

**PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP EKSPRESI
GEN CASPASE-3 DAN EKSPRESI GEN TNF- α GINJAL PADA
KERACUNAN TIMBAL**

Studi in vivo Tikus diinduksi Timbal Asetat

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister (S2)



Disusun Oleh:

Hesti Purwaningsih

MBK. 2016010199

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2022

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP EKSPRESI GEN
CASPASE-3 DAN EKSPRESI GEN TNF- α GINJAL PADA KERACUNAN
TIMBAL**

Studi *in Vivo* Tikus diinduksi Timbal Asetat

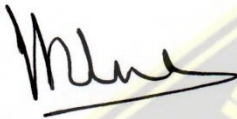
Diajukan oleh :

Hesti Purwaningsih

MBK. 2016010199

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,



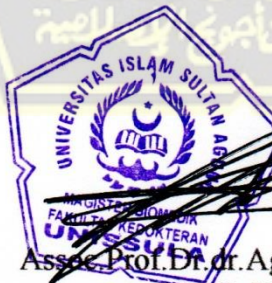
Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes
NIK. 220198045


Pembimbing II,



Dr. dr. Chodidjah, M.Kes
NIK. 210186023

Mengetahui,
Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula




Asst. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, September 2022



(Hesti Purwaningsih)



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis berjudul, **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SELEDRI TERHADAP EKSPRESI GEN TNF- α DAN EKSPRESI GEN CASPASE-3 GINJAL PADA KERACUNAN TIMBAL (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Terpapar Timbal Asetat 14 Hari)”** ini dapat terselesaikan.

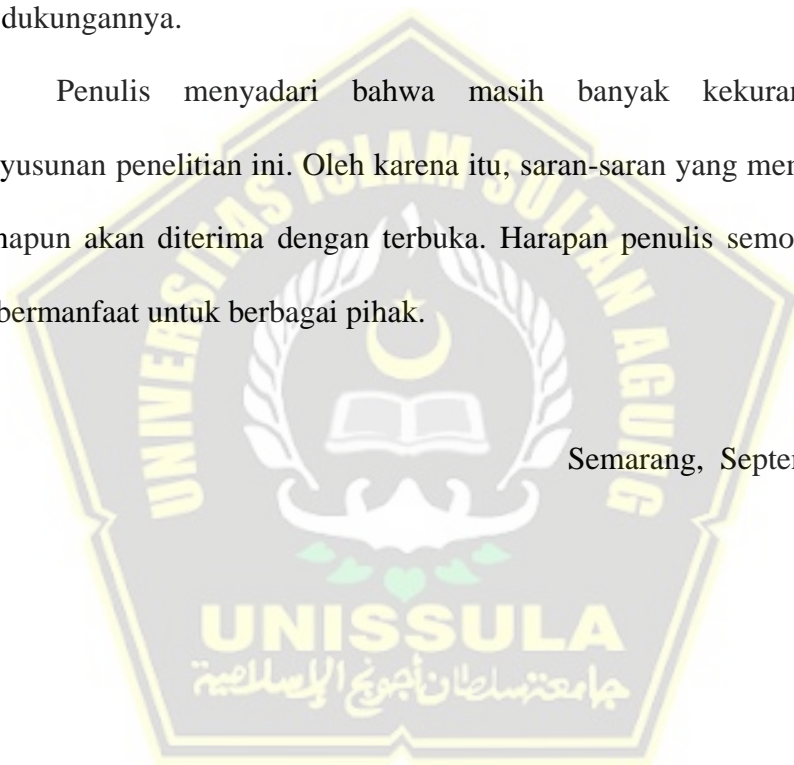
Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rector yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Dr.Ir.Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.

5. Dr.dr.Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, September 2022



ABSTRAK

Latar belakang: Akumulasi Timbal dalam tubuh berkontribusi terhadap stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan DNA sel sehingga memicu inflamasi yang ditandai dengan peningkatan sitokin inflamasi, termasuk TNF- α dan berujung pada apoptosis sel pada beberapa organ, termasuk sel pada organ ginjal. Kematian sel ginjal yang ditandai dengan peningkatan ekspresi Caspase 3 dapat mengurangi fungsi ginjal yang dapat diketahui dari adanya proteinuria pada urin. Penelitian terdahulu melaporkan antioksidan seperti vitamin E dan beberapa jenis tumbuhan seperti Seledri (*Apium graveolens L*) diketahui dapat mengurangi stres oksidatif. Namun demikian, peran Seledri dalam menghambat kerusakan ginjal akibat keracunan timbal yang dilihat dari ekspresi Caspase 3 ginjal dan ekspresi gen TNF- α masih belum dikaji. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pemberian ekstrak seledri terhadap ekspresi tnf alpha dan ekspresi caspase 3 pada ginjal tikus yang terpapar timbal

Metode : Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan hewan coba dengan metode rancang acak lengkap. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah pemeriksaan PCR ekspresi tnf alpha dan ekspresi caspase 3. Penelitian ini terdiri dari empat kelompok perlakuan yaitu kelompok sehat, kontrol negatif, kontrol positif dengan vitamin e dan perlakuan ekstrak seledri, dengan induksi timbal asetat. Data dianalisa dengan dua metode yaitu parametrik (one way anova) dan non parametrik (Kruskal wallis)

Hasil : Pada penelitian ini diperoleh hasil ekspresi gen TNF alpha pada kelompok perlakuan lebih rendah (3.13 ± 0.34) dari pada kontrol negatif (3.87 ± 0.09), namun ekspresi gen pada kelompok kontrol positif (2.13 ± 0.26) memiliki p value < 0.05 lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus yang terpapar timbal asetat.

Kata kunci: Seledri, TNF- α , caspase 3, timbal asetat

ABSTRACT

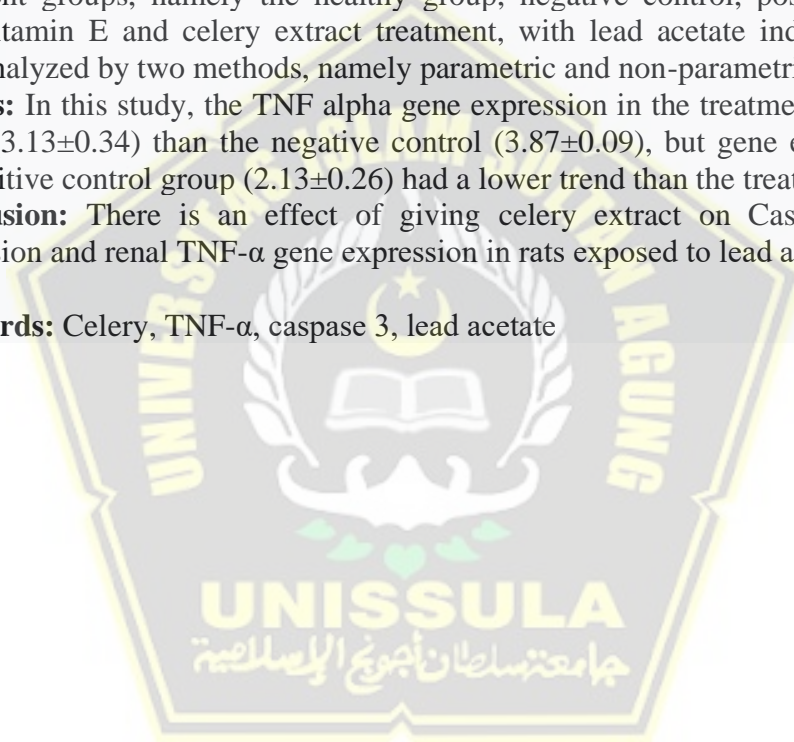
Background: Lead accumulation in the body contributes to oxidative stress that causes damage to cell DNA so that it triggers inflammation which is characterized by an increase in inflammatory cytokines, including TNF- α and leads to cell apoptosis in several organs, including cells in the kidney. Renal cell death which is characterized by increased expression of Caspase 3 can reduce kidney function which can be seen from the presence of proteinuria in the urine. Previous studies have reported that antioxidants such as vitamin E and several types of plants such as celery (*Apium graveolens* L) are known to reduce oxidative stress. However, the role of celery in inhibiting kidney damage due to lead poisoning as seen from renal Caspase 3 expression and TNF- α gene expression has not been studied.

Methods: This study was a post test only control group design with a completely randomized design method. The method used in this study was PCR examination of tnf alpha expression and caspase 3 expression. This study consisted of four treatment groups, namely the healthy group, negative control, positive control with vitamin E and celery extract treatment, with lead acetate induction. Data were analyzed by two methods, namely parametric and non-parametric.

Results: In this study, the TNF alpha gene expression in the treatment group was lower (3.13 ± 0.34) than the negative control (3.87 ± 0.09), but gene expression in the positive control group (2.13 ± 0.26) had a lower trend than the treatment group.

Conclusion: There is an effect of giving celery extract on Caspase 3 gene expression and renal TNF- α gene expression in rats exposed to lead acetate.

Keywords: Celery, TNF- α , caspase 3, lead acetate



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat penelitian.....	7
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	7
1.5.2. Manfaat Praktis.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Caspase-3.....	7
2.1.1. Definisi dan Peran Caspase dalam Apoptosis.....	7
2.1.2. Definisi Caspase-3.....	8
2.1.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis....	8
2.2. TNF- α	11
2.2.1. Definisi TNF- α	11
2.2.2. Aktivitas TNF- α	11
2.3. Logam Berat Timbal.....	12
2.3.1. Definisi dan Karakteristik Timbal.....	12
2.3.2. Prevalensi Keracunan Timbal.....	12

2.3.3.	Sumber Paparan Timbal.....	13
2.3.4.	Toksikokinetika Timbal pada Tubuh	13
2.4.	Vitamin E.....	16
2.5.	Toksikodinamika dan Toksikokinetika Timbal pada Ginjal	18
2.5.1.	Organ Ginjal.....	18
2.5.2.	Pengaruh Timbal terhadap Ginjal	19
2.5.3.	Prevalensi Keracunan Timbal pada Ginjal.....	21
2.5.4.	Mekanisme Nefrotoksisitas oleh Timbal	23
2.6.	Seledri.....	26
2.6.1.	Morfologi dan Habitat Tanaman Seledri.....	26
2.6.2.	Klasifikasi Tanaman Seledri	27
2.6.3.	Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri	28
2.6.4.	Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Radikal Bebas	30
2.6.5.	Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Caspase 3.....	33
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	34
3.1.	Kerangka Teori.....	34
3.2.	Kerangka Konsep	35
3.3.	Hipotesis	36
BAB IV	METODE PENELITIAN	37
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	37
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	38
4.2.1.	Variabel Penelitian	38
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	38
a.	Ekstrak Seledri	38
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	39
4.3.1.	Subyek Penelitian.....	39
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	39
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	40
4.3.4.	Besar Sampel.....	40
4.4.	Alat dan Bahan	40
4.4.1.	Alat.....	40
4.4.2.	Bahan.....	41

4.5.	Cara Penelitian.....	41
4.5.1.	Perolehan Ethical Clearance	41
4.5.2.	Cara Pembuatan Ekstrak Seledri.....	41
4.5.3.	Penetapan Dosis	41
4.5.4.	Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	42
4.5.5.	Pengambilan Sampel Jaringan	42
4.5.6.	Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF- α dan caspase-3 menggunakan RT-PCR	43
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	44
4.7.	Analisa Data	44
4.8.	Alur Penelitian.....	45
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		37
5.1.	Hasil Penelitian.....	37
5.1.1.	Profil fitokimia seledri	37
5.1.2.	Efek Pemberian seledri terhadap ekspresi gen TNF alpha.....	38
5.1.3.	Efek pemberian ekstrak seledri terhadap ekspresi gen caspase 3.....	40
5.2.	Pembahasan	42
5.3.	Kelemahan Penelitian.....	45
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		37
6.1.	Kesimpulan.....	37
6.2.	Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN		67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran Timbal dalam Apoptosis sel ²⁸	10
Gambar 2.2.	Efek Terendah yang Dapat Diamati dari <i>Blood Lead Level</i> (BLL) ⁶⁸	15
Gambar 2.3.	Ilustrasi Proses Manusia Terpapar Timbal dari Lingkungan dan Pengaruh Timbal terhadap Kesehatan Manusia. ⁵¹	16
Gambar 2.4.	Ekskresi Xenobiotik melalui Ginjal	19
Gambar 2.5.	Toksikodinamik Toksisitas Ginjal yang Diinduksi oleh Timbal ¹	25
Gambar 2.6.	Tanaman Seledri (<i>Apium graveolens Linn.</i>) ⁴	27
Gambar 2.7.	Struktur Kimia Kandungan Utama dalam Tanaman Seledri. ⁴	29
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	35
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	35
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.2.	Alur penelitian.....	45
Gambar 5.1.	Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA TNF alpha pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan $p < 0.05$	39
Gambar 5.2.	Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA caspase-3 pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan $p < 0.05$. ns menunjukkan perbedaan tidak signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan $p > 0.05$	41

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1.	Data hasil penelitian ekspresi gen TNF alpha dan caspase-3	38
Tabel 5.2.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD ekspresi mRNA TNF alpha antar kelompok perlakuan.....	39
Tabel 5.3.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD ekspresi mRNA caspase-3 antar kelompok perlakuan.....	41



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
APAF1	: <i>apoptotic protease activating factor 1</i>
BAX	: <i>Bcl-2-associated X</i>
BBB	: <i>blood-brain barrier</i>
BBL	: <i>blood lead level</i>
BCB	: <i>blood-cerebrospinal fluid barrier</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma-2</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
(Cyt-C)	: <i>cytochrome c</i>
DISC	: <i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FADD	: <i>Fas-associated death domain</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
MAPK	: <i>mitogen-actives protein kinases.</i>
NF-kB	: <i>Nuclear factor kappa beta</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PAF	: <i>Platelet activating factor</i>
PKC	: <i>protein kinase C</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SOD	: <i>superoxide dismutase</i>
TH	: <i>tyrosine hydroxylase</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrotic factor alpha</i>
TRAIL	: <i>TNF-α Receptor Apoptosis Inducing Ligand</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearens</i>	67
Lampiran 2. Surat Determinasi	68
Lampiran 3. Surat Uji Fitokimia	69
Lampiran 4. Surat Keterangan Penelitian	71
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	72



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Timbal (Pb) merupakan salah satu pencemar lingkungan yang berbahaya yang dapat masuk ke dalam tubuh secara oral atau pun inhalasi dari produk manufaktur yang sehari-hari banyak digunakan seperti bensin bertimbal, cat, keramik, pewarna rambut, kosmetik, peralatan pertanian, pesawat terbang, dan pipa air. Akumulasi Timbal dalam tubuh berkontribusi terhadap stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan DNA sel sehingga memicu inflamasi yang ditandai dengan peningkatan sitokin inflamasi, termasuk TNF- α dan berujung pada apoptosis sel pada beberapa organ, termasuk sel pada organ ginjal.¹ Kematian sel ginjal yang ditandai dengan peningkatan ekspresi Caspase 3 dapat mengurangi fungsi ginjal yang dapat diketahui dari adanya proteinuria pada urin. Penelitian terdahulu melaporkan antioksidan seperti vitamin E dan beberapa jenis tumbuhan seperti Seledri (*Apium graveolens L*) diketahui dapat mengurangi stres oksidatif.²⁻⁴ Namun demikian, peran Seledri dalam menghambat kerusakan ginjal akibat keracunan timbal yang dilihat dari ekspresi Caspase 3 ginjal dan ekspresi gen TNF- α masih belum dikaji.

National Poisoning Data System (NPDS) dari *American Association of Poison Control Centers (AAPCC)* melaporkan terdapat 2286 paparan tunggal terhadap timbal di taun 2019 dan dari paparan tersebut 1080 penderita merupakan anak-anak di bawah 6 tahun, sedangkan 679 penderita merupakan pasien berusia lebih dari 19 tahun.⁵ melaporkan bahwa sebagian

besar timbal terakumulasi di dalam ginjal dan dapat menyebabkan efek samping pada ginjal, seperti sindrom Fanconi, penurunan progresif fungsi ginjal, diabetes insipidus, disfungsi tubulus, atau nekrosis tubular.^{6,7} Paparan timbal yang berlebihan dilaporkan dapat menyebabkan efek nefrotoksik akut atau kronis.⁸ Paparan terus menerus terhadap Pb bahkan pada konsentrasi rendah memiliki efek buruk pada ginjal terutama pada glomerulus dan tubulus yang dapat menyebabkan sindrom nefrotik.

Penelitian terdahulu menyatakan akumulasi Pb dalam darah dapat mengganggu beberapa proses biokimia dalam tubuh dengan mengikat sulfhidril dan kelompok fungsional nukleofilik yang berkontribusi terhadap stress oksidatif. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan struktur, membran, dan DNA sel sehingga memediasi aktivasi kaskade sinyal inflamasi. Disisi lain, Pb juga mengganggu pembentukan enzim untuk sintesis vitamin D dan produksi hemoglobin (Hb) sehingga memicu kerusakan membrane sel dan kegagalan produksi Hb. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa paparan Pb secara kronis dan akut menyebabkan efek berbahaya bagi kesehatan hingga menimbulkan kematian. Efek toksik Pb mulai muncul ketika telah terjadi kerusakan pada jaringan tubuh. Pencegahan kondisi tersebut memerlukan suatu senyawa yang dapat menghilangkan atau mengurangi efek toksik radikal bebas ion Pb^{2+} .

