

**PENGARUH EKSTRAK TAPAK DARA (*Catharanthus roseus*)
TERHADAP KADAR CASPASE-3 DAN KADAR
INTERLEUKIN-6 GINJAL PADA KERACUNAN KADMIUM
(Studi Eksperimental *in vivo* Mencit BalB/C Jantan Diinduksi Cadmium
Clorida)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Disusun Oleh:

Qisthy Kurrota Aini

MBK. 2015010183

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH EKSTRAK TAPAK DARU (*Catharanthus roseus*)
TERHADAP KADAR CASPASE-3 DAN KADAR INTERLEUKIN-6
GINJAL PADA KERACUNAN KADMIUM**

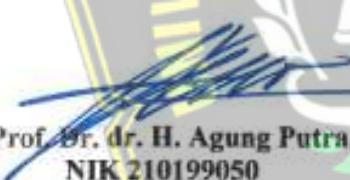
**Studi Eksperimental *in vivo* pada Mencit Balb/C Jantan diinduksi Cadmium
Clorida**

Diajukan oleh
Qisthy Kurrota Aini
MBK 20.15.01.0183

Telah disetujui oleh

Pembimbing I

Pembimbing II


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


Dr.dr.Hj.Cholidjah,M.Kes.
NIK 210186023

UNISSULA
جامعة سلطان أبجوع الإسلامية

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, Msi. Med
NIK 210199050

PERNYATAAN

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



Semarang, Maret 2024



(Qisthy Kurrota Aini)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis berjudul, **“PENGARUH EKSTRAK TAPAK DARU (*Catharantus roseus*) TERHADAP KADAR CASPASE-3 DAN KADAR INTERLEUKIN-6 GINJAL PADA KERACUNAN KADMIUM (Studi Eksperimental *in vivo* Mencit BalB/C Jantan diinduksi Cadmium Clorida)”** 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.H. selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta seluruh wakil rektor 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. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang, dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
4. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.

5. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
6. Seluruh keluarga tercinta Ibu Sri Astuti, Almarhum Bapak A. Fauzi, kedua kakak saya (Dr. Iqbal .M, S. IP, M.Si dan Zaky Ainun Najib,SE), suami saya Fahmi Idris, Lc dan anak laki-laki saya Ayyash Al Fakhri Idris yang telah memberikan banyak dukungan dalam proses menempuh pendidikan S 2 hingga terselesainya penulisan 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.

UNISSULA

جامعة سلطان أبجوج الإسلامية

Semarang, Maret 2024

ABSTRAK

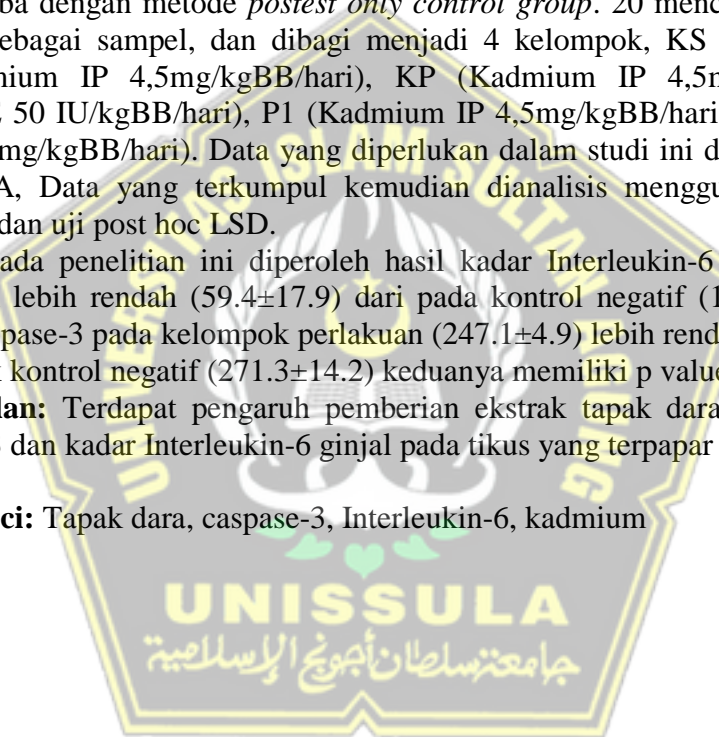
Latar belakang: Akumulasi kadmium dalam tubuh berkontribusi terhadap stress oksidatif memicu kerusakan sel DNA sehingga memicu inflamasi yang ditandai dengan peningkatan sitokin inflamasi, termasuk Interleukin-6 dan berujung pada apoptosis sel termasuk sel pada organ ginjal. Kerusakan sel ginjal meningkatkan kadar caspase-3 sehingga menurunkan fungsi ginjal. Penelitian terdahulu melaporkan antioksidan seperti Tapak dara (*Catharanthus roseus*) dan vitamin E diketahui dapat menurunkan stres oksidatif. Namun demikian, peran tapak dara dalam menghambat kerusakan ginjal akibat keracunan kadmium yang dilihat dari kadar Caspase-3 dan Interleukin-6 ginjal masih belum dikaji. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pemberian ekstrak tapak dara terhadap kadar Caspase-3 dan Interleukin-6 ginjal pada mencit yang terpapar kadmium

Metode : Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan hewan coba dengan metode *postest only control group*. 20 mencit Balb/C jantan diambil sebagai sampel, dan dibagi menjadi 4 kelompok, KS (pellet dan air), KN(Kadmium IP 4,5mg/kgBB/hari), KP (Kadmium IP 4,5mg/kgBB/hari + vitamin E 50 IU/kgBB/hari), P1 (Kadmium IP 4,5mg/kgBB/hari + ekstrak tapak dara 500 mg/kgBB/hari). Data yang diperlukan dalam studi ini diperoleh melalui uji ELISA, Data yang terkumpul kemudian dianalisis menggunakan one-way ANOVA dan uji post hoc LSD.

Hasil : Pada penelitian ini diperoleh hasil kadar Interleukin-6 pada kelompok perlakuan lebih rendah (59.4 ± 17.9) dari pada kontrol negatif (115.1 ± 5.85), dan kadar Caspase-3 pada kelompok perlakuan (247.1 ± 4.9) lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (271.3 ± 14.2) keduanya memiliki p value < 0.05

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak tapak dara terhadap kadar Caspase 3 dan kadar Interleukin-6 ginjal pada tikus yang terpapar kadmium

Kata kunci: Tapak dara, caspase-3, Interleukin-6, kadmium



ABSTRACT

Background: Cadmium 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 Interleukin-6 cause cell apoptosis including cells in the kidney. Renal cell death which is characterized by increased expression of Caspase 3 can reduce kidney function. Previous studies have reported that antioxidants Periwinkle (*Catharanthus roseus*) and vitamin E are known to reduce oxidative stress. However, the role of periwinkle in inhibiting kidney damage due to cadmium poisoning as seen from renal Caspase 3 level and Interleukin-6 has not been studied. This research aims to investigate the impact of periwinkle extract on the levels of Caspase-3 and Interleukin-6 in mice induced with a cadmium.

Methods: This study was a post test only control group design. 25 mice Balb/C were selected as the study samples and subsequently divided into four distinct group. KS (pellet and water only), KN (Cadmium IP 4,5mg/BW/day), KP (Cadmium IP 4,5mg/BW/day + vitamin E 50 IU/BW/day), P1 (Cadmium IP 4,5mg/ BW/day + extract periwinkle 500 mg/ BW/day). Data for this study were collected through ELISA testing and statistically analysed using one-way ANOVA and post hoc LSD test.

Results: In this study, the Interleukin-6 levels in the treatment group was lower (59.4 ± 17.9) than the negative control (115.1 ± 5.85), and Caspase-3 levels in the treatment group (247.1 ± 4.9) had a lower trend than the negative control group (271.3 ± 14.2), indicated by a p-value < 0.005 .

Conclusion: There is an effect of periwinkle extract on the levels of Caspase 3 and Interleukin-6 renal in mice exposed to cadmium.

Keywords: Periwinkle, Caspase-3, Interleukin-6, Cadmium



UNISSULA
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية

DAFTAR ISI

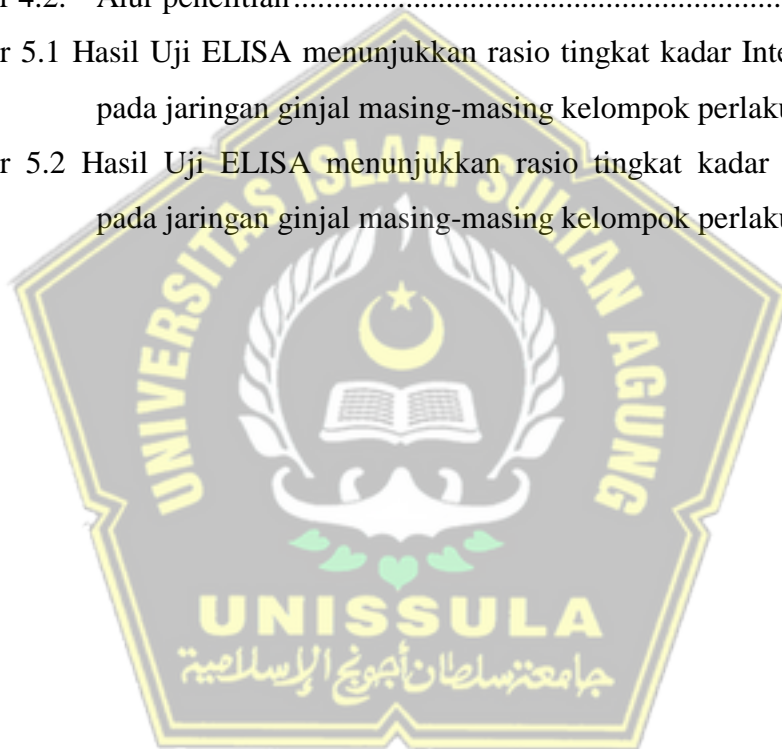
HALAMAN JUDUL.....	i
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
BAB I	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	3
1.4. Originalitas Penelitian	3
1.5. Manfaat penelitian	6
1.5.1. Manfaat Teoritis	6
1.5.2. Manfaat Praktis	6
BAB II.....	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. Interleukin-6	11
2.2.1. Definisi Interleukin-6.....	11
2.2.2. Peran IL-6 dalam inflamasi.....	11
2.2.3. Faktor-faktor yang mempengaruhi Interleukin-6.....	13
2.3. Logam Berat Kadmium	13
2.3.1. Definisi dan Karakteristik Kadmium	13
2.3.2. Prevalensi Keracunan Kadmium.....	14

