

Efek Ekstrak Daun Singkong terhadap Perbaikan Struktur dan Fungsi Ginjal Mencit yang Diinduksi Gentamisin

Study of Kidney Repair Mechanism of Cassava Leaf Extract on Gentamicin induced Nephrotoxicity

Rena Normasari¹, Rosita Dewi², Sheilla Rachmania³

¹Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

²Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

e-mail korespondensi: rena_normasari@unej.ac.id

Abstrak

Konsumsi obat-obatan seperti gentamisin dapat menyebabkan kerusakan dan penurunan fungsi ginjal. Daun singkong banyak mengandung mikronutrien, seperti vitamin C, vitamin A, dan karotenoid, yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Hasil penelitian yang pernah dilakukan oleh Almashuri membuktikan bahwa daun singkong mempunyai kadar senyawa karotenoid yang tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun singkong terhadap perbaikan fibrosis ginjal mencit secara *in vivo*. Penelitian ini merupakan *true experimental* dimana menggunakan hewan coba mencit (*mus musculus*) yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara acak. Kelompok-kelompok tersebut adalah 2 kelompok kontrol (positif dan negatif) dan 3 kelompok perlakuan (daun singkong 150, 300, dan 450 mg/hari). Pada kelompok kontrol positif dan perlakuan mencit dibuat model fibrosis ginjal dengan cara memberikan gentamisin 80 mg/kgBB/hari. Perlakuan dilakukan setiap hari selama 14 hari kemudian diamati kadar serum kreatinin beserta skor kerusakan histopatologi ginjalnya. Analisis statistik menunjukkan adanya penurunan bermakna kadar serum kreatinin ($p < 0.05$) dan penurunan bermakna skor histopatologis ginjal. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong dapat memperbaiki kerusakan ginjal akibat fibrosis ginjal pada mencit.

Kata kunci : ekstrak daun singkong, kreatinin, histopatologi ginjal

Abstract

*Drugs consumption like gentamicin caused damage and decreased of kidney function. Cassava leaf contain lots of micronutrients, such as vitamin C, vitamin A and carotenoids, which also as an antioxidant. The results of the study conducted by Almashuri proved that cassava leaf have high levels of carotenoid compounds. The purpose of this study was to determine the effect of cassava leaf extract on the repairment of renal damage in mice *in vivo*. This research is true experimental using mice (*mus musculus*) and were grouped into 5 groups. Two control groups (positive and negative) and 3 treatment groups (cassava leaves 150, 300, and 450 mg / day). Gentamicin is given every day for 14 days and then observed on serum levels of creatinine along with histopathological scores of kidneys' damage. Statistical analysis showed a significant reduction in serum levels of creatinine ($P < 0.05$) and a significant decrease in renal histopathologic score. This study suggests that cassava leaf extract can repair kidney damage as a result gentamicin-induced nephrotoxicity in mice.*

Keywords: cassava leaf extract, creatinin, kidney histopathology

Pendahuluan

Penyakit ginjal kronis merupakan satu masalah kesehatan dunia di bidang nefrologi dengan etiologi luas dan angka kejadian tinggi. Penyakit ini ditandai dengan penurunan laju filtrasi glomerulus, yaitu kurang dari 60 ml/menit selama lebih dari tiga bulan atau rasio albumin urin : kreatinin lebih dari 30 mg/g (USRDS, 2011). Berdasarkan data *4th Report of Indonesian Renal Registry*, dua etiologi utama penyakit ginjal kronis adalah hipertensi (34%) dan nefropati diabetikum (27%) (Pernefri, 2011). Hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2013 menunjukkan prevalensi penyakit ginjal kronis di Indonesia adalah 0,2%, sedangkan prevalensinya di Amerika Serikat pada usia 60 tahun atau lebih meningkat dari 18,8% pada tahun 2003 menjadi 24,5% pada tahun 2006 (USRDS, 2011). Proses perjalanan penyakit ginjal kronis diawali dengan inflamasi glomerulus, diikuti jejas sel epitel tubulus, dan terbentuknya jaringan fibrotik sebagai manifestasi akhir (Cho, 2010; Trihono, 2011).