Seledri merupakan herba semusim yang termasuk dalam famili Apiaceae. Konstituen aktif utama yang terkandung dalam seledri adalah L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri, yang diekstraksi dari berbagai bagiannya termasuk akar,

daun dan biji.^{9,10} Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan seledri memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, antimikroba, anti-arthritis, antiulcerogenic, antihiperlipidemia, dan antihipertensi. Ekstrak seledri diketahui mampu melindungi fungsi ginjal yang terpapar timbal.¹¹ Beberapa penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa ekstrak etanol seledri dapat meningkatkan dan memperbaiki fungsi ginjal.^{2,12} Namun demikian, peran Seledri dalam menghambat kerusakan ginjal akibat paparan timbal belum dikaji, oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji peran seledri dalam menghambat kerusakan ginjal yang dikaji dari ekspresi gen Caspase 3 ginjal dan ekspresi gen TNF- α tikus yang terpapar timbal.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan sebagai berikut : Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak seledri terhadap Ekspresi gen Caspase-3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada Tikus Terpapar Timbal asetat?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus yang terpapar timbal asetat.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol negatif.
2. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol negatif.
3. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol positif.
4. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol positif.
5. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol perlakuan.
6. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol perlakuan.
7. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif.
8. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok negatif dan kelompok kontrol positif.
9. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol perlakuan.
10. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol perlakuan.

11. Mengetahui perbedaan ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan.

12. Mengetahui perbedaan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	Afifah <i>et al.</i> , 2019 ²	<i>Protective effect of ethanol extract of celery (Apium graveolens L) on kidney damage in ischemia/reperfusion injury rats model</i>	Ekstrak seledri	SOD, NO	Ekstrak seledri mampu meningkatkan kadar SOD dan menurunkan NO
2	Afifah <i>et al.</i> , 2020 ¹³	<i>The protective effect of celery (Apium graveolens L.) ethanol extract on anemia in 5/6 subtotal nephrectomy rat model</i>	Ekstrak Seledri	Hb, sel darah merah, sel darah putih,	Ekstrak seledri melindungi tikus dari anemia pada tikus nephrectomy
3	Kocasari <i>et al.</i> , 2021 ¹⁴	<i>Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice</i>	Apigenin	CAT, GPx, SOD, GSH	Apigenin mampu memperbaiki fungsi ginjal dengan meningkatkan enzim antioksidan
4	He <i>et al.</i> , 2016 ¹⁵	<i>Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury</i>	Apigenin	TNF- α , IL-1, TGF- β	Apigenin mampu menekan kerusakan ginjal akibat stress oksidatif
5	El maaty <i>et al.</i> , 2020 ¹⁶	<i>The protective efficacy of vitamin E and cod liver oil against cisplatin-</i>	Vitamin E	Creatinin, BUN, IL-1	Terjadi perbaikan ginjal dilihat dari penurunan

		induced acute kidney injury in rats			Creatinin, BUN, dan IL-1
6	Purwaningsih et al., 2022	Pengaruh Ekstrak Seledri Terhadap Ekspresi Caspase-3 Dan Ekspresi Gen Tnf-A Ginjal Pada Keracunan Timbal Studi In Vivo Tikus Diinduksi Timbal Asetat	Ekstrak Seledri	Ekspresi Caspase 3 dan ekspresi gen TNF Alpha ginjal	Terjadi penurunan Ekspresi Caspase 3 dan ekspresi gen TNF Alpha ginjal

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa beberapa penelitian terkait pengaruh pemberian ekstrak seledri atau pun senyawa aktif dalam seledri terhadap kerusakan ginjal. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak seledri mampu menaikkan kadar enzim antioksidan seperti SOD serta mencegah terjadinya anemia pasca neprotektomi.^{2,13} Senyawa apigenin yang banyak ditemukan di seledri telah diteliti mampu memperbaiki fungsi ginjal yang dilihat dari peningkatan kadar enzim antioksidan seperti CAT, GPx, SOD, GSH serta penurunan sitokin inflamasi seperti TNF- α , dan IL-1.^{14,15} Diketahui antioksidan sangat berpengaruh terhadap perbaikan kerusakan ginjal, seperti Vitamin E yang merupakan senyawa antioksidan diketahui dapat memperbaiki kerusakan ginjal yang dapat diketahui dari penurunan IL-1, creatinine dan BUN.¹⁶

Berdasarkan data tersebut investigasi untuk mengetahui pengaruh ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α Ginjal pada tikus yang terpapar timbal belum dilakukan, sehingga penelitian penelitian dengan “Pengaruh Ekstrak Seledri Terhadap Ekspresi gen Caspase-3 dan Ekspresi Gen TNF- α pada Keracunan Timbal (Studi in vivo

Tikus diinduksi Timbal Asetat)” yang akan dilakukan masih layak untuk dilakukan karena memiliki novelitas.

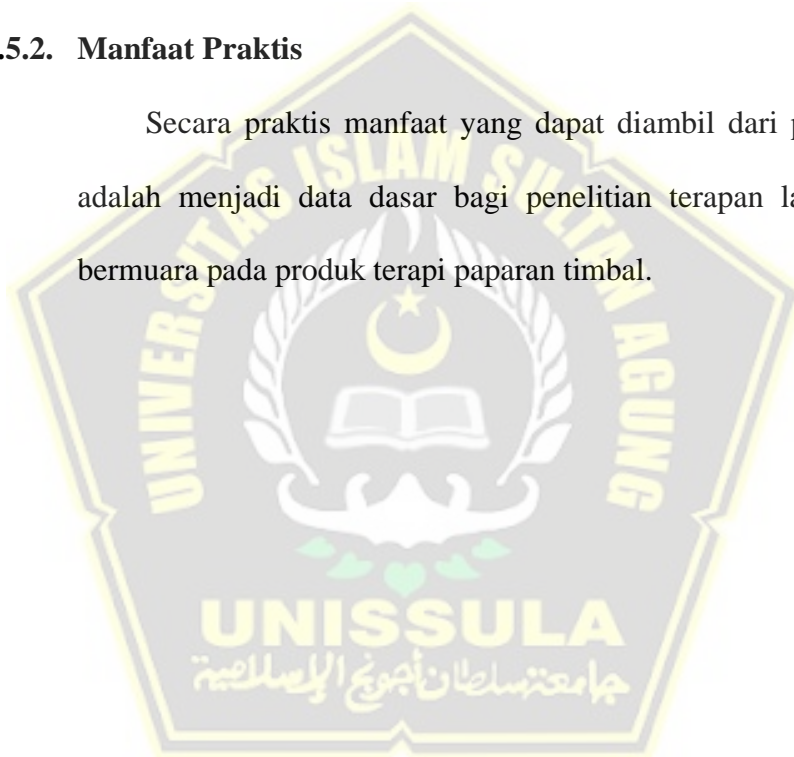
1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Secara teoritis manfaat yang diberikan dari penelitian ini adalah menyajikan ilmu pengetahuan kepada masyarakat terkait peran pemberian ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus yang terpapar timbal

1.5.2. Manfaat Praktis

Secara praktis manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah menjadi data dasar bagi penelitian terapan lanjutan yang bermuara pada produk terapi paparan timbal.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Caspase-3

2.1.1. Definisi dan Peran Caspase dalam Apoptosis

Caspases adalah keluarga protease sistein yang berfungsi sebagai efektor utama selama apoptosis untuk pembongkaran sebagian besar struktur seluler secara proteolitik, termasuk sitoskeleton, cell junctions, mitokondria, retikulum endoplasma, Golgi, dan nukleus.¹⁷ Apoptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang menghilangkan sel-sel individu dalam suatu organisme dalam mempertahankan struktur keseluruhan jaringan di sekitarnya.^{18,19} Di antara keseluruhan protein yang terlibat dalam aktivasi dan apoptosis *execution*, protease atau *caspases* adalah pendorong utama kematian sel apoptosis, membelah protein seluler yang sangat penting untuk *dismantling the dying cell*.²⁰

Caspases disintesis di dalam sel sebagai zimogen tidak aktif yang tidak memiliki aktivitas protease yang signifikan, sehingga *caspases* diregulasi ketika sintesis protein di mana *caspases* tidak diaktifkan hingga menerima rangsangan kematian tertentu.²¹ Struktur utama *caspases* adalah prodomain *amino-terminal* dan domain protease *carboxy-terminal* yang mengandung *key catalytic cysteine residue*.²⁰ *Caspases* dikategorikan sebagai *caspases* inisiator atau efektor, berdasarkan posisinya dalam kaskade pensinyalan apoptosis. *Caspases* inisiator (caspase-2, caspase-8, caspase-9, dan caspase-10) bekerja secara apikal dalam jalur kematian sel dan

semuanya memiliki prodomain yang panjang dan serupa secara structural.^{22,23} Sebaliknya, *caspases* efektor (caspase-3, caspase-6, dan caspase-7) memiliki prodomain yang lebih pendek dan ada di dalam sel sebagai homodimer yang terbentuk sebelumnya tetapi tidak aktif.²⁴

2.1.2. Definisi Caspase-3

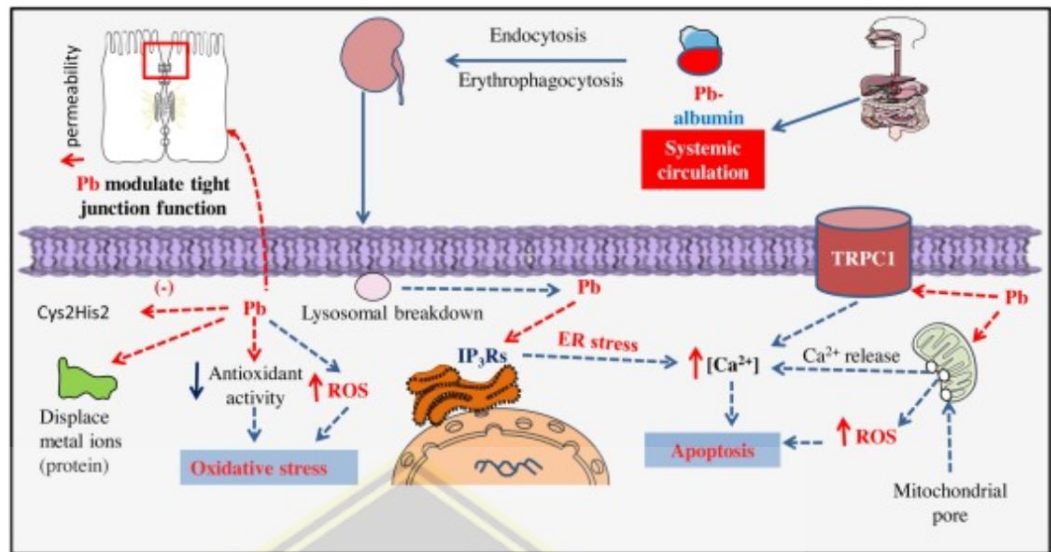
Caspase-3 adalah protein yang relatif kecil yang terdiri dari 2 subunit, subunit 12- dan 17-kDa yang masing-masing mengandung 3 dan 5 fungsi tiol. Aktivasi caspase-3 tergantung pada dimerisasinya menjadi heterotetramer, di mana Cys-285 yang diaktifkan histidin di situs aktif subunit p17 *conserved* dalam superfamili caspase dan diperlukan untuk aktivitas enzimatis.²⁵ Peran caspase-3 dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan *caspases-6*, caspase-7, dan caspase-9 untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein caspase-3 dibelah dan dipecah sendiri oleh caspase-8 dan caspase-10.^{26,27} Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis *execution*.²⁷

2.1.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis

Aktivasi Caspase-3 dapat melalui dua jalur apoptosis, yaitu jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik.²⁸ Apoptosis intrinsik diinduksi oleh stres seluler, yang menyebabkan aktivasi protein *B-cell lymphoma 2* (*Bcl-2*) *family*. Oligomer *Bcl-2 homologous antagonist killer* (BAK) dan *Bcl-2-associated X* (BAX) kemudian

menginduksi pembentukan *pore* di membran luar mitokondria yang menyebabkan pelepasan berbagai *intermembrane space proteins* terjadi.^{29,30} Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1), menginduksi oligomerisasi APAF1 untuk membentuk apoptosom.^{31,32} Apoptosom merekrut procaspase-9, yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi Caspase-9. Aktivasi Caspase-9 merangsang kaskade caspase yang berpuncak pada aktivasi Caspase-3 dan Caspase-7. *Caspases* ini bertanggung jawab untuk pembelahan banyak protein seluler, yang mengarah ke ciri biokimia dan morfologi apoptosis.^{33,34} Jalur apoptosis ekstrinsik dirangsang melalui pengikatan ligan ke reseptor kematian yang sesuai dan *recruitment Fas-associated death domain* (FADD) ke *death receptor* terjadi. FADD berasosiasi dengan procaspase-8/procaspase-10 melalui domain efektor kematiannya untuk membentuk *multiprotein death-inducing signaling complex* (DISC). Pembentukan DISC memfasilitasi pembelahan dan aktivasi Caspase-8.³⁵⁻³⁷ Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur pensinyalan tipe I atau jalur pensinyalan tipe II.³⁸ Dalam pensinyalan tipe I, Caspase-8 secara langsung memotong dan mengaktifkan Caspase-3 yang menyebabkan kematian sel.²⁰ Dalam pensinyalan tipe II, Caspase-8 memotong *Caspase-8-cleaved* (BID) untuk mengaktifkan BAK dan BAX.³⁹ Protein ini kemudian menginduksi pembentukan *pore* di mitokondria yang mengarah ke aktivasi

kaskade caspase dan berpuncak pada aktivasi Caspase-3/ Caspase-7.²⁸



Gambar 2.1. Peran Timbal dalam Apoptosis sel²⁸

Timbal dilaporkan menyebabkan stres oksidatif dengan menghasilkan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil dan peroksida lipid.⁴⁰ Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi timbal melibatkan ketidakseimbangan antara pembentukan dan penghilangan ROS dalam jaringan dan komponen seluler yang menyebabkan kerusakan pada membran, DNA, dan protein.⁴¹ Timbal asetat meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi oksida nitrat dengan pengurangan bersamaan dalam enzim antioksidan sebagai katalase dan superoksida dismutase.⁴² Menurut Elgawish *et al.* (2014), telah dilaporkan bahwa timbal menginduksi peningkatan signifikan dalam ekspresi caspase-3 yang menunjukkan bahwa timbal menginduksi terjadinya apoptosis.⁴³

2.2. TNF- α

2.2.1. Definisi TNF- α

Tumor Necrosis Factor- α merupakan salah satu jenis sitokin dengan berat molekul 51 kDa yang diekspresikan dan disekresikan oleh sel imun termasuk monosit, makrofag dan sel T.⁴⁴ Ekspresi dan produksi sitokin TNF- α juga dapat disekresikan oleh sel mesangial, glomerulus, dan endotel.⁴⁵

2.2.2. Aktivitas TNF- α

Fungsi TNF- α berperan dalam system imun sebagai mediator dalam aktivasi sel limfosit T dan merangsang ekspresi MHC I pada sel endotel dan fibroblast.⁴⁶ Ekspresi TNF- α juga diketahui memicu apoptosis sel termasuk sel ginjal ketika terjadi inflamasi akibat paparan zat kimia pada ginjal.⁴⁷ Molekul TNF- α mengaktifkan jalur apoptosis sel melalui aktivasi NF- κ B yang melibatkan protein reseptor Fas beserta TNF- α Receptor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL).⁴⁸ Keduanya membentuk jalur yang disebut extrinsic pathway atau death receptor pathway. Jalur apoptosis melalui TNF- α ini selanjutnya akan mengaktifasi protein Caspase dengan dimediasi oleh Caspase-8 hingga Caspase-3. Caspase-3 merupakan caspase efektor yang meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein dan menginisiasi jalur caspase menjadi program kematian sel.