2.3.3.	Sumber Paparan Kadmium	15
2.3.4.	Toksikokinetika Kadmium pada Tubuh.....	16
2.4.	Vitamin E	18
2.5.	Toksikodinamika dan Toksikokinetika Kadmium pada Ginjal	20
2.5.1.	Organ Ginjal.....	20
2.5.2.	Pengaruh Kadmium terhadap Ginjal.....	21
2.6.	Tapak Dara	22
2.6.1.	Morfologi dan Habitat Tanaman Tapak Dara	22
2.6.2.	Klasifikasi Tanaman Tapak Dara.....	23
2.6.3.	Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Tapak Dara.....	24
2.6.4.	Pengaruh Tanaman Tapak Dara terhadap Radikal Bebas	27
2.6.5.	Pengaruh Tanaman Tapak Dara terhadap Caspase 3	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		34
3.1.	Kerangka Teori.....	34
3.2.	Kerangka Konsep.....	35
3.3.	Hipotesis	36
BAB IV		37
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 Tapak Dara	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 Tapak Dara	41
4.5.3. Penetapan Dosis.....	41
4.5.4. Pembuatan Paparan Kadmium dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	42
4.5.5. Pengambilan Sampel Jaringan	42
4.5.6. Analisis Kadar Interleukin-6 dan Caspase-3 menggunakan ELISA	43
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian.....	44
4.7. Analisa Data	44
4.8. Alur Penelitian.....	45
BAB V.....	46
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
5.1. Hasil Penelitian.....	46
5.1.1. Profil fitokimia tapak dara.....	46
5.1.2. Efek Pemberian tapak dara terhadap kadar Interleukin-6.....	47
5.1.3. Efek pemberian ekstrak tapak dara terhadap kadar caspase 3.....	48
5.2. Pembahasan	50
5.3. Kelemahan Penelitian	52
BAB VI.....	53
KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
6.1. Kesimpulan	53
6.2. Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran Kadmium dalam Apoptosis sel	10
Gambar 2.2.	Ekskresi Xenobiotik melalui Ginjal	21
Gambar 2.3.	Tanaman Tapak Dara	244
Gambar 2.4.	Struktur Kimia Kandungan Utama Tanaman Tapak Dara	26
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 Uji ELISA menunjukkan rasio tingkat kadar Interleukin-6 pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan	
Gambar 5.2	Hasil Uji ELISA menunjukkan rasio tingkat kadar caspase-3 pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan	



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	3
Tabel 5.1.	Data hasil penelitian kadar caspase-3 dan interleukin-6.....	47
Tabel 5.2.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD kadar Interleukin-6 antar kelompok perlakuan ...	48
Tabel 5.3.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD kadar Caspase-3 antar kelompok perlakuan	49



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>
IL-6	: <i>Interlukin-6</i>
IP	: <i>Intraperitoneal</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>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kadmium merupakan jenis logam berat yang memiliki nilai toksisitas yang tinggi setelah merkuri (Hg). Batas kandungan kadar kadmium dalam air limbah yang diperbolehkan berdasarkan Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor : KEP-51/MENLH/10/1995 tentang Baku Mutu Limbah Cair Bagi Kegiatan Industri yaitu 0.05 ppm. Kadmium termasuk ke dalam kategori logam berat tidak esensial, yaitu logam yang keberadaannya dalam tubuh manusia masih belum dapat diketahui manfaatnya bahkan dapat bersifat toksik, sehingga adanya logam kadmium perlu diketahui secara pasti adanya cemaran oleh logam kadmium terutama di perairan apabila kadar yang terlalu tinggi dapat memberikan dampak buruk bagi kesehatan.¹ Kadmium juga digunakan sebagai bahan utama atau tambahan materi dalam industri, antara lain industri elektroplating, industri baterai nikel-kadmium, industri bahan pelapis, industri bahan penstabil dalam industri plastik dan barang sintetis lainnya. Selain itu paparan kadmium dapat berasal dari makanan dan akan terakumulasi dalam jaringan seperti hati, ginjal, dan organ reproduksi.²

Keracunan kadmium dilaporkan terjadi di Jepang yang mengakibatkan penyakit lumbago yang dapat mengakibatkan kerusakan tulang, adapun target organ lainnya yaitu ginjal apabila kandungan mencapai 200 µg Cd/gram (berat basah) dalam *cortex* ginjal berakibat gagal ginjal hingga kematian. Populasi dengan faktor resiko terbesar pada wanita

pascamenopause yang kekurangan gizi, kekurangan vitamin D, dan kalsium. Selain itu didapatkan peningkatan penimbunan cadmium dalam tubuh pada usia 20-30 tahun.⁴

Akumulasi kadmium dalam tubuh berkontribusi terhadap stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan DNA sel sehingga memicu inflamasi yang ditandai dengan peningkatan sitokin inflamasi, termasuk Interleukin-6 dan berujung pada apoptosis sel.⁵ Cadmium masuk ke dalam tubuh berikatan dengan metalotionin membentuk ikatan Cd+Mt selanjutnya akan terdeposit di organ ginjal dan menginduksi terbentuknya radikal bebas sehingga mengakibatkan peroksidasi lipid yang dapat merusak stuktur organ ginjal.⁶

Kerusakan sel ginjal yang ditandai dengan adanya peningkatan ekspresi Caspase 3 sehingga dapat menurunkan fungsi ginjal yang ditandai terdapat proteinuria pada urin.⁸ Dalam penelitian terdahulu menyebutkan tanaman seperti tapak dara (*Catharantus roseus*) memiliki antioksidan tinggi sebagaimana terdapat dalam penelitian sebelumnya dilakukan uji DPPH dengan konsentrasi berbeda (200, 400, 600, 800, 1.000 µg), dari lima konsentrasi yang diuji 800µg memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.⁹

Namun demikian, peran Tapak dara dalam menghambat kerusakan ginjal akibat keracunan cadmium yang dilihat dari kadar Caspase 3 ginjal dan kadar Interleukin-6 masih belum dikaji.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan sebagai berikut : Apakah terdapat pengaruh pemberian

ekstrak Tapak dara terhadap kadar Caspase-3 dan kadar Interleukin-6 ginjal terhadap mencit yang terpapar kadmium ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tapak dara terhadap kadar Caspase-3 dan kadar Interleukin-6 ginjal pada mencit yang terpapar kadmium.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui kadar Caspase 3 organ ginjal dan kadar Interlukin-6 organ ginjal pada mencit BalB/C jantan normal
2. Mengetahui kadar Caspase 3 organ ginjal dan kadar Interlukin-6 organ ginjal pada mencit BalB/C jantan yang diinduksi kadmium
3. Mengetahui kadar Caspase 3 organ ginjal dan kadar Interlukin-6 organ ginjal pada mencit BalB/C jantan yang diinduksi kadmium dan diberi ekstrak tapak dara 500mg/kgBB
4. Mengetahui perbedaan kadar Caspase 3 organ ginjal dan kadar Interlukin-6 organ ginjal pada mencit BalB/C jantan yang diinduksi kadmium dan diberi ekstrak tapak dara 500mg/kgBB dan kelompok kontrol

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	<i>Paarakh et al., 2019</i> ⁹	<i>Catharanthus Roseus</i> Linn-A review	Ekstrak tapak dara	Aktivitas antikoksidan	Ekstrak tapak dara memiliki kadar anti

					oksidan tertinggi di konsentrasi 800 µg
2	Wang, <i>et al.</i> , 2021 ¹⁰	<i>Effect of Cadmium Exposure on The Imune System and Immunoregulation</i>	Kadmium	Apoptosis imun sel, peningkatan ROS dan stress oksidatif	Paparan cadmium dapat menginisiasi imun adaptif, menurunkan system imun dan menyebabkan penyakit kronis
3	Siidiqui, 2010 ¹¹	<i>Cadmium Induced renal toxicity in male rats, Rattus rattus</i>	Cadmium	Glomeruli, Renal Cortex, demaged of membrane, protein	Cadmium yang diberikan selama 30 hari mengakibatkan kerusakan pada ginjal subkronik.
4	Hashim <i>et al.</i> , 2018 ⁷	Bioremediation of Cadmium Induced Renal Toxicity in Rattus norvegicus by medicinal plant Catharanthus roseus	kadmium, Tapak dara	Ureum Kreatinin	Penurunan signifikan kadar ureum kreatinin terhadap tikus terpapar cadmium yang diberikan ekstrak tapak dara
5	Hashim <i>et al.</i> , 2022 ¹²	<i>Protective Effect Of Catharantus Roseus Extract on Cadmium-Induced Toxicity in Albino Rats : A Putative Mecanism of Detoxification</i>	Tapak dara	Toksisitas cadmium	Terjadi penurunan toksisitas pada tikus yang terpapar cadmium yang diberikan ekstrak tapak dara
6	Yin G, <i>et al.</i> , 2024 ⁵⁸	<i>Tim-3 deficiency aggravates cadmium nephrotoxicity via regulation of NF-KB signaling and Mitokondrial demage</i>	Kadmium	T cell Immunoglobul in domain and mucin domain 3 (Tim-3)	Kadmium yang diberikan Intraperitoneal 4,5mg/KgBB selama 5 hari merupakan dosis optimal dalam

menyebabkan gagal ginjal akut pada mencit.

