

**PENGARUH EKSTRAK PASAK BUMI (*EURYCOMA LONGIFOLIO*)  
TERHADAP KADAR *INTERLEUKIN 6 (IL-6)*, *TUMOR NECROSING  
FACTOR  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )*, *NUCLEAR FACTOR-KAPPA B (NF- $\kappa$ B)* DAN  
*FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF23)* PADA TIKUS MODEL  
GAGAL GINJAL**

***THE EFFECT OF PASAK BUMI (*EURYCOMA LONGIFOLIO*) EXTRACT  
TO *INTERLEUKIN 6 (IL-6)*, *TUMOR NECROSING FACTOR  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )*,  
*NUCLEAR FACTOR-KAPPA B (NF- $\kappa$ B)* AND *FIBROBLAST GROWTH  
FACTOR 23 (FGF23)* LEVEL ON RENAL FAILURE MODEL RAT***

Oleh :  
**Mohammad Rudiansyah**  
NPM. 130130150504

**DISERTASI**

Untuk memperoleh gelar Doktor Ilmu Kedokteran  
Pada Universitas Padjadjaran  
Dengan wibawa Rektor Universitas Padjadjaran  
Prof. Dr. Rina Indriastuti, SE, M.SIE  
Sesuai dengan Keputusan Senat Komisi I / Guru Besar Universitas  
Dipertahankan pada tanggal 18 Februari 2020  
Di Universitas Padjadjaran



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS PADJADJARAN  
BANDUNG  
2020**

## **PERNYATAAN**

Dengan ini Saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis saya, Disertasi ini, adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana, magister, dan/atau doktor), dari Universitas Padjadjaran maupun di perguruan tinggi lain.
2. Karya tulis ini adalah murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing/Tim Promotor.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Karya tulis ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan dan Kedokteran Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada - RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dengan Ref. No. KE/FK/0800/EC/2019.
5. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandung, 18 Februari 2020

Yang membuat pernyataan,

Materai

(Mohammad Rudiansyah)  
NPM. 130130150504

## ABSTRAK

Prevalensi Penyakit ginjal kronis (PGK) yang tinggi masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Progresivitas PGK disebabkan oleh proses inflamasi dan ekspresi *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23). Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) merupakan bahan alami yang memiliki potensi anti inflamasi, yang ditandai penurunan kadar *Interleukin 6* (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- $\kappa$ B). Tujuan penelitian ini adalah menganalisis pengaruh ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23.

Penelitian eksperimental, di Laboratorium Farmakologi dan Terapi, Laboratorium Patologi Klinik, Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan (FKKMK) dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Subjek penelitian adalah 20 ekor tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) strain asli berumur 10-14 minggu (200-250 gr). Tikus Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol sehat (K), 5/6 nefrektomi 2 minggu kemudian dikorbakan (NK), 5/6 nefrektomi diikuti tanpa pemberian ekstrak (N0) dan 5/6 nefrektomi dengan pemberian ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dosis 32,5 mg/kg berat badan (NX). Uji statistik menggunakan Uji T tidak berpasangan dan Mann Whitney U, ANOVA, post-hoc LSD, korelasi Pearson, Analisis Rank Spearman, korelasi multivariat dan regresi linear. Kemaknaan bila  $p < 0,05$ . Penelitian ini sudah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan dan Kedokteran FKKMK UGM-RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dengan Ref. No. KE/FK/0800/EC/2019.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak bermakna pada kelompok NK dibanding K kadar IL-6 ( $p=0,760$ ) dan TNF- $\alpha$  ( $p=0,377$ ), tidak ada perubahan kadar NF- $\kappa$ B ( $p=0,904$ ) dan peningkatan bermakna FGF23 ( $p=0,003$ ). Pada kelompok NX dibanding NK terjadi penurunan tidak bermakna kadar Albuminuria, Kreatinin, IL-6 dan TNF- $\alpha$  ( $p > 0,05$ ), peningkatan tidak bermakna volume urin, kadar Ureum dan NF- $\kappa$ B dan FGF23 ( $p > 0,05$ ), kecuali berat badan tikus bermakna ( $p=0,001$ ). Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 ( $p > 0,05$ ) antara kelompok N0 dan NX. Tidak terdapat korelasi bermakna antara IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada kelompok N0 ( $r^2= 0,403$ ;  $p=0,874$ ) dan NX ( $r^2= 0,907$ ;  $p=0,383$ ).

Simpulan penelitian ini adalah Pasak Bumi memiliki potensi sebagai antiinflamasi namun belum mampu menurunkan ekspresi FGF23 sebagai penanda progresivitas pada tikus model gagal ginjal teknik 5/6 nefrektomi.

Kata kunci: tikus model gagal ginjal, 5/6 nefrektomi, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *NF- $\kappa$ B*, *FGF23*, Pasak Bumi, *Eurycoma longifolia*, *eurycomanone*

## ABSTRACT

The high prevalence of chronic kidney disease (CKD) is still a health problem in Indonesia. The progression of CKD is caused by the inflammatory process and expression of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23). *Pasak Bumi* (*Eurycoma longifolia*) is a natural material that has anti-inflammatory potential, which is marked by decreased levels of Interleukin 6 (IL-6), Tumor Necrosing Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B). The aim of this study was to analyze the effect of eurycomanone standardized *eurycomanone* extracts on IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and FGF23 levels.

This was an experimental study, in the Pharmacology and Therapy Laboratory, Clinical Pathology Laboratory, Integrated Research Laboratory of the Faculty of Medicine, Public Health and Nursing (FKKMK) and the Anatomy Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University Yogyakarta. Subjects were 20 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 10-14 weeks (200-250 gr) of the original strain. Wistar rats were divided into 4 groups, healthy control (K), 5/6 nephrectomy 2 weeks later sacrificed (NK), 5/6 nephrectomy followed by not given (N0) and 5/6 nephrectomy were given standardized *eurycomanone Pasak Bumi* extract 32.5 mg/kg body weight (NX). Statistical tests using unpaired T-test and Mann Whitney U, ANOVA, post-hoc LSD, Pearson correlation, Spearman Rank Analysis, multivariate correlation, and linear regression. Significance when  $p < 0.05$ . This research has approved by the Health and Medical Research Ethics Committee FKKMK UGM-RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, with Ref. No. KE/FK/0800/EC/2019.

The results showed that there was no significant difference in the NK group compared with K in IL-6 ( $p = 0.760$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p = 0.377$ ) levels, there was no change in NF- $\kappa$ B levels ( $p = 0.916$ ) and a significant increase in FGF23 level ( $p = 0.003$ ). In the NX compared to NK group, there was no significant decrease in Albuminuria, Creatinine, IL-6 and TNF- $\alpha$  level ( $p > 0.05$ ), no significant increase in urine volume, Ureum and NF- $\kappa$ B and FGF23 level ( $p > 0.05$ ), except for significant rat weight ( $p = 0.003$ ). There was no significant difference in IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and FGF23 levels ( $p > 0.05$ ) between N0 and NX group. There was no significant correlation between IL-6, TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B with FGF23 in the N0 ( $r^2 = 0.403$ ;  $p = 0.874$ ) and NX group ( $r^2 = 0.907$ ;  $p = 0.383$ ).

This study concluded that *Pasak Bumi* has potential as an anti-inflammatory but has not been able to reduce the expression of FGF23 as a marker of progression in renal failure rat model by 5/6 nephrectomy techniques.

Keywords: renal failure rat model, 5/6 nephrectomy, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *NF- $\kappa$ B*, *FGF23*, *Pasak Bumi*, *Eurycoma longifolia*, *eurycomanone*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil ‘alamiin, dengan segala kerendahan hati dan puji syukur yang mendalam Penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas anugrah, nikmat, sehat, rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan kepada Penulis sehingga dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma Longifolia*) terhadap kadar *Interleukin 6* (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- $\kappa$ B) dan *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) pada Tikus Model Gagal Ginjal”, disusun untuk memenuhi salah syarat penyelesaian program pendidikan doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung.

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penyakit kronis yang sampai saat ini mempunyai prevalensi cukup tinggi di dunia. Salah satu faktor yang berhubungan erat dengan penyebab progresivitas PGK adalah peningkatan kadar *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23). Kadar FGF23 sangat dipengaruhi proses inflamasi. Proses inflamasi mempercepat progresivitas PGK. Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) merupakan bahan alami khas terdapat di Indonesia dan juga Malaysia atau beberapa negara Asia lainnya. Pasak Bumi mempunyai efek anti inflamasi, yang ditandai penurunan kadar *Interleukin 6* (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- $\kappa$ B). Tujuan penelitian ini menilai perbedaan kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* serta korelasi antara IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan ekspresi FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

Penelitian ini menggunakan metoda eksperimental, di Laboratorium Farmakologi dan Terapi, Laboratorium Patologi Klinik, laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan (FKKMK) dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Subjek penelitian adalah tikus Wistar berumur sekitar 10-14 minggu (200-250 gr) dari strain asli yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKKMK UGM Yogyakarta. Subjek terbagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol sehat (K), 5/6 nefrektomi 2 minggu kemudian dikorbakan (NK), 5/6 nefrektomi diikuti tidak diberi (N0) dan 5/6 nefrektomi diberi ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dosis 32,5 mg/kg berat badan (NX).

Hasil Penelitian terdapat 20 subjek sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Terdapat peningkatan bermakna kadar Ureum dan Kreatinin pada tikus model gagal ginjal dengan teknik 5/6 nefrektomi yang menunjukkan keberhasilan pemodelan tikus gagal ginjal kronik. Terdapat peningkatan bermakna kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal dibanding kontrol yang menunjukkan proses fibrosis dan progresi penyakit ginjal sudah terjadi sejak awal. Terdapat efek ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap inflamasi dengan kecenderungan penurunan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi tapi belum bermakna. Tidak terdapat efek menurunkan dari ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap NF- $\kappa$ B dan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi, tapi malah meningkat. Ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* hanya terbukti menurunkan inflamasi tapi tidak menekan FGF23, hal ini karena sudah terjadi glomerulosklerosis luas.

Saat ini diperlukan modalitas untuk memperlambat atau menekan progresivitas PGK agar dapat mencegah komplikasi-komplikasi yang buruk. Pemberian Pasak Bumi pada penelitian ini tidak menjadi pilihan dalam menekan progresivitas melalui jalur inflamasi tapi masih mungkin ada efek pada keadaan gagal ginjal yang masih tahap awal. Pasak Bumi tampak menekan penanda inflamasi IL-6 dan TNF-  $\alpha$ , tapi tidak mampu menekan kadar FGF23. Pembuktian Pasak Bumi sebagai modalitas yang mampu memperlambat progresivitas PGK masih perlu diuji lagi dengan subjek PGK tahap awal.

Penulis menghaturkan sembah sujud dan doa tulus kepada kedua orang tua tercinta Ibunda Hj. Rr. Raguan dan Ayahanda H. Mohammad Hanafiah, dr., (almarhum) yang dengan tulus selalu mendoakan, membesarkan, mendidik, membimbing dan menjadi guru pertama dan utama selama kehidupan Penulis. Juga kepada Mertua, Tonycely Runtuwene (Papi Siong) dan Els Runtulalo (Mami Noni) yang selalu mendoakan, menyemangati dan nasehat-nasehat. Beliau-beliau semua mengajarkan kepada Penulis cara bersyukur, berikhtiar dan mandiri dalam menjalani hidup, selalu mengingatkan Penulis akan keseimbangan dunia dan akhirat. Tiada yang dapat membalas semua pengorbanan Beliau berdua bagi Penulis sebagai anak-anaknya kecuali Allah SWT yang akan membalas dan menjaga. Insya Allah, tempat termulia bagi keduanya di sisi-Mu Ya Rabb, Ya Allah. Aamiin YRA.

Yang paling utama Istri tercinta Hj. Lily Runtuwene, dr., SpS., dan anak-anak tercinta Penulis yaitu Mohammad Agung Raihan Rudiansyah, Syafina Dwiayu Ardelia Rudiansyah, Denisa Hening Lailqadar Rudiansyah dan Nur Muhammad Faisal Ghani,

yang penuh kesabaran dan kasih sayang selalu mendoakan, penyemangat, menjadi cahaya dan energi bagi Penulis hingga akhirnya mampu menyelesaikan disertasi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penyusunan disertasi ini terlaksana berkat dorongan dan bantuan yang berharga dari semua pihak yang telah banyak memberi masukan, bimbingan dan mengoreksi.

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. med. Tri Hanggono Achmad, dr. selaku Rektor Universitas Padjadjaran sebelumnya, Prof. Dr. Rina Indiasuti, M.SIE, selaku Rektor Universitas Padjadjaran saat ini,
2. Dr. Yoni Fuadah Syukriani, dr., Sp.F., M.Si., DFM selaku Dekan FK UNPAD periode sebelumnya dan Dr. Med. Setiawan, dr., AIFM selaku Dekan FK UNPAD saat ini, atas kesempatan, dukungan dan fasilitas yang diberikan selama Penulis menjalani pendidikan di Program Doktor Ilmu Kedokteran FK UNPAD.
3. Prof. Dr. Dedi Rachmadi, dr., Sp.A(K), M.Kes., selaku Ketua Program Studi Program Doktor Ilmu Kedokteran FK UNPAD periode sebelumnya dan Herry Herman, dr., Sp.OT., Ph.D, selaku Ketua Program Studi Program Doktor Ilmu Kedokteran FK UNPAD saat ini.
4. Tim Promotor yaitu Prof. Dr. Dedi Rachmadi, dr., Sp.A(K), M.Kes., selaku Ketua Tim Promotor, Dr. Ria Bandiara, dr., Sp.PD-KGH dan Dr. Leonardo Lubis, dr., M.Kes, AIFO, selaku anggota Tim Promotor, atas waktu luang, bimbingan dan dorongan yang telah diberikan selama Penulis menempuh pendidikan hingga



menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini dalam memenuhi syarat menempuh ujian di Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran FK UNPAD,

5. Prof. Dr. Rully MA Roesli, dr., Sp.PD-KGH, Dr. Reiva Farah Dwiyana, dr., Sp.KK (K), M.Kes., dan Dwi Aris Agung Nugrahaningsih, dr., MSc., PhD., selaku Tim Penelaah dan Penguji yang telah memberikan koreksi, masukan dan perbaikan yang berharga dalam menyelesaikan disertasi ini, khususnya Prof. Rully, selalu memberikan nasehat-nasehat kehidupan dan sudah menjadi Bapak sendiri bagi Penulis dan untuk Dwi Aris Angrehani, dr., Ph.D, yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian di FKMK UGM Yogyakarta,
6. Prof. Dr. Johannes C. Mose, dr., Sp.OG(K), sebagai representasi Guru Besar penguji disertasi ini yang banyak memberi masukan dan semangat,
7. Bu Ida, Bu Yana dan Pak Tatang di Sekretariat Program Studi Program Doktor Ilmu Kedokteran FK UNPAD atas bantuannya selama ini yang sangat berharga.
8. Dr. Ika Puspita Sari, S.Si., M.Si., Apt., dosen Fakultas Farmasi FK UGM yang banyak membantu Penulis memberikan ilmunya dan khususnya penyediaan bahan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dari Java Plant,
9. Kepala Departemen dan Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada (FKMK UGM) Yogyakarta, Kepala Laboratorium Patologi Klinik FKMK UGM, dr. Nana, SpPK, Kepala Laboratorium Riset Terpadu FKMK UGM dan Kepala Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas perkenan dan dukungan yang berharga dalam pelaksanaan penelitian ini,

10. Rektor Universitas Lambung Mangkurat, Prof. Dr. H. Sutarto Hadi, M.Si., M.Sc.;;  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Prof. Dr. Zairin Noor  
Ilmi, dr., MM, Sp.OT.(K-Spine), FICS.; Direktur RSUD Ulin Banjarmasin, Hj.  
Suciati, dr., M.Kes.; Kepala KSM Ilmu Penyakit Dalam FK ULM/RSUD Ulin  
Banjarmasin, H. Abimanyu, dr., Sp.PD-KGEH, beserta seluruh jajarannya atas  
perkenan melanjutkan pendidikan ini dan seluruh rekan-rekan dosen FK ULM dan  
Departemen IPD FK ULM/RSUD Ulin Banjarmasin, serta Kepala Instalasi  
Hemodialisis RSUD Ulin Banjarmasin beserta seluruh dokter, perawat dan  
pegawainya, Direktur RS Islam Banjarmasin beserta seluruh stafnya, atas dorongan  
semangatnya,
11. Para Guru Penulis sejak TK, SD, SMP, SMA, S1, S2, Sp1 IPD sampai Sp2 Ginjal  
dan Hipertensi di FK UNPAD dan RSUP Dr Hasan Sadikin Bandung, Prof. Enday  
Sukandar, dr., Sp.PD-KGH (almarhum); Prof. Dr. Rachmat Soelaeman, dr., Sp.PD-  
KGH; Prof. Dr. Rully MA Roesli, dr., Sp.PD-KGH; Dr. Abdul Hadi Martakusumah,  
dr., Sp.PD-KGH; Rubin Surachno Gondodiputro, dr., Sp.PD-KGH; Dr. Ria  
Bandiara, dr., Sp.PD-KGH; Dr. Rudi Supriyadi, dr., M.Kes., Sp.PD-KGH; Afiatin,  
dr., Sp.PD-KGH & Lilik Sukesi, dr., Sp.PD-KGH, KIC., beserta seluruh staf IPD  
RSUP Dr Hasan Sadikin Bandung, yang telah mencurahkan semua tenaga, waktu  
dan ilmu kepada Penulis hingga akhirnya sampai di jenjang pendidikan ini,
12. Para Dosen di Program Doktoral FK UNPAD yang telah banyak memberikan ilmu-  
ilmu selama Penulis menjalani pendidikan di Program Doktoral FK UNPAD,

13. Prof. Dr. Bambang Purwanto, dr., Sp.PD-KGH, dari Solo yang telah meluangkan waktu dan ilmu untuk menambah wawasan tentang imunologi,
14. Dr. Atma Gunawan, dr., Sp.PD-KGH; Nursamsu, Dr. dr., Sp.PD-KGH; Achmad Rifai, dr., Sp.PD; Etik Mertianti, dr., M.Kes., Sp.PD; dan Mirza Zaka Pratama, dr., MBiomed., tim Malang yang banyak membantu selama pendidikan khususnya pemilihan model tikus gagal ginjal,
15. Seluruh teman-teman seangkatan S3 Februari 2016 yang tetap saling menyemangati, membantu dan berbagi, terima kasih atas kebersamaan selama ini semoga tali shilaturrahim kita tetap terjaga,
16. Sahabat-sahabat Sp2 Ginjal dan Hipertensi RSHS/FKUP (Abah Lukman, Uda Rayen, Abang Wizhar, Kang Dede, Ading Astried, Mas Djoko dan Ading Enita), yang selalu menyemangati Penulis tetap jalan terus pendidikan ini,
17. Direktur dan seluruh jajarannya RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung, selama pendidikan ini banyak membantu,
18. Direktur dan seluruh jajarannya RSKG Ny. Habibie Bandung, Qania Mufliani, dr., Rusma Hidayati, Nina E, dr., dll. yang selama Penulis pendidikan juga banyak membantu dan diperkenankan ikut bekerja di RS ini,
19. Ketua PB IDI, Daeng M. Faqih, dr., SH, MH beserta seluruh Pengurus PB IDI, juga seluruh Pengurus IDI Wilayah Kalimantan Selatan beserta semua IDI Cabangnya, atas semangat tetap melanjutkan sekolah,
20. Ketua PB PERNEFRI (Perhimpunan Nefrologi Indonesia), Aida Lydia, dr., Sp.PD-KGH, PhD., juga Ketua PERNEFRI Korwil Jawa Timur & Kalimantan, Pranawa,

dr., Sp.PD-KGH, beserta seluruh anggota Pernefri yang turut menyemangati penulis menyelesaikan studi ini,

21. Lintang Prava Azza, Apt., yang sangat banyak sekali membantu Penulis selama penelitian di FKMK UGM Yogyakarta, semoga sukses juga S2 nya lulus dengan nilai tertinggi,
22. Mas Suroso, Mas Nur, Mbak Rena, drh. Nungki Fatimatuzzahra, di Laboratorium Farmakologi dan Terapi serta Mbak Fatin di Laboratorium Riset Terpadu FKMK UGM Yogyakarta, yang telah membantu jalannya penelitian ini,
23. Bernadet Maria Sanjaya, dr., dan Hendra Wana Nur'amin, dr., M.Sc., yang banyak membantu Penulis selama pendidikan ini,
24. Ustadz Dr. H. Abdul Rochim al Audah, S.Ag., M.Ag, sahabat Penulis yang selalu mendampingi, berbagi suka dan duka serta selalu memberi semangat dan doa, bersama-sama menempuh S3 ini meski berbeda jurusan,
25. Guru-guru Penulis Abah KH Husin Naparin, Lc, M.A. (Ketua MUI Prov. Kalsel), pengganti orang tua dan selalu mendoakan, Guru KH Juhran Erpan (Pendiri Ponpes Ushulluddin Tambak Anyar Martapura), selalu mendoakan dan Ustadz KH Abu Sangkan (Shalat Center Indonesia Jakarta), selalu membangkitkan semangat,
26. Abah Pangeran Gusti Rusdi Effendi, pendiri Banjarmasin Post, yang selalu mendukung tetap lanjut studi dan pengganti Abah bagi Penulis,
27. Direktur dan dokter-dokter beserta seluruh pegawai di Klinik Spesialis Rafisa Dahlia & Klinik Pratama Rafisa Sei Andai Banjarmasin, yang selalu mendukung dan memberi semangat sampai selesai studi ini,

28. Semua kakak-kakak tersayang Penulis, Prof. H. M. Handry Imansyah, SE, MAM., PhD & Hj. Lelyana Istiati, SE; Dra. Hj. Henny Hendriyati & Drs. H. Subagiyono; Ir. Hj. Elly Liestyani, MP & Ir. H. Eddy Hasby, MP; Ir. H. Bambang Herry Susanto, MSi., MAPPI (Cert.) & Roswita Ferawati; seluruh ponakan-ponakan dan cucu-cucu semua yang selalu menguatkan, menyemangati dan mendoakan,
29. Semua adik-adik ipar tersayang Penulis, Yulita Runtuwene, dr., Sp.OG., & Edmond Brando Polii, dr., Sp.M.; dan Elysa Runtuwene, dr., & Christian Langelo, SE., yang selalu memberi semangat dan mendoakan,
30. Motor Honda Legenda Penulis yang penuh Legenda dan telah menelorkan 1 orang Konsultan Ginjal dan Hipertensi, 1 orang Doktor Hukum Islam dan 1 orang Doktor Ilmu Kedokteran, kau telah berjasa menghantarkan mereka-mereka ini,
31. Semua pihak yang tidak bisa Penulis sebutkan satu persatu, Kang Dedi Kost Pondok Asri, Kang Gorengan, Aki Bubur Ayam, dll.

Kunci hidup sukses yang utama adalah tawadhu, wasta iinu bish shobri wash sholah.. Jadikanlah sabar dan shalat sebagai penolong mu.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua.  
Aamiin Yaa Rabbal Alamin.

