

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

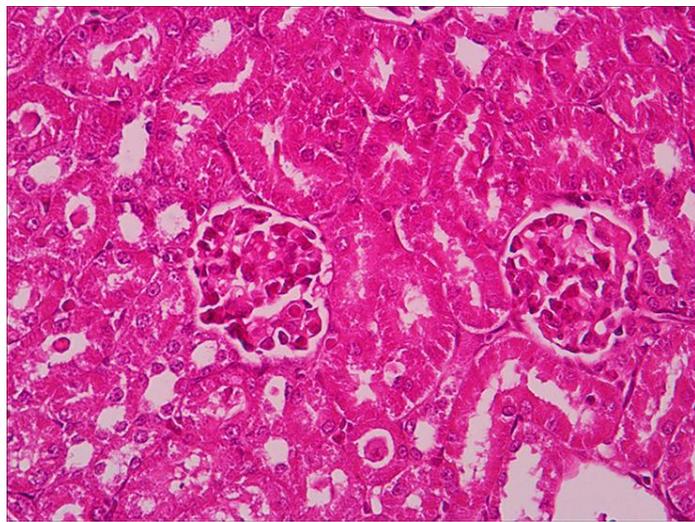
Subjek penelitian ini adalah anak yang diperoleh dari induk tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang telah diinduksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 7 hari dan 11 hari dengan cara di ligasi arteri uterina unilateral. Ditentukan pula anak yang diperoleh dari induk tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang sehat tanpa induksi hipoksia iskemik. Hewan uji dipelihara dan diberi makan minum *ad libitum*.

Setelah induk *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* hamil tersebut melahirkan, anak-anaknya ditimbang. Hanya anak yang berat badan lahir <5,50 gram yang dipilih sebagai subjek penelitian. Anak-anak tikus tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok 7 ekor. Anak-anak tikus yang lahir dikelompokkan berdasarkan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : Hewan uji yang dijadikan sebagai kelompok kontrol, tidak diinduksi hipoksia iskemik.
2. Kelompok 2 : Hewan uji dijadikan subyek penelitian, dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 7 hari.
3. Kelompok 3 : Hewan uji dijadikan subyek penelitian, dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 11 hari.

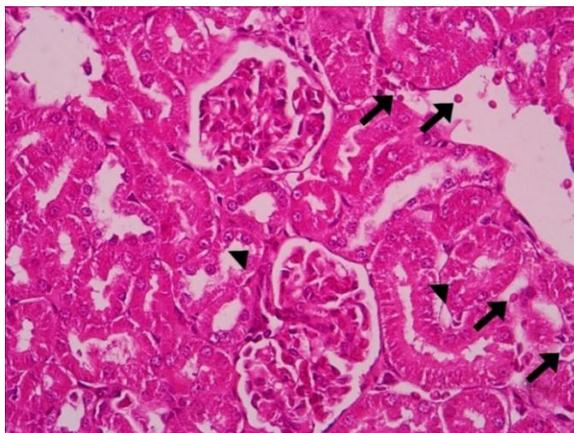
Semua anak-anak tikus mendapatkan perlakuan yang sesuai hingga memasuki usia 35 hari. Setelah memasuki usia 35 hari anak-anak tikus diambil

organ ginjalnya untuk dibuat sediaan preparat dan dilakukan pengamatan secara penghitungan jumlah sel ginjal yang mengalami perubahan histopatologis dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Perubahan pada tubulus berupa degenerasi hidropis, apoptosis dan adanya endapan protein di lumen. Hasil penelitian berupa gambaran histopatologi yaitu kerusakan tubulus dapat dilihat pada Gambar 4.



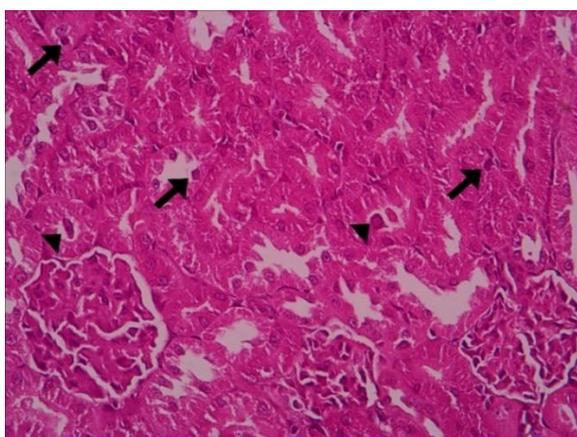
Gambar 4. Kelompok 1. Pewarnaan HE. Perbesaran 400x.

