

**PEPENGARUH MSC *CONDITIONED MEDIUM* DOSIS RENDAH
TERHADAP KADAR UREUM PADA GAGAL GINJAL AKUT
(Studi Eksperimental *In Vivo* MSC *Conditioned Medium* pada Kultur
Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Gentamicin)**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan Oleh :

Rizqi Windhu Sri Intania

30101407314

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2021

SKRIPSI

**PENGARUH MSC CONDITIONED MEDIUM DOSIS RENDAH TERHADAP KADAR UREUM
PADA GAGAL GINJAL AKUT**

**(Studi Eksperimental *In Vivo Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium* pada Kultur
Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Gentamicin)**

Diajukan oleh :

Rizqi Windhu Sri Intania

30101407314

telah dipertahankan didepan dewan penguji

pada tanggal 20 Februari 2021


dan telah dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I


Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si. Med

Pembimbing II


dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp. A

Anggota Tim Penguji

Penguji I


Dr. dr. H. Imam Djamaluddin M,M. Kes(Epid)

Penguji II


dr. Rino Arianto Marswita Sp.PD

Semarang, 25 Maret 2021

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,




Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KE

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizqi Windhu Sri Intania

NIM : 30101407314

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

"PENGARUH MSC *CONDITIONED MEDIUM* DOSIS RENDAH TERHADAP KADAR UREUM PADA GAGAL GINJAL AKUT (Studi Eksperimental *In Vivo* MSC *Conditioned Medium* pada Kultur Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Gentamicin)"

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 15 Februari 2021



Rizqi Windhu Sri Intania

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rizqi Windhu Sri Intania
NIM : 30101407314
Program Studi : Kedokteran Umum
Fakultas : Kedokteran
Alamat Asal : Jl Mulawarman II no 5A , Pedalangan , Banyumanik ,
Semarang
No. HP/Email : rizqiwindhu@std.unissula.ac.id/ 08164883965

Dengan ini menyerahkan karya ilmiah berupa Skripsi dengan judul:

“PENGARUH MSC *CONDITIONED MEDIUM* DOSIS RENDAH TERHADAP KADAR UREUM PADA GAGAL GINJAL AKUT (Studi Eksperimental *In Vivo* MSC *Conditioned Medium* pada Kultur Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Gentamicin)” dan menyetujuinya menjadi hak milik Universitas Islam Sultan Agung serta memberikan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif untuk disimpan, dialihmediakan, dikelola dalam pangkalan data, dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama masih tetap mencantumkan nama penulis sebagai pemilik Hak Cipta.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/Plagiatisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 15 Februari 2021



Rizqi Windhu Sri Intania

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat-Nya penulis telah diberi kesempatan, kesehatan, kesabaran, serta kekuatan sehingga skripsi yang berjudul, "**PENGARUH MSC *CONDITIONED MEDIUM* DOSIS RENDAH TERHADAP KADAR UREUM PADA GAGAL GINJAL AKUT (Studi Eksperimental *In Vivo* *MSC Conditioned Medium* pada Kultur Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Gentamicin)**" yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang telah diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari akan kekurangan dan keterbatasan, sehingga selama menyelesaikan Skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan, bimbingan, dorongan, dan petunjuk dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF.selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med dan dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis sehingga terselesaikannya skripsi ini.

3. Dr. dr. H. Imam Djamaluddin M, M.Kes(Epid) dan dr. Rino Arianto Marswita Sp.PD selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Kedua orang tua saya yang telah memberi pencerahan dan motivasi atas pengerjaan skripsi ini.
5. Para staf *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* yang telah membantu penelitian dari awal sampai selesai.
6. Sahabat-sahabat tersayang saya dari SMA sampai dengan kuliah yang telah memberi semangat dan dukungan dan semua pihak yang telah ikut membantu terselesainya Karya Tulis Ilmiah ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa, berkenan membalas semua kebaikan serta bantuan yang telah diberikan. Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini masih sangat terbatas dan jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan.

Akhir kata penulis berharap semoga penelitian ini dapat menjadi bahan informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 15 Februari 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI PENELITIAN	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI	xv
BAB I PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Ureum.....	6
2.1.1. Definisi	6
2.1.2. Metabolisme Ureum	7
2.1.3. Reabsorpsi Urea	8
2.1.4. Pentingnya Ureum Secara Klinis	9
2.2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kadar Ureum.....	12
2.3. Gagal Ginjal Akut.....	12
2.3.1. Definisi.....	12
2.3.2. Etiologi	13
2.3.3. Patogenesis.....	16

2.3.4. Manifestasi Klinis	20
2.3.5. Pemeriksaan Penunjang.....	21
2.3.6. Diagnosis	22
2.4. <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC)	23
2.4.1. Definisi	23
2.4.2. Sumber dan Karakteristik	24
2.4.3. Fungsi MSC	25
2.4.4. Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC	27
2.4.5. Induksi <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC.....	28
2.5. <i>Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium</i> (MSC-CM).....	29
2.6. Gentamisin	31
2.7. Hubungan <i>MSC Conditioned Medium</i> Dosis Rendah Terhadap Kadar Ureum pada Gagal Ginjal Akut	33
2.8. Kerangka Teori	34
2.9. Kerangka Konsep.....	35
2.10. Hipotesis.....	35
BAB III METODE PENELITIAN	36
3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	36
3.2. Variabel dan Definisi Operasional.....	36
3.2.1. Variabel Penelitian.....	36
3.2.2. Definisi Operasional	36
3.3. Populasi dan Sampel Penelitian	37
3.3.1. Populasi Penelitian.....	37
3.3.2. Sampel Penelitian	38
3.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	38
3.3.4. Besar Sampel.....	39
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian	39
3.4.1. Instrumen.....	39
3.4.2. Bahan Penelitian	40
3.5. Cara Penelitian	41
3.5.1. Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	41
3.5.2. <i>Informed Consent</i> Kepada Ibu Hamil.....	41
3.5.3. Pengambilan Sampel <i>Umbilical Cord Blood</i>	41
3.5.4. Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical</i>	

<i>Blood Cord</i>	42
3.5.5. Kultur Sel	43
3.5.6. Proses Pemanenan Sel	43
3.5.7. Proses Penghitungan Sel	43
3.5.8. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan <i>Flow</i> <i>Cytometry</i>	44
3.5.9. Prosedur Hipoksia dan Pembuatan <i>MSC Conditioned</i> <i>Medium</i> (MSC-CM)	45
3.5.10. Pembuatan Hewan Coba Model Gagal Ginjal Akut	46
3.5.11. Pembuatan Preparat.....	47
3.5.12. Perlakuan pada Tikus Model Gagal Ginjal.....	48
3.5.13. Analisis Ureum dengan Spektrofotometer	48
3.6 Tempat dan Waktu Penelitian	49
3.6.1. Tempat Penelitian.....	49
3.6.1. Waktu Penelitian.....	49
3.7. Pengolahan Data	49
3.8. Analisis Data	50
3.9. Alur Penelitian	51
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	52
4.1. Hasil Penelitian	52
4.2. Pembahasan Penelitian	54
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1. Kesimpulan	59
5.2. Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65

DAFTAR SINGKATAN

ACE inhibitor	= <i>Angiotensin converting enzyme inhibitors</i>
AGBM	= <i>Antiglomerular basement membrane</i>
ANAs	= <i>Antinuclear antibodies</i>
ANCAs	= <i>Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
APC	= <i>Allophycocyanin</i>
ARB	= <i>Angiotensin II receptor blockers</i>
BMP	= <i>Bone morphogenic protein</i>
BUN	= Nitrogen Urea Darah
CD	= <i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	= <i>Carbon dioxide</i>
CXCL	= <i>Chemokine ligand</i>
DMEM	= <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EPO	= <i>Chemokines, erythropoietin</i>
FBS	= <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	= <i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	= <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GCSF	= <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GGA	= <i>Gagal ginjal akut</i>
GM-CSF	= <i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
H ₂ O	= <i>Dihydrogen monoxide</i>
HCl	= <i>Hydrogen chloride</i>
HGF	= <i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1	= <i>Hypoxia-Inducible Factors-1</i>
HLA-DR	= <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
IGF	= <i>Insulin-like growth factor</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
KDIGO	= <i>The International Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LDH	= <i>Lactate dehydrogenase</i>
LFG	= <i>Laju filtrasi glomerular</i>

MRI	= <i>Magnetic resonance imaging</i>
MSC	= <i>Mesenchymal stem cells</i>
MSC-CM	= <i>Mesenchymal stem cell conditioned medium</i>
NK	= <i>Natural killer</i>
NSAID	= <i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
PDGF	= <i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	= <i>Phytoerythrin</i>
PKC	= <i>Protein kinase C</i>
PIGF	= <i>Placental growth factor</i>
SCF	= <i>Stem cell factor</i>
SCr	= <i>Serum creatinine</i>
SDF-1	= <i>Stromal-derived factor-1</i>
TGF- β	= <i>Transforming growth factor beta</i>
TPG	= <i>Terapi penggantian ginjal</i>
USG	= <i>Ultra Sonography</i>
VEGF	= <i>Vascular endothelial growth factor</i>



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur ureum	6
Gambar 2.2	Proses metabolisme protein secara umum	8
Gambar 2.3	Transport urea oleh transporter urea.....	9
Gambar 2.4	Rumus konversi BUN ke ureum.....	11
Gambar 2.5	Pembagian etiologi secara umum dari gagal ginjal akut.....	16
Gambar 2.6	Morfologi MSC.....	24
Gambar 2.7	Sumber MSC dan karakteristiknya	25
Gambar 2.8	Beberapa penggunaan MSC-CM dan EPC-CM dalam berbagai kondisi	31
Gambar 2.9	Kerangka teori.....	34
Gambar 2.10	Kerangka konsep.....	35
Gambar 3.1	Bilik hitung	44
Gambar 3.2	Alur penelitian	51
Gambar 4.1	Kadar ureum pada tiap kelompok	53

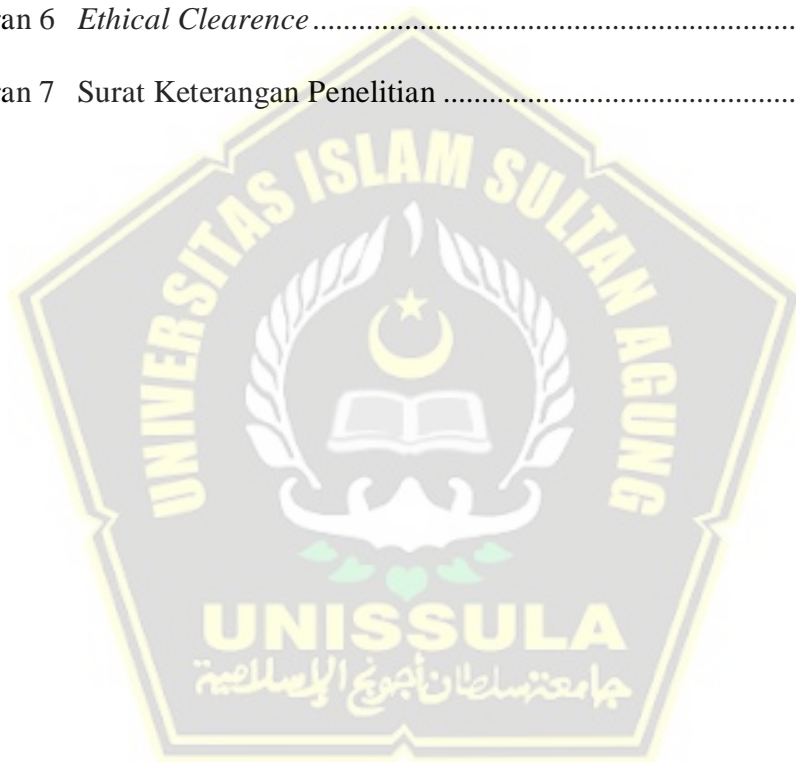
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penyebab kenaikan kadar ureum	12
Tabel 3.1	Reagen yang digunakan dalam <i>flowcytometry</i>	45
Tabel 4.1	Hasil uji normalitas kelompok	53
Tabel 4.2	Hasil uji <i>independent sample t-test</i>	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Kadar Ureum	65
Lampiran 2	Hasil Uji Deskriptif Kadar Ureum	66
Lampiran 3	Hasil Uji Normalitas Kadar Ureum	68
Lampiran 4	Uji T Tidak Berpasangan.....	69
Lampiran 5	Dokumentasi Penelitian	70
Lampiran 6	<i>Ethical Clearence</i>	71
Lampiran 7	Surat Keterangan Penelitian	72



INTISARI

Gagal ginjal akut (GGA) masih dihubungkan dengan angka kejadian morbiditas dan mortalitas yang tinggi, serta berisiko tinggi berkembang menjadi gagal ginjal kronis. GGA merupakan permasalahan di bidang kesehatan masyarakat yang utama, hal ini terkait dengan angka kematian yang tinggi, morbiditas, serta risiko jangka panjang yang dapat menjadi penyakit ginjal kronis. Penilaian fungsi ginjal salah satunya adalah peningkatan ureum serum dalam tubuh. Ginjal memiliki kemampuan yang luar biasa untuk regenerasi pasca cedera dan dapat kembali pulih sepenuhnya, dan pilihan tindakan klinis terbatas pada manajemen cairan serta tindakan dialisis. Pengembangan strategi baru dalam rangka meningkatkan kemampuan regenerasi ginjal akibat GGA, serta mempertahankan fungsi ginjal baik dalam jangka pendek maupun dalam jangka panjang sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada GGA.

