

Pengaruh Iskemia-Reperfusi terhadap Gambaran Seluler Tubulointerstisial Renalis, Kadar *Cystatin C* dan *Glomerular Filtration Rate (GFR)* Tikus Wistar

Ahadi Aulia Rahman^{1*}, Rachmat Hidayat², Sri Nita²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

²Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

E-mail: ahadiauliarahman@gmail.com

Abstrak

Acute Kidney Injury (AKI) merupakan penurunan fungsi ginjal secara cepat. Penyebab AKI terbesar adalah iskemia/reperfusi yang memicu respon inflamasi dan menyebabkan kerusakan ginjal. Inflamasi merupakan respon proteksi dan perbaikan jaringan, namun dapat menyebabkan fibrosis yaitu jaringan normal digantikan oleh matriks ekstraseluler seperti kolagen. Kerusakan yang terjadi pada bagian tubulointerstisial berpengaruh besar terhadap fungsi ginjal yang dapat diukur dengan GFR menggunakan *cystatin C*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh durasi iskemia-reperfusi terhadap gambaran seluler tubulointerstisial, kadar *cystatin C* dan GFR pada tikus Wistar serta korelasi antara gambaran seluler tubulointerstisial, kadar *cystatin C* dan GFR. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain *posttest only with control group*. Penelitian menggunakan 30 ekor tikus Wistar yang dilakukan di *animal house* dan laboratorium biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Gambaran seluler tubulointerstisial, kadar *cystatin C* dan GFR dinilai dengan persentase fraksi area kolagen, ELISA dan rumus Larsson. Iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari 99,1% berpengaruh terhadap persentase fraksi area kolagen, iskemia 120 menit dan reperfusi 14 hari 98,8% berpengaruh terhadap kadar *cystatin C* serta 99,5% berpengaruh terhadap GFR. Terdapat korelasi yang signifikan antara persentase fraksi area kolagen dan kadar *cystatin C* ($p=0,0001$, $r=0,901$), serta GFR ($p=0,0001$, $r=-0,834$), lalu antara kadar *cystatin C* dan GFR ($p=0,0001$, $r=-0,915$). Durasi iskemia-reperfusi berpengaruh terhadap gambaran seluler tubulointerstisial, kadar *cystatin C* dan GFR serta terdapat korelasi antara gambaran seluler tubulointerstisial, kadar *cystatin C* dan GFR pada tikus Wistar.

Kata Kunci: AKI, Persentase Fraksi Area Kolagen, *Cystatin C*, GFR

Abstract

Effect of ischemia-reperfusion on tubulointerstitial renal appearance, levels of cystatin c and glomerular filtration rate (GFR) on wistar rats. Acute Kidney Injury (AKI) is rapid decline in renal function. Most causes of AKI are ischemia/reperfusion which triggers an inflammatory response and causes renal injury. Inflammation is a protective response and tissue repair, but it can cause fibrosis, which is the normal tissue replaced by an extracellular matrix such as collagen. Damage that occurs in the tubulointerstitial area has a significant effect on renal function which can be measured by GFR using *cystatin C*. The purpose of this study was to determine the effect of ischemia-reperfusion duration on tubulointerstitial cellular appearance, *cystatin C* levels and GFR and correlations between tubulointerstitial cellular appearance, *cystatin C* and GFR in Wistar rats. This research is an experimental research using *posttest only with control group* design. The study used 30 Wistar rats carried out in animal houses and biomolecular laboratories at Medical Faculty of Sriwijaya University. Tubulointerstitial cellular appearance, *cystatin C* levels and GFR were assessed by percentage of collagen area fraction, ELISA and Larsson formula. 30 minutes ischemia and 14 days reperfusion 99.1% affect the percentage of collagen area fraction, 120 minutes ischemia and 14 days reperfusion 98.8% affect the *cystatin C* level and 99.5% affect the GFR. There was a significant correlation between the percentage of collagen area fraction and *cystatin C* levels ($p = 0,0001$, $r = 0,901$), and GFR ($p = 0,0001$, $r = -0,834$), then between *cystatin C* and GFR levels ($p = 0,0001$, $r = -0,915$). The duration of ischemia-reperfusion affects tubulointerstitial cellular appearance, *cystatin C* levels and GFR and there is a correlation between tubulointerstitial cellular appearance, *cystatin C* levels and GFR in Wistar rats.

Keywords: AKI, Percentage of Collagen Area Fraction, *Cystatin C*, GFR

1. Pendahuluan

Acute Kidney Injury (AKI) merupakan penurunan fungsi ginjal dalam mengatur keseimbangan komposisi cairan dan elektrolit tubuh, serta ekskresi produk sisa metabolisme, yang terjadi secara tiba-tiba.¹ Menurut Pernefri (Perhimpunan Nefrologi Indonesia) jumlah penderita AKI di Indonesia pada tahun 2016 sebanyak 8% dari seluruh pasien yang menjalani hemodialisis di Indonesia.²

Sekitar 70% kasus AKI disebabkan iskemia/reperfusi sehingga terjadi penurunan volume darah vaskular yang tergambar melalui penurunan GFR (*Glomerular Filtration Rate*).³ Iskemia/reperfusi akan memicu respon imun dan inflamasi yang berperan penting dalam patofisiologi AKI.⁴ Iskemia juga menyebabkan penurunan produksi ATP yang mengakibatkan sel mengalami apoptosis atau nekrosis terutama di glomerulus, tubulus dan interstisium.⁵ Adanya reperfusi aliran darah dan reoksigenasi dapat menambah keparahan kerusakan jaringan akibat cedera iskemik serta memicu timbulnya respon inflamasi yang disebut sebagai cedera reperfusi. Selain terjadi peningkatan aliran oksigen, terjadi juga peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan infiltrasi neutrofil sehingga memperparah terjadi kerusakan.^{6,7}

