3/cell)		Hematokrit (%)	
	7	35	7	35	7	35	7	35
1	20.1±2,02 [a]	17.6 ±2,23	29.4±0,20 [a]	26.2±0,69 [c]	68.4±0,20 [a]	67.2±0,69 [c]	45.5±0,11 [a]	43.8±0,32
2	18.1±2,34	18.8 ±2,59 [c]	26.9±0,39 [a]	27.9±0,50	67,5±0,39 [a]	67.3±0,50	51.3±0,32	41.4±0,14 [b c]
3	17.0±2,79	17.7±2,12 [c]	25.2±0,65	26.1±0,54	67,6±0,65	67,7±0,54	56.0±0,26	47.1±0,28 [c]
4	18.1±1,42	23.6±7,37 [bc]	26.5±0,33	35.2±0,48 [bc]	68.4±0,33	66.9±0,48 [bc]	53.3±0,30	38.7±0,31 [bc]
5	16.6±1,19	18.0±2,88 [c]	24.2±0,37	26.4±0,57	68.8±0,37	68.1±0,57	59.0±0,19	48.3±0,29 [c]
6	19.5±2,92	20.3±3,14	28.8±0,39 [a]	30.1±0,86	67.8±0,39 [a]	67.6±0,86	50.0±0,39	44.3±0,25
7	19.8±4,19 [a]	21.0±2,61	29.5±0,35 [a]	30.4±0,90 [c]	67.0±0,35 [a]	69.1±0,90 [c]	44.0±0,30 [a]	43.3±0,26
8	18,5±1,37 [a]	20.1±1,89	27.2±0,30 [a]	29.7±0,39	67.9±0,30 [a]	67.6±0,39	51.3±0,26 [a]	44.3±0,62 [bc]
9	20.7±2,09 [a]	22.3±3,14 [b]	29.5±0,41 [a]	33.8±0,32 [b]	71.1±0,41 [a]	66.1±0,32 [b]	38.7±0,31 [a]	37.7±0,27 [b]

Keterangan:

[a] Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol negatif
[b] Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif
[c] Berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Hasil analisis rerata MCH, MCV dan Hematokrit hari ke 35, kontrol negatif berbeda bermakna dengan kontrol positif, demikian pula dengan kelompok HPPHB dosis 100 mg/kgBB dan Ketosteril untuk pemeriksaan hematokrit. Pada pemeriksaan hari ke 35 kontrol negatif mengalami penurunan kadar hematokrit, demikian pula semua kelompok perlakuan kecuali kelompok vitamin E.

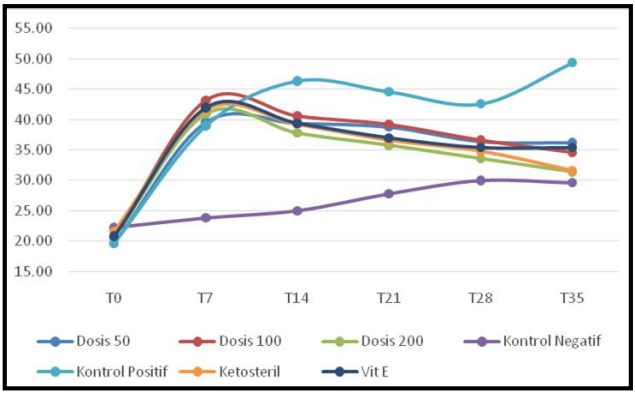
Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan sistem eritropoetik, akibat fungsi ginjal terganggu, rerata kadar Hb dan eritrosit pada semua kelompok perlakuan mengalami penurunan. Namun hal ini masih dalam taraf yang dapat dikompensasi karena hasil kelompok HPPHB tidak berbeda bermakna dengan kelompok pembanding Ketosteril dan Vitamin E.

Gambar 9.17.
Kiri: Tikus dibunuh dalam kotak CO2; Kanan: Pengambilan Serum

9.8. Parameter Fungsi Ginjal

9.8.1. Pengukuran Kadar Ureum (Hidayat, *et al.*, 2018a)

Sampel darah tikus Wistar yang diperoleh disentrifus 6000rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum. Pengukuran kadar ureum serum tikus dilakukan 6 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, ke-28 dan ke-35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri. Hasil pengukuran dapat dilihat pada gambar 9.18 berikut.

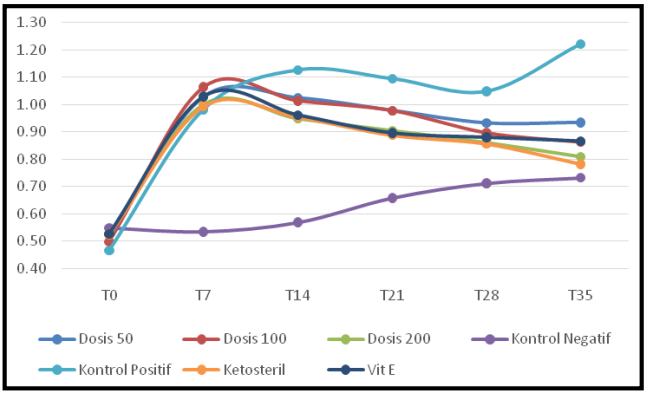


Gambar 9.18.
Grafik Perubahan Rerata Kadar Ureum Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin selama 35 hari

Hasil analisis data antara H0 dan H7 secara statistik dengan uji t-berpasangan menunjukkan bahwa setelah induksi dengan gentamicin 80 mg/kg BB selama 7 hari, terjadi peningkatan kadar ureum secara sangat bermakna ($p<0,01$) kecuali pada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa induksi gagal ginjal dengan gentamicin berhasil. Pada kelompok HPPHB dosis 50mg/kgBB, penurunan kadar ureum terjadi mulai hari ke-21 setelah pemberian zat uji sedangkan pada kelompok HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB, penurunan yang signifikan terjadi mulai hari ke-7 setelah pemberian zat uji. Penurunan kadar ureum serupa terjadi pada kelompok Ketosteril dan vitamin E.

9.8.2. Pengukuran Kadar Kreatinin (Hidayat, *et al.*, 2018a)

Pengukuran kadar kreatinin serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin dilakukan 6 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, ke-28 dan ke-35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri. Hasil pengukuran kreatinin dapat dilihat pada gambar 9.19 berikut.



Gambar 9.19.
Grafik Perubahan Rerata Kadar Kreatinin Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin selama 35 hari

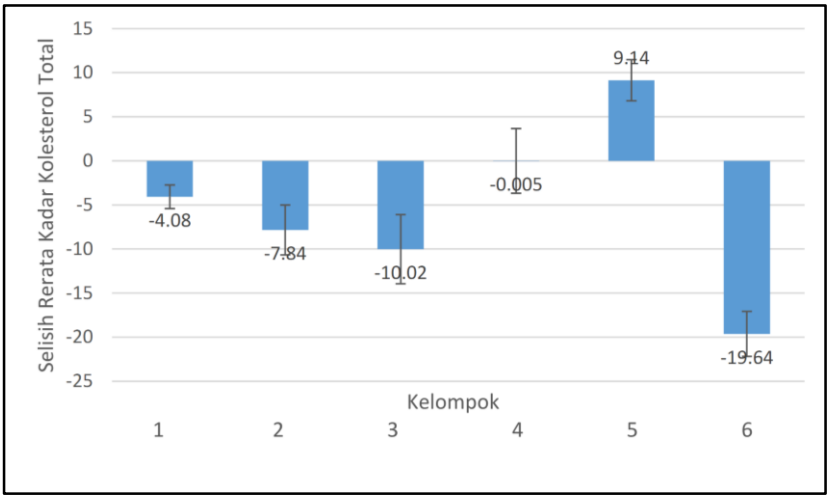
Hasil analisis data secara statistik antara H0 dan H7 dengan uji t-berpasangan menunjukkan bahwa setelah induksi dengan gentamicin 80 mg/kg BB selama 7 hari, terjadi peningkatan kadar kreatinin secara sangat bermakna ($p<0,01$) kecuali pada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa induksi gagal ginjal dengan gentamicin berhasil.

Pada kelompok HPPHB dosis 50 mg/kgBB, penurunan kadar ureum terjadi mulai hari ke-21 setelah pemberian zat uji sedangkan pada kelompok HPPHB dosis 200 mg/kgBB, penurunan yang signifikan terjadi mulai hari ke-14 setelah pemberian zat uji. Penurunan yang signifikan pada kelompok HPPHB dosis 100 mg/kgBB, ketosteril dan vitamin E terjadi mulai hari ke-7 setelah pemberian zat uji.

9.8.3. Pengukuran Kadar Kolesterol Total (Hidayat, et al., 2018c)

Pengukuran kadar kolesterol total serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, dan ke-35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri, dengan enzim *cholesterol*

oxidase-phenol aminophenazone (CHOD-PAP). Hasil selisih kadar kolesterol total antara hari ke-35 dan hari ke-7 dapat dilihat pada gambar 9.20.

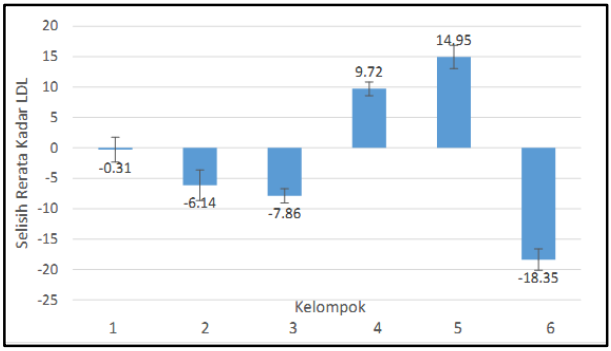


Gambar 9.20.
Grafik Selisih Rerata Kadar Kolesterol Total H 35-H7 (mg/dL)

Berdasarkan parameter kolesterol total, pemberian HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar kolesterol total sangat bermakna ($p<0,05$). Begitu pula halnya pada kelompok yang diberi simvastatin.

9.8.4. Pengukuran Kadar LDL (Hidayat, et al.,2018c)

Pengukuran kadar LDL tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, dan ke-35**.** Pemberian zat uji HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB serta Simvastatin dapat menurunkan kadar LDL hewan uji. Pemberian zat uji dosis 50 mg/kg bb tidak menyebabkan penurunan kadar LDL. Hasil selisih kadar LDL antara hari ke-35 dan hari ke-7 dapat dilihat pada gambar 9.21 di bawah ini:

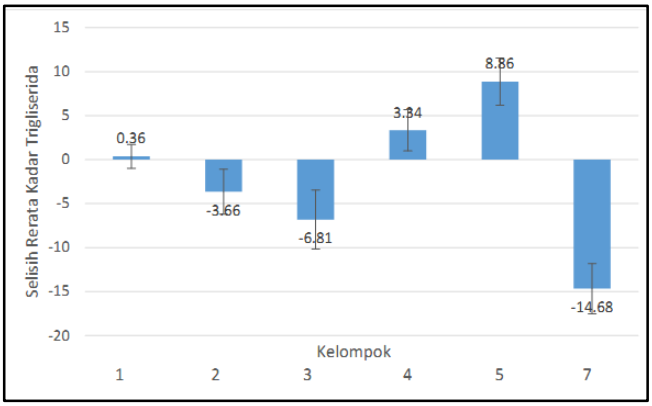


Gambar 9.21.
Grafik Selisih Rerata Kadar LDL H 35-H7 (mg/dL)

9.8.5. Pengukuran Kadar Trigliserida (Hidayat, et al., 2018c)

Pengukuran kadar trigliserida serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, dan ke-35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri, dengan enzim Glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone (GPO-PAP).

Hasil selisih kadar Trigliserida antara hari ke-35 dan hari ke-7 dapat dilihat pada gambar 9.22 di bawah ini:



Gambar 9.22.
Grafik Selisih Rerata Kadar Trigliserida H 35-H7 (mg/dL)

Pada analisis data rerata kadar trigliserida, terlihat penurunan yang bermakna ($p<0,05$) pada kelompok HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB serta kelompok fenofibrate. Hasil uji t-berpasangan rerata kelompok HPPHB dosis 100mg/KgBB/hari, dan 200mg/kgBB/hari antara hari ke 7 dan hari ke 35 menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$). HPPHB dosis 100 mg/kgBB menurunkan kadar trigliserida sebanyak 1,83 mg/dL dan dosis 200 mg/kgBB menurunkan sebanyak 3,5 mg/dL. Dapat dikatakan dosis HPPHB yang efektif untuk menurunkan kadar trigliserida serum tikus Wistar adalah dosis 100mg/KgBB/hari, dan 200mg/KgBB/hari.

HPPHB dapat menurunkan profil lipid tikus Wistar yang meningkat akibat diinduksi gentamicin karena adanya kandungan tanin dan fenol dalam kacang polong hijau (hasil pemeriksaan analisis proksimat yang diperlihatkan pada bab V), selain itu kacang polong hijau mengandung antioksidan yang cukup banyak (hasil pemeriksaan kadar SOD). Tanin dan fenol diduga dapat menghambat oksidasi lemak hingga 94,19%. Tanin mampu mengikat asam amino dan protein lain dengan ikatan hidrogen sehingga terbentuk kompleks tannin-protein yang memblokade resistensi asam amino terhadap enzim pencernaan. Dalam kacang polong terdapat senyawa turunan fenol yang aktif sebagai senyawa antioksidan (Wang X., et al, 1998). Hasil penelitian Stanisavljević menunjukkan bahwa hidrolisat protein kacang polong dengan berat molekul < 10kDa yang dapat diperoleh dari fermentasi kacang polong yang dimurnikan oleh Lactobacillus rhamnosus BGT10 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (Stanisavljević NS, et al., 2015). Semakin kecil berat molekul peptida, semakin mudah untuk diserap oleh tubuh. HPPHB mengandung berat molekul yang cukup kecil, terlihat dari hasil *pemeriksaan SDS PAGE*. Pada pemeriksaan tersebut terlihat banyak pita yang terletak di sekitar dan di bawah 14,4 kDa. Protein yang memiliki berat molekul < 10 kDa terdapat 3 buah yaitu pada pita 9.625 kDa, 8.140 kDa, dan 6.156 kDa, sehingga dapat dikatakan bahwa HPPHB cukup banyak mengandung antioksidan. Menurut

Hörl, perbaikan fungsi ginjal dapat mencegah kehilangan albumin dan penurunan produksi lipoprotein dan trigliserida.

9.9. Pemeriksaan Kadar *Super Oxyde Dismutase* (SOD) (Hidayat, et al.,2018b)

Pengukuran kadar SOD tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamicin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke-0, ke-7, dan ke-35. Kadar SOD darah tikus diperiksa menggunakan metode ELISA dan dibaca dengan alat spektrofotometri.