Salah satu zat yang dapat menyebabkan kerusakan ginjal di antaranya adalah antibiotik golongan aminoglikosida, seperti misalnya gentamisin. Gentamisin merupakan antibiotik yang banyak digunakan di masyarakat dan memiliki spektrum yang luas. Namun, di sisi lain gentamisin juga memiliki efek nefrotoksik yang dapat mengganggu fungsi ginjal. Gentamisin dapat berikatan dengan lisosom membentuk badan mieloid. Hal ini menyebabkan membran lisosom menjadi mudah pecah dan dapat melepaskan asam hidrolase yang dapat menyebabkan kematian sel (Rosmiati dan Gan, 2003)

Antioksidan alami yang telah diteliti memiliki efek nefroprotektif antara lain vitamin E dan air rebusan kacang kedelai. Sumber alami lain yang juga banyak mengandung antioksidan adalah daun singkong. Daun singkong, dapat dijumpai sehari-hari dalam kehidupan yang digunakan sebagai sayur dalam hidangan makanan mengandung mikronutrien, seperti vitamin C, vitamin A, dan karotenoid, yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Hasil penelitian yang pernah dilakukan oleh Almasyhuri (2007), menerangkan bahwa daun singkong mempunyai kadar senyawa karotenoid yang tinggi. Setiap 100 gr daun singkong mengandung 14.733 ug beta karoten. Sejauh ini penelitian tentang efek nefroprotektif daun singkong pada ginjal masih terbatas. Oleh karena itu, penulis termotivasi untuk mendukung pengembangan antioksidan alami sebagai agen nefroprotektif dengan meneliti pengaruhnya pada struktur histopatologi ginjal serta fungsi ginjal yang

dapat diamati pada kandungan serum kreatininnya.

Metode Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus mencit jantan umur 2-3 bulan dengan berat rata-rata 20 gram. Besar sampel adalah 25 ekor. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Sampel mencit dibagi ke dalam 5 kelompok; kelompok normal, kelompok kontrol, kelompok P1 (gentamisin+ekstrak daun singkong 150 mg/kgBB/hari), kelompok P2 (gentamisin+ekstrak daun singkong 300 mg/kgBB/hari), serta kelompok P3 (gentamisin+ekstrak daun singkong 450 mg/kgBB/hari). Mencit diberi perlakuan setiap hari selama 14 hari. Variabel penelitian adalah kadar serum kreatinin mencit serta gambaran histopatologi ginjal mencit.

Analisa Data

Data yang didapat dimasukkan dalam tabel dan disajikan dalam bentuk grafik. Berdasarkan skala data, jumlah variabel, distribusi data, homogenitas variansi dan rancangan penelitian yang digunakan, maka data yang didapatkan selanjutnya dianalisis dengan uji One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui adanya perbedaan dalam kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan.

Hasil Penelitian

Data hasil kadar kreatinin serum mencit didapatkan seperti pada tabel 1. dari data tersebut kemudian dilakukan uji normalitas. Hasil uji normalitas Kolmogorov-smirnov didapatkan bahwa data pada kelima kelompok tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya data dapat diuji dengan statistik parametrik. Hasil uji ANOVA didapat nilai signifikansi 0,004. Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan di antara kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan, analisa data dilanjutkan dengan menggunakan post hoc tukey.

Dari hasil post hoc didapatkan bahwa antara kelompok normal dan kelompok kontrol mempunyai perbedaan yang bermakna, dengan nilai signifikansi 0,004. Kemudian antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 mempunyai perbedaan yang tidak bermakna dengan nilai signifikansi 0,105. Dari hasil analisa tersebut menunjukkan bahwa pemberian gentamisin dapat

meningkatkan kadar serum kreatinin secara bermakna. Sedangkan pemberian ekstrak daun singkong mampu mengembalikan kadar serum kreatinin seperti kelompok normal.