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa beberapa penelitian terkait pengaruh pemberian ekstrak tapak dara atau pun senyawa aktif dalam tapak dara terhadap kerusakan ginjal. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak tapak dara mampu menaikkan kadar enzim antioksidan.¹² Diketahui pada penelitian sebelumnya tikus yang diberikan paparan kadmium akut 1 hari dan sub-akut 7 hari dengan dosis 8,8mg/kgBB dan 1,26mg/kgBB yang diberikan ekstrak tapak dara 500mg/kgBB menunjukkan bahwa terdapat penurunan signifikan pada hasil serum proteinuria, ureum dan kreatinin dibandingkan dengan tanpa perlakuan.⁷ Penelitian lain menunjukkan pemberian ekstrak tapak dara pada tikus memberikan perlindungan membrane sel dari kerusakan yang diakibatkan paparan kadmium dimana dikonfirmasi dengan penurunan konsentrasi MDA.¹² Dilaporkan dalam studi lain bahwa mencit yang diinduksi kadmium secara intraperitoneal dengan dosis 4,5 mg/kgBB dimana dilakukan uji selama 5hari menunjukkan terjadi kerusakan organ ginjal secara optimal dimana protein Tim-3 terjadi defisiensi memicu aktivasi NFkB sehinggaterjadi apoptosis sel.⁵⁸

Berdasarkan data tersebut peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak Tapak dara terhadap Kadar Caspase 3 dan kadar

Interleukin-6 Ginjal pada tikus yang terpapar Cadmium belum dilakukan, sehingga penelitian penelitian dengan “Pengaruh Ekstrak Tapak Dara Terhadap Kadar Caspase-3 dan Kadar Interleukin-6 pada Keracunan Kadmium (Studi Eksperimental *in vivo* Mencit BalB/C Jantan diinduksi Cadmium Clorida)” 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 Tapak dara terhadap Kadar Caspase 3 dan kadar Interleukin-6 ginjal pada tikus yang terpapar kadmium.

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 ekstrak tapak dara.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Caspase-3

2.1.1. Definisi dan Peran Caspase dalam Apoptosis

Caspases merupakan istilah dari keluarga protease sistein yang berfungsi sebagai efektor utama selama apoptosis berlangsung untuk pembongkaran sebagian besar struktur seluler secara proteolitik, termasuk sitoskeleton, cell junctions, mitokondria, retikulum endoplasma, Golgi, dan nukleus.¹³ Apoptosis merupakan bentuk kematian sel yang terprogram dimana menghilangkan sel-sel individu dalam suatu organisme untuk mempertahankan struktur keseluruhan jaringan di sekitarnya.^{14,15} Di antara keseluruhan protein yang terlibat didalam aktivasi dan apoptosis *execution*, protease atau *caspases* merupakan pendorong utama kematian sel apoptosis, membelah protein seluler yang sangat penting didalam *dismantling the dying cell*.¹⁶

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 kembali hingga menerima rangsangan kematian tertentu.¹⁷ Struktur utama *caspases* adalah prodomain *amino-terminal* dan domain protease *carboxy-terminal* yang mengandung *key catalytic cysteine residue*.¹⁶ *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 keseluruhan memiliki prodomain yang panjang dan serupa secara struktural.^{18,19} 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.²⁰

2.1.2. Definisi Caspase-3

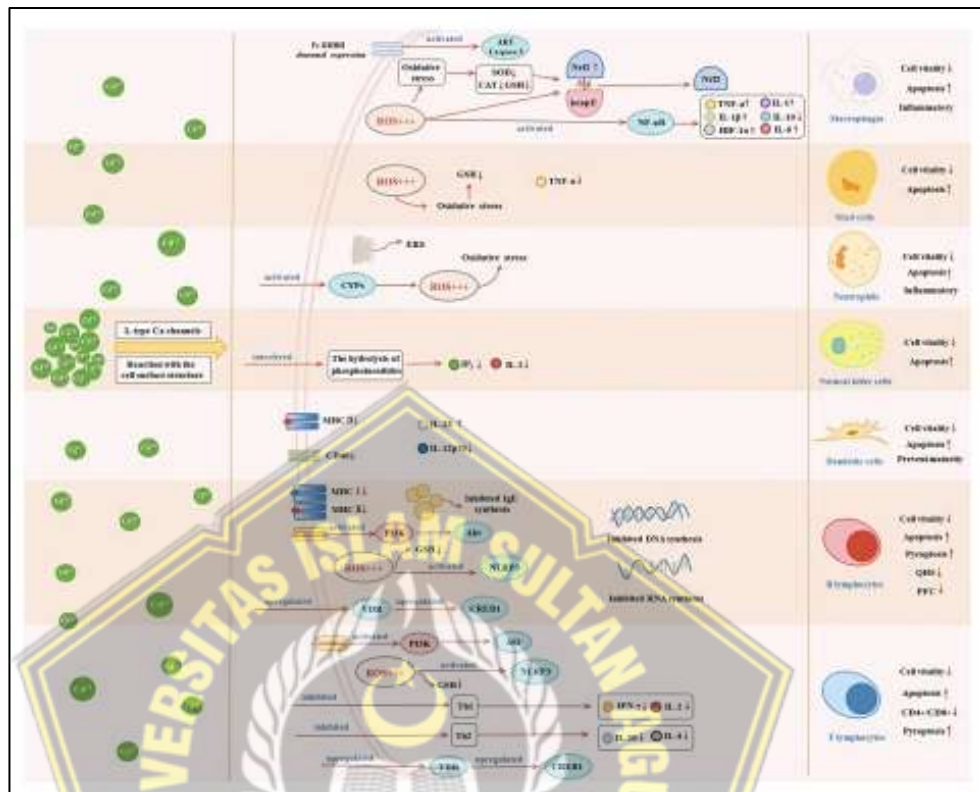
Caspase-3 merupakan protein yang relatif kecil terdiri dari 2 subunit, subunit 12- dan 17-kDa yang masing-masing mengandung 3 dan 5 fungsi tiol. Aktivasi caspase-3 tergantung pada dimerisasinya menjadi heterotetramer, di mana Cys-285 yang diaktifkan histidin di situs aktif subunit p17 *conserved* dalam superfamili caspase dan diperlukan untuk aktivitas enzimatis.²¹ 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.^{22,23} Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis *execution*.²³

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.²⁴ 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.^{25,26} Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1), menginduksi oligomerisasi APAF1 untuk membentuk apoptosom.^{27,28} 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.^{29,30} 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-8.³¹⁻³³ Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur pensinyalan tipe I atau jalur pensinyalan tipe II.³⁴ Dalam pensinyalan tipe I, Caspase-8 secara langsung memotong dan mengaktifkan Caspase-3 yang menyebabkan kematian sel.¹⁶ Dalam pensinyalan tipe II, Caspase-8 memotong *Caspase-8-cleaved* (BID) untuk mengaktifkan BAK dan BAX.³⁵ Protein ini kemudian menginduksi pembentukan *pore* di mitokondria yang mengarah ke aktivasi

kaskade caspase dan berpuncak pada aktivasi Caspase-3/ Caspase-7.²⁴



Gambar 2.1. Peran Cadmium dalam Apoptosis sel¹⁰

Cadmium dilaporkan meningkatkan respon inflamasi seperti stres oksidatif dengan menghasilkan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil dan peroksida lipid.¹⁰ Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi cadmium melibatkan ketidakseimbangan antara pembentukan dan penghilangan ROS dalam jaringan dan komponen seluler yang menyebabkan kerusakan pada membran, DNA, dan protein.¹⁰ Cadmium meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi oksida nitrat dengan pengurangan bersamaan dalam enzim antioksidan sebagai katalase dan superoksida dismutase. Menurut

Rumahlatu *et al.* (2014), telah dilaporkan bahwa cadmium menginduksi peningkatan signifikan dalam ekspresi caspase-3 yang menunjukkan bahwa cadmium menginduksi terjadinya apoptosis.⁴³

2.2. Interleukin-6

2.2.1. Definisi Interleukin-6

Interleukin-6 adalah sitokin yang disekresi dari jaringan tubuh ke dalam plasma darah, terutama dalam fase infeksi akut atau kronis, dan menginduksi respon peradangan transkriptis melalui penerap IL-6 RA, menginduksi maturas sel B, IL-6 manusia terdiri dari 212 asam amino, termasuk 28-asam amino peptida, dan gen nya telah dipetakan ke kromosom 7p21. IL-6 merupakan mediator larut dengan pleiotropic feel pada peradangan, respon imun, dan hematopoiesis. IL-6 akan diidentifikasi sebagai limfokin turunan sel T yang dapat menginduksi pematangan akhir sel B menjadi sel penghasil antibodi.^{37,38}

2.2.2. Peran IL-6 dalam inflamasi

Respon inflamasi merupakan reaksi sistemik terhadap infeksi, atau cedera ringan, yang ditandai dengan leukositosis, demam, peningkatan permeabilitas vaskuler, perubahan konsentrasi logam plasma dan steroid, serta peningkatan kadar protein fase akut.³⁹ Produk protein fase akut oleh hepatosit diatur oleh beberapa factor terlarut, seperti IL-1, *tumor nekrosis factor* (TNF) dan *hepatocyte stimulating factor* (HSF).⁴⁰ Diantara faktor-faktor ini hanya HSF yang dapat menginduksi protein fase akut penuh. Telah ditunjukkan bahwa IL-6 rekombinan dapat berfungsi HSF. IL-6 dapat

menginduksi berbagai protein fase akut, seperti fibrinogen, 1-antichymotripsin, 1-acid glycoprotein, dan haptoglobin, dalam *cell line*, hepatoma manusia. Selain itu, IL-6 menginduksi plasma amyloid A, protein reaktif C, dan 1-antitripsin dalam hepatosit primer manusia. Pada tikus, IL-6 menginduksi fibrinogen, inhibitor proteinase sistein, dan α 2-makroglobulin. Albumin plasma diatur secara negative oleh IL-6.^{41,42}