Proses inflamasi merupakan respon proteksi dan perbaikan jaringan, namun proses perbaikan yang tidak sempurna dapat menyebabkan fibrosis yang merupakan penggantian jaringan normal oleh matriks ekstraseluler seperti kolagen.⁸

Kerusakan pada tubulointerstisial renal terutama yang disebabkan oleh iskemia/reperfusi berpengaruh terhadap fungsi ginjal.⁹ Untuk mengetahui besar kerusakan jaringan ginjal diperlukan pemeriksaan patologi, sedangkan untuk mengetahui fungsi ginjal dapat dilakukan pengukuran GFR, pengukuran ini berdasarkan pada kadar kreatinin atau bisa menggunakan *cystatin C*. Kadar *cystatin C* dalam darah

menggambarkan *Glomerular Filtration Rate* (GFR).^{10,11} Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh durasi iskemia-reperfusi pada *Acute Kidney Injury* (AKI) terhadap gambaran seluler tubulointerstisial renalis, kadar *cystatin C* dan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) serta mengetahui korelasi antara gambaran seluler tubulointerstisial renalis, kadar *cystatin C* dan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) pada tikus Wistar.

2. Metode

Persiapan subjek penelitian. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *posttest only with control group*. Subjek penelitian adalah 30 tikus Wistar jantan usia 10-12 minggu dengan berat 200- 250 gram didapatkan dari Laboratorium Eureka Palembang, Indonesia dengan persetujuan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang, Indonesia. Tikus ditempatkan di kandang. Tikus diaklimatisasi dengan suhu kamar (25-30^o C), diberi makan dengan makanan yang telah ditentukan dan minum air sebanyak 2 kali sehari, lalu dihabituasi dengan menggunakan siklus terang-gelap masing-masing 12 jam selama 7 hari.¹²

Perlakuan subjek penelitian. Lalu subjek penelitian dibagi menjadi 10 kelompok yang masing- masing terdiri dari 3 ekor tikus.

K1 (kelompok normal/ *shamed operated*) yaitu subjek penelitian dilakukan prosedur bedah saja tanpa intervensi.

- K2 (iskemia 30 menit dan reperfusi/1 hari)
- K3 (iskemia 30 menit dan reperfusi 7 hari)
- K4 (iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari)
- K5 (iskemia 60 menit dan reperfusi 1 hari)
- K6 (iskemia 60 menit dan reperfusi 7 hari)
- K7 (iskemia 60 menit dan reperfusi 14 hari)
- K8 (iskemia 120 menit dan reperfusi 1 hari)
- K9 (iskemia 120 menit dan reperfusi 7 hari)

- K10 (iskemia 120 menit dan reperfusi 14 hari).

Selanjutnya, subjek penelitian akan diinduksi AKI dengan menggunakan model *Unilateral Renal Ischemia Reperfusion (UIR)* tanpa nefrektomi dengan cara menghentikan aliran darah pada arteri renalis kiri selama beberapa waktu yang akan memicu iskemik dan kemudian dialirkan kembali sehingga terjadi reperfusi.¹³ Subjek penelitian dianggap telah mengalami iskemik apabila terjadi perubahan warna pada ginjal dari kemerahan menjadi merah atau ungu kehitaman serta reperfusi yang berhasil ditandai dengan perubahan kembali warna ginjal menjadi kemerahan.¹⁴ Durasi waktu iskemia dan reperfusi yang digunakan sesuai dengan yang telah ditetapkan sebelumnya. Setelah waktu reperfusi selesai, maka akan dilakukan pengambilan sampel darah untuk dilakukan pengukuran kadar *cystatin C* serta akan dilakukan *euthanasia* pada subjek penelitian untuk diambil ginjal kirinya.

ELISA *cystatin C*. Sampel darah sebanyak 1 ml diambil dari arteri periorbital dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA untuk dilakukan analisis menggunakan *SimpleStep ELISA® Rat Cystatin C ELISA Kit* dengan prinsip menangkap antibodi terhadap *cystatin C* yang telah ditandai dengan menggunakan antibodi konjugasi detektor yang telah berikatan dengan sampel *cystatin C* dalam larutan. Selanjutnya seluruh kompleks antigen-antibodi (*capture antibody, analyte, detector antibody*) akan diimobilisasi melalui imunofinitas yang terdapat di *wells*. Untuk melakukan pengujian, sampel atau *standard* ditambahkan ke dalam *wells* diikuti dengan penambahan antibodi. Setelah inkubasi *wells* dicuci untuk menghilangkan komponen yang tidak terikat. Kemudian *TMB substrate* ditambahkan dan selama inkubasi akan dikatalisasi oleh HRP, yang akan menunjukkan warna biru. Reaksi ini lalu dihentikan dengan menambahkan *stop solution* yang ditandai

dengan perubahan warna dari biru menjadi kuning.