Tabel 1 Rata – rata kadar serum kreatinin mencit

Kelompok	Kadar serum kreatinin
N	0,1666 ± 0,00022
K	1,0998 ± 0,15538
P1	0,4332 ± 0,03749
P2	0,3326 ± 0,00022
P3	0,2666 ± 0,03727

Setelah mengetahui perbandingan pada setiap kelompok, data hasil kadar kreatinin dilanjutkan untuk dianalisa dengan menggunakan uji regresi. Diperoleh angka signifikansi sebesar 0,003 ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa penambahan dosis ekstrak daun singkong berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan kadar serum kreatinin pada mencit. Melalui uji korelasi pearson diperoleh nilai $R = 0,627$. Angka ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak daun singkong akan membuat kadar serum kreatinin semakin menurun.

Selanjutnya, pengamatan terhadap preparat histopatologi ginjal. Kerusakan histopatologi dinilai kerusakannya dengan menggunakan skor seperti pada tabel 2. kerusakan struktur ginjal meliputi atrofi tubulus, dilatasi tubulus, inflamasi interstitial, fibrosis, serta nekrosis.

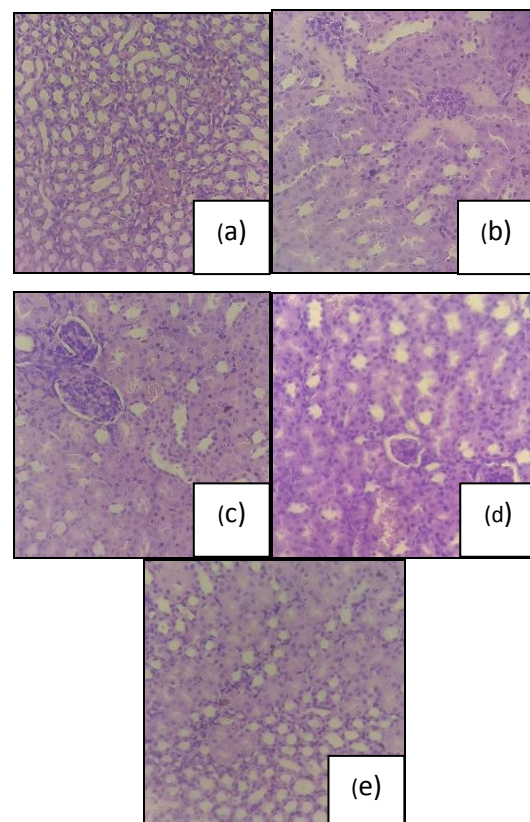
Tabel 2 Skor penilaian histopatologi ginjal

Presentase kerusakan	Skor kerusakan ginjal
0%	0
≤ 10%	1
11 – 25%	2
26 – 45%	3
46 – 75%	4
75%	5

Dari data tersebut kemudian dianalisa menggunakan SPSS. Dari uji normalitas didapatkan bahwa data terdistribusi normal. Selanjutnya dilanjutkan analisa menggunakan one way anova, untuk mengetahui adanya perbedaan di dalam kelompok. Dari hasil one way anova didapatkan

nilai signifikansi 0.00, artinya ada perbedaan yang bermakna di dalam kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda, dilakukan uji post hoc tukey.

Dari hasil uji tukey HSD diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok normal terhadap kelompok kontrol ($p = 0.00$); antara kelompok kontrol terhadap kelompok perlakuan 3 ($p = 0.018$). Sedangkan antara kelompok kontrol terhadap kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 didapatkan perbedaan yang tidak bermakna dengan nilai signifikansi masing – masing $p = 0.776$ dan $p = 0.183$. Selanjutnya antara kelompok normal dan kelompok perlakuan 3 didapatkan hasil yang berbeda secara bermakna ($p = 0.00$).