Tabel 9.8.
Hasil Analisis Data Kadar SOD Hari ke 7 dan ke 35

Kelompok	H0	H7	p* Analisis vs KN	H35	p* Analisis vs KP
HPPHB Dosis 50	88.48±3.13	82.34±3.28	0.000	87.84±3.87	0.000
HPPHB Dosis 100	90.64±0.71	85.00±1.81	0.052	93.44±0.38	0.000
HPPHB Dosis 200	91.48±1.17	86.98±1.45	0.684	93.84±0.54	0.000
Kontrol Negatif	90.22±1.13	87.48±1.39		87.98±1.13	0.000
Kontrol Positif	90.50±1.60	84.76±1.33	0.034	80.98±0.51	
Vit E	90.86±1.13	84.40±1.48	0.018	95.44±0.24	0.000

D0 = *baseline*, hasil pengukuran sebelum induksi
D7 = hasil pengukuran sesudah induksi
D14 = hasil pengukuran sesudah tujuh hari treatment
D21 = hasil pengukuran sesudah empat belas hari treatment
D28 = hasil pengukuran sesudah dua puluh satu hari treatment
D35 = hasil pengukuran sesudah dua puluh delapan hari treatment

Hasil analisis uji Levenne untuk menentukan distribusi data kadar enzim SOD menunjukkan bahwa data awal (H0) berdistribusi normal (p>0,05). Dengan demikian, dapat dilakukan analisis statistik lebih lanjut. Hasil uji homogenitas Kolmogorov Smirnov pada data *baseline* menunjukkan bahwa data homogen (p=0,174) sehingga dapat dilakukan pengolahan analisis data lebih lanjut dengan ANOVA.

Setelah tikus diinduksi dengan gentamicin 80 mg/kg BB selama 7 hari, pada D7 terjadi penurunan kadar SOD. Penurunan yang signifikan (berbeda bermakna terhadap kontrol negatif) terjadi pada kelompok kontrol positif, dosis 50, dan vit E. Setelah pemberian zat uji selama 28 hari, terjadi peningkatan kadar enzim SOD pada semua kelompok, termasuk kelompok kontrol negatif. Setelah dibandingkan secara statistik, peningkatan yang signifikan terjadi pada kelompok dosis 100 dan 200 mg/kgBB, dan vitamin E.

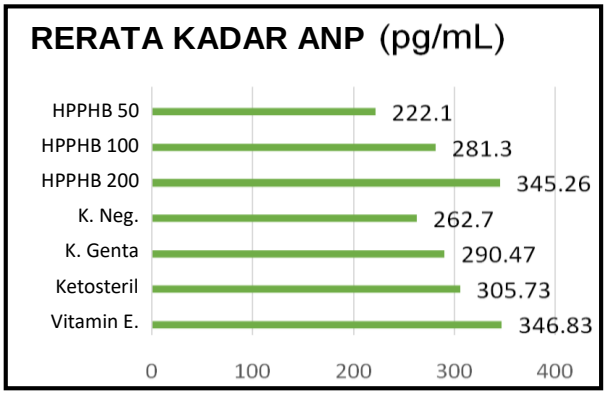
Hasil analisis menggunakan uji t-berpasangan antara rerata SOD hari ke 7 dan ke 35 menunjukkan hasil yang berbeda sangat bermakna ($p<0,01$) pada semua kelompok, menandakan terjadi peningkatan yang sangat bermakna. Pemberian HPPHB dosis 50, 100, 200, dan Vit E mempunyai efek meningkatkan kadar enzim SOD secara sangat bermakna ($p<0,01$). Pada kelompok uji, peningkatan kadar SOD tertinggi ditunjukkan oleh kelompok HPPHB dosis 200mg/kgBB. Pada kelompok kontrol positif, kadar enzim SOD terus menurun.

9.10. Parameter Kadar ANP, COX-1 dan Renin (Hidayat, et al., 2018a)

Pengukuran kadar ANP, COX-1 dan renin dilakukan pada homogenat tikus ginjal kanan menggunakan ELISA dengan kit produksi Qayee-bio dengan tiga kali pengulangan (triplo) di akhir penelitian setelah perlakuan 35 hari. Karena keterbatasan alat yang tersedia dalam penelitian, jaringan ginjal diukur per kelompok sehingga hasil rerata data hanya dapat dihitung per kelompok sebanyak tiga kali. Data ini tidak dapat dianalisis secara statistik, tetapi hanya dianalisis secara deskriptif (Gambar 9.23, 9.24 dan 9.25).

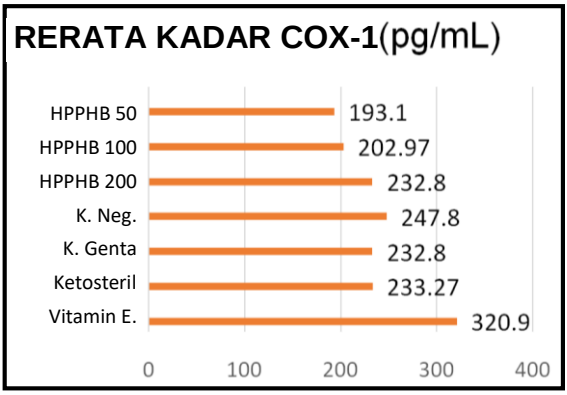
Kadar ANP pada kelompok kontrol negatif dan gentamicin masing-masing adalah 262,70 dan 290,47 pg/mL. Kelompok Ketosteril dan Vitamin E menunjukkan rerata kadar ANP yang baik,

masing-masing dengan nilai 305,73 dan 346,83 pg/mL. Kelompok perlakuan HPPHB menunjukkan hasil yang baik. Hasil kelompok HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. Kelompok HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan rerata kadar ANP tertinggi di antara tiga kelompok perlakuan (345,26 pg/mL), nilainya hanya sedikit lebih rendah daripada kelompok pembanding Vitamin E (346,83 pg/mL) (Gambar 9.23).



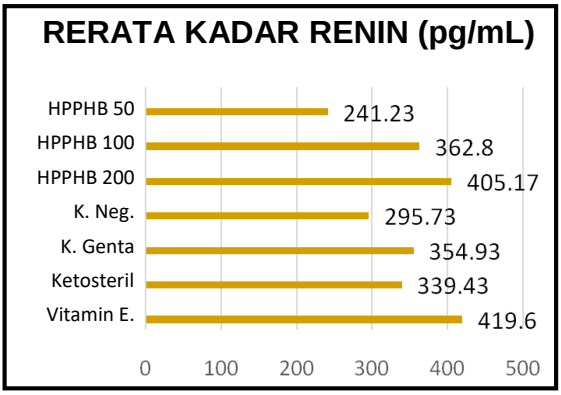
Gambar 9.23.
Rerata Hasil Pemeriksaan ANP pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus Wistar yang diinduksi oleh Gentamicin

Kelompok kontrol negatif menunjukkan kadar COX-1 247,8 pg/mL, sedangkan kontrol gentamicin menunjukkan hasil yang lebih rendah yaitu 232,80 pg/mL. Kelompok pembanding menunjukkan hasil yang baik, terutama kelompok Vitamin E (320,90 pg/mL), sedangkan kelompok Ketosteril hanya menunjukkan 233,27 pg/ml. Di antara kelompok perlakuan, kelompok HPPHB 200 mg/kgBB menunjukkan nilai rerata COX-1 tertinggi (232,80 pg/mL) (Gambar 9.24).



Gambar 9.24.
Rerata Hasil Pemeriksaan COX-1 pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin

Rerata kadar renin pada kelompok kontrol negatif adalah 295,73 pg/mL sementara kelompok kontrol gentamicin adalah 354,93 pg/mL. Di antara tiga kelompok perlakuan, kelompok HPPHB dosis 50 mg/kgBB menunjukkan hasil yang baik (241,23 pg/mL), yang lebih rendah dibandingkan pada kontrol negatif dan positif. Kelompok HPPHB 200 menunjukkan kadar renin yang tinggi (405,17 pg/mL), sedangkan kelompok Ketosteril menunjukkan hasil yang buruk (339,43 pg/mL) dan kelompok Vitamin E menunjukkan hasil yang lebih besar daripada kelompok kontrol positif (419,60 pg/mL) (Gambar 9.25).



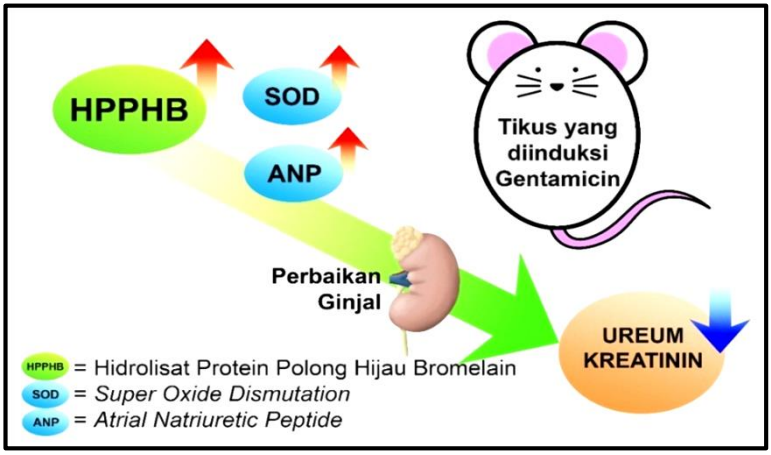
Gambar 9.25.
Rerata Hasil Pemeriksaan Renin pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus Wistar yang diinduksi oleh Gentamicin

Hasil pemeriksaan menunjukkan data yang sulit dijelaskan, yaitu kadar kontrol positif ANP lebih tinggi daripada kadar kontrol negatif. Mempertimbangkan keterbatasan penelitian, sulit menjelaskan hasil kontroversial tersebut. Hal ini mungkin disebabkan mekanisme kompensasi tubuh untuk mencapai homeostasis tekanan darah, sebagaimana yang dikemukakan oleh Ogawa et al., bahwa ANP meningkat pada pasien PGK yang rumit dengan fungsi ginjal yang memburuk. Hubungan antara kadar plasma ANP dengan kerusakan PGK masih perlu diteliti lebih lanjut. Pemberian HPPHB menyebabkan peningkatan kadar ANP sesuai peningkatan besar dosis. Kelompok HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan kadar ANP sebesar 131,42% lebih besar dari kontrol negatif dan 118,86% dari kontrol positif.

Secara umum, pemeriksaan COX-1 menunjukkan hasil yang buruk, dan tiga kelompok perlakuan HPPHB menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada kelompok kontrol gentamicin. Hasil ini mungkin karena durasi pemberian HPPHB kurang lama atau mungkin disebabkan berat molekul peptida aktif yang terkandung

dalam HPPHB lebih dari 3 kDa. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menjelaskan hal ini.

Hasil pengukuran renin kelompok HPPHB menunjukkan hasil yang sedikit baik, lebih rendah dari kontrol negatif (81,57%) dibandingkan dengan kontrol positif (67,96%). Namun perlu dibuktikan bahwa dosis HPPHB yang lebih tinggi meningkatkan kadar renin. Hasil yang sama ditemukan pada kelompok pembanding Ketosteril dan Vitamin E. Rerata kadar renin pada kelompok HPPHB 200 mg/kgBB (405,17 pg/dL) hampir sama dengan kontrol pembanding vitamin E (419,60 pg/dL). Hal ini mungkin disebabkan durasi pemberian perlakuan kurang lama sehingga tubuh masih dalam fase respons adaptasi terhadap kerusakan ginjal yang parah akibat induksi gentamicin.



Gambar 9.26.
Hipotesis Mekanisme HPPHB dalam Memperbaiki Fungsi Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin. Copyright: Geary Giaviany, 2018

Berdasarkan hasil pemeriksaan ini hipotesis mekanisme perbaikan fungsi ginjal oleh HPPHB adalah melalui aktivitas antioksidan SOD dan ANP dan tidak melalui mekanisme COX-1.

ANP memiliki fungsi yang sangat penting dalam penghambatan renin dalam sistem RAS (Kasama, 2008; Gutkowska, 2014). Rerata kadar ANP yang tinggi dari kelompok gentamicin kemungkinan akibat terjadi mekanisme kompensasi tubuh dalam usaha homeostasis tekanan darah (Santos-Araújo, C., 2015; Saito 2010). Kadar ANP perlu diukur beberapa kali untuk mengevaluasi pola dan tren respons tubuh terhadap kondisi ginjal yang sehat maupun cedera.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, hipotesis mekanisme HPPHB dalam memperbaiki fungsi ginjal, yang ditunjukkan dengan penurunan kadar Ureum dan Kreatinin pada tikus yang diinduksi Gentamicin adalah melalui aktivitas SOD (antioksidan) dan ANP (Gambar 9.26).

DAFTAR PUSTAKA

Gutkowska, J., Jankowski, M., & Antunes-Rodrigues, J. (2014). The role of oxytocin in cardiovascular regulation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. https://doi.org/10.1590/1414-431X20133309

Kasama, S., Furuya, M., Toyama, T., Ichikawa, S., & Kurabayashi, M. (2008). Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J. https://doi.org/ehn206 [pii]\r10.1093/eurheartj/ehn206

Crofford, L J. (1997). COX-1 and COX-2 Tissue Expression: Implications and Predictions. The Journal of rheumatology. Supplement.

Gutkowska, J., M. Jankowski, and J. Antunes-Rodrigues. (2014). The Role of Oxytocin in Cardiovascular Regulation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Hidayat, M., Prahastuti, S., Riany, D., Soemardji, A.A., Suliska, N., Garmana, A.N., Assiddiq, B.F., Hasan, K.(2018a). Kidney Therapeutic Potential of Peptides Derived from the Bromelain Hydrolysis of Green Peas Protein. Submitted to Iranian Journal of Basic Medical Science.

Hidayat, M., Prahastuti, S., Aurelia, A., Soemardji, A.A., Suliska, N., Garmana, A.N., Hasan, K. (2018b). Potential of Protein Hydrolysate of Green Peas to Gentamycin-Induced Wistar Rats by Organ Index, Haematology, Lipid profile and Histopathology Parameters. Submitted to Indian Journal of Pharmacology.

Kasama, S. (2008). Effect of Atrial Natriuretic Peptide on Left Ventricular Remodeling in Patients with Acute Myocardial Infarction. Eur Heart J.

Levin, E R, Gardner, D.G.. and W K Samson. (1998). Natriuretic Peptides. The New England journal of medicine.

Li, Huan et al. (2011). Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. J Agric Food Chem.

Mingeot-Leclercq, Marie Paule, and Paul M. Tulkens. (1999). Amino glycosides: Nephrotoxicity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Ogawa, N. et al. (2015). "Plasma Levels of Natriuretic Peptides and Development of Chronic Kidney Disease." BMC Nephrology.

Putri AY, Thaha M. (2014). Role of Oxidative Stress on Chronic Kidney Disease Progression. Acta Med Indones-Indones J Intern Med. 46(3): 245-251

Pavle Randjelović, Slavimir Veljković, Nenad Stojiljković, Dušan Sokolović, Ivan Ilić. (2017). Gentamicin Nephrotoxicity in Animals: Current Knowledge and Future Perspectives. EXCLI J. 16:388-399

Saito, Yoshihiko. (2010). Roles of Atrial Natriuretic Peptide and Its Therapeutic Use. Journal of Cardiology.

Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab, A., Pestana, M. (2015). Clinical Value of Natriuretic Peptides in Chronic Kidney Disease. Nefrologia 35(3): 227–233.

www.revistanefrologia.com.