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan jenis penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan model gagal ginjal akut dengan cara diinduksi dengan gentamicin dan menggunakan 2 kelompok penelitian, yaitu kelompok kontrol (PBS), kelompok perlakuan (MSC-CM 0,2. Selanjutnya darah diambil dari tikus pada hari ke-8 selanjutnya dibuat serum dan kadar ureum diperiksa menggunakan spektrofotometer setelah itu dianalisis dengan uji *t tidak berpasangan*.

Hasil penelitian ini didapatkan rerata kadar ureum antara kelompok kontrol ($19,46 \pm 0,56$ mg/dL) dan kelompok perlakuan ($13,96 \pm 0,73$ mg/dL) dengan perbedaan yang signifikan atau bermakna ($p < 0,05$).

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan terdapat pengaruh MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut.

Kata Kunci : GGA, MSC-CM, Ureum

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Gagal ginjal akut (GGA) masih dihubungkan dengan angka kejadian morbiditas dan mortalitas yang tinggi, serta berisiko tinggi berkembang menjadi gagal ginjal kronis (Dennen *et al.*, 2010). Penilaian fungsi ginjal salah satunya adalah peningkatan ureum serum dalam tubuh (Oh, 2011). Kadar ureum yang tinggi dapat digunakan sebagai indikator terjadinya GGA (Lu *et al.*, 2018). Ginjal memiliki kemampuan yang luar biasa untuk regenerasi pasca mengalami cedera dan dapat kembali pulih sepenuhnya, dan pilihan tindakan klinis terbatas pada manajemen cairan serta tindakan dialisis (Overath *et al.*, 2016). Pengembangan strategi baru dalam rangka untuk meningkatkan kemampuan regenerasi ginjal setelah GGA, serta mempertahankan fungsi ginjal baik dalam jangka pendek maupun dalam jangka panjang sangat diperlukan. Terapi berbasis *stem cell* tampaknya menjadi pilihan yang menjanjikan dimana terapi ini membutuhkan sel dengan kemampuan yang maksimum untuk mendukung regenerasi ginjal. Efek protektif terhadap organ oleh *mesenchymal stem cell* (MSC) dan *mesenchymal stem cell conditioned medium* (MSC-CM) telah diteliti dalam beberapa dekade terakhir, menunjukkan bahwa baik MSC atau MSC-CM mampu meningkatkan regenerasi tubular melalui efek parakrin yang ditimbulkan (Overath *et al.*, 2016). Namun sampai saat ini publikasi terkait

dengan pengaruh MSC-CM terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut belum banyak dipublikasikan.

Gagal ginjal akut (GGA) merupakan permasalahan di bidang kesehatan masyarakat yang utama, hal ini terkait dengan angka kematian yang tinggi, morbiditas, serta risiko jangka panjang yang dapat menjadi penyakit ginjal kronis (Ponce dan Balbi, 2016). Di beberapa negara maju, prevalensi GGA terjadi peningkatan. Sekitar 15% pasien dirawat inap akibat GGA dan sebagian besar dirawat dalam keadaan kritis (Case *et al.*, 2013). Pada pasien yang dalam kondisi kritis, angka kejadian GGA bervariasi berdasarkan populasi yang diteliti dan definisi GGA yang digunakan sekitar 8–89% pada pasien anak-anak dan 7–25% pada pasien dewasa (Fuhrman *et al.*, 2018). Berdasarkan *Assessment of Worldwide Acute Kidney Injury, Renal Angina, and Epidemiology* (AWARE) didapatkan hubungan antara kejadian GGA dengan morbiditas dan mortalitas pada pasien usia 3 bulan hingga 25 tahun yang dirawat di unit perawatan intensif (Kaddourah *et al.*, 2017). Kasus gagal ginjal akut apabila tidak tertangani dengan baik dapat memberikan hasil yang kurang baik, selain itu dapat meningkatkan waktu tinggal di rumah sakit, dapat berkembang menjadi penyakit ginjal kronik dan bisa berujung kepada kematian (Fuhrman *et al.*, 2018). Berdasarkan referensi beberapa penelitian, pada tikus model gagal ginjal akut maupun kronik, dosis MSC-CM yang digunakan yakni 200 μ L sebagai dosis terendah dan 400 μ L sebagai dosis tertingginya (Hu *et al.*, 2020).

Efek parakrin dari MSC dapat juga dihasilkan oleh MSC-CM. Kondisi ini memungkinkan digunakannya MSC-CM untuk terapi sebagai pengganti dari MSC itu sendiri. MSC-CM mengandung berbagai produk dari semua molekul bioaktif seperti faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh MSC di dalam media kultur (Tamama dan Kerpedjieva, 2012). MSC-CM mengandung banyak faktor pertumbuhan seperti IGF-1, TGF- β 1, HGF dan VEGF (Osugi *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Nagaishi *et al.* (2016) menjelaskan bahwa baik terapi MSC dan MSC-CM mampu meningkatkan regenerasi jaringan ginjal yang mengalami jejas dengan cara menekan infiltrasi sel dan mengurangi fibrosis interstitial serta mengurangi perubahan struktural dari glomerulus. Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Moghadasali *et al.* (2012) menggunakan kultur sel tubular epitelial proksimal yang merupakan sel dalam ginjal yang diinduksi gentamisin diperoleh hasil perbaikan sel-sel setelah pemberian MSC-CM dari *bone marrow* MSC. Penelitian yang dilakukan Putra *et al.* (2019) diperoleh hasil penurunan yang signifikan nilai BUN dan kadar kreatinin pada tikus model gagal ginjal akut dengan perlakuan pemberian MSC yang dihipoksia dibandingkan dengan MSC normal dan kontrol. Beberapa penelitian juga membuktikan MSC-CM dapat memperbaiki apoptosis podosit di ginjal pada model diabetes tipe 1 yang diinduksi oleh STZ dan memberikan perbaikan glomerulus di jaringan pada model penyakit ginjal kronis (Ali *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; van Koppen *et al.*, 2013).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka diperlukan upaya penelitian berupa pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut yang diinduksi gentamicin.

1.2. Rumusan Masalah

Adakah pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah terhadap penurunan kadar ureum pada gagal ginjal akut yang diinduksi gentamicin?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut yang diinduksi gentamicin.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui penurunan kadar ureum pada tikus gagal ginjal akut tanpa perlakuan (kontrol),

1.3.2.2 Mengetahui penurunan kadar ureum pada tikus gagal ginjal akut pada kelompok perlakuan.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu kedokteran tentang pengaruh MSC *conditioned medium* terhadap kadar ureum pada tikus model gagal ginjal akut yang diinduksi gentamicin.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat tentang aplikasi dari *stem cell* pada kasus gagal ginjal akut.



BAB II

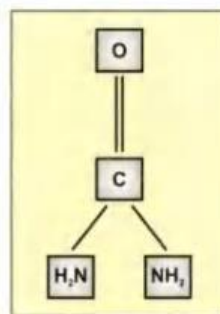
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ureum

2.1.1. Definisi

Ureum merupakan produk akhir dari proses pemecahan protein dimana zat ini termasuk memiliki berat molekul 60 dalton yang diproduksi oleh hati. Selanjutnya ureum ini akan tersebar melalui secara intraseluler maupun ekstraseluler ke dalam aliran darah yang selanjutnya mengalami proses penyaringan oleh glomerulus di ginjal (Gowda *et al.*, 2010; Setiati *et al.*, 2014).

Ureum memiliki rumus senyawa $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Ureum merupakan hasil pemecahan protein yang dikeluarkan oleh tubuh. Protein di dalam tubuh akan mengalami lisis menjadi asam amino dimana proses berikutnya yang terjadi yaitu proses transaminasi dan deaminasi oksidatif dengan hasil akhir berupa senyawa amonia. Selanjutnya amonia ini akan dikonversi menjadi ureum di dalam hati melalui serangkaian proses yang dibantu oleh enzim-enzim pada jalu-jalur siklus urea (Setiati *et al.*, 2014).

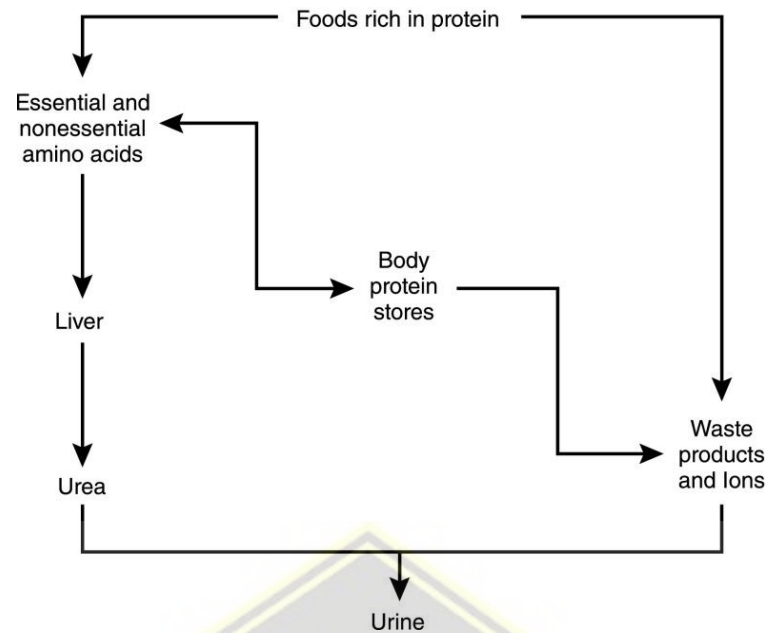


Gambar 2.1. Struktur ureum (Setiati *et al.*, 2014).

2.1.2. Metabolisme Ureum

Asupan protein makanan akan dimetabolisme dengan cepat di dalam tubuh menjadi asam amino esensial dan asam amino nonesensial atau menjadi produk sisa metabolisme serta ion. Asam amino esensial dan nonesensial saling bertukar dengan cadangan protein di dalam tubuh. Asam amino juga dapat dimetabolisme melalui hati untuk membentuk produk akhir berupa urea atau ureum, yang kemudian diekskresikan ke dalam urin. Protein yang tersimpan di dalam tubuh dapat dirubah kembali menjadi asam amino esensial dan nonesensial atau dapat dimetabolisme lagi membentuk produk sisa dan ion (Weiner *et al.*, 2015).

Jumlah asupan protein yang berasal dari makanan akan mempengaruhi fungsi ginjal. Sebagai contoh, individu normal yang mengonsumsi protein dalam jumlah yang kecil, maka akan memiliki nilai LFG yang rendah. Sebaliknya, konsumsi protein dalam jumlah besar akan meningkatkan LFG (Weiner *et al.*, 2015). Produksi ureum terkait erat dengan jumlah protein yang dimakan, oleh karena itu dalam praktik klinisnya kadar ureum dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah kebutuhan protein pada pasien dengan PGK. Selain itu, produksi ureum berfungsi untuk memperkirakan akumulasi racun uremik dan sebagai pedoman untuk manajemen diet pasien PGK (Weiner *et al.*, 2015).

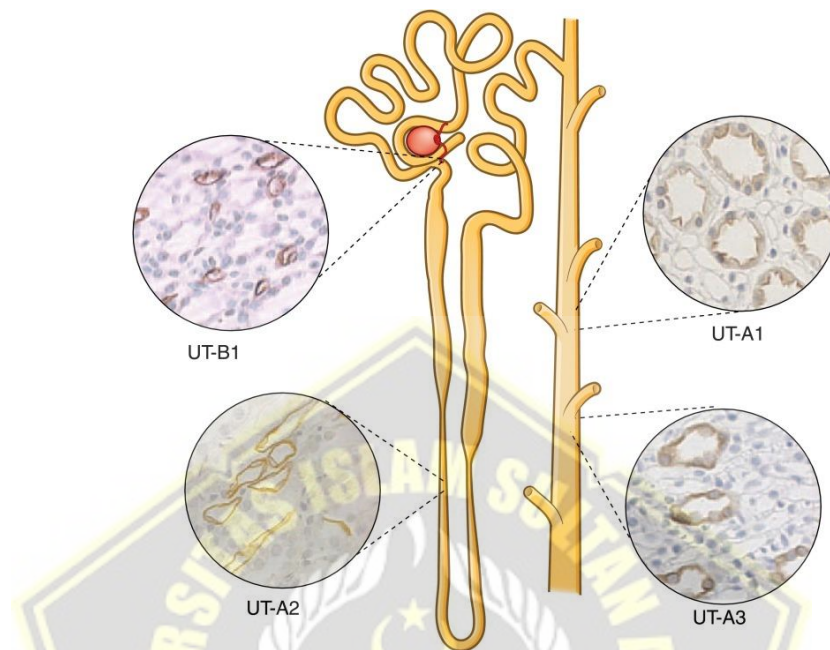


Gambar 2.2. Proses metabolisme protein secara umum
(Weiner *et al.*, 2015)

2.1.3. Transpor Ureum

Sebanyak 90% ureum akan diekskresi melalui ginjal setiap harinya dimana sisanya akan diekskresikan melalui kulit dan saluran cerna. Teori terdahulu menyebutkan bahwa tidak adan proses sekresi atau absoprsi aktif dari zat ureum pada tubulus-tubulus ginjal dan hanya terdapat proses difusi yang berlangsung secara pasif. Namun akhir-akhir ini melalui berbagai penelitian terbaru ditemukan adanya transporter ureum (UT-A1, UT-A3) yang terdapat pada *inner medullary collecting duct* (IMCD). Performa dari transporter ureum ini sedikit banyak dipengaruhi oleh keberadaan hormon anti diuretik (ADH). ADH meningkatkan proses fosforilasi dari transpoter ureum sehingga menyebabkan peninhkatan dari laju permeabilitas dari

ureum (Oh, 2011). Keberadaan transporter ureum ini menjelaskan terjadinya akumulasi ureum pada interstisium medula ginjal (Sands *et al.*, 2010).