Bandung, 18 Februari 2020

Mohammad Rudiansyah  
Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
LEMBAR PERNYATAAN .....	iii
ABSTRAK .....	iv
ABSTRACT .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xix
DAFTAR GAMBAR .....	xx
DAFTAR SINGKATAN .....	xxi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
BAB II KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN, DAN HIPOTESIS.	8
2.1 Kajian Pustaka .....	8
2.1.1 Penyakit Ginjal Kronis .....	8
2.1.1.1 Inflamasi pada Penyakit Ginjal Kronis .....	10
2.1.1.2 Penyebab dan Kemungkinan Akibat Inflamasi Penyakit Ginjal Kronis .....	20

2.1.2 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23).....	22
2.1.2.1 Fibroblast Growth Factor 23 dan Anti Inflamasi .....	24
2.1.3 Pasak Bumi .....	25
2.1.3.1 Pasak Bumi sebagai Anti Inflamasi.....	32
2.2 Kerangka Pemikiran.....	34
2.3 Premis.....	40
2.4 Hipotesis.....	41
<b>BAB III SUBJEK DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>42</b>
3.1 Subjek Penelitian.....	42
3.1.1 Populasi Penelitian.....	42
3.1.2 Subjek Penelitian .....	42
3.1.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi .....	42
3.1.4 Jumlah Sampel.....	43
3.2 Tempat Penelitian.....	44
3.3 Metode Penelitian.....	45
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	45
3.3.2 Identifikasi Variabel Penelitian .....	45
3.3.3 Definisi Operasional Penelitian .....	46
3.3.4 Alur Penelitian .....	47
3.4 Cara Pemeriksaan.....	50
3.4.1 Bahan Penelitian .....	50
3.4.2 Alat Penelitian .....	50
3.4.3 Cara Kerja .....	51

3.4.4 Pemeriksaan Kadar Ureum .....	57
3.4.5 Pemeriksaan Kadar Kreatinin .....	57
3.4.6 Pemeriksaan <i>Interleukin-6</i> (IL-6) .....	57
3.4.7 Pemeriksaan <i>Tumor Necrosing Factor <math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) .....	59
3.4.8 Pemeriksaan <i>Nuclear Factor Kappa <math>\beta</math></i> (NF- $\kappa\beta$ ) .....	60
3.4.9 Pemeriksaan <i>Fibroblast Growth Factor 23</i> (FGF 23).....	61
3.5 Pengolahan dan Analisis Data.....	63
3.5.1 Pengolahan Data .....	63
3.5.2 Analisis Data.....	63
3.6 Aspek Etik Penelitian.....	64
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>65</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	65
4.1.1 Tikus Model Gagal Ginjal .....	65
4.1.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Pasak Bumi Terhadap Tikus Model Gagal Ginjal .....	69
4.3 Korelasi Penanda Inflamasi.....	71
4.4 Pengujian Hipotesis.....	74
4.5 Pembahasan.....	77
4.5.1 Hewan Model Gagal Ginjal .....	79
4.5.2 Perbedaan Kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$ Terhadap Pemeriksaan Pasak Bumi... ..	82
4.5.3 Perbedaan Kadar NF- $\kappa\beta$ Terhadap Pemeriksaan Pasak Bumi.....	84
4.5.4 Perbedaan Kadar FGF23 Terhadap Pemeriksaan Pasak Bumi.....	86
4.5.5 Korelasi antara IL-6, TNF- $\alpha$ , dan NF- $\kappa\beta$ dengan FGF23 .....	88



4.6 Keterbatasan Penelitian.....	91
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	92
5.1 Simpulan.....	92
5.1.1 Simpulan Umum.....	92
5.1.2 Simpulan Khusus.....	93
5.2 Saran.....	94
5.2.1 Saran Akademik.....	94
5.2.2 Saran Praktis.....	95
DAFTAR PUSTAKA.....	96
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel 2-1	Dosis pemberian diberikan berdasarkan konversi dari dosis pemberian pada manusia ke tikus.....	32
Tabel 3-1	Definisi Operasional.....	46
Tabel 4-1	Perbedaan rerata antara Tikus Model Gagal Ginjal dengan Kontrol .....	66
Tabel 4-2	Perbedaan rerata Antar Kelompok Tikus Model Gagal Ginjal paska nefrektomi 2 minggu dikorbankan dan sesudah diberikan Ekstrak Pasak Bumi ( <i>Eurycoma longifolia</i> ).....	69
Tabel 4-3	Perbedaan rerata antara Kelompok Tikus Model Gagal Ginjal yang tidak dan diberikan Ekstrak Pasak Bumi ( <i>Eurycoma longifolia</i> ).....	70
Tabel 4-4	Korelasi antara kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$ pada tikus kontrol dan model gagal ginjal tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi .....	71
Tabel 4-5	Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$ dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus kontrol.....	72
Tabel 4-6	Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$ dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi.....	72
Tabel 4-7	Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$ dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi .....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2-1 Sel-sel dan mediator yang terlibat dalam progresivitas penyakit PGK .....	11
Gambar 2-2 Gambar skematik proses inflamasi pada penyakit ginjal yang progresif .....	15
Gambar 2-3 Efek akut dan kronis dari respon inflamasi .....	21
Gambar 2-4 Penyebab dan konsekuensi inflamasi pada PGK .....	21
Gambar 2-5 Struktur skematik FGF23.....	23
Gambar 2-6 Kerangka Pemikiran .....	39
Gambar 3-1 Alur Penelitian .....	49
Gambar 3-2 Operasi 5/6 nefrektomi pembuatan tikus model gagal ginjal .....	55
Gambar 3-3 Pemberian minum, makan dan ekstrak pasak bumi.....	55
Gambar 3-4 Tikus masuk ke dalam <i>Metabolic Cage</i> dan pengambilan darah ....	56
Gambar 3-5 Pembedahan mengambil organ ginjal.....	56
Gambar 4-1 Perbandingan hasil Patologi Anatomi Ginjal antara kelompok.....	67
Gambar 4-2 Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$ dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi.....	73

## DAFTAR SINGKATAN

AKI	<i>Acute Kidney Injury</i>
cFGF23	<i>c-terminal Fibroblast Growth Factor 23</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
CRP	<i>C-reactive Protein</i>
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
DMP1	<i>Dentin Matrix Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
ESRD	<i>End Stage Renal Disease</i>
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GGT	Gagal Ginjal Terminal
GMT-PGK	Gangguan mineral dan tulang pada penyakit ginjal kronis
HD	<i>Hemodialisis</i>
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney-293</i>
HIF1- $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon Gamma</i>

IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IMT	Indeks massa tubuh
HiperPTS	Hiperparatiroid sekunder
iPTH	<i>Intact Parathyroid Hormone</i>
IRR	<i>Indonesian Renal Registry</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease Initiative Global Outcomes</i>
LD	<i>Lethal Dose</i>
LFG	laju filtrasi glomerulus
LH	<i>Luteinsing Hormone</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIAC	<i>Malnutrition, Inflammation, Atherosclerosis, Calcification</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NF- $\kappa\beta$	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NKF	<i>National Kidney Foundation</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PGK-5D	PGK stadium 5 yang menjalani hemodialisis rutin
PHEX	<i>Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog X-Linked</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RRT	<i>Renal Replacement Therapy</i>
SGK	<i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase</i>
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>

SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-B</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosing Factor-<math>\alpha</math></i>
TPG	Terapi pengganti ginjal

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang Penelitian**

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penyakit kronis yang sampai saat ini mempunyai prevalensi cukup tinggi di dunia, sekitar 5-10%. Penyakit ini menempati urutan ke 12 sebagai penyebab kematian dan ke 17 sebagai penyebab kecacatan. Penurunan fungsi ginjal yang progresif dapat menyebabkan berbagai komplikasi, seperti anemia, malnutrisi, aterosklerosis, gangguan metabolisme mineral dan tulang pada penyakit ginjal kronis (GMT-PGK), neuropati dan penurunan kualitas hidup. Komplikasi tersebut semakin memberat pada pasien PGK stadium 5 yang menjalani hemodialisis rutin (PGK-5D).<sup>1</sup>

Data di negara maju seperti Amerika Serikat (AS) menunjukkan 30 juta orang atau 15% dari orang dewasa di AS diperkirakan menderita PGK. Dari jumlah tersebut, 48% dari mereka dengan penurunan fungsi ginjal yang berat tetapi tidak sedang menjalani dialisis tidak sadar bahwa dirinya menderita PGK.<sup>2</sup> Di Indonesia, berdasarkan laporan *Indonesian Renal Registry (IRR)* tahun 2017, jumlah pasien baru yang menjalani dialisis terus bertambah dari tahun ke tahun. Faktor jaminan kesehatan nasional berperan dalam menjaga kelangsungan terapi ini. Jumlah pasien ini belum menunjukkan data seluruh Indonesia tetapi dapat dijadikan representasi dari kondisi saat ini.<sup>3</sup>

Terdapat banyak faktor yang memengaruhi terjadinya komplikasi-komplikasi pada PGK. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan progresivitas PGK dan

terjadinya komplikasi GMT-PGK adalah *fibroblast growth factor 23* (FGF23). Dari beberapa literatur disebutkan hubungan FGF23 dapat mempercepat progresivitas PGK dan komplikasi GMT-PGK.<sup>4</sup> Hubungan yang bermakna antar FGF23 dengan iPTH merupakan salah satu faktor terjadinya GMT-PGK.<sup>5</sup> Penatalaksanaan GMT-PGK merupakan penanganan yang utama pada pasien PGK.

*Fibroblast growth factor-23* (FGF23) yang sebelumnya disebut suatu “*phosphatonine*”, merupakan suatu 251 peptida asam amino dengan berat molekul (BM) 32 kDa, termasuk dalam famili FGF dan secara filogenetika sangat dekat dengan FGF19 dan FGF21. Keluarga gen *FGF* manusia / tikus terdiri dari 22 anggota dengan kesamaan urutan tinggi.<sup>6</sup>

Pada hewan, tikus mengekspresikan FGF23 dengan fenotipe klinis rakhitis hipofosfat, dengan hipofosfatemia, peningkatan fosfaturia dan hiperparatiroidisme.<sup>7</sup> Pada tikus dengan adanya kadar FGF23 yang meningkat, hal ini berhubungan dengan keterbelakangan pertumbuhan, atrofi kulit, penurunan densitas tulang dan ektopik serta kalsifikasi vaskular. Selain itu, biasanya terdapat adanya hiperfosfatemia, hiperkalsemia, dan peningkatan kadar serum 1,25 dihidroksi vitamin D.<sup>8</sup>

Peningkatan kadar FGF23 terkait dengan proses inflamasi. Proses inflamasi terkait dengan beberapa penanda inflamasi berhubungan dengan tingkat CRP yang tinggi, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen. Hubungan itu terlepas dari fungsi ginjal, metabolisme mineral yang diukur, dan faktor lain yang diketahui terkait dengan inflamasi. Selanjutnya, di antara metabolit mineral yang diuji, FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing marker inflamasi.<sup>9</sup>



Kejadian PGK berhubungan dengan peningkatan penanda inflamasi, percepatan progresi PGK<sup>10,11</sup>, dan meningkatkan risiko kematian.<sup>10,12</sup> Beberapa penanda inflamasi yang berhubungan erat dengan FGF23 dan yang sudah diteliti adalah Interleukin-6 (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B).<sup>13</sup> Untuk menghambat terjadinya progresifitas PGK, diperlukan antiinflamasi. Ada beberapa antiinflamasi yang sudah dipakai, salah satunya adalah Pasak Bumi.

Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) merupakan bahan alami yang terdapat di Indonesia dan juga Malaysia atau beberapa negara Asia lainnya. Dari beberapa laporan penelitian, Pasak Bumi mempunyai efek anti inflamasi. Inflamasi yang dihambat dapat menghambat ekspresi FGF23 sehingga menurunkan progresivitas PGK. Pasak Bumi banyak dan mudah didapat di pulau Kalimantan.<sup>14</sup>

Pada tahun 2012, Mendoza JM, et al melaporkan bahwa pada pasien PGK, peningkatan kadar FGF23 secara independen terkait dengan tingkat CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen yang lebih tinggi dan kemungkinan lebih besar bermanifestasi sebagai inflamasi berat. FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing marker inflamasi.<sup>9</sup>

Studi molekuler *in vitro* menggunakan sel makrofag mengungkapkan bahwa Pasak Bumi menekan translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus, yang menyebabkan inaktivasi jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B dan pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 dan sintesis nitrit oksida yang dapat diinduksi.<sup>15</sup>

Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah pengatur utama dari beberapa jalur pro-inflamasi. Selain berperan penting dalam peradangan, NF- $\kappa$ B juga berperan dalam

resistensi sel melawan apoptosis. Oleh karena itu penghambatan NF- $\kappa$ B berkontribusi menghasilkan efek anti-inflamasi.<sup>16</sup>

Penelitian menggunakan hewan model setelah dilakukan 5/6 nefrektomi menunjukkan penurunan GFR, proteinuria, sklerosis glomerulus, dan hipertensi arteri yang dianggap sebagai karakteristik utama PGK.<sup>17</sup> Pada tikus yang dilakukan 5/6 nefrektomi, setelah 8 minggu, pada glomeruli menunjukkan ekspansi mesangial dan sklerosis glomerulus fokal dan segmental yang melibatkan sekitar 20% glomeruli, disertai dengan fibrosis interstitial awal dan atrofi tubular. Pada 12 minggu, terjadi glomerulosklerosis luas dan ditemukan fibrosis tubulointerstitial. Tikus biasanya mati karena uremia mulai minggu ke-12.<sup>18</sup>

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan **tema sentral** penelitian sebagai berikut:

Salah satu faktor yang berhubungan erat dengan penyebab progresivitas PGK adalah peningkatan kadar FGF23. Kadar FGF23 juga sangat dipengaruhi oleh proses inflamasi. Beberapa penanda inflamasi yang berhubungan erat dengan FGF23 dan sudah diteliti seperti *Interleukin-6* (IL-6); *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ); dan *Nuclear Factor Kappa B* (NF- $\kappa$ B). Proses inflamasi dapat mempercepat progresivitas PGK, salah satu jalurnya melalui FGF23. Diperlukan suatu modalitas yang mampu menghambat progresivitas penyakit ginjal. Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) merupakan bahan alami yang khas terdapat di Indonesia dan juga Malaysia atau beberapa negara Asia lainnya. Dari beberapa laporan penelitian, Pasak Bumi mempunyai efek anti inflamasi, yang memungkinkan dapat menekan proses inflamasi dan ditandai penurunan kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B. Penekanan proses inflamasi ini dapat menghambat ekspresi FGF-23 sehingga memperlambat progresivitas penyakit ginjal. Selama ini, beberapa terapi anti inflamasi justru akan memperburuk fungsi ginjal yang tersisa sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menunjukkan efek antiinflamasi Pasak Bumi terhadap penurunan penanda inflamasi kadar IL-6, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23

sehingga proses inflamasi berkurang. Kadar FGF23 yang rendah juga diharapkan memperlambat progresivitas komplikasi pada PGK. Sehingga perlu penelitian untuk mendapatkan modalitas baru antiinflamasi yaitu Pasak Bumi yang dilakukan pada tikus model gagal ginjal.

## 1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan rerata kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*?
2. Apakah terdapat perbedaan rerata kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*?
3. Apakah terdapat perbedaan rerata kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*?
4. Apakah terdapat perbedaan rerata kadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*?
5. Apakah terdapat korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal?

## 1.3. Tujuan penelitian

Studi ini bertujuan untuk:

1. Menilai perbedaan rerata kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
2. Menilai perbedaan rerata kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
3. Menilai perbedaan rerata kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
4. Menilai perbedaan rerata kadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
5. Menilai korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal?

#### **1.4. Manfaat penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat berguna untuk ilmu pengetahuan dan memiliki manfaat sebagai berikut:

##### **Manfaat akademik**

Memberikan landasan ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) sebagai anti inflamasi terhadap kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B serta ekspresi *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) pada tikus model gagal ginjal.

**Manfaat praktis**

Penelitian ini diharapkan dapat secara langsung mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) pada tikus model gagal ginjal untuk mencegah terjadinya progresivitas penyakit ginjal kronis melalui mekanisme anti inflamasi terhadap kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B yang memengaruhi ekspresi *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) sebagai salah satu faktor yang berpengaruh terhadap progresivitas pada penyakit ginjal kronis. Diharapkan hasil penelitian pada model hewan ini dapat menjadi dasar penelitian pada manusia dengan penelitian lanjut sehingga dapat menjadi suatu pilihan terapi untuk mencegah progresivitas PGK.

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN DAN HIPOTESIS

#### 2.1 Kajian Pustaka

##### 2.1.1 Penyakit Ginjal Kronis

Penyakit ginjal kronis sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan di dunia, termasuk di Indonesia. Insidensi dan prevalensi PGK di dunia terus meningkat setiap tahun dengan angka kesakitan, kematian, dan kebutuhan terapi pengganti ginjal (TPG) yang relatif tinggi. Insidensi PGK meningkat dengan cepat pada usia lanjut yaitu pada usia  $\geq 65$  tahun dan pada populasi tersebut di tahun 2008 meningkat 2 kali lipat dibandingkan tahun 2000.<sup>1,2</sup>

*Chronic Kidney Disease* (CKD), atau Penyakit Ginjal Kronis (PGK) didefinisikan sebagai abnormalitas struktur atau fungsi ginjal, yang sudah berlangsung lebih 3 bulan, dengan implikasi kesehatan dengan kriterianya terjadi penurunan laju filtrasi glomerulus (LFG) kurang dari 60 ml/menit/1,73 m<sup>2</sup> dan penanda kerusakan ginjal atau atau lebih yaitu albuminuria, sedimen urin yang abnormal, gangguan elektrolit yang berhubungan dengan gangguan tubulus, kerusakan histologi, kerusakan struktur yang tampak menggunakan imajing, dan riwayat cangkok ginjal.<sup>19</sup>

Pada awalnya, patofisiologi penyakit ginjal kronis tergantung pada penyakit yang mendasarinya. Dalam perkembangan selanjutnya, proses yang terjadi kurang lebih sama. Pengurangan massa ginjal akan mengakibatkan hipertrofi struktural dan fungsional nefron yang masih tersisa (*surviving nephrons*) sebagai upaya

kompensasi, yang diperantarai oleh molekul vasoaktif seperti sitokin dan *growth factors*. Hal ini mengakibatkan terjadinya hiperfiltrasi, yang diikuti oleh peningkatan tekanan kapiler dan aliran darah glomerulus. Proses adaptasi ini berlangsung singkat, akhirnya diikuti oleh proses maladaptasi berupa sklerosis nefron yang masih tersisa. Proses ini akhirnya diikuti dengan penurunan fungsi nefron yang progresif, walaupun penyakit dasarnya sudah tidak aktif.<sup>4,20</sup>

Secara umum tidak ada terapi farmakologis tertentu yang benar-benar efektif pada pasien dengan gagal ginjal, baik akut maupun kronis. Semua pengobatan, termasuk terapi farmakologis dan terapi pengganti ginjal berfungsi sebagai terapi pendukung (*supportive therapy*).<sup>21</sup>

Transplantasi merupakan pengobatan yang paling ideal untuk pasien penyakit ginjal stadium akhir. Pasien tetap harus mengonsumsi obat yaitu imunosupresan pada kasus yang telah dilakukan transplantasi ginjal dengan sampel jaringan yang cocok. Hal ini untuk memastikan bahwa organ tersebut tidak ditolak oleh sistem kekebalan tubuh alami. Jumlah transplantasi di Amerika Serikat meningkat secara signifikan pada tahun 1980. Sejak tahun 2003, jumlah transplantasi yang terdata adalah sekitar 16.500 per tahunnya, sedangkan daftar tunggu permintaan untuk transplantasi ginjal adalah 85.000. Tidak seimbangya ketersediaan organ dan kebutuhan itu pada akhirnya menjadi kendala dalam melakukan transplantasi ginjal.<sup>21</sup>

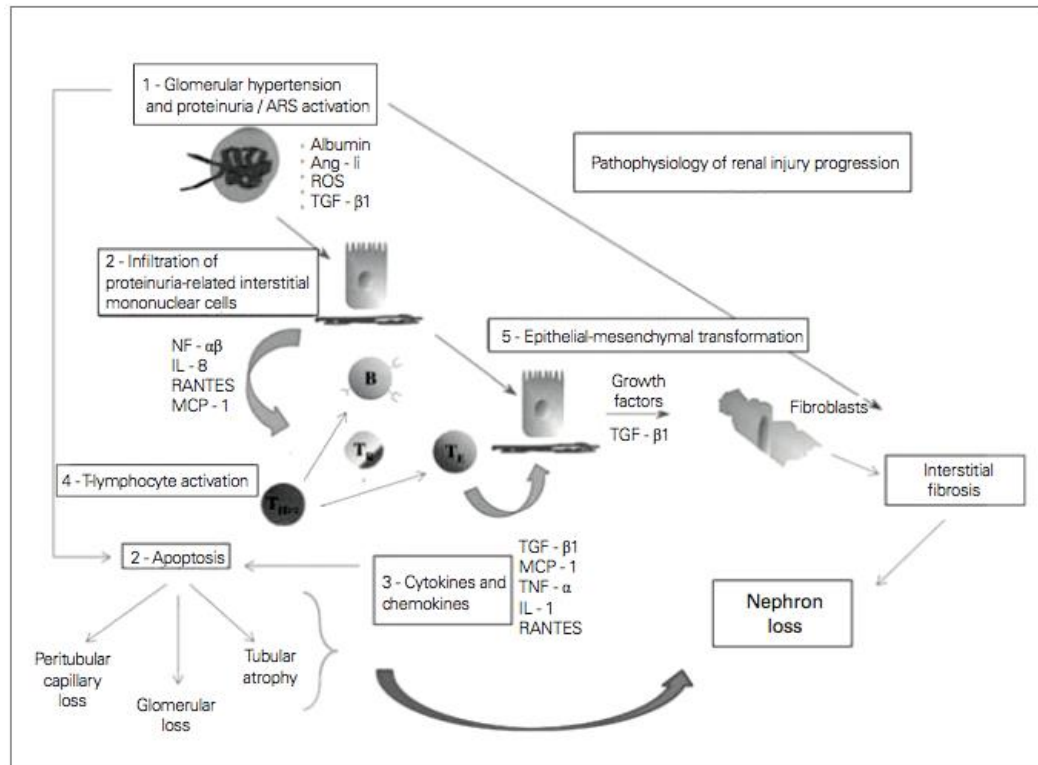
### 2.1.1.1 Inflamasi pada Penyakit Ginjal Kronis

Penyakit ginjal kronis (PGK) adalah masalah kesehatan masyarakat yang serius yang prevalensinya meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Perkembangan penyakit ini nantinya terkait dengan tingginya tingkat kesakitan dan tingkat kematian. Beberapa faktor terkait dengan onset dan progresivitas dari PGK, seperti obesitas, hipertensi dan diabetes mellitus. Di luar faktor-faktor ini, ada bukti adanya peran patofisiologis inflamasi di PGK. Beberapa sitokin dan kemokin telah terdeteksi di plasma dan urin pasien pada stadium awal PGK, dan juga terkait dengan komplikasi PGK. Ekspresi mediator dan jejas pada ginjal ini mungkin dipengaruhi oleh obat-obatan seperti *ace-inhibitor*, statin dan antagonis reseptor sitokin. Modulasi respon imun-inflamasi bisa menjadi target pengobatan PGK.<sup>22</sup> Pada pasien PGK, inflamasi juga merupakan prediktor mortalitas yang independen.<sup>23</sup>

Jalur patogenesis PGK ditandai oleh fibrosis glomerulus dan atau tubulointerstitial yang progresif, kerusakan kapiler peritubular akibat hipoksia dan hilangnya fungsi nefron akibat sklerosis glomerulus dan atrofi tubular, terlepas dari mekanisme pemicu utama. Inflamasi yang semakin meningkat diakui berperan dalam proses patofisiologis ini.<sup>24</sup> Peran inflamasi pada perkembangan PGK terbukti pada terjadinya glomerulopati, penyakit di mana inflamasi telah dikenali secara klasik, dan juga pada malformasi kongenital pada ginjal dan saluran urinaria, serta kondisi dimana obstruksi mekanis secara tradisional dianggap sebagai mekanisme utama. Potensi beberapa sitokin dan kemokin sebagai biomarker juga ditekankan sebagai perkembangan terjadinya PGK, perubahan *Transforming Growth Factor-*



$\beta$  (TGF- $\beta$ ), protein yang bersifat kemotaktik untuk monosit tipe 1 (MCP-1/CCL2), dan interleukin-8 (IL-8/CXCL8).<sup>22</sup>



**Gambar 2-1.** Sel-Sel dan Mediator yang Terlibat Dalam Progresivitas Penyakit PGK (Diadaptasi dari Chevalier RL, 2010)<sup>25</sup>

Peradangan kronis yang diamati pada PGK dikaitkan dengan peningkatan kadar serum fase akut-protein reaktan, seperti protein C-reaktif (CRP), dan berbagai mediator inflamasi ringan, seperti sitokin, komponen dari sistem pelengkap, prostaglandin dan leukotrien. Demikian juga, pengukuran CRP yang beredar di sirkulasi dan mediator pro-inflamasi, serta penilaian dari polimorfisme gen yang mengkode mediator pro-inflamasi ini telah menunjukkan bahwa pasien PGK menunjukkan fenotipe yang pro-inflamasi, yang ditekankan pada saat jejas ginjal berlanjut ke tahap akhir. Studi telah mendeteksi tingkat CRP yang meningkat

(antara 47,6 dan 76,2 nmol/L) pada 30% sampai 60% dari semua pasien PGK di Amerika Serikat, Kanada dan Eropa.<sup>26</sup> Selanjutnya, beberapa polimorfisme gen yang mengkode mediator inflamasi dikaitkan dengan perburukan pasien PGK. Rao dkk., misalnya, menunjukkan bahwa subkelompok G/C pada kodon 25 dari gen yang mengkodekan TGF- $\beta$ , terkait dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular pada pasien dengan PGK. Mekanisme dimana inflamasi menyebabkan kemunduran fungsi ginjal belum sepenuhnya dijelaskan. Mediator imun inflamasi diketahui memodulasi fungsi endotelial, adhesi dan migrasi interstisial sel imun yang bersirkulasi (monosit, leukosit atau neutrofil), selain mampu mengaktifkan fibroblas asal.<sup>24,27</sup> Beberapa sitokin proinflamasi yang dikaitkan dengan patofisiologi penyakit ginjal seperti IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ .<sup>28</sup> Ada bukti aktivasi kekebalan pada tahap awal PGK pada populasi orang dewasa. Tingkat CRP yang meningkat telah dikaitkan dengan semua penyebab mortalitas pada pasien pada stadium 3 dan 4 dari PGK.<sup>29</sup>

#### **2.1.1.1.1 Sitokin dan Kemokin**

Sitokin adalah protein larut dalam molekul rendah yang disekresikan oleh leukosit dan sel lainnya, terutama sebagai respons terhadap rangsangan antigenik, dan yang merupakan pembawa pesan dari sistem kekebalan tubuh. Sitokin mungkin menerima denominasi tertentu, yang mengacu pada sel dan mekanisme sintesis yang dominan. Jadi, sitokin yang sebagian besar disintesis oleh fagosit mononuklear adalah monokin yang diperintah, sementara yang diproduksi terutama oleh limfosit disebut limfokin. Sitokin yang bekerja pada leukosit lain disebut

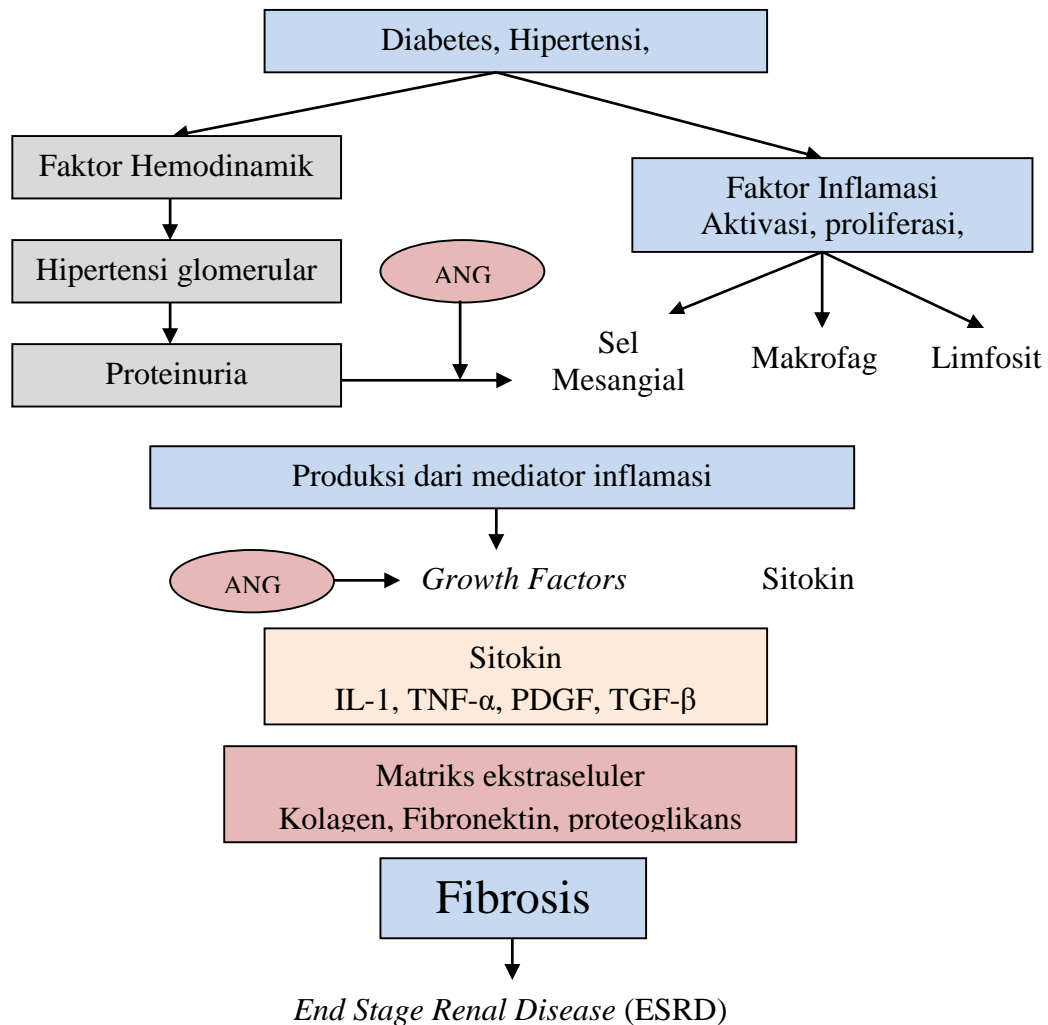
interleukin (IL). IL terlibat dalam respon antigen dan presentasi, terutama oleh limfosit T-helper. Sitokin yang mengontrol lalu lintas dasar dan inflamasi leukosit melalui kemotaksis disebut kemokin (yaitu sitokin kemoterapi). Mobilisasi adalah sifat mendasar dari sel kekebalan tubuh, dan kemokin adalah fasilitator penting dari proses ini. Selain kemotaksis, kemokin memiliki efek pro-angiogenik dan meningkatkan degranulasi leukosit. Dengan cara ini, respon kekebalan akhirnya terdiri dari kombinasi fungsi biologis.<sup>30</sup>

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, ada bukti klinis dan eksperimental yang mendukung peran sitokin dan kemokin dalam mekanisme cedera ginjal yang berbeda. Khususnya pada jaringan ginjal, sitokin menginduksi proliferasi lokal sel tubular dan interstisial, sintesis matriks ekstra seluler, aktivitas endotelial prokoagulan, pembentukan spesies reaktif oksigen dan peningkatan ekspresi molekul adhesi dan lipida aktif secara biologis. Pelepasan sitokin juga terkait dengan efek hemodinamik dan lokal dari pengaktifan sistem renin-angiotensin (RAS).<sup>30</sup>

#### **2.1.1.1.2 Sitokin sebagai Mediator Penyakit Ginjal**

Terlepas dari apakah imunitas *innate* atau adaptif terlibat, atau apakah penyakit ginjal akut atau kronis, jelas bahwa sitokin inflamasi memiliki peran sentral sebagai mediator fungsi kekebalan dan inisiator dari jejas ginjal. Terlepas dari apakah imunitas *innate* atau adaptif terlibat, atau apakah penyakit ginjal akut atau kronis, jelas bahwa sitokin inflamasi memiliki peran sentral sebagai mediator fungsi kekebalan dan inisiator dari jejas ginjal. Namun, sitokin memiliki peran imunomodulator yang dapat menghambat perkembangan penyakit ginjal juga.