2.3. Logam Berat Timbal

2.3.1. Definisi dan Karakteristik Timbal

Timbal atau Plumbum (Pb) adalah logam berat berwarna kelabu kebiruan dan termasuk logam golongan IV A dalam tabel periodik unsur kimia dengan nomor atom 82, berat atom 207,2, serta dapat menguap dan bereaksi dengan oksigen (O₂) dalam udara membentuk timbal oksida (PbO) pada suhu 550-600°C.⁴⁹ Timbal memiliki sifat fisiko-kimia seperti *softness*, *malleability*, *ductility*, *poor conductivity* dan ketahanan terhadap korosi yang membuat penggunaannya semakin meningkat dan merupakan logam kelima yang paling sering digunakan di seluruh dunia.⁵⁰ Karena sifatnya yang tidak dapat terurai secara hayati dan penggunaan secara terus menerus, hal ini menyebabkan konsentrasinya terakumulasi di lingkungan.⁵¹

2.3.2. Prevalensi Keracunan Timbal

Timbal merupakan salah satu polutan paling banyak di dunia yang berbahaya dan paparannya bersifat *multi-target toxicant* yang dapat memicu timbulnya masalah kesehatan global seperti penyakit gastrointestinal, hematopoietik, kardiovaskular, sistem reproduksi, ginjal, gangguan pernapasan, neurologis, dan peradangan.⁵¹⁻⁵³ Pada tahun 2019, *National Poisoning Data System* (NPDS) dari *American Association of Poison Control Centers* (AAPCC) melaporkan 2286 paparan tunggal terhadap timbal. Dari paparan tersebut, 1080 pada anak-anak di bawah 6 tahun, dan 679 pada pasien yang lebih tua dari 19 tahun.⁵

2.3.3. Sumber Paparan Timbal

Sumber paparan timbal terutama meliputi proses kegiatan penambangan, peleburan, industri baterai, pekerjaan yang berhubungan dengan radiator, pembuatan kabel, paparan tanah yang terkontaminasi, dan manufaktur seperti penggunaan cat bertimbal, bensin, keramik, pipa ledeng, pewarna rambut, kosmetik, peralatan pertanian, bahan bakar pesawat terbang, dan mesin *x-ray*.^{54,55} Timbal dapat masuk ke dalam tubuh dan menyebabkan keracunan jika bersentuhan, tertelan, atau terhirup dari salah satu sumber ini.^{56,57}

2.3.4. Toksikokinetika Timbal pada Tubuh

Timbal dapat diserap ke dalam tubuh melalui mulut (oral), saluran pernapasan, lambung dan bahkan beberapa senyawa Pb dapat menembus kulit, seperti timbal tetraetil, yang digunakan dalam bahan bakar sebagai zat anti-*knock*.^{58,59} Sekitar sepertiga dari asap timbal yang dihirup diserap dan sepersepuluh dari timbal yang tertelan diserap.⁵⁸ Hal ini disebabkan karena Pb merupakan suatu unsur yang ditemukan di udara sebagai partikel, sehingga Pb tidak mengalami penguraian atau terdegradasi dan tidak dapat dihancurkan.⁶⁰

Menurut *United States (US) Centers for Disease Control and Prevention* dan *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)*, *blood lead levels (BLL)* sama dengan atau lebih besar dari 5 g/dL dianggap meningkat pada orang dewasa. Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan US juga

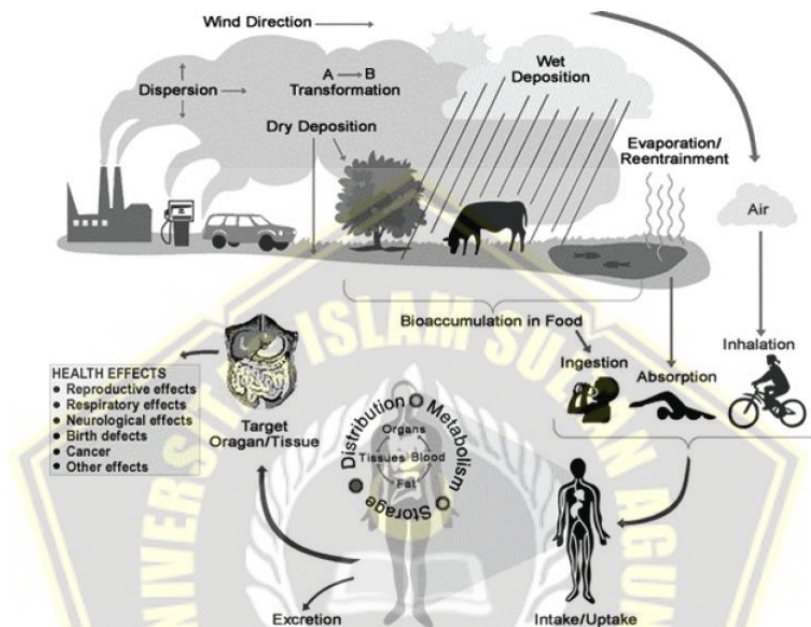
merekomendasikan bahwa kadar timbal dalam darah pada orang dewasa harus diturunkan di bawah 10 g/dL.⁶¹ Namun, penelitian yang dilakukan oleh Keramati *et al.* (2010) menunjukkan bahwa efek dan komplikasi terkait timbal bahkan dapat terjadi dengan kadar yang lebih rendah dan kecil, dan tidak ada ambang batas aman yang ditetapkan untuk timbal.⁶² Tanda dan gejala keracunan timbal tidak spesifik pada orang dewasa dan mungkin termasuk kehilangan ingatan jangka pendek, kurang konsentrasi, lekas marah, depresi, parestesia, kehilangan koordinasi, nyeri perut umum, mual, sakit kepala, penurunan berat badan, kelemahan dan hilangnya refleks tendon dalam.^{56,63} Setelah timbal diserap ke dalam tubuh, lebih dari 95% terikat pada eritrosit akhirnya disimpan dan terakumulasi di dalam darah dan tulang^{6,64,65} dan sebagian besar Pb akan terakumulasi dalam organ ginjal dan hati, serta sisa Pb akan tersebar ke seluruh tubuh (korteks serebral, sumsum tulang belakang, ovarium, pankreas, limpa, prostat, adrenal, otak, jaringan lemak, testis, jantung dan otot rangka).^{66,67}

Effects on Children	Blood Lead (ug/dL)	Effects on Adults
	150	
Death ▶	100	◀ Encephalopathy
Encephalopathy ▶		◀ Frank Anemia
Nephropathy ▶		◀ Decreased Longevity
Frank Anemia ▶	50	
Colic ▶		
	40	◀ Peripheral Neuropathies
Hemoglobin Synthesis Impaired ▶		◀ Infertility (men)
		◀ Nephropathy
Vitamin D Metabolism Decreased ▶	30	◀ Blood Pressure Increased (men)
		◀ Hearing Impaired
Nerve Conduction Velocity Decreased ▶	20	◀ Erythrocyte Protoporphyrin Increased (men)
		◀ Erythrocyte Protoporphyrin Increased (women)
Erythrocyte Protoporphyrin Increased ▶		
Vitamin D Metabolism Decreased ▶		
Developmental Toxicity ▶	10	◀ Possible Hypertension Effects
Cognitive Impacts ▶		
Hearing Impaired ▶		
Growth Impaired ▶		
Transplacental Transfer ▶		

Gambar 2.2. Efek Terendah yang Dapat Diamati dari *Blood Lead Level (BLL)*⁶⁸

Paparan timbal tingkat tinggi dapat mengakibatkan gangguan kesehatan yang merugikan, termasuk kerusakan pada sistem saraf, hati dan ginjal; anemia, hipertensi, penyakit kardiovaskular, defisiensi imun, infertilitas, masalah perkembangan termasuk defisit kognitif, ketidakmampuan belajar dan kehilangan memori.⁶⁹ Paparan timbal dalam waktu lama telah dilaporkan menyebabkan anemia, bersamaan dengan peningkatan tekanan darah, dan terutama pada orang tua dan paruh baya. Kerusakan parah pada otak dan ginjal, baik pada orang dewasa maupun anak-anak, ditemukan terkait dengan paparan kadar timbal berat yang mengakibatkan kematian.^{51,70} Dumková *et al.* (2017) melaporkan bahwa sebagian besar timbal terakumulasi di dalam ginjal dan dapat menyebabkan efek samping terkait ginjal, seperti sindrom Fanconi, penurunan progresif fungsi ginjal, diabetes insipidus, dan disfungsi tubulus, atau nekrosis tubular akut mungkin melalui kerusakan mitokondria

langsung.^{6,7} Rastogi (2008) mengungkapkan bahwa paparan timbal yang berlebihan dapat menyebabkan efek nefrotoksik akut atau kronis.⁸ Paparan terus menerus terhadap Pb bahkan pada konsentrasi rendah memiliki efek buruk pada ginjal terutama pada glomerulus dan tubulus yang menyebabkan peningkatan prevalensi proteinuria dengan berat molekul tinggi hingga sindrom nefrotik.⁷¹⁻⁷³



Gambar 2.3. Ilustrasi Proses Manusia Terpapar Timbal dari Lingkungan dan Pengaruh Timbal terhadap Kesehatan Manusia.⁵¹

2.4. Vitamin E

Vitamin adalah antioksidan yang melindungi sel dan jaringan dari stress oksidatif. Dimana vitamin E merupakan salah satu antioksidan terpenting untuk melindungi jaringan tubuh. Untuk menjaga homeostasis tubuh, penting untuk menjaga keseimbangan antara kadar antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh.^{16,74}

Vitamin E merupakan vitamin larut lemak. Vitamin E adalah istilah luas yang mengacu pada tokoferol dan tokotrienol, yang dapat dibagi lagi

menjadi alfa-, beta-, gamma-, dan delta-isomer berdasarkan posisi rantai samping pada cincin kromanol. Secara struktural, terdiri dari cincin kromanol dan rantai samping isoprenoid. Vit E memiliki fungsi sebagai antioksidan serta melindungi tubuh dari polyunsaturated fatty acid (PUFAs) seperti asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, dan asam arakhidonat. Selain itu vitamin E dalam tubuh juga berfungsi sebagai penangkal radikal bebas dan molekul oksigen yang penting dalam mencegah peroksidasi membran asam lemak tak jenuh.^{74,75} Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi sebagai donor ion hidrogen yang dapat mengubah radikal peroksil (hasil peroksida lipid) menjadi radikal tocopherol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak.^{74,75,76}

Aktivitas antioksidan vitamin E bergantung pada gugus hidroksil pada cincin kromanol, yang dapat menyumbangkan hidrogen untuk mengurangi radikal bebas.⁷⁶ Studi in vitro dan in vivo telah menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan tokotrienol lebih unggul daripada tokoferol berdasarkan tiga alasan yaitu tokotrienol terdistribusi lebih merata melintasi membran lipid; tokotrienol dengan ikatan rangkap pada rantai samping isoprenoidnya, menawarkan lebih banyak interaksi dengan free radikal; tokotrienol mempunyai efisiensi siklus redoks yang lebih tinggi dibandingkan dengan tokoferol. Selain berfungsi sebagai pemulung radikal bebas, vitamin E dapat memodulasi nuklir faktor-eritroid 2 terkait faktor 2 (Nrf2) yang merupakan faktor transkripsi mengatur ekspresi enzim antioksidan.^{74,75,77}

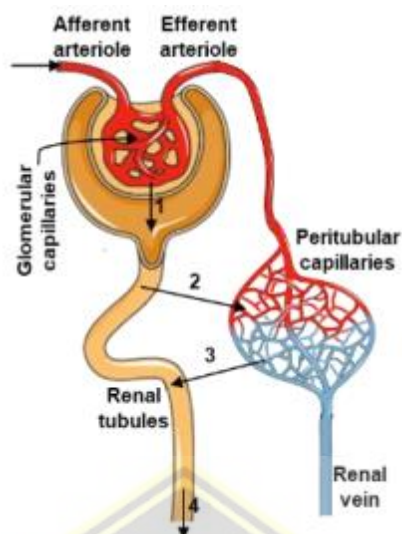
2.5. Toksikodinamika dan Toksikokinetika Timbal pada Ginjal

2.5.1. Organ Ginjal

Ginjal adalah organ yang kompleks secara anatomis yang terdiri dari berbagai jenis sel yang sangat terspesialisasi, yang tersusun dalam pola tiga dimensi yang sangat terorganisir. Nefron adalah unit fungsional ginjal yang tersegmentasi menjadi bagian yang berbeda, yaitu tubulus proksimal, lengkung henle, tubulus distal, dan duktus kolektivus.⁷⁸ Ginjal merupakan pusat homeostasis yang mengatur tekanan darah, air,⁷⁹ natrium,⁸⁰ kalium,⁸¹ keasaman,⁸² mineral tulang,⁸³ dan hemoglobin.⁸⁴ Namun, fungsi utama ginjal adalah ekskresi *waste products* pada metabolisme dalam urin.⁸⁵

Ginjal adalah organ ekskresi yang bertanggung jawab untuk ekskresi berbagai senyawa utuh dan/atau produk metabolisme dari sirkulasi.^{7,86} Dalam proses ini, dua langkah terjadi, yaitu filtrasi glomerulus tempat asal ultrafiltrat dan sekresi tubulus.^{7,87} Di dalam glomerulus darah disaring, kemudian masuk melalui arteriol aferen dan keluar melalui arteriol eferen. Fungsi ginjal dapat dinilai dengan menentukan laju filtrasi glomerulus.⁸⁶ Laju filtrasi glomerulus dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti latihan fisik; kehamilan; keberadaan dan tingkat keparahan penyakit ginjal; waktu hari; konsumsi protein; pemberian antihipertensi; dan status cairan ekstraseluler, yang dapat menyebabkan perubahan aliran darah yang mengakibatkan perubahan toksikokinetik dan kadar xenobiotik plasma.^{88,89} Xenobiotik adalah zat kimia yang ditemukan di dalam organisme yang tidak diproduksi secara alami yang dicirikan oleh

toksikokinetiknya dan mengacu pada pergerakan senyawa di seluruh organisme dari saat ia diserap hingga dikeluarkan.⁹⁰



Gambar 2.4. Ekskresi Xenobiotik melalui Ginjal

2.5.2. Pengaruh Timbal terhadap Ginjal

Beberapa penelitian telah melaporkan adanya hubungan antara keracunan timbal dengan penyakit ginjal pada manusia.⁹¹⁻⁹⁴ Timbal sangat mirip dengan kalsium secara kimiawi. Oleh karena itu, begitu timbal berada di dalam tubuh, timbal diperlakukan seolah-olah itu adalah kalsium.^{8,93} Timbal tidak memiliki tujuan yang berguna dalam tubuh manusia dan kehadirannya di dalam tubuh dapat menyebabkan efek toksik, terlepas dari jalur paparannya.⁵¹

Ginjal adalah organ penting yang terkena paparan jangka panjang terhadap timbal. Paparan timbal yang berlebihan dapat menyebabkan efek nefrotoksik akut atau kronis (Rastogi, 2008).⁸ Nefropati Pb akut dicirikan secara fungsional oleh defisit umum mekanisme transpor tubulus (sindrom Fanconi) dan secara morfologis oleh munculnya perubahan degeneratif pada epitel

tubulus dan *nuclear inclusion bodies* yang mengandung kompleks protein Pb.⁹⁵⁻⁹⁷ nefropati Pb akut biasanya bersifat reversibel dengan terapi khelasi, terutama pada anak-anak yang dimanifestasikan oleh glikosuria dan aminoasiduria.⁸

Paparan kronis timbal telah dikaitkan dengan tingginya insiden disfungsi ginjal, yang ditandai dengan perubahan glomerulus dan tubulointerstitial yang mengakibatkan gagal ginjal kronis, hipertensi dan hiperurisemia.^{8,93} Paparan timbal kronis tingkat rendah dikaitkan dengan peningkatan ekskresi protein dengan berat molekul rendah dan enzim lisosom melalui urin.⁹⁸ Lin *and* Huang (1994) melaporkan bahwa paparan timbal tingkat rendah juga dapat mempercepat insufisiensi ginjal pada pasien tanpa diabetes yang memiliki penyakit ginjal kronis.⁹⁹ Nefropati Pb kronis adalah penyakit ginjal ireversibel yang berkembang selama berbulan-bulan atau bertahun-tahun dari paparan berlebihan.^{73,100} Nefropati timbal kronis terjadi karena paparan timbal selama bertahun-tahun yang dimanifestasikan dalam biopsi ginjal dengan atrofi fokal sedang, hilangnya tubulus proksimal dan fibrosis interstitial.¹⁰¹⁻¹⁰² Pada orang dewasa yang terpapar Pb secara kronis, terjadi nefropati Pb sebagai nefritis tubulointerstitial progresif yang sulit didiagnosis pada tahap awal.⁸

Suatu uji yang mengevaluasi *glomerular filtration rate* (GFR) seperti klirens kreatinin, nitrogen urea darah, kreatinin serum merupakan satu-satunya uji yang dapat digunakan untuk mendeteksi

adanya kerusakan ginjal yang disebabkan oleh paparan Pb.^{71,103-105} Ketika hasil tes menunjukkan hasil tidak normal, maka nefropati telah mencapai fase ireversibel yang dapat menyebabkan gagal ginjal.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Studi epidemiologis telah menunjukkan hubungan antara kadar timbal dalam darah dengan tekanan darah, dan hipertensi adalah ciri utama dari nefropati timbal.^{71,72,96,107,108}

2.5.3. Prevalensi Keracunan Timbal pada Ginjal

Paparan timbal (Pb) yang merupakan salah satu polutan logam beracun, hingga saat ini masih menjadi perhatian global. Namun, dalam beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa prevalensi keracunan timbal diremehkan di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah.^{51,109} Berdasarkan *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME), sekitar 63,2% dari perkembangan idiopatik, cacat intelektual, 10,3% *hypertensive heart diseases*, 5,6% *ischemic heart diseases*, dan 6,2% stroke terkait dengan paparan timbal.¹¹⁰