Gambar 2.3. Transport urea oleh transporter urea (Klein *et al.*, 2012).

2.1.4. Pentingnya Ureum Secara Klinis

Penggunaan ureum serum secara klinis digunakan untuk menilai fungsi ginjal namun ada hal yang perlu diperhatikan bahwa konsentrasi ureum serum di dalam tubuh tidak hanya dipengaruhi oleh faktor dari fungsi ginjal saja namun bisa dipengaruhi oleh asupan protein yang tinggi pula sehingga menyebabkan peningkatan ureum secara bermakna. Reabsorpsi ureum yang terjadi di ginjal menjadikan pemeriksaan bersihan atau *clearence* ureum kurang sesuai dengan LFG. Jumlah ureum yang berhasil direabsorpsi

dipengaruhi oleh volume vaskular efektif. Penurunan volume sirkulasi renal menyebabkan reabsorpsi ureum di tubulus proksimal ginjal mengalami peningkatan. Pada keadaan ginjal normal tanpa disertai penurunan volume sirkulasi renal, klirens ureum mencapai 50% dari klirens kreatinin. Namun dalam kondisi penurunan volume sirkulasi renal yang berat, klirens ureum menjadi lebih kecil dan bisa mencapai 10% dari klirens kreatinin. Klirens ureum adalah prediktor LFG yang lebih baik dibandingkan dengan klirens kreatinin pada kasus penyakit ginjal tahap akhir (Oh, 2011).

Peningkatan kadar urea dalam darah disebut dengan azotemia. Pada kadar ureum yang sangat tinggi dapat menyebabkan sindroma uremik. Peningkatan kadar ureum dapat terjadi prerenal, renal dan post renal. Penyebab prerenal dapat terjadi karena penurunan perfusi ginjal (gagal jantung kongestif, syok, perdarahan, dehidrasi), peningkatan pemecahan protein atau diet tinggi protein. Penyebab peningkatan ureum karena renal bisa disebabkan oleh penyakit ginjal seperti gagal ginjal, nefritis glomerular dan tubular nekrosis akut. Peningkatan kadar ureum *postrenal* disebabkan oleh obstruksi saluran kemih misalnya karena urolitiasis. Penurunan kadar ureum dapat terjadi karena rendahnya asupan dari protein muntah dan diare berat, penyakit hati serta pada kondisi kehamilan (Frank, 2010).

Rumus Cockcroft-Gault tidak memasukkan unsur kadar ureum dalam perhitungan LFG nya, akan tetapi ureum/BUN masuk dalam

formula *Levey atau the Modification of Diet in Renal* (Frank, 2010). Hal yang patut diperhatikan bahwa hasil dari pemeriksaan ureum secara laboratorium memberikan hasil yang bervariasi. Pelaporan kadar ureum dinyatakan dalam *blood urea nitrogen* (BUN) yang selanjutnya dikali dengan faktor perkalian untuk memperoleh nilai ureum yang sebenarnya. BUN selanjutnya akan dikonversi menjadi ureum dengan faktor perkalian seperti pada gambar 2.3.

$$\text{Ureum (mg/dL)} = \text{BUN (mg/dL)} \times 2,14$$

Gambar 2.4. Rumus konversi BUN ke ureum

Hasil perhitungan rasio ureum/kreatinin pada kondisi normal yaitu 40-100:1 atau rasio BUN/kreatinin pada kondisi normal 10-20:1 dapat membantu membedakan azotemia prerenal. Gangguan prerenal dapat menghasilkan rasio yang tinggi karena terdapat peningkatan ureum tanpa diikuti dari peningkatan kreatinin dalam darah. Peningkatan rasio dengan peningkatan kreatinin umumnya dapat dijumpai pada gangguan postrenal. Rasio yang rendah justru dapat dijumpai pada penurunan produksi ureum misalnya karena asupan protein rendah, nekrosis tubular akut dan penyakit hati berat (Frank, 2010).

2.2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kadar Ureum

Peningkatan kadar ureum disebut dengan uremia. Penyebab dari uremia terbagi menjadi tiga penyebab yaitu dari penyebab dari pre-renal, renal atau intrinsik dan post renal (Sacher dan McPherso, 2012). Berikut ini rangkuman faktor-faktor yang menyebabkan uremia seperti terlihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Penyebab kenaikan kadar ureum (Sacher dan McPherso, 2012)

Faktor	Penyebab
Pra renal	<ul style="list-style-type: none"> • Penurunan aliran darah ke ginjal • Peningkatan katabolisme protein • Syok, kehilangan darah, dehidrasi • Cedera fisik berat, luka bakar, demam, perdarahan ke dalam jaringan lunak atau rongga tubuh, hemolysis
Renal / intrinsik	<ul style="list-style-type: none"> • Glomerulonefritis, hipertensi maligna, obat atau logam nefrotoksik, nekrosis korteks ginjal • Glomerulonefritis, pielonefritis, diabetes mellitus, arteriosklerosis, amilodosis, penyakit tubular ginjal, penyakit kolagen vaskular • Gagal ginjal akut • Penyakit ginjal kronis
Pasca renal	<p>Obstruksi uretra oleh batu, tumor, peradangan, kesalahan pembedahan; obstruksi leher <i>vesica urinaria</i> atau uretra oleh prostat, batu, tumor, adanya peradangan.</p>

2.3. Gagal Ginjal Akut

2.3.1. Definisi

Gagal ginjal akut (GGA) adalah penurunan fungsi ginjal yang terjadi mendadak, dalam beberapa jam sampai beberapa minggu, diikuti oleh kegagalan ginjal untuk mengekskresi sisa metabolisme nitrogen dengan atau tanpa disertai terjadinya gangguan

keseimbangan cairan dan elektrolit. Definisi tersebut tidak menyertakan batasan tentang parameter yang digunakan dan berapa waktu yang ditetapkan sebagai kriteria penurunan fungsi ginjal mendadak. Oleh karena itu berbagai definisi klinis gagal ginjal akut yang diajukan dalam literatur disesuaikan dengan kondisi masing-masing pasien (Setiati *et al.*, 2014).

Definisi diagnosis GGA harus cukup sensitif untuk mendeteksi gangguan ginjal pada tahap dini dan cukup spesifik untuk menentukan prognosis pasien (*outcome*), sehingga definisi GGA harus disertai tahapan-tahapan (kriteria) diagnosis. Kelompok ADQI mengajukan suatu kriteria dengan memperhitungkan berbagai faktor yang mempengaruhi perjalanan penyakit GGA, yang disebut kriteria RIFLE (*Risk-Injury-Failure-Loss-End-stage renal failure*) (Setiati *et al.*, 2014).

2.3.2. Etiologi

Selama bertahun-tahun diagnosis dan manajemen GGA didasarkan pada konsep etiologi yang diklasifikasikan dalam tiga kategori penyebab utama: *pre renal*, *intrinsik* dan *post renal*. Hal ini dijelaskan sebagai berikut (Makris dan Spanou, 2016):

1. *Pre Renal*

Hipoperfusi ginjal menyebabkan penurunan dari LFG tanpa diikuti kerusakan parenkim ginjal, kondisi ini terjadi sebagai respons adaptif terhadap berbagai kondisi yang terjadi

diluar ginjal. Kondisi LFG dipertahankan dalam kondisi normal tergantung pada perfusi ginjal yang adekuat. Ginjal menerima hingga 25% dari curah jantung dan apabila terjadi kegagalan dari sirkulasi darah sistematik dapat berdampak terhadap perfusi ginjal. Abnormalitas yang terjadi adalah sebagai berikut:

- a. Hipovolemi : perdarahan, kehilangan cairan tubuh, terbakar, peritonitis, dan pada trauma otot.
 - b. Gangguan fungsi jantung: gagal jantung kongestif, infark miokard akut, dan emboli paru masif
 - c. Vasodilatasi sistemik: penggunaan obat anti-hipertensi, bakteremia gram negatif, sirosis hepatis, dan reaksi anafilaksis.
 - d. Peningkatan tahanan vaskular: tindakan anestesi, operasi, sindrom hepatorenal, penggunaan obat-obatan NSAID, penggunaan obat-obatan yang menyebabkan vasokonstriksi ginjal seperti siklosporin.
2. Intrinsik

Secara umum, terdapat empat struktur ginjal yang terlibat yaitu tubulus, glomeruli, interstitium, dan pembuluh darah intra-ginjal. Abnormalitas yang terjadi adalah sebagai berikut:

- a. Tubular: iskemia ginjal (syok, komplikasi operasi, perdarahan, trauma, bakteremia, pankreatitis, kehamilan), obat-obatan nefrotoksik (antibiotik, obat antineoplastik,

media kontras, pelarut organik, obat bius, logam berat), dan racun endogen (mioglobin, hemoglobin, asam urat).

- b. Glomerular: glomerulonefritis pasca infeksi akut, lupus nephritis, glomerulonefritis IgA, endokarditis infeksi, sindrom Goodpasture, dan penyakit Wegener
- c. Interstitium: infeksi (bakteri, virus) dan obat-obatan (antibiotik, diuretik, dan NSAID)
- d. Vaskular: pembuluh darah besar (stenosis arteri ginjal bilateral, trombosis vena ginjal bilateral) dan pembuluh darah kecil (vaskulitis, hipertensi maligna, emboli aterosklerotik atau trombotik, sindrom uraemik hemolitik, purpura trombositopenik trombotik)

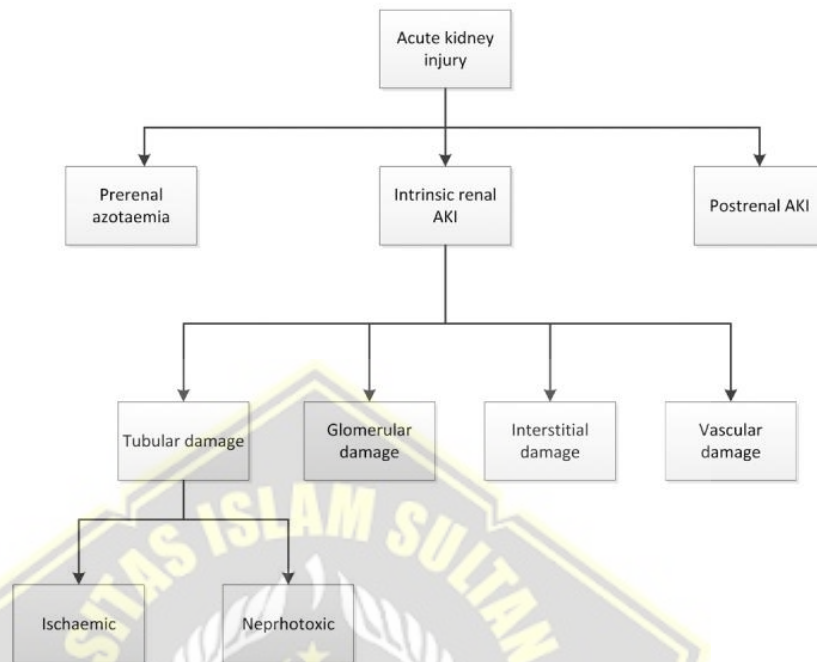
3. *Post Renal*

Terjadi setelah adanya obstruksi akut dari aliran urin yang dapat meningkatkan tekanan intra-tubular sehingga menurunkan LFG. Selain itu, obstruksi saluran kemih akut dapat menyebabkan gangguan aliran darah ginjal dan proses inflamasi yang juga berkontribusi terhadap penurunan LFG.

Abnormalitas yang terjadi adalah sebagai berikut:

- a. Obstruksi ekstrarenal: hipertrofi prostat, kateter ditempatkan dengan tidak benar, kanker kandung kemih, prostat atau serviks dan Fibrosis retroperitoneal.

- b. Obstruksi intrarenal: nefrolitiasis, adanya gumpalan darah dan nekrosis papiler



Gambar 2.5. Pembagian etiologi secara umum dari gagal ginjal akut (Makris dan Spanou, 2016)

2.3.3. Patogenesis

Patogenesis dari GGA terbagi menjadi 3, yakni sesuai dengan etiologinya yaitu pre renal, intrinsik atau renal dan post renal.

