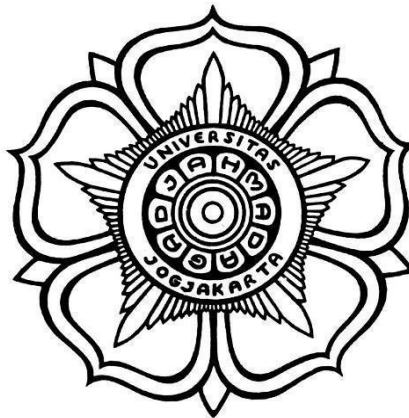


**PENGARUH PEMBERIAN ALLOPURINOL TERHADAP KADAR
ALBUMIN, EKSPRESI KOLAGEN TIPE 1 DAN α -SMA TERHADAP
HEPAR MENCIT YANG DIINDUKSI ASAM URAT**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Sebagian Syarat Memperoleh Derajat Sarjana
Kedokteran Universitas Gadjah Mada**



Disusun oleh :

LUQMAN AL HADI

16/397937/KU/19081

FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT,

DAN KEPERAWATAN

UNIVERSITAS GADJAH MADA

YOGYAKARTA

2019

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN ALLOPURINOL TERHADAP KADAR ALBUMIN,
EKSPRESI KOLAGEN TIPE 1 DAN A-SMA TERHADAP HEPAR MENCIT YANG
DIINDUKSI ASAM URAT**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Sebagian Syarat Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran
Universitas Gadjah Mada**

Disusun oleh:

LUQMAN AL HADI

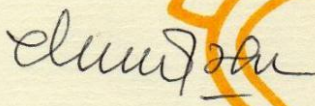
16/397937/KU/19081

Telah diuji dan disetujui pada tanggal 9 Desember 2019

Tim Penguji Skripsi

Pembimbing Materi

Pembimbing Metodologi


dr. Dwi Cahyani Ratna Sari,
M.Kes.PA(K)

NIP. 196712291996012001


dr. Nur Arfian, Ph.D

NIP. 198205182015041001

Dosen Penguji


dr. Muhammad Mansyur Romi,
SU, PA(K)

NIP. 195608101982111001

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT karena berkat karunianya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh Pemberian Allopurinol Terhadap Kadar Albumin, Ekspresi Kolagen Tipe 1 dan α -SMA Terhadap Hepar Mencit yang Diinduksi Asam Urat” ini dengan baik. Tesis ini disusun dengan tujuan untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana S-1 di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Selama penelitian ini berlangsung, penulis menyadari bahwa terselesaikannya tugas ini tidak terlepas dari bantuan dari banyak pihak. Maka dari itu, dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Dwi Cahyani Ratna Sari, M.Kes., PA(K) selaku pembimbing materi yang telah banyak memberikan bimbingan, petunjuk, bantuan dan masukan yang tidak ternilai selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
2. dr. Nur Arfian, Ph.D. selaku pembimbing metodologi yang telah memberikan bimbingan, petunjuk, saran yang tidak ternilai selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. dr. Muhammad Mansyur Romi, M.Kes. selaku penguji ayang telah banyak memberi kritikan dan saran yang bermanfaat dalam penyusunan tesis ini.
4. Seluruh staf pengajar, karyawan, dan asisten penelitian Departemen Anatomi, khususnya Mbak Wiwit A Wahyu, S.Keb, M.Sc, Mbak Nyoeh, Kak Tony F, Mbak Debora, Mbak Greta, Mbak Yuyun, Mbak Cynthia, dan Pak Mulyana yang telah susah payah membimbing dan membantu kelancaran jalannya penelitian.
5. Kepada keluarga tercinta, Kedua orang tua saya, Ayahanda Suwondo, S.Kep dan

Ibunda Juniarti S.Keb yang tidak henti-hentinya memberikan doa, dukungan dan kasih sayangnya selama ini.

6. Seluruh rekan seperjuangan khususnya Agung Novriandi, Yohannes D. F, Gratcheva A, Karina S dan Alif Indira atas kerjasamanya selama melakukan penelitian dan menjalani pendidikan.

7. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya baik secara langsung maupun tidak langsung.

Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi seluruh pihak dan bermakna untuk pengembangan ilmu pengetahuan.

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini, penulis, Luqman Al-Hadi, menyatakan bahwa penulisan skripsi ini sepenuhnya merupakan karya sendiri. Sepengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan orang lain atau lembaga lain kecuali yang tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 5 Desember 2019

Penulis



Luqman Al Hadi,

(16/397937/KU/19081)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
INTISARI.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Keaslian Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Anatomi dan Histologi Hepar.....	6
B. Asam Urat.....	9
C. Allopurinol	12
D. Albumin Hepar	12
E. Ekspresi Kolagen Tipe 1	14
F. Ekspresi α -SMA	16
G. Fibrosis Hepar	17
H. Kerangka Teori.....	18
I. Kerangka Konsep	19
J. Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN.....	21
A. Rancangan Penelitian	21
B. Variabel Penelitian	21
C. Definisi Operasional.....	22
D. Bahan dan Alat Penelitian	23
E. Jalannya Penelitian	24
F. Alur Penelitian.....	32
G. Analisis Data	33

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	34
A. Hasil Penelitian.....	34
A. 1. Karakteristik Hewan Coba	34
A. 2. Albumin.....	35
A. 3. Ekspresi mRNA Kolagen Tipe 1.....	36
A. 4. Ekspresi α -SMA (Myofibroblast).	38
B. Pembahasan	40
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
A. Kesimpulan.....	46
B. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambar Makroskopis dari hepar bagian dalam.....	7
Gambar 2. Makroskopis hepar bagian luar tampak depan dan belakang.....	7
Gambar 3. Mikroskopik hepar.....	8
Gambar 4. Proses pembentukan asam urat.....	11
Gambar 5. Proses pembentukan Albumin.....	13
Gambar 6. Sintesis Kolagen.....	15
Gambar 7. Kerangka Teori Penelitian.....	18
Gambar 8. Kerangka konsep penelitian.....	19
Gambar 9. Alur Penelitian.....	32
Gambar 10. Diagram batang hasil pemeriksaan kadar Albumin.....	36
Gambar 11. Gambar pita hasil elektroforesis antara GAPDH dan Kol-1.....	37
Gambar 12. Diagram batang hasil pemeriksaan PCR Kolagen tipe 1.....	38
Gambar 13. Gambaran mikroskopis hepar dengan pewarnaan α -SMA.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Normalitas data dari hasil pemeriksaan Albumin.	49
Lampiran 2. Hasil Uji Oneway ANOVA dari kadar Albumin.....	49
Lampiran 3. Hasil Uji Post Hoc LSD dari kadar Albumin.	50
Lampiran 4. Hasil Uji Normalitas dari Kolagen Tipe 1.....	51
Lampiran 5. Hasil Uji Kruskal-Wallis dari Kolagen Tipe 1.	51
Lampiran 6. Hasil Uji Mann Whitney dari Kolagen Tipe 1.....	52
Lampiran 7. Kelayakan Etik.....	53

DAFTAR SINGKATAN

ABCG2	: <i>ATP-binding cassette super-family G member 2</i>
AMP	: <i>Adenosine Monophosphate</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
CXCL 10	: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10</i>
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
GLUT9	: <i>Genomic Organization of human glucose transporter 9</i>
GMP	: <i>Guanosine Monophosphate</i>
HSC	: <i>Hepatic Stellate Cell</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KOL1	: <i>Kolagen Tipe 1</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MSU	: <i>Monosodium Urate</i>
RAS	: <i>Renin Angiotensin System</i>
RE	: <i>Retikulum Endoplasma</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	: <i>Toll-like Receptor</i>
XO	: <i>Xantine Oxidase</i>
α -SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>

INTISARI

PENGARUH PEMBERIAN ALLOPURINOL TERHADAP KADAR ALBUMIN, EKSPRESI KOLAGEN TIPE 1 DAN α -SMA PADA HEPAR MENCIT YANG DIINDUKSI ASAM URAT

Latar Belakang: Hiperurisemia semakin menjadi masalah dalam dunia kesehatan. Hiperurisemia diketahui terlibat dalam perkembangan beberapa penyakit seperti hipertensi, sindrom metabolik, dan penyakit kardiovaskular. Dengan pemberian allopurinol akan terjadi penghambatan xantine oksidase yang kemudian akan menghambat terbentuknya asam urat.

Tujuan: Mengkaji pengaruh pemberian Allopurinol terhadap kadar albumin, ekspresi kolagen tipe 1 dan α -SMA pada hepar mencit yang diinduksi asam urat.

Metode: Penelitian ini menggunakan subjek 25 ekor mencit jantan berusia 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol yaitu diinjeksi NaCl, kelompok AU7 dan AU14 yaitu mencit yang diinduksikan asam urat melalui intraperitoneal dengan dosis 125mg/kg/hari selama 7 hari dan 14 hari, serta kelompok ALU7 dan ALU14 yaitu kelompok AU7 dan AU14 yang diberi Allopurinol 50mg/kg/hari selama 7 hari melalui sonde. Pada akhir percobaan mencit dikorbankan kemudian diambil organ hepar dan dilakukan pengecekan kadar albumin, melihat ekspresi mRNA kolagen tipe 1 dengan PCR dan melihat kondisi histopatologi hepar menggunakan pewarnaan α -SMA. Data dianalisis dengan metode one-way ANOVA apabila terdistribusi normal dan dengan metode Kruskal Wallis apabila data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p < 0,05$ sebagai nilai signifikansi yang digunakan.

Hasil Penelitian: Terjadi penurunan kadar Albumin dari nilai kontrol setelah diinduksi asam urat ($p < 0,05$) dan kembali naik setelah diberikan Allopurinol ($p < 0,05$). Terjadi peningkatan ekspresi Kolagen Tipe 1 dari nilai kontrol setelah diinduksi asam urat ($p < 0,05$) dan kembali turun setelah diberikan Allopurinol ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Didapatkan hasil ekspresi mRNA Kolagen Tipe 1 yang lebih tinggi dan hasil kadar albumin yang lebih rendah pada mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol dibandingkan dengan mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.

Kata kunci: Asam urat, allopurinol, albumin hepar, ekspresi kolagen tipe 1, α -SMA.

ABSTRACT

THE EFFECT OF ALLUPURINOL ADMINISTRATION TO ALBUMIN, COLLAGEN TYPE 1 EXPRESSION AND α -SMA ON LIVER MICE INDUCED URIC ACID

Background: Hyperuricemia is increasingly becoming a problem in the world. Hyperuricemia is known to be involved in development of several diseases such as hypertension, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. With the administration of allopurinol will occur inhibition of xanthine oxidase that inhibit the formation of uric acid.

Objective: This study is aimed to assess the effect of Allopurinol administration to albumin, collagen type 1 expression and α -SMA on liver mice induced by uric acid.

Metode: This study used 25 mice 3-month-old males that were divided into 5 groups consisting of control groups, AU7, AU14, ALU7 and ALU14. The AU7 and AU14 groups are mice that are induced uric acid through intraperitoneal injection at a dose of 125mg/kg/day for 7 days and 14 days. The ALU7 and ALU14 groups are AU7 and AU14 groups that are given the Allopurinol 50mg/kg/day for 7 days orally. At the end of the experiment, mice were sacrificed and the liver was taken to check albumin levels, collagen type 1 expression with PCR and observe hepatic histopathology using α -SMA staining. Data will be analyzed by one-way ANOVA's method when it is distributed normally and Kruskal Wallis method when data is not distributed normally with the value $p < 0,05$ as the significance value.

Results: Albumin levels was decreased from control value after uric acid induction ($p < 0,05$) and increased after administration of Allopurinol ($p < 0,05$). Collagen type 1 expression was increased after uric acid induction ($p < 0,05$) and decreased after administration of Allopurinol ($p < 0,05$). Decreased Albumin levels and increased Col 1 mRNA expression represent inflammation and fibrosis in liver.

Conclusion: The results obtained were higher collagen type 1 mRNA expression and lower albumin levels in mice induced by uric acid and given Allopurinol compared to mice induced by uric acid without allopurinol.

Keywords: Uric Acid, Allopurinol, liver albumin, the expression of collagen type 1, α -SMA.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hiperurisemia semakin menjadi masalah dalam dunia kesehatan. Hiperurisemia diketahui terlibat dalam perkembangan beberapa penyakit seperti hipertensi, sindrom metabolik, dan penyakit kardiovaskular (Afzali *et al.*, 2010). Prevalensi terjadinya gout di Amerika Serikat meningkat dari 2,9 kasus tiap 1,000 orang pada tahun 1990 menjadi 5,2 kasus tiap 1,000 orang pada tahun 1999 (Wallasce *et al.*, 2004). Hal ini terjadi ketika kadar asam urat melebihi 6,8 mg/dL dan terbentuk kristal asam urat dalam bentuk monosodium urate (MSU). Monosodium urat ini kemudian menjadi pemicu terjadinya inflamasi dan gout (Culleton *et al.*, 1999).

Asam urat merupakan hasil metabolisme akhir dari purin yaitu salah satu komponen asam nukleat yang terdapat dalam inti sel tubuh. Kadar asam urat normal pada pria berkisar 3 – 7 mg/dl dan pada perempuan 2,5–6 mg/dl. Kadar asam urat diatas normal disebut hiperurisemia. Asam urat merupakan zat hepatotoksik yang dapat merusak jaringan. Asam urat termasuk dalam *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) pro-inflamasi yang dilepas oleh sel yang mati kemudian dikenali oleh *Toll-like Receptor* (TLR) sehingga dapat memicu terjadinya reaksi inflamasi dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Jin *et al.*, 2012).

Hiperurisemia bisa timbul akibat produksi asam urat yang berlebihan dan pembuangan asam urat yang berkurang. Faktor yang menyebabkan hiperurisemia adalah produksi asam urat di dalam tubuh meningkat terjadi karena tubuh

memproduksi asam urat berlebihan penyebabnya antara lain adanya gangguan metabolisme purin bawaan (penyakit keturunan), berlebihan mengonsumsi makanan berkadar purin tinggi, dan adanya penyakit kanker atau pengobatan (kemoterapi) serta pembuangan asam urat sangat berkurang keadaan ini timbul akibat dari minum obat (anti TBC, obat duretik/HCT, dan salisilat), dalam keadaan kelaparan (Merriman, 2015).