Sinyal *cystatin C* yang dihasilkan sebanding dengan jumlah analit *cystatin C* yang terikat dengan antibodi dan intensitasnya diukur pada panjang gelombang 450nm. Selain itu pada akhir pembacaan TMB juga dapat diukur dengan menggunakan Panjang gelombang 600 nm. *Cystatin C* yang merupakan keluarga dari *cystatin* tipe 2 merupakan inhibitor yang potensial terhadap proteinase lisosomal yang diekspresikan di beberapa organ tubuh serta merupakan inhibitor ekstraseluler yang penting dari protease sistein. Sebagai salah satu inhibitor protease sistein, *cystatin C* memiliki peran penting dalam regulasi aktivitas enzim tersebut.

Pengukuran GFR. Nilai GFR didapatkan melalui penghitungan dengan menggunakan rumus Larsson¹⁵ yang menggunakan kadar *cystatin C* untuk mengukur GFR. Rumusnya adalah sebagai berikut:

$$\text{GFR} = 77,24 \times \text{Cystatin C}^{-1,2623}$$

Keterangan:

GFR: *Glomerular Filtration Rate* (mg/L/min)

Cystatin C: Kadar *Cystatin C* pada serum (mg/L)

Gambaran seluler tubulointerstisial.

Untuk mendapatkan sampel ginjal tikus, awalnya tikus di-*euthanasia* menggunakan anestesi per inhalasi kloroform hingga tidak terdapat respon nyeri dan pergerakan nafas, lalu dilakukan pembedahan di bagian *flank* kiri, kemudian ambil ginjal dan difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin 10%* selama 24-48 jam pada suhu ruangan. Ginjal yang telah difiksasi kemudian disimpan dalam wadah khusus untuk diproses dalam pembuatan blok parafin. Setelah dibuat blok parafin, preparat dipotong dan dibuat *slide* untuk diwarnai menggunakan *Picrosirius Red*.

Pengamatan fibrosis pada tubulointerstisial renalis dilakukan dengan *Digital Image Analysis* menggunakan *ImageJ* 52. Fraksi area fibrosis dinyatakan dalam

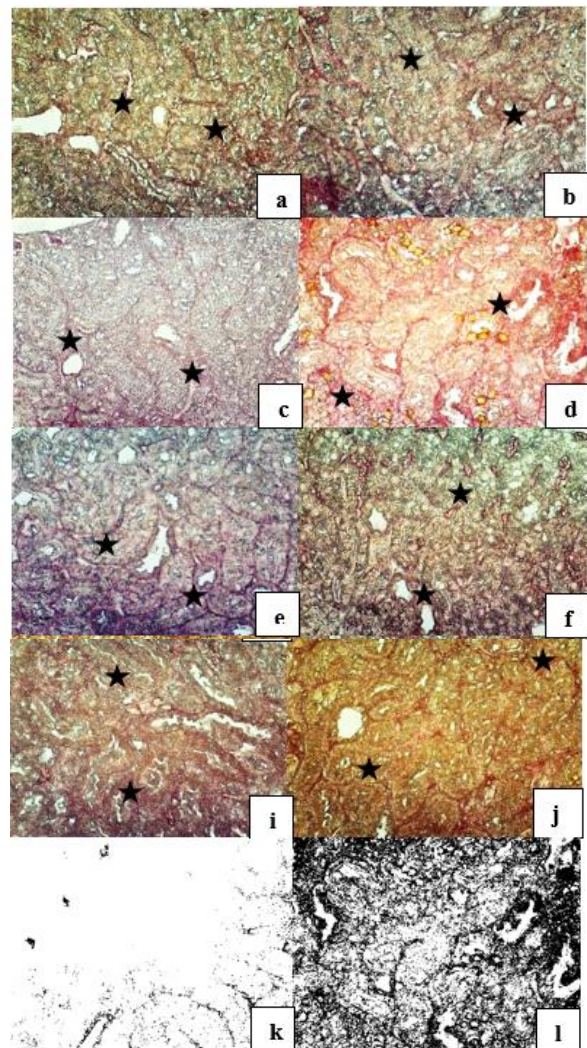
persentase (%). Preparat yang telah diwarnai dengan *Picro Sirius Red* akan diamati menggunakan mikroskop dan difoto dengan optilab sebanyak 5 lapangan pandang secara acak dengan perbesaran 400x, lalu foto tersebut akan dilakukan *Digital Image Analysis* menggunakan *ImageJ* 52 dan akan didapatkan hasil berupa persentase fraksi area fibrosis. Pada hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop warna kemerahan pada preparat menunjukkan adanya deposit kolagen serta pada hasil *Digital Image Analysis* menggunakan *ImageJ* 52 warna hitam menunjukkan deposit area kolagen.

Analisis data statistic. Data persentase fraksi area kolagen, kadar *cystatin C* dan GFR (*Glomerular Filtration Rate*) dianalisis menggunakan software IBM® *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®)* versi 25. Analisis komparatif menggunakan *One-way Anova* lalu dilanjutkan dengan *Post Hoc Bonferroni* dan *Games-Howell*, signifikan jika nilai $p < 0,05$. Analisis korelasi menggunakan uji korelasi *Pearson*, signifikan jika nilai $p < 0,05$. Analisis pengaruh menggunakan uji multivariat *Mannova*, signifikan jika nilai $p < 0,05$.