Sitokin Th1 IFN- $\gamma$ , misalnya, memiliki peran ganda potensial dalam patogenesis penyakit ginjal, yang dapat mendorong dan membatasi perkembangan penyakit. Hasil menunjukkan bahwa transfer langsung sel sekresi IL-12 di bawah kapsul ginjal model lepra nefritis MRL-Fas (lpr) yang kekurangan reseptor IFN- $\gamma$  dapat melindungi ginjal. Di sisi lain, kehadiran reseptor IFN- $\gamma$  diharuskan untuk mengurangi progresivitas jejas ginjal yang disebabkan oleh faktor pertumbuhan yang disekresi makrofag pada ginjal MRL-Fas (lpr).<sup>31</sup> Biasanya, ketika sitokin terlibat dalam patogenesis penyakit ginjal, mereka berkontribusi dengan mengatur molekul adhesi sel endotel dan kemokin yang selanjutnya meningkatkan infiltrasi sel kekebalan ginjal. Selain itu, jalur sinyal yang diaktifkan oleh banyak sitokin meningkatkan faktor penguat (NF- $\kappa$ B), faktor transkripsi yang selanjutnya mendorong fenotip proinflamasi. Ekspresi dan atau aktivasi NF- $\kappa$ B meningkat di ginjal pada pasien glomerulonefritis, nefropati diabetik, dan AKI. Salah satu konsekuensi dari siklus inflamasi ini adalah mendorong pengembangan stres oksidatif lokal yang meningkatkan cedera ginjal dan mengganggu fungsi tubular dan hemodinamik ginjal. Perubahan hemodinamik ginjal akibat sitokin inflamasi umum yang pada akhirnya dapat meningkatkan cedera ginjal.<sup>32</sup>



**Gambar 2-2.** Gambar Skematik Proses Inflamasi pada Penyakit Ginjal yang Progresif (Diadaptasi dari Imig JD, et al, 2013)<sup>32</sup>

#### 2.1.1.1.2.1 Interleukin-1

Keluarga IL-1 yang terdiri dari dua sitokin proinflammatory, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dan agen antiinflamasi alami, serta antagonis reseptor larut IL-1 (IL-1Ra). Hubungan antara tingkat IL-1 dan IL-1Ra memiliki peran penting dalam kerentanan dan tingkat keparahan sejumlah penyakit. Studi telah menunjukkan bahwa hubungan ini dapat memprediksi penyakit kardiovaskular, onset dan mortalitas

glomerulopati pada PGK. IL-1 juga dianggap sebagai mediator fibrosis tubulointerstisial.<sup>33</sup> Ekspresi IL-1 yang meningkat terdeteksi pada biopsi ginjal pasien dengan vaskulitis dan di jaringan ginjal tikus tersisa yang telah mengalami *nephrectomy* subtotal. Sebagai tambahan, antagonis IL-1 menghambat pengembangan fibrosis tubulointerstisial pada hewan model PGK.<sup>34</sup>

#### **2.1.1.1.2.2 Interleukin-6**

Interleukin-6 (IL-6) ditemukan pada 1986 sebagai faktor stimulasi sel B yang memproduksi IgG. Interleukin-6 adalah sitokin pleiotropik yang tidak hanya mengatur kekebalan tubuh dan respon inflamasi, tetapi juga memengaruhi hematopoiesis, metabolisme, dan perkembangan organ. Selain memainkan beberapa peran fisiologis yang penting, IL-6 juga berperan dalam autoimun dan antiinflamasi, kelainan metabolik, dan keganasan<sup>35</sup>

Interleukin-6 adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh beberapa sel, termasuk monosit dan sel mesangial ginjal. IL-6 menginduksi diferensiasi limfosit B menjadi sel penghasil antibodi dan produksi aktivator protein fase akut, seperti CRP dan fibrinogen. Sebagai tambahan, sitokin ini merangsang proliferasi sel mesangial dan memiliki peran penting dalam glomerulopati proliferasi mesangial.<sup>36,37</sup>

Studi terbaru menunjukkan korelasi erat antara ekspresi IL-6 dan GGA. Pada model hewan GGA, ditemukan bahwa transkripsi dan pensinyalan IL-6 meningkat secara lokal dan sistemik setelah 60 menit kedua ginjal mengalami iskemia. Hal ini

menunjukkan bahwa IL-6 berhubungan dengan inflamasi dan dapat digunakan sebagai biomarker dan target terapeutik pada GGA.<sup>35</sup>

Peningkatan kadar IL-6 plasma umumnya diamati pada pasien PGK, yang sebagian besar disebabkan oleh peningkatan akibat stres oksidatif, inflamasi kronis, dan kelebihan cairan. IL-6 mempercepat perkembangan PGK dalam hal terjadinya komplikasi, terutama penyakit vaskular kronis (CVD). Hal ini menunjukkan bahwa IL-6 menginisiasi cedera endothelial melalui penurunan sintesis nitrit oksida endotel (eNOS) dan adiponektin (ekspresi anti-aterogenik adipokin).<sup>35</sup>

#### **2.1.1.1.2.3. Interleukin-8**

Interleukin-8 (IL-8) adalah sitokin kemoterapi pertama yang ditemukan, sebuah tonggak sejarah dalam sejarah imunologi. IL-8/CXCL8 termasuk dalam subfamili kemokin CXC dan merupakan kemoatraktan yang didominasi oleh bakteri. Ekskresi urin dari  $\beta$ 2-mikroglobulin, IL-6 dan IL-8/CXCL8 terkait dengan aktivitas radang ginjal pada lupus nephritis. Pengurangan kadar urin IL-8/CXCL8 telah terlihat bertepatan dengan periode remisi lupus nephritis. Yokoyama dkk. menunjukkan keterlibatan IL-8/CXCL8 pada fase akut nefropati IgA, yang dipengaruhi oleh proliferasi endokapillus.<sup>38</sup>

#### **2.1.1.1.2.4 Tumour Necrosis Factor- $\alpha$**

*Tumour Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) adalah sitokin proinflamasi yang produksinya distimulasi oleh angiotensin II, dan yang terkait dengan fibrosis interstisial melalui diferensiasi miofibroblas dan aktivasi NF- $\kappa$ B. Dalam model

eksperimental glomerulopati, genetik yang mengalami defisiensi TNF- $\alpha$  dan penghambatan farmakologis dari sitokin ini, menurunkan perkembangan lesi glomerulus.<sup>39</sup>

TNF- $\alpha$  memiliki fungsi proinflamasi dan imunoregulasi. TNF- $\alpha$  menghasilkan berbagai efek biologis, termasuk diferensiasi seluler, proliferasi, dan apoptosis.<sup>40</sup>

TNF- $\alpha$  memiliki dua reseptor transmembran yang berbeda yakni tipe I, p55TNFR (TNFR1) dan tipe II, p75 TNFR (TNFR2). P55 TNFR diekspresikan pada banyak tempat, sedangkan ekspresi p75 TNFR lebih diatur secara ketat dan ditemukan secara dominan pada sel hematopoietik dan sel endotel. Kedua reseptor ini dapat memediasi respon sel yang berbeda melalui aktivasi kaskade sinyal yang berbeda. P55 TNFR utamanya memediasi inflamasi dan kematian sel yang diinduksi TNF, sedangkan TNFR p75 mendorong terjadinya respons proliferasi di timosit, limfosit T, dan sel hematopoietik lainnya dan menginduksi apoptosis pada aktivasi sel T matur. Dengan demikian sistem TNF / TNFR berperan dalam dua fungsi penting yaitu sebagai mediator proinflamasi yang poten, dan pengatur sistem imunitas.<sup>40</sup>

#### **2.1.1.1.2.5 Nuclear Factor-Kappa B**

*Nuclear Factor-Kappa B* (NF- $\kappa$ B) adalah keluarga faktor transkripsi pleiotropik yang menghasilkan regulasi transkripsi dari ratusan gen yang terkait dengan inflamasi, kekebalan, apoptosis, proliferasi sel, dan diferensiasi.<sup>41</sup>



Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B mengatur induksi dan resolusi inflamasi. Dua jalur utama, klasik dan alternatif, mengendalikan inti translokasi NF- $\kappa$ B. Selain itu juga NF- $\kappa$ B mengatur ekspresi banyak gen yang memainkan peran kunci dalam respon inflamasi pada gagal ginjal. Beberapa rangsangan mengaktifkan NF- $\kappa$ B melalui jalur klasik pada sel ginjal somatik, dan aktivasi jalur non-kanonis dengan munculnya TWEAK pada gagal ginjal akut.<sup>41</sup>

Pada gagal ginjal pada manusia, terdapat bukti histologis aktivasi NF- $\kappa$ B pada nefropati diabetes, penyakit glomerulus, dan GGA. Secara umum, NF- $\kappa$ B diaktivasi di makrofag dan glomerulus (termasuk podosit pada penyakit proteinuri) dan sel parenkim tubular dan berhubungan dengan parameter keparahan penyakit seperti proteinuria atau peradangan.<sup>41</sup>

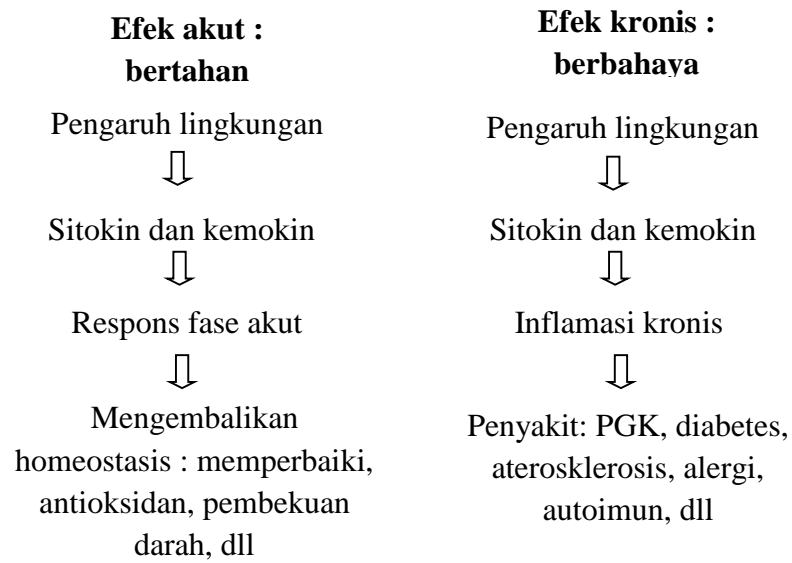
Aktivasi NF- $\kappa$ B mengatur neutrofil, makrofag, limfosit, dan sel dendritik. Selain itu, aktivasi NF- $\kappa$ B telah didokumentasikan secara *in vivo* dan *in vitro* pada sel glomerular intrinsik seperti podosit dan mesangial, tubular, dan sel endothelial pada gagal ginjal atau setelah terpapar rangsangan inflamasi. Banyak rangsangan menstimulasi NF- $\kappa$ B pada sel ginjal yang dikultur untuk mengatur transkripsi banyak molekul proinflamasi. Sitokin TNF dan angiotensin II (AngII) adalah aktivator utama NF- $\kappa$ B pada penyakit ginjal. Sitokin TNF yaitu TWEAK dan TNF menginduksi aktivasi jalur inflamasi yang berbeda dalam sel tubular.<sup>41</sup>

NF- $\kappa$ B terlibat baik pada onset dan resolusi inflamasi akut. Selama resolusi, NF- $\kappa$ B menurunkan regulasi gen inflamasi, meningkatkan regulasi gen anti-inflamasi, dan menginduksi apoptosis leukosit.<sup>41</sup>

### 2.1.1.2 Penyebab dan Kemungkinan Akibat Inflamasi Penyakit Ginjal Kronis

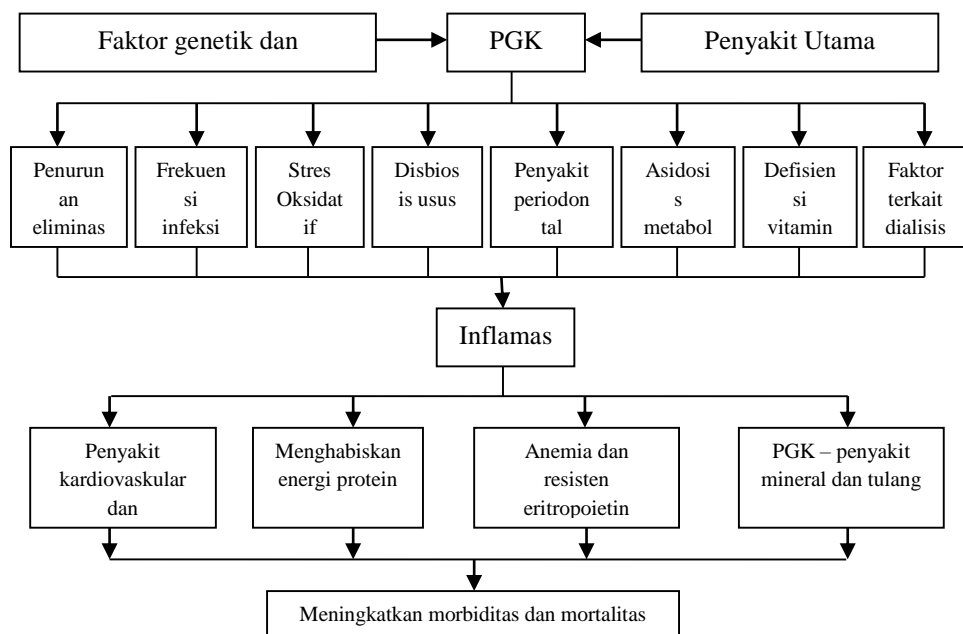
Akibat buruk yang paling serius dari PGK tidak hanya komplikasi metabolik dari penurunan GFR yang berlanjut ke ESRD (hipertensi, anemia, malnutrisi, kelainan tulang dan mineral, dll), tetapi juga meningkatkan risiko PKV, yang 100 kali lebih tinggi dari pada pada populasi umum.<sup>41</sup>

Inflamasi melibatkan interaksi kompleks antara sel kekebalan dan protein terlarut (sitokin, kemokin, adhesi, dan molekul co-stimulatory) yang terjadi di jaringan yang terkena dampak sebagai respons terhadap infeksi, trauma, iskemia, atau cedera autoimun. Berbagai jejas ginjal dapat terjadi pada tingkat yang berbeda dan ada enam mekanisme PGK yang berurutan yang mungkin merupakan bangunan jalur umum satu sama lain: (i) hiperfiltrasi glomerular, (ii) memburuknya proteinuria, (iii) penumpukan sitokin dan kemokin, (iv) inflamasi *nephritogenik interstitial*, (v) transisi epitel-mesenkim tubular (EMT), dan (vi) fibrosis neuron dan jaringan parut.<sup>42</sup> Penyebab lain inflamasi pada PGK termasuk hilangnya fungsi ginjal residual yang mengakibatkan gangguan *clearance* dan akumulasi metabolit pro-inflamasi dan produk akhir glication pasca-sintesis; Stres oksidatif meningkat akibat penipisan antioksidan (Zn, Se, vitamin C dan E) akibat gagal ginjal atau dialisis; paparan darah ke membran dialisis yang tidak kompatibel dan endotoksin dalam dialisat; dan infeksi dalam bahan akses vaskular pada hemodialisis (HD); peritonitis selama dialisis peritoneal jangka panjang (PD), atau cangkok penerima transplantasi yang aktif.<sup>43</sup>



**Gambar 2-3.** Efek Akut dan Kronis dari Respon Inflamasi (Diadaptasi dari Lam CWK, 2009) <sup>44</sup>

Secara keseluruhan penyebab dan konsekuensi dari inflamasi pada PGK.

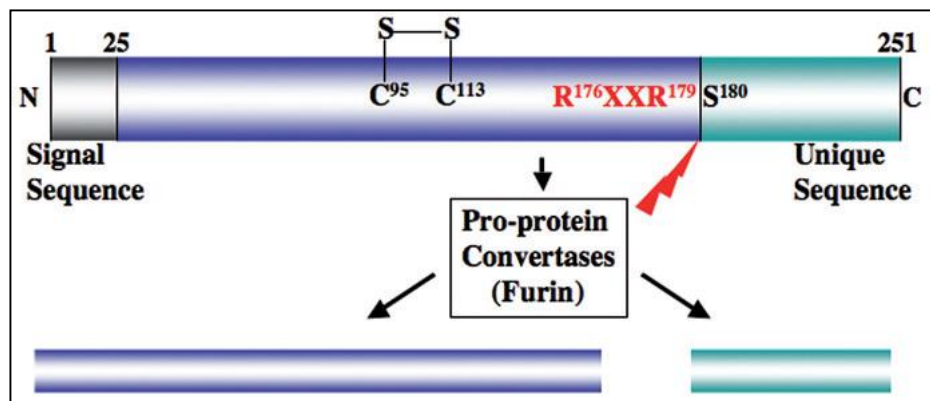


**Gambar 2-4.** Penyebab dan Konsekuensi Inflamasi pada PGK (Diadaptasi dari Akchurin OM dan Kaskel F 2015) <sup>45</sup>

### 2.1.2 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23)

*Fibroblast growth factor-23* (FGF23) yang sebelumnya disebut suatu “*phosphatonin*”, merupakan suatu 251 peptida asam amino dengan berat molekul (BM) 32 kDa, termasuk dalam famili FGF dan secara filogenetika sangat dekat dengan FGF19 dan FGF21. Keluarga gen *FGF* manusia/tikus terdiri dari 22 anggota dengan kesamaan urutan tinggi.<sup>6</sup>

*Fibroblast Growth Factors 1-23* telah diidentifikasi pada manusia dan tikus. FGF19 merupakan ortolog manusia dari FGF15 pada tikus. Dengan demikian, keluarga gen FGF pada tikus/manusia terdiri dari 22 anggota. Berdasarkan analisis filogenetika, FGF manusia dibagi menjadi 7 subfamili dan FGF23 masuk dalam subfamili FGF19.<sup>6,46</sup> Protein FGF23 relatif besar (32 kDa) dibanding anggota famili FGF lainnya dan diproses oleh enzim *proconvertase* menjadi 2 fragmen kecil yaitu ~18kDa (fragmen N-terminal) dan 14 kDa, suatu sekuens unik yang ada di C-terminal).<sup>46</sup> FGF23 merupakan suatu regio N-terminal yang berisi domain homologi FGF dan novel 71 asam amino C-terminal yang pertama kali ditemukan menggunakan skrining PCR *homology-based* pada pustaka cDNA embrionik tikus.<sup>4,6,47-49</sup>



**Gambar 2-5.** Struktur Skematik Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 (Diadaptasi dari Nabeshima Y, 2008) <sup>46</sup>

Sampai saat ini mekanisme kenaikan kadar FGF23 serum pada PGK masih belum jelas. Hal ini berhubungan dengan respon awal akibat retensi fosfat serta aksi dari ginjal untuk memperkuat pengeluaran fosfat dan mencegah hiperfosfatemia.<sup>47</sup> Pada PGK, kenaikan secara progresif serum fosfat memicu peningkatan secara progresif dalam pelepasan FGF23 sesuai dengan penurunan filtrasi glomerulus. Hasil menunjukkan kadar serum sangat tinggi ditemukan pada pasien PGK stadium 5 yang dialisis.<sup>50</sup>

Penelitian terbaru melibatkan 229 laki-laki dewasa usia pertengahan PGK yang menjalani dialisis. Pasien diikuti selama 5 tahun sampai menjalani transplantasi atau meninggal. Didapatkan peningkatan kadar FGF23 darah yang berhubungan dengan risiko kematian yang meningkat pada pasien dengan penyakit kardiovaskuler sebelumnya.<sup>51</sup> Terdapat peranan penting fosfat pada patofisiologi kalsifikasi vaskuler, termasuk juga kejadian pada pasien bukan dengan penyakit ginjal dan mungkin berkorelasi dengan penyakit koroner.

### 2.1.2.1 Fibroblast Growth Factor 23 dan Anti Inflamasi

Peningkatan kadar FGF23 terkait dengan tingkat CRP yang lebih tinggi, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen. Hubungan itu terlepas dari fungsi ginjal, metabolisme mineral yang diukur, dan faktor lain yang diketahui terkait dengan inflamasi. Selanjutnya, di antara metabolit mineral yang diuji, FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing marker inflamasi.<sup>9</sup>

Beberapa mekanisme dapat mendasari hubungan antara peningkatan kadar FGF23 dan marker inflamasi. Peningkatan FGF23 dapat merangsang inflamasi secara tidak langsung dengan mengurangi kadar 1,25D. FGF23 mengurangi tingkat sirkulasi 1,25D dengan menghambat ginjal 1-hidroksilase dan dengan merangsang 24-hidroksilase, yang mempercepat penurunan 1,25D. Karena penurunan tingkat 1,25D dikaitkan dengan tingkat IL-6 yang lebih tinggi, dan pengobatan dengan analog reseptor vitamin D menurunkan tingkat CRP pada PGK, ada kemungkinan supresi yang dimediasi oleh FGF23 pada 1,25 adalah pro-inflamasi.<sup>9</sup>

Kemungkinan lain adalah FGF23 langsung menginduksi peradangan. Penelitian menunjukkan melaporkan bahwa FGF23 mampu menginduksi sinyal pada sel yang tidak mengekspresikan klotho, co-reseptor FGF23 di ginjal, melalui aktivasi reseptor FGF, yang ada di hati dan jaringan adiposa. Dengan demikian, ada kemungkinan FGF23 dapat menginduksi ekspresi marker inflamasi yang diturunkan dari hati, seperti CRP, atau sitokin yang berasal dari lemak, seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$ , melalui efek klotho-independen. Sebagai alternatif, karena klotho memiliki sifat anti-inflamasi dan ekspresi ginjalnya berkurang pada pasien dengan PGK, kekurangan klotho dapat memediasi hubungan antara kelebihan dan

peningkatan FGF23. Efek serupa diamati pada tulang manusia dimana sampel TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang menginduksi ekspresi FGF23 adalah NF- $\kappa$ B dependen.<sup>9</sup> Pada penelitian in vivo, injeksi IL-1 $\beta$  pada tikus yang telah diobati dengan *HIF1 $\alpha$  inhibitor*, 2ME2, dan BAY 87-2243, secara signifikan menurunkan inflamasi dan merangsang peningkatan ekspresi mRNA FGF23 dan kadar cFGF23. Selain itu, penghambatan HIF1 $\alpha$  menghasilkan peningkatan iFGF23, yang menunjukkan bahwa HIF1 $\alpha$  dapat berkontribusi dalam peningkatan produksi FGF23 secara bersamaan yang diinduksi oleh peradangan. Hipotesis ini didukung dengan penelitian pengobatan tikus dengan *inhibitor prolyl-hydroxylase*, FG-4592, dan IOX2, yang meningkatkan kadar HIF1 $\alpha$ , yang menghasilkan peningkatan ekspresi mRNA FGF23 dan kadar cFGF23, sedangkan tingkat iFGF23 meningkat hanya dengan pemberian tambahan dari inhibitor purin yang menghambat sebagian pembelahan FGF23. Sitokin inflamasi secara langsung mengatur transkripsi FGF23 dengan merangsang ekspresi HIF1 $\alpha$  dan secara tidak langsung dengan mendorong defisiensi besi fungsional yang menstabilkan HIF1 $\alpha$ .<sup>9,52</sup>

Kemungkinan ketiga adalah bahwa inflamasi merangsang peningkatan FGF23. Bentuk kausalitas terbalik ini dapat dihasilkan dari efek resorptif pada tulang sebagai efek dari inflamasi, yang dapat merangsang produksi FGF23.<sup>52</sup>

### **2.1.3 Pasak Bumi**

*Eurycoma longifolia* dikenal secara komersial sebagai Pasak Bumi di Indonesia. Di Malaysia dikenal dengan nama *Tongkat Ali*, *Piak dan Tung* di Thailand serta *Cay ba bin* di Vietnam.<sup>53</sup> Pasak Bumi adalah pohon yang banyak

didapatkan di daerah hutan Kalimantan.<sup>14</sup> Pohon ini tumbuh mencapai tinggi 10 meter dengan daun panjang berwarna hijau. Daunnya memiliki bentuk menyirip. Bunga-bunga pohon ini bersifat dioecious, sedangkan buahnya berbentuk oval yang akan berubah warna menjadi coklat tua saat masak. Pasak Bumi berasal dari family *Simaroubaceae* yang menjadi salah satu obat herbal di Kalimantan yang digunakan aktivitas terapeutiknya.<sup>53</sup>

Berbagai senyawa kimia telah diisolasi, terutama dari akar Pasak Bumi yang meliputi *eurycomanone*, *eurycomanol*, *eurycomalactone*, *canthine-6-one alkaloid*, *9-hydroxycanthin-6-one*, *14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineaneone*, komponen *phenolic*, *tannins*, *quanssoids* dan *triterpenes triterpenes*.<sup>53</sup> Pada penelitian Jiwanjinda, et al,<sup>53</sup> Hamzah & Yusof,<sup>54</sup> dan Kuo, et al,<sup>55</sup> melaporkan tanaman Pasak Bumi juga mengandung *alkaloid quassinoid* turunan *squalene* dan *beta carboline alkaloids*.