Hati adalah organ penting dalam tubuh manusia. Ini melakukan berbagai fungsi yang membantu mendukung metabolisme, imunitas, pencernaan, detoksifikasi, penyimpanan vitamin di antara fungsi-fungsi lainnya. Ini terdiri sekitar 2% dari berat badan orang dewasa (Abdel-Misih *et al.*, 2010). Hati adalah organ unik karena suplai darah rangkap dari vena portal (sekitar 75%) dan arteri hepatis (sekitar 25%). Hati memiliki fungsi yang sangat penting dalam tubuh manusia karena berfungsi dalam memproduksi empedu, sebagai tempat penyimpanan dan metabolisme vitamin larut lemak, metabolisme obat, metabolisme bilirubin dan berbagai peran lainnya (Knell, 1980). Etiologi dari kerusakan hepar adalah alkohol, infeksi virus, gangguan genetik, gangguan sistem imun, keganasan, dan kelainan struktur. Hal ini yang dapat mengakibatkan terjadinya fibrosis dan cirosis hepatis (Lee & Friedman, 2011).

Inflamasi kronis pada hati dapat mengarah ke sirosis hepatitis yang mana menjadi penyebab kematian nomor 12 di Amerika Serikat (Centers for Disease Control and Prevention. Health, United States, 2015), bertanggung jawab atas kematian 32.000 orang di Amerika Serikat dan lebih dari 1 juta kematian setiap tahun di seluruh dunia (Mokdad *et al.*, 2014). Cidera mengubah ekspresi gen

hepatosit, menghasilkan peningkatan ekspresi TGF- β , IL-1A, Hedgehog ligands, dan CXCL10. Cidera hepatosit ini dapat menginduksi inflamasi dan fibrosis (Robinson & Harmon, 2016). Di Indonesia belum ada data pasti mengenai angka kejadian peningkatan kadar serum asam urat (Kurniari *et al.*, 2011).

Gangguan hepatosit menyebabkan terganggunya produksi albumin sehingga jumlahnya menjadi berkurang. Hal ini terjadi akibat inflamasi hepar dan fibrosis hepar (Beckett *et al.*, 2010). Saat terjadi proses inflamasi, maka fibroblas akan memperbaiki kerusakan jaringan dengan menimbulkan ekspresi α -SMA (Jester *et al.*, 1995). Inflamasi ini juga menyebabkan gangguan pada proses sintesis kolagen sehingga produksi serabut kolagen berlebihan dan menyebabkan fibrosis hepar (Mescher, 2009).

Allopurinol merupakan salah satu obat asam urat. Allopurinol bekerja dengan menghambat xantine oxidase dan mencegah sintesis urat dari hypoxantine dan xantine. Allopurinol digunakan untuk mengatasi hiperuricemia pada pasien dengan gout. (Becker *et al.*, 2005). Sehingga dengan dilakukan penelitian ini, kita dapat mengetahui perbandingan kadar albumin, ekspresi mRNA kolagen tipe 1 dan α -SMA pada hepar mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol terhadap hepar mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang penelitian, maka permasalahan yang diajukan adalah:

1. Bagaimana pengaruh pemberian Allopurinol terhadap albumin hepar pada mencit yang diinduksi asam urat?

2. Bagaimana pengaruh pemberian Allopurinol terhadap ekspresi mRNA kolagen tipe 1 pada mencit yang diinduksi asam urat?

C. Tujuan Penelitian

C. 1. Tujuan umum

Mengkaji pengaruh pemberian Allupurinol terhadap hepar mencit yang terinduksi asam urat.

C.2. Tujuan khusus

1. Mengkaji pengaruh pemberian allopurinol pada mencit yang diinduksi asam urat terhadap kadar albumin hepar.
2. Mengkaji pengaruh pemberian allopurinol pada mencit yang diinduksi asam urat terhadap ekspresi mRNA kolagen tipe 1.
3. Mengkaji pengaruh pemberian allopurinol pada mencit yang diinduksi asam urat terhadap ekspresi α -SMA.

D. Keaslian Penelitian

Telah dilakukan beberapa penelitian mengenai pengaruh asam urat terhadap kondisi hepar. Penelitian-penelitian tersebut membahas mengenai bagaimana efek yang terjadi akibat asam urat terhadap sel hepatosit dan inflamasi yang ditimbulkan. Namun belum banyak penelitian yang mengkaji mengenai progresifitas yang terjadi pada hepar setelah terpapar asam urat dan setelah diberi terapi Allupurinol.

Berikut adalah beberapa penelitian yang memiliki pokok bahasan yang serupa dengan penelitian ini :

1. Haryono, *et al.* (2018) Meneliti tentang pengaruh Allopurinol dalam menurunkan asam urat di ginjal dilihat dari Glomerulus Injury score, arteriolar injury score,

ekspresi mRNA MCP-1 dan ekspresi mRNA e-NOS. Kesamaan terhadap penelitian penulis terletak pada subjek yaitu mencit, prosedur, dan metode yang digunakan. Perbedaan terletak pada organ yang diteliti serta variabel yang digunakan yaitu pada penelitian penulis, variabel yang digunakan adalah kadar albumin dan ekspresi kolagen tipe 1.

2. Romi, *et al.* (2017) Meneliti pengaruh pemberian asam urat dalam menyebabkan perluasan fibroblas, ekspresi Endothelin-1, dan inflamasi pada ginjal. Kesamaan terhadap penelitian penulis terletak pada subjek yaitu mencit, prosedur, dan metode yang digunakan. Perbedaan terletak pada organ yang diteliti serta variabel yang digunakan yaitu pada penelitian penulis, organ yang diteliti adalah hepar dan variabel yang digunakan adalah kadar albumin dan ekspresi kolagen tipe 1.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini dapat menambah pengetahuan mengenai dampak asam urat terhadap hepar serta Allopurinol sebagai terapinya.

2. Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi penelitian lebih lanjut mengenai peran asam urat dalam menyebabkan inflamasi hepar dan efek pemberian Allopurinol terhadapnya.

3. Manfaat bagi masyarakat

Penelitian ini diharapkan bisa menambah pengetahuan kepada masyarakat mengenai pengaruh asam urat pada kerusakan hepar dan allopurinol sebagai terapinya.

BAB II

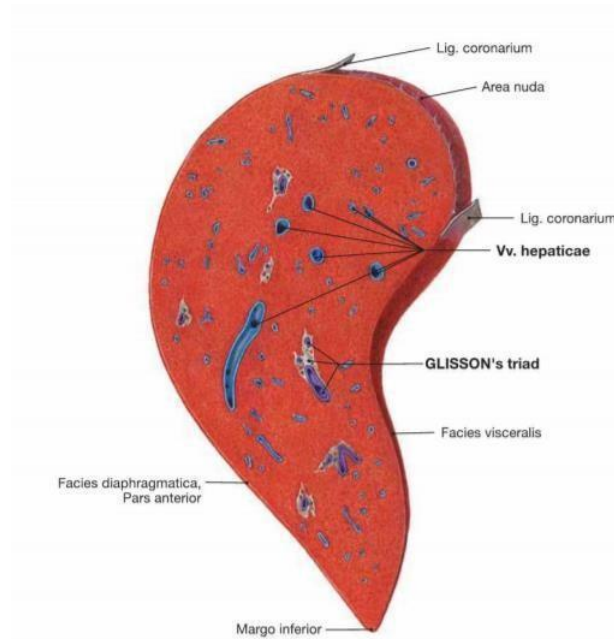
TINJAUAN PUSTAKA

A. Anatomi dan Histologi Hepar

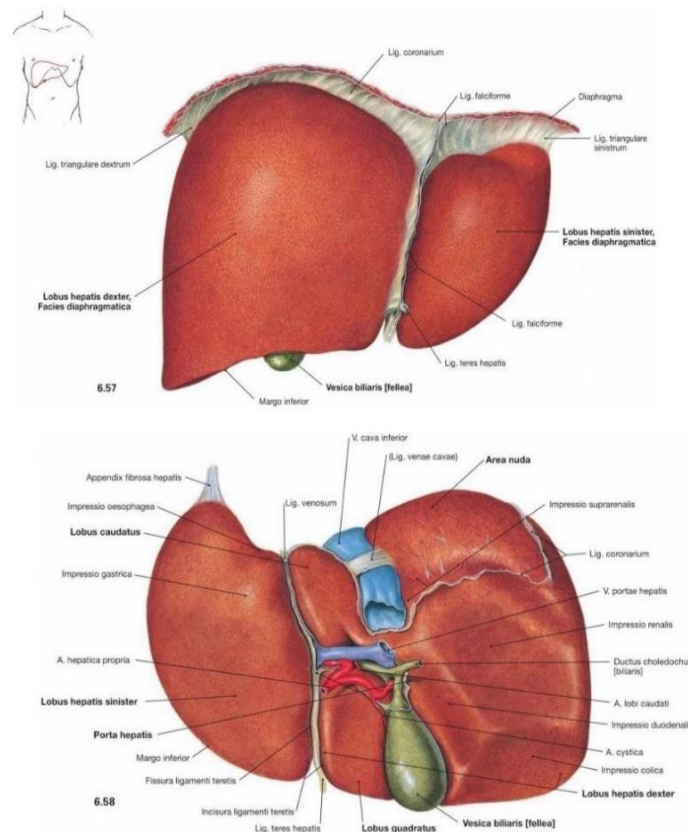
A. 1. Makroskopis

Hepar merupakan organ yang paling besar (2%-3%) dari rata-rata berat tubuh manusia (Abdel-Misih *et al.*, 2010). Hepar manusia terdiri dari lobus kanan yang lebih besar dan lobus kiri yang kedua lobus ini dipisahkan oleh ligamentum falciforme. Hepar memiliki fascies vicalis yang melekat pada organ abdomen di anterior lower margin dan Fascies diafragmatika yang terletak melekat pada diafragma (Paulsen & Waschke, 2016). Hepar manusia memiliki warna merah tua yang kaya akan persediaan darah. Sebagian besar hepar terletak di profunda arcus costalis dextra dan hemidiaphragma dextra memisahkan hepar dari pleura, pulmo, pericardium, dan cor. Berat hepar manusia kurang lebih 1,5 kg (Mescher, 2010).

Hepar terbagi menjadi empat lobus, yaitu lobus kanan, lobus caudatus, lobus kiri, dan lobus caudatus. Struktur vaskular dan empedu memasuki hati melalui hilum (v. Porta Hepatika, A. Hepatika propria, Ductus hepaticus Communis) dan dikelilingi oleh jaringan ikat. Mereka bercabang didalam parenkim hati membentuk triad Glisson atau biasa disebut trias Porta (Paulsen & Waschke, 2016)



Gambar 1. Gambar Makroskopis dari hepar bagian dalam. (Netter, 2011).

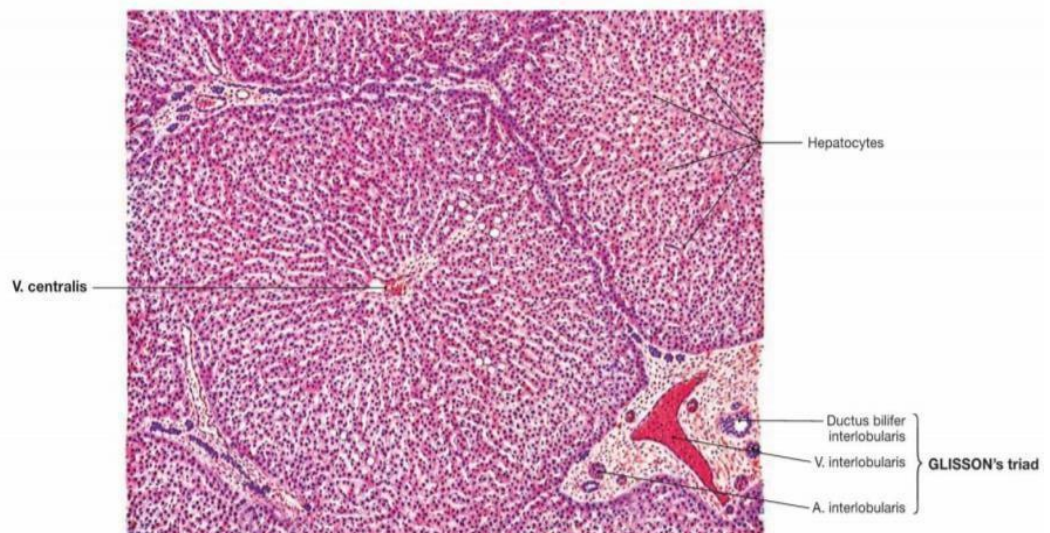


Gambar 2. Makroskopis hepar bagian luar tampak depan dan belakang. Terlihat 4 lobus hepar yaitu lobus kanan, lobus caudatus, lobus kiri, dan lobus caudatus (Netter, 2011).

A. 2. Mikroskopis

Hepar tersusun atas satu jenis sel parenkim yang disebut Hepatosit. Sel ini mengubah nutrisi yang sampai ke hepar menjadi produk simpanan, misalnya glikogen (Gartnes & Hiatt, 2014). Sel ini tersusun berderet menyerupai susunan bata didalam lobulus hati. Celah diantara sel ini mengandung kapiler yang disebut sinusoid hati (Mescher, 2009).

Terdapat 3 struktur yang disebut trias porta yaitu terdiri dari Vena Porta, Arteri Hepatika dan Ductus Choledocus. Selain sel hepatosit, di hepar juga terdapat sel endotel, sel magrofag yang disebut sel Kuppfer yang berfungsi untuk memfagosit eritrosit tua, hemoglobin dan mensekresi sitokin, dan juga terdapat sel ito atau hepatic stellate cell yang berfungsi sebagai penyimpanan vitamin A (Mescher, 2009).