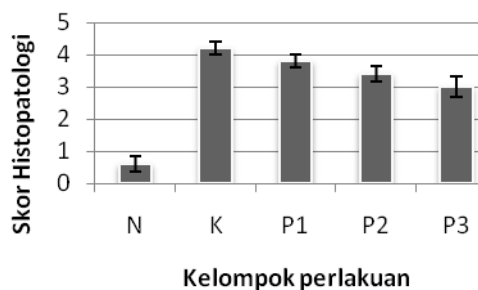


Gambar 1. Histopatologi Ginjal. (a) kelompok normal, (b) kelompok kontrol, (c) kelompok P1, (d) kelompok P2 (e) kelompok P3

Dari hasil analisa di atas menunjukkan bahwa induksi gentamisin dapat mengakibatkan kerusakan struktur histopatologi ginjal yang cukup bermakna. Sedangkan pemberian ekstrak daun singkong cukup dapat memperbaiki kerusakan struktur histopatologi ginjal secara bermakna,

dengan nilai skor yang semakin mendekati skor pada kelompok normal.

Analisa data dilanjutkan dengan uji regresi. Hasil uji regresi digunakan untuk mengetahui adanya hubungan antara besarnya dosis ekstrak daun singkong dengan derajat kerusakan histopatologi ginjal. Diperoleh angka signifikansi sebesar 0.01 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa penambahan dosis ekstrak daun singkong berpengaruh secara bermakna terhadap derajat kerusakan histopatologi ginjal. Sedangkan nilai koefisien determinan (R^2) pada uji ini diperoleh sebesar 0.455 atau sebesar 45.5% derajat kerusakan histopatologi ginjal dipengaruhi oleh besarnya dosis ekstrak daun singkong dan sebanyak 54.5% dipengaruhi oleh faktor lain.



Gambar 2 Hubungan dosis ekstrak daun singkong dengan skor kerusakan histopatologi ginjal

Keterangan:

N = kelompok normal

K = kelompok kontrol

P1 = gentamisin + ekstrak daun singkong 150mg/ml

P2 = gentamisin + ekstrak daun singkong 300mg/ml

P3 = gentamisin + ekstrak daun singkong 450mg/ml

Melalui uji korelasi pearson diperoleh nilai $R = 0.674$. Angka 0.674 menunjukkan kekuatan hubungan antara derajat kerusakan histopatologi ginjal dan besarnya dosis ekstrak daun singkong, dikatakan kuat jika $R > 0,5$. Sedangkan tanda negatif menyatakan hubungan yang berbanding terbalik antara dosis ekstrak daun singkong dan derajat kerusakan histopatologi ginjal, yang berarti bahwa semakin besar dosis ekstrak daun singkong akan semakin menurunkan skor kerusakan histopatologi ginjal, dimana semakin kecil skor semakin minimal kerusakan yang dialami oleh ginjal

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh ekstrak daun singkong terhadap fungsi dan struktur ginjal mencit yang diinduksi gentamisin.

Gentamisin merupakan salah satu golongan antibiotik jenis aminoglikosida yang mempunyai efek samping nefrotoksik. Toksisitas aminoiglikosida dimediasi oleh gangguan pada sintesis protein mitokondria dan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas ini akan mengaktifasi sintesis nitrit oksida sehingga akan meningkatkan konsentrasi nitrit oksida.

Radikal bebas seperti radikal Nitrit Oksida (NO^*), jika berikatan dengan O_2 (metabolisme aerobik) akan dihasilkan *Radikal Superoksida* (O_2^*) yang sangat reaktif. *Radikal Superoksida* (O_2^*) yang terbentuk akan diubah oleh enzim *Superoksid dismutase (SOD)* dalam tubuh menjadi Hidrogen Peroksida (H_2O_2). Hidrogen Peroksida (H_2O_2) bukan merupakan radikal bebas tetapi dapat mengawali terbentuknya radikal bebas yang lain (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Kerusakan pada ginjal akibat radikal bebas yang ditimbulkan oleh gentamisin dibuktikan pada penelitian ini dengan mengamati fungsi ginjal yang berkurang dan struktur histopatologi ginjal yang mengalami kerusakan. Adanya penurunan fungsi ginjal dilihat dari kadar serum kreatinin yang mengalami peningkatan. Pada penelitian ini dibuktikan bahwa pemberian induksi gentamisin dapat meningkatkan kadar serum kreatinin yang bermakna dibandingkan dengan kelompok normal. Hasil ini juga dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Patil et al (2010) yang juga menyatakan bahwa pemberian gentamisin dapat meningkatkan kadar serum kreatinin pada tikus.