Sawardekar S.B., Patel. T.C.(2015). Evaluation of the effect of *Boerhavia diffusa* on Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. J Ayurveda Integr Med. 6(2): 95–103.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484055/

Stanisavljević NS, Goran N. Vukotić GN, Pasto FT3, Sužnjević D, J. Z. (2015). Antioxidant Activity of Pea Protein Hydrolysates Produced By Batch Fermentation With Lactic Acid Bacteria. *Archives of Biological Sciences, 67*(3), 1033–1042.

Wang X, Warkentin, T.D., Briggs C.J., Oomah B.D., Campbell, C.G., Woods, S. (1998). Total phenolic and condensed tannins in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Euphytica. 101(1): 97–102

BAB X
ANALISIS *PROTEOMIC* HIDROLISAT PROTEIN KACANG POLONG HIJAU BROMELAIN MENGGUNAKAN METODE LC-MS/MS

10.1 *Proteomic*

Proteomic adalah ilmu yang mempelajari *proteome* atau kandungan protein yang terdapat pada organisme. Sumber lain mengatakan bahwa *proteomic* mempelajari segala hal tentang protein sel atau organisme secara lengkap. Bidang ini merupakan bidang ilmu baru yang dikembangkan khusus untuk mempelajari protein, serta mendefinisikan *proteome*, yang merupakan kandungan protein keseluruhan organisme yang dikode oleh protein genomnya. *Proteomic*, didefinisikan sebagai pengetahuan yang lengkap dari protein dalam sebuah sel atau organisme, mencakup pemahaman struktur, fungsi, dan interaksi dari seluruh kandungan protein suatu organisme. Salah satu metode analisis *proteomic* yang paling berkembang saat ini adalah LC-MS/MS.

Proteomic bertujuan untuk memperoleh gambaran struktur dan fungsi protein sel yang jelas pada skala besar. Berdasarkan pengetahuan *proteomic* kita dapat memahami struktur, fungsi sel dan organisme secara keseluruhan. Data yang didapat dari *proteomic* dapat dimanfaatkan untuk berbagai aplikasi melalui identifikasi protein, misalnya sebagai penanda penyakit atau menegakkan diagnosis, target obat yang baru atau terapi penyakit tertentu. *Proteomic* menjadi alat baru untuk memahami protein, yang merupakan molekul aktif dari sel yang berperan penting dalam mengendalikan semua kegiatan biofisik dan biokimia makhluk hidup. Melalui *proteomic* didapat pemahaman protein yang lebih baik, yaitu pengetahuan struktur, fungsi, dan interaksi protein.

Konsep satu gen-satu enzim dari Beadle dan Tatum menjadi dasar ilmu yang penting untuk menganalisis protein. Konsep ini menjadi dasar dari alat spektrometri massa untuk menguraikan struktur, fungsi dan bioinformatika protein genomik (Mishra, 2010).

10.2. Pendahuluan *Proteomic*

Istilah "*Proteomic*" berasal dari kata protein dan genom. Istilah ini menjelaskan keseluruhan koleksi protein yang dikode oleh genom dalam satu makhluk hidup. Sebagaimana telah diketahui, protein mengendalikan fenotipe dan melakukan semua fungsi sel dengan membangun strukturnya. Protein yang rusak menjadi penyebab utama penyakit dan dapat menjadi indikator yang bermanfaat untuk mendiagnosis penyakit tertentu. Protein menjadi target utama dari obat-obatan dan pengetahuan tentang protein menjadi dasar untuk pengembangan obat baru. Oleh karena itu, studi *proteomic* sangat penting dalam memahami peran protein dalam menyebabkan dan mengendalikan penyakit serta kesehatan manusia (Bedogni et al., 2006*;* Mishra, 2010).

Pada sebagian besar makhluk hidup, protein dikode oleh DNA dan pada beberapa jenis virus oleh RNA. Dalam semua kasus

kecuali virus RNA, DNA di transkripsi menjadi RNA, yang kemudian diterjemahkan menjadi protein. Dalam virus, RNA dapat diterjemahkan langsung menjadi protein. Awalnya, diperkirakan satu gen membuat hanya satu enzim, dalam mengendalikan fenotipe. Akan tetapi dalam beberapa dekade terakhir pandangan ini mengalami perubahan yang luar biasa terutama karena ditemukan sifat pemisahan gen eukariota, yang melibatkan pemisahan RNA (*splicing*), pengeditan RNA, dan fenomena RNA membungkam (*silence*). Dalam eukariota, urutan pengkodean gen ekson terganggu oleh peregangan *non-coding* nukleotida yang disebut intron. Ekson itu disambung setelah pengangkatan intron dari gen; (*cis splicing*) secara terus menerus atau tanpa henti (disebut sebagai *splicing alternatif*) atau antara kedua ekson gen yang berbeda (*transsplicing*). Modus penyambungan ekson yang berbeda dan modifikasi protein pasca-translasi bertanggung jawab untuk keanekaragaman protein dalam organisme eukariota. Pada manusia terdapat sekitar 23.000 gen dan lebih dari 500.000 protein (Mishra, 2010).

Sanggahan terhadap hipotesis satu gen-satu enzim terjadi karena ditemukan gen penekan (*suppressor*) dan sifat gen yang terpecah (*splicing*). Dogma sentral (Kleiner et al., 2005; Crick, 1970) dalam biologi molekul dan penjelasan kode genetik (Leder dan Nirenberg 1964, Khorana 1968), menerangkan bagaimana gen *suppressor* bekerja. Dengan demikian, mekanisme aksi gen *suppressor* tidak bertentangan dengan konsep satu enzim satu gen, hingga batas tertentu. Berdasarkan dogma sentral, dapat dimengerti bahwa gen atau segmen DNA tertentu menjadi kode untuk protein yang berbeda atau bagian pengode protein dalam DNA didistribusikan di hamparan besar DNA yang terganggu oleh urutan *non-coding*. Jadi konsep satu gen-satu-enzim hanya berlaku untuk gen yang mengode satu polipeptida, memiliki sifat *split* dan bisa mengode lebih dari satu protein. Oleh karena itu, konsep satu gen-satu enzim berlaku terbatas pada sifat gen itu sendiri karena hukum pewarisan Mendel; hanya berlaku untuk gen yang terletak di dalam

inti dan bukan pada gen yang berada di luar inti. Hukum Mendel berkaitan dengan lokasi gen, sedangkan konsep satu gen satu enzim terbatas pada sifat gen itu sendiri (Mishra, 2010).

10.3. Rekayasa Protein

Kemampuan para ilmuwan untuk menyintesis protein secara *in vivo* dan *in vitro* telah mengarah pada pengembangan teknologi rekayasa protein. Dengan menggunakan teknologi ini, protein dengan sifat-sifat yang diinginkan dapat diproduksi dalam jumlah banyak. Proses rekayasa protein menggunakan dua metode yang berbeda. Metode yang pertama disebut "disain rasional". Metode ini membutuhkan pengetahuan lengkap tentang struktur protein, yang sulit didapat pada zaman sebelum *proteomic*, namun saat ini, setelah era *proteomic* data lengkap protein telah tersedia. Metode ini menggunakan mutagenesis yang diarahkan ke lokasi yang efektif. Metode kedua disebut "evolusi yang terarah". Metode ini meniru proses evolusi alami karena protein berbeda diproduksi oleh mutagenesis yang terjadi acak namun kemudian diseleksi khusus untuk memilih model yang diinginkan. DNA yang mengode protein yang berbeda digabungkan untuk memperoleh produk gabungan yang diinginkan. Hampir semua laboratorium menggunakan gabungan kedua metode tersebut untuk produksi protein.

Terdapat 2 kekurangan utama dari strategi ini, pertama, metode ini melibatkan beberapa struktur yang rumit dan kedua, memerlukan banyak data yang tidak mungkin diperoleh untuk protein tertentu (Mishra, 2010).

10.4. Situs Aktif dan Regulasi Protein

Salah satu aspek penting dari *proteomic* adalah memahami fungsi protein. Pengetahuan ini sangat penting untuk memahami peran protein sebagai penyebab penyakit dan target terapi obat baru.

Sebagian besar protein mempunyai mekanisme aksi yang khas dalam sel, mungkin dengan cara mengatalisis reaksi biokimia atau berikatan dengan molekul tertentu termasuk molekul protein lainnya. Suatu protein biasanya mempunyai situs (lokasi) aktif sebagai bagian dari strukturnya. Dengan pengetahuan *proteomic*, situs aktif dari suatu enzim dapat ditentukan oleh bioinformatika menggunakan sistem perangkat lunak komputer. Selama berlangsung reaksi enzimatik situs aktif enzim akan berikatan dengan substrat dan terlepas saat reaksi berakhir. Dua model digunakan untuk menjelaskan pengikatan dan katalisis substrat. Model pertama disebut "kunci dan anak kunci," dan model kedua disebut model "induksi yang cocok". Dalam model pertama, situs aktif enzim dan substrat memiliki hubungan yang sangat cocok, seperti kunci dan anak kunci. Dalam model induksi yang cocok situs aktif bukanlah struktur yang mutlak dan dapat memiliki fleksibilitas tertentu di lokasi reaksi. Molekul itu dapat meniru struktur substrat yang berikatan dengan situs aktif dan dapat menghambat ikatan tersebut. Hal ini menjadi dasar pengetahuan untuk mekanisme penghambatan enzim obat-obatan tertentu. Situs-situs aktif tersebut dapat mengikat protein lain atau molekul lainnya dalam hal ini adalah protein non-enzim. Obat-obatan tertentu yang memiliki kemiripan dengan struktur substrat dapat mengikat situs aktif protein dan mampu menghambat aktivitas enzimatik protein dengan cara menghalangi interaksinya dengan substrat alami. Penghambat tersebut dikenal sebagai kompetitif inhibitor, karena mereka bersaing dengan substrat untuk situs aktif proteinnya.

Molekul yang berikatan dengan situs aktif protein berbeda dari molekul-molekul lain yang berikatan dengan protein di tempat lain. Substrat yang sudah berikatan dengan situs menyebabkan perubahan struktur konformasi protein sedemikian rupa sehingga situs tidak dapat berikatan dengan substrat yang lain lagi. Jenis penghambat seperti itu dikenal sebagai inhibitor alosterik dan

inhibitor non-kompetitif, mereka tidak bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan situs aktif.

Penghambat kompetitif dan non-kompetitif mudah dibedakan melalui analisis kinetika menggunakan rumus Kinetika Michaelis Menton. Analisis kinetika dilakukan dengan menghitung 1/V terhadap 1/S, di mana S mewakili konsentrasi substrat dan V menunjukkan kecepatan reaksi biokimia (Bedogni et al., 2006).

10.5. Karakterisasi Protein dalam Isolat Protein Kacang (Reinkensmeier, 2015)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Reinkensmeier dkk, protein kacang diekstraksi pada kondisi pH yang relatif asam atau basa untuk menghasilkan isolat protein. Prosedur tersebut menghasilkan denaturasi sebagian dari protein yang tidak larut pada kondisi pH tertentu. Beberapa fraksi protein kacang polong 'Salamanca' (*Pisum sativum*) diuji hidrofobisitas, sifat kelarutan, kandungan protein, dan parameter fisikokimianya. Sampel yang diteliti adalah: tepung kacang polong utuh (protein 20%), tepung kacang polong yang diperkaya protein dengan udara yang diklasifikasikan (protein 48%), tepung kacang terbuat dari lambung (protein 2,8%), dan isolat protein kacang (protein 81%). Semua sampel menunjukkan kapasitas buffering yang tinggi dalam rentang pH antara 4-10. Hasil penelitian menunjukkan kualitas fraksi isolat protein kacang relatif lebih baik dari protein kacang polong yang diperkaya protein dari udara yang diklasifikasikan. Daya larut isolat protein kacang dapat ditingkatkan dengan cara menambahkan aditif. Tepung yang memiliki kemampuan pengikatan air tertinggi adalah tepung kacang yang tersedia secara komersial diikuti oleh tepung kulit kacang. Fraksinasi dan nilai pH dapat mempengaruhi komposisi dan hidrofobisitas permukaan protein serta kandungan penghambat tripsin (Reikensmeier, 2015).

10.6. Analisis *Proteomic* Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau

Analisis *Proteomic* HPPHB dilakukan menggunakan Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analisis LC─MS/MS dilakukan pada spektrometer massa Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Jerman) dengan sistem Thermo RSLCnano Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA). Peptida dianalisis menggunakan kromatografi cair terbalik dengan sistem RP-LC yang dilengkapi kolom perangkap (Thermo Scientific, P/N 164649), kolom analisis (75 cm x 15 cm, Easy Spray Column PepMap, Thermo Fisher Scientific). Peptida disemprot menggunakan emitor yang dipasang pada sumber ionisasi nanospray bersama dengan kolom analitik. Peptida dimuat pada kolom awal dan dibilas menggunakan asam format 0,1% dalam air selama 2 menit, kemudian diukur pada kolom analisis menggunakan gradien mulai dari 5%-7% B selama 5 menit, 7%-28% selama 100 menit, 28%-60% selama 10 menit, 60%-95% selama 5 menit, untuk total berjalan selama 143 menit termasuk pencucian pada laju alir konstan 0,300 µl/menit. Pelarut A terdiri dari asam format 0,1% dalam air, pelarut B terdiri dari 98% asetonitril dan asam format 0,1%. Q Exactive dioperasikan dalam mode *data-dependent* dengan *scan* survei yang diperoleh pada resolusi 50.000 pada m/z 400. Prosedur dilakukan hingga didapat 10 besar pola isotop yang paling banyak dengan muatan $\geq$ 2 dari pemindaian survei yang dipilih dengan jendela isolasi 1,6 dan terfragmentasi oleh energi tumbukan normal 35. Waktu injeksi ion maksimum untuk pemindaian survei dan pemindaian MS/MS masing-masing adalah 20 dan 60 menit, dan nilai target ion untuk kedua mode pemindaian diatur ke 1E6, pengecualian untuk sekuens peptida dinamis ditetapkan 30 detik. Data LC-MS/MS dilacak menggunakan algoritma pencarian Sequest pada *Proteome Discoverer* (versi 2.1, Thermo Scientific), terhadap database protein *Pisum sativum* ID 3888 yang diunduh dari

SwissProt (diperbaharui 31 Juli 2017). Parameter pencarian adalah: a) rentang prekursor massa antara 350 hingga 8000 Da; b) jumlah puncak ditetapkan paling sedikit 5; c) sinyal ambang kebisingan diatur ke 1,5; d) bromelain dan Tripsin digunakan sebagai enzim proteolitik yang memungkinkan terjadinya pemisahan; e) toleransi prekursor massa sebesar 20 ppm dan toleransi fragmen 0,1 Da; f) oksidasi metionin sebagai modifikasi variabel dan karbamidometilasi sistein sebagai modifikasi tetap; dan g) 0.1% *false discovery rate* (FDR).