Gambar 3. Mikroskopik hepar. Dapat ditemukan adanya trias porta serta sel utama yang ada di hepar yaitu hepatosit (Netter, 2011).

B. Asam Urat

Asam urat merupakan hasil metabolisme akhir dari purin yaitu salah satu komponen asam nukleat yang terdapat dalam inti sel tubuh. Asam nukleat dalam tubuh terdiri dari cincin purin dan pirimidin. Cicin pirimidin terdiri dari Cytosine dan Thymine, sedangkan cincin purin terdiri dari Adenosine dan Guanosin. Adenosine dan Guanosine inilah yang kemudian memiliki produk akhir berupa Asam Urat (Fu *et al.*, 2014).

Kadar asam urat normal pada pria berkisar 3 – 7 mg/dl dan pada perempuan 2,5–6 mg/dl. Apabila kadar asam urat dalam darah diatas nilai tersebut maka kondisi ini disebut hiperurisemia (Merriman, 2015). Hiperurisemia dapat terjadi akibat kelebihan produksi dan kelebihan ekskresi dari produk katabolit purin di atas. Ketika asam urat dalam serum melebihi batas solubilitasnya (6,8 mg/dL), sodium urat akan mengkristal di jaringan lunak dan sendi sehingga menimbulkan reaksi inflamasi yang disebut gout arthritis (Fu *et al.*, 2014).

Faktor yang menyebabkan hiperurisemia adalah produksi asam urat di dalam tubuh meningkat akibat gangguan metabolisme purin bawaan (penyakit keturunan), berlebihan mengkonsumsi makanan berkadar purin tinggi, dan adanya penyakit kanker atau pengobatan (kemoterapi) serta pembuangan asam urat sangat berkurang keadaan ini timbul akibat dari minum obat (anti TBC, obat duretik/HCT, dan salisilat), dalam keadaan kelaparan (Merriman & Dalbeth, 2011).

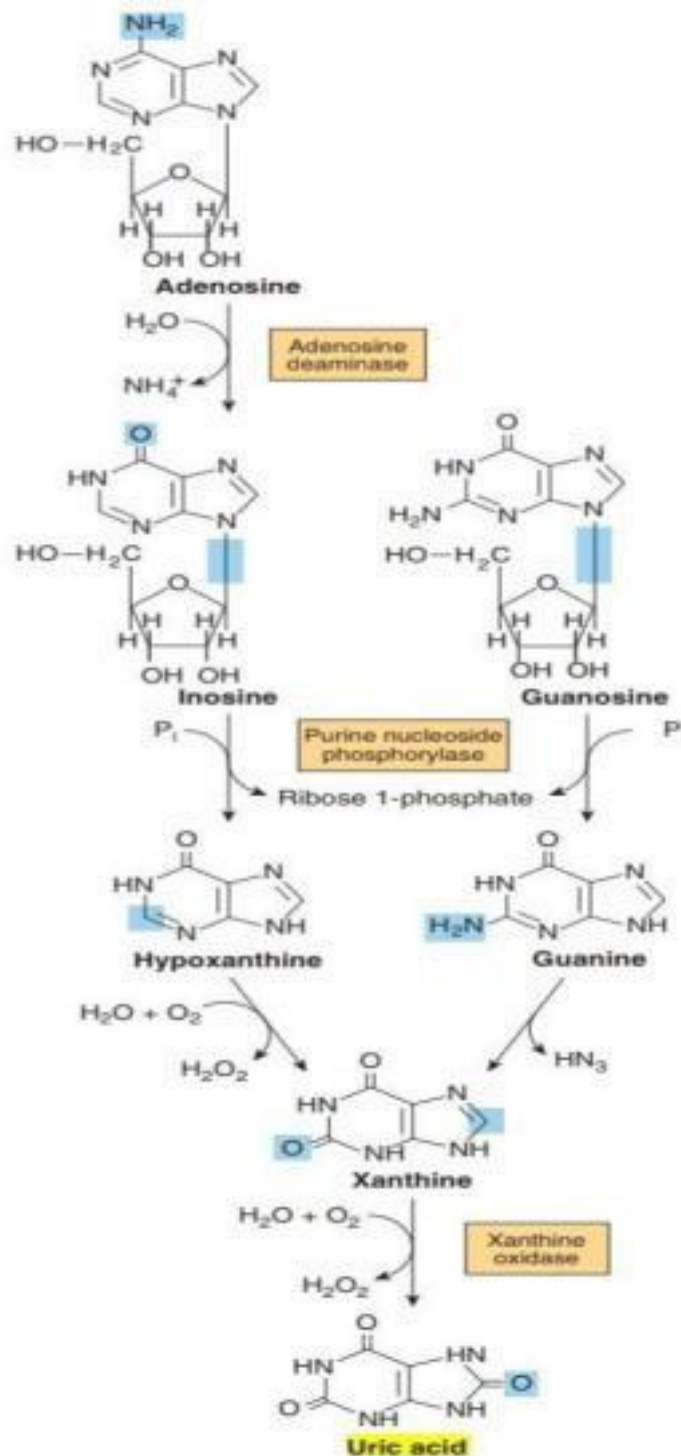
Asam urat dapat merusak jaringan karena termasuk agen hepatotoksik. Kerusakan yang diakibatkan tergantung besarnya dosis dan durasi paparan. Asam urat merupakan *damage-associated moleccular patterns* (DAMPs) pro-inflamasi

yang dilepaskan sel *Toll-Like Reseptor* (TLR) sehingga dapat memicu proses inflamasi dan menyebabkan kerusakan hepar (Jin *et al.*, 2012).

Hepatosit merupakan sel yang paling sensitif diantara kumpulan sel-sel yang terdapat di hepar apabila mengalami paparan dari agen toksik. Asam urat dapat berperan sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang merupakan sinyal yang dapat memicu terjadinya reaksi inflamasi pada hepar. Inflamasi hepar secara umum berasosiasi dengan kematian sel hepatosit bisa berupa nekrosis maupun apoptosis. Kerusakan sel hepar ini dapat menginisiasi terjadinya respon inflamasi dan akan berlanjut menjadi fibrosis hepar (Lewindon, 2002).

Pada orang normal, asam urat akan dieksresikan melalui urin. Terdapat 3 transporter penting yang berperan dalam regulasi asam urat serum yaitu ABCG2, URAT1 dan GLUT9. Terdapat juga enzim uricase yang berfungsi mengubah asam urat menjadi Allantoin yang lebih mudah larut dalam air (Maiuolo *et al.*, 2015)

Konsentrasi asam urat dapat diukur dalam serum, plasma dan urin. Apabila pH urin lebih rendah dari 5,75 maka asam urat akan mengkristal. Produksi dan katabolisme purin relatif konstan antara 300-400mg setiap hari. Ginjal membuang 2/3 sedangkan saluran pencernaan membuang 1/3 dari kadar asam urat. Hampir seluruh asam urat disaring dari glomerulus dan setelah menuju tubulus proksimal maka akan terjadi reabsorpsi dan sekresi asam urat. Kira-kira 90% direabsorpsi dalam darah. Oleh sebab itu, gangguan pada ginjal dapat menyebabkan kondisi hyperuricemia (Jin *et al.*, 2012).



Gambar 4. Proses pembentukan asam urat (Fu *et al.*, 2014)

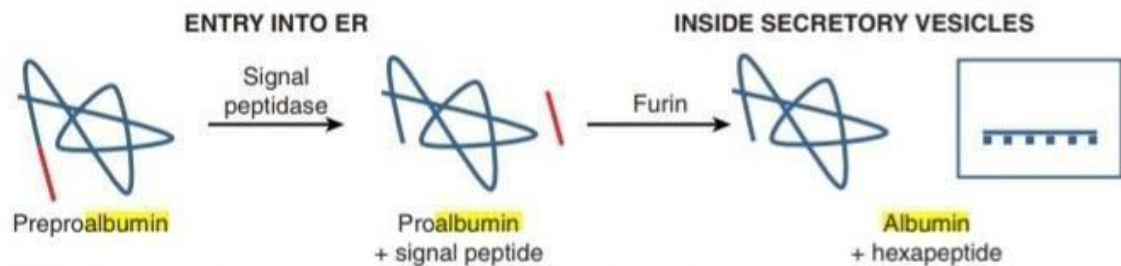
C. Allopurinol

Allopurinol merupakan salah satu obat asam urat. Allopurinol memiliki nama lain Zyloprim, Aloprimn. Obat ini dapat diberikan secara oral dan intravena. Allopurinol menghambat xantine oxidase dan mencegah sintesis urat dari hypoxantine dan xantine. Allopurinol digunakan untuk mengatasi hiperuricemia pada pasien dengan gout. (Becker *et al.*, 2005).

Sebelum pemberian allopurinol. Purin yang ada di urin didominasi asam urat, namun setelah diberikan Allopurinol, terdapat xantin dan hipoxantin juga di dalam urin. Sehingga selain menurunkan jumlah asam urat di plasma, juga meningkatkan eksresi purin tanpa berefek pada urinari trek. Allopurinol mencegah kadar asam urat di plasma agar tidak melebihi batas sehingga tidak berubah menjadi kristal dan tidak membentuk tophus dan gout (Brunton *et al.*, 2011).

D. Albumin Hepar

Albumin merupakan protein terbanyak didalam plasma darah. Albumin dibuat di hati oleh sel hepatosit dalam bentuk preproalbumin yang kemudian berubah menjadi proalbumin dan dengan bantuan furin kemudian diubah menjadi albumin (Albert B *et al.*, 2008). Albumin memiliki fungsi utama dalam memelihara tekanan osmotik darah (Mescher, 2009). Albumin tersusun atas rantai tunggal polipeptida dan terangkai dari 585 asam amino. Albumin disintesis di hepar sebanyak 12 gram setiap harinya. Sebanyak 40% albumin dalam tubuh berada di dalam plasma dimana jumlah ini menyumbang 3/5 dari total berat protein plasma (3,4-4,7 g/dL) serta sisanya terdapat di ekstrasvaskular yakni diantaranya 200-500 mcg/g di jaringan hati (Schaller H *et al.*, 2008).



Gambar 5. Proses pembentukan Albumin (Rodwell *et al.*, 2015)

Albumin didistribusikan dari hepatosit dapat secara langsung ke sinusoid dan vasa dapat pula melalui ruang antar sel hati kemudian ke saluran limfe yaitu duktus torasikus baru kemudian menuju intravaskuler. Hanya albumin yang berada dalam intravaskuler yang dapat berfungsi sebagai penjaga tekanan onkotik. Selain berfungsi sebagai penjaga tekanan onkotik darah, albumin juga berperan dalam memfasilitasi transport asam lemak, steroid hormon, calcium, billirubin, copper, dan beberapa plasma tryptophan (Schaller *et al.*, 2008).

Mikroalbuminuria didefinisikan apabila jumlah albumin 24 jam dalam urin sebanyak 30-300 mg albumin (Rodwell *et al.*, 2015). Total serum protein dan albumin rendah pada penderita penyakit hati kronis contohnya seperti sirosis hepatitis. Hal ini berhubungan dengan proses inflamasi dan fibrosis hepatitis. Kerusakan pada sel hepar ini juga berakibat kepada pemanjangan protombin time akibat gangguan sistesis faktor koagulasi serta juga mengakibatkan tingginya jumlah billirubin direct dan indirect. (Beckett *et al.*, 2010).

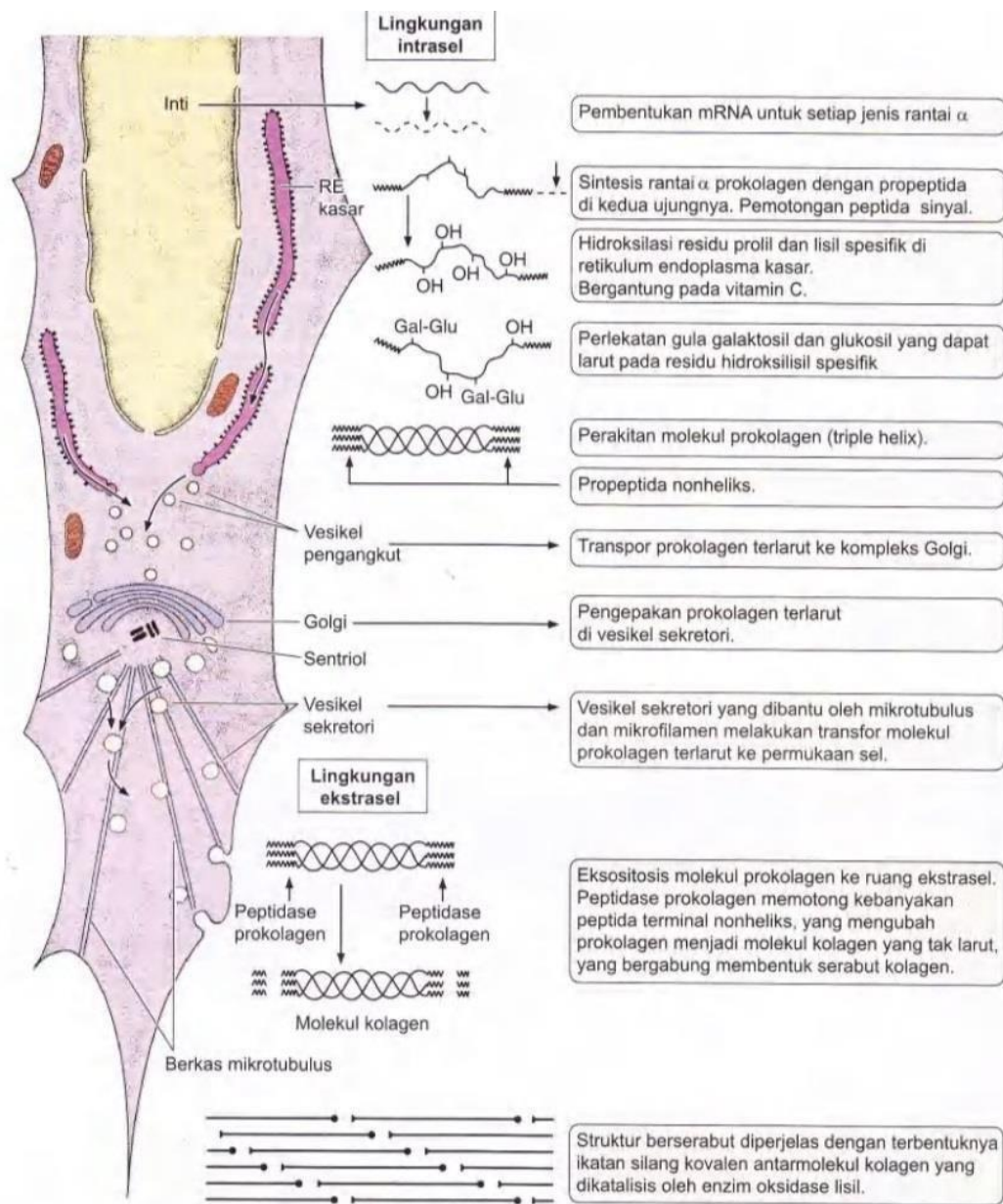
E. Ekspresi Kolagen Tipe 1

Kolagen merupakan suatu famili protein yang menyusun struktur jaringan ikat. Kolagen dapat dijumpai pada kulit, tulang, tulang rawan, otot polos, dan lamina basal. Kolagen memegang porsi protein terbanyak dalam tubuh manusia yakni 30% dari berat keringnya. Kolagen telah diidentifikasi memiliki lebih dari 20 jenis yang dinamai dengan angka romawi. (Mescher, 2009).