Gambar 4 merupakan kelompok perlakuan kontrol, yaitu kelompok yang tidak diinduksi dengan hipoksia iskemik prenatal. Kelompok ini memiliki tingkat lesi kurang dari 25%.



Gambar 5. Kelompok 2. Pewarnaan HE. Perbesaran 400x.

Gambar 5 merupakan kelompok perlakuan 2. Hewan uji yang dijadikan subyek penelitian berasal dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 7 hari. Pada kelompok ini sebagian besar sampel memiliki lesi sebesar 50-<75% total lapangan pandang. Pada Gambar 5 tubulus yang mengalami degenerasi hyalin ditunjukkan dengan gambar panah dan degenerasi hidropis ditunjukkan dengan gambar kepala panah.



Gambar 6. Kelompok 3. Tubulus yang mengalami endapan protein (kepala panah) dan inti sel yang mengalami apoptosis (panah). Pewarnaan HE. Perbesaran 400x.

Gambar 6 merupakan kelompok perlakuan 3. Hewan uji yang dijadikan subyek penelitian berasal dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 11 hari. Pada kelompok ini sebagian besar sampel memiliki lesi sebesar 25-<50% total lapangan pandang. Pada gambar 6 tubulus yang mengalami endapan protein ditunjukkan dengan gambar kepala panah dan inti sel yang mengalami apoptosis ditunjukkan dengan gambar panah.

Tabel 1. Analisis Deskriptif Sel Ginjal *Rattus norvegicus* Galur *Sprague-dawley*

	Kontrol		Perlakuan 1 hari ke-7		Perlakuan 2 hari ke-11	
	Frekuensi	Persen	Frekuensi	Persen	Frekuensi	Persen
Lesi kurang dari 25%	7	100 %	0	0	0	0
Lesi 25-<50%	0	0	2	28,6 %	5	71,4 %
Lesi 50-<75%	0	0	5	71,4 %	2	28,6 %
Lesi lebih dari sama dengan 75%	0	0	0	0	0	0
Total	7	100 %	7	100 %	7	100 %

Berdasarkan Tabel 1, semua kelompok kontrol memiliki lesi yang kurang dari 25 % lapangan pandang. Pada perlakuan 1 hari ke-7 sebagian besar

sampel memiliki lesi sebesar 50-<75% total lapangan pandang, sedangkan pada perlakuan 2 hari ke-11 sebagian besar sampel memiliki lesi sebesar 25-<50% total lapangan pandang.

Data hasil skoring perubahan histopatologi *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* merupakan data dengan skala pengukuran ordinal, sehingga dapat langsung dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Hasilnya didapatkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$), artinya hipotesis kerja diterima dan terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap perubahan struktur histopatologi ginjal pada tiap-tiap kelompok, maka analisa data dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil analisa data dengan uji *Mann-Whitney* untuk uji beda antar kelompok didapatkan bahwa skor nilai derajat perubahan histopatologi ginjal antara kelompok kontrol dengan perlakuan 1 terdapat perbedaan bermakna dimana $p<0,05$ dengan nilai 0,01. Pada kelompok kontrol dengan perlakuan 2 juga terdapat perbedaan yang bermakna dimana $p>0,05$ dengan nilai 0,01. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2, terdapat perbedaan tetapi tidak bermakna dimana $p>0,05$ dengan nilai 0,122.

B. Pembahasan

Pada penelitian ini ditemukan perbedaan gambaran histopatologis ginjal *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang bermakna antar kelompok dengan $p=0.001$. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh dari hipoksia iskemik prenatal terhadap gambaran histopatologis ginjal *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley*. Hal ini didukung oleh temuan penelitian dalam analisis

deskriptif yang menyatakan bahwa pada kelompok perlakuan 1 terjadi kerusakan sel tubulus ginjal yang terberat daripada kelompok perlakuan lain. Sedangkan dalam analisis analitik antara kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2, ditemukan perbedaan pada analisa deskriptif, namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna dalam analisis inferensial atau analitik.