Hasil dari SDS PAGE menunjukkan bahwa HPPHB berada pada pita molekuler sekitar 14 kD. Fragmen peptida ini tergolong besar untuk analisis MS dan dikhawatirkan tidak dapat terionisasi sepenuhnya; akibatnya MS tidak dapat mendeteksi dan menganalisis sinyal fragmen peptida ini. Oleh karena itu, digunakan Tripsin untuk memotong fragmen yang mengandung protein hidrolisat kacang polong hijau. Protein terhidrolisis bromelain dipecah menjadi peptida yang lebih kecil oleh enzim Tripsin, sehingga ukuran peptida ini lebih sesuai untuk analisis MS. Selain itu, peptida yang di hidrolisis tripsin lebih mudah terionisasi dan dideteksi oleh spektrometri massa MS. Hasil analisis LC-MS/MS sampel setelah di hidrolisis ulang menggunakan Tripsin terdapat 35 jenis protein yang diidentifikasi.

Protein hidrolisat kacang hijau menggunakan bromelain dalam penelitian ini dianalisis menggunakan *proteomic* LC-MS/MS dengan pilihan enzim non spesifik di Proteome Discoverer karena bromelain tidak termasuk dalam enzim pilihan di alat tersebut. Pada protein hidrolisat yang di hidrolisis hanya menggunakan Bromelain terdapat 10 jenis protein. Tabel 10.1 di bawah ini menunjukkan jumlah total protein teridentifikasi dari hidrolisat protein kacang hijau menggunakan enzim Bromelain dan rehidrolisis menggunakan Tripsin.

Tabel 10.1
Daftar Protein Teridentifikasi pada Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dengan Bromelain dan Rehidrolisis menggunakan Tripsin

No	Nomor Pengujian	Protein Teridentifikasi	Berat Molekul (kDa)	Rheidol (Tripsin)	Hanya Bromelain
1	P81929	Defensin-1 [OS=*Pisum sativum*]	5.2	v	
2	P81930	Defensin-2 [OS=*Pisum sativum*]	5.4	v	
3	P56679	*Seed trypsin/chymotrypsin inhibitor* IVB [OS=*Pisum sativum*]	7.9	v	
4	Q41065	*Seed trypsin/chymotrypsin inhibitor* IVA [OS=*Pisum sativum*]	10.5	v	
5	A0A158V755	*Non-specific lipid-transfer protein* 2 [OS=*Pisum sativum*]	12.1	v	
6	A0A161AT60	*Non-specific lipid-transfer protein* 1 [OS=*Pisum sativum*]	12.2	v	
7	Q41066	*Seed trypsin/chymotrypsin inhibitor* TI5-72 [OS=*Pisum sativum*]	12.6	v	
8	P62930	Albumin-1 E [OS=*Pisum sativum*]	13.8	v	
9	P62926	Albumin-1 A [OS=*Pisum sativum*]	13.9	v	
10	P62929	Albumin-1 D [OS=*Pisum sativum*]	13.9	v	
11	P62931	Albumin-1 F [OS=*Pisum sativum*]	13.9	v	
12	P02856	Vicilin, 14 kDa component [OS=*Pisum sativum*]	14	v	V
13	P28640	Dehydrin DHN2 [OS=*Pisum sativum*]	24.5	v	
14	P08688	Albumin-2 [OS=*Pisum sativum*]	26.2	v	V
15	P02867	Lectin [OS=*Pisum sativum*]	30.3	v	V
16	P02855	Provicilin [OS=*Pisum sativum*]	31.5	v	
17	P36907	Endochitinase [OS=*Pisum sativum*]	34.5	v	
18	P21226	Endochitinase A2 [OS=*Pisum sativum*]	34.7	v	
19	P46256	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic	38.4	v	
		isozyme 1 [OS=*Pisum sativum*]			

No	Nomor Pengujian	Protein Teridentifikasi	Berat Molekul (kDa)	Rheidol (Tripsin)	Hanya Bromelain
20	P14594	Legumin B [OS=*Pisum sativum*]	39	v	V
21	P05693	Legumin K [OS=*Pisum sativum*]	39.8	v	V
22	Q3LSN4	Lipoyl synthase 1, mitochondrial [OS=*Pisum sativum*]	41.3	v	
23	Q43814	Ornithine carbamoyltransferase, chloroplastic [OS=*Pisum sativum*]	41.3	v	
24	P13919	Convicilin [OS=*Pisum sativum*]	46.4	v	V
25	P02854	Provicilin [OS=*Pisum sativum*]	46.4	v	V
26	P29500	tubulin beta-1 chain [OS=*Pisum sativum*]	50.5	v	
27	P13918	**Vicilin [OS=**Pisum sativum**]**	**52.2**	v	V
28	P05692	legumin J [OS=*Pisum sativum*]	56.9	v	
29	Q84N37	OBERON-like protein [OS=*Pisum sativum*]	58.3	v	
30	P02857	Legumin A [OS=*Pisum sativum*]	58.8	v	
31	P15838	legumin A2 [OS=*Pisum sativum*]	59.2	v	V
32	Q43093	Granule-bound starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic [OS=*Pisum sativum*]	66.3	v	
33	P13915	Convicilin [OS=*Pisum sativum*]	66.9	v	V
34	Q41059	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 1, chloroplastic/amyloplastic [OS=*Pisum sativum*]	94.1	v	
35	P09918	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 [OS=*Pisum sativum*]	97.6	v	
Total Jumlah Protein Teridentifikasi				**35**	**10**

DAFTAR PUSTAKA

Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A., & Tiribelli, C. (2006). The fatty liver index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology*. https://doi.org/10.1186/1471-230X-6-33

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, *227*, 561–563. Retrieved from http://www.nature.com/nature/index.html

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., … Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. https://doi.org/10.1002/hep.20701

Mishra, N. (2010). *Methodology for Separation and Identification of Proteins and their Interactions*. *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*.

Reinkensmeier, A., Bußler, S., Schlüter, O., Rohn, S., & Rawel, H. M. (2015). Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. *Food Research International*, *76*(P1), 160–167. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.009

BAB XI
SIMPULAN DAN RENCANA PENELITIAN SELANJUTNYA

❖ Simpulan

1. Hidrolisat protein dari beberapa jenis kacang yang di hidrolisis menggunakan Neutrase atau bromelain telah dikarakterisasi dan menunjukkan efek dalam memperbaiki dan menjaga fungsi ginjal tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin, berdasarkan parameter terhadap organ: Bobot badan, Berat Organ (BO), Indeks Organ (IO) sepuluh organ utama dan analisis sediaan histopatologis ginjal, berdasarkan parameter fungsi ginjal: Ureum, Kreatinin; Profil lipid: Kolesterol Total, *Low Density Lipoprotein* (LDL), *High Density Lipoprotein* (HDL), Trigliserida; dan Asam Urat, berdasarkan parameter mekanisme: *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), *Cyclooxygenase*-1 (COX-1) dan Renin. Hidrolisat protein dari kacang polong hijau yang di hidrolisis menggunakan bromelain (HPPHB) menunjukkan efek paling baik berdasarkan parameter-parameter tersebut. Hipotesis mekanisme kerja HPPHB adalah melalui aktivitasCOX─1.
2. HPPHB telah dikarakterisasi dan terbukti menunjukkan efek perbaikan fungsi ginjal tikus Wistar jantan yang diinduksi

Gentamycin, berdasarkan parameter terhadap organ: Indeks Organ (IO) jantung dan ginjal, dan analisis sediaan histopatologis ginjal, berdasarkan parameter fungsi ginjal: Ureum, Kreatinin; Hematologi, Profil lipid: Kolesterol Total, LDL, Trigliserida; berdasarkan parameter mekanisme: SOD, ANP, COX-1 dan Renin; serta analisis *proteomic*s. HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan efek paling baik berdasarkan parameter-parameter tersebut dan disimpulkan sebagai dosis efektif. Hipotesis mekanisme kerja HPPHB adalah melalui aktivitas antioksidan dan ANP.

❖ **Simpulan Tambahan dari Simpulan 1:**

- Hasil uji Kunitz Aktivitas Neutrase: 40,650 U/mg sedangkan Bromelain: 35.773 U/mg, aktivitas spesifik total antara kedua enzim hampir sama. Hasil SDS PAGE: Hidrolisat protein yang menggunakan enzim Neutrase umumnya memiliki rentang berat molekul yang lebar mulai dari <14,4 kDa hingga 25,0 kDa. Hidrolisat protein yang menggunakan enzim bromelain umumnya memiliki rentang berat molekul kecil, yaitu di bawah 14,4 kDa.
- HPPKN menunjukkan pH 3.9; kandungan protein 40,84 mg/mL, HPPKB pH 3.8; kandungan protein 27,61 mg/mL, HPKGN pH 4.2; kandungan protein 32,93 mg/mL, HPKGB pH 4.2; kandungan protein 22,30 mg/mL, HPPHN pH 3.6; kandungan protein 56,69 mg/mL, HPPHB pH 3.7; kandungan protein 47,31 mg/mL, HPPPIN pH 7,3; kandungan protein 61,59 mg/mL, HPPPIB pH 7.2; kandungan protein 37,56 mg/mL.
- Berdasarkan BO dan IO, pemberian semua jenis hidrolisat protein menunjukkan hasil tidak berbeda bermakna dengan hasil kelompok kontrol negatif. Hasil analisis BO ovarium kelompok HPPKB, HPPHN dan HPPPIN menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol Cisplatin. Hasil analisis IO

jantung kelompok HPKGN dan HPKGB menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol Cisplatin.

- Berdasarkan parameter histopatologis ginjal, kelompok yang menunjukkan perbaikan skor histopatologis (degenerasi bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline cast*) paling baik adalah kelompok HPPHB.
- Berdasarkan parameter Ureum dan Kreatinin, semua jenis hidrolisat protein kacang memberikan efek menurunkan kadar Ureum dan Kreatinin, namun kelompok yang menunjukkan penurunan paling baik adalah kelompok HPPHB, tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($p > 0,05$) dan berbeda sangat signifikan dengan kontrol Cisplatin ($p < 0.05$).
- Berdasarkan parameter profil lipid, kelompok yang menunjukkan hasil kolesterol total paling baik adalah HPPKN, kelompok yang menunjukkan hasil HDL paling baik: HPPHB, kelompok yang menunjukkan hasil LDL paling baik: HPPKN dan kelompok yang menunjukkan hasil trigliserida paling baik: HPPKN.
- Berdasarkan parameter asam urat, kelompok yang menunjukkan hasil paling baik adalah HPPPIB.
- Berdasarkan parameter ANP, COX-1 dan Renin yang dianalisis secara deskriptif, parameter ANP dan Renin menunjukkan hasil pemeriksaan yang kurang baik. Parameter COX-1 menunjukkan hasil pemeriksaan yang cukup baik. Kelompok yang menunjukkan kadar rerata COX-1 yang paling tinggi adalah kelompok HPPHB. Mekanisme perbaikan fungsi ginjal kemungkinan disebabkan karena aktivitas COX-1.

❖ **Simpulan Tambahan dari Simpulan 2:**

- Karakteristik serbuk kacang polong hijau mengandung Tanin dan Fenol yang cukup tinggi. HPPHB adalah mengandung protein sebanyak 48,778 mg/mL, dengan pH 4,9 dan memiliki 3 buah

protein dengan berat molekul yang lebih kecil dari 10 kDa, yaitu 9,625 kDa, 8,140 kDa dan 6,156 kDa.

- Berdasarkan parameter IO ginjal, pemberian HPPHB dosis 50 mg/kgBB menunjukkan hasil sama dengan kontrol negatif. HPPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB menunjukkan hasil tidak berbeda bermakna dengan hasil kelompok kontrol pembanding Ketosteril dan Vitamin E. Pada parameter IO jantung semua kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.
- Berdasarkan parameter histopatologis ginjal semua kelompok perlakuan, kelompok kontrol negatif dan positif menunjukkan terjadi degenerasi tubulus bengkak keruh yang ringan, dosis yang menunjukkan perbaikan skor histopatologis nekrosis inti paling baik adalah kelompok HPPHB 100 mg/kgBB, untuk *hyaline cast* adalah kelompok HPPHB 200 mg/kgBB.
- Berdasarkan parameter hematologi, induksi gentamycin menyebabkan penurunan Hb, Ht dan eritrosit, karena fungsi ginjalnya terganggu. Pemberian HPPHB belum memberikan pengaruh terhadap gangguan sistem eritropoeitin, kemungkinan waktu pemberian perlakuan kurang lama. Hasil kelompok yang diberikan HPPHB dosis 200 mg/kgBB tidak berbeda dengan hasil kelompok kontrol pembanding Ketosteril dan Vitamin E.
- Berdasarkan parameter Ureum dan Kreatinin, semua dosis HPPHB memberikan efek menurunkan kadar Ureum dan Kreatinin, namun kelompok yang menunjukkan penurunan paling baik adalah kelompok HPPHB dosis 200 mg/kgBB.
- Berdasarkan parameter profil lipid, baik kolesterol total, LDL maupun trigliserida, kelompok yang menunjukkan hasil paling baik adalah HPPHB dosis 200 mg/kgBB. Semakin besar dosis HPPHB penurunan profil lipid semakin besar.
- Berdasarkan parameter SOD, semua dosis HPPHB memberikan efek meningkatkan kadar SOD, namun kelompok yang menunjukkan peningkatan paling besar adalah kelompok HPPHB

dosis 200 mg/kgBB, kadar SOD meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. Hipotesis mekanisme perbaikan fungsi ginjal adalah karena efek antioksidan dalam HPPHB.

- Berdasarkan parameter ANP, COX-1 dan Renin, rerata hasil meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan rerata kadar ANP, COX-1 dan Renin yang paling tinggi. Setelah dilakukan analisis secara deskriptif, dengan dibandingkan dengan kontrol negatif, maupun kontrol positif, maka hanya parameter ANP yang dinilai mempunyai efek baik untuk perbaikan fungsi ginjal. Mekanisme perbaikan fungsi ginjal kemungkinan disebabkan karena ANP.
- Hasil *proteomics* HPPHB ditemukan 10 jenis protein sesuai *database* protein *Pisum sativum* ID 3888

❖ Rencana Penelitian Selanjutnya

Pada penelitian ini telah dilakukan serangkaian percobaan dan pengukuran efektivitas hidrolisat protein kacang polong hijau yang di hidrolisis menggunakan bromelain dalam menjaga PGK, memelihara dan memperbaiki fungsi ginjal. Telah di dapat hasil sesuai dengan tujuan penelitian yaitu hidrolisat protein yang menunjukkan hasil paling baik yaitu HPPHB, dosis efektif untuk HPPHB adalah 200mg/kg BB dan hipotesis mekanisme kerja HPPHB adalah melalui efek antioksidan, COX-1 atau ANP. Penemuan ini akan dilanjutkan dengan pengujian mekanisme kerja lebih lanjut serta uji keamanan dari HPPHB. Rencana pengujian mekanisme kerja dilakukan menggunakan uji *in vitro* HPPHB pada sel glomerular mesangial yang induksi glukosa sebagai model PGK dengan parameter uji viabilitas, fibronektin, TGF-β dan ROS serta uji keamanan berupa uji toksisitas akut untuk menentukan nilai LD50, uji alergenik dari hidrolisat protein dan uji toksisitas sub-kronis.