Molekul kolagen membentuk fibril panjang yang jelas terlihat dengan mikroskop cahaya. Jenis kolagen yang paling sering dijumpai dan tersebar luar adalah kolagen tipe 1. kolagen ini terdapat di jaringan sebagai struktur yang disebut serat kolagen yang kemudian membentuk tendon, simpai organ dan dermis (Mescher, 2009).

Sintesis kolagen dapat terjadi pada fibroblas, kondroblas, osteoblas, dan odontoblas. Sintesis ini terjadi di ribosom RE Kasar yang awalnya membentuk rantai prokolagen α yang akhirnya membentuk kolagen dan serabut kolagen.

Berikut proses lengkapnya :



Gambar 6. Sintesis Kolagen (Mescher, 2009).

Sintesis kolagen melalui rangkaian proses yang panjang seperti yang sudah dijabarkan diatas. Ini tergantung dari ekspresi beberapa gen dan beberapa peristiwa pasca translasi. Oleh sebab itu, sangat memungkinkan terjadinya gangguan patologis yang mengakibatkan jumlah sistesis kolagen kurang ataupun abnormal.

Mutasi di gen $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ menyebabkan osteogenesis imperfecta. Sistesis kolagen yang berlebihan dapat menyebabkan penumpukan kolagen yang disebut fibrosis. Hal ini sering terjadi di kulit, saluran cerna, otot dan ginjal sehingga menyebabkan pengerasan dan gangguan fungsi organ yang terkena (Mescher, 2009).

Proses perbaharuan atau kolagen pada jaringan ikat normal umumnya terjadi lambat. Pada beberapa organ seperti ligamen dan tendon, kolagen bersifat stabil, sedangkan pada organ lain seperti periodontal, laju perbaharuan kolagen sangat tinggi. Kolagen didegradasi terlebih dahulu baru kemudian diperbaharui. Proses degradasi ini diawali oleh enzim kolagenase, yang merupakan enzim golongan *matrix metalloproteinase* atau MMP. Enzim ini memotong molekul kolagen untuk didegradasi lebih lanjut (Mescher, 2009).

F. Ekspresi α -SMA

α -SMA merupakan isoform aktin yang dapat ditemukan di sel otot polos, myofibroblas, dan pembuluh darah serta memiliki peran dalam fibrogenesis (Cherng *et al.*, 2008). α -SMA dapat menjadi penanda adanya fibroblas dan miofibroblas (Garret *et al.*, 2004). Kontraksi miofibroblas berhubungan dengan ekspresi α -SMA yang mana terjadi ketika adanya proses inflamasi, penyembuhan luka, fibrosis, dan karsinogenesis (Cherng *et al.*, 2008).

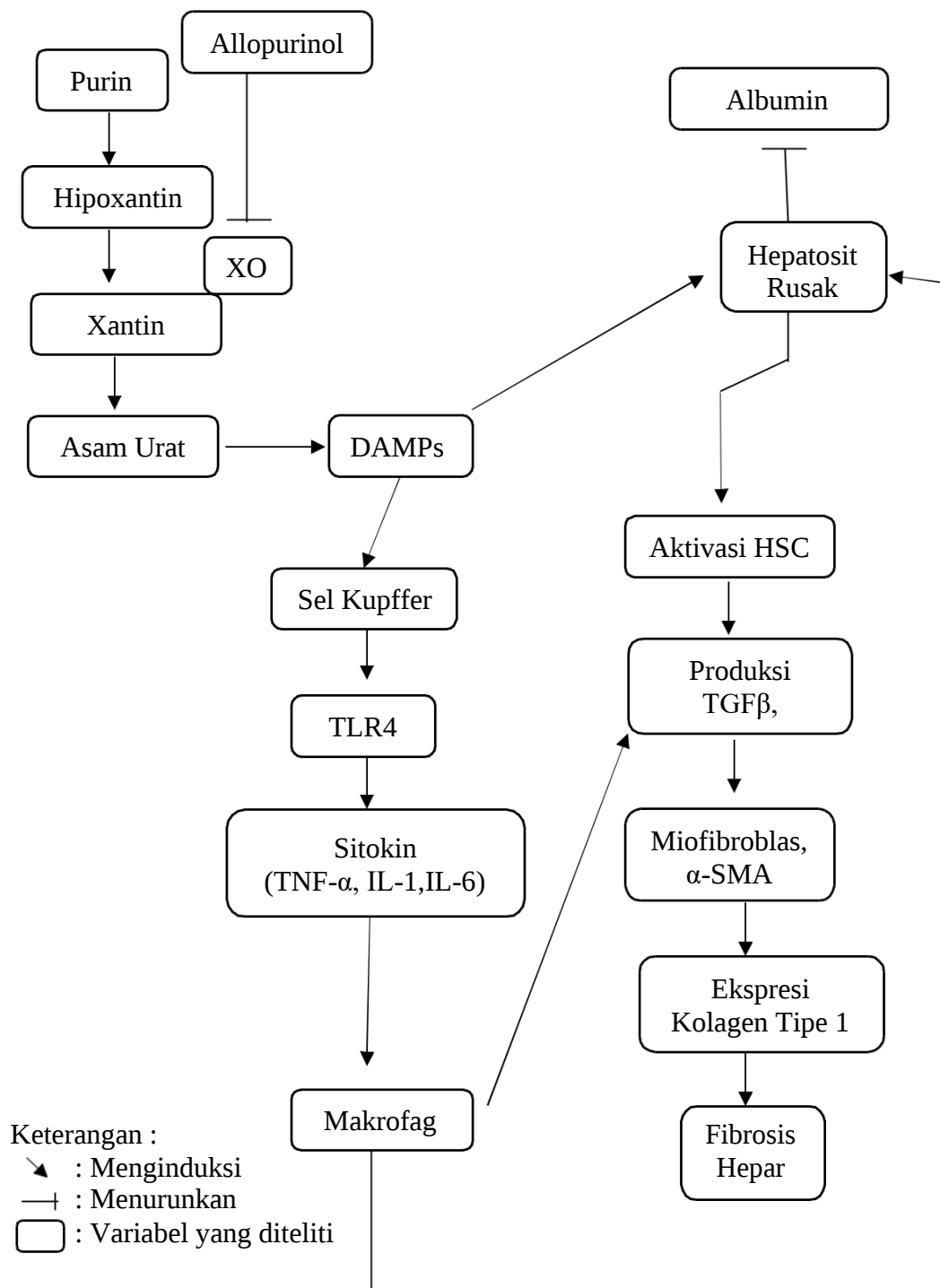
Fibrosis terjadi ketika adanya kerusakan jaringan atau inflamasi. Fibroblas berkontribusi terhadap fibrosis dengan meningkatkan kekuatan kontraktile untuk mengaktifkan ikatan integrin, TGF- β dan mensekresi kolagen serta matriks ekstraseluler lainnya untuk membentuk luka. Sehingga dengan ekspresi α -SMA, dapat dilihat adanya fibroblas patologis dan fibrosis hepar (Lee & Friedman, 2011).

G. Fibrosis Hepar

Penyakit hati kronis seperti hepatitis virus kronis, non-alcoholic fatty liver disease, chronic alcoholic liver disease dapat menyebabkan kondisi proses inflamasi dan fibrosis hati. Kondisi ini kemudian dapat berkembang buruk menjadi sirosis hati dan kanker hati (Marzuki K *et al.*, 2007).

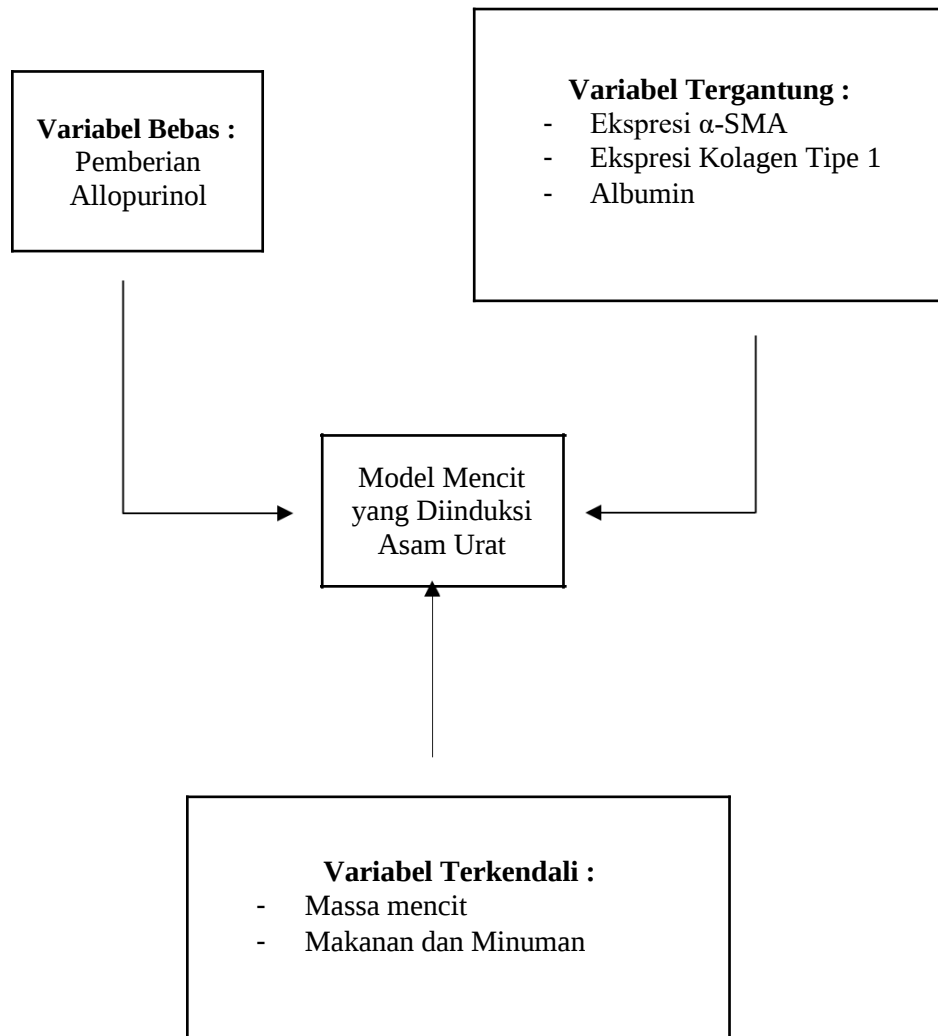
Fibrosis hati ditandai dengan produksi berlebihan dari ekstraselular matriks. Sumber ekstraselular matriks yang terlibat adalah sel stelata/sel ito/HSC (Lee & Friedman, 2011). HSC distimulasi oleh sitokin fibrogenic yaitu angiotensin II yaitu merupakan hormon dari RAS (renin angiotensin sistem) (Bataller R *et al.*, 2003) . Angiotensin II kemudian berhubungan dengan peningkatan TGF β -1. Aktivasi HSC juga menunjukkan adanya protein mikofilamen intaselular, *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) (Am, 2000).

H. Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka Teori Penelitian

I. Kerangka Konsep



➤ : Memengaruhi

Gambar 8. Kerangka konsep penelitian.

J. Hipotesis

1. Kadar albumin pada mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.
2. . Ekspresi mRNA Kolagen Tipe 1 pada mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol lebih rendah dibandingkan dengan mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode kuasi eksperimental dengan rancangan *post test only with controlled group design*, yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

B. Variabel Penelitian

Berikut variabel yang diuji pada penelitian :

1. Variabel Bebas
 - a. Pemberian Allopurinol
2. Variabel Tergantung
 - a. Ekspresi Kolagen tipe 1
 - b. Kadar Albumin Hepar
 - c. Ekspresi α -SMA
3. Variabel Terkendali
 - a. Massa Mencit
 - b. Makanan dan Minuman

C. Definisi Operasional

1. Pemberian asam urat

Pemberian asam urat adalah pemberian larutan asam urat yang dibuat dari serbuk asam urat dosis 125 mg/kgBB/hari dilarutkan dalam NaOH 0,15 M. Kemudian larutan asam urat ini diinjeksikan melalui intraperitoneal. Injeksi dilakukan setiap hari selama 14 hari. Berat serbuk asam urat yang digunakan ditimbang menggunakan timbangan digital di laboratorium parasitologi FKMK UGM.

2. Kadar Asam urat

Kadar asam urat adalah jumlah asam urat yang didapat dari serum darah mencit yang diambil melalui vena retroorbita dan kemudian dibawa ke laboratorium Patologi Klinik FKMK UGM untuk diperiksa.