Konstituen yang diketahui diidentifikasi dari Pasak Bumi adalah sebagai berikut: *eurycomalide C* (1), *eurycomalactone* (2), *7 $\alpha$ -hydroxyeurycomalactone* (3), *5,6-dehydroeurycomalactone* (4), *eurycolactone E* (5), *longilactone* (6), *14,15 $\beta$ -dihydroklaieaneone* (7), *11-dehydroklaieaneone* (8), *eurycomanone* (9), *13,21-dehydroeurycomanone* (10), *laurycolactone A* (11), *laurycolactone B* (12), *1-methoxycarbonyl- $\beta$ -carboline* (13), *9-hydroxycanthin-6-one* (14), *9-methoxycanthin-6-one* (15), *9,10-dimethoxycanthin-6-one* (16), *5-methoxy-4-hydroxycanthin-6-one* (17), *canthin-6-one 9-O- $\beta$ -D-glucoside* (18), *scopoletin* (19), *fraxidin* (20), *eurylene* (21), *pedunculoside* (22), *vanillic acid* (23), *vanillic aldehyde* (24), *syringic acid* (25), *1,1'-biphenyl-3,3'-dicarboxylic acid* (26), *isoaloeresin D* (27), dan *3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone* (28).<sup>16</sup>



Banyak sekali manfaat yang didapatkan dari konsumsi Pasak Bumi. Beberapa manfaat Pasak Bumi telah banyak diteliti. Pada tahun 2002, Kuo, *et al* melaporkan kandungan quassinoids yang awalnya ditemukan sebagai penghambat pertumbuhan tanaman, terbukti memiliki efek sebagai antitumor, antischistozomal dan antiplasmodial.<sup>56</sup>

Penelitian lain menunjukkan efek potensial Pasak Bumi sebagai anti-parasit pada kasus schistosomiasis. *Schistosomiasis* atau *bilharziasis* adalah penyakit parasit tropis yang disebabkan oleh cacing darah dari genus *Schistosoma*. Pada tahun 2002, Jiwajinda, *et al* mempelajari penghambatan efek dari tiga quassinoids (*longilactone*, *11-dehydroklaineaneone* dan *14,15  $\beta$ -dihydroxyklaineaneone*). Ketiga quassinoids menunjukkan efek penghambatan yang signifikan pada *S. japonicum* walaupun aktivitasnya ternyata lebih lemah daripada obat praziquantel yang digunakan untuk pengobatan skistosoma saat ini.<sup>55</sup>

Betakarboline alkaloids pada Pasak Bumi juga dilaporkan bersifat sitotoksik dan sebagai antimalaria.<sup>14</sup> Efek antimalaria dari komponen Pasak Bumi terutama dari berbagai jenis quassinoids juga telah diuji oleh beberapa peneliti. Telah dilaporkan bahwa terdapat tiga quassinoids (*eurycomanol*, *eurycomanone 12-O-beta-D-glucopyranoside* dan *13 beta, 18-dihydroeurycomanol*) terbukti memiliki efek antimalaria pada kasus malaria yang resisten terhadap *Plasmodium falciparum*.<sup>57</sup>

Pada tahun 2011, Purwantiningsih *et al* menyelidiki aktivitas radikal bebas *scavenger* yang berasal dari ekstrak etanolik pada Pasak Bumi berhubungan dengan kandungan fenolik total dan flavonoid. Namun dari hasil penelitian ini didapatkan

aktivitas radikal bebas pada Pasak Bumi lebih rendah dari aktivitas radikal bebas pada asam askorbat yang merupakan standar antioksidan atau radikal bebas.<sup>58</sup>

Pada tahun 2007, penelitian Farouk dan Benafri juga melaporkan bahwa Pasak Bumi memiliki efek antibakteri. Efek antibakteri dari Pasak Bumi juga didapatkan dari bagian daun dan batang Pasak Bumi tapi tidak dari ekstrak akarnya. Didapatkan hasil bahwa ekstrak alkohol dan aseton dari daun dan batang Pasak Bumi aktif melawan mikroba *Escherichia coli* dan *Salmonella typhii*, sedangkan ekstrak air dari daun Pasak Bumi ditemukan aktif melawan *Staphylococcus aureus* dan *Serratia marscesens*.<sup>59</sup>

Pasak Bumi juga telah digunakan sebagai afrodisiak oleh berbagai generasi masyarakat di daerah pedalaman Kalimantan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama pemberian infusa akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) meningkatkan libido tikus putih jantan, yang ditunjukkan adanya peningkatan jumlah pendekatan (introduksi) dan penunggang (climbing) tikus putih jantan terhadap tikus putih betina.<sup>60</sup>

Pasak Bumi juga mempunyai kandungan kimia *eurikomolakton* dan *amarolinda* yang dapat meningkatkan libido dan mempunyai efek androgenik. Bahan ini akan memperbaiki aktivitas membran sel hipofisis anterior sehingga pelepasan LH dan FSH akan lebih banyak. Peningkatan LH dan FSH akan memengaruhi organ testis. Aktivitas membran testis akan menjadi lebih baik sehingga afinitas reseptor LH pada sel Leydig akan meningkat. LH akan terikat pada reseptor dan akan merangsang pembentukan dan sekresi testosteron. FSH yang dihasilkan hipofisis akan merangsang sel sertoli untuk membentuk *sex*

*hormone binding globulin* (SHBG), berfungsi untuk mengikat testosteron yang dihasilkan sel Leydig. Proses ini akan meningkatkan kadar testosteron dalam testis yang merupakan syarat untuk inisiasi terjadinya proses spermatogenesis.<sup>61</sup>

Efek *in vivo* ekstrak air Pasak Bumi diselidiki pada berat badan serta parameter sperma fungsional dalam hal keamanan dan efikasi pada tikus jantan. Pada penelitian Rehman SU, et al, pada tikus, konsentrasi testosteron meningkat 30,2% dari konsentrasi sperma total, motilitas dan vitalitas progresif meningkat secara signifikan sebesar 25,1%, dengan peningkatan berat otot yang tidak signifikan, sehingga penggunaan *E. longifolia* aman untuk dilakukan pengobatan infertilitas pria dan masalah penuaan pria.<sup>62</sup>

Ekstrak Pasak Bumi juga pernah diteliti berdasarkan lama pemakaiannya. Pada penelitian Choudhary et al (2012) dilakukan pengujian toksisitas ekstrak Pasak Bumi. Pada uji toksisitas akut, pemberian oral 2000 mg/kg ekstrak Pasak Bumi tidak menghasilkan mortalitas maupun perubahan perilaku aktivitas fisiologis lainnya. Dalam studi toksisitas subakut, tidak ada mortalitas atau tanda toksik yang diamati pada pemberian tiga dosis 250, 500 dan 1000 mg/kg ekstrak Pasak Bumi yang diberikan secara oral selama 28 hari.<sup>63</sup>

Dalam studi toksisitas subakut, tampak bahwa ekstrak pasak *Eurycoma longifolia* pada dosis yang digunakan tidak menghasilkan perubahan yang nyata pada tikus jantan dan betina, yang dibuktikan dengan tidak adanya gejala toksik, tidak ada perubahan konsumsi makanan dan perubahan berat badan. Selain itu, tidak ditemukan perubahan patologis yang diteliti pada organ dalam.<sup>63</sup>

Pada pengujian toksisitas subkronis, dipelajari dengan pemberian tiga dosis oral 250, 500 dan 1000 mg/kg selama 90 hari. Tidak ada kejadian kematian dan kelainan klinis yang dilaporkan. Pemeriksaan aktivitas ophthalmologis, sensorik dan motorik tidak menunjukkan efek okular dan neurotoksik.<sup>63</sup>

Pada tahun 2013, penelitian Li CH, *et al* menemukan bahwa LD<sub>50</sub> Pasak Bumi yang diukur dengan pemberian dosis tunggal oral adalah lebih dari 6 g/kgbb pada tikus. Akar Pasak Bumi dengan dosis 6 g/kgbb pada tikus tidak menyebabkan toksisitas akut (didefinisikan sebagai timbulnya gejala cepat dalam beberapa jam atau hari) atau kelainan pada serum biokimia, hematologi, dan profil pembekuan. Pada studi subakut (4 minggu), dan subkronik (13 minggu), pemberian Pasak Bumi ditemukan tidak beracun untuk fungsi hati/ginjal, profil hematologi, profil lipid, elektrolit tubuh, dan faktor koagulasi.<sup>64</sup>

Pada kelompok tikus yang diberikan Pasak Bumi menjelaskan sitoprotektif potensi *E. longifolia*, terutama di hati dan ginjal. Potensi sitoprotektif ini disebabkan oleh farmakologis efek superoksida dismutase,  $\beta$ -karbolin alkaloid, dan turunan squalene. Senyawa ini diketahui memiliki efek perlindungan yang signifikan terhadap kerusakan oksidatif, lipid peroksidasi, dan inflamasi.<sup>64</sup>

Pada tahun 1998, Satayavivad, *et al* telah melakukan studi **toksisitas akut** pada Pasak Bumi dan menemukan bahwa toksisitas akut (LD oral 50) dari ekstrak alkohol Pasak Bumi pada tikus adalah 1500-2000 mg/kg sedangkan LD oral 50 untuk ekstrak air lebih dari 3000 mg/kg.<sup>65</sup>

Untuk mengkonversi dosis hewan ini ke manusia, normalisasi metode luas permukaan tubuh (BSA) harus digunakan. Formula untuk mengkonversi dosis dari hewan ke manusia menggunakan metode BSA.<sup>53</sup>

$$\text{Dosis pada manusia (mg/kg)} = \text{Dosis Hewan (mg/kg)} \times \frac{\text{berat hewan (kg)}}{\text{berat manusia (kg)}}$$

Pasak Bumi tidak menyebabkan kematian pada manusia dimana LD<sub>50</sub> dari Pasak Bumi sebesar 810 mg/kg pada pria dewasa. Pasak Bumi dianggap aman asalkan tidak dikonsumsi dalam dosis tinggi. Berdasarkan penelitian hasil toksisitas sebelumnya, Pasak Bumi normalnya dianjurkan diberikan untuk pria dewasa dengan dosis 200-400 mg setiap hari.<sup>53</sup>

Hewan model telah menjadi komponen penting dari penelitian medis untuk menggambarkan mekanisme dan menguji kemungkinan intervensi pada penyakit manusia termasuk penyakit ginjal kronis. Penyakit ginjal kronis terjadi akibat cedera berulang atau progresif pada glomeruli, tubulus, interstitium, dan/atau pembuluh darah. Untuk mempelajari patogenesis, mekanisme dan efek intervensi, banyak hewan model telah dikembangkan, termasuk model spontan, genetik, dan induksi. Salah satu hewan model gagal ginjal yang sering digunakan untuk menggambarkan penyakit gagal ginjal kronis adalah 5/6 nefrektomi.<sup>18</sup> Hewan model 5/6 nefrektomi telah menjadi model yang banyak digunakan untuk mempelajari glomerulosklerosis. Kelebihan dari model ini adalah pembacaan fungsional yang kuat (seperti proteinuria, LFG, dan hipertensi sekunder), induksi yang baik pada hewan pengerat, dan perbandingan dengan ginjal yang diinduksi cedera. Model ini sangat spesifik untuk tikus.<sup>18</sup>

**Tabel 2-1.** Dosis Pemberian Diberikan Berdasarkan Konversi dari Dosis Pemberian pada Manusia ke Tikus.<sup>66</sup>

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinc i 1,5 kg	Kucin g 2 kg	Ker a 4 kg	Anjin g 12 kg	Manusi a 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,9	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,31	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

### 2.1.3.1 Pasak Bumi sebagai Anti Inflamasi

Pada pasien dengan PGK, peningkatan kadar FGF23 secara independen terkait dengan tingkat CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen yang lebih tinggi dan kemungkinan lebih besar bermanifestasi sebagai inflamasi berat. FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing marker inflamasi.<sup>9</sup>

C-Reactive Protein (CRP) merupakan marker inflamasi yang digunakan secara luas dalam praktik klinis. Pada tingkat awal, CRP dapat memprediksi kejadian penyakit kardiovaskular. CRP tidak hanya menjadi marker inflamasi tapi juga mediator pada fokus inflamasi.<sup>67</sup> IL-6 dan IL-1 adalah induser utama ekspresi CRP. Banyak pula molekul lain, seperti IL-4, IL-11, TNF, TGF $\beta$  dan Dex juga telah dilaporkan berpartisipasi dalam mengatur ekspresi CRP.<sup>68</sup>

Pasak Bumi mengandung *Nitric Oxide* (NO) yang tinggi. Kadar NO yang terdapat pada Pasak Bumi terbukti dapat menghambat IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang merupakan mediator inflamasi.<sup>53</sup> Pada penelitian Kahtan MI, et al pada tahun 2018, Pasak Bumi juga dapat menurunkan TNF- $\alpha$  dan IL-6 pada *plasmodium berghei* secara *in vivo*.<sup>69</sup>

Studi molekuler *in vitro* menggunakan sel makrofag mengungkapkan bahwa Pasak Bumi menekan translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus, yang menyebabkan inaktivasi jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B dan dapat menginduksi pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 serta sintesis nitrit oksida diinduksi.<sup>15</sup>

Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah pengatur utama beberapa jalur pro-inflamasi. Selain berperan penting dalam peradangan, NF- $\kappa$ B juga berperan dalam resistensi sel melawan apoptosis. Oleh karena itu, penghambatan NF- $\kappa$ B turut berperan menghasilkan efek anti-inflamasi.<sup>16</sup>

Pasak Bumi memiliki 28 senyawa yang sudah terisolasi yang telah diuji kemampuannya dalam penghambatan jalur NF- $\kappa$ B pada HEK-293/Sel NF- $\kappa$ B-luc dengan konsentrasi awal 30  $\mu$ M. Terdapat dua senyawa utama yang bertanggung jawab atas aktivitas tersebut: (i) C19- dan C20-type quassinoids dan (ii)  $\beta$ -carboline dan canthin-6-one alkaloids. Kedua senyawa ini bertindak sebagai penghambat NF- $\kappa$ B yang nantinya menghasilkan efek anti-inflamasi. Tipe C19(1-6) dan quassinoid tipe C20 (7-10), alkaloid (13-16), dan flavonoid (28) merupakan quassinoid yang menunjukkan penghambatan jalur NF- $\kappa$ B lebih dari 50% .<sup>16</sup>

Quassinoid tipe C19 dan quassinoid tipe C20 serta alkaloid dapat dianggap sebagai antiinflamasi utama dari ekstrak Pasak Bumi. Di antara beberapa

quassinoid, *eurycomalactone*(2) menunjukkan aktivitas penghambatan NF- $\kappa$ B yang paling efektif.<sup>16</sup>

Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi memiliki efek penghambatan NF- $\kappa$ B yang poten. Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi mengungkapkan efek penghambatan NF- $\kappa$ B yang menjanjikan ( $66,9 \pm 3,2\%$ ) pada konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>16</sup>

Ekstrak hydroalcoholic dari akar Pasak Bumi juga dipelajari secara in vitro. Semua konsentrasi ekstrak yang diteliti menunjukkan adanya efek sebagai antiinflamasi yang bermakna, tapi tergantung konsentrasi dari ekstrak tersebut. Pada penelitian tersebut, didapatkan hasil Pasak Bumi mampu menunjukkan perlindungan  $83,333 \pm 2,343\%$  dibandingkan dengan natrium diklofenak.<sup>14</sup>

## 2.2 Kerangka Pemikiran

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penyakit kronis yang sampai saat ini mempunyai prevalensi cukup tinggi di dunia, sekitar 5-10%. Penyakit ini menempati urutan ke 12 sebagai penyebab kematian dan ke 17 sebagai penyebab kecacatan. Penurunan fungsi ginjal yang progresif dapat menyebabkan berbagai komplikasi, seperti anemia, malnutrisi, aterosklerosis, gangguan metabolisme mineral dan tulang pada penyakit ginjal kronis (GMT-PGK), neuropati dan penurunan kualitas hidup. Komplikasi tersebut semakin memberat pada pasien PGK stadium 5 yang menjalani hemodialisis rutin (PGK-5D).<sup>1</sup>

Terdapat banyak faktor yang memengaruhi terjadinya komplikasi-komplikasi pada PGK. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan progresivitas PGK dan



terjadinya komplikasi GMT-PGK adalah *fibroblast growth factor 23* (FGF23). Dari beberapa literatur disebutkan hubungan FGF23 dapat mempercepat progresivitas PGK dan komplikasi GMT-PGK.<sup>4</sup> Hubungan yang bermakna antar FGF23 dengan iPTH merupakan salah satu faktor terjadinya GMT-PGK.<sup>5</sup> Penatalaksanaan GMT-PGK merupakan penanganan yang utama pada pasien PGK.

*Fibroblast growth factor-23* (FGF23) yang sebelumnya disebut suatu “*phosphatonine*”, merupakan suatu 251 peptida asam amino dengan berat molekul (BM) 32 kDa, termasuk dalam famili FGF dan secara filogenetika sangat dekat dengan FGF19 dan FGF21. Keluarga gen *FGF* manusia / tikus terdiri dari 22 anggota dengan kesamaan urutan tinggi.<sup>6</sup>

Peningkatan kadar FGF23 terkait dengan proses inflamasi. Proses inflamasi terkait dengan beberapa penanda inflamasi berhubungan dengan tingkat CRP yang tinggi, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen. Hubungan itu terlepas dari fungsi ginjal, metabolisme mineral yang diukur, dan faktor lain yang diketahui terkait dengan inflamasi. Interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) adalah sitokin proinflamasi yang dikaitkan dengan patofisiologi penyakit ginjal.<sup>27</sup>

IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh beberapa sel, termasuk monosit dan sel mesangial ginjal. IL-6 menginduksi diferensiasi limfosit B menjadi sel penghasil antibodi dan produksi aktivator protein fase akut, seperti CRP dan fibrinogen. Sebagai tambahan, sitokin ini merangsang proliferasi sel mesangial dan memiliki peran penting dalam glomerulopati proliferasi mesangial.<sup>36,37</sup>

Peningkatan kadar IL-6 plasma umumnya diamati pada pasien PGK, yang sebagian besar disebabkan oleh peningkatan akibat stres oksidatif, inflamasi kronis, dan kelebihan cairan. IL-6 mempercepat perkembangan PGK dalam hal terjadinya komplikasi, terutama penyakit vaskular kronis (CVD). Hal ini menunjukkan bahwa IL-6 menginisiasi cedera endothelial melalui penurunan sintesis nitrit oksida endotel (eNOS) dan adiponektin (ekspresi anti-aterogenik adipokin).<sup>35</sup>

*Tumour Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) adalah sitokin proinflamasi yang produksinya distimulasi oleh angiotensin II, dan yang terkait dengan fibrosis interstisial melalui diferensiasi miofibroblas dan aktivasi NF- $\kappa$ B. Dalam model eksperimental glomerulopati, genetik yang mengalami defisiensi TNF- $\alpha$  dan penghambatan farmakologis dari sitokin ini, menurunkan perkembangan lesi glomerulus.<sup>39</sup> TNF- $\alpha$  memiliki fungsi proinflamasi dan imunoregulasi. TNF- $\alpha$  menghasilkan berbagai efek biologis, termasuk diferensiasi seluler, proliferasi, dan apoptosis. Dengan demikian sistem TNF / TNFR berperan dalam dua fungsi penting yaitu sebagai mediator proinflamasi yang poten, dan pengatur sistem imunitas.<sup>40</sup>

*Nuclear Factor-Kappa B* (NF- $\kappa$ B) adalah keluarga faktor transkripsi pleiotropik yang menghasilkan regulasi transkripsi dari ratusan gen yang terkait dengan inflamasi, kekebalan, apoptosis, proliferasi sel, dan diferensiasi.<sup>41</sup>

Kejadian PGK berhubungan dengan peningkatan penanda inflamasi, percepatan progresi PGK<sup>10,11</sup> dan peningkatan risiko kematian.<sup>10,12</sup> Beberapa penanda inflamasi yang berhubungan erat dengan FGF23 dan yang sudah diteliti

adalah Interleukin-6 (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B).<sup>70-73</sup>

Pada tahun 2012, Mendoza JM, et al melaporkan bahwa pada pasien PGK, peningkatan kadar FGF23 secara independen terkait dengan tingkat CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan fibrinogen yang lebih tinggi dan kemungkinan lebih besar bermanifestasi sebagai inflamasi berat. FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing marker inflamasi.<sup>9</sup>

Kemungkinan FGF23 dapat menginduksi ekspresi marker inflamasi yang diturunkan dari hati, seperti CRP, atau sitokin yang berasal dari lemak, seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$ , melalui efek klotho-independen. Sebagai alternatif, karena klotho memiliki sifat anti-inflamasi dan ekspresi ginjalnya berkurang pada pasien dengan PGK, kekurangan klotho dapat memediasi hubungan antara kelebihan dan peningkatan FGF23. Efek serupa diamati pada tulang manusia dimana sampel TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang menginduksi ekspresi FGF23 adalah NF- $\kappa$ B dependen.<sup>9</sup> Untuk menghambat terjadinya progresifitas PGK, diperlukan antiinflamasi.

Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) merupakan bahan alami yang terdapat di Indonesia dan juga Malaysia atau beberapa negara Asia lainnya. Dari beberapa laporan penelitian, Pasak Bumi mempunyai efek anti inflamasi. Pasak Bumi banyak dan mudah didapat di pulau Kalimantan.<sup>14</sup>

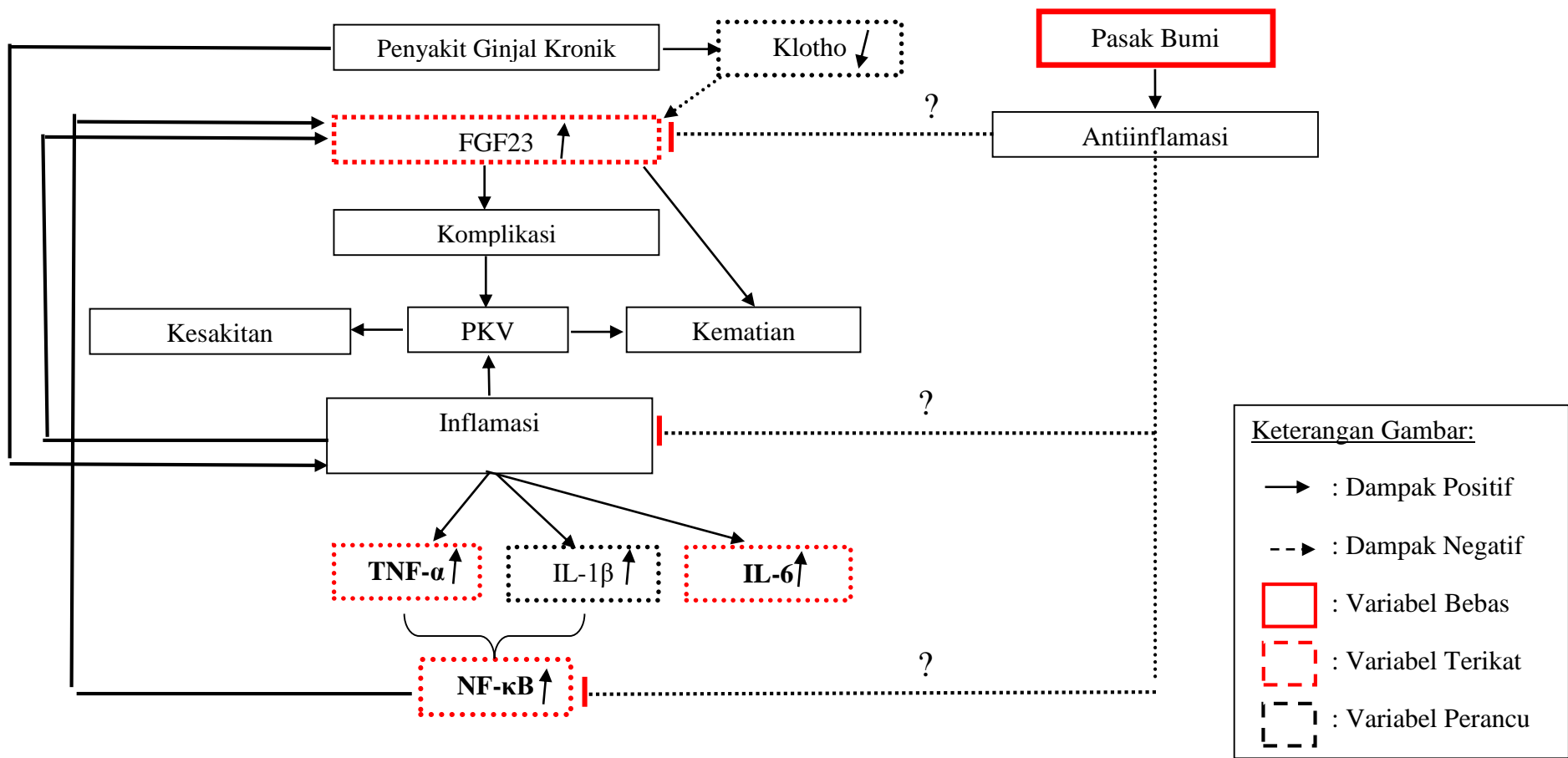
Studi molekuler *in vitro* menggunakan sel makrofag mengungkapkan bahwa Pasak Bumi menekan translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus, yang menyebabkan inaktivasi jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B dan pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 dan sintesis nitrit oksida yang dapat diinduksi.<sup>15</sup>

Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah pengatur utama dari beberapa jalur pro-inflamasi. Selain berperan penting dalam peradangan, NF- $\kappa$ B juga berperan dalam resistensi sel melawan apoptosis. Oleh karena itu penghambatan penghambatan NF- $\kappa$ B berkontribusi menghasilkan efek anti-inflamasi.<sup>16</sup>

Pada tahun 2011, Purwantiningsih et al<sup>57</sup> menyelidiki aktivitas radikal bebas *scavenger* yang berasal dari ekstrak etanolik pada Pasak Bumi berhubungan dengan kandungan fenolik total dan flavonoid. Namun dari hasil penelitian ini didapatkan aktivitas radikal bebas pada Pasak Bumi lebih rendah dari aktivitas radikal bebas pada asam askorbat yang merupakan standar antioksidan atau radikal bebas.