Fase akut protein pada manusia, yang paling diinduksi, termasuk di dalamnya protein C-reaktif (CRP), plasma amyloid A (SAA), fibrinogen dan haptoglobin. Secara fungsional, beberapa fase akut protein merupakan komponen sistem komplemen dan kaskade koagulasi. Protein fase akut lainnya adalah protease inhibitor, protein transport atau peserta dalam respon inflamasi, seperti fosfolipase A₂ yang disekresikan. Seperti telah disebutkan, penginduksi utama protein fase akut ginjal adalah sitokin IL-6, yang disekresikan oleh neutrofil, monosit, dan makrofag pada stimulasi TLR. Sel myeloid yang teraktivasi selain melepaskan sitokin inflamasi IL-1 dan TNF- α , yang dapat menyebabkan produksi besar-besaran dan sekresi IL-6 dari sel lain seperti sel endotel dan fibroblast sehingga berfungsi sebagai feed forward loop positive. Menariknya, pada tikus knockout IL-6, respon fase akut sebagian besar dihambat pada injeksi terpentin, sedangkan hamper normal pada injeksi lipopolisakarida. Ini mungkin karena kompensasi oleh sitokin tipe IL-6 lainnya seperti interleukin-11, faktor penghambat

leukemia, oncostatin M, faktor neurotropic silia dan kardiotropin 1, yang telah ditunjukkan untuk menginduksi sintesis protein fase akut.

43,44

2.2.3. Faktor-faktor yang mempengaruhi Interleukin-6

Interleukin-6 adalah protein yang diproduksi oleh berbagai sel. IL-6 membantu mengatur respon imun sehingga kadar IL-6 berguna sebagai penanda aktivasi sistem kekebalan. IL-6 dapat meningkat ketika ada peradangan, infeksi akut maupun kronis, gangguan autoimun, penyakit kardiovaskular, dan beberapa jenis kanker.⁴²

2.3. Logam Berat Cadmium

2.3.1. Definisi dan Karakteristik Cadmium

Cadmium diketahui sebagai logam berat non esensial bagi tubuh, dalam kadar rendah dapat menyebabkan karsinogenik, teratogenik, dan mutagenik pada tiap sel makhluk hidup. Cadmium murni merupakan logam berwarna perak-putih, berkilau, dan sebagian besar khususnya ditemukan di alam, dimana cadmium dikombinasikan dengan klorin (Cadmium Clorida), dengan oksigeb (Cadmium Oksida), dengan belerang (Cadmium Sulfida). Cadmium oksida dalam ukuran partikel kecil di udara berbentuk asap, hasil peleburan, solder logam, atau proses industri suhu tinggi seperti produk sampingan dari peleburan seng. Selain itu cadmium digunakan sebagai komposisi cat warna, baterai, plastik, dan sebagai peredam neutron pembangkit tenaga nuklir.³¹

2.3.2. Prevalensi Keracunan Cadmium

Wabah itai-itai dilaporkan terjadi di Jepang pertama kali ditemukan pada area yang sangat tercemar di lembah sungai Jinzu, terletak di Prefektur Toyama, Jepang. Penyakit itai-itai menunjukkan gejala nefropati dan osteomalasia. Penyakit tersebut merupakan penyakit yang timbul akibat adanya kandungan kadmium dalam batas tinggi yang beredar didalam tubuh manusia. Dinas kesehatan setempat atau Public Welfare Office of Toyama (Dinas Kesejahteraan Masyarakat Toyama) mengidentifikasi adanya area yang tercemar oleh logam kadmium di tahun 1967, hampir 97 persen dari 132 penduduk dilaporkan meninggal dunia adalah akibat dari penyakit itai-itai. Kasus tersebut terjadi di saat Jepang secara massal memproduksi senjata untuk kebutuhan militer. Penambangan yang dilakukan Mitsui Mining and Smelting Co., Ltd secara tidak langsung berdampak pada pencemaran logam berat di sungai Jinzu. Disebutkan bahwa lonjakan kasus meninggalnya akibat penyakit itai-itai setelah mengonsumsi air dari sumber sungai Jinzu serta memakan beras yang diirigasi oleh sungai tersebut. Ditahun tersebut diidentifikasi adanya kandungan kadmium, seng, dan tembaga dari 34 area irigasi yang menggunakan sistem pengairan sungai Jinzu dan 16 area irigasi yang menggunakan sistem pengairan lainnya. Area pengairan sungai Jinzu dengan kandungan logam berat yang paling parah. 34 area persawahan padi di sekitar sungai Jinzu ditemukan 4,04 ppm kandungan logam berat dalam air yang memasuki area tersebut, 2,42 ppm kandungan logam berat di tengah area

persawahan, dan 2,24 ppm di area outlet irigasi. Sedangkan logam kadmium sendiri berkisar kurang dari 1,0 ppm di seluruh wilayah persawahan. Dalam jumlah besar padi yang diteliti konsentrasi kadmium beragam mulai dari 1,0 ppm hingga yang tertinggi mencapai 6,88 ppm. Penelitian tersebut menjadi titik terang bagaimana warga setempat teracuni logam berat kadmium, pada umumnya mereka mengkonsumsi padi hasil pertanian setempat.³⁰

Standar yang dikeluarkan oleh kementerian Lingkungan Hidup tahun 2010 bahwa standar baku mutu air limbah kawasan industri yang hanya diperbolehkan 0,1 mg/l dan standar kualitas air minum yang ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang menetapkan kandungan kadmium pada air minum kurang dari 0,003 mg/l.³⁰

2.3.3. Sumber Paparan Kadmium

Kandungan kadmium dalam kerak bumi memiliki jumlah yang relatif kecil (sekitar 0,15-0,2 µg/g), kandungan kadmium dalam tanah dapat meningkat karena suatu proses alamiah seperti peristiwa bencana alam seperti gunung meletus dan dapat dipengaruhi oleh ulah manusia sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan serta proses pemupukan lahan pertanian yang berlebihan. Kadmium banyak digunakan untuk pelapisan logam, yang mutunya lebih baik dibandingkan dengan pelapis seng. Proses dilakukan dengan cara elektrolisis, pencelupan atau penyemprotan. Dari proses tersebut kemungkinan akan terbuang kadmium ke dalam alam lingkungan dan terbawa melalui air, dan udara, sehingga menyebar luas ke

daerah pertanian dan permukiman, sehingga berpengaruh terhadap kehidupan tanaman, hewan maupun manusia melalui rantai pakan.³⁰

2.3.4. Toksikokinetika Kadmium pada Tubuh

Kadmium masuk ke dalam saluran pencernaan melalui makanan dan minuman yang tercemar dan juga dapat melalui saluran pernafasan melalui partikel debu yang tercemar. Kadmium kemudian diabsorpsi dan dialirkan didalam darah selanjutnya didistribusikan ke dalam jaringan. Dalam jaringan, kadmium dapat terikat dengan beberapa macam bentuk molekul yaitu protein (metallothionein), enzim (metaloenzim), fosfolipida, purine, dan porfirin. Absorpsi kadmium dari saluran pencernaan sangat mungkin terjadi bila hewan menderita defisiensi zat besi atau defisiensi seng. Kadmium yang masuk melalui saluran pencernaan diabsorpsi sekitar 3-8 persen dari total kadmium yang masuk kedalam saluran cerna. Dalam usus kadmium menempel pada dinding usus sehingga diduga sel epitel akan terkelupas dan sebagian kadmium ikut keluar dari dalam tubuh. Proses inhalasi kadmium memiliki kemungkinan lebih kecil pada hewan dan manusia, akan tetapi dapat juga muncul pada perokok berat, dan absorpsi kadmium melalui paru-paru jauh lebih besar jika dibandingkan dengan absorpsi melalui saluran pencernaan yaitu sekitar 25-50 persen. Dua organ penting lainnya yang dapat mengakumulasi logam kadmium ialah hati dan ginjal, organ tersebut merupakan organ yang berperan besar dalam terakumulasinya logam kadmium dalam tubuh yang jumlahnya dapat mencapai 50 persen

dari total kadmium dalam tubuh . Kadmium yang terakumulasi dalam jaringan akan dimetabolisme secara lambat untuk dilepas kembali dan mengalami waktu paruh dalam jaringan (*biological halflife*) sampai dengan kurun waktu 5-10 tahun dalam sel hati dan 16-33 tahun dalam ginjal. Keracunan kadmium yang kronis dapat menyebabkan penurunan fungsi ginjal karena kadmium bersama dengan kalsium dibuang melalui ginjal pada proses dekalsifikasi. Kadmium yang terakumulasi dalam ginjal menyebabkan rusaknya sel epitel dari tubulus ginjal terutama bagian korteks ginjal. Ginjal dapat mengalami kegagalan fungsinya, menyebabkan organ tersebut tidak dapat menyaring molekul yang besar, sebagai akibatnya timbul gejala proteinuria, glikosuria, asiduria dan kalsiuria. Beberapa macam enzim yang mengikat logam bekerja sebagai katalisator untuk aktivitas kerja enzim yang bersangkutan, di mana logam yang paling banyak terlibat dalam aktivitas enzim ialah seng (Zn). Adanya kadmium yang berlebihan akibat kontaminasi kadmium dalam makanan maka kadmium dalam jaringan meningkat sehingga seng akan berinteraksi dengan kadmium, akibatnya kedudukan seng yang terikat enzim dapat digeser oleh kadmium yang mengakibatkan enzim tidak berfungsi normal.¹⁰