3. Hasil

Pada gambar 1. terlihat perbandingan gambaran tubulointerstisial pada masing-masing kelompok perlakuan mulai dari K1 hingga K10. Pada gambar 1(a) atau kelompok normal, tubulus dan interstitial berbatas tegas, namun pada gambar 1(d) atau kelompok iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari, tubulus dan interstitialnya tidak berbatas tegas lagi, disertai dengan pembengkakan pada daerah tubulus. Warna kemerahan yang terdapat di gambar baik pada gambar 1(a) hingga 1(j) menunjukkan adanya deposit kolagen yang terdapat di tubulus dan interstitial. Warna kemerahan ditemukan paling banyak pada gambar 1(d) yang merupakan kelompok iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari. Pada hasil *digital image analysis* menggunakan

ImageJ 52 didapatkan hasil persentase fraksi area kolagen yang tertinggi ditemukan pada kelompok K4 (iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari) dengan persentase 46,541% yang ditunjukkan oleh gambar 1(l), sedangkan pada kelompok normal (K1) hanya ditemukan persentase fraksi area kolagen sebesar 1,450% yang ditunjukkan oleh gambar 1(k).



Gambar 1. Gambaran Seluler Tubulointerstisial (a) K1, (b) K2, (c) K3, (d) K4, (e) K5, (f) K6, (g) K7, (h) K8, (i) K9, (j) K10, (k) hasil *digital image analysis* K1(kelompok normal), (l) hasil *digital image analysis* K4 (iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari). Warna kemerahan dan tanda bintang (*) menunjukkan adanya deposit kolagen di tubulus dan interstitial, warna hitam pada *digital image analysis* menunjukkan deposit kolagen (*Picrosirius Red*, 400x)

Pada tabel 1. menunjukkan bahwa rerata persentase fraksi area kolagen tertinggi ditemukan di kelompok K4 (iskemia 30 menit,

reperfusi 14 hari) yaitu sebesar 46,541%, sedangkan yang terendah ditemukan pada K1 (kelompok normal) yaitu sebesar 1,450%.

Tabel 1. Pengaruh durasi iskemia- reperfusi terhadap persentase fraksi area kolagen tubulointerstisial renal

Durasi Iskemia- Reperfusi	Rerata Persentase Fraksi Area Kolagen Mean \pm SD (%)	P_value*	P_value β^{**}	β	η_p^2
K1 Shamed Operated	1,450 \pm 0,127	- ^b	0,049 [#]	1,450 [#]	0,180 [#]
K2 ISM 30 menit + RPF 1 hari	14,294 \pm 0,974	0,009 ^{a,b}	0,000	12,844 ^c	0,896 ^d
K3 ISM 30 menit + RPF 7 hari	22,297 \pm 0,723	0,001 ^{a,b}	0,000	20,847 ^c	0,958 ^d
K4 ISM 30 menit + RPF 14 hari	46,541 \pm 0,923	0,001 ^a	0,000	45,091 ^c	0,991 ^d
K5 ISM 60 menit + RPF 1 hari	16,329 \pm 0,315	0,000 ^{a,b}	0,000	14,879 ^c	0,920 ^d
K6 ISM 60 menit + RPF 7 hari	32,268 \pm 1,035	0,002 ^{a,b}	0,000	30,818 ^c	0,980 ^d
K7 ISM 60 menit + RPF 14 hari	34,349 \pm 1,945	0,006 ^{a,b}	0,000	32,889 ^c	0,983 ^d
K8 ISM 120 menit + RPF 1 hari	19,878 \pm 0,674	0,000 ^{a,b}	0,000	18,428 ^c	0,946 ^d
K9 ISM 120 menit + RPF 7 hari	36,920 \pm 2,121	0,006 ^{a,b}	0,000	35,470 ^c	0,985 ^d
K10 ISM 120 menit + RPF 14 hari	33,076 \pm 0,845	0,003 ^{a,b}	0,000	31,626 ^c	0,981 ^d

* Uji Post Hoc Games- Howell, bermakna jika $p_value < 0,05$, ** Uji Parameter Estimates Mannova, bermakna jika $p_value < 0,05$, - Kelompok Normal (Shamed Operated), # Konstanta, ^a Analisis Post Hoc Games- Howell $p < 0,05$ dibandingkan shamed operated, ^b Analisis Post Hoc Games- Howell $p < 0,05$ dibandingkan K4, ^c Persentase fraksi area kolagen lebih tinggi dibandingkan shamed operated, ^d Persen pengaruh durasi iskemia- reperfusi terhadap persentase fraksi area kolagen dibandingkan shamed operated, η_p^2 partial eta square Mannova

Pada hasil analisis Post Hoc tabel 1. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) rerata persentase fraksi area kolagen pada kelompok perlakuan K2-K10 jika dibandingkan dengan K1 (kelompok normal). Selain itu, perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) rerata persentase fraksi area kolagen juga terdapat antara K4 (iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari) dan seluruh kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil analisis multivariat Mannova tabel 1. didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok perlakuan yang menunjukkan bahwa terdapat pengaruh antara durasi iskemia reperfusi terhadap persentase fraksi area kolagen. Nilai

β menunjukkan besar pengaruh yang ditimbulkan variabel independen terhadap dependen. Pada K1 (kelompok normal) berpengaruh terhadap besar persentase fraksi area kolagen sebesar 1,450%. Nilai β tertinggi terdapat di K4 (iskemia 30 menit, reperfusi 14 hari), menunjukkan bahwa perlakuan tersebut akan meningkatkan persentase fraksi area kolagen menjadi 45,091% lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Nilai η_p^2 menunjukkan seberapa besar persentase variabel independen mempengaruhi variabel dependen. Pada K1 (kelompok normal) didapatkan nilai η_p^2 sebesar 0,180 (18%) yang berarti kelompok normal mempengaruhi persentase fraksi area kolagen sebesar 18%. η_p^2

terbesar didapatkan pada K4 yaitu sebesar 0,991 (99,1%) yang berarti perlakuan iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari akan memengaruhi peningkatan persentase fraksi area kolagen menjadi 99,1% lebih tinggi dibandingkan kelompok normal.