Pasak Bumi mengandung *Nitric Oxide* (NO) yang tinggi. Kadar NO yang terdapat pada Pasak Bumi terbukti dapat menghambat IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang merupakan mediator inflamasi.<sup>53</sup> Pada penelitian Kahtan MI, et al pada tahun 2018, Pasak Bumi juga dapat menurunkan TNF- $\alpha$  dan IL-6 pada *plasmodium berghei* secara *in vivo*.<sup>69</sup> Hasil penelitian Voleti dan Agrawal (2006) didapatkan hasil bahwa *Nitric Oxide* (NO) juga dapat menurunkan ekspresi CRP pada *in vivo*.<sup>68</sup>

Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi memiliki efek penghambatan NF- $\kappa$ B yang poten. Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi menunjukkan efek penghambatan NF- $\kappa$ B ( $66,9 \pm 3,2\%$ ) pada konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>16</sup>



Gambar 2-6. Kerangka Pemikiran

### 2.3 Premis

Berdasarkan bukti-bukti ilmiah yang telah diuraikan, maka secara selektif dapat dirumuskan beberapa premis sebagai berikut:

**Premis 1** : Keadaan inflamasi kronis yang berlangsung terus pada gagal ginjal ditandai dengan adanya kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B yang tinggi.<sup>11</sup>

**Premis 2** : Beberapa penanda inflamasi yang berhubungan erat dengan FGF23 dan yang sudah diteliti adalah Interleukin-6 (IL-6), *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B).<sup>9,13,70-72</sup>

**Premis 3** : TNF- $\alpha$  memiliki fungsi proinflamasi dan imunoregulasi.<sup>40</sup>

**Premis 4** : NF- $\kappa$ B terlibat baik pada onset dan resolusi inflamasi akut dimana NF- $\kappa$ B menurunkan regulasi gen inflamasi, meningkatkan regulasi gen anti-inflamasi, dan menginduksi apoptosis leukosit.<sup>41</sup> Penghambatan NF- $\kappa$ B berkontribusi efek anti-inflamasi.<sup>16</sup>

**Premis 5** : Pasak Bumi juga dapat menurunkan TNF- $\alpha$  dan IL-6 pada *plasmodium berghei* secara *in vivo*.<sup>69</sup>

**Premis 6** : Pasak Bumi menekan translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus, yang menyebabkan inaktivasi jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B dan pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 dan sintesis nitrit oksida yang dapat diinduksi.<sup>15</sup>

**Premis 7** : Pasak Bumi mempunyai efek anti inflamasi, terutama terhadap IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B.<sup>16</sup>

**Premis 8** : Pasak Bumi sebagai anti inflamasi mampu menunjukkan perlindungan  $83,333 \pm 2,343\%$  dibandingkan dengan natrium diklofenak.<sup>14</sup>

## 2.4 Hipotesis

Premis diatas dapat dideduksi menjadi hipotesis yang pada hakekatnya merupakan landasan teoritis dalam rangka memberi jawaban terhadap masalah yang telah dirumuskan dengan perumusan sebagai berikut:

Hipotesis 1 : Terdapat perbedaan rerata kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*. (Premis 1, 5, 7)

Hipotesis 2 : Terdapat perbedaan rerata kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*. (Premis 1, 3, 5, 7)

Hipotesis 3 : Terdapat perbedaan rerata kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*. (Premis 1, 4, 6, 7)

Hipotesis 4 : Terdapat perbedaan rerata kadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*. (Premis 2, 8)

Hipotesis 5 : Terdapat korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal. (Premis 1, 2)

## **BAB III**

### **SUBJEK DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Subjek Penelitian**

##### **3.1.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian adalah semua tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 10-14 minggu yang ditempatkan dalam ruang di laboratorium selama kurang lebih 1 minggu untuk membuat suasana stabil.

##### **3.1.2 Subjek Penelitian**

Subjek penelitian adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 10-14 minggu normal dan dibuat model gagal ginjal yang dilakukan 5/6 nefrektomi dengan teknik pembedahan yang dilakukan oleh ahlinya.

##### **3.1.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

###### **Kriteria Inklusi:**

- a. Tikus jantan
- b. Berusia 10-14 minggu
- c. Tikus berbulu mengkilat, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal
- d. Berat badan rata-rata 200-250 gram



**Kriteria Eksklusi:**

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

**3.1.4 Jumlah Sampel**

Penentuan besar sampel dalam penelitian ini sesuai dengan tujuan penelitian dan tipe data. Besarnya ukuran sampel diestimasi berdasarkan tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian Pasak Bumi pada tikus model gagal ginjal, yaitu dengan menggunakan rumus penentuan besar sampel untuk penelitian analisis perbedaan rata-rata pada kedua kelompok tidak berpasangan maka digunakan rumus besar sampel menggunakan rumus Federer karena uji eksperimental hewan.

Menurut Federer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

$$t(n-1) > 15$$

t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel sebagai berikut:

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$n > 4,125$$

Besaran sampel digunakan dengan masing-masing kelompok 5 ekor tikus sehingga sampel penelitian yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus.

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 4 kelompok.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan untuk :

1. Pembuatan dan pemeliharaan serta pengambilan sampel tikus model gagal ginjal di Laboratorium Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran. Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan (FKKMK) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.
2. Pemeriksaan sampel darah dan urin di Laboratorium Patologi Klinik FKKMK UGM Yogyakarta.
3. Pemeriksaan Patologi Anatomi di Laboratorium Patologi Anatomi Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.
4. Pemeriksaan ELISA di Laboratorium Riset Terpadu FKKMK UGM Yogyakarta.

Waktu penelitian dilakukan selama 9 bulan, yang dimulai dengan persiapan bahan, pemesanan tikus, pemesanan reagen, pengajuan etik penelitian, pembuatan tikus model gagal ginjal (4 minggu), pemberian ekstrak Pasak Bumi (9 minggu), pengambilan sampel, pelaksanaan pemeriksaan (2 bulan) dan analisis data. Penelitian dimulai pada bulan Maret sampai November 2019.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) untuk menekan IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

#### 3.3.2 Identifikasi Variabel Penelitian

Menilai perbedaan rerata kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal :

1. Variabel bebas pada penelitian ini terdiri dari: ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*).
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah:
  - a. kadar *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23)
  - b. kadar *Interleukin-6* (IL-6)
  - c. kadar *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )
  - d. kadar *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B).

Menilai korelasi antara IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal :

1. Variabel terikat pada penelitian ini terdiri dari: kadar *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23).
2. Variabel bebas pada penelitian ini adalah:
  - a. kadar *Interleukin-6* (IL-6)
  - b. kadar *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )
  - c. kadar *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B).

### 3.3.3 Definisi Operasional Penelitian

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

**Tabel 3-1.** Definisi Operasional.

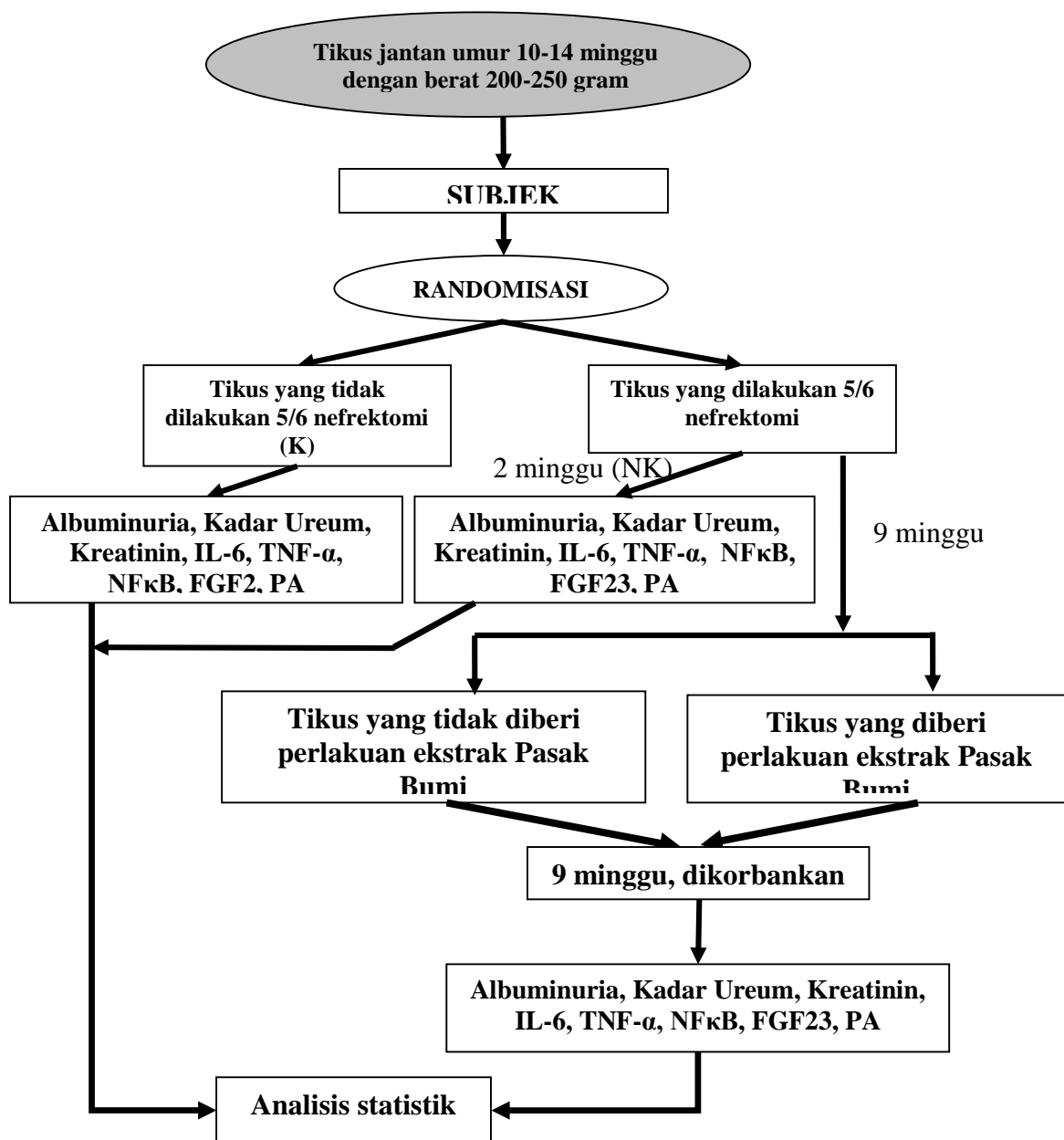
Variabel	Definisi operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Tikus model gagal ginjal	Tikus Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ) berumur 10-14 minggu yang dilakukan 5/6 nefrektomi dengan teknik pembedahan yang dilakukan sesuai standar pembedahan pada hewan coba (tikus) oleh Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta	Pemeriksaan laboratorium ureum dan kreatinin (Peningkatan bermakna dengan tikus kontrol)	Tikus gagal ginjal positif  Tikus Kontrol	Kategorik
<i>Fibroblast Growth Hormone</i> 23 (FGF23)	protein dengan 32 kD terdiri 251 asam amino, kadar normalnya masih belum ada kesepakatan, hormon yang disekresi osteosit dan osteoblast yang mengatur homeostasis fosfor dan vitamin D. <sup>73</sup>	Pemeriksaan ELISA ( <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> )	Kadar RU/mL.	Numerik
Interleukin 6 (IL-6)	sitokin yang disekresi dari jaringan tubuh ke dalam plasma darah, terutama pada fase infeksi akut atau kronis, dan menginduksi respon peradangan transkriptis melalui pencerap IL-6 RA, menginduksi maturasi sel B dan penyerap gp130. <sup>36,37</sup>	Pemeriksaan ELISA ( <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> )	Kadar pg/mL	Numerik

<i>Tumor Necrosing Factor <math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ )	sitokin yang banyak disekresi oleh makrofag dan memiliki banyak peran metabolisme seperti proliferasi sel, differensiasi, apoptosis, metabolisme lipid, dan koagulasi. <sup>63</sup>	Pemeriksaan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	Kadar pg/mL	Numerik
<i>Nuclear factor-kappa B</i> (NF- $\kappa$ B)	kelompok faktor transkripsi yang beranggotakan tujuh senyawa organik yang berperan dalam pertumbuhan kardiovaskular, respon stres, dan peradangan, sistem kekebalan tiruan, sistem kekebalan turunan, apoptosis, dengan mengendalikan ekspresi genetik. <sup>70</sup>	Pemeriksaan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	Kadar ng/dL	Numerik
Pasak Bumi ( <i>Eurycoma longifolia</i> )	Tanaman yang berasal dari family <i>Simaroubaceae</i> yang menjadi salah satu obat herbal di Kalimantan yang digunakan aktivitas terapeutiknya. <sup>53</sup>	Neraca analitik	Kadar mg/kgBB	Numerik

### 3.3.4 Alur Penelitian

1. Tahap pertama adalah membuat hewan model yaitu tikus yang dibuat gagal ginjal.
2. Subjek penelitian adalah tikus berumur 10-14 minggu yang dilakukan 5/6 nefrektomi dengan teknik pembedahan yang dilakukan sesuai prosedur teknik 5/6 nefrektomi.

3. Dilakukan randomisasi dibagi dua kelompok yang terdiri dari:
  - a. Kelompok kontrol yang tidak dilakukan 5/6 nefrektomi.
  - b. Kelompok yang dilakukan 5/6 nefrektomi.
4. Kontrol penelitian adalah kelompok yang tidak dilakukan 5/6 nefrektomi (K).
5. Dilakukan pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan ureum, kreatinin, urine, IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 pada tikus kontrol.
6. Kelompok 5/6 nefrektomi dilakukan randomisasi 3 kelompok terdiri dari:
  - a. Kelompok yang dilakukan pemeriksaan setelah 2 minggu 5/6 nefrektomi (NK)
  - b. Kelompok yang diikuti dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (N0).
  - c. Kelompok yang diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX).
7. Kelompok N0 dan NX antara 6 - 12 minggu setelah 5/6 nefrektomi dilakukan, tikus dikorbankan, dilakukan pemeriksaan ureum, kreatinin, urine, dan kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF23 untuk menilai efek pemberian ekstrak Pasak Bumi.
8. Dilakukan analisis statistik untuk masing-masing hasil pemeriksaan tersebut.



Gambar 3-1 Alur Penelitian

### **3.4 Cara Pemeriksaan**

#### **3.4.1 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Ekstrak Pasak Bumi terstandarisasi *eurycomanone*
2. Darah dari tikus model gagal ginjal jantan dan organ ginjal
3. Tikus putih strain Wistar umur 10-14 minggu
4. *Cutting needle*
5. *Tapper needle*
6. Benang silk 2.0;3.0
7. Betadin
8. Ketamin 50mg/mL
9. Alkohol 70%
10. Spuit 1cc
11. Povidone iodine
12. Kassa steril
13. Kain steril berlubang
14. Pita perekat dan alas operasi
15. Kit Reagen FGF23
16. Kit Reagen IL-6
17. Kit Reagen TNF- $\alpha$
18. Kit Reagen NF- $\kappa$ B

#### **3.4.2 Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:



1. Gunting bengkok
2. Gunting lurus
3. Pinset chirurgis
4. Pinset anatomis
5. Pinset bengkok
6. Needle holder
7. Nierbekken

### **3.4.3 Cara Kerja**

#### **Persiapan Bahan Ekstrak Pasak Bumi**

Ekstrak Pasak Bumi terstandar *Eurycomanone* didapatkan dari Javaplant Indonesia, kemurnian 8% (CoA No. 198/QC/PROD/JVP/18; Batch No.021805/Lot B; *expired date* 2020). Ekstrak terstandar adalah ekstrak tertentu yang memiliki parameter non spesifik dan parameter spesifik. Parameter non spesifik yang dimaksud adalah seperti kadar abu, logam, air, dan cemaran mikroba. Parameter spesifik adalah *eurycomanone* itu sendiri.

Ekstrak terstandar ini menggunakan *Quadran Percolation System* atau empat perkulator 24 jam selama 7 hari. Metode ekstraksi yang digunakan Javaplant adalah *ion exchange*. Pada ekstrak yang digunakan mengandung sebesar 8% kandungan *eurycomanone* yang terdapat dalam Pasak Bumi.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, kandungan *eurycomanone* pada ekstrak Pasak Bumi yang dapat menimbulkan efek anti-inflamasi adalah sebesar 1,3% untuk dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB.<sup>74</sup> Sedangkan pada penelitian ini, digunakan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dan

mengandung kandungan *Eurycomanone* 8%. Sehingga didapatkan perhitungan sebagai berikut :

$$(1,3\% : 8\%) \times 200 \text{ mg/kgBB} = 32,5 \text{ mg/kgBB}$$

Kemudian dihitung untuk dosis pemberian tikus dengan BB 250 gram menjadi 8,125 mg/250gram BB per hari.

### **Persiapan Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Wistar (*rattus norvegicus*) yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus Wistar diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada (FKKMK UGM) Jogjakarta yang telah memiliki sertifikasi mengenai keaslian strain Wistar yang digunakan. Tikus Wistar dipilih dalam penelitian ini dikarenakan data dari penelitian terdahulu yang menggunakan tikus Wistar yang dijadikan gagal ginjal sesuai dengan protokol yang ada.

### **Prosedur Kerja**

Prinsip:

Subtotal nefrektomi adalah prosedur pengambilan ginjal sampai dengan 5/6 bagian. Biasanya dilakukan operasi dalam 2 tahap yaitu tahap pertama adalah operasi 2/3 nefrektomi, kemudian tahap kedua adalah operasi uninefektomi ginjal kontralateral maupun sebaliknya. Biasanya antara operasi tahap pertama diberi jeda waktu 2 minggu untuk memberi waktu pemulihan dari operasi sebelumnya.<sup>66</sup>

### Minggu I (2/3 nefrektomi)

1. Lakukan anestesi dengan menggunakan ketamin secara intramuscular.
2. Tunggu sampai tikus teranestesi secara sempurna
3. Letakkan tikus pada meja operasi dengan posisi tengkurap dengan keempat ekstremitas di fiksasi dengan perekat.
4. Cukur bulu tikus pada regio lumbal (*flank*) yang akan dioperasi (sebelah kanan)
5. Insisi kulit dan peritoneum regio lumbal (*flank*) sepanjang  $\pm 1,5$  cm.
6. Gunakan pinset bengkok untuk mengakses ginjal kanan.
7. Pisahkan *capsula renalis* dengan ginjal.
8. Buat ikatan pada 1/3 polus superior dan 1/3 polus inferior ginjal kanan menggunakan benang silk 3/0.
9. Lakukan insisi pada polus superior dan polus inferior di distal ikatan.
10. Periksa adanya perdarahan dari tempat bekas insisi.
11. Lakukan penjahitan tempat insisi mulai dari peritoneum dan diikuti dengan penjahitan kulit.
12. Beri betadin pada luka operasi.
13. Tunggu tikus sampai sadar dari anestesi dan kembalikan ke kandangnya.

### Minggu III (uninefrektomi)

14. Lakukan anestesi dengan menggunakan ketamin intraperitoneal.
15. Tunggu sampai tikus teranestesi secara sempurna
16. Letakkan tikus pada meja operasi dengan posisi tengkurap dengan keempat

ekstremitas di fiksasi dengan perekat.

17. Cukur bulutikus pada regio lumbal (*flank*) yang akan dioperasi (sebelah kiri).
18. Lakukan insisi kulit dan peritoneum regio lumbal (*flank*) sepanjang  $\pm 1,5$  cm.
19. Gunakan pinset bengkok untuk mengakses ginjal kiri.
20. Pisahkan kapsula renalis dengan ginjal.
21. Ligasi bagian pediculus renalis (pembuluh darah dan ureter) menggunakan silk 3/0.
22. Potong ginjal kanan di distal ikatan.
23. Periksa adanya perdarahan dari tempat bekas potongan ginjal.
24. Pastikan tidak ada perdarahan sebelum melakukan penutupan insisi.
25. Lakukan penjahitan tempat insisi mulai dari peritoneum dan diikuti dengan penjahitan kulit.
26. Beri betadin pada luka operasi.
27. Tunggu tikus sampai sadar dari anestesi kemudian kembalikan ke kandangnya.



Gambar 3-2 Operasi 5/6 nefrektomi untuk pembuatan tikus model gagal ginjal

Pada studi ini dilakukan 5/6 nefrektomi sesuai prosedur yaitu nefrektomi 2/3 ginjal unilateral, ditunggu 2 minggu untuk masa pemulihan. Kemudian dilakukan nefrektomi total pada ginjal kontralateral atau ginjal satunya yang utuh, sehingga tersisa ginjal yang dinefektomi 2/3 atau hanya tersisa 1/6 ginjal dari keseluruhannya. Subjek penelitian ini terdiri 20 ekor tikus Wistar dari strain yang sama, 5 ekor sebagai kontrol normal (sehat) (K), 15 ekor dilakukan nefrektomi dan dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 5 ekor yaitu kelompok sebagai kontrol sebelum pemberian terapi yaitu 2 minggu paska nefrektomi dikorbankan untuk menilai pemeriksaan (NK), kelompok sebagai kontrol tidak diberikan terapi (N0) dan kelompok yang diberikan terapi ekstrak Pasak Bumi (NX).



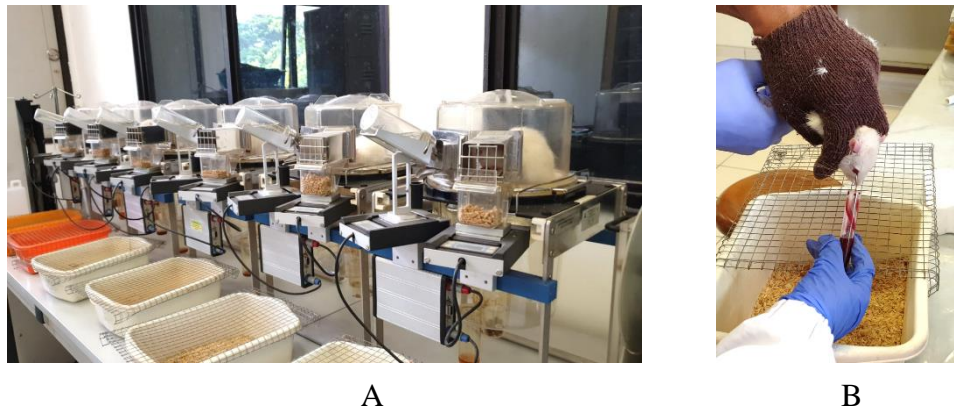
A

B

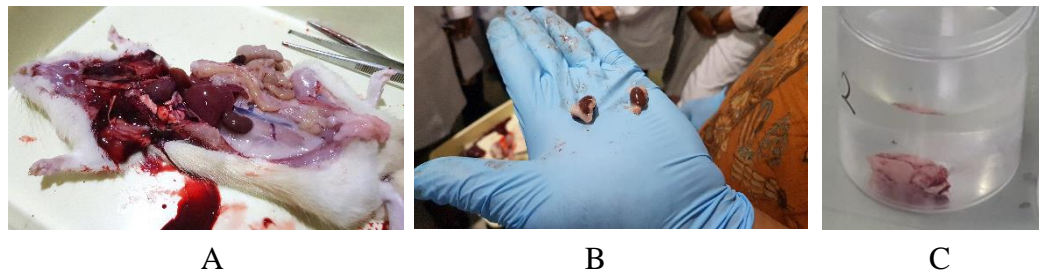
C

Gambar 3-3 A. Pemberian minum, makan dan tempat yang nyaman selama periode penelitian. B. Pengambilan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone*. C. Pemberian ekstrak Pasak Bumi *eurycomanone* lewat sonde.

Pemberian ekstrak Pasak Bumi menggunakan sonde lurus yang dimasukkan lewat mulut masuk ke lambung dan diberikan setiap hari 1 kali dengan waktu yang sama sekitar jam 11.00-13.00 WIB. Dosis ekstrak Pasak Bumi sesuai berat badan tikus saat mau diberikan (Gambar 3-3 B dan C).



Gambar 3-3 A. Tikus dimasukkan ke dalam *Metabolic Cage* untuk mengukur berat badan dan jumlah urin selama 24 jam sebelum dikorbankan. B. Pengambilan sampel darah melalui plexus retroorbitalis



Gambar 3-4 A. Pembedahan mengambil organ ginjal. B. Ginjal tikus. C. Organ ginjal tikus diperiksa PA.

Proses pengorbanan (*euthanasia*) ini dilakukan oleh drh. Nungki Fatimatuzzahra dan dikerjakan di Laboratorium Farmakologi FKMK UGM Yogyakarta. Cara pengorbanan dengan metoda dekapitasi yaitu mematikan tikus dengan menarik atau mematahkan bagian leher setelah diberikan anestesi ketamin

sebelumnya. Ini disebut dengan prosedur dislokasi servikal, yaitu tangan satu memegang bagian kepala bawah dan tangan lain memegang leher bawah, tarik dengan cepat ke arah berlawanan dengan kekuatan cukup sampai berbunyi krek.<sup>75</sup> Dilakukan pembedahan dan pengambilan organ-organ seperti ginjal untuk pemeriksaan PA. Kemudian setelah selesai karkas hewan dibakar di insinerator. Pemeriksaan laboratorium ureum, kreatinin dan albuminuria dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FKKMK UGM dan pemeriksaan PA dilakukan di Patologi Anatomi Kedokteran Hewan UGM. Pemeriksaan ELISA dilakukan di Laboratorium Riset Terpadu FKKMK UGM.

#### **3.4.4 Pemeriksaan Kadar Ureum<sup>76</sup>**

1. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
2. Sampel darah dari tikus dikumpulkan.
3. Tambahkan campuran reaksi dan inkubasi selama 60 menit pada 37°C.
4. Ureum diukur dengan menggunakan metode kuantitatif *microplate reader*.

#### **3.4.5 Pemeriksaan Kadar Kreatinin<sup>77</sup>**

1. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
2. Sampel darah dari tikus dikumpulkan.
3. Tambahkan campuran reaksi dan inkubasi selama 60 menit pada 37°C.
4. Ureum diukur dengan menggunakan metode kuantitatif *microplate reader*.