Proses yang terjadi pada peristiwa penyakit itai-itai yaitu peristiwa keroposnya tulang karena keracunan kadmium secara kronis. Pada peristiwa tersebut kadmium menghambat absorpsi kalsium di dalam saluran pencernaan. Kadmium dapat merusak sel

epithel usus dan juga merusak reseptor vitamin D, sehingga menurunkan daya absorpsi kalsium. Hal tersebut dapat dicegah dengan pemberian kalsium dosis tinggi pada pakan sehingga dapat mencegah kerusakan sel epithel usus oleh toksisitas kadmium, di samping itu kalsium berkompetisi dengan kadmium sehingga absorpsi kadmium menurun. Beberapa bukti menunjukkan interaksi antara kadmium dengan logam esensial seperti Fe yang berakibat pada anemia, maupun Cu dan Se juga dilaporkan menghambat proses metabolisme logam esensial tersebut.³⁰

Keracunan logam berat kadmium apabila masuk kedalam organ tubuh seperti ginjal menjadi salah satu organ target yang mengalami kerusakan sel. Terjadi reaksi inflamasi dan kerusakan mitokondrial. Immunoglobulin sel T domain dan mucin domain 3 (Tim-3) adalah protein esensial yang rilis akibat respon inflamasi. Dilaporkan dalam studi (Yin, Guanyi, et.,al. 2024) bahwa mencit yang diinduksi kadmium secara intraperitoneal dengan variasi dosis 1,5 mg/kgBB, 3 mg/kgBB, dan 4,5 mg/kgBB dimana dilakukan uji selama 0, 3, 5, 7 hari menunjukkan terjadi kerusakan organ ginjal secara optimal pada dosis kadmium 4,5mg/kgBB selama 5 hari, dimana protein Tim-3 terjadi defisiensi memicu aktivasi NFkB sehingga terjadi apoptosis sel.⁵⁸

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.^{45,46}

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. 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.^{46,47,48}

Aktivitas antioksidan vitamin E bergantung pada gugus hidroksil pada cincin kromanol, yang dapat menyumbangkan hidrogen untuk mengurangi radikal bebas. 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.^{46,47,49}

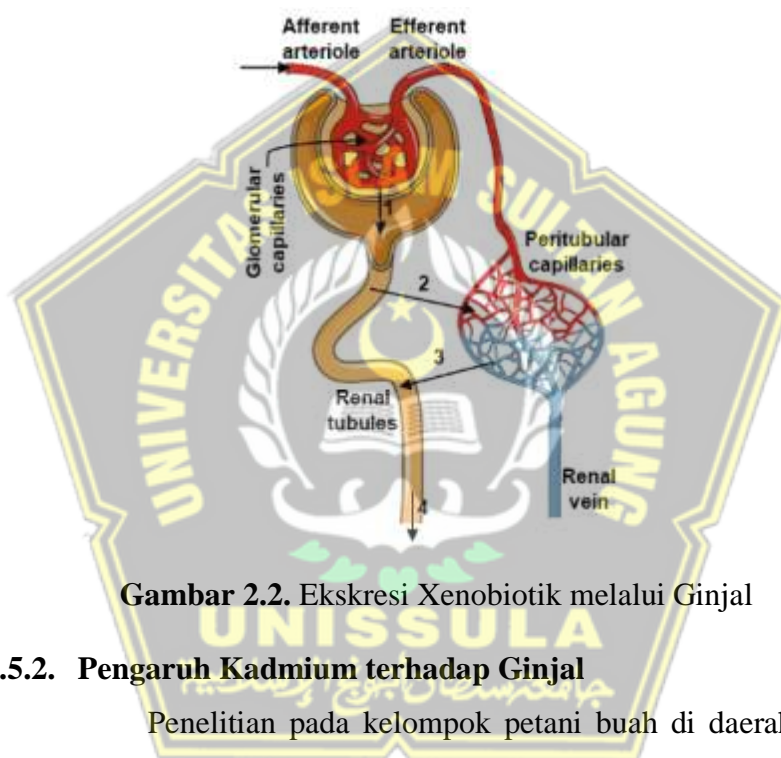
2.5. Toksikodinamika dan Toksikokinetika Kadmium pada Ginjal

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 kolektifus. Ginjal merupakan pusat homeostasis yang mengatur tekanan darah, air, natrium, kalium, keasaman, mineral tulang, dan hemoglobin. Akan tetapi, fungsi utama ginjal yaitu organ ekskresi *waste products* pada metabolisme dalam urin.⁵⁰

Ginjal adalah organ ekskresi yang bertanggung jawab untuk ekskresi berbagai senyawa utuh dan/atau produk metabolisme dari sirkulasi. Dalam proses ini, dua langkah terjadi, yaitu filtrasi glomerulus tempat asal ultrafiltrat dan sekresi tubulus. Di dalam glomerulus darah disaring, kemudian masuk melalui arteriol aferen dan keluar melalui arteriol eferen. Fungsi ginjal dapat dinilai dengan menentukan laju filtrasi glomerulus. 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.^{51,52} 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.⁵³



Gambar 2.2. Ekskresi Xenobiotik melalui Ginjal

2.5.2. Pengaruh Kadmium terhadap Ginjal

Penelitian pada kelompok petani buah di daerah Maesot di Thailand juga ditemukan bahwa petani di daerah tersebut terpapar kadmium dan mengalami penurunan fungsi ginjal. Penurunan fungsi ginjal ditandai dengan peningkatan kadar proteinuria, β 2-microglobulin, hipokalemia, peningkatan ekskresi fosfat, dan penurunan laju filtrasi glomerulus (GFR). β 2 mikroglobulin merupakan polipeptida dengan berat molekul 11.8 kDa, banyak dijumpai pada permukaan sel berinti pada manusia

dan merupakan bagian dari sistem Human Leucocyte Antigen (HLA) dan merupakan parameter untuk deteksi dini pada gangguan fungsi ginjal. Kadar β 2- M akan semakin meningkat apabila terjadi penurunan laju filtrasi pada ginjal.²⁷ Paparan kadmium akan menyebabkan kerusakan membran tubulus proksimal ginjal termasuk penurunan fluiditas dan kerusakan protein membrane serta perubahan homeostatis kalsium, karena kalsium dan cadmium bersifat antagonistik. Disfungsi organ ginjal menyebabkan penghambatan reabsorpsi garam, pengurangan reabsorpsi air sehingga terjadi peningkatan volume urine dan peningkatan jumlah protein urin (proteinuria). Proteinuria dapat dideteksi melalui peningkatan protein bermolekul rendah seperti β 2 Mikroglobulin, Retinol Binding Protein dan N-asetil- β -D Glukosaminidase (NAG). Jika paparan kadmium terus berlanjut, disfungsi tubular akan semakin berat dan menyebabkan kerusakan glomerulus sehingga terjadi peningkatan kadar β 2-M disertai dengan penurunan Laju Filtrasi Glomerulus.¹⁰

2.6. Tapak Dara

2.6.1. Morfologi dan Habitat Tanaman Tapak Dara

Tapak dara (*Catharanthus roseus*) merupakan tumbuhan yang berasal dari Amerika tengah, umumnya ditanam sebagai tanaman hias. Tumbuhan ini memiliki nama yang beraneka ragam dari berbagai daerah seperti : Tapak dara (Indonesia), Perwinkle (Inggris), Chang Chun Hua (Cina), Keminting Cina dan Rumpit

Jalang (Malaysia). Tapak dara dapat tumbuh di tempat terbuka dengan berbagai macam iklim, serta ditemukan dengan mudah di dataran rendah hingga ketinggian 800 m dpl.⁵⁴

Habitat tapak dara berupa tumbuhan semak, termasuk tumbuhan tahunan, tingginya sekitar 1-2 m, memiliki batang berkayu, bulat, bercabang, beruas-ruas dan berwarna hijau. Daun tapak dara tergolong daun tunggal dengan letaknya silang berhadapan, mempunyai morfologi bulat telur dengan ujungnya terdapat getah dan pangkal tumpul, tepi rata, mengkilat, memiliki tangkai dengan panjang 2-6 cm, lebar daun 1-3 cm, pertulangan menyirip, dan berwarna hijau. Bunga tapak dara ialah jenis bunga tunggal, terletak di ketiak daun, memiliki mahkota berbentuk terompet, panjang tangkai 2,5-3 cm, memiliki kelopak bertajuk lima, berbentuk runcing, benang sari berjumlah lima, kepala sari berwarna kuning, dan tangkai putik putih. Buahnya kotak dengan bentuk pipih, ketika masih muda berwarna hijau setelah tua maka akan berwarna coklat.⁵⁵

2.6.2. Klasifikasi Tanaman Tapak Dara

Menurut Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan klasifikasi taksonomi tanaman tapak dara adalah sebagai berikut :³²

- Divisi : *Plantae*
- Sub Kingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)

Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Gentianales
Famili : Apocynaceae
Genus : *Catharanthus*
Spesies : *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

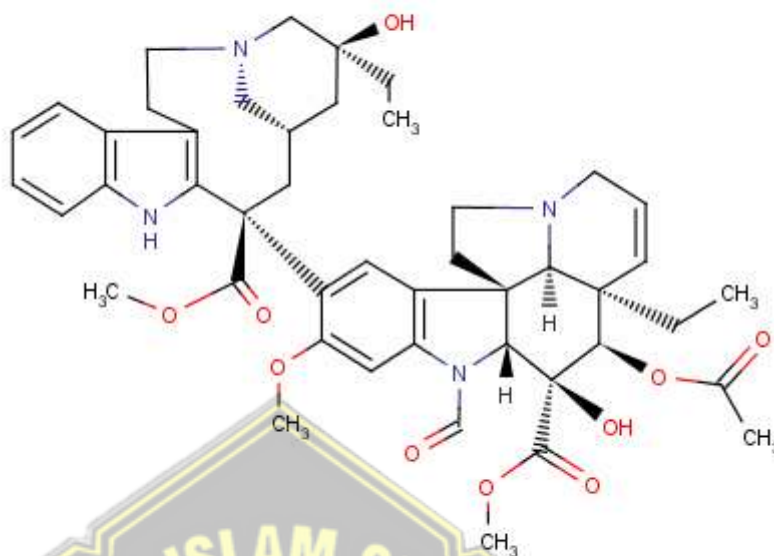


Gambar 2.3. Tanaman Tapak Dara (*Catharanthus roseus*).