Pada tabel 2. menunjukkan bahwa rerata kadar *cystatin C* tertinggi ditemukan di kelompok K10 (iskemia 120 menit, reperfusi 14 hari) yaitu sebesar 1,47 mg/L, sedangkan yang terendah ditemukan pada K1 (kelompok

Tabel 2. Pengaruh durasi iskemia- reperfusi terhadap kadar *Cystatin C*

Durasi Iskemia- Reperfusi	Rerata Kadar <i>Cystatin C</i> Mean \pm SD (mg/L)	<i>P</i> _value*	<i>P</i> _value β **	β	η_p^2
K1 <i>Shamed Operated</i>	0,47 \pm 0,01	-	0,000 [#]	0,470	0,973
K2 ISM 30 menit + RPF 1 hari	0,85 \pm 0,04	0,000 ^a	0,000	0,380	0,922
K3 ISM 30 menit + RPF 7 hari	1,11 \pm 0,02	0,000 ^a	0,000	0,640	0,971
K4 ISM 30 menit + RPF 14 hari	1,34 \pm 0,043	0,000 ^a	0,000	0,870	0,984
K5 ISM 60 menit + RPF 1 hari	0,89 \pm 0,02	0,000 ^a	0,000	0,420	0,936
K6 ISM 60 menit + RPF 7 hari	1,12 \pm 0,01	0,000 ^a	0,000	0,650	0,972
K7 ISM 60 menit + RPF 14 hari	1,38 \pm 0,036	0,000 ^a	0,000	0,910	0,986
K8 ISM 120 menit + RPF 1 hari	0,97 \pm 0,036	0,000 ^a	0,000	0,500	0,954
K9 ISM 120 menit + RPF 7 hari	1,21 \pm 0,026	0,000 ^a	0,000	0,740	0,978
K10 ISM 120 menit + RPF 14 hari	1,47 \pm 0,036	0,000 ^a	0,000	1,000	0,988

* Uji *Post Hoc Games- Howell*, bermakna jika *p*_value <0,05, ** Uji *Parameter Estimates Manova*, bermakna jika *p*_value <0,05, - Kelompok Normal (*Shamed Operated*), # Konstanta, ^a Analisis *Post Hoc Games- Howell*, *p*<0,05 dibandingkan *shamed operated*, ^b Analisis *Post Hoc Games- Howell*, *p*<0,05 dibandingkan K4, ^c Persentase fraksi area kolagen lebih tinggi dibandingkan *shamed operated*, ^d Persen pengaruh durasi iskemia- reperfusi lebih tinggi terhadap persentase fraksi area kolagen dibandingkan *shamed operated*, η_p^2 *partial eta square Manova*

normal) yaitu sebesar 0,47 mg/L. Hasil analisis *Post Hoc* tabel 2. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan (*p*<0,05) rerata kadar *cystatin C* pada kelompok perlakuan K2-K10 jika dibandingkan dengan K1 (kelompok normal).

Berdasarkan hasil analisis multivariat *Mannova* tabel 2. didapatkan hasil yang signifikan (*p*<0,05) pada semua kelompok perlakuan yang menunjukkan bahwa terdapat pengaruh antara durasi iskemia reperfusi terhadap kadar *cystatin C*. Nilai β menunjukkan besar pengaruh yang ditimbulkan variabel independen terhadap dependen. Pada K1

(kelompok normal) berpengaruh terhadap kadar *cystatin C* sebesar 0,47 mg/L. Nilai β tertinggi terdapat di K10 (iskemia 30 menit, reperfusi 14 hari), menunjukkan bahwa perlakuan tersebut akan meningkatkan kadar *cystatin C* menjadi 1 mg/L lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Nilai η_p^2 menunjukkan seberapa besar persentase variabel independen mempengaruhi variabel dependen. Pada K1 (kelompok normal) didapatkan nilai η_p^2 sebesar 0,973 (97,3%) yang berarti kelompok normal mempengaruhi kadar *cystatin C* sebesar 97,3%. η_p^2 terbesar didapatkan pada K10 yaitu sebesar 0,988

(98,8%) yang berarti perlakuan iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari akan memengaruhi peningkatan kadar *cystatin C* menjadi 98.8% lebih tinggi dibandingkan kelompok normal.