Demikian pula dengan pengamatan terhadap struktur histopatologi ginjalnya. Struktur histopatologi ginjal diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan memakai skor kriteria Venient. Pada kriteria ini sel ginjal yang sehat diberi angka 0. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian gentamisin meningkatkan skor yang berbeda secara bermakna dengan kelompok normal.

Aktivitas radikal bebas dari gentamisin yang berlebihan ini dapat dinetralsir oleh pemberian antioksidan dari luar seperti daun singkong. Daun singkong merupakan sayuran hijau gelap yang banyak mengandung antioksidan seperti beta karoten dan vitamin C. Beta karoten dan asam askorbat (vitamin C) merupakan antioksidan non enzimatik. Struktur kimianya memiliki kelebihan elektron dan dapat memberikan elektron kepada partikel radikal bebas yang kekurangan elektron sehingga partikel radikal bebas tersebut menjadi lebih stabil.

Daun singkong kaya akan senyawa karotenoid, yang terbungkus dalam kantung pigmen hijau daun (klorofil). Makin pekat warna sayuran, makin tinggi kandungan karotenoidnya. Didalam tubuh, karotenoid ini akan mengaktifkan enzim fase-2, yang berfungsi membersihkan bahan-bahan kimia dalam tubuh pemicu kanker. Sayuran hijau sangat bermanfaat bagi tubuh, karena kandungan karotenoidnya bukan karotenoid tunggal. Namun merupakan kumpulan dari beberapa karotenoid aktif, seperti betakaroten. Beta karoten dalam tubuh ini berfungsi sebagai antioksidan. Selain betakaroten sayuran hijau juga kaya akan vitamin dan mineral lainnya, misal vitamin C, Fe dan protein (Apriadji, 2001).

Sedangkan vitamin C (asam askorbat) mempunyai kemampuan untuk mereduksi suatu senyawa kimia, misalnya Fe(III) menjadi Fe²⁺. Selain itu asam askorbat juga merupakan *scavenger* yang kuat terhadap O₃ dan NO₂* dalam cairan tubuh manusia. Asam askorbat dapat mencegah kerusakan oleh radikal bebas yang ditimbulkan oleh serangan radikal OH* dan ROO*, juga dapat menghambat peroksidasi lemak yang diinduksi oleh campuran hemoglobin atau mioglobin dengan H₂O₂: askorbat akan mereduksi haem Fe(IV) kembali menjadi Fe²⁺. Selain itu juga dapat melindungi membran dan lipoprotein melawan peroksidasi lipid yang diinduksi oleh senyawa yang terdapat pada gentamisin (Halliwell dan Gutteridge, 2008).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun singkong dapat memperbaiki kerusakan ginjal akibat induksi gentamisin, baik dari segi struktur yang dilihat dari penurunan skor ataupun fisiologis fungsi ginjalnya. Perbaikan fungsi ginjal dapat dilihat dari penurunan kadar serum kreatinin yang signifikan dibandingkan dengan kelompok normal.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Dana DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2015 dengan nomor SP.DIPA-042.01.2.400922/2016.

Daftar Pustaka

Almasyhuri. 2007. *Potensi Daun Singkong Kering Sebagai Sumber Vitamin Untuk Anak Pra Sekolah*, dalam Abstrak PGMI.

Apriadji, W. Harry. 2001. *Mengkudu Diantara Sayuran Lain*, Sedap Sekejap edisi 5/II-Mei 2001. (Online) (<http://www.ekafood.com/sayur.htm>)

Bendich, Adrienne. 2004. From 1989 – 2001 : What Have We Learned About the “Biological Actions of Betacarotene?”. *American Society for Nutritional Science*. J. Nutr. 134: 225S-230S (Online) (www.nutrition.org/cgi/search)

Cho, M. H. 2010. Renal Fibrosis. *Korean J Pediatr*. 53(7):735-40. doi: 10.3345/kjp.2010.53.7.735.