Timbal adalah nefrotoksikan lingkungan yang paling paling banyak diteliti hingga saat ini.¹¹¹ Keracunan timbal akut (kadar timbal dalam darah > 80–100 g/dL) mengganggu struktur dan fungsi tubulus proksimal.^{112,113} Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa 10,8% dari populasi penelitian dari sampel perwakilan nasional 47.204 orang Cina menderita disfungsi ginjal kronis pada tahun 2009,¹¹⁴ dengan prevalensi disfungsi ginjal dari populasi umum di Inggris dan Kanada adalah 5,85%¹¹⁵ pada 2007 hingga 2009 dan 4,54%¹¹⁶ pada tahun 2010. Persentase tingginya disfungsi ginjal

yang ditemukan dalam penelitian sebelumnya adalah tingkat paparan timbal pada konsentrasi rendah telah meningkatkan risiko disfungsi ginjal.¹¹⁷

Paparan timbal yang menyebabkan keracunan Pb akut atau kronis tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang signifikan di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah.¹¹⁴ Secara klinis, keracunan timbal akut ditandai dengan perkembangan glukosuria, aminoasiduria, fosfaturia, atau sindrom Fanconi.^{109,115} Manifestasi ginjal dari keracunan timbal akut biasanya reversibel setelah penghentian paparan timbal dan jika diindikasikan terapi khelasi.^{92,116} Sedangkan keracunan timbal kronis dapat menyebabkan nefropati timbal, yang ditandai dengan fibrosis tubulointerstitial, atrofi tubulus, sklerosis glomerulus, dan akhirnya penurunan *glomerular filtration rate* (GFR).^{89,117,118} Nefropati toksik diperkirakan menyebabkan kurang dari 1% dari semua kasus penyakit ginjal stadium akhir (CDC, 2018).¹¹⁹ Insiden dan prevalensi pasti dari nefropati timbal tidak diketahui, meskipun *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) Amerika Serikat memperkirakan bahwa sekitar 804.000 pekerja di industri umum dan 838.000 pekerja tambahan di konstruksi berpotensi terpapar timbal.¹²⁰

Hubungan antara paparan timbal dan GFR dievaluasi pada anak-anak Amerika Utara dengan *Chronic Kidney Disease* (CKD) dalam *Chronic Kidney Disease in Children Study* (CKiD).^{121,122}

Fadowski *et al.* (2013) juga menunjukkan bahwa rata-rata persentase perubahan GFR untuk setiap 1 g/dL peningkatan kadar timbal dalam darah adalah 2,1%. Sedangkan dalam analisis yang dikelompokkan berdasarkan diagnosis CKD, hubungan antara kadar timbal dan GFR lebih kuat di antara anak-anak dengan penyakit glomerulus yang mendasari CKD untuk setiap 1 g/dL peningkatan kadar timbal dikaitkan dengan 12,1% pada perubahan GFR.¹²¹

2.5.4. Mekanisme Nefrotoksisitas oleh Timbal

Timbal (Pb) adalah xenobiotik beracun yang menyebabkan kondisi kesehatan kritis yang berbeda pada tahap yang fatal.^{123,124} Timbal (Pb) mudah diserap oleh usus, paru-paru, kulit dan hampir 90% berikatan dengan protein eritrosit (albumin).¹²⁵ Timbal disimpan ke dalam jaringan dan organ termasuk ginjal hingga 95% dari total beban Pb melalui endositosis dan/atau eritrofagositosis.¹²⁵⁻¹³¹

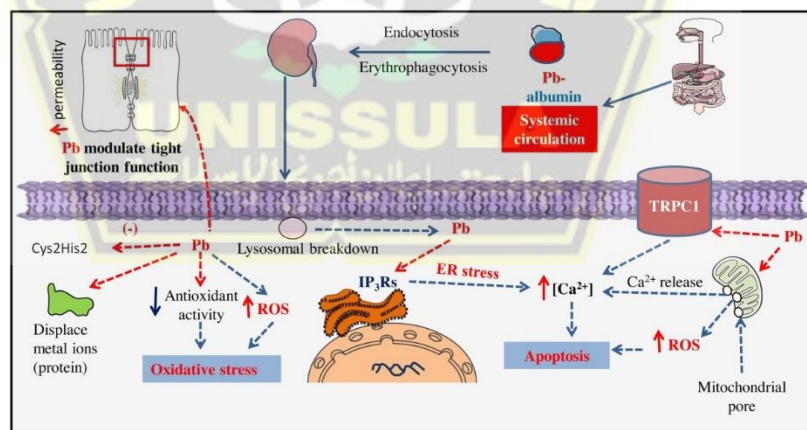
Ginjal merupakan salah satu target toksisitas Pb karena menjadi rute utama ekskresi dari tubuh dan memfasilitasi kerusakan ginjal melalui stres oksidatif pada sel dan jaringan ginjal serta peroksidasi lipid.^{40,129,132,133} Timbal akan terikat dengan protein yang memiliki berat molekul rendah (<1% dari total) kemudian disaring secara bebas melalui glomerulus dan sebagian diserap kembali oleh tubulus proksimal.¹²⁷ Chaumont *et al.* (2012) melaporkan bahwa adanya kemungkinan bahwa Pb diserap kembali oleh tubulus proksimal sebagai protein kompleks dengan berat molekul rendah yang mirip

dengan kompleks Cd-metallothionein.^{126,131} Sabath *et al.* (2012) melaporkan bahwa toksisitas seluler Pb bersifat kompleks dan dapat berkembang melalui beberapa *pathway* yang berbeda.¹²⁷ Pertama, paparan Pb dapat menyebabkan stres oksidatif, sehingga menginisiasi kaskade yang dapat menyebabkan resistensi pembuluh darah dan tekanan darah tinggi. Kedua, radikal bebas dapat dihasilkan dan mengaktifkan *nuclear factor* $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) dan inflamasi. Ketiga, Pb dapat mengganggu reaksi enzimatik yang bergantung pada Ca dan induksi apoptosis. Berbagai *pathways* ini pada akhirnya dapat menyebabkan perkembangan kerusakan pada ginjal.¹³¹

Rana *et al.* (2018) melaporkan bahwa Aminoaciduria, glikosuria, dan fosfaturia dilaporkan sebagai penanda disfungsi tubulus proksimal pada toksisitas Pb akut.¹ Menurut Ahamed and Siddiqui (2007) dan Ponce-Canchihuamán *et al.* (2010),¹³⁴ mekanisme kerusakan ginjal oleh Pb dimulai ketika Pb^{2+} bersaing dengan Ca^{2+} dan mengatur homeostasis kalsium. Akibatnya, pelepasan Ca^{2+} dari mitokondria dirangsang dan memulai pembukaan pori transisi mitokondria yang pada gilirannya menyebabkan kerusakan mitokondria, generasi spesies reaktif dan stres oksidatif termasuk perubahan metabolisme lipid. Di antara sel yang ada pada organ ginjal, tubulus proksimal lebih rentan terhadap kerusakan sel yang diinduksi Pb yang diikuti oleh apoptosis.¹³⁵ Studi pada kultur primer sel *rat proximal tubular* (rPT) menunjukkan

bahwa Pb^{2+} meningkatkan sitosolik, konsentrasi kalsium mitokondria $[Ca^{2+}]$, dan *depletes endoplasmic reticulum's* (ER) $[Ca^{2+}]$ melalui kerja pada *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor* (IP3Rs).^{1,135} Menariknya, studi pada sel HEK293 juga menunjukkan adanya keterlibatan Ca^{2+} , di mana potensi reseptor transien Canonical TRPC1 secara aktif berpartisipasi dalam sitotoksitas dan masuknya Pb^{2+} .¹³⁶ Selain itu, Pb^{2+} juga menggantikan ion logam esensial seperti Zn^{2+} dan Ca^{2+} dalam protein dan menghambat *Cys2His2 zinc finger transcription factors*.¹²⁵

Dari sudut pandang yang berbeda, Pb juga menghambat *integrity of cell-cell junctions (tight junction)* dan memodifikasi struktur seluler.¹³⁷ Polaritas yang berubah dan transportasi vektor sel epitel juga bisa menjadi konsekuensi yang mungkin dari struktur *atypical cell-cell junction* setelah berkurangnya lumen tubulus proksimal ginjal dan hilangnya mikrovil (Gambar 1).



Gambar 2.5. Toksikodinamik Toksisitas Ginjal yang Diinduksi oleh Timbal¹

2.6. Seledri

2.6.1. Morfologi dan Habitat Tanaman Seledri

Seledri atau *Apium graveolens* Linn. merupakan sayuran yang termasuk ke dalam famili *Apiaceae*. Seledri berasal dari daerah Mediterania di Eropa Selatan atau Mesir dan Swedia di mana habitat alaminya asin dan basah, atau tanah berawa di dekat pantai. Seledri dikenal sebagai *Celeri* dalam bahasa Prancis, *Sellerie* dalam bahasa Jerman, *Apio* dalam bahasa Spanyol, *Salleri* dalam bahasa Swedia, *Karafs* dalam bahasa Arab, *Selderiji* dalam bahasa Belanda, *Sedano* dalam bahasa Italia, *Aipo* dalam bahasa Portugis, *Syelderey* dalam bahasa Rusia, *Serorjini* dalam bahasa Jepang; *Chin* dalam bahasa Cina; *Karnaulior Ajmod* di India. Seledri mencakup tiga varietas taksonomi yang dibudidayakan, yaitu *Celery* (var. *dulee*), *celeriac* (var. *rapaeum*), dan *smallage* (var. *secalinum*).^{138,139}

Seledri memiliki tangkai berserat panjang yang meruncing menjadi daun. Tergantung pada lokasi dan kultivarnya, baik batang, daun atau hipokotilnya dapat dimakan dan digunakan sebagai sayuran, sedangkan bijinya digunakan untuk bumbu dan sebagai obat.¹⁴⁰⁻¹⁴² Minyak atsiri yang diekstraksi dari biji seledri merupakan bahan penyedap utama dalam industri makanan yang digunakan untuk meningkatkan rasa dan aroma makanan jadi, sup, daging, saus, acar, dan jus sayuran.¹⁰ Minyak biji seledri mengandung dua kelompok utama senyawa: limonene-type mono-terpenes dan butylphthalides.¹⁴³

2.6.2. Klasifikasi Tanaman Seledri

Menurut *Handbook of Herbs and Spices Peter* (2012) seledri diklasifikasikan sebagai sayuran aromatik karena terutama ditanam untuk herba segar, daun dan tangkai daun. Dalam klasifikasi lain dari organ tumbuhan yang digunakan sebagai bumbu, seledri telah dikategorikan sebagai bumbu biji karena biji digunakan sebagai biji utuh, bubuk atau dalam bentuk minyak biji atau oleoresin.¹⁴⁴



Gambar 2.6. Tanaman Seledri (*Apium graveolens* Linn.)⁴

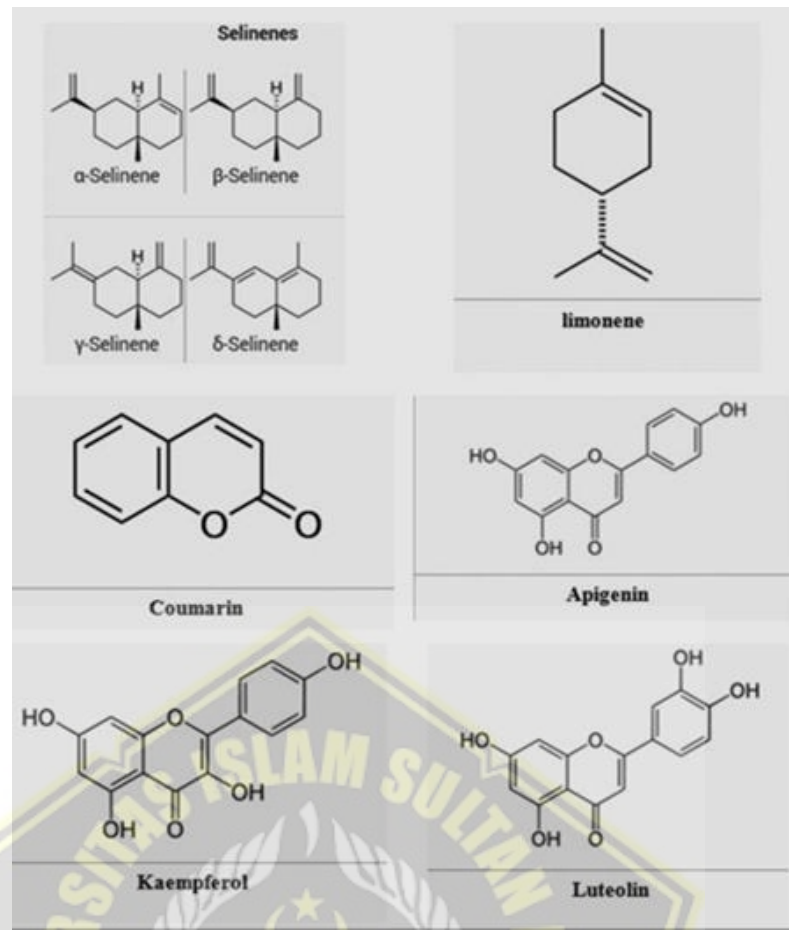
Menurut Malhotra (2006) klasifikasi taksonomi tanaman seledri adalah sebagai berikut :¹⁴⁵

Kerajaan	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida (Dicotyledoneae)</i>
Sub kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Apiales</i>
Famili	: <i>Apiaceae</i>

Genus : *Apium*
Spesies : *Apium graveolens* Linn.

2.6.3. Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri

Apium graveolens Linn. merupakan herba semusim yang termasuk dalam famili *Apiaceae*. Konstituen aktif utamanya adalah L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri, yang diekstraksi dari berbagai bagiannya termasuk akar, daun dan biji.^{9,10} Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan aktivitas farmakologinya pada antimikroba, anti-inflamasi, anti-arthritis, antiulcerogenic, antihiperlipidemia, antioksidan dan antihipertensi.^{3,9,10} Seledri dapat mencegah penyakit kardiovaskular,¹⁴⁶ penyakit kuning, penyakit hati dan lien,¹⁴⁷ obstruksi saluran kemih,¹⁴⁸ asam urat,¹⁴⁷ dan gangguan rematik.¹⁴⁹ Penelitian terbaru melaporkan bahwa ekstrak seledri dapat mencegah dan memperbaiki penyakit akibat gangguan fungsi ginjal terutama dalam kaitannya dengan nefropati akut dan kronis serta memiliki efek perlindungan yang disebabkan oleh flavonoid pada seledri terhadap fibrosis ginjal.¹⁵⁰



Gambar 2.7. Struktur Kimia Kandungan Utama dalam Tanaman Seledri.⁴

Adanya senyawa-senyawa seperti limonene, selinen, glikosida frocoumarin, flavonoid, serta vitamin A dan C menjadi alasan bahwa seledri merupakan tumbuhan yang paling banyak digunakan dalam pengobatan tradisional.¹⁵¹ Beberapa kandungan utama seledri, yaitu selenine, limonene, apigenin, kaempferol, coumarin, dan luteolin, asam caffeic, asam p-coumaric, asam ferulic, tanin, saponin, dan kaempferol yang memiliki karakteristik antioksidan kuat untuk menghilangkan radikal bebas.⁴ Berbagai senyawa fitokimia, terutama polifenol (seperti flavonoid, asam fenolik, dan tansipropanoid) bertanggung jawab untuk mengumpulkan radikal

bebas dan aktivitas antioksidan tanaman.¹⁵² Polifenol memiliki efek biologis, terutama aktivitas antioksidan yang merupakan induktor untuk menahan radikal bebas dan peroksidasi. Polifenol umumnya menunjukkan sifat kimia yang serupa, yang berarti bahwa satu atau lebih jumlah gugus fenolik dapat bereaksi dengan donor hidrogen dan menetralkan radikal bebas.¹⁵³ Menurut penelitian terdahulu, akar seledri dan daunnya memiliki khasiat untuk menghilangkan radikal OH dan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan juga mengurangi intensitas peroksidasi liposom yang mewakili perlindungan tanaman.^{154,155}

2.6.4. Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Radikal Bebas

Menurut Liu *et al.* (2020), flavonoid (apiin, apigenin, dan rutin) dan terpen (α -ionone) memberikan kontribusi terbesar terhadap aktivitas pemulungan DPPH, diikuti oleh vitamin (riboflavin, phyloquinone, dan kolin), pigmen (safflomin A), dan karotenoid (3-hidroksi-3'-okso- β , ϵ -karoten).¹⁵⁶ Seperti yang dilaporkan sebelumnya, DPPH adalah N-atom-centered free radical (NOS) yang stabil pada suhu kamar dan telah banyak diterapkan untuk penentuan aktivitas antioksidan primer. Pemulungan DPPH didasarkan pada dua jalur utama, jalur pertama yaitu yang melibatkan penerimaan elektron atau atom hidrogen dari antioksidan.¹⁵⁷ Jalur kedua telah terbukti lebih menguntungkan untuk pemulungan DPPH.¹⁵⁸