3. Pemberian allupurinol

Pemberian allupurinol adalah pemberian larutan Allupurinol dengan dosis 50mg/kgBB/hari melalui sonde selama 7 hari.

4. Ekspresi α -SMA

Ekspresi α -SMA adalah hasil yang didapat dari pemeriksaan histopatologis preparat hepar mencit yang diberi pengecatan α -SMA dan dilihat melalui mikroskop.

5. Ekspresi mRNA kolagen tipe 1

Ekspresi kolagen tipe 1 adalah hasil yang didapat dari analisis ekspresi gen kolagen tipe 1 menggunakan image J berdasarkan hasil foto yang diperoleh dari agar elektroforesis setelah dilakukan PCR.

6. Kadar Albumin

Kadar albumin adalah jumlah albumin yang didapat dari serum darah mencit yang diambil melalui vena retroorbita mencit yang telah terinduksi asam urat.

D. Bahan dan Alat Penelitian

D. 1. Bahan penelitian.

Berikut bahan yang digunakan dalam penelitian :

- Makanan dan minuman : pakan jenis AIN-76A dan air matang yang diberikan ad libitum.
- Asam urat (Sigma Aldrich, U2625-25G), allopurinol (Sigma Aldrich, A8003-25G), larutan NaOH 1M, akuades dan NaCl 0,9%.
- Bahan pemeriksaan kadar asam urat serum : ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), micro hematocrit

D.2. Alat penelitian.

Berikut alat yang digunakan dalam penelitian:

- Kandang, tempat pakan dan botol air minum. Alas kandang menggunakan sekam padi dan diganti setiap hari.
- Alat induksi : timbangan, jarum suntik 1cc, jarum sonde, betadine.
- Alat pengambilan jaringan hepar : sarung tangan, gunting, pinset, pisau bedah, tube, perfusor (Perista Pump)
- Isolasi RNA, pembuatan cDNA, dan RT-PCR : tabung eppendorf 1,5 ml (Axygen, MCT-150-C), tabung PCR 0,2 mL (Axygen, PCR-020C), sentrifugator, vortex, micropipet 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, dan tumbukan.

e. Elektroforesis : gelas ukur, labu erlenmayer, batang pengaduk, cetakan gel, dan mesin elektroforesis.

f. Pemeriksaan Histopatologi : slide, object glass, microtome, cetakan blok parafin, mikroskop, humidity chamber, microwave oven, glass jar, stopwatch.

E. Jalannya Penelitian

E. 1. Tempat penelitian

Tempat pemeliharaan mencit dan proses induksi asam urat dan allupurinol adalah di kandang khusus di Laboratorium Anatomi FKKMK UGM. Penimbangan dosis asam urat dilakukan di Laboratorium parasitologi FKKMK UGM. Pengukuran kadar asam urat dalam serum mencit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FKKMK UGM. Tempat pembuatan larutan asam urat, proses sacrafice mencit, pengambilan serum darah dan organ, prosedur IHC, PCR, dan Elektroforesis dilakukan di Laboratorium Anatomi FKKMK UGM. Foto dari gel hasil elektroforesis dilakukan di Laboratorium Terpadu lantai 2 gedung Radiopoetro.

E. 2. Persiapan penelitian

a. Pengurusan hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit swiss jantan sejumlah 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok. Setiap mencit dipelihara dalam kandang khusus di Laboratorium Anatomi dimana 1 kandang berisikan 5 ekor mencit. Mencit di aklimatisasi selama 7 hari dan diberi perlakuan selama 4 minggu. Mencit diberi makan menggunakan pakan AIN 76A dan minum dengan air matang setiap harinya.

b. Pembuatan asam urat

Larutan asam urat yang digunakan berasal dari campuran serbuk asam urat 125 mg/kgBB/hari yang ditimbang di Laboratorium parasitology dan dilarutkan dalam larutan NaOH 0,15M kemudian diinjeksikan melalui intraperitoneal. c. Pemberian allupurinol

Pemberian Allopurinol adalah pemberian allupurinol dengan injeksi intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB/hari. d. Terminasi hewan coba

Setelah mencit sudah selesai diberi perlakuan sepenuhnya, mencit kemudian dibunuh dengan cara dislokasi bagian leher. Setelah itu, bagian abdomen mencit dibuka hingga bagian cavum thorax dan dialirkan cairan NaCl 0,9% di bagian ventrikel kiri. Kemudian setelah hepar mencit sudah berwarna pucat, hepar diambil melalui lobus dextra dan disimpan di dalam tabung berisi formalin 10% formaldehid 4%, dalam PBS untuk pembuatan preparat, serta potongan yang lain disimpan dalam RNA-Later.

e. Pemeriksaan histopatologis

1. Mengambil slide sampel dari kulkas 4 °C dan diamkan pada suhu ruang selama 30 menit.
2. Sampel direndam dalam xylene I, II, III selama 5 menit untuk deparafinisasi.
3. Melakukan rehidrasi dengan meletakkan sampel pada rak staining logam dan rendam dalam ethanol 100% I dan II masing masing 5 menit, kemudian ethanol 90%, 80%, 70% masing masing 1 menit.
4. Memasukan ke dalam glass jar kaca dan cuci dengan air mengalir selama 5

menit sampai warna menjadi bening kemudian masukan kedalam glass
kaca berisi aquades selama 5 menit.

5. Antigen retrieval:
 - a. Menuangkan citrate buffer 1x ke dalam 2 buah glass jar akrilik sampai penuh.
 - b. Memasukan slide ke salah satu glass jar tersebut.
 - c. Memasukan glass jar yang berisi slide dalam microwave selama 5 menit.
 - d. Membuka microwave dan melihat jumlah citrate buffer dalam glass jar.
Apabila berkurang tambahkan citrate buffer dari glass jar sampai pemanasan mencapai total waktu 15 menit
 - e. Mengeluarkan glass jar dari microwave dan diamkan hingga mencapai suhu ruang selama 30 menit
6. Memindahkan slide ke dalam humidity chamber
7. Mencuci slide dengan PBS 1x 1000 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali.
8. Mengeringkan slide menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan.
9. Inhibisi peroksidase endogen dengan H₂O₂ 3% selama 5 menit :
 - a. Menyiapkan larutan H₂O₂ 3% dengan mencampur 1 mL H₂O₂ 30% dengan 9 mL PBS.
 - b. Meneteskan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 60-200 μ L pada jaringan sampel menggunakan mikropipet dan tunggu selama 5 menit
10. Mencuci slide dengan PBS 1x 100 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali.
11. Slide dikeringkan dengan tisu pada permukaan bawah dan sekitar jaringan.

12. Melakukan Blocking background dengan meneteskan 1-2 tetes larutan background Sniper pada jaringan per slide. Kemudian menutup jaringan dengan parafilm dan tunggu selama 20 menit.
13. Mengeringkan slide menggunakan tisu pada permukaan bawah dan sekitar jaringan
14. Melakukan pemeriksaan first Antibody:
 - a. Mengencerkan antibody anti- α SMA dengan konsentrasi 1:500 (1 μ L antibodi dalam 500 μ L BSA 1% dalam PBST). Untuk 1 slide sampel diperlukan sekitar 100 μ L larutan antibody, sehingga encerkan antibodi sesuai dengan jumlah slide yang akan diwarnai.
 - b. Membuka parafilm, kemudian mengeringkan dengan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan. Tanpa dicuci dengan PBS.
 - c. Meneteskan 70-100 μ L antibodi anti- α SMA di atas jaringan.
 - d. Menutup kembali jaringan dengan parafilm
 - e. Menutup humidity chamber dan simpan di dalam kulkas 4°C overnight.
15. Mengambil slide sampel dari kulkas 4°C dan diamkan pada suhu ruang selama 30 menit.
16. Mencuci slide dengan PBS 1x 1000 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali.
17. Mengeringkan slide menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan
18. Meneteskan 1-2 tetes Trekkie Universal Link pada jaringan per slide, kemudian tutup jaringan dengan parafilm. Tunggu selama 60-90 menit pada suhu ruang.

19. Mencuci slide dengan PBS 1x 1000 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali.
20. Mengeringkan slide menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan.
21. Meneteskan 1-2 tetes Trek Avidin-HRP label pada jaringan per slide, kemudian tutup jaringan dengan parafilm. Tunggu selama 45 menit pada suhu ruang.
22. Mencuci slide dengan PBS 1x 1000 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali.
23. Mengeringkan slide menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan.
24. Mempersiapkan larutan DAB 1:400 (1 μ L Betazoid DAB Chromogen + 400 μ L Betazoid DAB Substrate Buffer). Tiap slide dan tunggu selama 3 menit.
25. Memindahkan ke ruangan gelap. Meneteskan 70-100 μ L DAB pada jaringan per slide dan tunggu selama 3 menit.
26. Mencuci dengan air mengalir selama 5 menit dalam glass jar kaca.
27. Melakukan dehidrasi dengan etanol 70%, 80%, 90% selama 1 menit, etanol 100% I, II selama 5 menit.
28. Melakukan clearing dengan menggunakan xylene I, II, III selama 5 menit.
29. Melakukan mounting jaringan dengan meneteskan Entellan dan tutup dengan deck glass.

f. Pemeriksaan PCR

1. Ekstraksi RNA

- a. Jaringan hepar yang sudah dipotong kecil ditambahkan RNA Isoplus 0,5 mL

dan dihomogenisasi sambil menambahkan cairan isoplus terus menerus

hingga volume mencapai 1mL dan klorofom 0,2 mL.

- b. Melakukan vortex selama 15 detik dan sentrifugasi 13.000 RPM pada suhu 4° C selama 20 menit di laboratorium Biokimia FK UGM.
- c. Mengambil supernatan sebanyak 0,6 mL dan memindahkan ke tabung eppendorf, kemudian menambahkan 0,5 mL isopropanolol. Setelah itu melakukan vortex sampai muncul benang- benang putih dan mensentrifuge lagi 13.000 RPM dengan suhu 4° C selama 15 menit.
- d. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pellet disisakan untuk ditambah etanol 70% dalam DEPC, sentrifuge lagi 13.000 RPM dengan suhu 4° C selama 10 menit.
- e. Mengambil supernatan yang terbentuk dilarutkan dalam DEPC 30 – 50 µL.
- f. Melakukan inkubasi pada suhu 55° C selama 10 menit.

2. Pembuatan cDNA

- a. Membersihkan meja dengan alkohol 70%.
- b. Menyiapkan ice packed.
- c. Menyiapkan tabung eppendorf 0,2cc dan diberi label sesuai cDNA yang digunakan (kolagen tipe 1).
- d. Memasukan 3µl cDNA dari tabung eppendorf yang disimpan di -20° C ke dalam tabung eppendorf 0,2cc menggunakan mikropipet merah.
- e. Membuat PCR Mixture kolagen 1 yang terdiri dari cDNA 3µl, master mix 337,5µl, primer forward (5'-ATGCCGCGACCTCAAGATG-3') dan primer reverse (5'-TGAGGCACAGACGGCTGAGTA-3') 16,2µl, PCR

water 224,1µl

- f. Membuat PCR Mixture GAPDH yang terdiri dari cDNA 3µl, master mix 337,5µl, primer forward (5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'), primer reverse (5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3') 16,2 µl, PCR water 224,1 µl untuk perbandingan.
- g. Memasukan PCR Mixture kedalam tabung eppendorf yang berisi cDNA menggunakan mikropipet kuning.

3. Pemeriksaan PCR

Pemeriksaan PCR dilakukan dengan masukan hasil campuran cDNA dan mixture kolagen tipe 1 kedalam alat PCR. Sebelum dimasukan, pastikan campuran sudah merata dengan divortex terlebih dahulu baru kemudian masukan ke dalam mesin PCR. Setelah itu, setting pada tombol PCR menggunakan suhu 60 ° C sebanyak 35 siklus selama satu setengah jam. g. Pemeriksaan Elektroforesis

1. Pembuatan Gel

Pembuatan gel agarose 2% dilakukan dengan mencampur 2 gram agarose gel dan 200 mL TBE 0,5X dalam tabung Erlenmeyer. Kemudian memanaskan dalam microwave selama 3-4 menit dan menambahkan gel red. Menuangkan agarose dalam piringan gel dan didinginkan dalam suhu ruang selama 30-40 menit.