1. Patogenesis GGA *Pre Renal*

Patogenesis GGA merupakan kombinasi kejadian yang sangat kompleks dan bervariasi serta tergantung dari etiologinya masing-masing. Berdasarkan etiologinya GGA terbagi menjadi 3 klasifikasi yaitu: *pre-renal*, intrinsik atau renal dan post-renal. GGA *pre-renal* menggambarkan kondisi reaksi ginjal akibat

kekurangan cairan sirkulasi renal. Pada keadaan ini, fungsi ginjal sebelumnya adalah normal. Berkurangnya perfusi ginjal dan volume efektif arterial akan menstimulasi aktivitas sistem saraf simpatis dan renin-angiotensin aldosteron (RAA). Stimulasi sistem RAA ini akan meningkatkan kadar angiotensin II yang dapat memicu vasokonstriksi arteriol efferent glomerulus ginjal (*post-glomerulus*). Peran dari angiotensin II ini pada arteriol afferent glomerulus ginjal (*preglomerulus*) tetapi efek yang ditimbulkan mampu meningkatkan kadar hormon vasodilator yaitu prostaglandin dimana kondisi ini sebagai mekanisme kontra-regulasi (Setiati *et al.*, 2014).

Vasokonstriksi pada *post-glomerulus* terjadi untuk mempertahankan tekanan kapiler intra-glomerulus serta LFG agar tetap dalam batas normal. Beberapa faktor penyebab gangguan hemodinamik akan meningkatkan kadar angiotensin II disamping itu akan merangsang pula sistem saraf simpatis sehingga terjadi reabsorpsi air dan garam-garam di tubulus proksimal ginjal. Kondisi tersebut terjadi perangsangan sekresi dari hormon antidiuretik yaitu aldosteron dan vasopresin sehingga meningkatkan reabsorpsi Na^+ , ureum dan H_2O pada segmen distal nefron. Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa sebagai respons fisiologis terhadap gangguan hipoperfusi ginjal yang ringan, maka untuk mempertahankan LFG terjadilah

retensi urin dan Na^+ sehingga urin menjadi pekat dengan kadar Na^+ yang rendah. Profil urine pada pasien dengan azotemia prerenal akan ditemukan kadar Na^+ dalam urin yang rendah yaitu <20 meq/L, nilai *fractional excretion of Natrium* yang rendah yaitu <1 , ekskresi *fractional excretion of urea* yang rendah yaitu $<35\%$ dan osmolalitas urin yang cukup tinggi. Mekanisme autoregulasi diatas dapat terganggu atau tidak dapat lagi dipertahankan apabila pasien GGA prerenal mengalami gangguan hipoperfusi ginjal yang berat atau berlangsung lama (Setiati *et al.*, 2014).

2. Patogenesis GGA Intrinsik

Etiologi yang utama dari GGA intrinsik atau renal adalah nekrosis tubular akur (TNA). Kerusakan ginjal akibat TNA terbagi menjadi dua yaitu: proses iskemik dan proses nefrotoksik. Meskipun terbagi menjadi 2 proses besar, TNA pada umumnya disebabkan oleh multifaktorial yang biasanya terjadi pada berbagai kondisi penyakit akut yang disertai dengan sepsis, hipotensi, atau penggunaan obat-obatan yang dapat merusak ginjal atau nefrotoksik. Respon ginjal terhadap kondisi hipoperfusi dapat berujung pada dua kondisi, yaitu: azotemia prerenal atau gangguan iskemik. Kondisi azotemia prerenal, hipoperfusi akan mengganggu fungsi ginjal saja dan dapat kembali normal (reversibel) bila kondisi hipoperfusinya

mampu untuk diatasi. Apabila hipoperfusi bertambah berat atau berkelanjutan, maka akan terjadi kerusakan pada sel-sel tubulus disertai gangguan penurunan fungsi ginjal. Kerusakan yang terjadi ditandai dengan ditemukannya sel-sel epitel tubulus yang mati (nekrosis) dan apoptosis. Gangguan iskemik reperfusi tersebut ternyata tidak saja terjadi pada epitel tubulus, tetapi juga pada endotel pembuluh darah serta terjadi pula aktivasi dari sel-sel inflamasi serta mediator-mediator humoral (Setiati *et al.*, 2014).

Patogenesis TNA iskemik terjadi dalam beberapa tahapan. Pada tahapan awal adalah tahap prerenal, diikuti dengan keadaan yang lebih menonjol akibat hipotensi berkepanjangan serta iskemik ginjal, yang disebut tahap inisiasi. Tahap inisiasi ini ditandai dengan munculnya kerusakan sel-sel epitel dan endotel dan selanjutnya akan diikuti oleh tahap ekstensi. Memasuki tahapan ekstensi ini bukan hanya terjadi akibat gangguan iskemia saja, akan tetapi juga melibatkan kerusakan endotel mikrovaskular dan aktivasi berbagai jalur inflamasi. Kemudian tahap ekstensi ini akan diikuti oleh "tahap pemeliharaan" dimana ditandai dengan adanya perbaikan dan diferensiasi ulang dari sel-sel epitel dan endotel sehingga terjadi perbaikan fungsi ginjal atau masuk ke dalam "fase perbaikan" (Setiati *et al.*, 2014).

3. Patogenesis GGA *Post Renal*

Kondisi GGA *post-renal* terjadi akibat sumbatan dari sistemtraktus urogenitalis. Sumbatan dapat terjadi pada tingkat buli- buli dan uretra atau disebut juga sumbatan tingkat bawah, atau terjadi pada ureter dan pelvis ginjal yang disebut dengan sumbatan tingkat atas. Apabila terjadi pada tingkat atas, maka sumbatannya harus bilateral atau terjadi pada hanya 1 buah ginjal yang berfungsi dimana ginjal satunya sudah tak berfungsi. Pada anak-anak, sumbatan tingkat atas umumnya diakibatkan oleh striktur ureter kongenital, atau striktur katup ureter. Pada wanita dewasa, sumbatan tingkat atas umumnya disebabkan oleh keganasan di daerah retroperitoneal atau pada panggul, sedangkan pada laki-laki biasanya diakibatkan oleh pembesaran atau keganasan prostat. Sumbatan dapat bersifat total dan disertai anuria, atau parsial yang biasanya tidak memiliki manifestasi klinik. Pemeriksaan pencitraan yang spesifik diperlukan untuk mengevaluasi keadaan-keadaan tersebut di atas (Setiati *et al.*, 2014).

2.3.4. Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis GGA bergantung kepada penyebab yang mendasarinya, hal ini dijelaskan sebagai berikut (Arifputera *et al*, 2014):

1. Pre Renal

- a. Rasa haus, seperti ingin jatuh;
- b. Hipotensi ortostatik, takikardi, penurunan JVP, turgor kulit menurun, mukosa kering
- c. Tanda-tanda gagal jantung pada pasien gagal jantung kongestif
- d. Sepsis dan sebagainya

2. Renal

- a. Pada nekrosis tubular akut: riwayat hipovolemia, syok sepsis, dan operasi besar
- b. Pada kasus SLE: demam, arthralgia, rash eritematosa
- c. Oligouria, edema, hipertensi, hematuria menandakan glomerulonefritis
- d. Hipertensi maligna

3. Post Renal

- a. Nyeri suprapubik
- b. Nyeri pada perut
- c. Kolik menandakan adanya obstruksi pada ureter
- d. Nokturia, frekuensi, pembesaran prostat menandakan adanya patologi pada prostat

2.3.5. Pemeriksaan Penunjang

Pemeriksaan penunjang yang bisa dilakukan antara lain

((Arifputera *et al*, 2014):

1. Urinalisis
2. Indeks gangguan ginjal
3. Laboratorium: darah perifer lengkap, kreatinin serum, elektrolit (Na^+ , K^+ , fosfat, Ca^{2+}), asam urat dan kreatinin kinase. Dari hasil serum kreatinin, dapat dihitung LFG dengan beberapa rumus, antara lain:

- Rumus Cockcroft-Gault

$$\text{LFG (mL/min)}^* = \frac{(140 - \text{usia}) \times \text{Berat badan (Kg)}}{\text{Serum kreatinin } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) \times 72}$$

*Hasilnya dikali 0,85 jika pasien berjenis kelamin perempuan

- Rumus studi MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*)

$$\text{LFG (mL/min/1,73 m}^2) = 175 \times \text{Scr}^{(-1,154)} \times \text{Usia}^{(-0,203)} \times (0,742 \text{ jika perempuan}) \times (1,21 \text{ jika berkulit hitam})$$

4. Pemeriksaan radiologi: USG ginjal merupakan pilihan, CT scan dan MRI juga dapat dilakukan.
5. Biopsi Ginjal: untuk diagnosis pasti pasien dengan kecurigaan GGA renal

2.3.6. Diagnosis

Diagnosis banding GGA adalah penyakit ginjal kronik (PGK) dan gangguan akut pada PGK (*acute on chronic kidney disease*). Seringkali sulit membedakan antara GGA dengan keadaan akut pada

PGK. Berikut ini cara membedakan kedua keadaan tersebut (Arifputera *et al*, 2014):

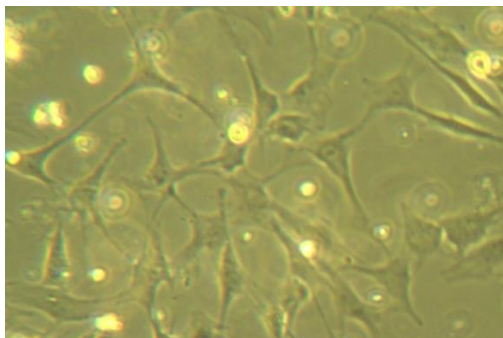
- Anamnesis: riwayat etiologi GGA dan riwayat etiologi PGK;
- Data kreatinin serum sebelumnya merupakan data yang bermanfaat. Dalam keadaan akut pada PGK terjadi peningkatan nilai kreatinin yang mendadak dibandingkan nilai dasar sebelumnya;
- Adanya anemia, hiperfosfatemia, hipokalsemia, hiperparatiroidisme (dalam hal ini bersifat sekunder), dan neuropati mengarahkan diagnosis PGK;
- Pemeriksaan radiologi; adanya osteodistrofi ginjal atau ginjal yang berukuran kecil menunjukkan kemungkinan PGK. Pengecualian pada beberapa kasus PGK seperti nefropati diabetik, amiloidosis, dan penyakit ginjal polisistik.

2.4. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

2.4.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah *stem cell* dewasa dengan kemampuan untuk memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai macam jaringan (Williams dan Hare, 2011). Pada awalnya MSC diperoleh dari sumsum tulang. MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tununan dari jaringan mesodermal dan non-mesodermal. Peran MSC bagi tubuh adalah membantu proses hematopoietik, berperan dalam menjaga

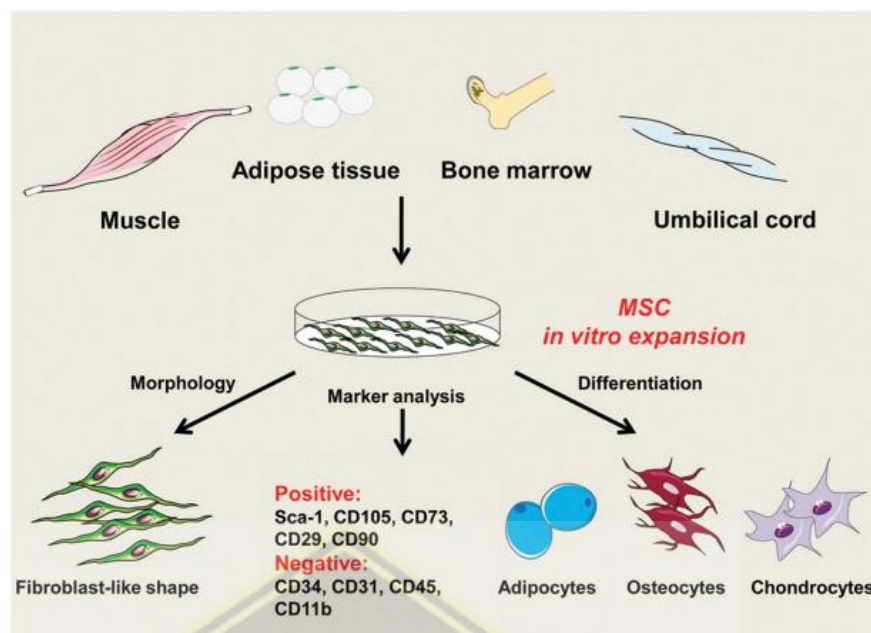
homeostasis organ, penyembuhan luka, dan penuaan (Williams dan Hare, 2011).



Gambar 2.6. Morfologi MSC (Hematti, 2012).

2.4.2. Sumber dan Karakteristik

MSC dapat diisolasi dari beberapa jaringan seperti lemak, sumsum tulang, tali pusat, otot dan akar gigi. Setelah di kultur MSC menunjukkan beberapa karakteristik seperti dari morfologi yang berbentuk seperti fibroblas. Selain itu, MSC juga mengekspresikan beberapa marker positif seperti Sca-1, CD105, CD73, CD29 dan CD90, dan marker negatif seperti CD31, CD34, CD45 dan CD11b. MSC juga memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel lemak, kondrosit, osteoblas dan sel-sel tipe lainnya (Ma *et al.*, 2014).