Aktivitas antioksidan alami pada ekstrak seledri menunjukkan kapasitas pemulungan DPPH yang berbeda. Apiin, apigenin, dan rutin memiliki kapasitas tertinggi, terutama karena *bond dissociation energy* (BDE) ikatan O-H yang lebih rendah pada cincin-B, yang meningkatkan kemampuan mendonorkan atom-H.¹⁵⁶ Bendary *et al.* (2013) membandingkan kapasitas *scavenging* DPPH dan H₂O₂ dari anilin dan fenol (termasuk flavonoid), menemukan bahwa fenol lebih efektif dalam mengais DPPH daripada anilin, karena kemampuannya untuk kehilangan atom hidrogen lebih mudah.¹⁵⁹ Selain itu, lokasi dan jumlah ikatan O-H merupakan faktor penting dalam meningkatkan kapasitas *scavenging* DPPH.¹⁵⁶ Senyawa rutin memiliki dua gugus O-H aktif dalam posisi orto, yang merupakan ikatan O-H yang lebih lemah dibandingkan dengan fungsi para dan meta-dihidroksi sehingga menghasilkan kapasitas pemulung DPPH yang paling kuat.¹⁶⁰ Menurut struktur kimia flavonoid, kombinasi ikatan rangkap C2 = C3 dan gugus 4-karbonil pada cincin-C dapat secara efisien menggeser elektron cincin-B melalui efek resonansi, yang membantu meningkatkan kapasitas penangkapan radikal.¹⁶¹

Liu *et al.* (2020) juga melaporkan bahwa asam lemak tak jenuh (asam oleat dan asam linolenat) dan vitamin (asam pantotenat dan vitamin E suksinat) memberikan kontribusi terbesar terhadap aktivitas penangkapan radikal, diikuti oleh flavonoid (3,7 - dihidroksiflavan dan apigenin), kumarin (peucedanin), vitamin (kolin dan riboflavin), dan pigmen (safflomin A), sedangkan

flavonoid (sianidin dan apiin) memberikan kontribusi terkecil. $O_2^{\cdot -}$ adalah *reactive oxygen species* (ROS) yang secara langsung dapat menyerang makromolekul biologis (seperti DNA, protein, dan lipid membran) sehingga dapat menginduksi kerusakan jaringan¹⁵⁶. $O_2^{\cdot -}$ dapat secara langsung menghasilkan radikal hidroksi ($\cdot OH$), yang merupakan ROS paling berbahaya, karena mampu memodifikasi hampir setiap molekul dalam sel hidup.¹⁶² $O_2^{\cdot -}$ juga dapat bereaksi dengan *nitric oxide* (NO) untuk membentuk anion peroksinitrit, yang menyebabkan lebih banyak kerusakan pada sel daripada hanya $O_2^{\cdot -}$ dan NO.¹⁶³ Oleh karena itu, kapasitas pemulung $O_2^{\cdot -}$ dapat berfungsi sebagai indikator signifikan dari aktivitas antioksidan potensial seledri.

Radikal ROS (seperti $O_2^{\cdot -}$) terutama menyerang *unsaturated fatty acids* (UFAs) di dalam membran sel. Peroksidasi lipid dari UFA dapat mengalami reaksi berantai yang berlangsung sendiri.¹⁵⁷ Oksidasi UFA menghasilkan radikal asam lemak ($R\cdot$), yang dengan cepat menangkap oksigen untuk membentuk radikal asam lemak peroksil ($ROO\cdot$). $ROO\cdot$ selanjutnya menerima atom hidrogen dari UFA lain, menghasilkan lipid hidroperoksida ($ROOH$). Selanjutnya, $ROOH$ terurai menjadi spesies yang lebih radikal. UFA eksogen juga dapat mengerahkan $O_2^{\cdot -}$ kapasitas pemulungan yang kuat.¹⁶⁴ Selanjutnya, vitamin E suksinat dapat dihidrolisis untuk membentuk vitamin E bebas. Vitamin E, yang berfungsi sebagai “*chain breaker*” lipolarut yang kuat, dapat mencegah $ROO\cdot$ dan menghentikan reaksi

berantai peroksidasi lipid.¹⁶⁰ Asam pantotenat juga merupakan faktor penting dalam pencegahan stres oksidatif pada jaringan. Asam pantotenat, sebagai prekursor dan penyusun koenzim A (CoA), dapat merangsang biosintesis CoA. CoA dapat mengurangi kandungan tert-butil hidroperoksida (sebuah generator ROS) menjadi hampir nol dan meningkatkan kandungan glutathione (mengubah ROOH menjadi ROH yang stabil) dan rasio GSH/GSSG lebih dari 50% pada sel asites Ehrlich.¹⁶⁵ Mekanisme ini bertanggung jawab atas hubungan yang kuat dari UFA (asam linolenat dan asam oleat) dan vitamin (asam pantotenat dan vitamin E suksinat) dalam seledri dengan kapasitas pemulung $O_2^{\cdot -}$.

2.6.5. Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Caspase 3

Tanaman seledri merupakan tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena adanya senyawa flavonoid dan fenolik didalamnya. Beberapa flavonoid telah menunjukkan efek perlindungan ginjal terhadap banyak agen nefrotoksik yang dapat menyebabkan kerusakan ginjal akut atau kronis. Flavonoid yang telah dilaporkan dapat melindungi ginjal tikus atau mencit terhadap agen nefrotoksik meliputi flavocoxid,¹⁶⁶ pinocembrin,¹⁶⁷ gossypin,¹⁶⁸ dan baicalin yang dapat melindungi ginjal terhadap kerusakan oksidatif ginjal yang diinduksi timbal pada tikus.¹⁶⁹

Nefrotoksisitas dapat dikurangi dengan *pre-treatment* dengan luteolin melalui peningkatan level oksidan ginjal dan pengurangan aktivasi NF-kB dan faktor inflamasi serta apoptosis.¹⁷⁰ Beberapa

flavonoid dapat memperbaiki kerusakan ginjal pada tikus dan mencit, mengurangi perubahan histopatologi, dan mengurangi peningkatan kreatinin serum dan nitrogen urea darah. Mekanisme aksinya melibatkan beberapa jalur kaskade inflamasi dan gangguan oksidatif, termasuk downregulasi NF- κ B yang diaktifkan ekspresi protein p65 dan *downstream effectors* (misalnya, iNOS dan Proteinurea), dengan pemulihan IL-10 anti-inflamasi dan pengurangan aktivasi phospho-NF- κ B p65 dan phospho-P38 MAPK dan ekspresi Nrf2 pada kerusakan ginjal. Flavonoid juga menurunkan regulasi ekspresi penanda apoptosis caspase-3, menghambat apoptosis yang diinduksi dan dengan demikian mendukung kelangsungan hidup sel ginjal.^{15,150,171-178}

Penelitian Liu *et al.* (2017) menunjukkan bahwa senyawa Luteolin yang merupakan salah satu senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak biji seledri secara signifikan dapat meningkatkan tingkat Bcl-2 dan mengurangi tingkat Bax yang juga menyebabkan penurunan tingkat caspase-3, yang pada akhirnya dapat mengurangi apoptosis pada jaringan ginjal.¹⁷⁹ Apoptosis atau kematian sel terprogram terlibat dalam homeostasis jaringan melalui eliminasi sel yang ditargetkan tanpa mengganggu fungsi fisiologis normal jaringan.¹⁸⁰

Menurut Gao *et al.* (2011), ekstrak daun seledri dapat menginduksi apoptosis seluler dengan cara yang bergantung pada konsentrasi dan waktu melalui jalur yang dimediasi oleh caspase dan

mitokondria. Jalur kematian yang diprakarsai oleh mitokondria memainkan peran penting dalam memicu apoptosis sebagai respons terhadap rangsangan tersebut. Pada jalur kematian yang diprakarsai mitokondria, mitokondria yang mengalami transisi permeabilitas melepaskan protein apoptogenik atau faktor pemicu apoptosis dari ruang antar membran mitokondria ke dalam sitosol untuk mengaktifkan caspase-9, dan mengaktifkan caspase-9 pada gilirannya membelah dan mengaktifkan algojo caspase-3. Aktivitas caspase-3, -8, dan -9 diregulasi, menunjukkan bahwa caspase berpartisipasi dalam proses apoptosis ini.¹⁸¹ Bax adalah komponen kunci untuk apoptosis yang diinduksi seluler melalui stres mitokondria.³⁰ Setelah stimulasi apoptosis, Bax membentuk oligomer dan mentranslokasi dari sitosol ke membran mitokondria^{182,183} dan telah terbukti menginduksi pelepasan sitokrom c dan langkah-langkah selanjutnya (termasuk caspase-9 dan caspase-3) pada fase eksekusi apoptosis.^{184,185} Ekstrak daun seledri dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi Bax proapoptosis, sementara Bcl-xL antiapoptosis diatur ke bawah setelah peningkatan signifikan aktivitas caspase-3.¹⁸¹

BAB III

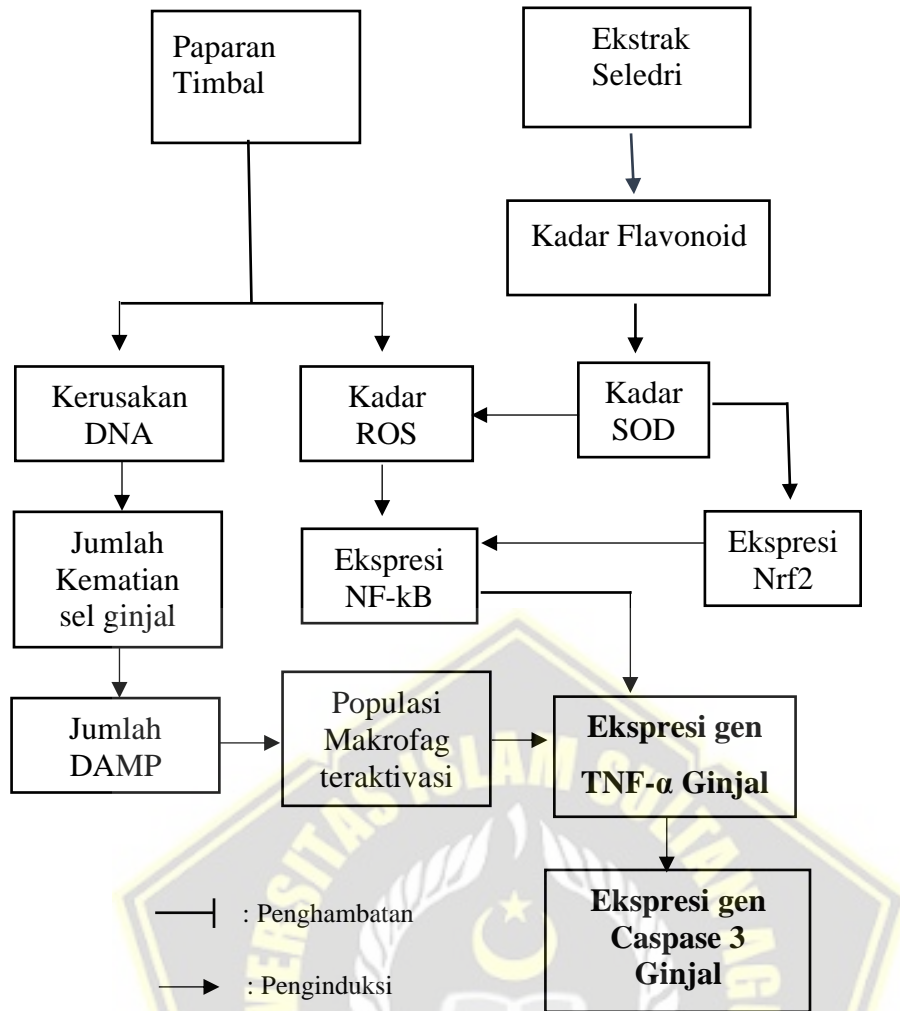
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Sehubungan dengan mekanisme keracunan Timbal, paparan Timbal pada jaringan ginjal menghasilkan pembentukan ROS yang secara langsung menginduksi kerusakan aktivasi NF-kB yang berperan dalam stimulasi sintesis protein pro-inflamasi, termasuk TNF alpha. Produksi TNF alpha secara terus menerus akibat paparan timbal akan memicu aktivasi cascade caspase 8 hingga caspase 3 yang dapat berujung pada apoptosis sel pada ginjal yang berakibat pada kerusakan fungsi ginjal dan ditandai oleh adanya peningkatan ekspresi caspase 3 dan ekspresi gen tnf alpha.

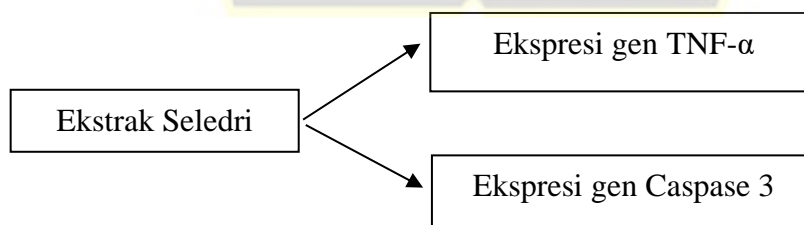
Seledri diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti apigenin dan antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS sehingga dapat mencegah aktivasi NF-kB dan penurunan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF alpha yang berujung pada penekanan ekspresi Caspase 3.

Selain itu Antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang dapat memblokir jalur TNF alpha. Pemblokiran TNF alpha oleh Nrf2 dapat mencegah terjadinya induksi caspase 3 sel pada jaringan ginjal sehingga fungsi ginjal terjaga yang ditandai dengan penurunan TNF-A. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus yang terpapar timbal dibandingkan kontrol.

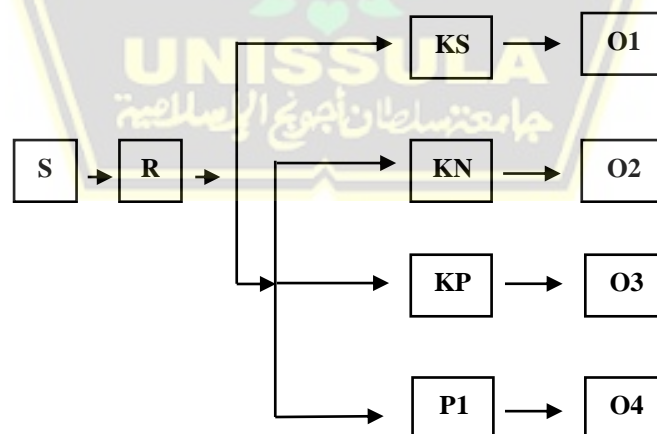


BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental hewan coba dengan rancangan acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subyek penelitian adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot badan 200-250 gr. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Kontrol Sehat (Tikus sehat tanpa paparan Timbal dan diberi pakan standar),
2. Kontrol Negatif (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan diberi pakan standar),
3. Kontrol Positif (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan diberikan vitamin E 50 IU serta pakan standar).
4. Perlakuan (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan ekstrak seledri 300mg/kgBB/hari serta pakan standar)



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak Seledri ¹⁸⁷

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF-A

4.2.2. Definisi Operasional

a. Ekstrak Seledri

Ekstrak seledri dalam penelitian ini adalah ekstrak daun seledri yang berasal dari area Jawa Tengah dan berusia antara 1-3 bulan yang diekstrak menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan oral dengan diencerkan menggunakan aquabides dengan dosis 200 mg/kgBB. Satuan ekstrak seledri menggunakan satuan milligram (mg) dan skala nominal.

b. Ekspresi gen TNF Alpha

adalah TNF alpha yang dianalisis dari sampel jaringan ginjal pada hari ke-15 setelah 14 hari pemberian perlakuan. Ekspresi gen TNF- α dianalisis dengan PCR dengan satuan fold change dan skala rasio.

c. Ekspresi gen Caspase 3

Caspase 3 adalah protein yang relatif kecil yang terdiri dari 2 subunit, subunit 12- dan 17-kDa yang berperan dalam inisiasi

proses apoptosis. Ekspresi gen Caspase 3 ginjal dianalisis dengan PCR dengan satuan fold change dan skala rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 180-200 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dan dipapar timbal secara oral dengan kadar 200 mg/kgBB selama 14 hari .

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar
2. Umur 2-3 bulan.
3. Mengalami paparan Timbal akibat paparan Timbal
4. Tikus sehat
5. Berat badan 180-200 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tidak mengalami paparan Timbal

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Kontrol Sehat (tikus sehat tanpa paparan Timbal), Kontrol Negatif (tikus model paparan Timbal yang tidak diberi perlakuan), Kontrol Positif (tikus model paparan Timbal yang diberi Vitamin E dosis 50 IU), Perlakuan (tikus model paparan Timbal yang diberi ekstrak Seledri secara oral dosis 300 mg/kgBB).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal mengikuti ketentuan WHO yaitu sebanyak 5 ekor per jenis perlakuan dikali dengan jumlah waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari ke 15 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus wistar

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan untuk membuat hewan model yang terdiri alat sonde, botol kaca gelap, kandang pemeliharaan, dan tempat air minum tikus. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan data antara lain tabung conical 15 mL, dan kandang metabolisme. Alat yang digunakan untuk analisis data

terdiri dari microplate reader, mikroskop binokular, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop dengan RAM 2GB.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri asam asetat, aquades, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Permohonan *ethical clearance* penelitian diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Seledri

Pembuatan ekstrak seledri dilakukan di unit pelaksana teknis terpadu laboratorium Universitas Diponegoro dengan cara Seledri sebanyak ± 600 gram dicacah, didehidrasi pada suhu $50 - 60^{\circ} \text{C}$ dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol 95% kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol dihilangkan dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga membentuk ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $2-8^{\circ} \text{C}$.