LAMPIRAN - LAMPIRAN

1. Hasil Analisis Komposisi Kacang Polong Hijau, Kacang Polong Kuning, Kacang Gude, dan Protein Isolat Kacang Polong

LABORATORIUM NUTRISI TERNAK RUMINANSIA DAN KIMIA MAKANAN TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN UNIVERSITAS PADJADJARAN
Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21
Telp. (022) 779 1662, Fax (022) 789 212, Hp. 0812 226 5766, 0813 207 234 17 Jatinangor Sumedang 45363

No Surat : 146b/AN/LNTRKMT/V/2017
Nama Pelanggan : dr. Meilinah Hidayat
Tanggal Masuk Analisa : 5 Mei 2017
Tanggal Selesai Analisa : 17 Mei 2017
Nama Sampel : Protein Isolat Canada

HASIL ANALISA

No	NAMA ANALISIS	SAMPEL Protein Isolat Canada
I.	**PROKSIMAT6,54**	
	1. AIR (%)1,86	6.54
	2. ABU (%)70,21	1,86
	3. PROTEIN (%)	70,21
	4. SERAT KASAR (%)	0,00
	5. LEMAK KASAR (%)	6,24
	6. KARBOHIDRAT (%)	-
	7. TDN	-
	8. ENERGI BRUTTO (kkl/kg)	3086
II	**MINERAL**	
	1.KALSIUM (Ca) (%)	-
	2.PHOSFOR (P) (%)	-
	3 NaCL (%)	-
III	**VAN SOEST**	
	1.ADF (%)	-
	2.NDF (%)	-
	3.LIGNIN (%)	-
	4.SELULOSA (%)	-
	5.HEMISELULOSA (%)	-
IV	**IN VITRO**	
	1. KecernaanBahanOrganik (KCBO)	-
	2. KecernaanBahanKering (KCBK)	-
	3. Bakteri	-
	4. Protozoa	-
	5. NH3 mM	-
	6. VFA	-
V.	**LAIN LAIN**	
	1. BilanganPeroksida	-
	2. TVB	-
	3. pH	-
	4. C/N Ratio	-
	5. Nitrogen (%)	-
	6. Carbon (%)	-

Ket : 1. Hasil Uji Ini Hanya berlaku untuk sampel yang dikirim
2. Hasil Analisa berdasarkan Bahan Kering

Kepala Laboratorium

Ir. Atun Budiman,MSi
NIP. 196408051993031001

LABORATORIUM NUTRISI TERNAK RUMINANSIA DAN KIMIA MAKANAN TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN UNIVERSITAS PADJADJARAN

Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21
Telp. (022) 779 1662, Fax (022) 789 212, Hp. 0812 226 5766, 0813 207 234 17 Jatinangor Sumedang 45363

No Surat : 146a/AN/LNTRKMT/V/2017
Nama Pelanggan : dr. Meilinah Hidayat
Tanggal Masuk Analisa : 5 Mei 2017
Tanggal Selesai Analisa : 17 Mei 2017
Nama Sampel :

HASIL ANALISA

No	NAMA ANALISIS	SAMPEL		
		Kacang Polong Kuning	Kacag Polong Hijau	Kacang Guede
I.	**PROKSIMAT**			
	1. AIR (%)	7,72	8,87	10,37
	2. ABU (%)	2,04	1,29	2,96
	3. PROTEIN KASAR (%)	26,66	25,71	23,87
	4. SERAT KASAR (%)	5,93	6,38	6,94
	5. LEMAK KASAR (%)	10,78	9,28	4,12
	6. BETN (%)	-	-	-
	7. TDN (%)	-	-	-
	8. ENERGI BRUTTO (kkl/kg)	4015	4209	3472
II	**MINERAL**			
	1.KALSIUM (Ca) (%)	-	-	-
	2.PHOSFOR (P) (%)	-	-	-
	3.NaCL (%)	-	-	-
IIi	**VAN SOEST**			
	1.ADF (%)	-	-	-
	2.NDF (%)	-	-	-
	3.LIGNIN (%)	-	-	-
	4.SELULOSA (%)	-	-	-
	5.HEMISELULOSA (%)	-	-	-
IV	**IN VITRO**			
	1. Kecernaan Bahan Organik (KCBO)	-	-	-
	2. Kecernaan Bahan Kering (KCBK)	-	-	-
	3. Bakteri	-	-	-
	4. Protozoa	-	-	-
	5. NH3	-	-	-
	6. VFA	-	-	-
V	**LAIN LAIN**			
	1. Bilangan Peroksida	-	-	-
	2. TVB	-	-	-
	3. NPN	-	-	-
	4. PH	-	-	-
	5. Air Destilasi	-	-	-

Ket : 1. Hasil Analisa Berdasarkan Bahan Kering
2. Hasil Analisa ini Hanya berlaku untuk sampel yang dikirim

Kepala Laboratorium

ir. Atun Budiman,MSi
N.P. 196408051993031001

2. Hasil Determinasi Kacang Polong Kuning, Kacang Polong Hijau, Kacang Gude, dan Protein Isolat Kacang Polong

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

Nomor : 1179/I1.CO2.2/PL/2017. 21 Maret 2017.
Hal : Determinasi tumbuhan

Kepada yth.
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Kristen Maranatha
Jalan Prof.drg. Surya Sumantri No. 65
Bandung

Memperhatikan surat permintaan Saudara dalam surat No.146/FK-UKM/II/ 2017 tanggal 17 Februari 2017 mengenai determinasi tumbuhan, dengan ini kami sampaikan bahwa setelah dilakukan determinasi oleh staf kami, tumbuhan yang dibawa oleh Sdr. Dr.dr.Meilinah Hidayat, M. Kes. (No Pokok : 110165), adalah :

Sampel tanaman 1 : kacang gude

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida (Dicots)
Anak kelas	:	Rosidae
Bangsa		Fabales
Nama suku / familia	:	Papilionaceae / Fabaceae
Nama jenis / species	:	*Cayanus cayan* (L.) Millsp.
Sinonim	:	*Cytisus cayan* L. *Cayanus indicus* Spreng.
Nama umum	:	Pigeon pea (Inggris), kacang bali, kacang gude, kacang kayu, kacang hiris (Sunda).
Buku acuan	:	1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr., R..C.1963. Flora Of Java Volume I. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp : 634 2. Ogata, Y. *et al.* (Committee Members).1989. Medicinal Herb Index in Indonesia. (Second Edition). PT. Eisai Indonesia. Jakarta. pp : 116. 3. van der Maesen.L.J.G.1992. *Cayanus cayans* (L.) Millsp. In : van der Maesen, L.J.G. & Somaatmadja, S. (Eds.) Plant Resources of South-East Asia No 1 Pulses. Prosea Foundation. Bogor, Indonesia. pp : 39 - 42. 4. Ochse,J.J. & Bakhuizen van den Brink, R.C.1931.Vegetables of the Dutch East Indies, English edition of "Indische Groenten". Printed and Edited by Archipel Drukkerij Buitenzorg-Java. pp: 370 – 372. 5. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. pp.Xiii - XViii

Sampel tanaman 2 : kacang polong hijau

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida (Dicots)
Anak kelas	:	Rosidae
Bangsa		Fabales
Nama suku / familia	:	Papilionaceae / Fabaceae
Nama jenis / species	:	*Pisum sativum* L.
Sinonim	:	
Nama umum	:	ea (Inggris), kacang polong, kacang kapari (Indonesia).
Buku acuan	:	1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr., R..C.1963. Flora Of Java Volume I. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp : 634 2. Ogata, Y. *et al.* (Committee Members).1989. Medicinal Herb Index in Indonesia. (Second Edition). PT. Eisai Indonesia. Jakarta. pp : 116. 3. Davies, D.R.1992. *Pisum sativum* L. In : van der Maesen, L.J.G. & Somaatmadja, S. (Eds.) Plant Resources of South-East Asia No 1 Pulses. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. pp : 63 - 64. 4. Ochse,J.J. & Bakhuizen van den Brink, R.C.1931.Vegetables of the Dutch East Indies, English edition of "Indische Groenten". Printed and Edited by Archipel Drukkerij Buitenzorg-Java. pp: 422 – 423. 5. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. pp.Xiii - XViii

Sampel tanaman 3 : kacang polong "Australi"

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida (Dicots)
Anak kelas	:	Rosidae
Bangsa		Fabales
Nama suku / familia	:	Papilionaceae / Fabaceae
Nama jenis / species	:	*Pisum sativum* L.
Sinonim	:	
Nama umum	:	Pea (Inggris), kacang polong, kacang kapri (Indonesia).
Buku acuan	:	1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr., R..C.1963. Flora Of Java Volume I. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp : 634 2. Davies, D.R.1992. *Pisum sativum* L. In : van der Maesen, L.J.G. & Somaatmadja, S. (Eds.) Plant Resources of South-East Asia No 1 Pulses. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. pp : 63 - 64. 4. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. pp.Xiii - XViii

Sampel tanaman 4 : kacang polong kuning "Canada "

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida (Dicots)
Anak kelas	:	Rosidae
Bangsa		Fabales
Nama suku / familia	:	Papilionaceae / Fabaceae
Nama jenis / species	:	*Pisum sativum* L.

Sinonim :
Nama umum : Pea (Inggris), kacang polong, kacang kapari (Indonesia).
Buku acuan : 1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr., R..C.1963. Flora Of Java Volume I. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp : 634

2. Davies, D.R.1992. *Pisum sativum* L. In : van der Maesen, L.J.G. & Somaatmadja, S. (Eds.) Plant Resources of South-East Asia No 1 Pulses. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. pp : 63 - 64.
3. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. pp.Xiii - XViii

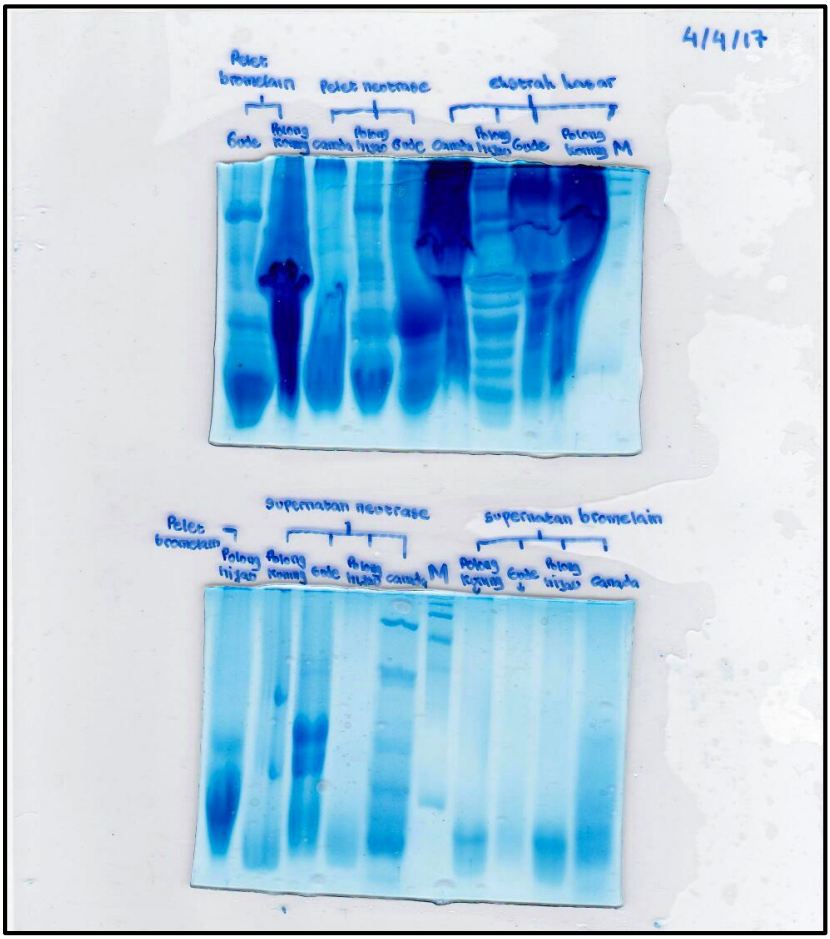
Demikian yang kami sampaikan. Atas perhatian dan kerjasama yang diberikan, kami ucapkan terima kasih.

Wakil Dekan Bidang Sumberdaya,

Dr. Iriawati
NIP. 196205071988032001

Tembusan:
Dekan SITH ITB. sebagai laporan.

3. **Hasil Pemeriksaan SDS-PAGE Serbuk dan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau, Kacang Polong Kuning, Kacang Gude, dan Protein Isolat Kacang Polong** *(Dokumentasi Pribadi).*



4. Tabel Hasil Pengukuran Bobot Badan Masing-masing Tikus, Dosis dan Volume Pemberian 8 Jenis Hidrolisat Protein Menurut Waktu Penelitian

Kelompok	Konsentrasi	No.	BB (g)			Dosis (mg)			Volume pemberian (mL)		
	Minggu	ke	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	(mg/mL)		6/4/17	13/4/17	20/4/17	6/4/17	13/4/17	20/4/17	6/4/17	13/4/17	20/4/17
PHPKN	40.84	1	192	158	160	19.2	15.8	16	0.47	0.39	0.39
	40.84	2	158	147	143	15.8	14.7	14.3	0.39	0.36	0.35
	40.84	3	172	161	154	17.2	16.1	15.4	0.42	0.39	0.38
	40.84	4	185	163	150	18.5	16.3	15	0.45	0.40	0.37
	40.84	5	187	171	158	18.7	17.1	15.8	0.46	0.42	0.39
PHPKB	27.61	6	170	171	174	17	17.1	17.4	0.62	0.62	0.63
	27.61	7	207	182	175	20.7	18.2	17.5	0.75	0.66	0.63
	27.61	8	206	174	189	20.6	17.4	18.9	0.75	0.63	0.68
	27.61	9	180	172	161	18	17.2	16.1	0.65	0.62	0.58
	27.61	10	175	167	159	17.5	16.7	15.9	0.63	0.60	0.58
PHKGN	32.93	11	164	144	140	16.4	14.4	14	0.50	0.44	0.43
	32.93	12	166	153	160	16.6	15.3	16	0.50	0.46	0.49
	32.93	13	196	178	182	19.6	17.8	18.2	0.60	0.54	0.55
	32.93	14	199	164	170	19.9	16.4	17	0.60	0.50	0.52
	32.93	15	139	168	170	13.9	16.8	17	0.42	0.51	0.52
PHKGB	22.3	16	156	158	145	15.6	15.8	14.5	0.70	0.71	0.65
	22.3	17	173	164	159	17.3	16.4	15.9	0.78	0.74	0.71
	22.3	18	141	136	135	14.1	13.6	13.5	0.63	0.61	0.61
	22.3	19	183	167	156	18.3	16.7	15.6	0.82	0.75	0.70
	22.3	20	157	138	146	15.7	13.8	14.6	0.70	0.62	0.65
PHPHN	56.59	21	206	168	183	20.6	16.8	18.3	0.36	0.30	0.32
	56.59	22	189	156	168	18.9	15.6	16.8	0.33	0.28	0.30
	56.59	23	174	156	158	17.4	15.6	15.8	0.31	0.28	0.28
	56.59	24	185	151	157	18.5	15.1	15.7	0.33	0.27	0.28
	56.59	25	182	160	159	18.2	16	15.9	0.32	0.28	0.28
PHPHB	47.31	26	201	162	168	20.1	16.2	16.8	0.42	0.34	0.36
	47.31	27	182	171	182	18.2	17.1	18.2	0.38	0.36	0.38
	47.31	28	168	155	154	16.8	15.5	15.4	0.36	0.33	0.33
	47.31	29	181	152	166	18.1	15.2	16.6	0.38	0.32	0.35
	47.31	30	193	162	173	19.3	16.2	17.3	0.41	0.34	0.37
PHPPIN	61.59	31	181	166	166	18.1	16.6	16.6	0.29	0.27	0.27
	61.59	32	194	156	152	19.4	15.6	15.2	0.31	0.25	0.25
	61.59	33	195	165	146	19.5	16.5	14.6	0.32	0.27	0.24
	61.59	34	197	166	185	19.7	16.6	18.5	0.32	0.27	0.30
	61.59	35	189	168	174	18.9	16.8	17.4	0.31	0.27	0.28
PHPPIB	37.56	36	174	159	166	17.4	15.9	16.6	0.46	0.42	0.44
	37.56	37	189	168	182	18.9	16.8	18.2	0.50	0.45	0.48
	37.56	38	175	150	149	17.5	15	14.9	0.47	0.40	0.40
	37.56	39	192	160	163	19.2	16	16.3	0.51	0.43	0.43
	37.56	40	191	162	181	19.1	16.2	18.1	0.51	0.43	0.48