Gambar 2.7. Sumber MSC dan karakteristiknya (Ma *et al.*, 2014)

2.4.3. Fungsi MSC

Mesenchymal stem cell berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Hal ini dikarenakan, stem cell memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdeferensiasi serta mampu untuk menghasilkan berbagai produk seperti faktor pertumbuhan dan sitokin. *Stem cell* juga mampu berkomunikasi secara parakrin maupun autokrin melalui sitokin yang dihasilkan. Kemampuan stem cell berkomunikasi secara parakrin yaitu dengan cara menstimulasi pengaktifan sel lain dalam proses penyembuhan. Stem cell juga memiliki kemampuan untuk Homing yaitu kemampuan sel untuk menuju organ target sebagai mekanisme awal proses penyembuhan sebelum akhirnya menempel, proliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan (Halim *et al.*, 2010).

Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan sel membuat MSC menarik secara klinik. Berbagai jurnal penelitian melaporkan MSC terlibat kuat dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan dan atau regenerasi jaringan, diantaranya adalah (Putra, 2019):

1. Neurodegeneratif
 - a. Penyakit stroke,
 - b. Parkinson,
 - c. Alzheimer,
 - d. Huntington.
2. Lesi Kardiovaskuler
 - a. Infark miokard
 - b. Periperal vaskuler iskemia
3. Disfungsi dan disufisiensi hormonal
 - a. Diabetes mellitus
4. Sistem imunitas
 - a. Autoimune
5. Muskuloskeletal
 - a. Fraktur
 - b. Osteoporosis
 - c. Osteoarthritis
6. Luka kulit kronis, ulkus kornea

2.4.4. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya dalam menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Konsep parakrin adalah komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC. Secara spesifik, konsep *small molecule growth factor* MSC didasarkan pada (Putra, 2019):

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC

Sebagaimana diketahui teknik dan metode dalam mengisolasi MSC membutuhkan teknik yang kompleks disamping kerja aseptis serta waktu kultur (selama beberapa minggu) untuk mendapatkan turunan MSC yang homogen dengan potensi *stemness* tinggi, terutama kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai sel jaringan spesifik. Berbagai faktor harus dikendalikan untuk mencapai hasil optimum, karena banyak faktor yang ikut menentukan hasil akhir isolasi.

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC ketika berintegrasi dalam jaringan cedera paska transplantasi adalah singkat, sehingga kemungkinan MSC melakukan fungsi regenerasi tidak optimal. Berbagai faktor internal yang terjadi dalam jaringan cedera ikut mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.

3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

Laporan penelitian terkini mengungkapkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan lewat intavena akan terjebak dalam paru sebagai small emboli (tidak menimbulkan oklusi vaskuler). Sekalipun demikian, MSC yang terjebak tersebut tetap akan melepaskan berbagai molekul antiinflamasi, disamping pro-regenerasi. Hal ini memunculkan spekulasi bahwa small molecule yang dilepas oleh MSC secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan.

2.4.5. Induksi *Small Molecule Growth Factor* MSC

Begitu pentingnya peranan small molecule growth factor MSC ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan small molecule ini secara *in-vitro*. Secara spesifik induksi *small molecule* growth factor MSC dapat dibagi menjadi 2 yaitu (Putra, 2019):

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi

Secara teoritis, MSC yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF- α dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi.

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic preactivated MSC-induced soluble*

molecule yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSC yang mengalami hipoksia.

2.5. *Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium* (MSC-CM)

Berbagai penelitian tentang faktor-faktor yang dihasilkan oleh *stem cell* menunjukkan bahwa faktor yang disekresikan saja tanpa keberadaan *stem cell* dapat menyebabkan perbaikan jaringan dalam berbagai kondisi seperti kerusakan jaringan / organ. Faktor-faktor yang disekresikan disebut sebagai secretome, microvesicles, atau exosome dan dapat ditemukan dalam medium di mana *stem cell* dibiakkan, dengan demikian, medium disebut *conditioned medium* (CM) (Kim dan Choi, 2013).

Penggunaan secretome yang terkandung dalam CM memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan penggunaan *stem cell*, karena CM dapat diproduksi, dibekukan kering, dikemas, dan diangkut lebih mudah. Terlebih lagi, karena ia tidak memiliki sel maka tidak perlu mencocokkan donor dan penerima untuk menghindari masalah penolakan. Oleh karena itu, *stem cell conditioned medium* dapat diproduksi sebagai obat-obatan untuk pengobatan regeneratif (Pawitan, 2014). *Conditioned medium* mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan agen regeneratif jaringan, yang disekresikan oleh *stem cell*. Faktanya bahwa *stem cell* mengeluarkan berbagai faktor pertumbuhan juga ditunjukkan oleh berbagai studi proteomik, yang mengungkapkan adanya berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin lain di CM (Pawitan, 2014). Berbagai faktor pertumbuhan yang

terkandung dalam CM antara lain VEGF, PDGF, EGF, IGF-I, IGF-II, HGF, FGF-2/bFGF, KGF/FGF-7, PDEGF, HEGF, PIGF, NGF, dan BDNF (Pawitan, 2014).

Menurut Putra (2019), secara spesifik *soluble molecule* dan ligan yang dilepas MSC pada *conditioned medium* berupa:

1. Molekul anti-inflamasi

MSC paska terpapar molekul inflamasi poten seperti TNF- α , IL-1 dan IFN- γ , maka akan melepas berbagai molekul anti inflamasi:

- a. IL-10
- b. TGF- β
- c. IL-1a
- d. TSG6
- e. PGE-2

2. Molekul pro-regenerasi

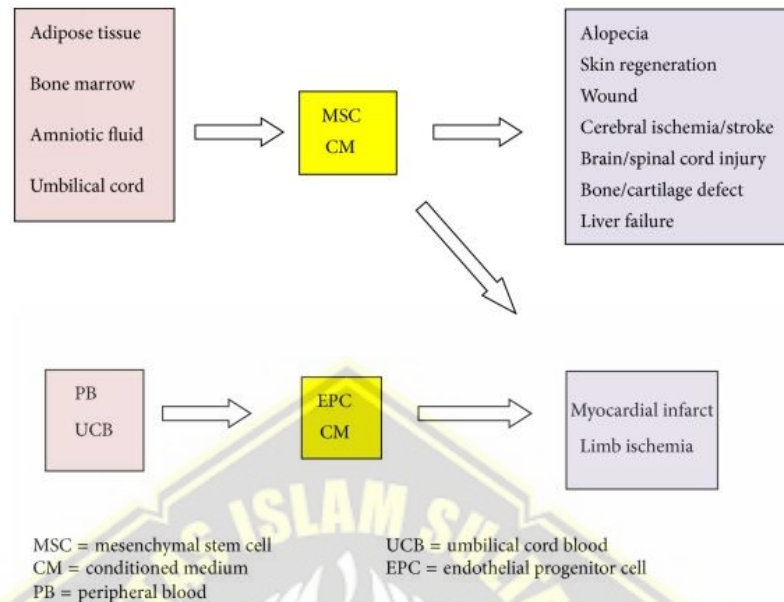
- a. VEGF
- b. PDGF
- c. IGF
- d. FGF-2

e. Ang-1

3. Molekul/ligan kemoatraksi

Stem cell mampu mendeteksi berbagai molekul kemoatraksi seperti HGF dan SDF-1 melalui reseptor CXCR-3, sehingga terjadi *homing*, molekul tersebut diantaranya:

- a. HGF
- b. CXCR-3



Gambar 2.8. Beberapa penggunaan MSC-CM dan EPC-CM dalam berbagai kondisi (Pawitan, 2014)

2.6. Gentamisin

Gentamisin tergolong antibiotika (aminoglikosida) yang berspektrum luas dan memiliki toksisitas tinggi. Salah satu efek toksik dari gentamisin adalah menyebabkan kerusakan pada tubulus ginjal (Rajak *et al.*, 2016). Aminoglikosida menghambat beberapa phospholipase lisosomal seperti aktivitas phosphatidylinositol-specific phospholipase C pada sitosol korteks ginjal dan membran brush border sel epitel tubulus proksimal. Inhibisi dari phospholipase ini merubah jumlah dan komposisi dari plasma dan membran subseluler dalam tubulus proksimal. Perubahan dalam korteks ginjal berhubungan dengan phospholipid mendahului gejala disfungsi ginjal,

Gentamisin menghambat aktifitas dari enzim phospholipase-dependent, Na⁺-K⁺-ATPase, dan *adenylate cyclase*. Selain itu golongan aminoglikosida ini juga mengganggu respiratorik mitokondria. Terjadi disfungsi mitokondria berat dan hal ini mengganggu enersi seluler. Gentamisin juga menghambat pengambilan kalsium dan meningkatkan sitosolik bebas (Ca²⁺). Dalam keadaan ini sekuesterisasi dari aminoglikosida dalam lisosom menyebabkan terbentuknya badan mieloid disebabkan karena degradasi phospholipid, dan integritas membran lisosom terganggu (Lintong *et al.*, 2012).

Pemberian gentamisin, 60 mg/kgBB selama 10 hari berturut-turut dengan cepat menginduksi terjadinya nekrosis korteks ginjal secara luas disertai disfungsi ginjal. Pada keadaan ini terlihat sejumlah besar perubahan struktur metabolik, dan perubahan-perubahan pada sel-sel epitel tubulus ginjal berupa disfungsi atau kematian sel. Sudah banyak diteliti bahwa nekrosis tubulus merupakan hal utama dari toksisitas gentamisin (Lintong *et al.*, 2012). Perubahan morfologik ginjal dengan nekrosis tubuler akut disebabkan karena bahan toksik dan obat seperti gentamisin paling banyak terlihat pada tubulus proksimalis.¹¹ Gambaran histologik nekrosis tubuler akut umumnya tidak spesifik. Nekrosis sel epitel tubulus akut disebabkan karena bahan toksik ditandai oleh adanya nekrosis sel-sel epitel tubulus sepanjang tubulus proksimalis (Lintong *et al.*, 2012).

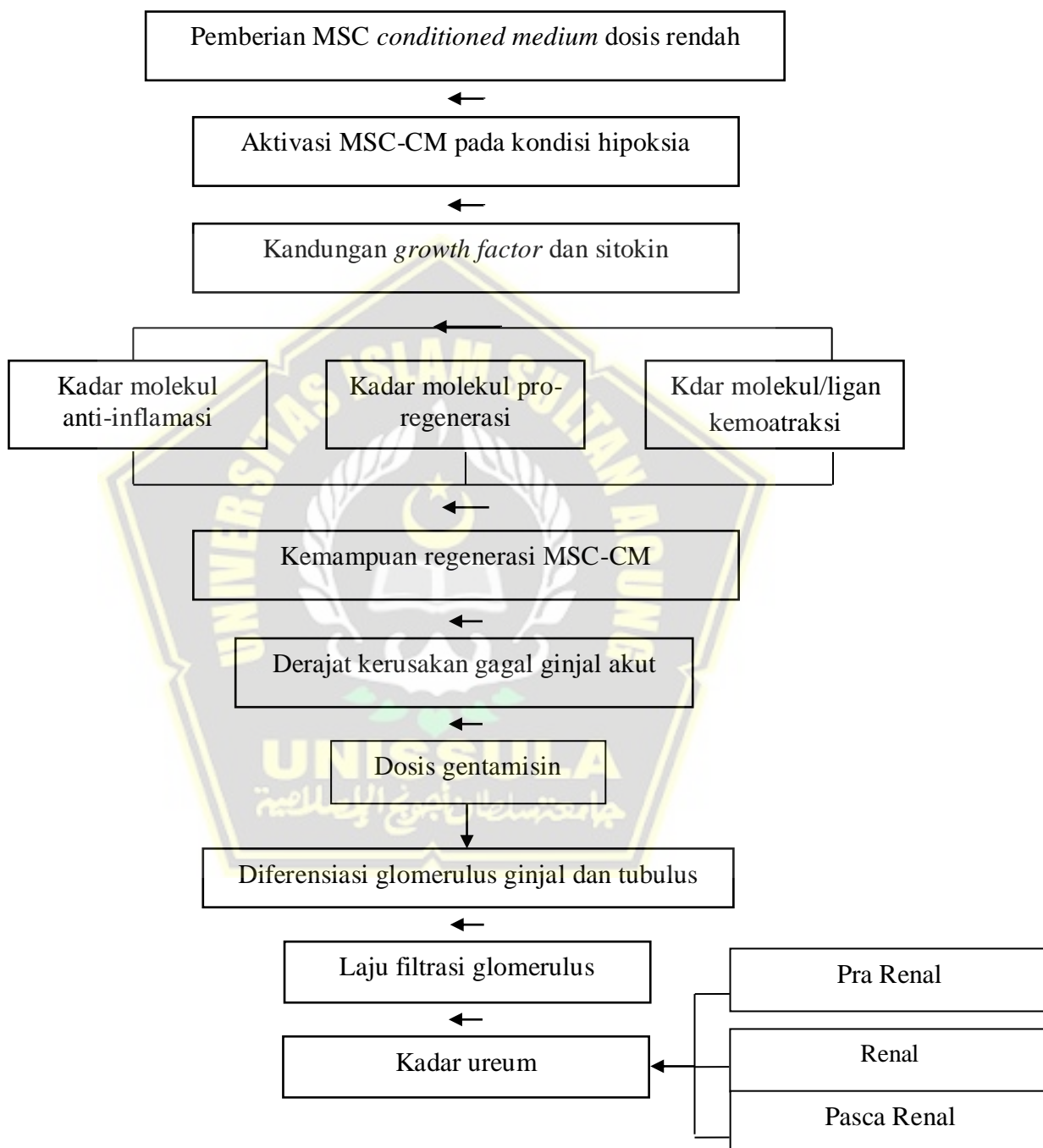
2.7. Hubungan MSC *Conditioned Medium* Dosis Rendah Terhadap Kadar Ureum Pada Gagal Ginjal Akut

Secara umum, MSC digambarkan sebagai sel yang belum matang di dalam sumsum tulang, dan di dalam hampir semua jaringan dewasa misal jaringan adiposa, sinovium, dermis dan organ-organ padat seperti hati, limpa dan paru-paru) (Zou *et al.*, 2010). Baru-baru ini, faktor trofik yang dihasilkan oleh MSC telah menjadi topik di berbagai penelitian yang mencakup bidang-bidang dasar dan klinis (Hofer dan Tuan, 2016). Faktor tropik ini selanjutnya diisolasi dalam bentuk *conditioned medium* (CM) mengandung berbagai faktor pertumbuhan klasik dan berbagai sitokin seperti VEGF, CNTF, GDNF, TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8, dan ligan CC (CCL-2, CCL-5, CCL-23) (Hofer dan Tuan, 2016).