Oksigen merupakan salah satu zat utama yang dibutuhkan untuk reaksi kimia di dalam sel. Pada keadaan normal, sekitar 97% oksigen yang diangkut dari paru ke jaringan dibawa dalam campuran kimiawi dengan hemoglobin di dalam sel darah merah sisanya sebanyak 3% diangkut dalam bentuk terlarut dalam cairan plasma dan sel darah. Setiap sel membutuhkan oksigen untuk mengubah energi makanan menjadi ATP (*Adenosine Triphosphate*) yang siap pakai untuk kerja tiap sel (Guyton & Hall, 2012).

Bila jaringan tubuh tidak mendapatkan suplai oksigen yang cukup maka dapat timbul hipoksia. Pada hipoksia terjadi defisiensi oksigen yang mengakibatkan kerusakan sel akibat penurunan respirasi oksidatif aerob pada sel. Hipoksia merupakan penyebab penting dan umum dari cedera dan kematian sel namun tergantung pada beratnya keadaan hipoksia. Pada keadaan hipoksia sel dapat mengalami adaptasi, cedera, atau kematian (Kumar, 2006).

Periode paling penting dari manusia adalah selama masa perkembangan janin, tahap dimana sedikit saja paparan merugikan yang didapatkan oleh ibu dapat mempengaruhi perkembangan janin di masa yang akan mendatang. Dua faktor yang paling sering terjadi pada janin selama masa perkembangan adalah penurunan oksigen atau hipoksia dan pengiriman nutrisi. Oksigen yang cukup

diperlukan untuk perkembangan janin. Dalam rahim hipoksia dapat menyebabkan dampak buruk terhadap perkembangan janin (Ojeda, 2008).

Hipoksia prenatal juga dapat mempengaruhi proses perkembangan ginjal. Pada masa prenatal, hipoksia dapat mengganggu proses nefrogenesis, yang kemudian mengarah ke penurunan jumlah nefron berfungsi yang dimiliki tiap individu ketika lahir. Selain itu, hipoksia prenatal mempengaruhi sistem renin-angiotensin janin dan hemodinamik ginjal janin, yang mengarah ke hipertensi pada anak. Malnutrisi selama kehamilan dapat menyebabkan perkembangan yang abnormal pada ginjal dan mengurangi jumlah nefron. Perkembangan abnormal yang terjadi antara lain adalah proses penuaan ginjal dikaitkan dengan perubahan fisiologis dan fungsional, termasuk penurunan berat ginjal dan jumlah glomerulus (Nangaku, 2006).

Penelitian mengenai perubahan histopatologis pada sel tubulus ginjal yang telah diinduksi hipoksia telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan adanya perubahan fisiologi ginjal, penurunan berat badan dan organ dan tubulus ginjal. Pada penelitian ini, antara kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2, ditemukan perbedaan pada analisa deskriptif, namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna dalam analisis inferensial atau analitik. Hal ini dapat berhubungan dengan proses nefrogenesis pada tikus yang bermula pada masa awal kehamilan, dan berakhir pada postnatal hari ke-4 (Larsson *et al.*, 1980). Pada masa awal kehamilan oksigen sangat dibutuhkan untuk membantu proses organogenesis. Jika terjadi hipoksia pada janin maka

dapat mengganggu perkembangan ginjal janin dan mempercepat proses penuaan ginjal pada perkembangan postnatal (Xia *et al.*, 2014).