Pada tabel 3. menunjukkan bahwa rerata GFR (*Glomerular Filtration Rate*) tertinggi ditemukan di kelompok K1 (kelompok normal)

yaitu sebesar 200,42 mg/L/min, sedangkan yang terendah ditemukan pada K10 (kelompok normal) yaitu sebesar 47,52 mg/L/min. Hasil analisis *Post Hoc* tabel 3. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) rerata kadar *cystatin C* pada kelompok

Tabel 3. Pengaruh durasi iskemia-reperfusi terhadap GFR (*Glomerular Filtration Rate*)

Durasi Iskemia- Reperfusi	Rerata <i>Glomerular Filtration Rate</i> (GFR) Mean \pm SD (mg/L/min)	<i>P_value</i> *	<i>P_value</i> β^{**}	β	η_p^2
K1 <i>Shamed Operated</i>	200,42 \pm 5,386	-	0,000 [#]	200,420 [#]	0,998 [#]
K2 ISM 30 menit + RPF 1 hari	95,03 \pm 5,652	0,000 ^a	0,000	-105,390 ^b	0,988 ^c
K3 ISM 30 menit + RPF 7 hari	67,73 \pm 1,540	0,000 ^a	0,000	-132,690 ^b	0,993 ^c
K4 ISM 30 menit + RPF 14 hari	53,43 \pm 2,240	0,000 ^a	0,000	-146,983 ^b	0,994 ^c
K5 ISM 60 menit + RPF 1 hari	89,52 \pm 2,535	0,000 ^a	0,000	-110,897 ^b	0,990 ^c
K6 ISM 60 menit + RPF 7 hari	66,95 \pm 0,755	0,000 ^a	0,000	-146,983 ^b	0,994 ^c
K7 ISM 60 menit + RPF 14 hari	51,46 \pm 1,679	0,000 ^a	0,000	-148,953 ^b	0,994 ^c
K8 ISM 120 menit + RPF 1 hari	80,37 \pm 3,707	0,000 ^a	0,000	-120,050 ^b	0,991 ^c
K9 ISM 120 menit + RPF 7 hari	60,75 \pm 1,699	0,000 ^a	0,000	-139,670 ^b	0,993 ^c
K10 ISM 120 menit + RPF 14 hari	47,52 \pm 1,457	0,000 ^a	0,000	-152,900 ^b	0,995 ^c

* Uji *Post Hoc Games- Howell*, bermakna jika $p_value < 0,05$, ** Uji *Parameter Estimates Mannova*, bermakna jika $p_value < 0,05$, - Kelompok Normal (*Shamed Operated*), # Konstanta, ^a Analisis *Post Hoc Bonferroni* $p < 0,05$ dibandingkan *shamed operated*, ^b GFR lebih rendah dibandingkan *shamed operated*, ^c Persen pengaruh durasi iskemia- reperfusi terhadap GFR dibandingkan *shamed operated*, η_p^2 *partial eta square Mannova*

perlakuan K2-K10 jika dibandingkan dengan K1 (kelompok normal). Berdasarkan hasil analisis multivariat *Mannova* tabel 3. didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok perlakuan yang menunjukkan bahwa terdapat pengaruh antara durasi iskemia reperfusi terhadap GFR. Nilai β menunjukkan besar pengaruh yang ditimbulkan variabel independen terhadap dependen. Pada K1 (kelompok normal) berpengaruh terhadap GFR sebesar 200,420 mg/L/min. Nilai β tertinggi terdapat di K10 (iskemia 30 menit, reperfusi 14 hari), menunjukkan bahwa perlakuan tersebut akan

menurunkan GFR menjadi 152,90 mg/L/min lebih rendah dibandingkan kelompok normal. Nilai η_p^2 menunjukkan seberapa besar persentase variabel independen mempengaruhi variabel dependen. Pada K1 (kelompok normal) didapatkan nilai η_p^2 sebesar 0,998 (99,8%) yang berarti kelompok normal mempengaruhi GFR sebesar 99,8%. η_p^2 terbesar didapatkan pada K10 yaitu sebesar 0,995 (99,5%) yang berarti perlakuan iskemia 30 menit dan reperfusi 14 hari akan memengaruhi penurunan GFR menjadi 98.8% lebih rendah dibandingkan kelompok normal.

Tabel 4. Korelasi persentase fraksi area kolagen, kadar Cystatin C dan GFR (Glomerular Filtration Rate)

	Persentase Fraksi Area Kolagen		GFR	
	r	P_value*	r	P_value*
Kadar <i>Cystatin C</i>	0,901	0,000	-0,915	0,000
GFR	-0,834	0,000		

* Uji Korelasi *Pearson*, bermakna jika *p_value* <0,05

Pada tabel 4. Didapatkan bahwa terdapat korelasi yang bermakna signifikan ($p < 0,05$) antara kadar *cystatin C* dan persentase fraksi area kolagen dengan arah korelasi positif yang berarti semakin tinggi kadar *cystatin C* maka semakin tinggi persentase fraksi kolagen tubulointerstitial renal serta kekuatan korelasi yang sangat kuat ($r = 0,901$). Kemudian, terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) antara kadar *cystatin C* dan GFR (*Glomerular Filtration Rate*) ($p < 0,05$), dengan arah korelasi negatif yang berarti semakin tinggi kadar *cystatin C* maka semakin rendah GFR serta kekuatan korelasi yang sangat kuat ($r = -0,915$). Lalu, terdapat korelasi yang bermakna signifikan ($p < 0,05$) antara GFR dan persentase fraksi kolagen dengan arah korelasi negatif yang berarti semakin tinggi GFR maka semakin rendah persentase fraksi kolagen tubulointerstitial renal serta kekuatan korelasi yang sangat kuat ($r = -0,834$).