Strategi baru untuk mengoptimalkan kemampuan regeneratif baik MSC maupun MSC-CM menjadi fokus penelitian kedepan dimana bertujuan untuk meningkatkan kemampuan dari regenerasi yang dihasilkan. Untuk mencapai tujuan ini, berbagai strategi pretreatment "prakondisi") *in vitro* baru-baru ini diterapkan untuk meningkatkan kemampuan regeneratif MSC termasuk MSC-CM (Trivedi *et al.*, 2010). Percobaan kultur sel ini melibatkan adanya faktor pertumbuhan atau sitokin, atau dalam lingkungan hipoksia (Rota *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Prekondisi dalam kondisi hipoksia terutama pada MSC-CM telah diteliti mampu meningkatkan sekresi faktor regeneratif dan dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel (Stubbs *et al.*, 2012; Beegle *et al.*, 2015). Melalui kemampuan

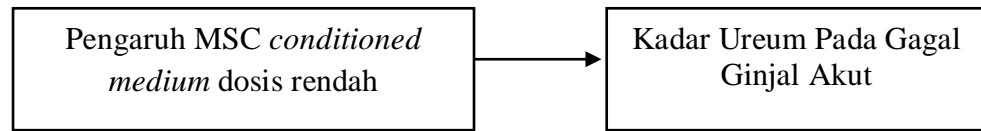
regeneratifnya MSC-CM mampu memberikan efek menguntungkan pada proses regenerasi ginjal (Zou *et al.*, 2010).

2.8. Kerangka Teori



Gambar 2.9. Kerangka teori

2.9. Kerangka Konsep



Gambar 2.10. Kerangka konsep

2.10. Hipotesis

Terdapat pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut yang diinduksi gentamicin.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan “*post test only control group design*” dengan menggunakan hewan coba.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

3.2.1.1. Variabel Bebas : Pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah

3.2.1.2. Variabel Tergantung: Kadar ureum .

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Pengaruh MSC *conditioned medium* dosis rendah

Conditioned Medium diperoleh dari hasil *secretome* kultur *umbilical cord blood Mesenchymal Stem Cell* (MSC) yang diaktivasi dalam kondisi hipoksia dengan pengaliran gas CO₂ dalam *chamber* sehingga kadar O₂ menjadi 1,5% - 5% menggunakan alat *oxygen meter* yang diletakkan didalam *chamber* selama waktu 24 jam. *Mesenchymal stem cell* (MSC) merupakan sel yang mengekspresikan CD73+, CD90+ dan CD105+ dengan menggunakan metode

immunostaining. MSC diisolasi dari *umbilical cord blood* yang berasal dari bayi yang telah melalui proses *informed consent*. MSC merupakan *stem cell* yang mengekspresikan CD73+, CD90+ dan CD105+ dengan menggunakan pemeriksaan *flow cytometry*. Dosis MSC-CM yang digunakan sebesar 0,2.

Skala : Rasio

3.2.2.2. Kadar Ureum.

Merupakan hasil metabolisme akhir protein yang berasal dari asam amino yang telah dipindahkan aminonya di dalam hati dan mencapai ginjal. Hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometri.

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

3.3.1.1. Populasi Target

Populasi target dari penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Wistar*.

3.3.1.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran

UNISSULA kemudian dipilih secara acak dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi.

3.3.2. Sampel Penelitian

3.3.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan galur Wistar umur 2-3 bulan.
2. Tikus putih jantan galur Wistar yang sehat.
3. Tikus putih jantan galur Wistar dengan berat badan 200-250 gram.
4. Tikus yang berhasil diinduksi gagal ginjal akut

3.3.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus putih jantan galur Wistar yang memiliki kelainan anatomis
2. Tikus putih jantan galur Wistar yang pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

3.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mati selama penelitian

3.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *randomized sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P).

3.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Pada penelitian ini digunakan

12 ekor tikus putih jantan galur Wistar dengan masing-masing 6 ekor sampel per kelompok.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen

1. *Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)*
2. *Pipette filler*
3. *Conical tube (15 ml, 50 ml)*
4. *Cryotube 1 ml*
5. *Inverted microscope*
6. *Scissor*
7. *Pinset*
8. *Scalpel dan bisturi*
9. *Thermostirrer*
10. *Beaker glass*
11. *Aluminium foil*
12. *Dish*
13. *Flask*
14. *Tabung CO₂*
15. *Imunocytochemistry*
16. *Biosafety Cabinet class 2*
17. *CO₂ Incubator*
18. *Hotplate stirrer*
19. *Disposable pipet*

20. *Cell counter*
21. *24 well plate*
22. Gunting bedah
23. Pipet kapiler
24. *Freezer*
25. *Sentrifuge* (Sarvall MC 12 V),
26. Spektrofotometer
27. *Chamber*
28. *Oxygen meter*

3.4.2. Bahan Penelitian

1. *Mesenchymal Stem Cell*
2. NaCl 0.9%
3. FBS
4. Medium dMEM
5. Alkohol 70%
6. Fungizon 0.5%
7. *Streptomisin-penicilin* 1% (penstrep)
8. PBS
9. Alkohol 70%
10. H₂O₂
11. Antibodi CD105, CD90 and CD73
12. Parafin
13. Larutan xylol

14. Hematoksin eosin
15. *Fluorescein isothiocyanate* (FITC)
16. *Allophycocyanin* (APC)
17. *Phycoerythrin* (PE)

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Pengajuan *Ethical Clearance*

Pengajuan *ethical clearance* penelitian ditujukan kepada dewan peninjau institusional dari etika Komite Etik Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

3.5.2. *Informed Consent* Kepada Ibu Hamil

Persetujuan atau *informed consent* terkait pengambilan darah dari *umbilical cord* dilakukan sebelum proses kelahiran pada ibu hamil.

3.5.3. Pengambilan Sampel *Umbilical Cord Blood*

1. Ambillah darah dari *umbilical cord* pasien @ 5cc
2. Masukkan ke dalam tabung heparin.

3.5.4. Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Blood Cord*

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. Masukkan ficol 4000 μl ke tabung sentrifuge.
2. Buka tutup tabung heparin pipet dengan pipet besar.
3. Masukan ke dalam tabung berisi *ficoll* (secara hati-hati) jangan sampai tercampur hingga membentuk dua lapis. *Ficoll* dan darah.
4. Tutup tabung kemudian sentrifuge selama 15 menit dalam kecepatan 3000 rpm.
5. Setelah sentrifuge akan di dapatkan bufficoat (cincin putih ditengah).
6. Ambil *bufficoat* secara hati-hati masukkan ke tabung baru.
7. Beri PBS sebanyak 500 μL .
8. Sentrifuge kembali selama 15 menit dalam kecepatan 3000 rpm.
9. Setelah di dapatkan pellet buang supernatan.
10. Beri PBS kemudian hitung.
11. Masukkan medium ke dalam tabung.
12. Pindahkan ke flash.
13. Inkubasi sampai konfluen 80%.

3.5.5. Kultur sel

1. Tanam di cawan petri jaringan
2. Inkubasi 37°C dan 5% CO₂
3. Setengah medium diganti setiap 2-3 hari sekali sampai sel konfluens 80%.

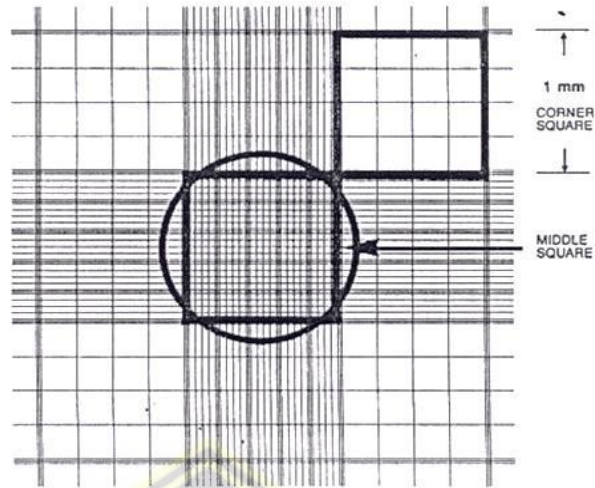
3.5.6. Proses Pemanenan Sel

1. Panen sel dilakukan menggunakan panen sel ketiga yang dipindahkan ke *coverslip*.
2. Wadah medium dibersihkan dengan menggunakan PBS 1 ml dan tripsin 1 ml untuk memisahkan medium dengan sel.
3. Inkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C.
4. Memastikan sel sudah lepas dilihat di mikroskop.
5. Jika sudah lepas, ambil tripsin dan PBS menggunakan *micropipette*.
6. Kemudian ganti dengan medium komplet.

3.5.7. Proses Penghitungan Sel

1. 10µl sel disiapkan dan dimasukkan ke cryotube
2. triptofan blue 90µl ditambahkan ke dalam cryotube
3. 10µL ddi dipipetkan ke bilik hitung yg sudah ditutup dengan deck glass
4. Diihat dengan menggunakan mikroskop inverted pada 4 bilik hitung
5. Cara penghitungan:
 - Hitung sel pada 4 bilik hemositometer.

- Sel yang hidup → bening terang.



Gambar 3.1. Bilik hitung

Gambar diatas menunjukkan kotak pada *haemocytometer* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel. Yang digunakan adalah 4 kotak paling pojok (kiri, kanan, atas, dan bawah). Sedangkan kotak tengah tidak digunakan. Hitung jumlah sel dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\sum n1 + \sum n2 + \sum n3 + \sum n4}{4} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

3.5.8. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BD™ *accutase™ cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD Pharmingen™ *Stain Buffer* (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS)

buffer. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung *falcon* 5ml dan label sebagai berikut:

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam *flowcytometry*

Tabung	Reagen	Volume dimasukan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD90	5 μ l
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD44	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD105	5 μ l
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD73	5 μ l
5	Kosong	-
	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20 μ l
6	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20 μ l
	hMSC <i>positive cocktail</i>	20 μ l
7	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20 μ l

3. Ulangi tabung 5 -7 setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel kedalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *Flow Cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

3.5.9. Prosedur Hipoksia dan Pembuatan MSC *Conditioned Medium* (MSC-CM)

1. Siapkan *chamber*

2. Masukkan *well plate* yang telah berisi MSC sebanyak 50.0000 sel dalam 20 sumuran kedalam chamber
3. Letakkan *oxygen meter* di dalam *chamber*
4. Pastikan chamber tersebut tertutup rapat
5. Alirkan CO₂ melalui selang yang terhubung ke chamber
6. Amati pada *oxygen meter* sampai kadar O₂ 1,5% - 5%
7. Inkubasi selama 24 jam dan amati kembali pada *oxygen meter* tetap dalam kadar 1,5% - 5%
8. Selanjutnya pisahkan *stem cell* dengan *conditioned medium* dengan disentrifuge pada kecepatan 3000 RPM.
9. Ambil supernatan.

3.5.10. Pembuatan Hewan Coba Model Gagal Ginjal Akut

1. Tikus diinduksi dengan gentamisin dosis 60 mg/KgBB secara intraperitoneal selama 10 hari.
2. Pada hari ke-11 dilakukan terminasi pada salah satu kelompok tikus yang prakondisi gagal ginjal akut untuk pembuatan preparat jaringan.
3. Pembuatan preparat jaringan untuk melihat apakah sudah terdapat kerusakan jaringan pasca induksi gentamisin. Preparat jaringan dibuat dengan menggunakan prepat parafin organ ginjal dan dilakukan pengecatan dengan menggunakan pulasan Hematoksilin dan Eosin serta dilihat pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x

4. Gagal ginjal akut pada preparat ginjal akan didapatkan gambaran glomerulus dan tubulus mengalami kerusakan, tampak tubulus tidak utuh tetapi terdapat penyatuan dan terjadi degenerasi hialin.

3.5.11. Pembuatan Preparat

1. Fiksasi

Jaringan eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam *phospat Buffer Saline* pada Ph 7,0). Fiksasi jaringan dilakukan selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai masukan jaringan fiksasi dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk menghilangkan larutan fiksasi.

2. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam *alcohol* 30%, 40%, 50%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) agar jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Masukan jaringan ke dalam larutan *alcohol-xylol* selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan *xylol* murni selama 2 x 2 jam.

3. Parafinasi

Jaringan dimasukan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam.