4.5.3. Penetapan Dosis

Dosis pemberian ekstrak Seledri ditentukan sebelum penelitian dengan studi literatur. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa

pemberian 150 mg/kgBB/hari ekstrak Seledri secara oral melindungi fungsi ginjal¹². Oleh karena itu penelitian ini menggunakan dosis yang ditingkatkan menjadi 300 mg/kg/BB/hari.

4.5.4. Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diadaptasi selama 1 minggu setelah sampai di tempat penelitian
2. Tikus diinduksi timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquadestilata selama 14 hari¹¹.
3. Tikus pada Perlakuan diberi perlakuan ekstrak Seledri secara oral bersamaan dengan induksi timbal asetat dengan dosis 200 mg/kg BB (P) dan Vitamin E dosis 50 IU (KP).¹²
4. Tikus Kontrol Negatif tidak diinduksi timbal dan hanya mendapat pakan standar.

4.5.5. Pengambilan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan organ ginjal. Bagian abdomen tikus dibedah kemudian sampel ginjal diambil untuk analisis PCR. Jaringan yang akan dianalisis PCR dimasukkan dalam RNA later dan disimpan dalam suhu -20⁰ C hingga proses analisis.

4.5.6. Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF- α dan caspase-3 menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁷⁵

Isolasi RNA dari ginjal dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

2. Penentuan Ekspresi gen Caspase 3⁷⁶

Gen TNF- α dan caspase 3 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

3. Penentuan Ekspresi Gen TNF- α dan caspase-3⁷⁶

Gen TNF- α dan caspase-3 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

Tabel 4.1. komponen PCR Mix GPx

Komponen	Jenis
Primer	Forward TNF- α
TNF- α	5'- CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG -3' Reverse TNF- α
Reagen	5'- ATGGGCTACAGGCTTGTCACCTC -3'
RNA transcribed	Trizol Reagen
cDNA	High Capacity cDNA Reverse Transcription SYBR Green

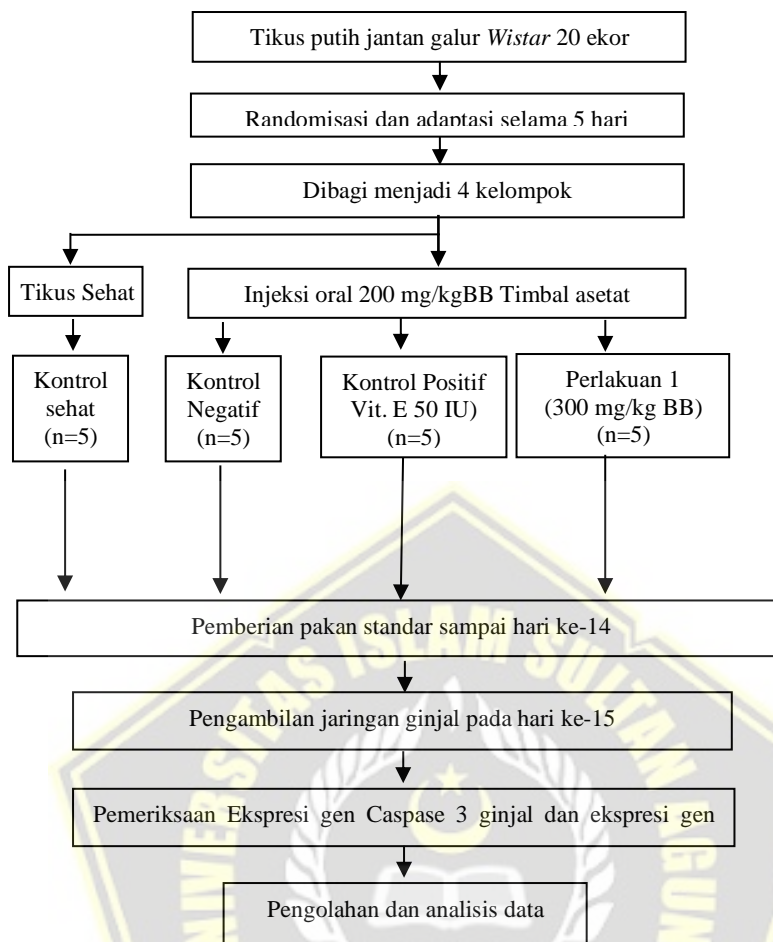
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di SCCR, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Penelitian rencana akan dilakukan pada juli-agustus 2022.

4.7. Analisa Data

Data RT-PCR TNF alpha dan Caspase 3 dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang dihasilkan normal dan homogen, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD dan Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila data yang diperoleh tidak normal dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0. data tersebut bermakna bila Pvalue < 0.05

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli hingga Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200–250-gram dan berumur 2-3 bulan yang diinduksi timbal asetat. Penelitian ini menggunakan 20 ekor hewan model dan tidak ada yang eksklusif atau drop out selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yang terdiri dari, kelompok sehat terdiri dari 5 ekor tikus, kelompok kontrol negatif yang terdiri dari 5 ekor tikus yang mendapatkan induksi timbal asetat 200 mg/kgBB/hari secara peroral selama 14 hari, kelompok kontrol positif yang mendapatkan induksi timbal asetat dan vitamin E dosis 50 IU/kgBB/hari secara peroral selama 14 hari, dan kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor hewan uji yang mendapatkan pemberian timbal dosis 200mg/kgBB/hari dan ekstrak seledri 300 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Profil fitokimia seledri

Sampel seledri yang digunakan pada penelitian ini telah dikonfirmasi secara taksonomi oleh laboratorium UPT lab terpadu Universitas Diponegoro dengan nomor seri DT.01.03/8/1002/2022 bahwa sampel seledri yang digunakan adalah spesies *Apium graveolens* L. Ekstrak seledri terbukti mengandung senyawa golongan alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, dan steroid. Ekstrak seledri pada penelitian ini mengandung senyawa flavonoid total

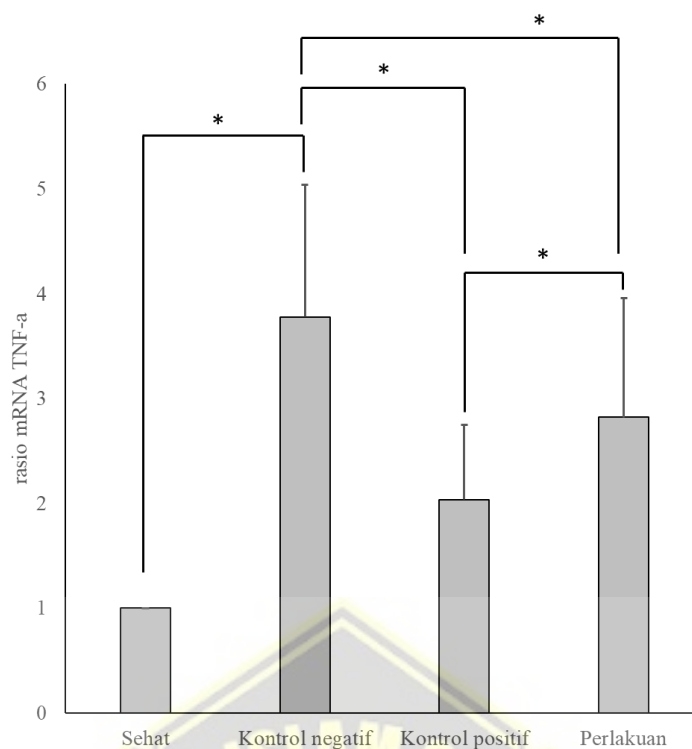
dengan kadar 14,3036 mg/gram extract. Pada penelitian ini akan dilakukan evaluasi aktivitas ekstrak seledri terhadap ekspresi gen TNF alpha dan caspase-3.

Tabel 5.1. Data hasil penelitian ekspresi gen TNF alpha dan caspase-3

Variabel	Kelompok				pvalue P<0.05
	Sehat n=5 mean±SD	Kontrol negatif n=5 mean±SD	Kontrol positif n=5 mean±SD	Perlakuan n=5 mean±SD	
Ekspresi gen TNF alpha	1.02±0.01	3.87±0.09	2.13±0.26	3.13±0.34	
<i>Saphiro wilk</i>	1.000	0.377	0.167	0.821	
<i>Levene test</i>					0.063
<i>One way Anova</i>					0.000
Ekspresi gen Caspase-3	1.02±0.01	7.95±0.23	7.05±0.28	2.48±1.23	
<i>Saphiro wilk</i>	1.000	0.503	0.196	0.112	
<i>Levene test</i>					0.003
<i>Kruskal-Wallis</i>					0.024

5.1.2. Efek Pemberian seledri terhadap ekspresi gen TNF alpha

Ekspresi gen TNF alpha adalah satu jenis sitokin pro inflamasi yang diekspresikan dan disekresikan oleh sel imun termasuk monosit, makrofag dan sel T.⁴⁴ Pada penelitian ini diperoleh hasil ekspresi gen TNF alpha pada kelompok perlakuan lebih rendah (3.13±0.34) dari pada kontrol negatif (3.87±0.09), namun ekspresi gen pada kelompok kontrol positif (2.13±0.26) memiliki tren lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan (Gambar 5.1.).



Gambar 5.1. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA TNF alpha pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan $p < 0.05$.

Tabel 5.2. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi mRNA TNF alpha antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok perbandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0.000
	Kontrol positif	0.008
	Perlakuan	0.000
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.001
	Perlakuan	0.048
Kontrol positif	Perlakuan	0.013

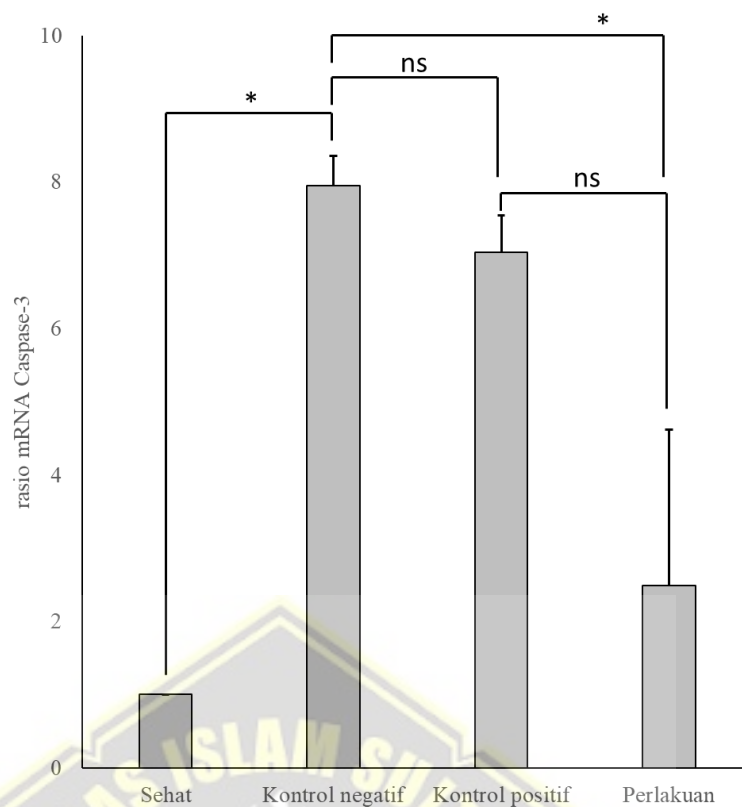
Pada data deskriptif ekspresi gen TNF alpha masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai $p > 0.05$ pada semua kelompok. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One-*

way ANOVA, dan dilanjutkan uji *Post-hoc LSD*. Uji beda *One-way ANOVA* didapatkan $p < 0.05$. Hasil uji *post-hoc LSD* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.1 dan tabel 5.2.

5.1.3. Efek pemberian ekstrak seledri terhadap ekspresi gen caspase 3

Caspase 3 adalah keluarga protease sistein yang berfungsi sebagai efektor utama selama apoptosis untuk pembongkaran sebagian besar struktur seluler secara proteolitik, termasuk sitoskeleton, cell junctions, mitokondria, retikulum endoplasma, Golgi, dan nukleus.¹⁷ Apoptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang menghilangkan sel-sel individu dalam suatu organisme dalam mempertahankan struktur keseluruhan jaringan di sekitarnya.^{18,19}

Pada penelitian ini diperoleh hasil ekspresi gen caspase-3 pada kelompok perlakuan lebih rendah (2.48 ± 1.23) dari pada kontrol negatif (7.95 ± 0.23), namun ekspresi gen pada kelompok kontrol positif (7.05 ± 0.28) tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok perlakuan (Gambar 5.2.).



Gambar 5.2. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA caspase-3 pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan $p < 0.05$. ns menunjukkan perbedaan tidak signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan $p > 0.05$.

Tabel 5.3. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi mRNA caspase-3 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok perbandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0.007
	Kontrol positif	0.089
	Perlakuan	0.734
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.308
	Perlakuan	0.017
Kontrol positif	Perlakuan	0.174

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian seledri 300mg per kgbb perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen caspase 3 dibandingkan kontrol negatif, namun pemberian perlakuan pada kelompok vitamin

E kontrol positif tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak seledri mampu menurunkan ekspresi gen caspase 3 setara dengan kondisi sehat tanpa paparan timbal. Pada data deskriptif ekspresi gen caspase 3 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$ namun uji homogenitas memiliki nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan data tidak homogen. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan tidak homogen sehingga dilakukan uji non parametrik kurskal-wallis, dan dilanjutkan uji mann-whitney. Uji beda kurskal wallis didapatkan didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji mann-whitney disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.2 dan tabel 5.3.

5.2. Pembahasan

Penelitian mengenai Ekstrak Seledri terhadap ekspresi gen TNF- α dan ekspresi gen caspase-3 ginjal ini menggunakan 20 ekor tikus jantan galur wistar yang dibagi 4 (empat) kelompok: K1 (kelompok tikus normal) dan K2-K4 tikus yang dibuat model keracunan timbal. Pembuatan keracunan timbal dilakukan melalui pemberian paparan timbal 200mg/kgBB/hari selama 14 hari kemudian. Selanjutnya, pada K3 diberikan vitamin E 50IU/kgBB¹⁶ dan K4 diberikan ekstrak seledri 300mg/kgBB dengan lama perlakuan selama 14 hari. Penelitian ini menggunakan tikus jantan wistar karena secara karakteristik gen, biologi dan perilaku mempunyai kemiripan

dengan manusia serta tidak dipengaruhi hormone dan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh seledri dalam menurunkan kadar TNF- α serta menghambat apoptosis sel-sel otak yang ditandai dari penurunan ekspresi Caspase-3 ginjal pada tikus yang dipapar timbal.

Penelitian ini melakukan pemaparan Timbal yang menyebabkan pembentukan ROS pada jaringan otak sehingga mengaktifkan jalur PI3K dan AKT yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi NF-kB yang berperan dalam stimulasi pelepasan protein proinflammasi termasuk TNF- α .¹¹² Induksi timbal juga terbukti mengaktifkan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) fosforilasi. Hal tersebut akan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi protein heterodimeric (AP-1) yang mengandung c-jun protein, sehingga menyebabkan aktivasi gen TNF- α .²⁹ pada penelitian ini TNF- α yang teraktivasi menyebabkan aktivasi balik faktor transkripsi NF-kB dan AP-1.¹¹³ Pada kondisi kadar TNF- α yang meningkat, menginduksi kematian sel melalui Paparan timbal adalah salah satu faktor resiko peradangan dan apoptosis pada sel ginjal, ditandai dengan peningkatan ekspresi gen TNF alpha dan Caspase 3, melalui pembentukan ROS oksidatif, yang mengakibatkan aktivasi beberapa jalur inflamasi dan apoptosis. Pencegahan saat ini tidak semuanya memberikan hasil maksimal terutama dalam mencegah proses peradangan dan apoptosis. Penelitian terkini membuktikan bahwa ekstrak seledri bisa menurunkan kadar ekspresi gen TNF alpha dan ekspresi gen caspase 3 pada ginjal yang dipapar timbal asetat. Penelitian ini

bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak seledri bisa menurunkan kadar ekspresi gen TNF alpha dan ekspresi gen caspase 3 pada ginjal.

Penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak seledri secara signifikan menurunkan ekspresi gen TNF alpha dan ekspresi gen Caspase-3. Pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak seledri melindungi tikus dari anemia pada tikus nephrectomy melalui pengahambat radikal bebas. Paparan timbal akan mengakibatkan stress oksidatif dan akan mengaktifkan nfkb pathway, jalur tersebut secara langsung akan meningkatkan ekspresi sitokin pro inflamasi ,seperti TNF alpha.¹¹²

Peningkatan TNF alpha dapat mengaktifkan jalur pospatidil tri inositol (PI3K) melalui peningkatan ekspresi p38 yang meningkatkan ekspresi caspase 3 sehingga menginduksi apoptosis sel pada ginjal. Pada penelitian ini senyawa yang terkandung dalam ekstrak seledri seperti flavonoid terbukti sebagai anti oksidan sehingga dapat menurunkan proses peradangan dengan cara meningkatkan nrf2 sehingga menekan stress oksidatif¹¹³

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak seledri memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi gen TNF alpha dan Ekspresi gen caspase 3 ginjal tikus yang terpapar timbal asetat. Namun tidak lebih baik bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif²⁹

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah ekstrak seledri tidak lebih baik dari pada vitamin E untuk menekan ekspresi gen TNF alpha dan Ekspresi gen Caspase 3 ginjal tikus yang terpapar timbal asetat. Pada penelitian ini juga tidak melakukan pengukuran kadar ROS yang merupakan factor utama pengaruh timbal asetat.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

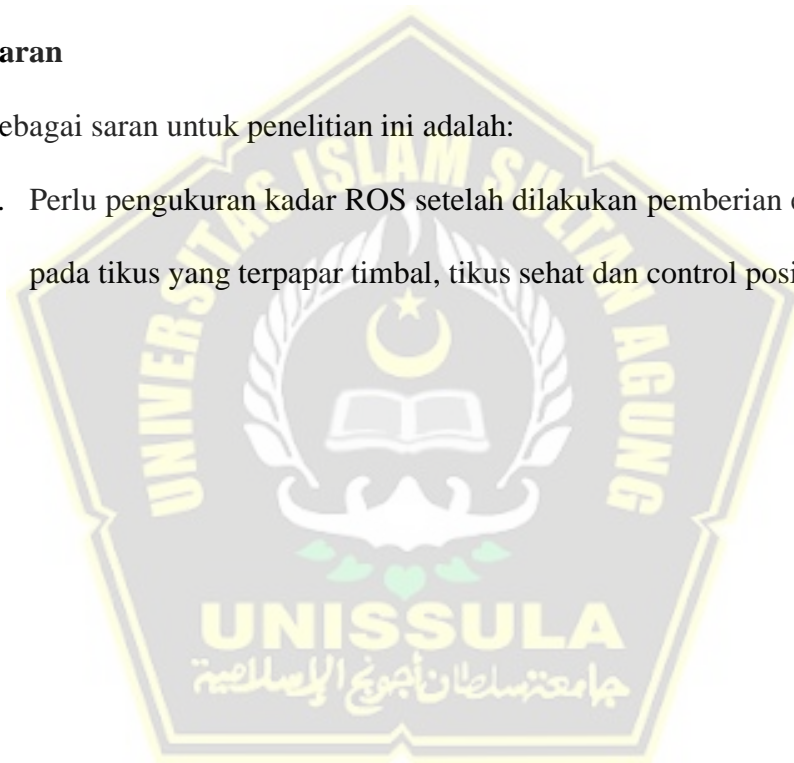
1. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Ekspresi gen Caspase 3 dan ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus yang terpapar timbal asetat
2. Tidak Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol negatif.
3. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol negatif.
4. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol positif.
5. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol positif.
6. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol perlakuan.
7. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok sehat dan kelompok kontrol perlakuan.
8. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif.
9. terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok negatif dan kelompok kontrol positif.

10. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol perlakuan.
11. terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol perlakuan.
12. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Caspase 3 ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan.
13. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen TNF- α ginjal pada tikus wistar kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian ekstrak seledri pada tikus yang terpapar timbal, tikus sehat dan control positif.



DAFTAR PUSTAKA

1. Rana, M. N., Tangpong, J. & Rahman, M. M. Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. *Toxicology Reports* (2018) doi:10.1016/j.toxrep.2018.05.012.
2. Afifah *et al.* Protective effect of ethanol extract of celery (*Apium graveolens* L) on kidney damage in ischemia/ reperfusion injury rats model. *Molekul* (2019) doi:10.20884/1.jm.2019.14.1.448.
3. Powanda, M. C., Whitehouse, M. W. & Rainsford, K. D. Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities. *Prog. Drug Res.* (2015) doi:10.1007/978-3-0348-0927-6_4.
4. Kooti, W. & Daraei, N. A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens* L). *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2017) doi:10.1177/2156587217717415.
5. Gummin, D. D. *et al.* 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 37th Annual Report. *Clin. Toxicol. (Phila).* (2020) doi:10.1080/15563650.2020.1834219.
6. Dumková, J. *et al.* Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part. Fibre Toxicol.* (2017) doi:10.1186/s12989-017-0236-y.
7. George, B., You, D., Joy, M. S. & Aleksunes, L. M. Xenobiotic transporters and kidney injury. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) doi:10.1016/j.addr.2017.01.005.
8. Rastogi, S. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* (2008) doi:10.4103/0019-5278.44689.
9. Din, Z. U., Shad, A. A., Bakht, J., Ullah, I. & Jan, S. In vitro antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Apium graveolens*. *Pak. J. Pharm. Sci.* (2015).

10. Sowbhagya, H. B. Chemistry, Technology, and Nutraceutical Functions of Celery (*Apium graveolens* L.): An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2014) doi:10.1080/10408398.2011.586740.
11. Osman, N. The role of antioxidant properties of Celery against lead acetate induced hepatotoxicity and oxidative stress in irradiated rats. *Arab J. Nucl. Sci. Appl.* **46**, 339–346 (2013).
12. Nainggolan, M., Sinaga, K. R., Sinaga, S. M. & Nugraha, S. E. Effect of Ethanol Extract of Celery (*Apium graveolens* L) against Urea and Creatinine Level in Male Wistar Rats on Ethylene Glycol Induced Nephrolithiasis. in (2020). doi:10.5220/0010087107420746.
13. Afifah, A. *et al.* The protective effect of celery (*Apium graveolens* L.) ethanol extract on anemia in 5/6 subtotal nephrectomy rat model. *Universa Med.* **39**, 12–18 (2020).
14. Sahindokuyucu-Kocasari, F., Akyol, Y., Ozmen, O., Erdemli-Kose, S. B. & Garli, S. Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* (2021) doi:10.1177/09603271211009964.
15. He, X. *et al.* Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *European Journal of Pharmacology* (2016) doi:10.1016/j.ejphar.2016.07.003.
16. Abo-Elmaaty, A. M. A., Behairy, A., El-naseery, N. I. & Abdel-Daim, M. M. The protective efficacy of vitamin E and cod liver oil against cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2020) doi:10.1007/s11356-020-10351-9.
17. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2008) doi:10.1038/nrm2312.
18. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
19. Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* (1999) doi:10.1038/sj.cdd.4400476.
20. Parrish, A. B., Freel, C. D. & Kornbluth, S. Cellular mechanisms

- controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2013) doi:10.1101/cshperspect.a008672.
21. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* (1999) doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
 22. Boatright, K. M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* (2003) doi:10.1016/S1097-2765(03)00051-0.
 23. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2007) doi:10.1038/nrm2153.
 24. Van Damme, P. *et al.* Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat. Methods* (2005) doi:10.1038/nmeth792.
 25. Stoyanovsky, D. A. & Billiar, T. R. Cellular non-heme iron modulates apoptosis and caspase 3 activity. in *Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide* (2007). doi:10.1016/B978-044452236-8/50012-5.
 26. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation* (2015) doi:10.1038/cdd.2014.216.
 27. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* (2007) doi:10.1080/01926230701320337.
 28. Boland, K., Flanagan, L. & Prehn, J. H. M. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death and Disease* (2013) doi:10.1038/cddis.2013.250.
 29. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J.-C. Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol. Cell. Biol.* (2000) doi:10.1128/mcb.20.3.929-935.2000.
 30. Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (80-.). (2001) doi:10.1126/science.1059108.
 31. Wei, M. C. *et al.* tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* (2000)

- doi:10.1101/gad.14.16.2060.
32. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E. & Boise, L. H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* (2013) doi:10.1186/1471-2121-14-32.
 33. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80434-1.
 34. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* (1998) doi:10.1016/S1097-2765(00)80095-7.
 35. Hyun, H. P. *et al.* The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual Review of Immunology* (2007) doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656.
 36. Reed, J. C., Doctor, K. S. & Godzik, A. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* (2004) doi:10.1126/stke.2392004re9.
 37. Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E. & Yang, X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.* (2003) doi:10.1093/emboj/cdg414.
 38. Kantari, C. & Walczak, H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2011) doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.026.
 39. Billen, L. P., Shamas-Din, A. & Andrews, D. W. Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene* (2008) doi:10.1038/onc.2009.47.
 40. El-Nekeety, A. A., El-Kady, A. A., Soliman, M. S., Hassan, N. S. & Abdel-Wahhab, M. A. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2209–2215 (2009).
 41. Patra, R. C., Rautray, A. K. & Swarup, D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Veterinary Medicine International* (2011) doi:10.4061/2011/457327.
 42. Moniem, A. E. A., Dkhil, M. A. & Al-Quraishy, S. Protective role of

- flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *African J. Biotechnol.* (2010).
43. Elgawish, R. A. R. & Abdelrazek, H. M. A. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicol. Reports* (2014) doi:10.1016/j.toxrep.2014.10.010.
 44. Mehta, A. K., Gracias, D. T. & Croft, M. TNF activity and T cells. *Cytokine* (2018) doi:10.1016/j.cyto.2016.08.003.
 45. Lana, J. P. *et al.* TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* (2016) doi:10.1139/apnm-2016-0265.
 46. Bloemendaal, F. M. *et al.* TNF-anti-TNF immune complexes inhibit IL-12/IL-23 secretion by inflammatory macrophages via an fc-dependent mechanism. *J. Crohn's Colitis* (2018) doi:10.1093/ecco-jcc/jjy075.
 47. Schwabe, R. F. & Brenner, D. A. Mechanisms of liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (2006) doi:10.1152/ajpgi.00422.2005.
 48. Wang, S. & El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* (2003) doi:10.1038/sj.onc.1207232.
 49. Bratovic, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Toxicity of Lead Oxide Nanoparticles. in *Lead Chemistry* (2020). doi:10.5772/intechopen.91362.
 50. Karrari, P., Mehrpour, O. & Abdollahi, M. A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures. *DARU, J. Pharm. Sci.* (2012) doi:10.1186/1560-8115-20-2.
 51. Wani, A. L., Ara, A. & Usmani, J. A. Lead toxicity: A review. *Interdisciplinary Toxicology* (2015) doi:10.1515/intox-2015-0009.
 52. World Health. WHO | Breast cancer. *Who* (2018).
 53. Dobrakowski, M. *et al.* Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. *Hum. Exp. Toxicol.* (2017) doi:10.1177/0960327116665674.

54. Wilson, V., Hou, A., Zhang, R., Wilson, V. L. & Meng, G. HIV-1 RT inhibitor design View project Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures. *Anim. Sci. Food Saf.* (2015).
55. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B. & Beeregowda, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* (2014) doi:10.2478/intox-2014-0009.
56. Mehrpour, O., Karrari, P. & Abdollahi, M. Chronic lead poisoning in Iran; A silent disease. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* (2012) doi:10.1186/2008-2231-20-8.
57. Fathabadi, B. *et al.* Comparison of Blood Lead Levels in Patients With Alzheimer's Disease and Healthy People. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* (2018) doi:10.1177/1533317518794032.
58. Morais, S., e Costa, F. G. & Lourdes Pereir, M. de. Heavy Metals and Human Health. in *Environmental Health - Emerging Issues and Practice* (2012). doi:10.5772/29869.
59. Abdel Moneim, A. E. Indigofera oblongifolia prevents lead acetate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, fibrosis and apoptosis in rats. *PLoS One* (2016) doi:10.1371/journal.pone.0158965.
60. Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y. W. & Et, A. 3 . Health Effects of Lead. in *Toxicological profile for lead* (2007).
61. Safety, O., Administration, H. & others. Adult Blood Lead Epidemiology and Surveillance (ABLES). (2018).
62. Keramati, M. R., Sadeghian, M. H. & Mood, M. Akü sanayiinde çalışan işçilerde demir eksikliği anemisi ile kurşun intoksikasyonu ilişkisi. *UHOD - Uluslararası Hematol. Derg.* (2010).
63. Hayatbakhsh, M. M. *et al.* Lead poisoning among opium users in Iran: An emerging health hazard. *Subst. Abus. Treat. Prev. Policy* (2017) doi:10.1186/s13011-017-0127-0.
64. Kshirsagar, M. *et al.* Biochemical effects of lead exposure and toxicity on battery manufacturing workers of Western Maharashtra (India): with respect to liver and kidney function tests. *Al Ameen J Med Sci* **8**, 107–114 (2015).

65. Charkiewicz, A. E. & Backstrand, J. R. Lead toxicity and pollution in Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2020) doi:10.3390/ijerph17124385.
66. Sirivarasai, J. *et al.* Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: An analysis based on the EGAT study. *Biomed Res. Int.* (2015) doi:10.1155/2015/856319.
67. Dongre Nilima, N., Rathi, S. A. N. P. A. J. & others. Occupational Lead Exposure In Automobile Workers In North Karnataka (India): Effect On Liver And Kidney Functions. (2010).
68. for Toxic Substances, A. & Corporation, D. R. S. R. *Toxicological profile for lead.* (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Syracuse Research Corporation, 1990).
69. Nigra, A. E., Ruiz-Hernandez, A., Redon, J., Navas-Acien, A. & Tellez-Plaza, M. Environmental Metals and Cardiovascular Disease in Adults: A Systematic Review Beyond Lead and Cadmium. *Current environmental health reports* (2016) doi:10.1007/s40572-016-0117-9.
70. Sokol, R. Z. & Berman, N. The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology* (1991) doi:10.1016/0300-483X(91)90186-5.
71. Hammond, P. B. *et al.* The relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. *J. Occup. Med.* 475–484 (1980).
72. Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N. & Tsatsakis, A. M. Lead toxicity update. A brief review. *Medical Science Monitor*, 11 (10), RA329-RA336. (2005).
73. Lin, J.-L., Tan, D.-T., Hsu, K.-H. & Yu, C.-C. Environmental lead exposure and progressive renal insufficiency. *Arch. Intern. Med.* **161**, 264–271 (2001).
74. Chin KY and Nirwana SI. The Role of Vitamin E in Preventing and Treating Osteoarthritis A Review of the Current Evidence. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, vol. 9 : 946. fii: 10.3389/fphar.2018.00946
75. Keen MA and Hassan I. Vitamin E in Dermatology. *Indian Dermatology*

Online Journal. 2016, vol. 7: 311 - 315

76. Peh, H. Y., Tan, W. S., Liao, W., and Wong, W. S. (2016). Vitamin E therapy beyond cancer: tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacol. Ther.* 162, 152–169. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.12.003
77. Dworski, R., Han, W., Blackwell, T. S., Hoskins, A., and Freeman, M. L. (2011). Vitamin E prevents NRF2 suppression by allergens in asthmatic alveolar macrophages in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 516–521. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.040
78. Scott, J. G. & WEINER, D. National Kidney Foundation Primer on Kidney Diseases. *AN Mehta M. Emmett.--12--Approach to Acid-Base Disord.* 113–122 (2014).
79. Danziger, J. & Zeidel, M. L. Osmotic homeostasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 852–862 (2015).
80. Palmer, L. G. & Schnermann, J. Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 676–687 (2015).
81. Subramanya, A. R. & Ellison, D. H. Distal convoluted tubule. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 2147–2163 (2014).
82. Curthoys, N. P. & Moe, O. W. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1627–1638 (2014).
83. Blaine, J., Chonchol, M. & Levi, M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1257–1272 (2015).
84. Hoenig, M. P. & Zeidel, M. L. Homeostasis, the milieu interieur, and the wisdom of the nephron. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1272–1281 (2014).
85. Rayner, H., Thomas, M. & Milford, D. *Understanding kidney diseases.* (Springer, 2016).
86. Radi, Z. A. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. *Int. J. Toxicol.* **38**, 215–227 (2019).
87. Robertson, E. E. & Rankin, G. O. Human renal organic anion transporters: characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion. *Pharmacol. & Ther.* **109**, 399–412 (2006).
88. Bunprajun, T., Yuajit, C., Noitem, R. & Chatsudthipong, V. Exhaustive