2. Elektroforesis

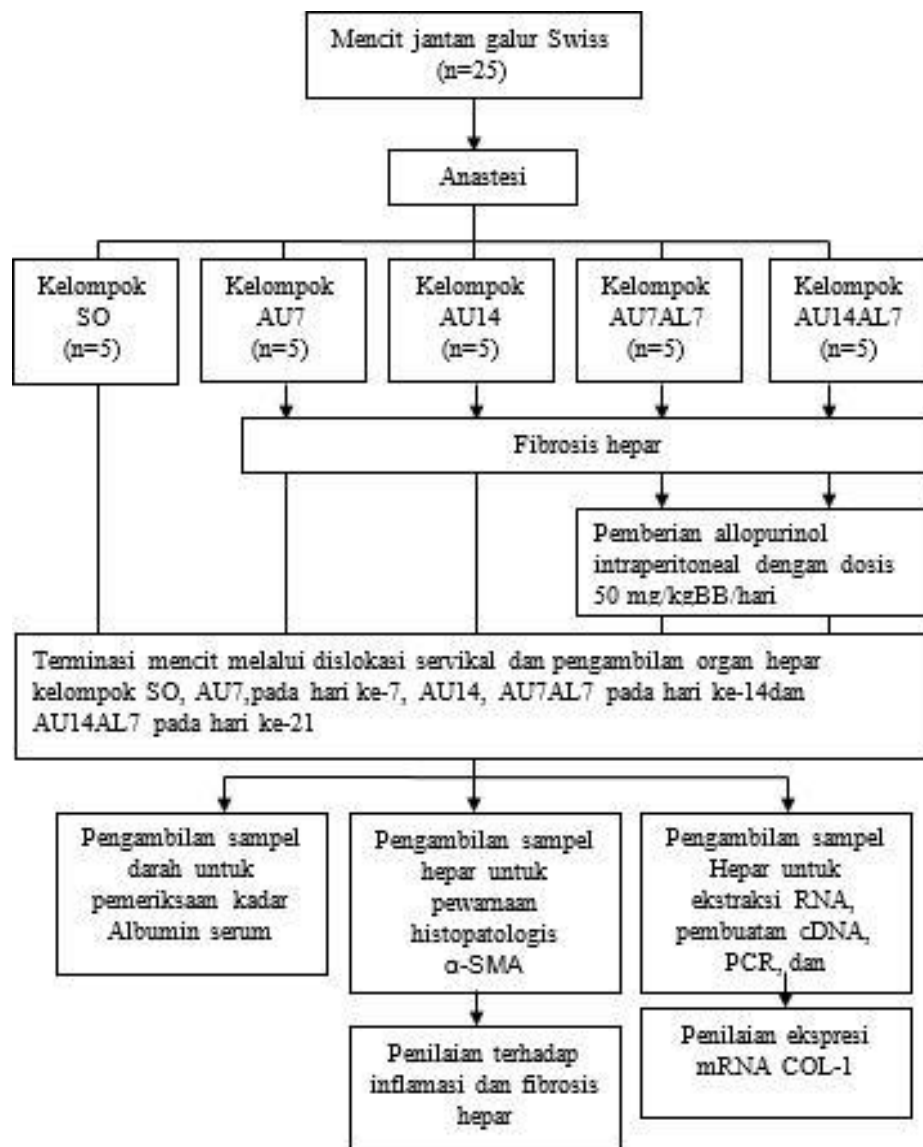
Pertama, memasukan agar ke dalam alat elektrofloresis yang sudah digenangi dengan larutan TBE 0,5X. Kemudian memasukkan 5 µL DNA ladder ke dalam agar elektroforesis di kotak pertama, setelah itu masukan hasil PCR dengan

urutan SO1, AU7 1, AU14 1, ALU7 1, ALU14 1 dan seterusnya dalam sumuran elektroforesis. Melakukan elektroforesis selama 15-20 menit.

a. Foto

Foto dari gel dilakukan di laboratorium Biokimia FK UGM dengan menggunakan gel doc. Hasil yang didapatkan berupa gambaran band dan dianalisis dengan menggunakan software ImageJ.

F. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

G. Analisis Data

G. 1. Ekspresi mRNA Kolagen tipe 1

Ekspresi mRNA Kolagen tipe 1 dapat dilihat dari hasil elektroforesis yang difoto menggunakan gel doc. Data yang diperoleh dalam bentuk band putih dianalisis densitometri dengan menggunakan ImageJ dan disajikan dalam bentuk angka yang menunjukkan perbandingan antara ekspresi Kolagen tipe 1 dengan GAPDH sebagai house keeping gene.

G. 2. Ekspresi α -SMA

Ekspresi α -SMA dihasilkan dari pemeriksaan histopatologis pada preparat hati mencit menggunakan pewarnaan α -SMA kemudian dicek menggunakan mikroskop dan dilihat kondisi sel hepanya.

G.3. Albumin Hepar

Kadar albumin mencit didapatkan dari hasil pengecekan jumlah albumin yang ada di serum mencit yang dilakukan menggunakan lab PK FKKMK UGM. Data yang diperoleh dari penelitian tersebut akan dianalisis dengan menggunakan software SPSS 19 for windows. Data-data yang didapatkan diuji terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data. Berdasarkan uji tersebut dapat diketahui apakah data penelitian akan diuji dengan uji statistik parametrik atau non-parametrik. Untuk menentukan adanya perbedaan rerata pada masing-masing variabel digunakan uji *one-way ANOVA* dan uji *post hoc LSD* jika data terdistribusi normal dan jika tidak terdistribusi normal akan dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *post hoc Mann Whitney*. Nilai $p < 0,05$ digunakan untuk menentukan level signifikansi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini telah memiliki izin dari komisi etik penelitian Kedokteran dan kesehatan Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada berdasarkan surat nomor KE/FK/0313/EC/2019.

A. 1. Karakteristik Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit swiss jantan sejumlah 25 ekor dengan berat yang bervariasi antara 20-30 kg. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan jumlah masing masing kelompok 5 ekor mencit. Kelompok kontrol diberi injeksi NaCl 0,9% secara intraperitoneal selama 28 hari. Kelompok AU7 diberi injeksi asam urat dengan dosis 125 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal selama 7 hari. Kelompok AU14 diinjeksi asam urat dengan dosis 125 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal selama 14 hari. Kelompok ALU7 diberi injeksi asam urat dengan dosis 125 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal selama 7 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol dengan dosis 50 mg/kgBB/hari selama 7 hari. Kelompok ALU14 diberi injeksi asam urat dengan dosis 125 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal selama 14 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol dengan dosis 50 mg/kgBB/hari selama 7 hari.

Jumlah mencit pada akhir penelitian ini adalah 25 ekor mencit yaitu 5 ekor kelompok kontrol, 5 ekor kelompok AU7, 5 ekor kelompok AU14, 5 ekor kelompok ALU7, 5 ekor kelompok ALU14.

A. 2. Albumin

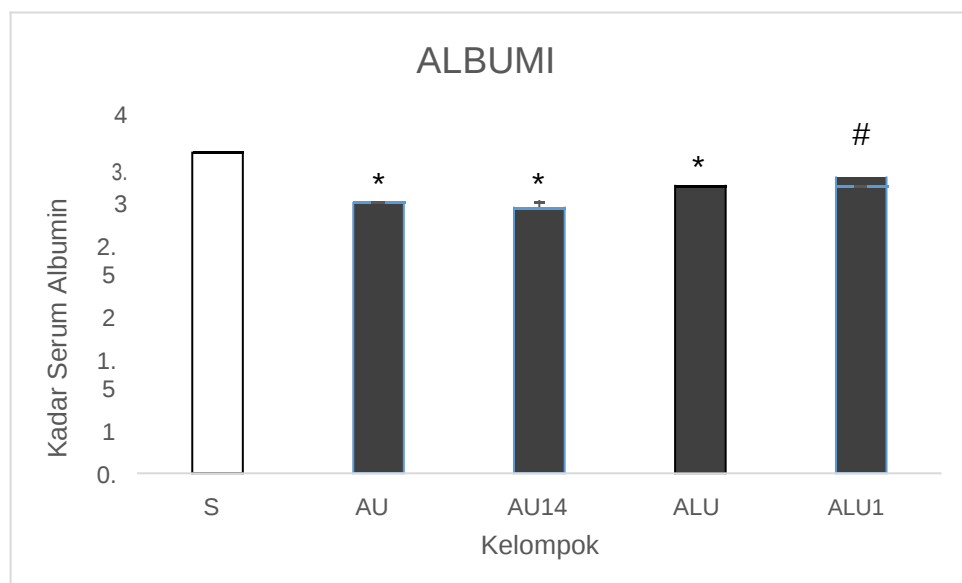
Dari hasil pemeriksaan yang kadar Albumin, didapatkan hasil rerata $\pm$ SD kadar albumin kelompok kontrol 3,574 $\pm$ 0,1 mg/dL, kelompok AU7 3,012 $\pm$ 0,092 mg/dL, kelompok AU14 2,96 $\pm$ 0,074 mg/dL, kelompok ALU7 3,204 $\pm$ 0,126 mg/dL dan kelompok ALU14 3,298 $\pm$ 0,11 mg/dL. Data rerata $\pm$ SD kadar Albumin setelah perlakuan disajikan dalam bentuk diagram batang.

Setelah itu dilakukan uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk test* karena jumlah subjek yang digunakan <50 . Hasil dikatakan terdistribusi normal ketika nilai $p > 0,05$. Dari hasil tersebut didapatkan kontrol ($p=0,100$), AU7 ($p=0,121$), AU14 ($p=0,314$), ALU7 ($p=0,806$) dan ALU14 ($p=0,346$) terdistribusi normal seluruhnya.

Untuk mengetahui perbandingan kadar Albumin antar kelompok kontrol, AU7, AU14, ALU21 dan ALU14, maka dilakukan uji hipotesis komparatif numerik lebih dari dua kelompok tidak berpasangan berdistribusi normal dengan menggunakan uji *One-way ANOVA*. Hasil uji *one-way ANOVA* antar kelompok didapatkan nilai $p < 0,05$ ($p=0,003$), artinya terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan atau paling tidak terdapat dua kelompok yang mempunyai rerata kadar albumin setelah perlakuan yang berbeda bermakna.

Karena hasil uji *One-way ANOVA* yang didapatkan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *post-hoc LSD* untuk mengetahui antar kelompok mana yang mempunyai perbedaan yang bermakna. Hasil uji *post-hoc LSD* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan AU7 ($p=0,001$), kelompok kontrol dan AU14 ($p=0,000$),

kelompok kontrol dan ALU7 ($p=0,019$), Serta kelompok AU14 dan ALU14 ($p=0,030$). Sedangkan pada kelompok kontrol dan ALU14 ($p=0,071$), kelompok AU7 dan AU14 ($p=0,724$), kelompok AU7 dan ALU7 ($p=0,200$), kelompok AU7 dan ALU14 ($p=0,062$), kelompok AU14 dan ALU7 ($p=0,108$), kelompok AU14 dan ALU14 ($p=0,030$), serta kelompok ALU7 dan ALU14 ($p=0,524$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna.



Gambar 10. Diagram batang hasil pemeriksaan kadar Albumin pada setiap kelompok mencit. Ada perbedaan bermakna kadar Albumin antar kelompok kontrol dan AU7 ($p=0,001$), kelompok kontrol dan AU14 ($p=0,000$), kelompok kontrol dan ALU7 ($p=0,019$) serta kelompok AU14 dan ALU14 ($p=0,030$). Keterangan: Kontrol: Kelompok kontrol dengan injeksi NaCl 0,9%, AU7: Kelompok induksi asam urat selama 7 hari, AU14: Kelompok induksi asam urat selama 14 hari, ALU7: kelompok induksi asam urat selama 7 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol selama 7 hari., ALU14: kelompok induksi asam urat selama 14 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol selama 7 hari. *= $p<0,05$ terhadap kontrol, #= $p<0,05$ terhadap AU14.

A. 3. Ekspresi mRNA Kolagen Tipe 1

Berdasarkan hasil pemeriksaan didapatkan rerata $\pm$ SD kol-1/GAPDH kelompok kontrol adalah $0,77\pm0,04$, kelompok AU7 adalah $1,01\pm0,06$, kelompok AU14 $0,95\pm0,04$, kelompok ALU7 $0,91\pm0,05$, kelompok ALU14 $0,85\pm0,05$.

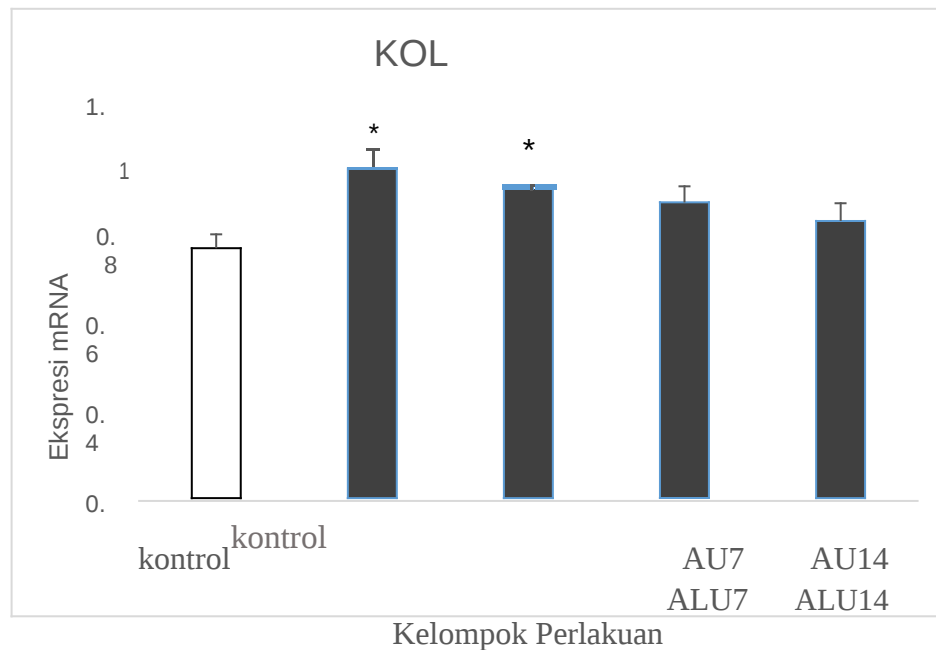
Setelah itu dilakukan uji normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk test* karena jumlah subjek yang digunakan <50 . Hasil dikatakan terdistribusi normal ketika nilai $p > 0,05$. Dari hasil tersebut didapatkan Kontrol ($p=0,086$), AU7 ($p=0,523$), AU14 ($p=0,240$), ALU7 ($p=0,746$) terdistribusi normal namun ALU14 tidak ($p=0,032$).



Gambar 11. Gambar pita hasil elektroforesis antara GAPDH dan Kol 1

Karena salah satu hasil tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji selanjutnya yaitu *Kruskal Wallis Test* yang dikatakan significant apabila $p < 0,05$. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai ($p=0,036$) sehingga dikatakan signifikan dan terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok tersebut.