#### **3.4.6 Pemeriksaan *Interleukin-6 (IL-6)*<sup>78</sup>**

1. Sebelum dilakukan pengerjaan, seimbangkan *working solution* dan substrat

TMB setidaknya 30 menit pada suhu kamar (37°C).

2. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
3. Tambahkan 0,1 ml dari 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, standard solutions ke dalam tabung.
4. Tambahkan 0,1 ml sampel ke dalam tabung kontrol.
5. Tambahkan 0,1 ml sampel serum tikus ke dalam tabung uji sampel.
6. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
7. Lepaskan penutup dan tepuk plate dengan kertas penyerap.
8. Tambahkan 0,1 ml *Working Antibody Solution* yang terdiri dari *Biotinylated Antibody* ke dalam tabung. Tambahkan *solution* di bagian bawah setiap sumur tanpa menyentuh sisi dinding.
9. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
10. Lepaskan penutup, dan cuci 3 kali dengan *wash buffer*.
11. Tambahkan 0,1 ml *SABC Working Solution* ke dalam masing-masing tabung, tutupi dengan penutup dan inkubasi pada 37°C selama 30 menit.
12. Lepaskan penutup dan cuci plate 5 kali dengan *wash buffer*.
13. Tambahkan 90 µl substrat TMB ke dalam masing-masing tabung. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 15-30 menit.
14. Tambahkan 50 µl *Stop Solution* ke masing-masing tabung dan aduk hingga warnanya berubah menjadi kuning.
15. Baca pada 450 nm pada *microplate reader* segera setelah diberikan *Stop Solution*.
16. Lakukan perhitungan hasil.



17. Serum IL-6 diperiksa menggunakan FineTest ELISA Kit yang diproduksi oleh Wuhan Fine Biotech.

### 3.4.7 Pemeriksaan *Tumor Necrosing Factor $\alpha$* (TNF- $\alpha$ )<sup>79</sup>

1. Sebelum dilakukan pengerjaan, seimbangkan *working solution* dan substrat TMB setidaknya 30 menit pada suhu kamar (37°C).
2. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
3. Tambahkan 0,1 ml dari 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml, *standard solutions* ke dalam tabung.
4. Tambahkan 0,1 ml sampel ke dalam tabung kontrol.
5. Tambahkan 0,1 ml sampel serum tikus ke dalam tabung uji sampel.
6. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
7. Tambahkan 0,1 ml *Working Antibody Solution* yang terdiri dari *Biotinylated Antibody* ke dalam tabung. Tambahkan *solution* di bagian bawah setiap sumur tanpa menyentuh sisi dinding.
8. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
9. Lepaskan penutup, dan cuci 3 kali dengan *wash buffer*.
10. Tambahkan 0,1 ml SABC *Working Solution* ke dalam masing-masing tabung, tutupi dengan penutup dan inkubasi pada 37°C selama 30 menit.
11. Lepaskan penutup dan cuci *plate* 5 kali dengan *wash buffer*.
12. Tambahkan 90  $\mu$ l substrat TMB ke dalam masing-masing tabung. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 15-30 menit.
13. Tambahkan 50  $\mu$ l *Stop Solution* ke masing-masing tabung dan aduk hingga

warnanya berubah menjadi kuning.

14. Baca pada 450 nm pada *microplate reader* segera setelah diberikan *Stop Solution*.
15. Lakukan perhitungan hasil.
16. Serum TNF- $\alpha$  diperiksa menggunakan FineTest ELISA Kit yang diproduksi oleh Wuhan Fine Biotech.

#### **3.4.8 Pemeriksaan *Nuclear Factor Kappa B* (NF- $\kappa$ B)<sup>80</sup>**

1. Sebelum dilakukan pengerjaan, seimbangkan *working solution* dan substrat TMB setidaknya 30 menit pada suhu kamar (37°C).
2. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
3. Tambahkan 0,1 ml dari 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3125 ng/ml, *standard solutions* ke dalam tabung.
4. Tambahkan 0,1 ml sampel ke dalam tabung kontrol.
5. Tambahkan 0,1 ml sampel serum tikus ke dalam tabung uji sampel.
6. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
7. Lepaskan penutup dan tepuk *plate* dengan kertas penyerap.
8. Tambahkan 0,1 ml *Working Antibody Solution* yang terdiri dari *Biotinylated Antibody* ke dalam tabung. Tambahkan solution di bagian bawah setiap sumur tanpa menyentuh sisi dinding.
9. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
10. Lepaskan penutup, dan cuci 3 kali dengan *wash buffer*.
11. Tambahkan 0,1 ml SABC *Working Solution* ke dalam masing-masing

tabung, tutupi dengan penutup dan inkubasi pada 37°C selama 30 menit.

12. Lepaskan penutup dan cuci plate 5 kali dengan *wash buffer*.
13. Tambahkan 90 µl substrat TMB ke dalam masing-masing tabung. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 15-30 menit.
14. Tambahkan 50 µl *Stop Solution* ke masing-masing tabung dan aduk hingga warnanya berubah menjadi kuning.
15. Baca pada 450 nm pada *microplate reader* segera setelah diberikan *Stop Solution*.
16. Lakukan perhitungan hasil.
17. Serum NF-κB diperiksa menggunakan FineTest ELISA Kit yang diproduksi oleh Wuhan Fine Biotech.

#### **3.4.9 Pemeriksaan *Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23)*<sup>81</sup>**

1. Sebelum dilakukan pengerjaan, seimbangkan *working solution* dan substrat TMB setidaknya 30 menit pada suhu kamar (37°C).
2. Bekerja pada meja laboratorium dalam keadaan bersih, tidak perlu steril.
3. Tambahkan 0,1 ml dari 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml, *standard solutions* ke dalam tabung.
4. Tambahkan 0,1 ml sampel ke dalam tabung kontrol.
5. Tambahkan 0,1 ml sampel serum tikus ke dalam tabung uji sampel.
6. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
7. Lepaskan penutup dan tepuk *plate* dengan kertas penyerap.

8. Tambahkan 0,1 ml *Working Antibody Solution* yang terdiri dari *Biotinylated Antibody* ke dalam tabung. Tambahkan *solution* di bagian bawah setiap sumur tanpa menyentuh sisi dinding.
9. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
10. Lepaskan penutup, dan cuci 3 kali dengan *wash buffer*.
11. Tambahkan 0,1 ml *SABC Working Solution* ke dalam masing-masing tabung, tutupi dengan penutup dan inkubasi pada 37°C selama 30 menit.
12. Lepaskan penutup dan cuci plate 5 kali dengan *wash buffer*.
13. Tambahkan 90 µl substrat TMB ke dalam masing-masing tabung. Tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 15-30 menit.
14. Tambahkan 50 µl *Stop Solution* ke masing-masing tabung dan aduk hingga warnanya berubah menjadi kuning.
15. Baca pada 450 nm pada *microplate reader* segera setelah diberikan *Stop Solution*.
16. Lakukan perhitungan hasil.
17. Serum FGF23 diperiksa menggunakan FineTest ELISA Kit yang diproduksi oleh Wuhan Fine Biotech.

Untuk membuktikan keberhasilan model tikus gagal ginjal menggunakan teknik 5/6 nefrektomi maka didapatkan hasil peningkatan ureum, kreatinin dan atau albuminuria serta hasil PA yang menunjukkan gambaran gagal ginjal yaitu terjadi fibrosis glomerulus.

### 3.5 Pengolahan dan Analisis Data

#### 3.5.1 Pengolahan Data

Data yang sudah terkumpul diolah secara komputerisasi untuk mengubah data menjadi informasi. Langkah-langkah dalam pengolahan data dimulai dari:

1. *Editing*, yaitu memeriksa kebenaran data yang diperlukan
2. *Coding*, yaitu mengubah data menjadi data angka atau bilangan.
3. *Data entry* yaitu memasukkan data, yakni hasil pemeriksaan dan pengukuran subjek penelitian yang telah di-*coding*, dimasukan ke dalam program komputer.
4. *Cleaning*, yaitu apabila semua data dari subjek penelitian telah selesai dimasukkan, maka perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan-kemungkinan adanya kesalahan-kesalahan kode, ketidaklengkapan, dan sebagainya, kemudian dilakukan koreksi.

#### 3.5.2 Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk rerata. Untuk menilai perbedaan rerata kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan FGF123 dari serum tikus model gagal ginjal menggunakan uji *t test* dan *Mann-Whitney U test* dan perbedaan semua variabel menggunakan ANOVA satu arah dengan post hoc LSD. Perbedaan dianggap bermakna bila  $p < 0,05$  dengan interval kepercayaan 95%. Untuk menilai korelasi antar variabel menggunakan Uji Korelasi uji Pearson dan korelasi Spearman serta regresi linear untuk menilai korelasi antara IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23, dengan kemaknaan  $p < 0,05$ .

### 3.6 Aspek Etik Penelitian

Beberapa aspek etik penelitian terkait dalam penelitian ini, dijelaskan dalam uraian berikut:

Penelitian ini melibatkan subjek binatang dan perlakuan terhadap setiap subjek sesuai standar baku yang berlaku di laboratorium hewan coba departemen Farmakologi. Pendekatan 3R yaitu *reduction, refinement, replacement* tetap diperhatikan selama penelitian untuk mengurangi kerugian etika yang mungkin terjadi selama penelitian. Tikus dipelihara dalam lingkungan yang sesuai dan dilaksanakan dengan tujuan untuk membuat hewan coba terbebas dari rasa sakit, haus, dan lapar serta ketidaknyamanan akibat perlakuan yang diberikan. Jumlah sampel penelitian pun dipilih dengan jumlah seminimal mungkin untuk mengurangi jumlah hewan coba yang harus dieliminasi setelah penelitian berakhir. Penelitian sudah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan dan Kedokteran Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada - RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dengan Ref. No. KE/FK/0800/EC/2019.

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1. Hasil Penelitian**

Didapatkan hasil penelitian dari 20 subyek penelitian yang terbagi dalam 4 kelompok sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Subyek penelitian adalah tikus Wistar dari strain asli yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada (FKKMK UGM) Yogyakarta dan telah memiliki sertifikasi mengenai keaslian strain Wistar yang digunakan. Tikus Wistar dipilih dalam penelitian ini dikarenakan data dari penelitian terdahulu yang menggunakan tikus Wistar yang dijadikan gagal ginjal sesuai dengan protokol yang ada. Terdapat 4 kelompok yaitu kelompok kontrol yaitu tikus yang tidak dilakukan apapun sebagai tikus kontrol normal (K), kelompok tikus yang dinefektomi ditunggu 2 minggu kemudian dikorbankan, sebagai sebelum diberi perlakuan Pasak Bumi (NK), kelompok tikus yang dinefektomi dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi diikuti sampai akhir penelitian (N0) dan kelompok tikus yang dinefektomi kemudian diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX).

##### **4.1.1 Tikus Model Gagal Ginjal**

Pada tikus kelompok K didapatkan hasil semua normal yaitu kadar ureum  $43,69 \pm 0,92$  mg/dL, Kreatinin  $0,81 \pm 0,04$  mg/dL dan albuminuria  $0,60 \pm 0,19$  mg/ml serta

Patologi Anatomi hasilnya tidak ada kelainan patologi anatomi. Kelompok NK yaitu tikus model gagal ginjal 2 minggu setelah mengalami 5/6 nefrektomi, kemudian dilakukan dekapitasi. Kelompok NK sebagai kontrol pada tikus model gagal ginjal sebelum perlakuan pemberian ekstrak Pasak Bumi.

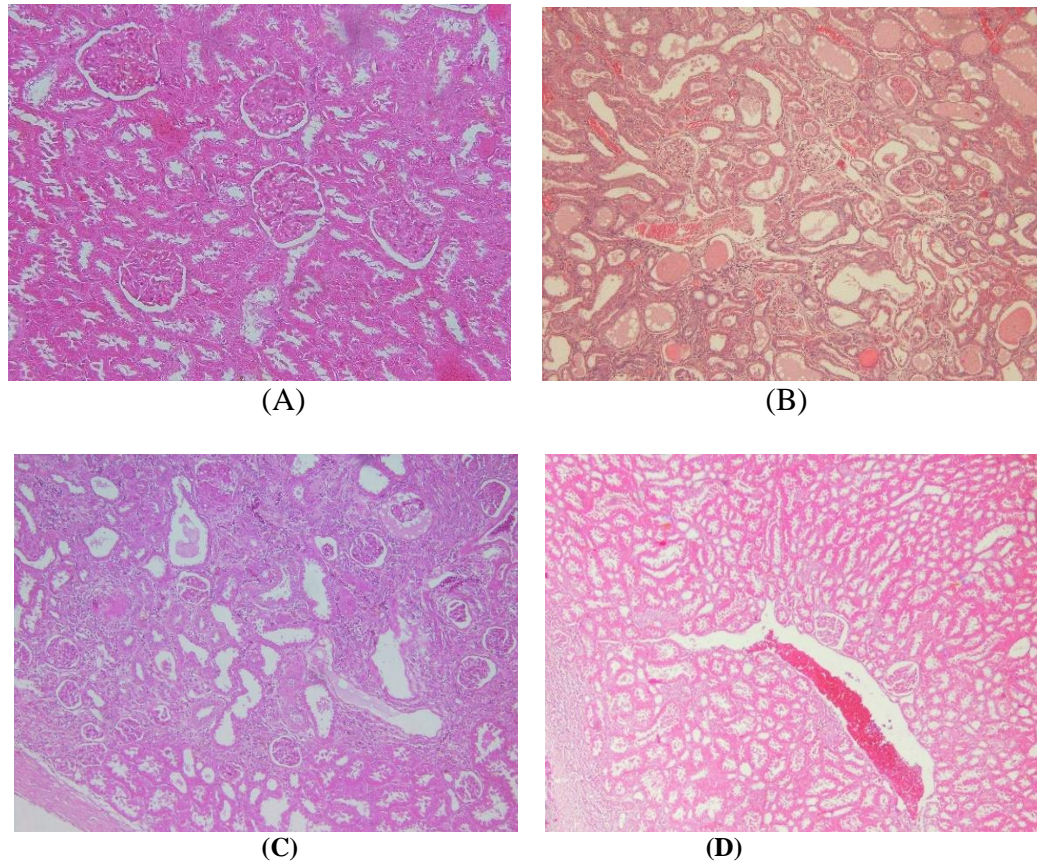
Pada pemeriksaan darah, urin dan Patologi Anatomi ginjal menunjukkan sebagai tikus model gagal ginjal berhasil. Hasilnya dibandingkan dengan kelompok K dan tampak perbedaan yang bermakna. Kadar albuminuria pada tikus positif, berbeda dengan urin manusia yang negatif. Kadar albumin pada urin tikus sekitar 0,5 – 0,8 mg/ml.

**Tabel 4-1 Perbedaan rerata antara Tikus Model Gagal Ginjal dan Kontrol**

Variabel	Rerata $\pm$ SD/SE		p
	Tikus model gagal ginjal (NK)	Tikus Kontrol (K)	
Berat Tikus (gr)	232,73 $\pm$ 19,15	231,98 $\pm$ 21,22	0,955
Volume Urin (mL)	11,75 $\pm$ 1,82	9,20 $\pm$ 1,48	<b>0,041*</b>
Kadar Albumin Urin (mg/24 jam)	7,88 $\pm$ 1,80	5,39 $\pm$ 1,13	<b>0,035*</b>
Kadar Ureum (mg/dL)	45,39 $\pm$ 0,78	43,69 $\pm$ 0,92	<b>0,014*</b>
Kadar Kreatinin (mg/dL)	2,01 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,04	<b>0,000*</b>
Kadar IL-6 (pg/mL)	546,50 $\pm$ 151,22	503,00 $\pm$ 268,38	0,760
Rentang	(399-799)	(179-829)	
Kadar TNF- $\alpha$ (pg/mL)	237,69 $\pm$ 140,50	173,38 $\pm$ 62,29	0,377
Rentang	(83,8-451,5)	(123,8-282,3)	
Kadar NF- $\kappa$ B (ng/dL)	0,57 $\pm$ 0,26	0,60 $\pm$ 0,42	0,904
Rentang	(0,34-0,97)	(0,26-1,29)	
Kadar FGF23 (RU/mL)	174,5 $\pm$ 42,70	88,92 $\pm$ 14,28	<b>0,003*</b>
Rentang	(104,13 $\pm$ 219,41)	(73,58-107,47)	

\*Bermakna menggunakan statistik uji t dengan  $p < 0,05$ . Keterangan SD = standar deviasi, SE = standar error. IL-6 = Interleukin 6, TNF- $\alpha$  = *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$* , NF- $\kappa$ B = *Nuclear factor-kappa B* dan FGF23 = *Fibroblast Growth Hormone 23*.





- Gambar 4-1. Perbandingan hasil Patologi Anatomi Ginjal antara kelompok**
- (A) kontrol: tampak tidak ada kelainan patologis**
  - (B) tikus model gagal ginjal: Fokal radang granulomatosa dengan sentral nekrosis kaseosa. Nekrosis tubuli medulla dan kortek. Dilatasi lumen tubulus dengan akumulasi massa homogen eosinofilik. Infiltrasi limfosit di interstisial tubuli. Membranoproliferasi glomeruli (glomerulosklerosis)**
  - (C) tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan Pasak Bumi: Nekrosis tubuli dikortek dan medula. Infiltrasi limfosit di interstitial tubuli. Dilatasi lumen tubuli dengan akumulasi massa homogen eosinofilik. Membrano prolifearif glomeruli (glomerulosklerosis)**
  - (D) tikus model gagal ginjal diberikan Pasak Bumi: Radang garnulomatosa dengan pusat terlihat potongan dugaan benang yang terkapsulir jaringan ikat. Nekrosis tubuli medula. Dilatasi lumen tubulus dengan akumulasi massa homogen eosinofilik. Infiltrasi limfosit dan neutrofil di interstitial tubuli. Membrano proliferasi glomeruli**

Pada Tabel 4-1 antara tikus model gagal ginjal dengan kontrol tampak terdapat perbedaan rerata lebih tinggi pada kelompok NK yang bermakna secara statistik yaitu

kadar Ureum ( $45,78 \pm 0,90$  vs  $43,69 \pm 0,92$ ;  $p=0,014$ ) dan Kreatinin ( $2,01 \pm 0,18$  vs  $0,81 \pm 0,04$ ;  $p=0,000$ ). Albuminuria yang ditunjukkan dengan kadar Albumin dalam urin 24 jam, juga meningkat bermakna secara statistik ( $7,88 \pm 1,80$  vs  $5,39 \pm 1,13$ ;  $p=0,035$ ). Artinya bahwa pemodelan tikus gagal ginjal menggunakan model 5/6 nefrektomi berhasil, yang ditunjukkan terjadi kenaikan kadar Ureum dan Kreatinin yang bermakna. Jumlah air kencing juga meningkat bermakna pada kelompok NK ( $p=0,041$ ), sedangkan berat badan tidak ada perubahan. Gambaran PA menunjukkan terjadi membrano proliferasi glomeruli (skor glomerulosklerosis/GS 3) baik yang kelompok NK, N0 maupun NX (Gambar 4-1). Jalur patogenesis PGK ditandai oleh fibrosis glomerulus dan atau tubulointerstitial yang progresif, kerusakan kapiler peritubular akibat hipoksia dan hilangnya fungsi nefron akibat sklerosis glomerulus dan atrofi tubular.<sup>24</sup> Jadi hasil PA sudah menunjukkan fibrosis glomerulus sebagai bukti terjadinya PGK.

Kadar penanda inflamasi lebih tinggi pada kelompok NK dibanding K tapi secara statistik tidak bermakna yaitu kadar IL-6 ( $546,50 \pm 151,22$  vs  $503,00 \pm 268,38$ ;  $p=0,377$ ), TNF- $\alpha$  ( $237,69 \pm 140,50$  vs  $173,38 \pm 62,29$ ;  $p=0,760$ ), kecuali kadar FGF23 yang bermakna ( $174,51 \pm 42,70$  vs  $88,92 \pm 14,28$ ;  **$p=0,003$** ) dan pada NF- $\kappa$ B tampak tidak ada perubahan bahkan turun sedikit ( $0,57 \pm 0,26$  vs  $0,60 \pm 0,42$ ;  $p=0,904$ ).

#### 4.1.2 Pengaruh pemberian ekstrak Pasak Bumi terhadap tikus model gagal ginjal

Ekstrak Pasak Bumi yang digunakan adalah *Eurycomanone* yang sudah terstandarisasi dengan kemurnian 8% dari Java Plant (CoA No. 198/QC/PROD/JVP/18; Batch No.021805/Lot B; *expired date* 2020). Kelompok yang dilakukan nefrektomi dibagi 2 secara random yaitu kelompok yang diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX) dan kelompok kontrol positif yang tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (N0).

**Tabel 4-2** Perbedaan rerata antara Kelompok Tikus Model Gagal Ginjal paska nefrektomi 2 minggu dikorbankan dan sesudah diberikan Ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*)

Variabel	Rerata $\pm$ SD/(SE)		P
	Nefrektomi 2 minggu dikorbankan (NK)	Sesudah diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX)	
Berat Tikus (gr)	240,95 $\pm$ 19,15	318,72 $\pm$ 22,97	<b>0,001*</b>
Volume Urin (mL)	11,75 $\pm$ 1,82	14,20 $\pm$ 4,66	0,322
Kadar Albumin Urin (mg/24 jam)	7,88 $\pm$ 1,80	6,50 $\pm$ 2,67	0,642
Kadar Ureum (mg/dL)	45,39 $\pm$ 0,78	46,91 $\pm$ 3,89	0,436
Kadar Kreatinin (mg/dL)	2,01 $\pm$ 0,18	1,48 $\pm$ 0,24	0,095
Kadar IL-6 (pg/mL)	546,50 $\pm$ 151,22	399,00 $\pm$ 200,87	0,226
Rentang	(399-799)	(229-739)	
Kadar TNF- $\alpha$ (pg/mL)	237,69 $\pm$ 140,50	149,54 $\pm$ 37,08	0,212
Rentang	(83,8-451,5)	(93,8-187,7)	
Kadar NF- $\kappa$ B (ng/dL)	0,57 $\pm$ 0,26	0,74 $\pm$ 0,47	0,497
Rentang	(0,34-0,97)	(0,34-1,49)	
Kadar FGF23 (RU/mL)	174,5 $\pm$ 42,70	201,20 $\pm$ 48,27	0,382
Rentang	(104,13 $\pm$ 219,41)	(144,70-247,60)	

\*Bermakna menggunakan statistik uji t dengan  $p < 0,05$ . Keterangan SD = standar deviasi, SE = standar error. IL-6 = Interleukin 6, TNF- $\alpha$  = *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$* , NF- $\kappa$ B = *Nuclear factor-kappa B* dan FGF23 = *Fibroblast Growth Hormone 23*.

Pada Tabel 4-2 tampak variabel antara kelompok NK dan NX tidak berbeda bermakna secara statistik kecuali berat badan. Terjadi penurunan pada kelompok NX

untuk kadar Albuminuria, Kreatinin, IL-6 dan TNF- $\alpha$ , tapi secara statistik belum tampak kemaknaan. Volume urin, kadar Ureum, NF- $\kappa$ B dan FGF23 malah terjadi peningkatan, tapi juga tidak bermakna secara statistik, kecuali berat badan tikus terjadi peningkatan pada kelompok NX yang bermakna secara statistik ( $232,73 \pm 22,12$  vs  $318,72 \pm 22,97$ ;  $p= 0,001$ ). Artinya terdapat perubahan berat badan bertambah pada tikus yang sesudah diterapi.

**Tabel 4-3 Perbedaan rerata antara Kelompok Tikus Model Gagal Ginjal yang tidak dan diberikan Ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*)**

Variabel	Rerata $\pm$ SD/(SE)		P
	Tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (N0)	Diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX)	
Berat Tikus (gr)	$321,84 \pm 19,17$	$318,72 \pm 22,97$	0,821
Volume Urin (mL)	$15,20 \pm 7,27$	$14,20 \pm 4,66$	0,802
Kadar Albumin Urin (mg/24 jam)	$5,97 \pm 4,20$	$6,50 \pm 5,97$	0,875
Kadar Ureum (mg/dL)	$34,78 \pm 1,87$	$46,91 \pm 3,89$	<b>0,000*</b>
Kadar Kreatinin (mg/dL)	$1,11 \pm 0,28$	$1,48 \pm 0,54$	0,204
Kadar IL-6 (pg/mL)	$437,00 \pm 181,02$	$399,00 \pm 200,87$	0,761
Rentang	(169-579)	(229-739)	
Kadar TNF- $\alpha$ (pg/mL)	$157,38 \pm 47,11$	$149,54 \pm 37,08$	0,777
Rentang	(113,8-234,6)	(93,8-187,7)	
Kadar NF- $\kappa$ B (ng/dL)	$0,70 \pm 0,56$	$0,74 \pm 0,47$	0,905
Rentang	(0,41-1,70)	(0,34-1,49)	
Kadar FGF23 (RU/mL)	$189,56 \pm 43,28$	$201,20 \pm 48,27$	0,699
Rentang	(139,69-244,69)	(144,70-247,60)	

\*Bermakna menggunakan statistik uji t dengan  $p < 0,05$ . Keterangan SD = standar deviasi, SE = standar eror. IL-6 = Interleukin 6, TNF- $\alpha$  = *Tumor Necrosing Factor  $\alpha$* , NF- $\kappa$ B = *Nuclear Factor-kappa B* dan FGF23 = *Fibroblast Growth Hormone 23*.

Pada Tabel 4-3 tampak perbedaan rerata antara kelompok tikus model gagal ginjal yang diikuti tanpa diberi perlakuan ekstrak Pasak Bumi (N0) dan diberi

perlakuan ekstrak Pasak Bumi (NX). Semua variabel berbeda tidak bermakna kecuali kadar Ureum bermakna secara statistik lebih tinggi pada kelompok yang diberikan ekstrak Pasak Bumi dibanding yang tidak ( $34,78 \pm 1,87$  vs  $46,91 \pm 3,89$ ;  $p = 0,000$ ).

### 4.3 Korelasi Penanda Inflamasi

**Tabel 4-4 Korelasi antara kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  pada tikus kontrol dan model gagal ginjal tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi**

Variabel		Subyek	
		K	N0
IL-6	TNF- $\alpha$	$r = 0,900$ $p = 0,037$	$r = 0,600$ $p = 0,285$

\*Data disajikan dalam median dan *interquartile range*. Uji kemaknaan menggunakan tes Spearman dengan dua arah.

Pada tabel 4-4 menunjukkan adanya korelasi penanda inflamasi yang tampak pada kelompok kontrol yaitu IL-6 dan TNF- $\alpha$  ( $r = 0,900$ ;  $p = 0,037$ ), meskipun hubungan ini lemah. Sedangkan pada kelompok tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan Pasak Bumi, hubungan ini tidak bermakna ( $r = 0,600$ ;  $p = 0,285$ ).