Tubulus proksimal merupakan bagian ginjal yang aktif pada aktifitas absorpsi maupun sekresi sehingga sering mendapatkan paparan tertinggi dari zat toksik. Segmen tubulus sebagian besar mempunyai kapasitas yang terbatas terhadap energi yang bersifat anaerobik sehingga tergantung pada oksigen dalam memelihara reabsorpsi aktif solut transtubulus. Hipoksia akan mengakibatkan kerusakan pada tubulointerstisial ginjal melalui banyak cara. Hipoksia dapat mengaktifasi fibroblas, perubahan metabolisme matriks ekstrasel pada sel-sel ginjal, dan fibrogenesis. Aktifasi interstitial fibrosis akibat hipoksia dan peningkatan deposit matriks ekstrasel akan mengakibatkan gangguan aliran darah dan asupan oksigen. Sel tubulus ginjal yang mengalami hipoksia akan lebih mudah mengalami gangguan fungsi mitokondria dan defisit energi yang menetap, hal ini kemudian akan menyebabkan apoptosis tubulus ginjal (Nangaku, 2006). Perubahan pada tubulus di penelitian ini berupa apoptosis, degenerasi hidropis, degenerasi hyalin, kongesti, dan adanya endapan protein di lumen. Perubahan histopatologi ini disebabkan paparan hipoksia yang bersifat nefrotoksik.

Pada tubulus yang berdilatasi ditemukan epitel dengan sitoplasma yang mengalami degenerasi hyalin. Degenerasi hyalin biasanya berhubungan dengan peradangan pada tubuli yang disebabkan iskemia atau racun. Butiran hyalin akan tampak berwarna merah cerah yang bersifat homogen. Perubahan ginjal yang berupa degenerasi hyalin disajikan pada Gambar 5.

Degenerasi hidropis merupakan suatu keadaan dimana pada sitoplasma sel terdapat air. Hilangnya kontrol air disebabkan oleh kerusakan pompa sodium, dimana jumlah ion Na yang masuk ke dalam sel berlebihan. Hal ini menyebabkan air banyak masuk ke dalam sel. Pada awalnya air terakumulasi di sitosol dan sisterna retikulum endoplasma. Namun seiring berjalannya waktu seluruh sel membengkak (Barnett *et al.*, 1999). Degenerasi hidropis disebabkan oleh ketidak cukupan sel terhadap makanan dan ketuaan individu secara keseluruhan atau jaringan tertentu. Pada penelitian ini degenerasi hidropis disebabkan oleh hipoksia yang bersifat toksik (Suyanti, 2008). Secara mikroskopik sel terlihat mengandung ruangan-ruangan yang jernih yang mengelilingi inti tetapi tidak sejernih glikogen atau lemak (Barnett *et al.*, 1999).

Degenerasi hidropis ginjal diakibatkan oleh induksi hipoksia yang bersifat toksik. Induksi hipoksia ini menyebabkan hilangnya pengaturan volume pada bagian-bagian sel. Agar kestabilan lingkungan internal terjaga, sel harus mengeluarkan energi metabolik untuk memompa ion natrium keluar dari membran dan ion kalium masuk ke dalam membran. Hal yang dapat mengganggu metabolisme energi dalam sel atau sedikit saja melukai membran sel menyebabkan sel tidak mampu memompa natrium dengan baik. Hal ini menyebabkan kenaikan konsentrasi natrium dan influks air ke dalam sel. Mekanisme ini menyebabkan perubahan yang disebut pembengkakan sel. Perubahan ini menjelaskan bahwa sewaktu air terakumulasi dalam sitoplasma, organel sitoplasma juga menyerapnya sehingga menyebabkan pembengkakan

di mitokondria dan pembesaran retikulum endoplasma (Barnett *et al.*, 1999). Degenerasi hidropis merupakan gambaran utama dari perubahan sel akut dimana sel kehilangan kontrol terhadap air sehingga menyebabkan sel bengkak. Kerusakan akut terjadi akibat gangguan pada epitel tubulus oleh infeksi, efek toksin secara langsung atau iskhemia. Respon kerusakan setelah degenerasi hidropis diikuti oleh nekrosa dan deskuamasi sel epitel tubulus. Degenerasi dalam patologi dapat didefinisikan secara luas sebagai kehilangan struktur dan fungsi normal sel (Spector *et al.*, 1993) (Confer *et al.*, 1995). Degenerasi juga dapat diartikan sebagai gangguan mekanisme pemompaan natrium sehingga terjadi penimbunan cairan intraseluler. Degenerasi menunjukkan gangguan biokimiawi sel yang dapat disebabkan oleh iskhemik, metabolisme abnormal, zat kimia. Epitel tubulus yang mengalami degenerasi hidropis disajikan pada Gambar 5.