Kelompok	Konsentrasi	No.	BB (g)			Dosis (mg)			Volume pemberian (mL)		
	Minggu	ke	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	(mg/mL)		6/4/17	13/4/17	20/4/17	6/4/17	13/4/17	20/4/17	6/4/17	13/4/17	20/4/17
K Neg		41	153	147	142	15.3	14.7	14.2			
		42	200	168	175	20	16.8	17.5			
		43	174	163	159	17.4	16.3	15.9			
		44	211	183	195	21.1	18.3	19.5			
		45	173	145	157	17.3	14.5	15.7			
K Cis		46	196	172	183	19.6	17.2	18.3			
		47	200	179	196	20	17.9	19.6			
		48	184	168	176	18.4	16.8	17.6			
		49	161	155	165	16.1	15.5	16.5			
		50	187	166	179	18.7	16.6	17.9			

Kelompok	Konsentrasi	No.	BB (g)			Dosis (mg)			Volume pemberian (mL)		
	Minggu	ke	IV	V	VI	IV	V	VI	IV	V	VI
	(mg/mL)		27/4/17	4/5/17	11/5/17	27/4/17	4/5/17	11/5/17	27/4/17	4/5/17	11/5/17
PHPKN	40.84	1	184	188	192	18.4	18.8	19.2	0.45	0.46	0.47
	40.84	2	168	160	158	16.8	16	15.8	0.41	0.39	0.39
	40.84	3	152	172	172	15.2	17.2	17.2	0.37	0.42	0.42
	40.84	4	173	177	185	17.3	17.7	18.5	0.42	0.43	0.45
	40.84	5	181	182	187	18.1	18.2	18.7	0.44	0.45	0.46
PHPKB	27.61	6	180	182	170	18	18.2	17	0.65	0.66	0.62
	27.61	7	198	201	207	19.8	20.1	20.7	0.72	0.73	0.75
	27.61	8	203	209	206	20.3	20.9	20.6	0.74	0.76	0.75
	27.61	9	184	188	180	18.4	18.8	18	0.67	0.68	0.65
	27.61	10	172	181	175	17.2	18.1	17.5	0.62	0.66	0.63
PHKGN	32.93	11	153	161	164	15.3	16.1	16.4	0.46	0.49	0.50
	32.93	12	172	163	166	17.2	16.3	16.6	0.52	0.49	0.50
	32.93	13	199	196	196	19.9	19.6	19.6	0.60	0.60	0.60
	32.93	14	189	190	199	18.9	19	19.9	0.57	0.58	0.60
	32.93	15	179	181	139	17.9	18.1	13.9	0.54	0.55	0.42
PHKGB	22.3	16	164	162	156	16.4	16.2	15.6	0.74	0.73	0.70
	22.3	17	168	171	173	16.8	17.1	17.3	0.75	0.77	0.78
	22.3	18	144	143	141	14.4	14.3	14.1	0.65	0.64	0.63
	22.3	19	180	181	183	18	18.1	18.3	0.81	0.81	0.82
	22.3	20	157	161	157	15.7	16.1	15.7	0.70	0.72	0.70
PHPHN	56.59	21	208	205	206	20.8	20.5	20.6	0.37	0.36	0.36
	56.59	22	187	189	189	18.7	18.9	18.9	0.33	0.33	0.33
	56.59	23	174	172	174	17.4	17.2	17.4	0.31	0.30	0.31
	56.59	24	179	185	185	17.9	18.5	18.5	0.32	0.33	0.33
	56.59	25	185	187	182	18.5	18.7	18.2	0.33	0.33	0.32
PHPHB	47.31	26	191	203	201	19.1	20.3	20.1	0.40	0.43	0.42
	47.31	27	194	192	182	19.4	19.2	18.2	0.41	0.41	0.38
	47.31	28	175	174	168	17.5	17.4	16.8	0.37	0.37	0.36
	47.31	29	177	180	181	17.7	18	18.1	0.37	0.38	0.38
	47.31	30	188	196	193	18.8	19.6	19.3	0.40	0.41	0.41
PHPPIN	61.59	31	182	188	181	18.2	18.8	18.1	0.30	0.31	0.29

Kelompok	Konsentrasi	No.	BB (g)			Dosis (mg)			Volume pemberian (mL)		
	Minggu	ke	IV	V	VI	IV	V	VI	IV	V	VI
	(mg/mL)		27/4/17	4/5/17	11/5/17	27/4/17	4/5/17	11/5/17	27/4/17	4/5/17	11/5/17
	61.59	32	185	196	194	18.5	19.6	19.4	0.30	0.32	0.31
	61.59	33	185	190	195	18.5	19	19.5	0.30	0.31	0.32
	61.59	34	201	204	197	20.1	20.4	19.7	0.33	0.33	0.32
	61.59	35	196	192	189	19.6	19.2	18.9	0.32	0.31	0.31
PHPPIB	37.56	36	179	180	174	17.9	18	17.4	0.48	0.48	0.46
	37.56	37	194	196	189	19.4	19.6	18.9	0.52	0.52	0.50
	37.56	38	169	173	175	16.9	17.3	17.5	0.45	0.46	0.47
	37.56	39	188	192	192	18.8	19.2	19.2	0.50	0.51	0.51
	37.56	40	199	201	191	19.9	20.1	19.1	0.53	0.54	0.51
K Neg		41	152	161	153	15.2	16.1	15.3			
		42	196	202	200	19.6	20.2	20			
		43	168	172	174	16.8	17.2	17.4			
		44	207	212	211	20.7	21.2	21.1			
		45	169	173	173	16.9	17.3	17.3			
K Cis		46	189	198	196	18.9	19.8	19.6			
		47	208	206	200	20.8	20.6	20			
		48	191	297	184	19.1	29.7	18.4			
		49	174	274	161	17.4	27.4	16.1			
		50	186	190	187	18.6	19	18.7			

REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN
CIPTAAN

Dalam rangka pelindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan	:	EC00201810615, 1 Mei 2018
Pencipta		
Nama	:	**Meilinah Hidayat**
Alamat	:	Jalan Terusan Prof Sutami I No 19 RT 006 RW 003, Bandung, Jawa Barat, Bandung 40163
Kewarganegaraan	:	Indonesia
Pemegang Hak Cipta		
Nama	:	**Meilinah Hidayat, UNIVERSITAS KRISTEN MARANATHA,**
Alamat	:	Jalan Terusan Prof Sutami I No 19 RT 006 RW 003, Bandung, Jawa Barat, Bandung 40163
Kewarganegaraan	:	Indonesia
Jenis Ciptaan	:	**Karya Ilmiah**
Judul Ciptaan	:	**PEMBUATAN DAN PENGUJIAN PROTEIN HIDROLISAT KACANG POLONG HIJAU UNTUK TERAPI PERBAIKAN FUNGSI GINJAL**
Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia	:	1 Mei 2018, di Bandung
Jangka waktu pelindungan	:	Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.
Nomor pencatatan	:	000107038

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

LAMPIRAN
PEMEGANG

No	Nama	Alamat
1	Meilinah Hidayat	Jalan Terusan Prof Sutami I No 19 RT 006 RW 003
2	UNIVERSITAS KRISTEN MARANATHA	Jalan Prof Drg Suria Sumantri 65

GLOSARIUM

Absorbsi: daya jaringan untuk menyerap benda-benda lain dari luar.

Adekuat: memenuhi syarat; memadai; sama harkatnya.

Albumin: jenis protein plasma darah yang memiliki banyak peran, berfungsi mengikat komponen darah sehingga menjaga cairan darah tidak terpisah atau bocor ke dalam jaringan.

Albuminuria: terdapatnya albumin dalam urine, biasanya berkaitan dengan penyakit ginjal.

Aldosteron: hormon steroid yang di sekresi oleh kelenjar adrenal berperan dalam pengaturan keseimbangan garam dan cairan tubuh sehingga digolongkan sebagai mineral okortikoid.

Amonia: senyawa kimia dengan rumus NH_3. Biasanya senyawa ini didapati berupa gas dengan bau tajam yang khas (disebut bau amonia).

Anafilaksis: kenaikan kerentanan suatu organisme terhadap injeksi protein susulan (kedua).

Enzim alosterik: enzim yang mempunyai dua bagian aktif, yaitu bagian aktif yang menangkap substrat dan bagian yang menangkap penghambat.

ALT plasma: *Alanin Amino Transaminase*, enzim yang dibuat oleh sel hati, meningkat apabila terjadi kerusakan pada selaput sel hati dan menunjukkan tingkat kerusakan fungsi hati. Nama lainnya adalah SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*).

Anasarka: pembengkakan menyeluruh di hampir sebab tubuh akibat penimbunan cairan pada jaringan sub-kutan.

Anoreksia: keinginan makan berkurang atau nafsu makan menurun.

Antropometri: ilmu yang mempelajari pengukuran dimensi tubuh manusia (ukuran, berat, volume).

Asam amino esensial: jenis asam amino atau protein yang mutlak dibutuhkan oleh tubuh namun tubuh tidak dapat mensintesisnya sehingga kebutuhannya harus dipasok dari luar dalam bentuk makanan.

Asam keto analog: asam amino yang menghasilkan Nitrogen dalam bentuk Urea yang harus dikeluarkan oleh ginjal, namun dengan adanya asam pada substansi ini, asam dapat mengikat Nitrogen, sehingga terjadi proses daur ulang Nitrogen sekali lagi dalam tubuh dan mengurangi produksi Urea sehingga mengurangi kerja ginjal.

Asites: cairan terkumpul dalam rongga perut, biasanya berupa cairan serosa berwarna kuning pucat.

Asidosis metabolik: keadaan dimana keseimbangan asam basa tubuh terganggu akibat hilangnya basa atau retensi asam non-karbonat dalam tubuh. Terjadi akumulasi asam dan ion hidrogen dalam darah dan jaringan tubuh sehingga menurunkan pH.

AST plasma: *Aspartat Aminotransferase,* enzim mitokondria yang dapat menjadi penanda kerusakan organ jantung dan hati, nama lainnya adalah SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*).

Aterosklerosis: pengerasan dinding pembuluh darah arteri, dapat disebabkan oleh pembentukan endapan lemak, kolesterol atau substansi lain.

Autosomal resesif: kondisi yang diturunkan secara genetik dimana seseorang akan menderita penyakit apabila menerima gen mutan dari salah satu atau kedua orangtuanya.

Azotemia: kelainan biokimia dimana terjadi peningkatan kadar kreatinin dan nitrogen urea darah dan berkaitan dengan penurunan laju filtrasi glomerular atau fungsi ginjal Bilateral: dua atau keduanya.

Calyx ginjal: ruangan dalam ginjal yang dilalui urine.

Dekade: masa 10 tahun; dasawarsa.

Deskripsi: pemaparan atau penggambaran dengan kata-kata secara jelas dan terperinci; uraian.

Dislipidemia: kelainan metabolisme lemak yang ditandai dengan kadar lemak abnormal dalam darah.

Dialisat: cairan pembersih yang digunakan dalam dua bentuk utama dialisis: hemodialisis dan dialisis peritoneal.

Larutan dialisat mengandung dekstrosa (gula) dan bahan-bahan kimia yang serupa dengan yang terdapat dalam tubuh.

Dialisis: pemisah zat dalam larutan; peritoneal: cuci darah melalui rongga perut: merupakan alternatif lain yang bisa dilakukan secara mandiri oleh pasien gagal ginjal tahap akhir.

Degradasi: penguraian menjadi bentuk yang lebih sederhana.

Disuria: rasa nyeri, sakit atau terbakar saat berkemih.

Dislipidemia: istilah medis yang menunjukkan adanya gangguan lemak pada darah, termasuk kolesterol dan trigliserida.

Diverticulum: penonjolan keluar abnormal hingga berbentuk kantung kecil.

Edema: bengkak pada bagian tubuh karena meningkatnya volume cairan di luar sel (ekstra seluler) dan di luar pembuluh darah (ekstra vaskular) disertai dengan penimbunan di jaringan serosa.

Efusi pleura: penumpukan cairan dalam selaput paru-paru atau di antara dua lapisan pleura (membran yang memisahkan paru-paru dengan dinding dada bagian dalam).

Ekimosis: bercak pendarahan pada kulit atau selaput lendir.

Endokrin: sistem pengaturan dan kontrol kelenjar tanpa saluran, yang menghasilkan hormon yang beredar di seluruh tubuh melalui aliran darah untuk memengaruhi organ lain.

Enteral: pemberian cairan nutrisi melalui saluran cerna dengan menggunakan pipa atau tabung sonde (*tube feeding*); direkomendasikan untuk penderita yang tidak dapat memenuhi kebutuhan nutrisinya secara volunter melalui asupan oral.

Eritropoetin: hormon glikoprotein yang diproduksi oleh sel sel khusus di ginjal yang merangsang sumsum tulang untuk meningkatkan pembentukan sel darah merah (eritrosit).

Facies Anterior: Permukaan bidang depan.

Facies Posterior: Permukaan bidang belakang.

Fibrosis: perubahan struktur dan pembentukan jaringan ikat fibrosa yang berlebihan.

Flax seed: sejenis makanan berbentuk biji-bijian, sepintas mirip sekali dengan biji bunga matahari. Merupakan biji/benih dari bunga flax (*Linium Usitatissinum*) yang tumbuh subur di daerah Amerika dan Kanada.