4. Pembahasan

Gambaran seluler dari tubulointerstitial renalis menunjukkan bahwa pada kelompok K1, bagian – bagian yang terdapat di ginjal masih jelas baik itu glomerulus, tubulus maupun interstitialnya, namun pada K10 bagian- bagian tersebut sudah susah untuk didapatkan dengan jelas. Walaupun fibrosis merupakan respon terhadap kerusakan yang secara normal terjadi dan merupakan proses perbaikan yang bersifat *selflimiting* dan untuk membatasi kerusakan yang terjadi, fibrosis dapat bersifat patologis dan dapat bersifat merusak. Setelah kerusakan jaringan,

fibroblast akan menggunakan sinyal dan program genetik maupun epigenetik untuk berproliferasi dan membuat jaringan ikat tetapi setelah itu berubah menjadi jaringan parut dewasa dan permanen. Kerusakan pada tubulus berkaitan dengan fibrosis yang terjadi disekitarnya. Kerusakan endotel dan hilangnya kapiler selama kerusakan dapat menghasilkan hipoksia yang dapat mencegah proses perbaikan dari bagian tubulus yang cedera dan menyebabkan tubulus atrofi. Fibrosis hanya berkembang disekitar tubulus yang mengalami atrofi dan tubulointerstitium disekitarnya tetap normal. Namun pada beberapa penelitian tentang AKI dimana tubulus gagal untuk kembali normal, strukturnya akan mengalami atrofi dan fibrosis akan berkembang disekitarnya dan akan mempengaruhi tubulus lain yang sebelumnya mengalami proses perbaikan yang sempurna atau tidak mengalami kerusakan. Episode AKI yang berat atau terjadinya iskemia reperfusi yang berulang dalam periode waktu tertentu dapat menyebabkan terbentuknya fibrosis tubulointerstitial yang parah dan menimbulkan dampak pada sistem hemodinamik yang diakibatkan karena adanya pengurangan massa ginjal oleh adanya kerusakan sebelumnya, kerusakan yang terjadi biasanya diawali di nefron dan akan menyebar ke lingkungan sekitarnya seperti interstitial.¹⁶

Cystatin C pertama kali digunakan sebagai prediktor fungsi ginjal pada tahun 1985 dan merupakan protein dasar nonglikosilasi dengan berat 13kDa serta merupakan bagian dari keluarga besar *cystatin C* yang termasuk ke dalam sistein protease inhibitor dan diproduksi oleh semua sel yang memiliki inti. *Cystatin C* difiltrasi oleh glomerulus dan selanjutnya akan direabsorpsi secara sempurna oleh tubulus dan dikatabolisme tanpa di skresikan kembali. *Cystatin C* tidak dipengaruhi oleh jenis kelamin, massa otot dan makanan. Secara klinis *cystatin C* yang diukur di darah dan di urin dapat digunakan untuk

pemeriksaan pada AKI. Banyak penelitian yang telah menggunakan kadar *cystatin C* dalam serum untuk mengetahui kerusakan yang ada di ginjal. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi penggunaan *cystatin C* sebagai penanda untuk AKI adalah perubahan kadar *cystatin C* yang cepat di dalam darah dapat menggambarkan perubahan pada GFR.¹⁷ Konsentrasi normal *cystatin C* urin adalah <120 µg/L, konsentrasi *cystatin C* akan meningkat pada pasien dengan gangguan pada tubulus dibandingkan dengan pasien yang memiliki gangguan di glomerulus, hal ini menunjukkan bahwa pengukuran *cystatin C* dapat mendeteksi gangguan fungsi tubulus yang diakibatkan oleh murni penyakit tubulus atau karena penyakit lain.¹⁸

GFR dapat didefinisikan sebagai volume plasma yang secara sempurna dapat dibersihkan dari partikel-partikel yang terlarut di dalamnya oleh ginjal dalam satuan waktu tertentu.¹⁹ Cedera iskemia-reperfusion ditandai dengan adanya keterbatasan aliran darah ke organ yang diikuti dengan pengembalian aliran darah dan reoksigenasi. Hal tersebut dapat menyebabkan kerusakan di jaringan oleh karena adanya kaskade inflamasi seperti stress oksidatif, sitokin, kemokin dan aktivasi leukosit. Di ginjal, cedera iskemia-reperfusion berperan dalam timbulnya kondisi patologis yang disebut AKI. Adanya berbagai mekanisme yang terlibat menyebabkan terjadinya kerusakan di hampir semua bagian dari ginjal baik di sistem vaskularisasi, glomerulus, tubulus maupun interstisial, kerusakan tersebut meliputi terjadinya edema, nekrosis maupun apoptosis. Adanya kerusakan tersebut dapat mempengaruhi fungsi ginjal dalam menyaring darah yang akan tergambar dari perubahan nilai GFR.²⁰

Fibrosis dan sklerosis merupakan suatu mekanisme umum yang berperan dalam penyakit ginjal yang bersifat progresif. Perkembangan dari fibrosis ginjal akan menyebabkan terbentuknya akumulasi yang

berlebihan jaringan ikat, kolagen primer yang mengalami ekspresi berlebihan terutama di vascular renal, glomerulus, kompartemen tubulointerstisial sebagai respon terhadap rangsangan patologis atau inflamasi.²¹ Berbagai jenis sub tipe kolagen akan terakumulasi selama proses ini termasuk yang di interstisial (kolagen I, III dan V) dan membrane dasar (kolagen IV). Fibrosis sebenarnya melibatkan beberapa jenis kolagen dan menggambarkan keseimbangan antara kolagen sintesis dan degradasi. Fibrosis kolaps disebabkan oleh hilangnya parenkim ginjal yang secara teori tidak melibatkan sintesis kolagen. Hal ini sangat berhubungan dengan ginjal, dimana tubulus yang melingkupi hampir sebagian besar masa ginjal dan atrofi tubulus yang biasanya diikuti oleh kondisi patologis di interstisial. *Picrosirius red* biasa digunakan untuk mengidentifikasi serat kolagen yang berbentuk fibril baik secara histologi maupun biokimia. Analisis secara kuantitatif terhadap fibrosis tubulointerstisial dapat digambarkan oleh luas area jaringan yang ditutupi oleh pewarna yang spesifik atau yang disebut sebagai persentase fraksi area fibrosis.²²