2.6.3. Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Tapak Dara

Tapak dara memiliki suatu senyawa yang diduga dapat mengobati kanker (antikanker) idealnya dapat segera membunuh sel kanker tanpa efek samping seperti merusak jaringan normal, namun hingga kini belum ada obat kanker dengan kriteria tersebut. Selain efek tersebut, justru terdapat efek samping yang dirasakan seperti harga obat-obatan tersebut juga mahal sehingga bagi sebagian masyarakat sulit dijangkau. Upaya untuk mengatasi penyakit kanker dengan obat-obatan tradisional semakin marak dilakukan karena biaya yang ekonomis, mudah didapat dan memiliki efek samping yang relatif kecil.⁵⁴ Umumnya pemanfaatan tapak dara digunakan sebagai obat pereda nyeri otot, obat depresi, obat sistem saraf pusat, obat mengurangi efek bengkak yang ditimbulkan akibat sengatan tawon, obat mimisan, obat gusi berdarah, obat bisul, dan obat untuk sakit tenggorokan serta obat penurun tekanan darah.

Berbagai macam pemanfaatan tersebut disebabkan oleh metabolit sekunder yang dihasilkan tapak dara yaitu alkaloid.⁵⁵ Daun tapak dara dilaporkan mengandung lebih dari 70 jenis alkaloid, diantaranya ialah vinkristin dan vinblastin. Alkaloid memiliki rasa yang pahit dan dingin. Saat ini penggunaan tapak dara diteliti lebih lanjut sebagai obat antikanker. Komponen aktif antikanker yang dihasilkan ialah vinkristin dan vinblastin. Kedua senyawa tersebut dapat menghambat sel kanker pada tahap metafase atau mitosis kemudian dapat menghambat sintesis purin, DNA, RNA yang terdapat pada sel kanker, sehingga proliferasinya dapat dihambat. Proses molekuler penghambatan kanker dilakukan dengan cara menghambat sintesis DNA. Replikasi DNA terjadi apabila adanya sintesis rantai nukleotida yang baru. Proses ini berlangsung apabila tersedianya komplementasi pasangan basa (purin dan pirimidin) untuk menghasilkan cetakan baru. Oleh karena itu dengan terhambatnya sintesis purin maka proses replikasi DNA sel kanker tidak terjadi, sehingga dapat menghambat proliferasi sel kanker. Meskipun kedua senyawa tersebut dapat menghambat kanker, namun vinkristin mempunyai efek antikanker yang lebih tinggi daripada vinblastin, dan senyawa ini dapat menghambat *ridgeway osteosarcoma*, *mecca lymphosarcoma*, dan *x5563 myeloma*. Ekstrak tapak dara menggunakan air dan alkohol dapat menghambat pertumbuhan *sarcoma 180* dengan tingkat keberhasilan 95,7%.⁵⁶



Gambar 2.3. Struktur Kimia Vinkristin

Senyawa ini bersifat sebagai antineoplasma. Cara kerjanya ialah vinkristin berikatan dengan tubulin kemudian menginhibisi formasi mikrotubula. Oleh karena itu, proses metafase sel dapat terhenti dengan cara mengganggu formasi mitotic spindle, spesifiknya terdapat pada fase S (Sintesis) dan M (Mitosis). Cara lain yang dilakukan vinkristin untuk menghambat kanker ialah menghalangi sintesis asam nukleat dan protein dengan pemblokkan pada penggunaan asam glutamat. Vinkristin dimetabolisme di hati oleh enzim CYP3A4. Interaksi antara vinkristin dan mikrotubula terletak pada permukaan longitudinal dua tubulin yang heterodimer lalu tergantung dengan GTP binding site (E-site). Interaksi ini menjelaskan tentang bagaimana vinkristin menghambat hidrolisis

GTP. Sisa α tubulin digunakan sebagai katalisator untuk pembelahan β -fosfodiester yang terhubung dengan molekul GTP dan terikat oleh subunit β tubulin yang lokasinya bersebelahan. Struktur yang melengkung dapat menginduksi tubulin menjadi agregat yang berbentuk spiral sehingga merusak polimerasi mikrotubula.⁵⁶

2.6.4. Pengaruh Tanaman Tapak Dara terhadap Radikal Bebas

Paraakh *et al.* (2019), menyebutkan tanaman seperti tapak dara (*Catharantus roseus*) memiliki antioksidan tinggi sebagaimana terdapat dalam penelitian sebelumnya dilakukan uji DPPH dengan konsentrasi berbeda (200, 400, 600, 800, 1.000 μg), dari lima konsentrasi yang diuji 800 μg memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.⁹

2.6.5. Pengaruh Tanaman Tapak Dara terhadap Caspase 3

Tanaman tapak dara merupakan tanaman yang dengan 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, pinocembrin, gossypin, dan baicalin yang dapat melindungi ginjal terhadap kerusakan oksidatif ginjal yang diinduksi kadmium pada tikus. Nefrotoksisitas dapat dikurangi dengan pre-treatment dengan luteolin melalui peningkatan level oksidan ginjal dan pengurangan aktivasi NF-kB dan faktor

inflamasi serta apoptosis. 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.⁵⁷

Penelitian Hashim *et al.* (2022) menunjukkan bahwa senyawa Luteolin yang merupakan salah satu senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak tapak dara 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. Apoptosis atau kematian sel terprogram terlibat dalam homeostasis jaringan melalui eliminasi sel yang ditargetkan tanpa mengganggu fungsi fisiologis normal jaringan.¹²

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

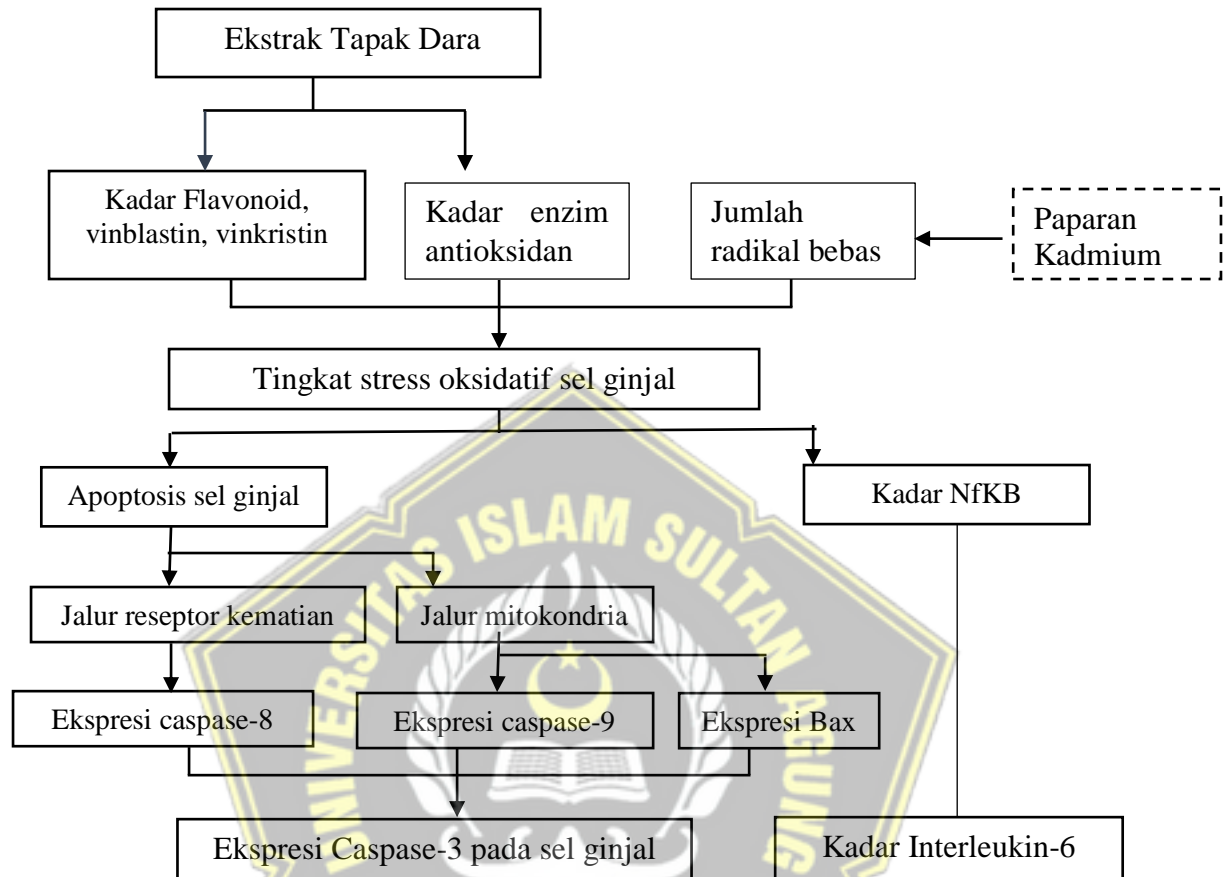
3.1. Kerangka Teori

Sehubungan dengan mekanisme keracunan kadmium, paparan kadmium pada jaringan ginjal menghasilkan pembentukan ROS yang secara langsung menginduksi kerusakan aktivasi NF-kB yang berperan dalam stimulasi sintesis protein pro-inflamasi, termasuk Interleukin-6. Produksi Interleukin-6 secara terus menerus akibat paparan kadmium 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 dengan adanya peningkatan ekspresi caspase-3 dan kadar interleukin-6.

Tapak dara diketahui mengandung beberapa zat aktif penting Alkaloids 0.74 sampai 0.82% seperti vinkristin, vinblastin, catharanthamine, vincoline 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 Interleukin-6 yang berujung pada penekanan ekspresi Caspase 3.