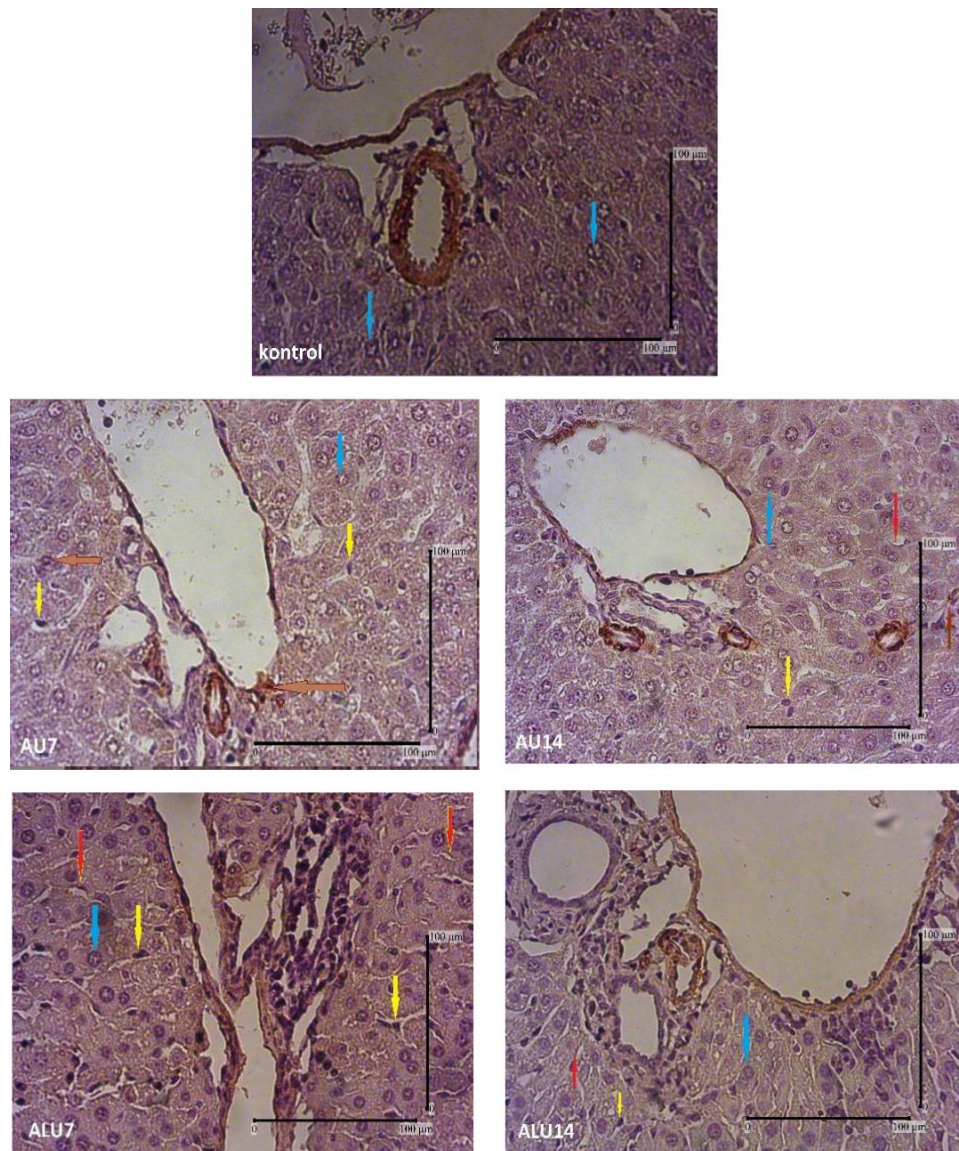
Kemudian untuk melihat perbedaan antar kelompok tersebut dilakukan uji *post hoc Mann Withney* dan didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol dan AU7 ($p=0,014$), dan kelompok kontrol dan AU14 ($p=0,014$) sedangkan pada kelompok kontrol dan ALU7 ($p=0,086$), kelompok kontrol dan ALU14 ($p=0,142$), kelompok AU7 dan AU14 ($p=0,347$), kelompok AU7 dan ALU7 ($p=0,135$), kelompok AU7 dan ALU14 ($p=0,076$), kelompok AU14 dan ALU7 ($p=0,347$), kelompok AU14 dan ALU14 ($p=0,251$), serta kelompok ALU7 dan ALU14 ($p=0,754$) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).



Gambar 12. Diagram batang hasil pemeriksaan PCR kolagen tipe 1 pada setiap kelompok mencit. Ada perbedaan bermakna kelompok kontrol dengan kelompok AU7 ($p=0,014$) dan kelompok kontrol dengan AU14 ($p=0,014$). Keterangan: kontrol: kelompok kontrol dengan injeksi NaCl 0,9%, AU7: kelompok induksi asam urat selama 7 hari, AU14: kelompok induksi asam urat selama 14 hari, ALU7: kelompok induksi asam urat selama 7 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol selama 7 hari., ALU14: kelompok induksi asam urat selama 14 hari dilanjutkan dengan terapi Allopurinol selama 7 hari. $*=p<0,05$ terhadap kontrol.

A. 4. Ekspresi α -SMA (Myofibroblast).

Pemeriksaan histopatologis menggunakan pewarnaan α -SMA untuk melihat sel hepar. Setelah diwarnai preparat diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan software Optilab dengan perbesaran 100 kali. Foto dilakukan pada sekitar trias prota dan daerah perisinusoid.



Gambar 13. Gambaran mikroskopis hepar dengan pewarnaan α -SMA. Dapat ditemukan beragam sel yang ada di hepar pada kelompok kontrol, AU7, AU14, ALU7 dan ALU14. Skala yang digunakan adalah 100 μ m. Panah warna biru menunjukan Hepatosit. Panah warna kuning menunjukan Sel Kupffer atau Makrofag. Panah warna merah menunjukan Sel Ito atau HSC. Panah warna cokelat menunjukan Miofibroblas.

B. Pembahasan

Penelitian ini melanjutkan penelitian sebelumnya dimana injeksi asam urat 125mg/kgBB dapat menimbulkan kondisi hiperurisemia. Kemudian dengan pemberian Allopurinol 50 mg/kgBB diketahui dapat menyebabkan penurunan kadar asam urat (Haryono *et al.*, 2018). Hal ini ditunjukkan dari kadar albumin yang lebih tinggi serta ekspresi mRNA kolagen tipe 1 yang lebih rendah setelah diinduksi asam urat dan diberikan Allopurinol dibandingkan dengan diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.

Albumin merupakan protein terbanyak yang terdapat didalam plasma darah. Albumin dibuat di hati oleh sel hepatosit dalam bentuk preproalbumin yang kemudian berubah menjadi proalbumin dan dengan bantuan furin kemudian diubah menjadi albumin. Penurunan kadar albumin menunjukan adanya kerusakan dari hepatosit. Dari hasil pemeriksaan terhadap kadar Albumin, didapatkan hasil kadar albumin mulai turun saat injeksi asam urat 7 hari dan semakin turun setelah induksi asam urat 14 hari. Namun setelah diberi Allopurinol, kadar albumin kembali naik (Albert *et al.*, 2008).

Hasil menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan AU7, kelompok kontrol dan AU14, kelompok kontrol dan ALU7, Serta kelompok AU14 dan ALU14. Adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan pemberian asam urat ini sesuai dengan teori diatas yang mengatakan bahwa penurunan kadar albumin karena induksi asam urat ini terjadi karena efek hepatotoksik dari asam urat yang menyebabkan pelepasan TLR dan terjadilah proses inflamasi (Jin *et al.*, 2012). Proses inflamasi inilah yang kemudian menyebabkan rusaknya hepatosit sehingga terjadi penurunan produksi albumin.

Adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok asam urat dan

Allopurinol juga membuktikan bahwa hasil di atas sesuai dengan teori yaitu dengan pemberian allopurinol ini maka terhentilah pembentukan asam urat dari hypoxanthine dan xantine melalui proses penghambatan enzim xantine oxidase (Day *et al.*, 2007). Sehingga dengan penurunan kadar asam urat ini dapat menurunkan angka kerusakan hepatosit dan mengembalikan kadar albumin.

Adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan Allopurinol 7 hari ini menunjukkan bahwa pemberian allopurinol selama 7 hari tidak cukup untuk mengembalikan kadar albumin ke kondisi normal. Hal ini bisa saja terjadi karena kesalahan yang ditimbulkan akibat menggunakan RT-PCR pada penelitian ini karena setelah dilakukan PCR tetap harus menggunakan alat lain yaitu ImageJ untuk kemudian dilakukan kuantifikasi. Hal ini bisa saja menimbulkan terjadinya bias. Untuk itu saya menyarankan menggunakan Real Time PCR, dimana pada mesin Real Time PCR, kuantifikasi dapat langsung dilakukan (Kuang *et al.*, 2018). Kolagen merupakan suatu famili protein yang menyusun struktur jaringan ikat. Kolagen dapat dijumpai pada kulit, tulang, tulang rawan, otot polos, dan lamina basal (Mescher, 2009). Sintesis kolagen dapat terjadi pada fibroblas, kondroblas, osteoblas, dan odontoblas. Akibat pemberian asam urat yang berlebihan, hepar mencit perlahan mengalami kerusakan yaitu terjadinya inflamasi dan berujung pada fibrosis. Pada penyakit hati kronis seperti hepatitis virus kronis, non-alcoholic fatty liver disease, chronic alcoholic liver disease dapat menyebabkan kondisi proses inflamasi dan fibrosis hati. fibrosis hati terjadi akibat proses sistesis kolagen yang berlebihan sehingga terbentuk penumpukan serabut kolagen (Lee & Friedman, 2011).

Dari penelitian didapatkan hasil grafik yang sesuai yakni dengan pemberian asam urat didapatkan hasil kolagen yang meningkat menunjukkan terjadinya kerusakan hepar dan setelah diberi terapi allopurinol hasilnya menunjukkan terjadi penurunan jumlah kolagen. Peningkatan Kolagen setelah diberikan asam urat selama 7 dan 14 hari ini menunjukkan hasil yang sesuai teori diatas yaitu mengatakan bahwa akan terjadi peningkatan kadar kolagen setelah diberikan asam urat. Peningkatan kadar kolagen karena induksi asam urat ini terjadi karena efek hepatotoksik dari asam urat yang menyebabkan pelepasan TLR dan terjadilah proses inflamasi. Proses inflamasi inilah yang kemudian menyebabkan rusaknya hepatosit dan menyebabkan aktivasi sel ito/HSC. HSC/sel ito yang teraktivasi kemudian dengan bantuan angiotensin II dan TGF- β akan menghasilkan miofibroblas (Lewindon, 2002). Miofibroblas ini kemudian menyebabkan endapan protein matriks ekstraseluler (MMP) yang menyebabkan banyak terjadi sintesis kolagen tipe 1 (Jin *et al.*, 2012).

Grafik kolagen setelah induksi asam urat yang lebih tinggi pada hari ke 14 dibandingkan hari 7 ini tidak sesuai dengan teori. Hal ini kemungkinan disebabkan karena tingginya asam urat clearance yang terjadi setelah 7 hari yang dimediasi oleh urat-binding protein atau terjadi perubahan pada renal tubular transporter asam urat mencit tersebut (Fox *et al.*, 1976).

Penurunan rerata Kolagen setelah diberikan Allopurinol selama 7 dan 14 hari ini juga sesuai dengan teori diatas yaitu mengatakan bahwa dengan pemberian allopurinol akan menurunkan kadar Kolagen. Hal ini terjadi karena dengan pemberian Allopurinol akan menghentikan proses pembentukan asam urat dari

hypoxanthine dan xantine dengan cara menghambat kerja enzim xantine oxidase (Day *et al.*, 2007). Sehingga dengan penurunan kadar asam urat ini dapat menurunkan angka kerusakan hepatosit dan menurunkan angka kejadian fibrosis yang ditandai dengan banyaknya produksi kolagen tipe 1. Hal ini didukung juga dengan penelitian Albumin yang menunjukkan penurunan setelah diberikan terapi Allopurinol

Didapatkan perbedaan yang bermakna pada Kelompok kontrol dan AU7 dan Kelompok kontrol dan AU14. Ini sesuai dengan teori diatas yang mengatakan bahwa akan terjadi kerusakan hepar setelah injeksi asam urat (Jin *et al.*, 2012) & (Becker *et al.*, 2005). Teori ini juga diperkuat dengan hasil pewarnaan α -SMA yang menunjukkan adanya miofibroblast patologis yang muncul disertai dengan kehadiran sel ito yang menunjukkan terjadinya kondisi fibrosis akibat asam urat. Kondisi fibrosis ini sejalan dengan hasil kolagen yang meningkat setelah induksi asam urat (Cherng *et al.*, 2008).

Kemudian pada Kelompok kontrol dan ALU7 serta Kelompok kontrol dan ALU14 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Hal ini mendukung teori diatas yakni dngan pemberian Allopurinol diharapkan dapat menurunkan angka inflamasi akibat asam urat. Sehingga seiring berkurangnya proses inflamasi ini diharapkan menurunkan juga angka kejadian fibrosis sehingga jumlah kolagen kembali mendekati normal/kontrol (Becker *et al.*, 2005).

Alpha Smooth Muscle Actin merupakan sebuah isoform aktin yang dapat ditemukan di sel otot polos, myofibroblas dan pembuluh darah yang memiliki peran dalam fibrogenesis (Cherng *et al.*, 2008). α -SMA dapat menjadi penanda adanya

fibroblas dan miofibroblas. (Grotendorst *et al.*, 2004). Akibat pemberian asam urat yang berlebihan, hepar mencit perlahan mengalami kerusakan yaitu terjadinya inflamasi dan berujung pada fibrosis. Pada penyakit hati kronis seperti hepatitis virus kronis, non-alcoholic fatty liver disease, chronic alcoholic liver disease dapat menyebabkan kondisi proses inflamasi dan fibrosis hati (Lee & Friedman, 2011).

Pada saat terjadi inflamasi hepar, akan terjadi aktivasi dari sel ito/HSC dari sel hepatosit dan sel kuppfer. Aktivasi sel ito inilah yang kemudian dengan bantuan TGF-B dan Angiotensin II akan mengaktivasi Miofibroblas sehingga terbentuklah α -SMA. Fibroblas inilah yang berkontribusi terhadap fibrosis dengan meningkatkan kekuatan kontraktile untuk mengaktifkan ikatan integrin, TGF B dan mensekresi kolagen serta matriks ekstraselular lainnya untuk kemudian membentuk luka. Sehingga dengan ekspresi α -SMA, kita dapat menentukan adanya fibroblas patologis dan melihat adanya fibrosis hepar (Lewindon, 2002).