- exercise decreases renal organic anion transporter 3 function. *J. Physiol. Sci.* **69**, 245–251 (2019).
89. Levey, A. S., Becker, C. & Inker, L. A. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *Jama* **313**, 837–846 (2015).
 90. . Silva, R. *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol. & Ther.* **149**, 1–123 (2015).
 91. Nakhaee, S., Amirabadizadeh, A., Brent, J. & Mehrpour, O. Impact of chronic lead exposure on liver and kidney function and haematologic parameters. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2019) doi:10.1111/bcpt.13179.
 92. Bernard, A. M. *et al.* Renal effects in children living in the vicinity of a lead smelter. *Environ. Res.* **68**, 91–95 (1995).
 93. Loghman-Adham, M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ. Health Perspect.* **105**, 928–939 (1997).
 94. Pollock, C. A. & Ibels, L. S. Lead intoxication in paint removal workers on the Sydney Harbour Bridge. *Med. J. Aust.* **145**, 635–639 (1986).
 95. . Flora, G., Gupta, D. & Tiwari, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* (2012) doi:10.2478/v10102-012-0009-2.
 96. Goyer, R. A. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **46**, 153–162 (1989).
 97. . Ritz, E., Mann, J. & Stoeppler, M. Lead and the kidney. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* **17**, 241–274 (1988).
 98. . Yu, C.-C., Lin, J.-L. & Lin-Tan, D.-T. Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: a four-year prospective longitudinal study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1016–1022 (2004).
 99. Lin, J. L. & Huang, P. T. Body lead stores and urate excretion in men with chronic renal disease. *J. Rheumatol.* (1994).\
 100. Odigie, I. P., Ladipo, C. O., Ettarh, R. R. & Izegebu, M. C. Effect of chronic exposure to low levels of lead on renal function and renal

- ultrastructure in SD rats. *Niger. J. Physiol. Sci.* **19**, 27–32 (2004).
101. Benjelloun, M. *et al.* Chronic lead poisoning: a " forgotten" cause of renal disease. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* **18**, 83 (2007).
 102. Nasr, S. H. *et al.* Crystalline nephropathy due to 2, 8-dihydroxyadeninuria: an under-recognized cause of irreversible renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 1909–1915 (2010).
 103. Bennett, W. M. & others. Lead nephropathy. *Kidney Int.* **28**, 212–220 (1985).
 104. Mueller, P. W., Smith, S. J., Steinberg, K. K. & Thun, M. J. Chronic renal tubular effects in relation to urine cadmium levels. *Nephron* (1989) doi:10.1159/000185581.
 105. Hounkpatin, H. O. *et al.* Predicting Risk of Recurrent Acute Kidney Injury: A Systematic Review. *Nephron* (2019) doi:10.1159/000497385.
 106. Lee, P., Johansen, K. & Hsu, C. Y. End-stage renal disease preceded by rapid declines in kidney function: A case series. *BMC Nephrol.* (2011) doi:10.1186/1471-2369-12-5.
 107. Cardenas, A. *et al.* Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. II. Application to workers exposed to lead. *Br. J. Ind. Med.* (1993) doi:10.1136/oem.50.1.28.
 108. Almeida Lopes, A. C. B. De *et al.* Association between blood lead and blood pressure: A population-based study in Brazilian adults. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* (2017) doi:10.1186/s12940-017-0233-5.
 109. Ericson, B. *et al.* The Global Burden of Lead Toxicity Attributable to Informal Used Lead-Acid Battery Sites. *Ann. Glob. Heal.* (2016) doi:10.1016/j.aogh.2016.10.015.
 110. Organization, W. H. & others. *Preventing disease through healthy environments: exposure to lead: a major public health concern.* (2019).
 111. ATSDR. Public Health Statement for Lead. *Agency Toxic Subst. Dis. Regist.* (2012).
 112. Cramer, K., Goyer, R. A., Jagenburg, R. & Wilson, M. H. Renal ultrastructure, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br. J. Ind. Med.* (1974)

- doi:10.1136/oem.31.2.113.
113. Weidemann, D. K., Weaver, V. M. & Fadrowski, J. J. Toxic environmental exposures and kidney health in children. *Pediatr. Nephrol.* (2016) doi:10.1007/s00467-015-3222-3.
 114. Zhang, L. *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in China: A cross-sectional survey. *Lancet* (2012) doi:10.1016/S0140-6736(12)60033-6.
 115. Arora, P. *et al.* Prevalence estimates of chronic kidney disease in Canada: Results of a nationally representative survey. *CMAJ* (2013) doi:10.1503/cmaj.120833.
 116. Jameson, K. *et al.* Prevalence and management of chronic kidney disease in primary care patients in the UK. *Int. J. Clin. Pract.* (2014) doi:10.1111/ijcp.12454.
 117. Wang, X. *et al.* Risk factors of renal dysfunction and their interaction in level-low lead exposure paint workers. *BMC Public Health* (2018) doi:10.1186/s12889-018-5475-9.
 118. Venkatesh, T. Editorial role of a clinical biochemist in evaluating the impact of lead poisoning. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (2013) doi:10.1007/s12291-012-0290-z.
 119. Hu, H., Rabinowitz, M. & Smith, D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: Conceptual paradigms. *Environmental Health Perspectives* (1998) doi:10.1289/ehp.981061.
 120. Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Cohen, A., Bergamaschi, E. & Mutti, A. Experimental model of lead nephropathy. II. Effect of removal from lead exposure and chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Environ. Res.* (1992) doi:10.1016/S0013-9351(05)80203-8.
 121. Morgan, J. M. Nephropathy in chronic lead poisoning. *Arch. Intern. Med.* (1966) doi:10.1001/archinte.118.1.17.
 122. Evans, M. & Elinder, C. G. Chronic renal failure from lead: Myth or evidence-based fact. *Kidney International* (2011) doi:10.1038/ki.2010.394.
 123. Schuchat, A. & Breysse, P. Agency for Toxic Substances and Disease Registry justification of appropriation estimates for Appropriations Committees fiscal year 2019. (2018).

124. OSHA. Safety and Health Topics | Toluene - Occupational Exposure Limits | Occupational Safety and Health Administration. *Natl. J. Community Med.* (2018).
125. Fadrowski, J. J. *et al.* Blood lead level and measured glomerular filtration rate in children with chronic kidney disease. *Environ. Health Perspect.* (2013) doi:10.1289/ehp.1205164.
126. Ruebner, R. L., Hooper, S. R., Parrish, C., Furth, S. L. & Fadrowski, J. J. Environmental lead exposure is associated with neurocognitive dysfunction in children with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* (2019) doi:10.1007/s00467-019-04306-7.
127. Annabi Berrahal, A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N. & El-Fazâa, S. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus - Biol.* (2007) doi:10.1016/j.crv.2007.05.007.
128. Reglero, M. M., Taggart, M. A., Monsalve-González, L. & Mateo, R. Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: Effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environ. Pollut.* (2009) doi:10.1016/j.envpol.2008.11.036.
129. Gonick, H. C. Lead-binding proteins: A review. *Journal of Toxicology* (2011) doi:10.1155/2011/686050.
130. Chaumont, A., De Winter, F., Dumont, X., Haufroid, V. & Bernard, A. The threshold level of urinary cadmium associated with increased urinary excretion of retinol-binding protein and β 2-microglobulin: A re-assessment in a large cohort of nickel-cadmium battery workers. *Occup. Environ. Med.* (2011) doi:10.1136/oem.2009.054122.
131. Sabath, E. & Robles-Osorio, M. L. Renal health and the environment: Heavy metal nephrotoxicity. *Nefrologia* (2012) doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.10928.
132. Hambach, R. *et al.* Adverse effects of low occupational cadmium exposure on renal and oxidative stress biomarkers in solderers. *Occup. Environ. Med.* (2013) doi:10.1136/oemed-2012-100887.
133. Reyes, J. L. *et al.* Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *BioMed Research International* (2013)

- doi:10.1155/2013/730789.
134. Kwon, S. Y. *et al.* Erythrophagocytosis of lead-exposed erythrocytes by renal tubular cells: Possible role in lead-induced nephrotoxicity. *Environ. Health Perspect.* (2015) doi:10.1289/ehp.1408094.
 135. Vervaet, B. A., D'Haese, P. C. & Verhulst, A. Environmental toxin-induced acute kidney injury. *Clinical Kidney Journal* (2017) doi:10.1093/ckj/sfx062.
 136. Garçon, G. *et al.* Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: Usefulness of alpha-glutathione S-transferase. *Sci. Total Environ.* (2007) doi:10.1016/j.scitotenv.2007.02.002.
 137. Farrag, A.-R. H. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against lead-induced hepatorenal damage in male rats' Abdel-Razik H. Farrag, "Karam A. Mahdy,'Gamal H. Abdel Rahman and "Mostafa M. Osfor" Departments of Pathology, "Department of Medical Biochemistry. *J. biol. sci* **10**, 2809–2816 (2007).
 138. Ahamed, M. & Siddiqui, M. K. J. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical Nutrition* (2007) doi:10.1016/j.clnu.2007.03.010.
 139. Wang, H. *et al.* Redistribution of subcellular calcium and its effect on apoptosis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. *Toxicology* (2015) doi:10.1016/j.tox.2015.04.015.
 140. Zhang, H., Li, W., Xue, Y. & Zou, F. TRPC1 is involved in Ca²⁺ influx and cytotoxicity following Pb²⁺ exposure in human embryonic kidney cells. *Toxicol. Lett.* (2014) doi:10.1016/j.toxlet.2014.05.017.
 141. Navarro-Moreno, L. G. *et al.* Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells. *Toxicol. Vitro.* (2009) doi:10.1016/j.tiv.2009.07.020.
 142. Yang, X. & Quiros, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* (1993) doi:10.1007/BF00222080.
 143. Domblides, A., Domblides, H. & Kharchenko, V. Discrimination Between

- Celery Cultivars with the Use of Rapd Markers. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B Nat. Exact, Appl. Sci.* (2008) doi:10.2478/v10046-009-0003-z.
144. Helaly, A. A.-D., El-Refy, A., Mady, E., Mosa, K. A. & Craker, L. Morphological and molecular analysis of three celery accessions. *J. Med. Act. plants* **2**, 27–32 (2014).
 145. Halim, A. F. Analysis of celery fruit oil and investigation of the effect of storage. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **31**, 107–113 (1990).
 146. Shalaby, M. A. & El Zorba, H. Y. Protective effect of celery oil, vitamin E and their combination against testicular toxicity in male rats. *Glob. Vet.* (2010).
 147. Tang, J., Zhang, Y., Hartman, T. G., Rosen, R. T. & Ho, C. T. Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds in Fresh Celery (*Apium graveolens* L.). *J. Agric. Food Chem.* (1990) doi:10.1021/jf00100a013.
 148. Peter, K. V. *Handbook of herbs and spices. Handbook of herbs and spices* (2012). doi:10.1533/9780857095688.
 149. Malhotra, S. K. Celery. in *Handbook of herbs and spices* 317–336 (Elsevier, 2006).
 150. Sowbhagya, H. B., Srinivas, P. & Krishnamurthy, N. Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. *Food Chem.* (2010) doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.013.
 151. Nadkarni, K. M. [*Indian materia medica*]; *Dr. KM Nadkarni's Indian materia medica: with Ayurvedic, Unani-Tibbi, Siddha, allopathic, homeopathic, naturopathic & home remedies, appendices & indexes. 1. vol. 1* (Popular Prakashan, 1996).
 152. Bhattacharjee, S. K. & others. *Handbook of medicinal plants.* (Aavishkar Publishers, 2000).
 153. Karnick, C. R. *Pharmacopoeial standards of herbal plants.* (Sri Satguru Publications, 1994).
 154. Vargas, F. *et al.* Flavonoids in kidney health and disease. *Frontiers in Physiology* (2018) doi:10.3389/fphys.2018.00394.
 155. Kooti, W., Mansouri, E., Ghasemiboroon, M., Harizi, M. & Amirzargar, A. Protective effects of celery (*Apium Graveolens*) on testis and cauda

- epididymal spermatozoa in rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* (2014).
156. Nickavar, B., Kamalinejad, M. & Izadpanah, H. In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pak. J. Pharm. Sci.* (2007).
157. Mello, L. D., Alves, A. A., Macedo, D. V. & Kubota, L. T. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chem.* (2005) doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.019.
158. Zidorn, C. *et al.* Polyacetylenes from the apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J. Agric. Food Chem.* (2005) doi:10.1021/jf048041s.
159. Yildiz, L., Başkan, K. S., Tütem, E. & Apak, R. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* (2008) doi:10.1016/j.talanta.2008.06.028.
160. Liu, D. K. *et al.* Evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of four celery (*Apium graveolens* L.) leaves and petioles. *Int. J. Food Prop.* (2020) doi:10.1080/10942912.2020.1778027.
161. Jabbari, M. & Jabbari, A. Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2016) doi:10.1016/j.colsurfa.2015.11.022.
162. Habu, J. B. & Ibeh, B. O. In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of active metabolite constituents of *Newbouldia laevis* ethanolic leaf extract. *Biol. Res.* (2015) doi:10.1186/s40659-015-0007-x.
163. Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I. & El Hady, S. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Ann. Agric. Sci.* (2013) doi:10.1016/j.aogas.2013.07.002.
164. Nimse, S. B. & Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* (2015) doi:10.1039/c4ra13315c.
165. Atrahimovich, D., Vaya, J. & Khatib, S. The effects and mechanism of

- flavonoid-rePON1 interactions. Structure-activity relationship study. *Bioorganic Med. Chem.* (2013) doi:10.1016/j.bmc.2013.02.055.
166. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* (2018) doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
167. Xu, C. C. *et al.* Regulation of N-acetyl cysteine on gut redox status and major microbiota in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* (2014) doi:10.2527/jas.2013-6755.
168. Joe, B. & Lokesh, B. R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n - 3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *BBA - Mol. Cell Res.* (1994) doi:10.1016/0167-4889(94)90198-8.
169. Wojtczak, L. & Slyshenkov, V. S. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals - The role of glutathione. in *BioFactors* (2003). doi:10.1002/biof.5520170107.
170. El-Kashef, D. H., El-Kenawi, A. E., Suddek, G. M. & Salem, H. A. Flavocoxid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* (2015) doi:10.1007/s00210-015-1164-8.
171. Promsan, S. *et al.* Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (2015) doi:10.1139/cjpp-2015-0468.
172. Katary, M. & Salahuddin, A. Ameliorative effect of gossypin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* (2017) doi:10.1016/j.lfs.2017.03.009.
173. Zhang, Z. *et al.* The Protective Effect of Baicalin Against Lead-Induced Renal Oxidative Damage in Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* (2017) doi:10.1007/s12011-016-0731-2.
174. Xin, S. Bin, Yan, H., Ma, J., Sun, Q. & Shen, L. Protective effects of luteolin on lipopolysaccharide-induced acute renal injury in mice. *Med. Sci. Monit.* (2016) doi:10.12659/MSM.898177.
175. Tanabe, K. *et al.* Epicatechin limits renal injury by mitochondrial

- protection in cisplatin nephropathy. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* (2012) doi:10.1152/ajprenal.00227.2012.
176. Malik, S. *et al.* Nobiletin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury due to its anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Exp. Toxicol. Pathol.* (2015) doi:10.1016/j.etp.2015.04.008.
177. Arab, H. H., Mohamed, W. R., Barakat, B. M. & Arafa, E. S. A. Tangeretin attenuates cisplatin-induced renal injury in rats: Impact on the inflammatory cascade and oxidative perturbations. *Chem. Biol. Interact.* (2016) doi:10.1016/j.cbi.2016.09.008.
178. Chao, C. S. *et al.* Hyperin inhibits nuclear factor kappa B and activates nuclear factor E2-related factor-2 signaling pathways in cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* (2016) doi:10.1016/j.intimp.2016.09.020.
179. Hassan, S. M., Khalaf, M. M., Sadek, S. A. & Abo-Youssef, A. M. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Pharm. Biol.* (2017) doi:10.1080/13880209.2016.1275704.
180. Huang, D. *et al.* Targeting Oct2 and P53: Formononetin prevents cisplatin-induced acute kidney injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2017) doi:10.1016/j.taap.2017.04.013.
181. Lee, I. C. *et al.* Ameliorative effects of pine bark extract on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Ren. Fail.* (2017) doi:10.1080/0886022X.2017.1282871.
182. Ma, X., Yan, L., Zhu, Q. & Shao, F. Puerarin attenuates cisplatin-induced rat nephrotoxicity: The involvement of TLR4/NF-KB signaling pathway. *PLoS One* (2017) doi:10.1371/journal.pone.0171612.
183. Liu, Y., Shi, B., Li, Y. & Zhang, H. Protective effect of luteolin against renal ischemia/reperfusion injury via modulation of pro-inflammatory cytokines, oxidative stress and apoptosis for possible benefit in kidney transplant. *Med. Sci. Monit.* (2017) doi:10.12659/MSM.903253.
184. Fulda, S. & Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* (2006)

- doi:10.1038/sj.onc.1209608.
185. Gao, L. L. *et al.* Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via S phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* (2011).
 186. Jürgensmeier, J. M. *et al.* Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) doi:10.1073/pnas.95.9.4997.
 187. Marzo, I. *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* (80-.). (1998) doi:10.1126/science.281.5385.2027.
 188. Lakhani, S. A. *et al.* Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* (80-.). (2006) doi:10.1126/science.1115035.
 189. Zhao, J. *et al.* Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. *Cancer Gene Ther.* (2006) doi:10.1038/sj.cgt.7700910.
 190. Cao, Y.-L., Lin, J.-H., Hammes, H.-P. & Zhang, C. Flavonoids in Treatment of Chronic Kidney Disease. *Molecules* **27**, 2365 (2022).
 191. Singh, N. K., Garabadu, D., Sharma, P., Shrivastava, S. K. & Mishra, P. Anti-allergy and anti-tussive activity of *Clitoria ternatea* L. in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* (2018) doi:10.1016/j.jep.2018.05.026.