4. *Embedding*

Jaringan yang ditanam dalam parafin padat memiliki titik lebur 56-58°C, tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari

potongan jaringan ditempelkan pada *object glass* yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukkan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

5. Pewarnaan dengan Hematoksilin Eosin

Proses pewarnaan dengan menggunakan hematoksilin dan eosin, diamkan selama 1-5 menit, cuci dengan air mengalir, aliri dengan larutan yodium, cat dibuang, isapkan dengan *tissue* kemudian keringkan di udara.

3.5.12. Perlakuan pada Tikus Model Gagal Ginjal

Kelompok (K) : tikus gagal ginjal diberikan larutan PBS sebagai kontrol, pemberian secara intravena.

Kelompok (P) : tikus gagal ginjal diberikan MSC-CM dosis rendah (0,2), , pemberian secara Intravena.

3.5.13. Analisis Ureum dengan Spektrofotometer

1. Darah diambil dari sinus orbitalis tikus pada hari ke 8 setelah perlakuan dan kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 15-20 menit, selanjutnya hasil dari supernatannya dimasukkan ke dalam spektrofotometer yang diberi label sesuai dengan kelompok perlakuan.
2. Sebanyak 0,1 mL sampel darah lalu ditambahkan 1 mL reagen (campuran buffer dan urease 100:1) ke dalam tabung sampel

standard dan blanko, kemudian diresuspensi dan diinkubasi pada suhu kamar (20-25°C) selama 5 menit.

3. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen (campuran buffer dan urease 100:1) kemudian diresuspensi dan diinkubasi pada suhu kamar (20-25°C) selama 5 menit.
4. Konsentrasi sampel dan standar terhadap blanko dibaca dengan menggunakan spektrofotometer.

3.6. Tempat dan Waktu Penelitian

3.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* FK Unissula (SCCR)

3.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2020.

3.7. Pengolahan Data

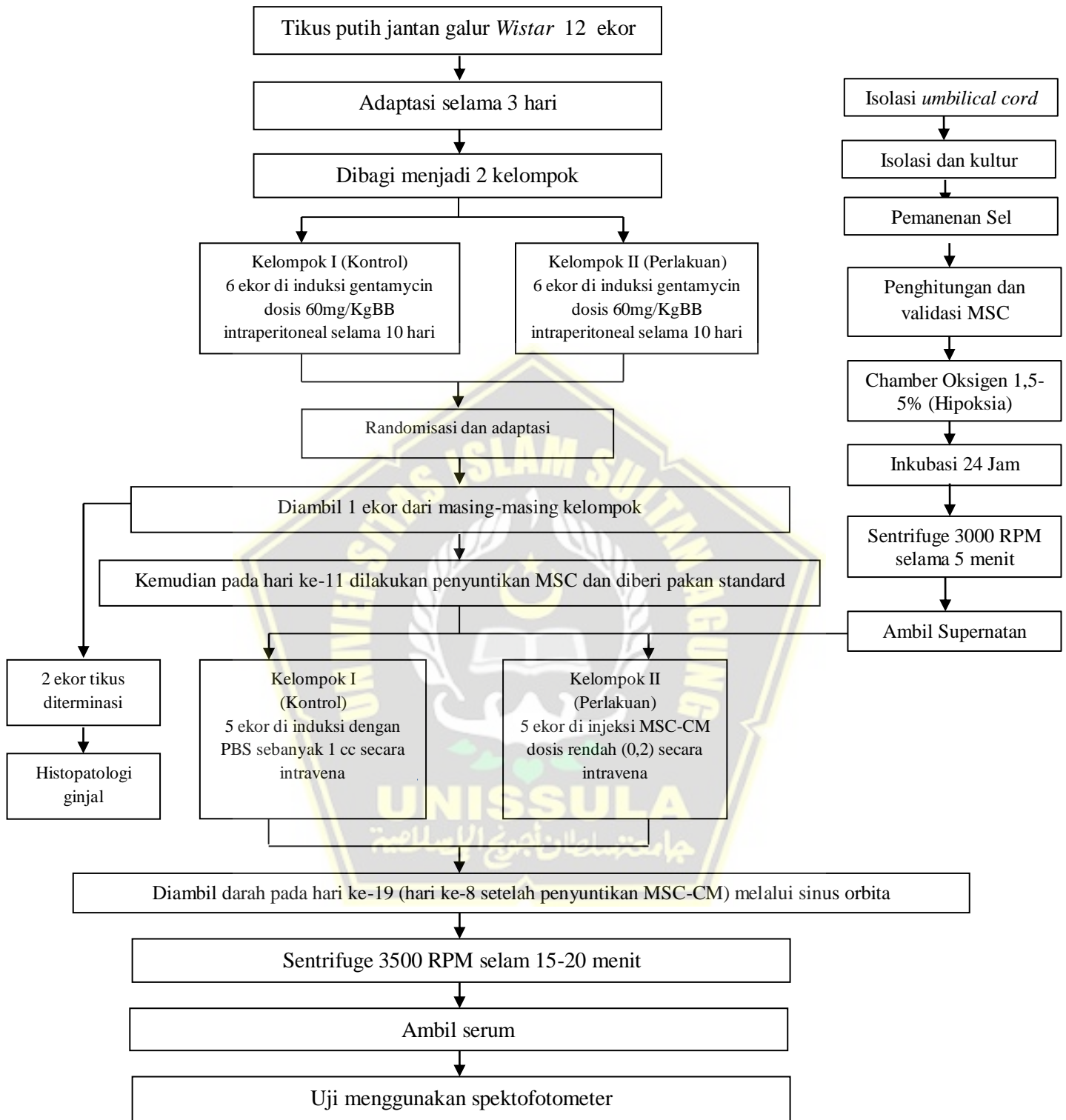
Pengolahan data pada penelitian ini melalui empat tahap, yaitu *editing*, *coding*, *processing*, dan *cleaning*. *Editing* yaitu pengecekan kembali data-data yang didapatkan setelah data terkumpul. *Coding* meliputi pemberian kode atau merubah kata menjadi angka pada data yang sudah di edit agar mempermudah memasukkan data. *Processing* adalah memproses data yang akan dianalisis dengan cara memasukkan data ke komputer. *Cleaning* adalah pengecekan kembali data-data yang sudah dimasukkan agar terhindar dari kesalahan.

3.8. Analisis Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan deskriptif data menggunakan mean, median, modus. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk*. Bila data kadar ureum pada tikus gagal ginjal akut setelah perlakuan terdistribusi normal dan varian sama maka akan dilakukan uji beda uji T tidak berpasangan. Bila terdapat data tidak normal dan varian tidak sama, maka dilakukan uji *Mann Whitney*. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 20.0 *for Windows*.



3.9. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian

BAB IV

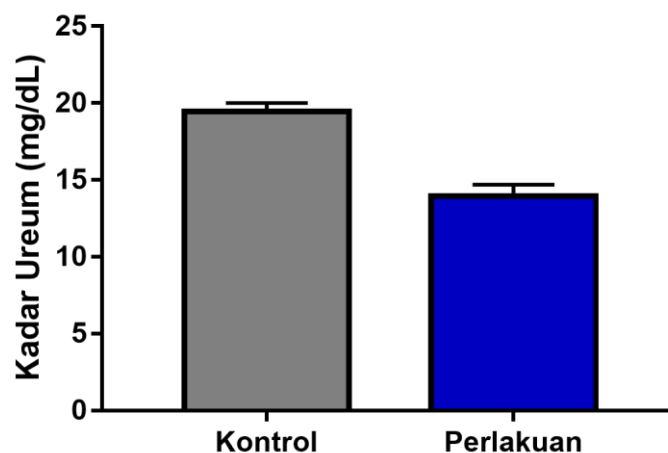
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Research Cancer* FK Unissula Semarang. Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 ekor tikus jantan galur *Wistar* yang diambil secara random dengan berat badan 200-250 gram. Pada 12 tikus jantan galur *Wistar* dilakukan pengelompokan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (K/ injeksi PBS) dan perlakuan (P1/ MSC-CM dosis 0,2).

Penelitian ini diawali dengan pembuatan tikus model gagal ginjal akut dengan diinduksi gentamisin dosis 60 mg/KgBB secara intraperitoneal selama 10 hari. Pada hari ke-11 dilakukan terminasi pada salah satu kelompok tikus yang prakondisi gagal ginjal akut untuk pembuatan preparat jaringan. Kemudian pada hari ke-11 dilakukan perlakuan sesuai kelompok. Diambil darah pada hari ke-19 (hari ke-8 setelah penyuntikan MSC-CM) melalui sinus orbita dan dilakukan analisis serum ureum menggunakan spektrofotometer.

Rerata kadar ureum pada tiga kelompok ditunjukkan oleh gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kadar ureum pada tiap kelompok. Kelompok K ($19,46 \pm 0,56$ mg/dL); P ($13,96 \pm 0,73$ mg/dL).

Data kadar ureum selanjutnya dianalisis dengan uji *Shapiro Wilk* untuk mengetahui sebaran datanya. Uji *Shapiro Wilk* menghasilkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,454 ($p > 0,05$) untuk kelompok kontrol (K) dan 0,655 ($p > 0,05$) untuk kelompok perlakuan (P). Hasil uji *Shapiro Wilk* menunjukkan baik kelompok kontrol dan perlakuan memiliki data yang terdistribusi normal (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Hasil uji normalitas kelompok

Kelompok	Sig	Keterangan
Kelompok kontrol (K)	0,454	Data terdistribusi normal
Kelompok perlakuan (P)	0,655	Data terdistribusi normal

Keterangan: nilai $p > 0,05$ menunjukkan data terdistribusi normal pada kelompok kontrol ($p = 0,454$) dan kelompok perlakuan ($p = 0,655$).

Berdasarkan hasil uji normalitas data bersifat parametrik, sehingga uji beda menggunakan uji *independent sample t-test* untuk mengetahui adakah perbedaan kadar ureum yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan (tabel 4.2.).

Tabel 4. 2 Hasil uji *independent sample t-test*

	t	df	Sig. (2-tailed)
Hasil Equal variances assumed	13,411	8	0,000

Berdasarkan analisis menggunakan uji *independent sample t-test* (tabel 4.2.), menunjukkan nilai $p=0,000$ yang berarti lebih kecil dari α (0,05) sehingga hipotesis kerja penelitian ini diterima. Nilai p menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna (signifikan) yang berarti bahwa terdapat pengaruh MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut.

4.2. Pembahasan Penelitian

Hasil uji statistik deskriptif dalam penelitian ini penurunan rerata kadar ureum pada kelompok perlakuan (P) dibandingkan dengan kelompok kontrol (P). Berdasarkan hasil *independent sample t-test* diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna terhadap rerata kadar ureum pada kelompok perlakuan (P atau dosis 0,2) dibandingkan dengan kelompok kontrol (P). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa pemberian MSC-CM dosis rendah (0,2) mampu menurunkan kadar ureum secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Beberapa penelitian lainnya sejalan dengan hasil penelitian ini yakni seperti pada penelitian yang dilakukan oleh

Markovic *et al.* (2017). Pada penelitian ini pemberian MSC-CM pada mencit yang diinduksi gagal ginjal akut dengan cisplatin menurunkan kadar BUN dan kreatinin serum secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (Markovic *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Overath *et al.* (2016) menjelaskan bahwa pemberian MSC-CM baik yang diinduksi dengan kondisi hipoksia maupun pada kultur normal mampu menurunkan parameter kerusakan ginjal yakni serum kreatinin pada model AKI yang diinduksi dengan cisplatin dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian yang dilakukan oleh Abouelkheir *et al.* (2016) membuktikan bahwa pemberian MSC-CM dapat memberi perbaikan pada fungsi ginjal pada tikus dengan model gagal ginjal akut dengan cara menurunkan tingkat kerusakan jaringan dan apoptosis sel tubular. Hasil yang berbeda ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Xing *et al.* (2014) menjelaskan bahwa penurunan kadar BUN signifikan terjadi pada kelompok pemberian perlakuan MSC dan bukan kelompok MSC-CM pada tikus model AKI diinduksi jejas iskemia reperfusi.

Gentamisin adalah antibiotik aminoglikosida efektif yang banyak diresepkan untuk mengobati pasien dengan infeksi, tetapi efek samping yang terkait dari stres oksidatif dan cedera ginjal membatasi penggunaan klinis jangka panjangnya (Ali *et al.*, 2011). Onset gagal ginjal biasanya lebih lambat dan peningkatan kreatinin serum setiap hari cenderung lebih rendah daripada penyebab gagal ginjal akut lainnya. Kreatinin serum dan nitrogen urea darah secara khas meningkat 7-10 hari setelah dimulainya

terapi aminoglikosida (Udupaa dan Prakashb, 2019). Gentamisin sebagai obat aminoglikosida dapat menyebabkan kerusakan sel tubulus ginjal seperti gangguan struktur membran lisosom, mitokondria, dan plasma. Nefrotoksisitas yang diinduksi gentamisin ditandai dengan nekrosis tubular langsung, yang terlokalisasi terutama di daerah tubulus proksimal (Abedi *et al.*, 2016).