Tabel 4-5 menunjukkan korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada tikus kontrol (K) dengan menggunakan uji statistik korelasi Univariat & Multivariat Spearman dengan hasil semua tidak bermakna. Artinya secara statistik ketiga penanda inflamasi ini tidak berkorelasi bermakna terhadap kadar FGF23 baik masing-masing secara langsung IL-6 ( $p = 0,298$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,206$ ) dan NF- $\kappa$ B ( $p = 0,199$ ) maupun bersama-sama ( $r^2 = 0,909$ ;  $p = 0,378$ ) pada tikus kontrol, tapi

mempunyai koefisien korelasi dan koefisien determinan yang tinggi ( $r > 0,9$ ). Artinya perubahan yang terjadi pada kadar FGF23 dipengaruhi lebih dari 90% oleh kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B.

**Tabel 4-5 Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus kontrol**

Variabel	FGF23	Nilai
	Nilai p	
IL-6	0,298	<b>r = 0,953</b>
TNF- $\alpha$	0,206	<b>r<sup>2</sup> = 0,909</b>
NF- $\kappa$ B	0,199	<b>p = 0,378</b>

\*Uji korelasi univariat dan multivariat Spearman.

**Tabel 4-6 Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi**

Variabel	FGF23	Nilai
	Nilai p	
IL-6	0,626	<b>r = 0,635</b>
TNF- $\alpha$	0,991	<b>r<sup>2</sup> = 0,403</b>
NF- $\kappa$ B	0,633	<b>p = 0,874</b>

\*Uji korelasi univariat dan multivariat Spearman.

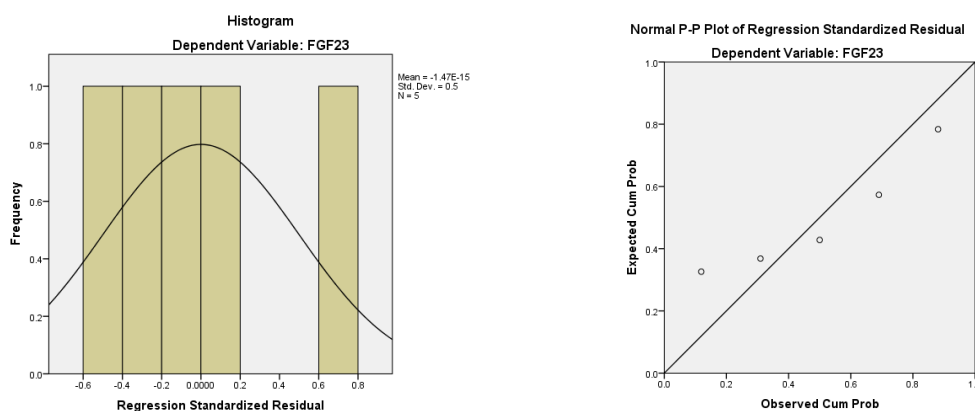
Tabel 4-6 menunjukkan korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (N0). Uji statistik menggunakan uji korelasi Univariat dan Multivariat Spearman dengan hasil semua tidak bermakna. Artinya ketiga penanda ini secara statistik tidak berkorelasi bermakna terhadap kadar FGF23 baik masing-masing IL-6 ( $p = 0,626$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,991$ ) dan NF- $\kappa$ B ( $p = 0,633$ ) maupun bersama-sama ( $r^2 = 0,403$ ;  $p = 0,874$ )

pada tikus model gagal ginjal yang tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi.

**Tabel 4-7 Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi**

Variabel	FGF23	
	Nilai p	Nilai
IL-6	0,558	<b>r = 0,952</b>
TNF- $\alpha$	0,270	<b>r<sup>2</sup> = 0,907</b>
NF- $\kappa$ B	0,251	<b>p = 0,383</b>

\*Uji korelasi univariat dan multivariat Spearman.



**Gambar 4-2 Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi**

Tabel 4-7 menunjukkan korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23 pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi (NX) dengan hasil semua tidak bermakna. Artinya ketiga penanda ini tidak berkorelasi bermakna secara statistik dalam memengaruhi kadar FGF23 baik masing-masing secara langsung IL-6 (p= 0,558), TNF- $\alpha$  (p= 0,270) dan NF- $\kappa$ B (p=0,251) maupun bersama-sama (r<sup>2</sup>=

0,907;  $p=0,383$ ) pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi, mempunyai koefisien korelasi dan koefisien determinan yang tinggi ( $>0,9$ ).

#### **4.4 Pengujian Hipotesis**

##### **Hipotesis 1**

Terdapat perbedaan rerata kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.

Hasil yang mendukung: tidak ada

Hasil yang tidak mendukung:

Tidak terdapat perbedaan bermakna rerata kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan dibandingkan sebelum perlakuan dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*, dengan perbedaan rerata  $399,00 \pm 200,87$  vs.  $546,50 \pm 151,22$  dan  $437,00 \pm 181,02$  (Tabel 4-2 dan 4-3).

Simpulan:

Hipotesis 1 teruji dan ditolak.

##### **Hipotesis 2**

Terdapat perbedaan rerata kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.

Hasil yang mendukung: tidak ada

Hasil yang tidak mendukung:



Tidak terdapat perbedaan bermakna rerata kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan dibandingkan sebelum perlakuan dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*, dengan perbedaan rerata  $149,54 \pm 37,09$  vs.  $237,69 \pm 140,50$  dan  $157,56 \pm 47,11$  (Tabel 4-2 dan 4-3)

Simpulan:

Hipotesis 2 teruji dan ditolak.

**Hipotesis 3**

Terdapat perbedaan rerata kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.

Hasil yang mendukung: tidak ada

Hasil yang tidak mendukung:

Tidak terdapat perbedaan bermakna rerata kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan dibandingkan sebelum perlakuan dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*, dengan perbedaan rerata  $0,74 \pm 0,47$  vs.  $0,57 \pm 0,15$  dan  $0,70 \pm 0,56$  (Tabel 4-2 dan 4-3).

Simpulan:

Hipotesis 3 teruji dan ditolak.

**Hipotesis 4**

Terdapat perbedaan rerata kadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.

Hasil yang mendukung: tidak ada

Hasil yang tidak mendukung:

Tidak terdapat perbedaan bermakna rerata kadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang diberikan dibandingkan sebelum perlakuan dan tidak diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*, dengan perbedaan rerata  $201,20 \pm 48,27$  vs.  $174,51 \pm 42,70$  dan  $189,56 \pm 43,28$  (Tabel 4-2 dan 4-3).

Simpulan:

Hipotesis 4 teruji dan ditolak.

### **Hipotesis 5**

Terdapat korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B terhadap kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

Hasil yang mendukung: tidak ada

Hasil yang tidak mendukung:

Tidak terdapat korelasi yang tidak bermakna antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada kelompok tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*, dengan ( $r^2 = 0,403$ ;  $p = 0,874$ ) dan  $r^2 = 0,907$ ;  $p = 0,383$  (Tabel 4-7 dan 4-8).

Simpulan:

Hipotesis 5 teruji dan ditolak.

#### 4.5 Pembahasan

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penyakit kronis yang sampai saat ini masih menjadi masalah besar dan mempunyai prevalensi cukup tinggi di dunia, sekitar 5-10%.<sup>1,82</sup> Saat ini modalitas untuk penatalaksanaan PGK hanya terbatas mencegah progresivitas penyakit dan terapi pengganti ginjal pada keadaan stadium 5 yaitu hemodialisis dan cangkok ginjal. Biaya yang dikeluarkan untuk PGK saat ini yang terbanyak menggunakan dana Jaminan Kesehatan Nasional di Indonesia.<sup>3</sup> Untuk itu perlu modalitas lain untuk mencegah progresivitas yang terjadi pada PGK.

Banyak faktor yang memengaruhi terjadinya progresivitas pada PGK. Salah satu faktor adalah proses inflamasi. Proses inflamasi dapat mempercepat progresivitas PGK bahkan dapat menyebabkan kematian.<sup>10-12</sup> Faktor inflamasi juga merupakan prediktor mortalitas yang independen pada pasien PGK.<sup>23</sup> Inflamasi yang semakin meningkat diakui berperan dalam proses patofisiologis ini.<sup>24</sup> Potensi beberapa sitokin dan kemokin sebagai biomarker juga ditekankan sebagai perkembangan terjadinya PGK.<sup>22</sup> Beberapa mediator yang berperan dalam proses ini seperti TNF- $\alpha$  yang akan memacu apoptosis dan kehilangan nefron atau NF- $\kappa$ B yang dapat mengaktivasi T limfosit sehingga memicu transformasi epitel-mesenkimal sehingga peningkatan *Growth Factors* sampai terjadi fibrosis.<sup>25</sup> Selain itu IL-6 dan TNF- $\alpha$  merupakan sitokin proinflamasi yang dikaitkan dengan patofisiologi penyakit ginjal.<sup>28</sup> Interleukin merupakan sitokin yang bekerja pada leukosit lain yang terlibat dalam respon antigen dan presentasi, terutama oleh limfosit *T-helper* serta mengontrol lalu lintas dasar dan

inflamasi leukosit melalui kemotaksis.<sup>30</sup> Jalur sinyal yang diaktifkan oleh banyak sitokin meningkatkan faktor penguat (NF- $\kappa$ B), faktor transkripsi yang selanjutnya mendorong fenotip proinflamasi. Ekspresi dan atau aktivasi NF- $\kappa$ B, meningkat di ginjal pada pasien glomerulonefritis, nefropati diabetik, dan AKI. Salah satu konsekuensi dari siklus inflamasi ini adalah mendorong pengembangan stres oksidatif lokal yang meningkatkan cedera ginjal dan mengganggu fungsi tubular dan hemodinamik ginjal. Perubahan hemodinamik ginjal akibat sitokin inflamasi umum yang pada akhirnya dapat meningkatkan cedera ginjal.<sup>32</sup> Proses fibrosis pada PGK salah satunya dipengaruhi peningkatan kadar FGF23 yang bahkan bersifat independen. Inflamasi merangsang peningkatan FGF23 akibat dari efek resorptif pada tulang sebagai efek inflamasi, dan dapat merangsang produksi FGF23.<sup>52</sup>

Peningkatan kadar FGF23 terkait dengan IL-6 dan TNF- $\alpha$ .<sup>9</sup> Hubungan itu terlepas dari fungsi ginjal, metabolisme mineral yang diukur, dan faktor lain yang diketahui terkait dengan inflamasi. Selanjutnya, di antara metabolit mineral yang diuji, FGF23 sangat berkorelasi kuat dengan masing-masing penanda inflamasi.<sup>9</sup> Modulasi respon imun-inflamasi bisa menjadi target pengobatan PGK.<sup>22</sup> Salah satu bahan alami yang mempunyai efek antiinflamasi dan banyak ditemukan di Pulau Kalimantan adalah Pasak Bumi.<sup>14</sup> Pasak Bumi mengandung *Nitric Oxide* (NO) yang tinggi dan terbukti dapat menghambat mediator inflamasi IL-6 dan TNF- $\alpha$ .<sup>53</sup> Pasak Bumi juga dapat menurunkan TNF- $\alpha$  dan IL-6 pada *plasmodium berghei* secara *in vivo*.<sup>69</sup> Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi memiliki efek penghambatan NF- $\kappa$ B yang poten.<sup>16</sup> Jadi

pada studi ini untuk menilai efek penghambatan atau sebagai antiinflamasi dari Pasak Bumi terhadap mediator-mediator inflamasi tersebut yang diharapkan menekan ekspresi FGF23 pada tikus model gagal ginjal. Pada studi ini untuk menilai hubungan faktor-faktor inflamasi tersebut yaitu IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B terhadap FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

#### **4.5.1 Hewan Model Gagal Ginjal**

Studi ini menggunakan hewan model yaitu tikus. Penggunaan hewan model telah menjadi komponen penting dari penelitian medis untuk menggambarkan mekanisme dan menguji kemungkinan intervensi pada penyakit manusia termasuk penyakit ginjal kronis. Penyakit ginjal kronis terjadi akibat cedera berulang atau progresif pada glomeruli, tubulus, interstitium, dan/atau pembuluh darah. Untuk mempelajari patogenesis, mekanisme dan efek intervensi, banyak hewan model telah dikembangkan, termasuk model spontan, genetik, dan induksi. Salah satu model gagal ginjal yang sering digunakan pada hewan untuk menggambarkan penyakit gagal ginjal kronis adalah 5/6 nefrektomi.<sup>18</sup> Hewan model 5/6 nefrektomi telah menjadi model yang banyak digunakan untuk mempelajari glomerulosklerosis. Kelebihan dari model ini adalah pembacaan fungsional yang kuat (seperti proteinuria, LFG, dan hipertensi sekunder), induksi yang baik pada hewan pengerat, dan perbandingan dengan ginjal yang diinduksi cedera. Model ini sangat spesifik untuk tikus.<sup>18</sup> Inilah alasan dilakukan studi ini pada hewan model tikus. Berdasarkan literatur yang ada bahwa teknik 5/6

nefrektomi sangat mendekati sebagai model gagal ginjal karena terjadi glomerulosklerosis yang sangat mirip dengan penyakit ginjal kronik.<sup>83,84</sup>

Pengamatan dilakukan 2 minggu setelah 5/6 nefrektomi sesuai kepustakaan yang ada bahwa terlihat gagal ginjal dimulai 2 minggu dengan peningkatan proteinuria sebagai awal hipertrofi glomerular selama fase akut (0-4 minggu).<sup>18</sup> Kondisi ini terlihat dari hasil penelitian dimana setelah 2 minggu pada kelompok NK, kadar Albuminuria meningkat dibandingkan kelompok normal (K), perbedaan ini bermakna secara statistik ( $p=0,035$ ) (Tabel 4-1). Peningkatan kadar albuminuria terjadi sebagai manifestasi kegagalan ginjal meresorpsi albumin. Batas normal albuminuria yaitu 0,5 – 0,8 mg/mL dengan urin normal per 24 jam sekitar 10 mL, maka kadar Albuminuria normal sekitar 5 – 8 mg/24 jam.<sup>85</sup> Pada tikus jantan, terjadinya albuminuria normal dengan kisaran tersebut, berbeda dengan pada manusia sehat yang negatif atau tidak ditemukan albuminuria. Tikus model gagal ginjal pada penelitian ini juga menunjukkan peningkatan kadar Ureum yang bermakna dibanding normal ( $p=0,014$ ) (Tabel 4-1). Selain itu juga terjadi peningkatan kadar Kreatinin yang bermakna pada kelompok NK ( $p=0,000$ ). Peningkatan kadar Albuminuria, Ureum dan Kreatinin menunjukkan terjadinya penurunan fungsi ginjal pada tikus model gagal ginjal dengan teknik 5/6 nefrektomi. Hasil ini juga dikonfirmasi dengan pemeriksaan PA (Patologi Anatomi) pada tikus model gagal ginjal yang terjadi membranoproliferasi glomeruli dengan *Glomerulosclerosis Score* (GS) 1 dan 3 dibanding tikus normal yang tidak ada kelainan patologis (Gambar 4-1). Hal ini membuktikan bahwa pembuatan model tikus

gagal ginjal dengan 5/6 nefrektomi berhasil sesuai dengan tujuan penelitian dan literatur.<sup>18,83,84</sup>

Tampak berat badan lebih besar dibanding kontrol karena terjadi penumpukan cairan dan secara klinis juga terlihat tikus model gagal ginjal lebih gemuk (Tabel 4-1). Hal ini karena penumpukan cairan (udem). Perbedaan berat badan pada kelompok tikus model gagal ginjal yang diikuti selama penelitian bermakna lebih berat dibanding normal atau yang 2 minggu setelah nefrektomi.

Pasak Bumi mempunyai peran sebagai antiinflamasi. Salah satu kandungan dalam Pasak Bumi yang mempunyai efek antiinflamasi yang poten adalah *eurycomanone*. Penelitian ini menggunakan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone*. Ekstrak terstandar *eurycomanone* adalah ekstrak yang sudah terstandarisasi kadar *eurycomanone* dan sudah tidak mengandung kadar lain seperti kadar abu, logam, air, dan cemaran mikroba. Ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* yang digunakan pada penelitian ini dari Javaplant Indonesia, kemurnian 8% (CoA No. 198/QC/PROD/JVP/18; Batch No.021805/Lot B; *expired date* 2020). *Eurycomanone* adalah kandungan quassinoid yang ditemukan pada ekstrak *Eurycoma longifolia* (Pasak Bumi) yang paling banyak ditemukan pada ekstrak akar tersebut sekitar 28,6 mg/g. *Eurycomanone* dilaporkan dapat mengatur jalur persinyalan yang terlibat pada proses proliferasi, kematian sel, dan inflamasi atau peradangan.<sup>74</sup>

Selain itu kadar Ureum berbeda bermakna antara tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* lebih tinggi dibanding yang

tidak. Sehubungan dengan semakin banyak ginjal yang rusak maka Ureum juga meningkat. Peningkatan Ureum terjadi pada kelompok yang diberikan Pasak Bumi. Sangat mungkin terjadi yang diberikan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* mempunyai efek meningkatkan nafsu makan<sup>86</sup> sehingga sisa metabolisme nya juga lebih banyak (Ureum). Tapi kondisi ini mungkin tidak sesuai karena pada tikus yang diberikan Pasak Bumi tidak terjadi peningkatan berat badan dibanding yang tidak. Hal yang mungkin terjadi adalah Pasak Bumi dapat berefek menurunkan inflamasi melalui jalur *cyclooxygenase 2* (COX 2), penurunan sintesis nitrit oksida, prostaglandin turun, terjadi vasokonstriksi pembuluh darah termasuk terjadi iskemik di ginjal sehingga dapat menurunkan aliran darah ke glomerulus dan semakin menurunkan fungsi ginjal yang ditandai peningkatan ureum.<sup>87</sup>

#### **4.5.2 Perbedaan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$ terhadap Pemberian Pasak Bumi**

Kadar penanda inflamasi pada penelitian ini adalah IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang terjadi peningkatan pada tikus model gagal ginjal dibanding tikus normal tapi peningkatan ini belum bermakna ( $p=0,789$  dan  $p=0,437$ ) (Tabel 4-1). Hasil ini menunjukkan bahwa pada gagal ginjal terjadi peningkatan penanda inflamasi IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang dikaitkan dengan patofisiologi penyakit ginjal.<sup>27</sup> Peningkatan mediator-mediator inflamasi ini dapat mempercepat perburukan penyakit ginjal. Pada tikus model gagal ginjal terjadi proses inflamasi yang disebabkan karena fungsi ginjal yang menurun bukan akibat perlakuan nefrektomi. Hal ini sesuai kepustakaan sebelumnya



yang menyatakan bahwa setelah lebih 1 minggu efek paska operasi sudah minimal, puncak stres 3 hari paska operasi.<sup>18,83</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan terjadi penurunan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* tapi belum bermakna secara statistik (Tabel 4-3). Efek antiinflamasi ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dalam menurunkan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  belum bermakna pada kondisi tikus model gagal ginjal tersebut. Pasak Bumi mengandung *Nitric Oxide* (NO) yang tinggi. Kadar NO yang terdapat pada Pasak Bumi terbukti dapat menghambat IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang merupakan mediator inflamasi.<sup>53</sup> Pada gagal ginjal terjadi pengurangan NO dan peningkatan ROS (*reactive oxygen species*), dimana ROS dapat menurunkan aktivitas NO.<sup>88</sup> Jadi meskipun Pasak Bumi mengandung NO yang tinggi tapi pada keadaan ini sangat mungkin kadar ROS juga tinggi dapat menginaktivasi NO sehingga penghambatan IL-6 dan TNF- $\alpha$  oleh Pasak Bumi tidak bermakna. Pada tahun 2011, Purwantiningsih et al menyelidiki aktivitas radikal bebas *scavenger* yang berasal dari ekstrak etanolik pada Pasak Bumi berhubungan dengan kandungan fenolik total dan flavonoid. Hasil penelitian ini didapatkan aktivitas radikal bebas pada Pasak Bumi lebih rendah dari aktivitas radikal bebas pada asam askorbat yang merupakan standar antioksidan atau radikal bebas.<sup>58</sup> Hal ini juga yang mungkin mendasari meskipun efek anti radikal bebas dari Pasak Bumi lebih tinggi dari asam askorbat tapi pada kondisi gagal ginjal efek tersebut masih belum mampu menekan

inflamasi secara bermakna. Keterbatasannya tidak ada data kadar radikal bebas pada tikus model gagal ginjal pada studi ini.

Pada penelitian lain efek Pasak Bumi dapat menurunkan IL-6 dan TNF- $\alpha$  pada *plasmodium berghei* secara *in vivo*.<sup>69</sup> Hal ini mirip dengan efek pemberian Curcumin pada tikus model gagal ginjal dengan teknik I/R (*ischemia/reperfusion*), juga terjadi penurunan IL-6 dan TNF- $\alpha$ .<sup>89</sup> Pada penelitian ini Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terbukti sebagai antiinflamasi mampu menurunkan IL-6 dan TNF- $\alpha$  meski belum bermakna secara statistik pada tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi. Artinya pemberian Pasak Bumi pada gagal ginjal mempunyai efek menekan proses inflamasi. Mungkin bila diberikan pada gagal ginjal tahap awal efek antiinflamasinya lebih baik dan mungkin dapat memperlambat progresivitas akibat inflamasi.

#### **4.5.3 Perbedaan kadar NF- $\kappa$ B terhadap Pemberian Pasak Bumi**

Pada studi ini tampak tidak terjadi peningkatan NF- $\kappa$ B pada tikus model gagal ginjal dibanding normal ( $0,57 \pm 0,15$  vs  $0,60 \pm 0,19$ ;  $p= 0,916$ ) (Tabel 4-1). Hasil ini berbeda dengan sebelumnya dimana terjadi peningkatan NF- $\kappa$ B yang berhubungan dengan inflamasi, kekebalan, apoptosis, proliferasi dan diferensiasi sel. Terjadi aktivasi NF- $\kappa$ B secara *in vivo* dan *in vitro* pada sel glomerular intrinsik seperti podosit dan mesangial, tubular, dan sel endothelial pada gagal ginjal atau setelah terpapar rangsangan inflamasi.<sup>41</sup> Penghambatan NF- $\kappa$ B dapat menyebabkan penurunan ekspresi COX-2, penghambatan enzim yang terlibat dalam biosintesis inflamasi dan

menginduksi nitrit oksid. Pada pemberian penghambat p38-spesifik SB203580 menghambat aktivasi p38, secara signifikan mengurangi aktivasi NF- $\kappa$ B dan menekan sintesis COX-2.<sup>90</sup>

Penelitian sebelumnya menunjukkan penghambatan jalur aktivasi NF- $\kappa$ B pada pemberian Pasak Bumi.<sup>15,16,91</sup> Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B terdiri dari p65, RelB, C-Rel, p52, dan p50, yang berperan dalam peradangan, respon imun dan kematian sel.<sup>92</sup> Adanya rangsangan dari sitokin dapat menyebabkan NF- $\kappa$ B terdegradasi sehingga terjadi pelepasan NF- $\kappa$ B yang terikat oleh promotor seperti TNF, IL dan COX-2.<sup>41</sup> Penghambatan NF- $\kappa$ B menyebabkan penghambatan inflamasi dan rasa nyeri.<sup>90</sup> Meskipun banyak obat saat ini secara umum mempengaruhi aktivasi NF- $\kappa$ B, tidak ada data mengenai penghambatan NF- $\kappa$ B spesifik pada penyakit ginjal manusia.<sup>41</sup> Pada keadaan gagal ginjal selama resolusi, NF- $\kappa$ B menurunkan regulasi gen inflamasi, mengatur gen anti-inflamasi, dan menginduksi apoptosis leukosit.<sup>92</sup> Pasak Bumi mampu menghambat NF- $\kappa$ B dengan baik dan poten.<sup>16</sup> Aktivasi sistem NF- $\kappa$ B memainkan peran penting dalam patogenesis cedera ginjal pada tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi.<sup>93</sup> Penghambat NF- $\kappa$ B mempunyai efek salah satunya mengurangi stres oksidatif pada sistem NF- $\kappa$ B. Pemberian penghambat sistem NF- $\kappa$ B ini mungkin merupakan strategi baru untuk mencegah perkembangan penyakit ginjal kronis.<sup>93</sup> Pemberian Pasak Bumi yang mempunyai efek poten menghambat NF- $\kappa$ B pada keadaan tidak gagal ginjal, sedangkan pada gagal ginjal tidak terjadi seperti pada studi ini tikus model gagal ginjal.