Filtrasi: proses penyaringan darah dari zat zat sisa metabolisme yang dapat meracuni tubuh.

Fimosis: penyempitan atau perlengketan, sehingga tidak berkembang dengan normal.

Fisiologi: cabang biologi yang berkaitan dengan fungsi dan kegiatan kehidupan atau zat hidup (organ, jaringan, atau sel); ilmu faal.

Focal: berkumpul dan memadat menjadi kesatuan, dalam gambaran histopatologis.

Frekuensi: peningkatan keinginan berkemih, yang normal umumnya sekitar 7x/hari atau tiap 3-4 jam sekali.

Geriatri: cabang ilmu kedokteran dengan fokus pada diagnosis dan pengobatan kondisi dan gangguan yang terjadi pada usia tua.

Glikemia: kadar gula atau glukosa dalam darah.

Global: 1. secara umum dan keseluruhan; secara bulat; secara garis besar. 2. bersangkut paut, mengenai, meliputi seluruh dunia.

Glomerulus: bagian dari badan malpighi ginjal, membentuk anyaman pembuluh darah kapiler di dalam kapsula bowman, yang berfungsi dalam proses penyaringan dan pembentukan urine.

Glomerulonefritis: penyakit yang terjadi pada ginjal yang terlihat sebagai inflamasi pada bagian penyaring darah (glomerulus).

Glukoneogenesis: proses pembentukan glukosa dari senyawa-senyawa non karbohidrat, bisa dari lipid atau protein, berlangsung terutama di dalam hati dan ginjal.

Growth Factor: Faktor pertumbuhan (GF) yang mempengaruhi dan memicu siklus sel antara lain: *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF).

Haptotatik: gradien konsentrasi struktur-substansi sinyal yang menentukan pergerakan sel dan proses sel. Umumnya bersama dengan kemotaktik memengaruhi pergerakan sel-sel darah putih keluar dari pembuluh darah dan menjadi makrofag.

Heterogen: mengandung beberapa unsur yang berbeda sifat atau berlainan jenis.

Hiper filtrasi: meningkatnya laju filtrasi glomerulus mencapai 20-50%. Di atas nilai normal menurut usia.

Hiper katabolik: peningkatan katabolisme atau pemecahan energi, meningkatnya produksi panas, meningkatnya kebutuhan energi (meningkat 25-50%), meningkatnya kecepatan nadi, nafas.

Hipertrofi: peningkatan volume organ atau jaringan akibat pembesaran komponen atau ukuran sel.

Hiperlipidemia: peningkatan kadar lemak dalam darah, misalnya kolesterol, trigliserida.

Hipoalbuminemia: penurunan kadar albumin dalam darah.

Hipoglikemia: gangguan kesehatan yang terjadi ketika kadar gula di dalam darah berada di bawah kadar normal.

Hipovitaminosis: kekurangan atau defisiensi vitamin tertentu.

Hematuria: penyakit yang ditandai adanya darah (eritrosit) dalam urin.

Homeostatik: keadaan keseimbangan internal yang ideal, dimana semua sistem tubuh bekerja dengan baik dan berusaha mempertahankan keadaan tersebut.

Homogen: seragam, hanya mengandung satu jenis unsur tertentu.

Idiopatik: istilah yang digunakan untuk menjelaskan kondisi medis yang penyebabnya belum diketahui dengan jelas.

Immunoglobulin: kelas antibodi (sejenis protein) yang ditemukan dalam darah dan jaringan yang fungsinya membantu tubuh melawan penyakit.

Imunomodulator: bahan atau zat yang dapat memperbaiki fungsi sistem imun atau daya tahan tubuh.

Irreversible: kondisi yang tidak dapat pulih kembali.

Irama *sirkardian:* jam alami dalam tubuh manusia. Selama 24 jam tubuh mengalami pola fluktuasi temperatur, kemampuan untuk bangun, aktivitas lambung, denyut jantung, tekanan darah dan kadar hormon.

Jugular Venous Pressure (JVP): tekanan sistem vena yang diamati secara tidak langsung (indirek) pada posisi berbaring di sepanjang permukaan musculus sternocleidomastoideus (leher penderita). JVP yang meningkat adalah tanda klasik hipertensi vena (pada keadaan gagal jantung kanan).

Karbamidometilasi: sebuah radikal univalen yang terdiri dari karbamid menggantikan atom hidrogen dari gugus metil misalnya. NH_2-CO-NH-CH_2-(kelompok yang paling sederhana).

Katabolisme: proses metabolisme untuk memecah menjadi molekul yang lebih sederhana.

Kemoatraktan: kemampuan untuk memanggil atau menarik zat kimia tertentu.

Kemotaktik: substansi yang menyebabkan terjadi migrasi sel-sel darah putih keluar dari pembuluh darah dan menuju ke pusat inflamasi.

Kolik: rasa nyeri spasmodik hebat dan sifatnya ritmis hilang timbul, dapat terlokalisasi dapat pula menjalar.

Kreatinin: produk limbah dari protein daging dalam makanan dan hasil metabolisme otot serta konsumsi daging yang terbentuk dari kreatin, molekul penting untuk produksi energi otot. Zat yang mengalir melalui pembuluh darah ini disaring oleh ginjal untuk kemudian dibuang bersama urine.

Lateral dextra: bagian samping kanan.

Lateral sinistra: bagian samping kiri.

Lipoprotein Lipase: suatu enzim dalam tubuh manusia yang bekerja menghidrolisis lemak dan memecah lipoprotein densitas rendah dalam darah kemudian menimbunnya dalam sel adiposa.

Lipogenesis: lintasan metabolisme yang mengubah Asetil koA menjadi lipid atau lemak, terjadi karena stimulasi asupan karbohidrat berlebih dan terhambat oleh asam lemak tak jenuh dan kegiatan puasa.

Lipotoksisitas: toksisitas sel akibat akumulasi lemak abnormal pada jaringan-jaringan yang tidak semestinya seperti sel jantung, sel beta-pankreas, sel otot & hati dan dapat membahayakan kesehatan.

Malaise: perasaan umum tidak sehat, tidak nyaman, letih, lesu dan tidak bersemangat.

Malnutrisi: keadaan dimana status gizi penderita tidak normal, kondisi medis serius akibat tidak tercukupi nutrisi penting yang dibutuhkan tubuh.

Masif: sangat banyak atau deras.

Nausea: rasa mual dan ingin muntah, rasa tidak enak di daerah lambung.

NF-κB: suatu faktor transkripsi untuk dimulainya reaksi inflamasi.

Nefron: satuan unit fungsional ginjal yang terkecil yang terdiri atas tubulus kontortus proksimal, tubulus kontortus distal, dan duktus koligentes.

Nitrotirosin: indikator dari kerusakan sel dan inflamasi, produk dari nitrasi tirosin yang diperantarai oleh spesies Nitrit Oksida (NO).

Nitrogen: suatu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang N dan nomor atom 7. Unsur ini pertama kali ditemukan dan diisolasi oleh dokter berkebangsaan Skotlandia Daniel Rutherford pada tahun 1772.

Nutrisi: 1. Proses pemasukan dan pengolahan zat makanan oleh tubuh; 2. Makanan bergizi; 3. Ilmu tentang gizi.

Obat prokinetik: obat yang menyebabkan otot-otot dalam sistem pencernaan untuk menggerakkan makanan melalui saluran pencernaan secara lebih cepat, meningkatkan aktivitas gerakan lambung dan mempercepat proses pengosongan lambung.

Obesitas: penumpukan lemak yang berlebihan di dalam badan; kegemukan yang berlebih.

Oksalosis: deposit atau akumulasi oksalat, bisa terjadi pada tulang, persendian, dan sumsum tulang.

Oliguria: jumlah urin yang dikeluarkan tubuh kurang dari 500 ml/24 jam.

Oral: 1. bersangkutan dengan mulut; 2. melalui saluran pencernaan makanan (tentang pemberian obat).

Osteoporosis: keadaan tulang yang menjadi keropos dan lapuk.

Pasca-: sesudah.

Patogenesis: proses yang terjadi dalam perjalanan penyakit atau mekanisme perkembangan penyakit, proses berjangkitnya penyakit yang dimulai dari permulaan terjadinya infeksi sampai dengan timbulnya reaksi akhir.

Parenkim: jaringan dasar dari suatu organ atau *ground tissue*, pada ginjal terdiri dari korteks dan medulla.

Parenteral: pemberian cairan nutrisi melalui pembuluh darah misalnya dengan alat infus.

Permeabilitas: sifat atau kemampuan suatu membran untuk dapat dilewati oleh zat.

Perfusi: aliran darah untuk mempertahankan sirkulasi oksigen.

Podosit: sel ginjal dalam kapsula bowman yang berderet mengelilingi pembuluh darah kapiler di permukaan glomerulus.

Polus superior: bagian kutub sebelah atas.

Polus inferior: bagian kutub sebelah bawah.

Prostanoid adalah produk Asam Arakhidonat (AA) yang dimetabolisme oleh enzim Siklooksigenase (COX).

Prognosis: ramalan tentang peristiwa yang akan terjadi, khususnya yang berhubungan dengan penyakit atau penyembuhan setelah operasi.

Proteinuria: suatu keadaan yang tidak normal dimana terlalu banyak protein dalam urin, umumnya karena terdapat gangguan fungsi filtrasi ginjal.

Proteomic: ilmu yang mempelajari sifat protein (tingkat ekspresi, interaksi, modifikasi setelah translasi dan lainnya) dalam skala besar untuk memperoleh pandangan jelas dan terintegrasi.

Prevalensi: 1. hal yang umum; kelaziman; 2. jumlah keseluruhan kasus penyakit yang terjadi pada suatu waktu tertentu di suatu wilayah.

Pruritus: rasa gatal yang bisa meliputi seluruh atau sebagian tubuh seseorang.

Purin: asam amino atau protein Adenin dan Guanin dapat terdapat dalam tubuh dan di berbagai jenis makanan. Purin berperan dalam pembentukan asam urat.

Retroperitoneal: ruang anatomi yang terletak di abdomen, sebelah belakang dari peritoneum.

Reabsorbsi: proses penyerapan kembali filtrat glomerulus yang masih dapat digunakan oleh tubuh dari cairan pra urin, seperti glukosa, asam amino, air dan garam mineral.

Reseksi bilier: operasi pengangkatan kandung empedu atau organ bilier.

Rhabdomyolisis: sindroma yang disebabkan cedera pada sel otot rangka dan keluarnya substansi sel otot (myoglobin, kalium, phosphat dll.) ke dalam plasma darah.

Sitokin: zat yang diproduksi sebagai akibat adanya proses radang

Siklosporin: obat immunosuppressant yang digunakan untuk mengurangi penolakan transplantasi atau untuk mengobati artritis dan psoriasis

Sitokin inflamasi: mediator utama yang terbentuk sebagai respon inflamasi yang dihasilkan oleh banyak sel yang berbeda, berfungsi memperantarai dan mengatur imunitas.

Sekresi: pengeluaran zat yang dibutuhkan oleh tubuh, misalnya hormon, enzim.

Sklerosis: pengerasan jaringan, biasanya disebabkan oleh radang.

Striktura uretra: penyempitan atau kontraksi dari lumen uretra akibat terbentuknya jaringan fibrotik pada dinding uretra.

Super saturasi: larutan mengandung zat yang terlarut melebihi jumlah batas jenuhnya.

Takrolimus: obat yang umumnya digunakan bersama obat lain untuk mencegah penolakan transplantasi ginjal, jantung, atau hati.

Tekanan onkotik: tekanan osmotik koloid, gaya tarik yang dihasilkan oleh molekul larutan koloid protein plasma; tujuannya menjaga keseimbangan air antara cairan interstitial dan intravaskular; sehingga air tetap berada dalam plasma darah dan tidak berdifusi.

Translasi: proses penerjemahan kode genetik oleh tRNA ke dalam urutan asam amino. Translasi terbagi menjadi tiga tahap (sama seperti pada transkripsi) yaitu inisiasi, elongasi, dan terminasi. Semua tahapan ini memerlukan faktor-faktor protein yang membantu mRNA, tRNA, dan ribosom selama proses translasi.

Transkripsi: bagian dari rangkaian ekspresi genetik. Arti kata transkripsi adalah alih aksara atau penyalinan, yang dimaksud adalah mengubah "teks" DNA menjadi RNA. Perubahan yang terjadi hanyalah basa nitrogen timina (T) di DNA yang pada RNA digantikan oleh urasil (U).

Transferrin: protein ellipsoid dengan dua sub-domain atau lobus, masing-masing mengikat zat besi, fungsinya membawa besi (Ferro) dalam darah.

Transplantasi: pemindahan jaringan tubuh dari suatu tempat ke tempat lain (seperti menutup luka yang tidak berkulit dengan jaringan kulit dari bagian tubuh yang lain); pencangkokan.

Tubulointerstial: kerusakan ginjal yang luas dan dapat melibatkan seluruh struktur ginjal selain glomerulus.

Uremia: penimbunan unsur air kencing dalam darah dan jaringan yang seharusnya dikeluarkan dengan akibat keracunan atau keadaan toksik.

Urea: senyawa organik yang tersusun dari unsur karbon, hidrogen, oksigen dan nitrogen dengan rumus CON_2H_4 atau $(NH_2)_2CO$. Urea juga dikenal dengan nama carbamide yang terutama digunakan di kawasan Eropa.

Urgensi: rasa ingin berkemih mendadak yang sulit ditahan atau ketidakmampuan menahan keluarnya urin karena otot detrusor tidak stabil, dan bereaksi secara berlebihan.

Urine: zat cair buangan yang terhimpun di dalam kandung kemih dan dikeluarkan dari dalam tubuh melalui saluran kemih; air kemih; air seni.

Vasoaktif: bahan kimia yang berefek pada kaliber atau diameter pembuluh darah.