Mesenchymal stem cell conditioned medium (MSC-CM) merupakan pengembangan produk dari *stem cell* dimana pada dasarnya memanfaatkan *secretome* dari MSC dapat menggantikan peran terapi MSC konvensional dalam penyembuhan berbagai kerusakan jaringan (Lotfinia *et al.*, 2017; Pawitan, 2014). Beberapa kandungan dari MSC-CM berdasarkan studi proteomik memberikan hasil yakni kadar IGF-1 1515.6 ± 211.8 pg/mL; kadar VEGF 465.8 ± 108.8 pg/mL; kadar TGF- β 1 339.8 ± 14.4 pg/mL dan kadar HGF 20.3 ± 7.9 pg/mL (Pawitan, 2014). Dalam proses perbaikan cedera ginjal, VEGF menjadi faktor tambahan dalam renoproteksi (Togel et sementara IGF-1 dan HGF memainkan peran regenerasi pada ginjal pasca cedera akut (Moghadasali *et al.*, 2013). Paparan gentamicin menyebabkan nekrosis pada tubulus proksimal, sehingga pemberian MSC-CM secara *in vitro* pada kultur sel ginjal manusia terbukti mampu meningkatkan perbaikan jaringan melalui peningkatan viabilitas sel dan percepatan migrasi sel pasca toksisitas sel yang diinduksi gentamisin (Abedi *et al.*, 2016; Moghadasali *et al.*, 2013).

MSC-CM secara signifikan mengurangi apoptosis sel tubular, memperbaiki fungsi ginjal, dan meningkatkan kelangsungan hidup tikus yang menderita cedera ginjal akut (Liu *et al.*, 2018). MSC-CM secara efisien melemahkan nefrotoksisitas yang obat dengan mengurangi masuknya dan kapasitas sel dendritik dan limfosit T untuk menghasilkan sitokin inflamasi. Selain itu *peran nitric oxide* bertanggung jawab atas efek renoprotektif yang dimediasi MSC-CM (Markovic *et al.*, 2017). Injeksi MSC-CM secara signifikan melemahkan cisplatin yang diinduksi cedera ginjal akut dan peradangan seperti yang ditunjukkan oleh penurunan kadar kreatinin serum, IL-1, dan IL-6 dan berkurangnya kehadiran neutrofil yang diaktifkan di ginjal yang terluka (Overath *et al.*, 2016).

Penelitian ini memiliki makna yakni MSC-CM dosis rendah berpengaruh terhadap perbaikan fungsi ginjal dibandingkan pada kelompok kontrol. Pada tahapan pre klinik terhadap hewan coba, pemberian MSC-CM mampu memberikan perbaikan parameter fungsi ginjal yang rusak akibat induksi gentamicin. Kendala penelitian ini teknik isolasi MSC sampai memperoleh MSC-CM yang begitu kompleks. Penelitian ini memiliki keterbatasan di mana peneliti tidak menganalisis keterlibatan berbagai molekul yang dilepaskan oleh MSC-CM pada penelitian ini, sehingga mekanisme regenerasi pada penelitian masih mengacu pada teori atau penelitian-penelitian terdahulu. Tidak dilakukan pemeriksaan terhadap gambaran histologi jaringan, seperti tubular *injury score* sehingga perbaikan

jaringan hanya dilihat berdasarkan fungsional ginjal melalui penurunan kadar ureum.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan data penelitian pengaruh MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut maka dapat ditarik kesimpulan:

- 5.1.1. Terdapat pengaruh MSC-CM dosis rendah terhadap kadar ureum pada gagal ginjal akut.
- 5.1.2. Kadar ureum pada tikus gagal ginjal akut kelompok kontrol yaitu $19,46 \pm 0,56$ mg/dL.
- 5.1.3. Kadar ureum pada tikus gagal ginjal akut pada kelompok perlakuan (MSC-CM) yaitu $13,96 \pm 0,73$ mg/dL

5.2. Saran

- 5.2.1. Dilakukan penelitian lanjutan dengan menilai tubular *injury score* pasca pemberian MSC-CM pada tikus model gagal ginjal akut dengan berbagai dosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedi A, Azarnia M, Zahvarehy MJ, foroutan T, Golestani S. 2016. Effect of Different Times of Intraperitoneal Injections of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury. *Miscellaneous*
- Abouelkheir, M., El Tantawy, D.A., Saad, M.A., Abdelrahman, K.M., Sobh, M.A., Lotfy, A., 2016, Mesenchymal stem cells versus their conditioned medium in the treatment of cisplatin-induced acute kidney injury: evaluation of efficacy and cellular side effects, *Int J Clin Exp Med* 9(12):23222-23234.
- Ali BH, Al Zaabi M, Blunden G, Nemmar A. 2011. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a minireview of recent research. Mini review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 9:225–232.
- Ali, I.H., Brazil, D.P., 2013, *Under the right conditions: protecting podocytes from diabetes-induced damage, Stem cell research & therapy* 4, 119.
- Arifputera, A., Tanto, C, Calistania, C., Klarisa, C., Priantono, D., Wardhani, D., P., Wibisono, E., 2014. *Kapita Selekt Kedokteran*, Media Aesculapius, Jakarta.
- Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R.R., Nolte, J.A., 2015, Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival and promotes cell retention in vivo, *Stem Cells*.
- Case, J., Khan, S., Khalid, R., Khan, A., 2013, Epidemiology of acute kidney injury in the intensive care unit, *Crit Care Res Pract* 2013:479730
- Dennen, P., Douglas, I.S., Anderson, R., 2010, Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist, *Crit. Care Med.* 38 (2010) 261–275.
- Frank, E.L, 2010, Non protein nitrogen compounds. In: Bishop M.L, Fody E.P, Schoeff L.E., editors, *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations*. 6th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fuhrman, D.Y., Kane-Gill, S., Goldstein, S.L., Priyanka, P., Kellum, J.A., 2018, Acute kidney injury epidemiology, risk factors, and outcomes in critically ill patients 16–25 years of age treated in an adult intensive care unit, *Ann Intensive Care*. 2018; 8: 26.

- Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A.K., Vernekar, S.N., 2010, Markers of renal function tests, *N Am J Med Sci.* 2(4): 170-3.
- Halim, D., Murti, H., Sandra, F., Boediono, A., Djuwantono, T., Setiawan, B., 2010, *Stem Cell Dasar Teori dan Apikasi Klinis*, Erlangga, Jakarta.
- Hematti, P., 2012, Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity?, *Cytotherapy* 14(5):516-21.
- Hofer H.R., Tuan R.S., 2016, Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies, *Stem Cell Res Ther.* 7(1): 131.
- Hu C, Zhao L, Zhang L, Bao Q, Li L. 2020. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11: 377.
- Kaddourah, A., Basu, R.K., Bagshaw, S.M., Goldstein, S.L., 2017, Epidemiology of acute kidney injury in critically ill children and young adults, *N Engl J Med.* 376(1):11-20.
- Kim H.O., Choi S., 2013, Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10(3):93–101.
- Klein, J.D., Blount, M.A., Sands, J.M., 2012, Molecular mechanisms of urea transport in health and disease, *Pflugers Arch.* 464(6):561-72.
- Li, D., Wang, N., Zhang, L., Hanyu, Z., Xueyuan, B., Fu, B., Shaoyuan, C., Zhang, W., Xuefeng, S., Li, R., Chen, X., 2013, Mesenchymal stem cells protect podocytes from apoptosis induced by high glucose via secretion of epithelial growth factor. *Stem cell research & therapy* 4(5):103.
- Lintong PM, Kairupan CF, Sondak PLN. 2012. Gambaran Mikroskopik Ginjal Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Setelah Diinduksi Dengan Gentamisin. *Jurnal Biomedik.* 4(3): 185-192.
- Liu B, Ding F, Hu D, Zhou Y, Long, C, Shen L, Zhang Y, Zhang D, Wei G. 2018. Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in vivo and in vitro. *Stem Cell Research & Therapy.* 9(7).
- Lotfinia, M., Lak, S., Ghahhari, N.M., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Tabrizi, B.S., Kadivar, M., 2017, Hypoxia pre-conditioned embryonic

- mesenchymal stem cell secretome reduces il-10 production by peripheral blood mononuclear cells, *Iranian Biomedical Journal* 21(1): 24-31.
- Lu HY, Ning XY, Chen YQ, Han SJ, Chi P, Zhu SN, Yue Y. 2018. Predictive Value of Serum Creatinine, Blood Urea Nitrogen, Uric Acid, and β 2-Microglobulin in the Evaluation of Acute Kidney Injury after Orthotopic Liver Transplantation. *Chin Med J (Engl)*. 131(9): 1059–1066.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y., 2014, Immunobiology of mesenchymal stem cells, *Cell Death and Differentiation* 21:216–225.
- Makris, K., Spanou, L., 2016, Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes, *Clin Biochem Rev.* 37(2): 85–98.
- Markovic BS, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Jeremic J, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. 2017. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. *Stem Cells Int.*
- Moghadasali, R., Mutsaers, H.A.M., Azarnia, M., Aghdami, N., Baharvand, H., Torensma, R., Wilmer, M.J.G., Masereeuw, R., 2012, Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates regeneration of human renal proximal tubule epithelial cells after gentamicin toxicity, *Experimental and Toxicologic Pathology* 65 (2013):595–600.
- Nagaishi, K., Mizue, Y., Chikenji, T., Otani, M., Nakano, M., Konari, N., Fujimiya, M., 2016, Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes, *Sci Rep* 6:34842.
- Oh, M.S., 2011, Evaluation of renal function, water, electrolytes and acid base balance. In: Mc Pherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Osugi, M., Katagiri, W., Yoshimi, R., Inukai, T., Hibi, H., Ueda, M., 2012, Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects, *Tissue Eng Part A*. 18(13-14):1479-89.
- Overath JM, Gauer S, Obermüller N, Schubert R, Schäfer R, Geiger H, Baer PC. 2016. Short-term preconditioning enhances the therapeutic potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury. *Exp Cell Res* 342(2):175-83.
- Overath, J.M., Gauer, S., Obermüller, N., Schubert, R., Schaefer, R., Geiger, H., Baer, P.C., 2016, Short-term preconditioning enhances the therapeutic

- potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury, *Exp Cell Res.* 342(2):175-83.
- Pawitan, J.A., 2014, Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine, *BioMed Research International* (2014).
- Ponce, D., Balbi, A., 2016, Acute kidney injury: risk factors and management challenges in developing countries, *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 9(1):193-200.
- Putra A., 2019, *Basic Molecular Stem Cell*, Semarang, Unissula Press.
- Putra, A., Pertiwi, D., Milla, M.N., Indrayani, U.D., Jannah, D., Sahariyani, M., Trisnadi, S., Wibowo, J.W., 2019, Hypoxia-preconditioned mscs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model, *Open Access Maced J Med Sci.* 7(3):305-310.
- Rajak ZFW, Loho L, Lintong P. 2016. Gambaran histopatologik ginjal wistar yang diberi ekstrak binahong pasca pemberian gentamisin. *Jurnal e-Biomedik (eBm).* 4(2).
- Rota, C., Imberti, B., Pozzobon, M., Piccoli, M., De Coppi, P., Atala, A., 2012, Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential, *Stem Cells Dev.* 21:1911–1923.
- Sacher, R.A., McPherso, R.A., 2012, *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan. Laboratorium Edisi 11*, Penerbit EGC, Jakarta.
- Sands, J.M., Blount, M.A., Klein, J.D., 2010, Regulation of renal urea transport by vasopressin, *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 122: 82 - 92 .
- Setiati, S., Alwi, I., Sudoyo, A.W., Stiyohadi, B., Syam, A.F., 2014, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II (ed) VI*, InternaPublishing, Jakarta.
- Stubbs, S.L., Hsiao, S.T.F., Peshavariya, H.M., Lim, S.Y., Dusting, G.J., Dilley, R.J., 2012, Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro, *Stem Cells Dev.* 21:1887–1896.
- Tamama, K., Kerpedjieva, S.S., 2012, Acceleration of wound healing by multiple growth factors and cytokines secreted from multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells, *Adv Wound Care (New Rochelle).* 1(4): 177–182.
- Trivedi, O., Tray, N., Nguyen, T., Nigam, N., Gallicano, G.I., 2010, Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later, *Stem Cells Dev.* 19 :1109–1120.

- Udupaa V, Prakashb V. 2019. Gentamicin induced acute renal damage and its evaluation using urinary biomarkers in rats. *Toxicology Reports*. 6:91-99.
- van Koppen, A., Joles, J.A, van Balkom, B.W., Lim, S.K., de Kleijn, D., Giles, R.H., Verhaar, M.C., 2012, *Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease*. *PloS one* 7(6):e38746.
- Weiner, I.D., Mitch, W.E., Sands J.M., 2015, Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion, *Clin J Am Soc Nephrol*. 10(8): 1444–1458.
- Williams, A.R., Hare, J.M., 2011, Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease, *Circ Res*. 109(8): 923–940.
- Xing L, Cui R., Peng, L. *et al.* 2014. Mesenchymal stem cells, not conditioned medium, contribute to kidney repair after ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther* 5(101).
- Zhang, W., Liu, L., Huo, Y., Yang, Y., Wang, Y., 2014, Hypoxia-pretreated human mscs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities, *Biomed Res. Int*. 462472.
- Zou, Z., Zhang, Y., Hao, L., Wang, F., Liu, D., Su, Y., Sun, H., 2010, More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body., *Expert Opin. Biol. Ther*. 10 (2010) 215–30.