Pada pewarnaan α -SMA yang dilakukan juga dapat dilihat adanya sel makrofag/sel kuppfer yang menandakan proses inflamasi, serta dapat juga dilihat adanya sel ito/HSC yang menandakan awal proses aktivasi miofibroblas yang kemudian akan menyebabkan fibrosis hepar (Friendman, 1996) .

Berdasarkan gambar dari pemeriksaan mikroskopis setelah diwarnai, didapatkan hasil bahwa pada kelompok kontrol didapatkan warna cokelat hanya pada bagian endotel yaitu di vasa darah hepar mencit tersebut. Warna cokelat tersebut merupakan fibroblast normal yang pada keadaan sehat juga ditemukan pada jaringan endotel vasa darah. Selain itu juga tidak ditemukan adanya sel kuppfer yakni menandakan kondisi hepar yang masih normal.

Namun pada gambar hasil pemeriksaan pada seluruh kelompok perlakuan yaitu kelompok AU7, AU14, ALU7, dan ALU14 ditemukan magrofag yang tersebar di seluruh bagian hepar yakni terdapat di vasa darah maupun di sekitar sinusoid hepar. Ini menunjukkan adanya proses inflamasi yang terjadi akibat kerusakan yang disebabkan oleh asam urat. Selain itu ditemukan juga sel ito/hepatic stellate cell di perisinusoid hepar menandakan awal proses aktivasi miofibroblas yang kemudian akan menyebabkan fibrosis hepar. Pada gambar hasil pemeriksaan pada kelompok AU14 juga didapatkan adanya miofibroblas yang terwarnai coklat pada bagian perisinusoid yang merupakan fibroblast patologis. Adanya sel ito ini membuktikan bahwa adanya hubungan yang sesuai dari hasil pemeriksaan kadar kolagen yang meningkat pada penelitian PCR kolagen karena dengan adanya HSC/sel ito yang teraktivasi ini maka dengan bantuan angiotensin II dan TGF- β kemudian akan menghasilkan miofibroblas. Miofibroblas ini kemudian menyebabkan endapan protein matriks ekstraseluler (MMP) yang menyebabkan banyak terjadi sintesis kolagen tipe 1 (Garret *et al.*, 2004).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Kadar albumin pada mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.
2. Ekspresi mRNA Kolagen Tipe 1 pada mencit yang diinduksi asam urat dan diberi Allopurinol lebih rendah dibandingkan dengan mencit yang diinduksi asam urat tanpa diberi Allopurinol.

B. Saran

1. Melakukan penelitian serupa menggunakan real time PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Misih, S., Bloomston, M. & Sherif, R. Z., 2010. Liver Anatomy. *The Surgical Clinic of North America Vol 90,4*, pp. 90(4):643-653.
- Afzali, A., Weiss, N. & Boyco, E., 2010. Association between serum uric acid level and chronic liver disease in the united states. *AASLD*, pp. 578-89.
- Albert, B., Johnson, A. & Lewis, J., 2008. *Molecular Biology of the cell, 5th ed.* Garland.. s.l.:Science.
- Am, J., 2000. *Physiol Gastrointest Liver Physiol*. pp. 279(5):845-50.
- Becker, M. A., Schumacher, H. J. & Wothmann, R. L., 2005. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *N Engl J Med*, pp. 2450-2461.
- Beckett, G., Walker, S., Rae, P. & Ashby, P., 2010. *clinical Biochemistry 8th ed.* Wiley-Blackwill. In: s.l.:s.n.
- Branden, C. & Tooze, J., 1991. *Introduction to Protein Stucture*. New York: Garland Publishing.
- Brunton, L., Chabner, B. & Knollman, B., 2011. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th edition*. California: The McGraw Hill companies, pp. 996-998.
- Cherng, S., Young, J. & Ma, H., 2008. Alpha-Smooth Muscle Actin. *Am Sci ER*.
- Culleton, B. F., Larson, M. G., Kannel, W. B. & Levy, D., 1999. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*, Volume 131(1), pp. 7-13.
- Day, R. O., Graham, G. G. & Hicks, M., 2007. Clinical pharmacokinetics of allopurinol and oxypurinol. *Clin Pharmacokinet*, pp. 46:623-644.
- Fox, I. H., Halperin, M. L., Goldstein, M. B. & Marliss, E. R., 1976. Renal Excretion of uric acid during prolonged fasting. *Metabolism*, pp. 25:551-9.
- Friendman, S. L., 1996. Hepatic Stellate cells. *Prog Liver Dis*, pp. 14:101-130.
- Fu, W., Li, Q. & Yao, J., 2014. Protein expression of urate transporters in renal tissue of patients ith uric acid nephrolithiasis.. *Cell Biochem Biophys* 2014;70:449, p. 70:449.
- Garret, Q., Khaw, P., Blalock, T. D. & Schultz, G. S., 2004. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the precent in mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, p. 45:11.
- Haryono, A. et al., 2018. Reduction of serum uric acid associated with attenuation of renal injury inflammation and makrofages M1/M2 ratio in hyperuricemic mice model. *Kobe J. Med. Sci*, Volume 64, pp. E107-E114.
- Jester, J. V., Petroll, W. M., Barry, P. A. & Cavanagh, H. D., 1995. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, pp. 36:809-19.
- Jin, M., Yang, F. & Yang, I., 2012. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, pp. 17:656-669.
- Jin, M., Yang, F. & Yang, I., 2012. Uric acid, hypruricemia and vascular disease. *Front Biosci*, pp. 656-669.
- Knell, A. J., 1980. Liver function and failure: the evolution of liver physiology. *Journal of the royal collage of physicians of london*, pp. 205-208.
- Kuang, J. et al., 2018. An Overview of technical consideration when using quantitative real time PCR analysis of gene expression in human exercise reaserch. *PLOS One*, 13(5), pp. 1-27.
- Lee, U. & Friedman, S., 2011. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best practice &*

- research. *Clinical Gastroenterology* vol 25,2, pp. 195-206.
- Lewindon, P. J., 2002. The Role of hepatic Stellate Cells and Transforming Growth Factor- β 1 in Cystic Fibrosis Liver disease. *The American journal of pathology* vol. 160, pp. 1-15.
- Maiuolo, J. et al., 2015. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, pp. 8-16.
- Merriman, T., 2015. An update on genetic architecture of hyperuricemia and gout. *Arthritis Res Ther*, p. 17:98.
- Merriman, T. & Dalbeth, N., 2011. The genetic basis of hyperuricemia and gout. *Joint bone spine*, pp. 78:35-40.
- Mescher, A., 2009. In: H. Hartanto, ed. *Histologi Dasar JUNQUEIRA Teks & Atlas edisi 12*. Jakarta: EGC, pp. 91-94.
- Mokdad, A. A., Lopez, A. & Syahraz, S., 2014. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systemic analysis. *MBC Medicine*, p. 12:145.
- Paulsen, F. & Waschke, J., 2016. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. 15 ed. Canada: Urban & Fischer.
- Robinson, M. & Harmon, C., 2016. Liver immunology and its role in inflammation and homeostatis. *Cell Mol Immunol*, pp. 13(3):267-276.
- Rodwell, V. et al., 2015. In: *Harper's Illustrated Biochemistry 30th Edition*. New York: Mc Graw Hill Education, pp. 597-598.
- Romi, M. M. et al., 2017. Uric acid causes kidney injury through inducing fibroblast expansion, Endothelin-1 expression, and inflammation. *BMC Nephrology*, Volume 18, pp. 1-8.
- Schaller, H., Garber, S. & Kaemfer, U., 2008. *Human Blood Plasma Protein: Structure and function*. New York: Wiley.
- Stewart, M., 2007. Molecular mechanisms of the nuclear protein import cycle. *Nature Rev Mol Cell Biol*, p. 8:195.
- Uehara, L., Kimura, T. & Tanigaki, S., 2014. Paracellular route is the major urate transport pathway across the blood placental barrier. *Physiol Rep*, p. 20:2.
- Wallasce, K. L., Riedel, A. A., Joseph-Ridge, N. & Wortmann, R., 2004. Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *J Rheumatol*, pp. 1582-7.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Normalitas data dari hasil pemeriksaan Albumin.

Tests of Normality

KELOMPOK		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ALBUMIN	SO	,294	5	,181	,811	5	,100
	AU7	,242	5	,200 [*]	,822	5	,121
	AU14	,201	5	,200 [*]	,881	5	,314
	ALU7	,216	5	,200 [*]	,960	5	,806
	ALU14	,230	5	,200 [*]	,888	5	,346

Lampiran 2. Hasil Uji Oneway ANOVA dari kadar Albumin.

→ Oneway

ANOVA

ALBUMIN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,210	4	,302	5,758	,003
Within Groups	1,051	20	,053		
Total	2,260	24			

Lampiran 3. Hasil Uji Post Hoc LSD dari kadar Albumin.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ALBUMIN

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Differenc e (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SO	AU7	,56200*	,14496	,001	,2596	,8644
	AU14	,61400*	,14496	,000	,3116	,9164
	ALU7	,37000*	,14496	,019	,0676	,6724
	ALU14	,27600	,14496	,071	-,0264	,5784
AU7	SO	-,56200*	,14496	,001	-,8644	-,2596
	AU14	,05200	,14496	,724	-,2504	,3544
	ALU7	-,19200	,14496	,200	-,4944	,1104
	ALU14	-,28600	,14496	,062	-,5884	,0164
AU14	SO	-,61400*	,14496	,000	-,9164	-,3116
	AU7	-,05200	,14496	,724	-,3544	,2504
	ALU7	-,24400	,14496	,108	-,5464	,0584
	ALU14	-,33800*	,14496	,030	-,6404	-,0356
ALU7	SO	-,37000*	,14496	,019	-,6724	-,0676
	AU7	,19200	,14496	,200	-,1104	,4944
	AU14	,24400	,14496	,108	-,0584	,5464
	ALU14	-,09400	,14496	,524	-,3964	,2084
ALU14	SO	-,27600	,14496	,071	-,5784	,0264
	AU7	,28600	,14496	,062	-,0164	,5884
	AU14	,33800*	,14496	,030	,0356	,6404
	ALU7	,09400	,14496	,524	-,2084	,3964

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

Lampiran 4. Hasil uji Normalitas dari Kolagen Tipe 1.

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kol1 so	,235	5	,200 [*]	,937	5	,643
au7	,295	5	,177	,919	5	,523
au14	,222	5	,200 [*]	,863	5	,240
alu7	,214	5	,200 [*]	,951	5	,746
alu14	,352	5	,043	,753	5	,032

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 5. Hasil Uji Kruskal-Wallis dari Kolagen Tipe 1.

➔ **Oneway**

ANOVA

Kol1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,120	4	,030	1,490	,243
Within Groups	,403	20	,020		
Total	,523	24			

Lampiran 6. Hasil Uji Mann Whitney dari Kolagen Tipe 1.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kol1

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
so	au7	,03016	,08980	,740	-,1572	,2175
	au14	,09378	,08980	,309	-,0935	,2811
	alu7	,13463	,08980	,149	-,0527	,3219
	alu14	,19173*	,08980	,045	,0044	,3790
au7	so	-,03016	,08980	,740	-,2175	,1572
	au14	,06362	,08980	,487	-,1237	,2509
	alu7	,10447	,08980	,258	-,0828	,2918
	alu14	,16157	,08980	,087	-,0257	,3489
au14	so	-,09378	,08980	,309	-,2811	,0935
	au7	-,06362	,08980	,487	-,2509	,1237
	alu7	,04085	,08980	,654	-,1465	,2282
	alu14	,09795	,08980	,288	-,0894	,2853
alu7	so	-,13463	,08980	,149	-,3219	,0527
	au7	-,10447	,08980	,258	-,2918	,0828
	au14	-,04085	,08980	,654	-,2282	,1465
	alu14	,05710	,08980	,532	-,1302	,2444
alu14	so	-,19173*	,08980	,045	-,3790	-,0044
	au7	-,16157	,08980	,087	-,3489	,0257
	au14	-,09795	,08980	,288	-,2853	,0894
	alu7	-,05710	,08980	,532	-,2444	,1302

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

Lampiran 7. Kelayakan Etik



MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)
FACULTY OF MEDICINE GADJAH MADA UNIVERSITY
- DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Ref. No. : KE/FK/0313 /EC/2019

Title of the Research Protocol : Kajian Seluler dan Molekuler dari Efek Protektif Gotukola (*Centella asiatica L.*) terhadap Proses Penuaan (*Senescence*) pada Model Hiperurisemia

Document(s) Approved and version : Study Protocol version 02 2019

Principle Investigator : Dr. dr. Dwi Cahyani Ratna Sari, M.Kes., PA(K).

Participating Investigator(s) : 1. dr. Dwi Aris Agung Nugrahaningsih, M.Sc., Ph.D.
2. dr. Muhammad Mansyur Romi, SU., PA(K).
3. dr. Nungki Anggorowati, Sp.PA., Ph.D.
4. dr. Nur Arfian, Ph.D.
5. Wiwit Ananda Wahyu S, S.Keb., M.Sc.
6. Alif Indiralarasati
7. Yohanes Don Bosco Fernando Mario Marcelino
8. Gratcheva Alexandra
9. Karina Safira Gozali
10. Agung Novriyandi
11. Lukman Al Hadi

Date of Approval : **27 MAR 2019**
(Valid for one year beginning from the date of approval)

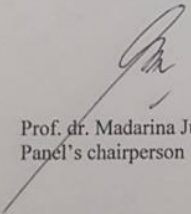
Institution(s)/place(s) of research : Departemen Anatomi FKMK UGM

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the document above meets the ethical principle outlined in the International and National Guidelines on ethical standards and procedures for researches with human beings.

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) has the right to monitor the research activities at any time.

The investigator(s) is/are obliged to submit:

- ☐ Progress report as a continuing review (state its due time)
- ☐ Report of any serious adverse events (SAE)
- ☒ Final report upon the completion of the study



Prof. dr. Madarina Julia, Sp.A(K), MPH., Ph.D.
Panel's chairperson



dr. Shinta Prawitasari, M.Kes., Sp.OG(K).
Panel's secretary

Recognized by Forum for Ethical Review Committees in Asia and the Western Pacific (FERCAP)
26-Mar-19