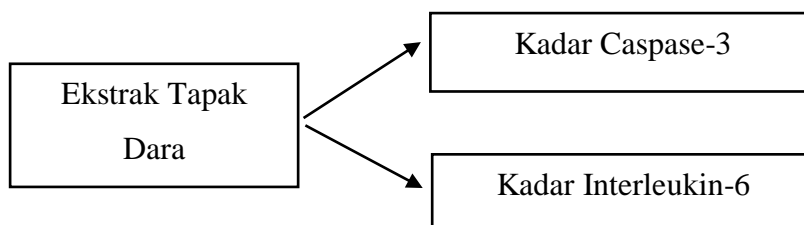
Selain itu Antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang dapat memblokir jalur interleukin-6. Pemblokkan interleukin-6 oleh Nrf2 dapat mencegah terjadinya induksi caspase 3 sel pada jaringan ginjal sehingga fungsi ginjal

terjaga yang ditandai dengan penurunan interleukin-6. 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 Tapak dara terhadap Kadar Caspase 3 dan kadar Interleukin-6 ginjal pada mencit yang terpapar kadmium.

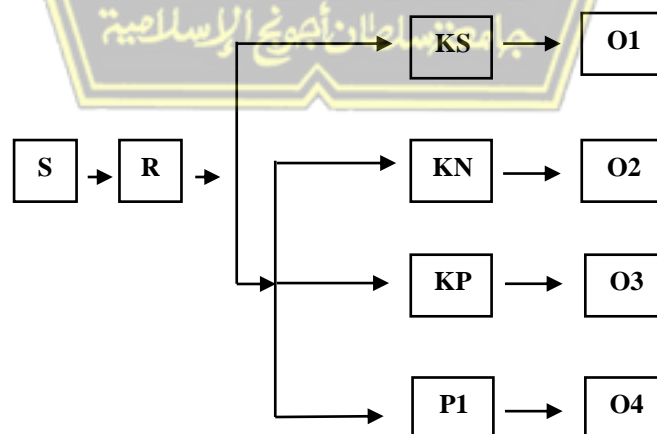


BAB IV METODE PENELITIAN

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 mencit Balb/C jantan dengan bobot badan 20-30 gram. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Kontrol Sehat (mencit sehat tanpa paparan Kadmium dan diberi pakan standar),
2. Kontrol Negatif (mencit diberi paparan Kadmium IP 4,5 mg/kgBB/hari dan diberi pakan standar),
3. Kontrol Positif (mencit diberi paparan Kadmium IP 4,5 mg /kgBB/hari dan diberikan vitamin E 50 IU serta pakan standar).
4. Perlakuan (mencit diberi paparan Kadmium IP 4,5 mg /kgBB/hari dan ekstrak tapak dara 500mg/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 tapak dara

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah kadar Caspase 3 dan kadar Interleukin-6

4.2.2. Definisi Operasional

a. Ekstrak Tapak Dara

Ekstrak tapak dara dalam penelitian ini adalah ekstrak daun dan bunga tapak dara yang berasal dari laboratorium Stem Cell Center Research Semarang Jawa Tengah dan berusia antara 3-4 bulan yang diekstrak menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan oral dengan diencerkan menggunakan aquabides dengan dosis 500 mg/kgBB. Satuan ekstrak tapak dara menggunakan satuan milligram (mg) dan skala rasio.

b. Kadar Interleukin-6

Interleukin-6 yang dianalisis dari sampel jaringan ginjal pada hari ke-6 setelah 5 hari pemberian perlakuan. Kadar Interleukin-6 dianalisis dengan ELISA dengan satuan picogram (pg/ml) dan skala rasio.

c. Kadar Caspase 3

Kadar Caspase 3 ginjal dianalisis dari sampel jaringan ginjal pada hari ke-6 setelah 5 hari pemberian perlakuan. Kadar

Interleukin-6 dianalisis dengan ELISA dengan satuan picogram (pg/ml) dan skala rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BalB/C jantan berusia 1-2 bulan dengan bobot badan 20-30 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Mencit BalB/C jantan
2. Umur 2-3 bulan.
3. Mencit sehat
4. Berat badan 20-30 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Mencit yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah mencit mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Mencit BalB/C jantan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Kontrol Sehat (mencit sehat), Kontrol Negatif (mencit model paparan kadmium IP yang tidak diberi perlakuan), Kontrol Positif (mencit model paparan Kadmium yang diberi Vitamin E dosis 50 IU/kgBB), Perlakuan (mencit model paparan kadmium yang diberi ekstrak tapak dara secara oral dosis 500 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. 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, spuit 1 cc, 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, *coated desk glass*, *cover glass*, ELISA kit Caspase-3, ELISA kit IL-6 dan laptop dengan RAM 2GB.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri kadmium, water for injection, ekstrak tapak dara, aquades, etanol, 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 Tapak Dara

Pembuatan ekstrak tapak dara dilakukan di unit pelaksana teknis terpadu laboratorium SCCR Semarang dengan cara tapak dara 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 tapak dara ditentukan sebelum penelitian dengan studi literatur. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa pemberian 500 mg/kgBB/hari ekstrak tapak dara secara oral

melindungi fungsi ginjal. Oleh karena itu penelitian ini menggunakan dosis 500 mg/kg/BB/hari.

4.5.4. Pembuatan Paparan Kadmium dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Mencit diadaptasi selama 1 minggu setelah sampai di tempat penelitian
2. Mencit diinduksi kadmium dengan injeksi peritoneal (IP) dengan dosis 4,5 mg/kg BB yang dilarutkan dalam water for injection pada kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan.
3. Mencit pada perlakuan diberi sonde ekstrak tapak dara secara oral bersamaan dengan induksi kadmium dengan dosis 500 mg/kgBB (P) dan Vitamin E dosis 50 IU/kgBB (KP).
4. Tikus Kontrol Negatif tidak diberikan perlakuan ekstrak tapak dara 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. Sampel ginjal diambil dan dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer kemudian disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 1000 g. Supernatan diambil dan disimpan dalam suhu -20°C hingga proses analisis.

4.5.6. Analisis Kadar Interleukin-6 dan Caspase-3 menggunakan ELISA

1. Periksa kadar IL-6 dan Caspase 3 menggunakan ELISA adalah sebagai berikut
 - a. Pembuatan Standar: Persiapan standar yang mengandung kadar yang diketahui dari IL-6 dan Caspase 3 untuk membuat kurva standar.
 - b. Blocking (Blokir): Tahap untuk mencegah ikatan nonspecific dengan menutup sisa-sisa area kosong pada mikrotiter plate.
 - c. Pemberian Sampel dan Kontrol: Penambahan sampel (serum, plasma, atau supernatan sel) yang akan diuji, serta kontrol positif dan negatif.
 - d. Inkubasi: Inkubasi plate sehingga IL-6 dan Caspase 3 dari sampel dan standar tertangkap oleh antibodi yang terdapat pada plate.
 - e. Cucian (Washing): Membersihkan mikrotiter plate dari zat-zat yang tidak terikat.
 - f. Pemberian Antibodi Deteksi (Detection Antibody): Menambahkan antibodi deteksi spesifik terhadap IL-6 dan Caspase 3 yang terikat pada target.
 - g. Penambahan Enzim Konjugat: Menambahkan enzim yang terikat pada antibodi deteksi.

- h. Pemberian Substrat: Penambahan substrat enzimatis yang akan menghasilkan sinyal berwarna.
- i. Pemberhentian Reaksi dan Pembacaan: Reaksi dihentikan dan intensitas warna diukur dengan spektrofotometer.
- j. Analisis Data: Hasil absorbansi diplot pada kurva standar untuk menentukan kadar IL-6 dan Caspase 3 dalam sampel.

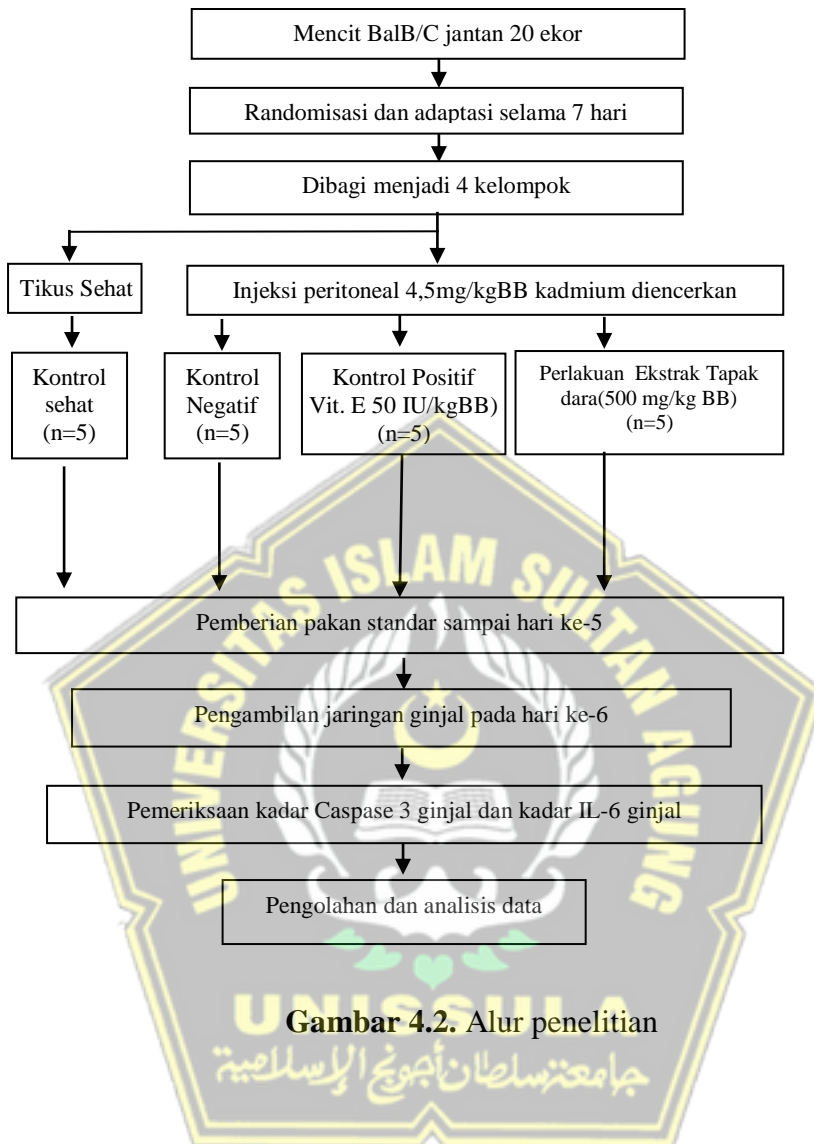
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Stem Cell Cancer and Research (SCCR), Semarang. Penelitian rencana akan dilakukan pada bulan Februari 2024.