5. Kesimpulan

Durasi iskemia 30 menit dan reperfusion 14 hari 99,1% berpengaruh terhadap gambaran seluler tubulointerstisial renalis yang tercermin dari persentase fraksi area kolagen. Durasi iskemia 120 menit dan reperfusion 14 hari 98,8% berpengaruh terhadap kadar *cystatin C*. Durasi iskemia 120 menit dan reperfusion 14 hari 99,5% berpengaruh terhadap *Glomerular Filtration Rate* (GFR). Terdapat korelasi positif antara gambaran seluler tubulointerstisial renalis yang tercermin dari persentase fraksi area kolagen dan kadar *cystatin C* dengan nilai korelasi 0,901 (sangat kuat) yang berarti ketika persentase fraksi area kolagen meningkat maka kadar *cystatin C* juga akan meningkat. Terdapat korelasi negatif antara antara

gambaran seluler tubulointerstisial renalis yang tercermin dari persentase fraksi area kolagen dan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) dengan nilai korelasi $-0,834$ (sangat kuat) yang berarti ketika persentase fraksi area kolagen meningkat maka GFR akan menurun. Terdapat korelasi negatif antara kadar *cystatin C* dan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) dengan nilai korelasi $-0,915$ (sangat kuat) yang berarti ketika kadar *cystatin C* meningkat maka GFR akan menurun.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada seluruh pihak yaitu staf laboratorium biomolekuler dan *animal house* serta, dosen pengajar di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Melyda. Diagnosis dan Tatalaksana Acute Kidney Injury (AKI) pada Syok Septik. 2017;44(12):907–11.
2. PERNEFRI. 9th Report Of Indonesian Renal Registry 2016. 2016;1–46.
3. Awdishu BL, Wu SE. Acute Kidney Injury. 2nd ed. CCSAP; 2017. 7-26 p.
4. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1503–20.
5. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury : Definition , Pathophysiology and Clinical Phenotypes. 2016;37(2):85–98.
6. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med [Internet]*. 2011 Nov 7;17:1391. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2507>
7. Lee JA, Choi JW, In JH, Jung HS, Kim YS, Jeon YS, et al. Hepatic ischemic preconditioning provides protection against distant renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Korean Med Sci*. 2012;27(5):547–52.
8. Meng X, Nikolic-paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2014;10(9):493–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2014.114>
9. Widiana IGR. Penyakit Tubulointerstisial. In: Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, Simadibrata M, Setyohadi B, Syam AF, editors. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. VI. Jakarta: Interna Publishing; 2014. p. 2114–22.
10. Journal O, Society I. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. 2013;3(1).
11. Meinardaniawati D, Effendi SH, Rahayuningsih SE. Kadar Cystatin-C Serum Sebagai Penanda Fungsi Ginjal Bayi Prematur. 2013;15(1):17–22.
12. Lempiäinen J. Ischaemia-Reperfusion-Induced Kidney Injury. Helsinki: Institute of Biomedicine Pharmacology Faculty of Medicine and Doctoral Programme in Drug Research University of Helsinki; 2014. 1-77 p.
13. Clef N Le, Verhulst A, Haese PCD, Vervaeke BA. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. 2016;
14. Whalen H, Shiels P, Littlejohn M, Clancy M. A novel rodent model of severe renal ischemia reperfusion injury. *Ren Fail*. 2016;38(10):1694–701.
15. Mousavinasab N, Jalalzadeh M. A comparison of estimated GFRs based on formulas of serum cystatin C and serum creatinine. *Nephrourol Mon*. 2017;9(3):0–7.
16. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2015;26(8):1765–76. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2015010006>

17. Koyner JL, Bennett MR, Worcester EM, Ma Q, Raman J, Jeevanandam V, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int.* 2008;74(8):1059–69.
18. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):288–91.
19. Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, Smith J, Moffitt S. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr.* 1983;37(3):478–94.
20. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev [Internet].* 2015;4(2):20–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4459724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Hewitson TD. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Physiol.* 2009;296(6):F1239–44.
22. Hewitson TIMD, Smith ER, Samuel CS. Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney ABSTRACT: Renal fibrosis results from an excess accumulation of connective tissue „ 2014;19:721–6.
23. Wahdaningsih S, Untari EK. Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Kulit Buah Naga Merah (*Hylocerecus polyhizus*) Terhadap Kadar Malondialdehid Pada Tikus (*Rattus novergicus*) Wistar Yang Mengalami Stres Oksidatif. *Res Artic Nomor.* 2016;3(1):45–55.
24. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013 Oct;1(1):483–91.
25. In S, Wresdiyati T, Suprayogi A. Respon Stres Oksidatif dan Pemberian Isoflavon terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus. *JITV Th.* 2013;18(2):146–52