INDEKS

1

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil · 79
1,25 dihydroxyvitamin D_3 · 17

A

adekuat · 49, 61, 63, 64
AIF · 121
akumulasi · 56, 58, 64, 66, 67, 243, 249, 250
Albuminuria · 34, 36, 242
Aldosteron · 242
Aminoglikosida · 184
anemia · 32, 35, 58, 60, 62
angina · 96, 130
ANP · 6, 37, 81, 85, 86, 119, 126, 154, 155, 157, 160, 161, 163, 182, 183, 185, 190, 206, 207, 209, 210, 226, 227, 228, 230
anti inflamasi non steroid · 33
Anti Natriuretic Peptide · 81, 85
antibiotik · 33, 96
apoptosis · 96, 121, 122
Apoptosis Initiating Factor (AIF) · 121
apparatus juxtaglomerular · 14
arteri arkuata · 16
arteri interlobaris · 16
arteri interlobularis · 16
arteriol aferen · 16
arteriole afferent · 14
Asam Keto Analog · 189
asidosis metabolik · 32, 35, 39, 40, 58, 62, 67
autokrin dan parakrin · 82
Azotemia · 57, 244

B

Blood urea nitrogen · 71
Bobot Badan (BB) · 181, 190
Bovine Serum Albumin (BSA) · 105, 106, 171
Bradford Protein Assay Dye Reagent, · 105, 106, 170, 171

C

calmodulin (CaM) · 77
Calmodulin Phosphodiesterase (CamPDE) · 85
CaMKII · 4
CaMPDE · 76
Cholesterol-oxidasephenol aminophenazone(CHOD-PAP). · 147
COBAS ROCHE · 138, 141, 144, 146, 147, 150, 152
Cobas Roche 311 · 199, 200, 201, 203
columnae renales · 13
COX-1 · 6, 24, 25, 78, 85, 119, 126, 152, 154, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 182, 183, 185, 190,

194, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 226, 227, 228, 230
cytochrome C · 121

D

damage-associated molecular patterns (DAMPs) · 120
death receptors (TNF receptors atau Fas) · 120
degenerasi tubulus bengkak keruh · 132, 134, 136, 192, 193, 229
Dekade · 244
Deskripsi · 33, 244
Diabetes · 33
Dialisis · 244
Diet Rendah Protein · 47, 50, 60, 71
Diet Tinggi Protein · 55
Dislipidemia · 34, 48, 244

E

edema perifer · 35
efusi pleura · 35
ekimosis · 35
Ekskresi · 20
Elektroforesis · 112, 113
ELISA · 156, 159, 160, 205, 206
endogen · 79
endokarditis bakterial · 33
Endokrin · 245
endonuclease G · 121
enzim alcalase · 76
Enzim alosterik · 242
Enzim bromelain · 96

F

facies anterior dan posterior · 12
Fanconi-like syndrome · 122
Fenofibrate · 186, 193, 198
fibrosis interstitial · 66, 67
Filtrasi · 18, 21, 22, 31, 168, 169, 174, 175, 245
focal · 130

G

gastritis · 35
Gentamicin · 181, 183, 184, 185, 186, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 200, 201, 202, 203, 205, 207, 208, 209, 210, 213
Gentamycin · 5, 6, 212, 227
Ghrelin · 63
Glikemia · 34, 246
Global · 29, 32, 246
Glomerulonefritis · 246
glomerulus · 14, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 29, 34, 47, 60, 65, 66, 67, 122, 130, 136, 184, 246, 250, 251, 253
glutathione (GSH) · 78
Glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone (GPO-PAP) · 150
growth factor · 34, 43, 66

H

haptotatik · 42

Hb · 197, 199, 229
hematoanalyzer · 196
Hematokrit · 199
Hematologi · 182, 185, 188, 190, 196, 197, 227
hepatitis B · 33
hepatitis C · 33
Hidrolisat · 4, 75, 76, 83, 85, 88, 100, 102, 103, 108, 109, 110, 111, 114, 115, 125, 133, 147, 150, 152, 153, 168, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 186, 193, 194, 221, 223, 226, 227, 236, 237
hilus · 12, 15
hiper filtrasi · 34, 47
Hipertensi · 33, 34, 65, 182
hipertrofi · 35, 44, 65
Histopatologis · 126, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 192, 193, 194, 195, 196
HIV · 33
Homeostatik · 247
HPKGB · 110, 115, 125, 128, 129, 130, 133, 138, 139, 141, 142, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 161, 227, 228
HPKGN · 110, 115, 125, 128, 129, 130, 133, 135, 138, 139, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 227, 228
HPPHB · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 161, 163, 167, 176, 181, 183, 186, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 221, 222, 226, 227, 228, 229, 230
HPPHN · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 138, 140, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 161, 227
HPPKB · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 134, 138, 139, 141, 142, 144, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 227
HPPKN · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 134, 135, 138, 139, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 227, 228
HPPPIB · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 138, 140, 141, 143, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 161, 227, 228
HPPPIN · 110, 115, 125, 128, 129, 133, 138, 140, 141, 143, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 227
Ht · 229
Hyaline · 66, 130, 135, 136, 137, 195, 196
hyaline cast · 66, 132, 135, 192, 193, 195, 196, 228, 229

I

ikatan hidrogen · 204
in vivo · 78, 121, 149, 185, 218
Indeks Organ (IO) · 118, 129, 181, 190, 191, 226, 227

J

Jugular Venous Pressure · 35, 248

K

kapiler peritubular · 14
kapsula Bowman · 14, 18, 21, 22
Karbamidometilasi · 248
karioeksis · 130, 137, 194
kDa · 76, 78, 79, 80, 81, 114, 115, 149, 178, 204, 210, 223, 227, 229
kemotaktik · 42, 246
Ketosteril · 186, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 198, 199, 200, 206, 207, 208, 210, 229
Kjeldahl · 92
Klirens plasma · 20
Kolesterol Total · 118, 126, 144, 182, 185, 201, 202, 226, 227
Kreatinin · 6, 58, 59, 72, 118, 125, 126, 141, 142, 143, 182, 185, 190, 200, 201, 226, 227, 228, 229, 248

L

Lactobacillus rhamnosus BGT10 · 204
Laktat dehidrogenase · 114
LC-MS/MS · 7, 76, 215, 221, 222
LDL · 4, 6, 40, 41, 43, 48, 101, 118, 122, 126, 147, 148, 149, 150, 182, 185, 190, 202, 203, 226, 227, 228, 229
lengkung henle · 19
LFG/GFR · 23
lisosom · 184
lumen tubular · 14
Lupus eritematosus sistemik · 33
Lysozyme · 114

M

makrofag · 42, 66, 246
malnutrisi · 35, 36, 38, 40, 41, 47, 52, 60, 61, 62, 63, 65
Malnutrisi · 32, 62, 63, 64, 249
MAPK · 122, 261
margo medialis · 12
matriks ekstra seluler · 66
MCH · 199
MCV · 199
medulla · 14, 19, 25, 250
Metabolisme · 38, 39, 40, 59
metalic taste · 35
mikrositik hipokrom · 35

N

nafas Kussmaul · 35
Natural Vitamin E · 189
nefron · 14, 19, 29, 34, 36, 37, 44, 47, 65, 66, 83, 130, 162
nefrotoksisitas · 121, 122, 123, 129, 184
nekrosis inti · 131, 132, 134, 192, 194, 228, 229
neuropeptide Y · 63

Neutrase · 4, 5, 6, 97, 98, 100, 104, 105, 107, 108, 115, 125, 133, 138, 141, 145, 147, 226, 227
Nitrogen · 53, 56, 60, 63, 122, 125, 243, 249
normositik normokrom · 35
Nutrisi · 8, 28, 49, 70, 72, 249, 261

O

Obesitas · 34, 250
OCT2 · 120, 123
Omi/HtrA2 · 121
oral · 47, 49, 79, 80, 96, 245
orexin · 63
Osteoporosis · 250

P

p53 induced protein with a death domain (PIDD) · 121
p53 up regulated modulator of apoptosis-alpha (PUMA-alfa) · 121
Pasca · 250
penyakit ginjal polikistik · 33, 76
peptida natriuretic (NP) · 82
PGES · 24
phosphodiesterase 1 · 76
pigmentasi kulit · 35
plasma angiotensin II · 80
polikistik · 76
pompa ion Natrium · 194
Prevalensi · 30, 70, 74, 251
proliferasi · 66, 82, 155, 182
Prostaglandin · 24, 26
prostanoid · 65
Proteinuria · 34, 251
proteomic · 7, 215, 216, 218, 222
pruritus · 35
pyramides renales · 13

R

Radio Immuno Assay (RIA). · 82
Renal Blood Flow · 20
Renin · 6, 36, 76, 87, 119, 126, 154, 155, 157, 160, 161, 162, 163, 182, 185, 206, 209, 226, 227, 228, 230
Retroperitoneal · 251

S

SDS PAGE Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder. · 178
Sekresi · 20, 63, 252
sel juxtaglomerular · 14
Sentrifugasi · 188
Siklooksigenase (COX) · 251
siklosporin · 33
Simvastatin · 186, 191, 193, 198, 202
single nucleotide polymorphism (SNP) · 121
sinus renalis · 12
sitokin · 34, 41, 42, 46, 61, 64, 66, 67, 120
sklerosis · 35, 46
SMAC/Diablo · 121
spektrofotometer UV-Vis · 105, 106, 170, 171

Spontan Hypertension Rats =SHR · 80
SPRD-cy · 80
stress endoplasmic reticulum · 120
Super Oxyde Dismutase (SOD) · 205
Supernatan · 105, 155

T

takrolimus · 33
TNFR1 · 121
Translasi · 252
transplantasi · 29, 31, 44, 46, 47, 48, 252
Trigliserida · 3, 6, 41, 118, 126, 150, 182, 185, 190, 203, 226, 227
Tryptophan · 39
tubulointerstial · 66
tubulus dilatasi · 66
tubulus distal · 14, 19, 122
tubulus proksimal · 14, 19, 123, 184

U

uji homogenitas Levene Statistic · 132, 192
Uji Kunitz · 105, 169
uji non-parametrik Kruskal-Wallis · 132, 192
uji normalitas Saphiro-Wilk · 132, 192
ulkus peptikum · 35
ultra filtrasi · 76, 78, 79, 96
Urea · 45, 55, 56, 57, 59, 63, 122, 125, 243, 253
Uremia · 29, 41, 42, 57, 58, 253
ureter · 11, 12
Ureum · 6, 72, 118, 125, 126, 138, 139, 140, 141, 182, 185, 190, 199, 200, 226, 227, 228, 229
Urine · 18, 20, 253
Uropati obstruktif · 33

V

vakuola endosomal · 184
vasoaktif · 34
vasodilatasi · 65, 82, 154
vasopresor · 80

TENTANG PENULIS

Nama : Dr. dr. Meilinah Hidayat, M.Kes.

T/T lahir : Bandung, 4 Desember 1963

Jabatan/gol : Lektor Kepala/IVa

Status : Kawin, dengan 2 anak

Nama suami : Tjandra Heru

Email : mellahidayat@yahoo.com

❖ **Kualifikasi Akademik**

1970-1976 : SD Gita Kirti Karangsari Bandung

1976-1979 : SMP Santa Angela Bandung

1979-1982 : SMA Santa Angela Bandung

1986-1988 : Dokter Fakultas Kedokteran UNPAD Bandung

1998-2001 : Magister Pascasarjana Ilmu Kedokteran Dasar UNPAD BKU Parasitologi

2004-2006 : Magister Program Profesi *Combined Degree* RSHS UNPAD BKU Ilmu Gizi Medik

2008-2011 : Program Doktor Kedokteran UNPAD Bidang Ilmu Gizi

❖ **Riwayat Pekerjaan**

1988-1989	: Tenaga sukarela Bag. Parasitologi Fakultas Kedokteran UNPAD
1988-1991	: Dokter poliklinik di BengPusHub Angkatan Darat RI PINDAD Bandung
2001-2003	: Dokter PTT PLH Puskesmas Warnasari Pangalengan Kabupaten Bandung
2003-2005	: Dokter PTT Puskesmas Cipageran Cimahi Kab. Bandung
1989-1997	: Tenaga Edukatif Luar Biasa FK UK Maranatha
1997-sekarang	: Tenaga Edukatif Tetap FK UK Maranatha
2010-2014	: Pemimpin Redaksi Jurnal Kedokteran Maranatha
2014-sekarang	: Chief Editor *Journal of Medicine and Health*

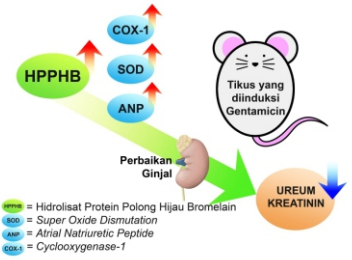
❖ **Disertasi**

Aktivitas Ekstrak Protein Biji Kedelai (*Glycine Max* L. Merr) varietas *Detam 1* terhadap Pengendalian Berat Badan dan Peningkatan Kadar Kolesistokinin Melalui Mekanisme Aktivitas *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) pada Tikus *Wistar* Jantan

❖ **Buku**

Meilinah Hidayat, Lusiana Darsono, Santoso Chandra. Nutrisi untuk Penderita Penyakit Ginjal. 2016. Talenta Indonesia Mandiri. Jogjakarta.

HIDROLISAT PROTEIN DARI KACANG POLONG HIJAU (*Pisum sativum.* L) UNTUK PENYAKIT GINJAL KRONIS



Penyakit ginjal kronis (PGK) adalah penyakit yang menyebabkan fungsi ginjal terganggu dan berlangsung dalam waktu yang cukup lama, paling sedikit 3 bulan. Jumlah penderita PGK cenderung meningkat dari waktu ke waktu dan jika mereka tidak ditangani dengan baik dapat berakibat fatal. Penderita PGK membutuhkan terapi untuk mengobati penyakitnya atau setidaknya mencegah penyakitnya agar tidak bertambah buruk.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan terapi bagi penderita PGK, yang terinspirasi dari hasil penelitian kacang polong di Kanada yang menunjukkan bahwa hidrolisat protein kacang polong mempunyai efek terapi yang baik untuk PGK. Hidrolisat protein kacang polong telah banyak diteliti dan menunjukkan beberapa efek yang menguntungkan bagi kesehatan. Proses hidrolisis untuk mendapatkan hidrolisat protein yang efektif, mudah dan sederhana adalah menggunakan enzim.

Penelitian ini telah berlangsung dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk mendapatkan jenis hidrolisat protein kacang yang paling baik untuk memperbaiki gangguan fungsi ginjal, sedangkan tahap kedua bertujuan untuk mendapatkan dosis efektif hidrolisat protein kacang yang didapat dari tahap pertama.

Pada awal penelitian, pembuatan hidrolisat protein dari beberapa jenis kacang dilakukan dengan menggunakan dua jenis protease, yaitu Neutrase selain bromelain yang didapat dari sari nanas (*Ananas sativus*). Uji efek hidrolisat-hidrolisat protein tersebut terhadap fungsi ginjal dilakukan pada tikus Wistar betina yang ginjalnya dirusak menggunakan Cisplatin. Hasil uji menunjukkan bahwa hidrolisat protein dari kacang polong hijau (*Pisum sativum*) asal Indonesia yang dihidrolisis menggunakan bromelain (HPPHB) menunjukkan efek yang paling menjanjikan. Penelitian tahap kedua pada tikus Wistar jantan yang ginjalnya dirusak menggunakan Gentamicin menunjukkan bahwa dosis efektif HPPHB terhadap perbaikan fungsi ginjal serta penjelasan lengkapnya dapat dilihat pada Bab IX. Hipotesis mekanisme kerja yang pasti dari HPPHB masih perlu diteliti lebih lanjut. Pada penelitian ini, uji mekanisme HPPHB terhadap antioksidan SOD, *Cyclooxygenase-1* (COX-1), *atrial natriuretic peptide* (ANP) dan renin juga telah dilakukan.

ISBN 978-602-289-453-7

Penerbit ALFABETA
Jl. Gegerkalong Hilir Bandung
Telp. 022-2008822 Fax. 022-2020373
e-mail:alfabetabdg@yahoo.co.id
website: www.cvalfabeta.com
ISBN: 978-602-289-453-7
Kes38-282