Endapan protein pada lumen tubulus disebabkan oleh malfungsi glomerulus akibat rusaknya struktur membran kapiler. Struktur membran kapiler yang rusak meningkatkan permeabilitas filter, sehingga protein dengan molekul besar dan albumin plasma dapat menerobos keluar memasuki filtrat. Kelainan pada sistem filter glomerulus dapat berupa hilangnya kaki podosit (sel epitel) glomerulus. Berbagai komponen yang berkemampuan merusak filter glomerulus diantaranya bahan toksik, molekul bermuatan atau kompleks imun. Lolosnya protein dapat menimbulkan kondisi proteinuria. Selain itu, gangguan reabsorpsi karena melebihi ambang batas kemampuan atau rusaknya epitel tubulus dapat juga menjadi penyebab hadirnya endapan protein di

tubulus. Faktor lain yang menjadi penyebab adanya protein dalam lumen tubuli adalah gangguan fungsi enzim lysosom epitel tubuli yang diakibatkan oleh akumulasi bahan yang bersifat merusak (Spector *et al.*, 1993). Bila degradasi protein yang diserap secara enzimatik terganggu maka akan menimbulkan residu protein yang tersisa baik dalam lumen maupun pada sel epitel. Adanya endapan protein ditandai dengan massa berwarna merah muda pada pewarnaan HE (Gambar 6).

Kejadian apoptosis juga diikuti dengan adanya endapan protein di lumen tubulus. Keadaan ini kemungkinan disebabkan menurunnya kemampuan absorpsi tubulus atau terlalu banyaknya protein yang harus diserap kembali oleh tubulus. Menurunnya kemampuan absorpsi tubulus dikarenakan epitel tubulus telah mengalami degenerasi hingga apoptosis. Adanya endapan protein di tubulus disebabkan peningkatan tekanan osmotik koloid cairan interstitium sehingga mengganggu filtrasi glomerulus dan reabsorpsi tubulus. Al-Khafaji yang lolos dari glomerulus tidak dapat diserap dengan sempurna oleh epitel-epitel tubulus sehingga terjadi penumpukan protein di lumen tubulus (Al-Khafaji & Corwin, 2001).

Apoptosis yang terjadi pada sel epitel tubuli ginjal tikus diduga diakibatkan formulasi insektisida yang bersifat nefrotoksik. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram (programmed cell death) serta terjadi pada dua kondisi yaitu kondisi fisiologis (normal) atau patologis (abnormal). Apoptosis fisiologis dapat terjadi pada proses pertumbuhan, sedangkan apoptosis patologis biasanya terjadi pada lesio akibat agen infeksius atau toksin

Pada apoptosis terjadi peristiwa pengaktifan beberapa gen untuk membentuk enzim baru seperti enzim endonuklease. Enzim ini bersifat dapat memecah DNA inti. Sel kemudian akan terbagi menjadi bagian-bagian kecil yang disebut badan apoptosis. Sebuah badan apoptosis akan terdiri dari hasil pecahan inti dan organel-organel yang tidak lengkap. Badan apoptosis ini yang kemudian akan difagosit oleh makrofag (Barnett *et al.*, 1999).

Pada umumnya paparan rendah hipoksia hanya dapat mengakibatkan perubahan fisiologis dari tubulus proksimal saja, namun pada paparan tinggi perubahan morfologi juga dapat terjadi. Terdapat dua perubahan morfologi yang sering terjadi pada ginjal adalah perubahan morfologi yang reversibel dan ireversibel. Perubahan reversibel antara lain adalah degenerasi sel tubulus dan inflamasi sel tubulus, sedangkan perubahan ireversibel dari sel tubulus antara lain adalah atrofi atau dilatasi lumen, fibrosis sel tubulus, dan yang paling berat adalah nekrosis sel tubulus. Perubahan ireversibel biasanya ditandai dengan hilangnya *brush border* dan inti sel memipih (Al-Khafaji & Corwin, 2001).