Chow, K, Ching. 2001. *Vitamin and Related Dietary Antioxidant in Trace Element micronutrient and Free Radical*. Dalam Ivor E Dreosti (Eds.) New Jersey, USA : Human Press Totawa

De Souza VB, de Oliveira RF, de Lucena HF, Ferreira AAA, Guerra GCB Freitas ML, et al. Gentamicin Induces renal Morphopathology in Wistar Rats. *Int. J. Morphol*. 2009;27(1):59-63.

Dehghani F, Namavar MR, Noorafshan, Karbalay-Doust, Esmaeilpour T. Evaluation of the kidney extract on gentamicin induced-nephrotoxicity in rat. *Kidney Research Journal*. 2011;1(1):24-32.

Guillermo HA, Xin G. *Medical diseases of the Kidney*. In: Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, Livolsi VA, Wich MR, editors. *Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*, Vol 2 (Fourth Edition). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006; p.485.

Halliwell, Barry dan Gutteridge, John. 2008. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford : Oxford Science Publication

Hewitson, T.D. 2012. Fibrosis in the kidney: Is a problem shared a problem halved? *Fibrogenesis Tissue Repair* 5 Suppl. 1: S14.

Himmelfarb, J. 2005. Hemodialysis Complications. *American Journal of Kidney Diseases* Vol 45(6): 1122-1131.

Jandacek, J. Ronald. 2000. The Canary In The Cell: A Sentinel Role For Betacarotene. *American Society For Nutritional Sciences Journal Clinical*. J. Nutr. 130: 648-651 (Online). (www.nutrition.org/cgi/search)

Liu, R-M. and Pravia K.A.G. 2010. Oxidative stress and Glutathione in TGF-β-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*. Vol. 48(1):

1. doi:10.1016/ j.freeradbiomed. 2009.09.026.
- Maestro. 2001. Trace Element, micronutrient and Free Radical, *Free Radical As Mediators of Tissue Injury*. Dalam Ivor E Dreosti (Eds). New Jersey, USA: Human Press Totawa
- McDermott, June H. 2000. Antioxidant Nutrient : Current Dietary Recommendation and Research Update. *Journal of The American Pharmaceutical Association*. J. Am. Pharm. Assoc. 40 (6): 785-799. (Online). (www.medscape.com/viewarticle/406705)
- Morin JP, Viotte G, Vandewalle A, Van Hoof F, Tulkens P, Fillastre JP. Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach. *Kidney International*. 1980;18:583-90.
- National center for chronic disease prevention and health promotion. 2014. National chronic kidney disease fact sheet. http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/kidney_factsheet.pdf.
- Patil CR, Jadhav RB, Singh PK, Mundada S, and Patil PR. 2010. Protective Effect of Oleonic acid on Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Rats. *Phytotherapy Research* 24 (1): 33 - 37
- Perkumpulan Nefrologi Indonesia (Pernefri). 2011. *4th Report of Indonesian Renal Registry*. <http://www.pernefriinasn.org/Laporan/4th%20Annual%20Report%20Of%20IRR%202011.pdf>.
- Rahardja dan Tjay. 2002. *Obat-obat Penting dan Efek-efek Sampingnya*. Jakarta: PT Elex Media Computindo
- Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Volume II (Ninth Edition)*. London: Mosby, 2004; p.1159-63.
- Rosmiati, H. dan Gan, V.H.S. 2003. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Gaya Baru.
- Strutz, F. 2014. Antifibrotic Therapy: Is an Antioxidative Regimen the Answer? *J Am Soc Nephrol* 25: 3-5. doi: 10.1681/ASN.2013101034.
- Trihono, P.P. 2011. Peran Transforming Growth Factor- β 1 pada Penyakit Ginjal. *Sari Pediatri* Vol. 13(1): 49-54.
- United States Renal Data System (USRDS). 2011. *Kidney Disease Statistic for the United States*. <http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/Pages/kidney-disease-statistics-united-states.aspx#4>.