Peningkatan aktivitas sistem NF- $\kappa$ B dilaporkan terutama pada area interstitial, sedangkan perbaikan proteinuria dan kerusakan struktur ginjal dikaitkan dengan penurunan aktivitas sistem NF- $\kappa$ B.<sup>94</sup> Salah satu antiinflamasi alami yang banyak diteliti yaitu *curcumin*. Terapi *curcumin* menunjukkan efek perlindungan pada cedera I/R ginjal terkait dengan penekanan inflamasi yang dimediasi NF- $\kappa$ B melalui jalur sinyal JAK2/STAT3.<sup>89</sup> Mungkin jalur yang berbeda dengan efek Pasak Bumi pada pemberian *curcumin* ini dan juga teknik pembuatan model gagal ginjalnya berbeda, sehingga hasil studi ini berbeda. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah pengatur utama beberapa jalur pro-inflamasi. Pasak Bumi menginaktivasi NF- $\kappa$ B melalui jalur siklooksigenase-2 yaitu pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 dan sintesis nitrit oksida diinduksi.<sup>15</sup>

#### **4.5.4 Perbedaan kadar FGF23 terhadap Pemberian Pasak Bumi**

Kadar FGF23 terjadi peningkatan yang bermakna pada tikus model gagal ginjal dibanding kontrol normal ( $p=0,003$ ) (Tabel 4-1). Sampai saat ini mekanisme kenaikan kadar FGF23 serum pada PGK masih belum jelas. Hal ini berhubungan dengan respon awal inflamasi dan akibat retensi fosfat serta aksi dari ginjal untuk memperkuat pengeluaran fosfat dan mencegah hiperfosfatemia.<sup>47</sup> Sangat mungkin peningkatan FGF23 berhubungan dengan penurunan filtrasi glomerulus yang cepat dibuktikan dengan peningkatan kreatinin yang bermakna juga pada penelitian ini. Studi lain menyatakan peningkatan kadar FGF23 yang tinggi pada pasien PGK yang HD dan PD

rutin bahkan sampai 1000 kali lipat.<sup>95,96</sup> Penelitian lain menunjukkan pada tikus yang dilakukan obstruksi terjadi peningkatan kadar FGF23 karena perlukaan tubulus tersebut memicu jalur aktivasi TGF- $\beta$ .<sup>97</sup>

Banyak jalur yang berhubungan dengan ekspresi FGF23. Salah satunya jalur protein tulang gen PHEX dan DMP1 (*Dentin matrix protein-1*)<sup>98</sup> yang akan memacu osteosit, selain itu jalur pacuan karena hiperfosfatemia<sup>99</sup> dan jalur pensinyalan ERK1 / 2 – SGK1.<sup>100</sup>

Pada tikus model gagal ginjal terjadi peningkatan kadar FGF23 yang bermakna. Pasak Bumi tidak mampu menghambat peningkatan FGF23 (Tabel 4-3). Kerusakan ginjal dapat meningkatkan kadar FGF23, dimana pada studi ini ginjal yang tersisa 1/6 bagian. Kondisi ini menyerupai kasus pada manusia dengan kondisi gagal ginjal stadium 5 atau fungsi ginjal kurang dari 15%, kadar FGF23 sangat tinggi.<sup>95,96</sup> Hal ini menunjukkan bahwa FGF23 dipengaruhi oleh besarnya kerusakan ginjal. Kerusakan ginjal ini dibuktikan dengan hasil PA yang sudah terjadi glomerulosklerosis luas. (Gambar 4-1)

Efek Pasak Bumi tidak mampu untuk menekan ekspresi FGF23 melalui jalur inflamasi. Pada penelitian ini FGF23 tetap meningkat meski diberikan ekstrak Pasak Bumi. Efek Pasak Bumi terhadap inflamasi pada penelitian ini mampu menekan IL-6 dan TNF- $\alpha$  tapi tidak bermakna, artinya tampak kecenderungan penurunan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  karena pemberian Pasak Bumi. Hal ini menunjukkan efek antiinflamasi Pasak Bumi masih terjadi pada tikus model gagal ginjal. Tampaknya FGF23 tidak

terpengaruh oleh pemberian Pasak Bumi melalui jalur inflamasi pada tikus model gagal ginjal yaitu tetap meningkat meskipun kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  menurun. Penurunan inflamasi tidak bermakna pada studi ini. Peningkatan FGF23 terjadi tidak hanya melalui jalur inflamasi, ada beberapa jalur lain yang dapat meningkatkan kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

#### **4.5.5 Korelasi antara IL-6, TNF- $\alpha$ dan NF- $\kappa$ B dengan FGF23**

Kadar FGF23 tidak berhubungan bermakna dengan kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B pada tikus kontrol meski secara korelasi sangat kuat ( $r^2=0,909$ ;  $p=0,378$ ) (Tabel 4-5). Kadar FGF23 tidak berhubungan bermakna dengan kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B pada tikus model gagal ginjal ( $r^2= 0,403$ ;  $p=0,874$ ) (Tabel 4-6). Hal ini karena mediator-mediator inflamasi tersebut tidak ada yang berkorelasi bermakna sehingga tidak sampai memengaruhi kadar FGF23. Pada pemberian ekstrak Pasak Bumi terstandar eurycomanone terjadi penurunan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  tapi tidak NF- $\kappa$ B, sedangkan FGF23 tetap meningkat dan tidak didapatkan korelasi bermakna ( $p=0,383$ ), meski mempunyai koefisien korelasi yang tinggi ( $r=0,952$ ) dan koefisien determinan yang sangat tinggi ( $r^2=0,907$ ) yang menunjukkan bahwa lebih dari 90% perubahan FGF23 dipengaruhi oleh IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi. Artinya ekstrak Pasak Bumi dalam hal mungkin justru menjadi proinflamator.

Pada studi ini membandingkan efek pemberian ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap mediator-mediator inflamasi yaitu IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B serta FGF23 pada tikus model gagal ginjal. *Eurycomanone* merupakan molekul yang sangat baik karena menginduksi NF- $\kappa$ B dari TNF- $\alpha$  dimana dapat bermanfaat pada aktivitas proliferasi dan apoptosis sel.<sup>101</sup>

Pada penelitian tulang manusia dimana sampel TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang menginduksi ekspresi FGF23 adalah NF- $\kappa$ B dependen.<sup>9</sup> Pemberian ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* tidak mempunyai efek menurunkan kadar NF- $\kappa$ B dan FGF23 (Tabel 4-3). Padahal NF- $\kappa$ B adalah pengatur utama beberapa jalur pro inflamasi dan penghambatan NF- $\kappa$ B berkontribusi menghasilkan efek antiinflamasi.<sup>16</sup> Ekstrak metanol dari akar Pasak Bumi menunjukkan efek penghambatan NF- $\kappa$ B yang menjanjikan tapi pada tikus model gagal ginjal efek penghambatan ini tidak terjadi. Diharapkan Pasak Bumi mampu menekan translokasi NF- $\kappa$ B ke nuklues yang menyebabkan inaktivasi jalur penyinyalan NF- $\kappa$ B dan pengurangan ekspresi siklooksigenase-2 serta dapat menginduksi sintesis NO.<sup>15,103</sup> Seperti pada kondisi efek Pasak Bumi ke IL-6 dan TNF- $\alpha$  terhadap aktivasi NO juga tidak terjadi.

Pada studi ini ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* juga tidak mampu menekan atau menghambat FGF23 pada tikus model gagal ginjal. Pada penelitian *in vivo*, injeksi IL-1 $\beta$  pada tikus yang telah diobati dengan *HIF1 $\alpha$  inhibitor*, 2ME2, dan BAY 87-2243, secara signifikan menurunkan inflamasi dan merangsang peningkatan ekspresi mRNA FGF23 dan kadar cFGF23. Selain itu, penghambatan HIF1 $\alpha$

menghasilkan peningkatan iFGF23, yang menunjukkan bahwa HIF1 $\alpha$  dapat berkontribusi dalam peningkatan produksi FGF23 secara bersamaan yang diinduksi oleh peradangan. Hipotesis ini didukung dengan penelitian pengobatan tikus dengan *inhibitor prolyl-hydroxylase*, FG-4592, dan IOX2, yang meningkatkan kadar HIF1 $\alpha$ , yang menghasilkan peningkatan ekspresi mRNA FGF23 dan kadar cFGF23, sedangkan tingkat iFGF23 meningkat hanya dengan pemberian tambahan dari inhibitor purin yang menghambat sebagian pembelahan FGF23. Ekspresi HIF1 $\alpha$  dirangsang oleh transkripsi FGF23 yang diatur langsung oleh sitokin inflamasi dan secara tidak langsung dengan mendorong defisiensi besi fungsional dengan HIF1 $\alpha$  tetap stabil.<sup>9,52</sup>

Efek Pasak Bumi juga tidak mampu menekan FGF23, sehingga kadar FGF23 meningkat meskipun diberikan ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* (Tabel 4-3). Pasak Bumi mampu menekan inflamasi dengan penurunan kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$ , tapi kadar FGF23 tetap meningkat. Artinya jalur pacuan peningkatan kadar FGF23 tidak hanya dipengaruhi oleh inflamasi selain itu penurunan IL-6 dan TNF- $\alpha$  karena Pasak Bumi juga belum bermakna. Masih banyak jalur lain pada FGF23 yang tidak berhubungan dengan proses inflamasi. Dari beberapa penelitian menunjukkan kadar FGF23 yang sangat tinggi pada pasien PGK yang hemodialisis rutin dan peritoneal dialisis.<sup>102</sup> Pasak Bumi tidak mempunyai tempat untuk menekan kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal.

Pada hasil penelitian ini bahwa pemberian ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* dosis 32,5 mg/kg BB terhadap tikus model gagal ginjal, meski



memberikan pengaruh penurunan terhadap TNF- $\alpha$  tapi tidak memengaruhi FGF23, begitu juga tidak memberikan dampak yang serius terhadap IL-6 untuk memengaruhi FGF23. Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B terhadap FGF23 pada tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi menunjukkan korelasi yang tidak bermakna, masing-masing maupun bersama-sama, tapi perubahan FGF23 dipengaruhi ketiganya tersebut mencapai 90% lebih ( $r^2=0,907$ ) pada kelompok yang diberikan Pasak Bumi. Pasak Bumi tidak memiliki efek yang signifikan terhadap penurunan FGF23 pada tikus model gagal ginjal. Meskipun demikian Pasak Bumi terbukti menurunkan IL-6 dan TNF- $\alpha$  meski tidak bermakna secara statistik. Pasak Bumi hanya menekan inflamasi tapi tidak mampu menekan FGF23 pada tikus model gagal ginjal dengan teknik 5/6 nefrektomi.

#### **4.6 Keterbatasan Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat beberapa keterbatasan penelitian yaitu

1. Tidak dilakukan pemeriksaan kadar Kalsium, Fosfat dan Vitamin D yang dapat menjadi perancu kadar FGF23.
2. Pada tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi tidak bisa membedakan tahapan gagal ginjal, mungkin Pasak Bumi masih ada pengaruh terhadap FGF23 pada tahap-tahap awal.
3. Pada penelitian ini tidak disertakan pemeriksaan aktivitas Makrofag, kadar antioksidan dan radikal bebas yang dapat mempengaruhi kadar NF- $\kappa$ B.

## **BAB V**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

Berdasarkan data hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

#### **5.1 Simpulan**

##### **5.1.1 Simpulan Umum**

1. Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IL-6 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
2. Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar TNF- $\alpha$  dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
3. Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar NF- $\kappa$ B dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.
4. Tidak terdapat perbedaan bermaknakadar FGF23 dari serum tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) terstandar *eurycomanone*.

5. Tidak terdapat korelasi bermakna antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada kelompok tikus model gagal ginjal yang tidak dan diberikan ekstrak Pasak Bumi.

### 5.1.2 Simpulan Khusus

1. Terdapat peningkatan bermakna kadar Albuminuria/24 jam ( $7,88 \pm 1,80$  vs  $5,39 \pm 1,13$ ; **p=0,035**), Ureum ( $45,78 \pm 0,90$  vs  $43,69 \pm 0,92$ ; **p=0,014**) dan Kreatinin ( $2,01 \pm 0,18$  vs  $0,81 \pm 0,04$ ; **p=0,000**) pada tikus model gagal ginjal dengan teknik 5/6 nefrektomi yang menunjukkan keberhasilan pemodelan tikus gagal ginjal kronik.
2. Terdapat peningkatan bermakna kadar FGF23 pada tikus model gagal ginjal dibanding kontrol yang menunjukkan proses fibrosis dan progresi penyakit ginjal yang terjadi sejak awal ( $174,51 \pm 42,70$  vs  $88,92 \pm 14,28$ ; **p=0,003**).
3. Terdapat efek ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap inflamasi dengan penurunan tapi belum bermakna secara statistik kadar IL-6 ( $546,50 \pm 151,22$  vs  $503,00 \pm 268,38$ ; p= 0,377), TNF- $\alpha$  ( $237,69 \pm 140,50$  vs  $173,38 \pm 62,29$ ; p=0,760) dari serum tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi.
4. Ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* tidak terbukti menurunkan kadar NF- $\kappa$ B ( $0,74 \pm 0,47$  vs.  $0,70 \pm 0,56$ ; p=0,905) dan FGF23 ( $201,20 \pm 48,27$  vs.  $189,56 \pm 43,28$ ; p=0,699) dari serum tikus model gagal ginjal 5/6 nefrektomi.

5. Korelasi antara kadar IL-6, TNF- $\alpha$  dan NF- $\kappa$ B dengan kadar FGF23 pada kelompok tikus model gagal ginjal yang diberikan ekstrak Pasak Bumi tidak bermakna secara statistik tapi mempunyai koefisien korelasi yang sangat tinggi ( $r=0,952$ ) dan koefisien determinan juga sangat tinggi ( $r^2=0,907$ ).

## **5.2. Saran**

Merujuk dari hasil penelitian, maka diusulkan beberapa saran sebagai berikut:

### **5.2.1 Saran Akademik**

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang meneliti :
  - Efek ekstrak Pasak Bumi terstandar *eurycomanone* terhadap Makrofag, Anti oksidan dan kadar radikal bebas pada tikus model gagal ginjal.
  - Menilai albuminuria serial, tekanan darah serial, kadar Kalsium, Fosfat dan Vitamin D pada tikus model gagal ginjal.
  - Pengaruh Pasak Bumi terhadap perlambatan progresi PGK melalui jalur inflamasi dengan subyek PGK stadium awal atau GaGA (Gangguan Ginjal Akut) dan kerusakan glomerulus yang belum luas.
2. Perlu kajian khusus terhadap keamanan pemberian pasak bumi dan dosisnya serta lama pemberian pada tikus model gagal ginjal.
3. Perlu memasukkan jalur lain untuk menekan fibrosis pada penelitian lanjut dengan tikus model gagal ginjal seperti sclerostin.

### **5.2.2 Saran Praktis**

1. Penggunaan Pasak Bumi masih memungkinkan diberikan untuk menekan inflamasi tapi pada tahap akhir tidak ada tempat untuk menekan progresivitas.
2. Perlu perhatian pemberian Pasak Bumi pada penyakit ginjal stadium lanjut karena belum terbukti keamanannya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int.* 2009;76(Suppl. 113):S1-S130.
2. Sheet NCDF. Centers for Disease Control and Prevention. 2017.
3. Laporan Indonesian Renal Registry; 2017.
4. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2600-8.
5. Oliveira RB, Cancela AL, Gracioli FG, Dos Reis LM, Draibe SA, Cuppari L, *et al.* Early control of PTH and FGF23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(2):286-91.
6. Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn.* 2008;237(1):18-27.
7. Marsell R, Krajisnik T, Goransson H, Ohlsson C, Ljunggren O, Larsson TE, *et al.* Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing Fibroblast Growth Factor 23. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(3):827-33.
8. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, *et al.* Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(7):2116-24.

9. Mendoza JM, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH, *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7:1155–62.
10. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, *et al.* Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003;107(1):87-92.
11. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Jhangri GS, Curhan G. Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(1):237-45.
12. Wanner C, Metzger T. C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(suppl 8):29-32.
13. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(3 suppl 1):S83-S8.
14. Varghese C, Ambrose C, Jin S, Lim Y, Keisaban T. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack, a traditional medicinal plant in Malaysia. *IJPSN.* 2013;5(4):1875-8.
15. Han YM, Woo SU, Choi MS, Park YN, Kim SH, Yim HS, *et al.* Antiinflammatory and analgesic effect of *Eurycoma longifolia* extracts. *Arch Pharm Res.* 2016;39(3):421-8.
16. Tran TVA, Malainer C, Schwaiger S, Atanasov AG, Heiss EH, Dirsch VM, *et al.* NF- $\kappa$ B Inhibitors from *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod.* 2014;77:483-8.
17. Gava AL, Freitas FPS, Balarini CM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effect of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2012;4(3):167-73.

18. Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. Model of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*. 2010;7:13-9.
19. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2013;3:1-150.
20. Suwitra K. Penyakit Ginjal Kronis. Dalam: Sudoyo A, Setyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editor. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi ke-4*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI; 2009; hlm. 1035-7.
21. Sullivan JD. End stage renal disease economics and the balance of treatment modalities. *J Service Sci Man*. 2010;3(1):45-50.
22. Vianna HR, Soares CM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *BJN*. 2011;33(3):351-64
23. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, *et al*. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2004;65:1009-16.
24. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005;12:353-65.
25. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2010;25:687-97.
26. Krane V, Wanner C. Statins, inflammation and kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:385-97.
27. Rao M, Wong C, Kanetsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 2007;72:549-66.



28. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell MolBiol.* 2001;47:661-73.
29. Grenda R, Wühl E, Litwin M, Janas R, Sladowska J, Arbeiter K, *et al.* Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- beta1 (TGF-beta1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:3487- 94.
30. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001;2:95-101.
31. Schwarting A, Moore K, Wada T, Tesch G, Yoon HJ, Kelley VR. IFN-gamma limits macrophage expansion in MRL-Fas(lpr) autoimmune interstitial nephritis: A negative regulatory pathway. *J Immunol.* 1998;160:4074–81.
32. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol.* 2013;3(2):957-76
33. Geiler J, Buch M, McDermott MF. Anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des.* 2011;17:3141–54.
34. Ferrario F, Castiglione A, Colasanti G, di Belgioioso GB, Bertoli S, D'Amico G, *et al.* The detection of monocytes in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1985;28(3):513–9.
35. Su H, Lei CT, dan Zhang C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Front Immunol.*2017;405(8):1-10.
36. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, *et al.* Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: Thetocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2968–80.

37. Ghee JY, Han DH, Song HK, Kim WY, Kim SH, Yoon HE, *et al.* The role of macrophage in the pathogenesis of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:4061–9.
38. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, *et al.* Mycophenolatemofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med.* 2005;353:2219–28.
39. Gourley MF, Austin HA III, Scott D, Yarboro CH, Vaughan EM, Muir J, *et al.* Methylprednisolone and cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1996;125:549–57.
40. Jacob N, Yang H, Pricop L, Liu Y, Gao X, Zheng SG, *et al.* Accelerated pathological and clinical nephritis in systemic lupus erythematosus-prone New Zealand Mixed 2328 mice doubly deficient in TNF receptor 1 and TNF receptor 2 via a Th17-associated pathway. *J Immunol.* 2009;182:2532–41.
41. Sanz AB, Sanchez-in MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ortega MR, *et al.* NF- $\kappa$ B in renal inflammation. *JASN.* 2010;21:1254-62.
42. Harris RC, Neilson EG. Towards a unified theory of renal progression. *Ann Rev Med.* 2006;57:365-80.
43. Kaysen GA, Eiserich JP. Characteristics and effects of inflammation in end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2003;16:438-46.
44. Lam CWK. Inflammation, cytokines and chemokines in chronic kidney disease. *eJIFCC.* 2009;20(1):12–20.
45. Akchurin M, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84-92.
46. Nabeshima Y. The discovery of  $\alpha$ -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(20):3218-30.

47. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int.* 2001;60(6):2079-86.
48. White KE, Evans WE, O'Riordan JL, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, *et al.* Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics.* 2000;26(3):345-8.
49. Bernheim J, Benchetrit S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(8):2433-8.
50. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, *et al.* Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(2):250-6.
51. Jean G, Terrat J-C, Vanel T, Hurot J-M, Lorriaux C, Mayor B, *et al.* High levels of serum fibroblast growth factors (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2792-6.
52. David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, *et al.* Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2016; 89:135–46.
53. Effendy NM, Mohamed N, Muhammad N, Mohamad IN, Shuid AN. *Eurycoma longifolia*: medicinal plant in the prevention and treatment of male osteoporosis due to androgen deficiency. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:1-9.
54. Hamzah S, Yusof A. The ergogenic effects of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*). *Br J Sports Med.* 2003;37:465-6.
55. Jiwajinda S, Santisopasri V, Murakami A, Kawanaka M, Kawanaka H, Gasquet M, *et al.* In vitro anti-tumor promoting and anti-parasitic activities of the

- quassinoids from *Eurycoma longifolia*, a medicinal plant in Southeast Asia. *J Ethnopharmacol.* 2002;82(1):55-8.
56. Kuo PC, Shi LS, Damu AG, Su CR, Huang CH, Ke Ch, *et al.* Cytotoxic and Antimalarial  $\beta$ -Carboline Alkaloids from the Roots of *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod.* 2003;66(10):1324-7.
57. Mohamed AN, Vejayan J, Yusoff MM. Review on *Eurycoma longifolia* pharmacological and phytochemical properties. *J Applied Sci.* 2015;15(6):831-44.
58. Purwantiningsih A, Hussin H, Chan KL. Free radical scavenging activity of *Eurycoma longifolia* the standardized ethanolic extract of *Eurycoma longifolia*(TAF-273). *IntJ Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(4): 343-7.
59. Farouk AE, Benafri A. Antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack. A Malaysian medicinal plant. *Saudi Med J.* 2011;28:1422-4.
60. Itjin D, Kuswibawati L. Pengaruh infusa akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap libido tikus putih jantan. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2004;15(3):130 -5
61. Bogar BCA, Tendean L, Turalaki GLA. Pengaruh pemberian ekstrak pasak bumi (*Eurycoma longifolia jack*) terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). *eBm.* 2016;4(1):205-9.
62. Rehman SU, Choe K, Yoo HH. Review on a traditional herbal medicine, jack (*tongkat ali*): its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology. *Molecules.* 2016;21:1-31.
63. Choudhary YK, Bommu P, Ming YK, Zulkawi NB. Acute, sub acute and subchronic 90-days toxicity of *Eurycoma longifolia* aqueous extract (physta) in Wistar rats. *IntJ Pharm Pharm Sci.* 2012;4(3):232-8.
64. Li CH, Liao JW, Liao PL, Huang WK, Tse LS, Lin CH, *et al.* Evaluation of Acute 13-Week Subchronic Toxicity and Genotoxicity of the Powdered Root of

- Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack). Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 1-11.
65. Satayavivad J, Noppamas S, Aimon S, Yodhathai T. Toxicological and antimalaria activity of *Eurycoma longifolia* jack extracts in mice. Thai J Phytopharm. 1998;5:14-27.
  66. Ngatidjan. Metode Laboratorium dalam Toksikologi. Yogyakarta: Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Indonesia; 2006.
  67. Thiele JR, Zeller J, Bannasch H, Stark GB, Peter K, Eisenhardt SU. Targeting C-Reactive Protein in inflammatory disease by preventing conformational changes. Mediators Inflamm. 2010; 1-5.
  68. Voleti B, Agrawal A. Statins and nitric oxide reduce C-reactive protein production while inflammatory conditions persist. Mol Immunol. 2006;43(7):891-6.
  69. Kahtan MI, Astuty H, Wibowo H. Uji antimalaria ekstrak akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* jack) dan pengaruhnya terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Majalah Kedokteran UKI. 2018;34:74-81.
  70. Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest. 2001;107(1):7-11.
  71. Browner WS, Newman TB, Cummings SR, Hulley SB. Estimating sample size and power : the Nitty-gritty. Dalam: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB, editor. Designing Clinical Research. Edisi ke-2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. hlm. 65-86.
  72. Barbara JA, van Ostade X, Lopez AF. Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ): The good, the bad and potentially very effective. Immunology & Cell Biology. 1996;74(5):434-43.
  73. Francis C, David V. Inflammation regulates fibroblast growth factor 23 production. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2016;25(4):325-32.

74. Han YM, Woo SU, Choi MS, Park YN, Kim SH, *et al.* Antiinflammatory and analgesic effects of *Eurycoma longifolia* extracts. Arch Pharm Res. 2016;39(3):421-8.
75. Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, *et al.* AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association, 2013.
76. Abcam. Urea Assay Kit. Dikutip dari: [www.abcam.com](http://www.abcam.com).
77. Abcam. Creatinine Assay Kit. Dikutip dari: [www.abcam.com](http://www.abcam.com).
78. Wuhan Fine Biotech. Rat IL-6 (Interleukin-6) ELISA Kit. Melalui [www.fn-test.com](http://www.fn-test.com).
79. Wuhan Fine Biotech. Rat TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit. Melalui [www.fn-test.com](http://www.fn-test.com).
80. Wuhan Fine Biotech. Rat NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) ELISA Kit. Melalui [www.fn-test.com](http://www.fn-test.com).
81. Wuhan Fine Biotech. Rat FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) ELISA Kit. Melalui [www.fn-test.com](http://www.fn-test.com).
82. National Institutes of Health. USRDS 2003. Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2003.
83. Lim BJ, Yang HC, Fogo AB. Animal models of regression/progression of kidney disease. Drug Discov Today Dis Models. 2014;11:45-51.

84. Chamberlain RM, Shirley DG. Time course of the renal function response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. *Exp Physiol.* 2007;92(1):251-62.
85. Bell ME. Albuminuria in the normal male rat. *J Physiol.* 1933;79(2):191-93.
86. Nurani LH, AzzahranF, S, Rohman A. Effects of pasak bumi (*Eurycoma longifolia jack*) roots ethanol extract against hematology profile of healthy volunteers. *Trad Med J.* 2019;24(2):65-71.
87. Achike FI, Kwan CY. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30(9):605-15.
88. Vaziri ND. Effect of chronic renal failure on nitric oxide metabolism. *AJKD.* 2001;28(4):S74-9.
89. Zhang J, Tang L, Li GS, Wang J. The anti-inflammatory effects of curcumin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Renal Failure.* 2018;40(1):680-6.
90. Ulivi V, Giannoni P, Gentili C, Cancedda R, Descalzi F. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2008;104(4): 1393-406.
91. Susana W, Permatasari I, Florensia J, Siregar MN, Hendra P. Uji Aktivitas Analgesik dan Anti-Inflamasi Sediaan Infusa dan Dekokta Akar *Eurycoma longifolia* pada Mencit (*Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of*

- Infusion and Decoction of Eurycoma longifolia root in Mice*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2018;16(2):182–7.
92. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62
93. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DMAC, Vieira Jr. JM, Zatz R. Chronic Inhibition Of Nuclear Factor- $\kappa$ B Attenuates Renal Injury In The 5/6 Renal Ablation Model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(1): F92-F99.
94. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C, Corna D, Tomasoni S, Benigni A, *et al*. Protein traffic activates NF- $\kappa$ B gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am J Kidney Dis*. 2000;36:1226-41.
95. Rudiansyah M, Roesli RM, Martakusumah AH, Rachmadi D, Bandiara R, Lubis L. Mon-148 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) correlated with phosphate but not calcium in routine hemodialysis. *KI Reports*. 2019,47:S363-4.
96. Wesseling-Perry K, Pereira RC, Wang H, Elashoff RM, Sahney S, Gales B, *et al*. Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and bone mineralization in children with renal failure on peritoneal dialysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(2): 511-7.
97. Smith ER, Tan SJ, Holt SG, Hewitson TD. FGF23 is synthesised locally by renal tubules and activates injury-primed fibroblasts. *Sci Rep*. 2017;7(1): 3345.



98. Rowe PS. The wrickkened pathways of FGF23, MEPE and PHEX. Crit Revin Oral Bio Med. 2004;15(5):264-281.
99. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. Physiol Rev. 2012;92(1):131-155.
100. Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2–SGK1 signaling pathway. Bone. 2012;51(3):621-8.
101. Hajjouli S, Chateauvieux S, Teiten MH, Orlikova B, Schumacher M, Dicato M. *Eurycomanone* and *Eurycomanol* from *Eurycoma longifolia* jack as regulators of signaling pathways involved in proliferation, cell death and inflammation. Molecules. 2014;19:14649-66.
102. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, Vargas G, Sowden N, Houston J, *et al.* Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. CJASN. 2011;6(11):2688-95.
103. Hien DTT, Long TP, Thao TP, Lee JH, Trang DT, Minh NTT, *et al.* Anti-inflammatory effects of alkaloid enriched extract from roots of *Eurycoma longifolia* Jack. Asian Pac J Trop Biomed. 2019;9(1):18-22.