4.7. Analisa Data

Data Kadar Interleukin-6 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 untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 29.0. 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 Februari 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang. Subjek penelitian ini adalah mencit BalB/C jantan dengan berat 20–30 gram dan berumur 1-2 bulan. Penelitian ini menggunakan 20 ekor hewan model dan tidak ada yang eksklusi 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 kadmium 4,5 mg/kgBB/hari secara injeksi intraperitoneal (IP) selama 5 hari, kelompok kontrol positif yang mendapatkan induksi kadmium dan vitamin E dosis 50 IU secara peroral selama 5 hari, dan kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor hewan uji yang mendapatkan pemberian cadmium intraperitoneal dosis 4,5 mg/kgBB/hari dan ekstrak tapak dara 500 mg/kgBB/hari selama 5 hari.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Profil fitokimia tapak dara

Sampel tapak dara yang digunakan pada penelitian ini menggunakan tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) yang ditanam dan diproses ekstraksi di laboratorium SCCR Semarang. Ekstrak tapak dara terbukti mengandung senyawa golongan alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, steroid dan glikosida. Pada penelitian ini akan dilakukan evaluasi aktivitas ekstrak tapak dara terhadap kadar caspase-3 dan kadar Interleukin-6 ginjal pada keracunan kadmium.

Tabel 5.1. Data hasil penelitian kadar caspase-3 dan interleukin-6

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	
Kadar Interleukin-6	46.8±2.88	115.1±5,85	43.0±3.27	59.4±17.9	
<i>Saphiro wilk</i>	0.207	0.500	0.451	0.421	
<i>Levene test</i>					
<i>One way Anova</i>					0.000
Kadar Caspase-3	37.6±9.57	271.3±14.2	249.8±24.4	247.1±4.9	
<i>Saphiro wilk</i>	0.413	0.136	0.065	0.156	
<i>Levene test</i>					
<i>One way Anova</i>					0.000

5.1.2. Efek Pemberian tapak dara terhadap kadar Interleukin-6

Kadar Interleukin-6 adalah satu jenis sitokin proinflamasi yang dieksresikan dan disekresikan oleh sel imun termasuk monosit, makrofag dan sel T. Pada penelitian ini diperoleh hasil kadar Interleukin-6 pada kelompok perlakuan lebih rendah (59.4±17.9) dari pada kontrol negatif (115.1±5.85), namun kadar Interleukin-6 pada kelompok kontrol positif (43.0±3.27) memiliki tren lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan (Gambar 5.1.).



Gambar 5.1. Hasil Uji ELISA menunjukkan rasio tingkat kadar Interleukin-6 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 kadar Interleukin-6 antar kelompok perlakuan

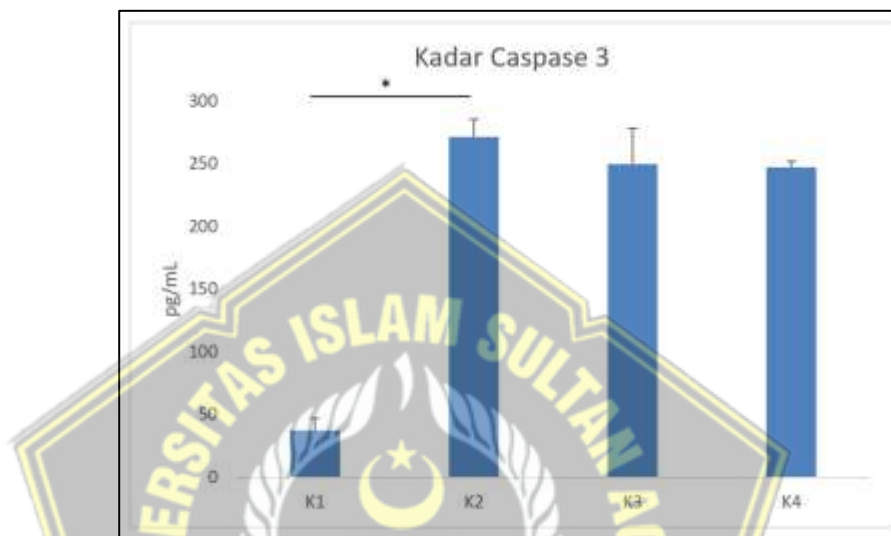
Kelompok	Kelompok perbandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0.000
	Kontrol positif	0.538
	Perlakuan	0.058
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.000
	Perlakuan	0.000
Kontrol positif	Perlakuan	0.017

Pada data deskriptif ekspresi gen Interleukin-6 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 tapak dara terhadap kadar 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. Apoptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang menghilangkan sel-sel individu dalam suatu organisme dalam mempertahankan struktur keseluruhan jaringan di sekitarnya.

Pada penelitian ini diperoleh hasil uji kadar caspase-3 pada kelompok perlakuan lebih rendah (247.1 ± 4.9) dari pada kontrol negatif (271.3 ± 0.23), namun kadar caspase-3 pada kelompok kontrol positif (249.8 ± 24.4) tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok perlakuan (Gambar 5.2.).



Gambar 5.2. Hasil Uji ELISA menunjukkan rasio tingkat kadar caspase-3 pada jaringan ginjal masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dan perlakuan $p < 0.05$ dan menunjukkan perbedaan tidak signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan $p > 0.05$.

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

Kelompok	Kelompok perbandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0.000
	Kontrol positif	0.000
	Perlakuan	0.000
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.039
	Perlakuan	0.017
Kontrol positif	Perlakuan	0.785

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian tapak dara 500mg/kgBB perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan kadar caspase 3 dibandingkan kontrol

negatif, namun pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif tidak berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tapak dara mampu menurunkan kadar caspase 3 jika dibandingkan dengan kondisi kelompok kontrol negative dengan paparan kadmium. Pada data deskriptif kadar caspase 3 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 pada gambar 5.2 dan tabel 5.3.

5.2. Pembahasan

Penelitian mengenai Ekstrak tapak dara terhadap kadar Caspase-3 ginjal dan kadar interleukin-6 ginjal ini menggunakan 20 ekor mencit BalB/C jantan yang dibagi 4 (empat) kelompok: K1 (kelompok sehat) dan K2-K4 mencit dengan model keracunan kadmium. Pembuatan keracunan kadmium dilakukan melalui pemberian paparan kadmium Intraperitoneal (IP) 4,5mg/kgBB/hari bersamaan pada K3 diberikan vitamin E 50IU/kgBB dan K4 diberikan ekstrak tapak dara 500mg/kgBB dengan lama perlakuan selama 5hari. Penelitian ini menggunakan mencit Balb/C jantan 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 tapak dara dalam menurunkan kadar Interleukin-6 serta menghambat apoptosis sel-sel ginjal yang ditandai dari penurunan kadar Caspase-3 ginjal pada mencit yang dipapar kadmium.

Penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak tapak dara secara signifikan menurunkan kadar Interleukin-6 dan ekspresi gen Caspase-3 ginjal yang terpapar kadmium dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak tapak dara melindungi ginjal tikus dari toksisitas kadmium melalui penghambat radikal bebas. Paparan kadmium akan mengakibatkan stress oksidatif dan akan mengaktifkan nfkb pathway, jalur tersebut secara langsung akan meningkatkan ekspresi sitokin pro inflamasi ,seperti Interleukin-6.

Peningkatan Interleukin-6 dapat mengaktifkan jalur pospatidil tri inositol (PI3K) melalui peningkatan ekspresi p53 yang meningkatkan ekspresi caspase 3 sehingga menginduksi apoptosis sel pada ginjal. Pada penelitian ini senyawa yang terkandung dalam ekstrak tapak dara seperti flavonoid terbukti sebagai anti oksidan sehingga dapat menurunkan proses peradangan dengan cara meningkatkan nrf2 sehingga menekan stress oksidatif.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak tapak dara memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar Interleukin-6 ginjal dan kadar caspase 3 ginjal mencit yang terpapar kadmium. Namun tidak lebih baik bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelamahan penelitian ini adalah ekstrak tapak dara tidak lebih baik dari pada vitamin E untuk menekan kadar Interleukin-6 ginjal dan kadar Caspase 3 ginjal mencit yang terpapar kadmium. Dalam penelitian ini untuk menilai *acute kidney injury* (AKI) peneliti melakukan pengukuran kadar Ureum kreatinin namun tidak pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan, kemudian peneliti tidak menilai pemeriksaan preparat histopatologi pada tubulus ginjal mencit.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak Tapak dara terhadap penurunan kadar Caspase 3 ginjal dan kadar Interleukin-6 ginjal pada mencit yang terpapar kadmium dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.
2. Terdapat perbedaan bermakna kadar Caspase 3 ginjal dan kadar Interleukin-6 ginjal pada mencit kelompok sehat dengan kelompok kontrol negatif
3. Tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap kadar Caspase 3 ginjal pada mencit yang diinduksi kadmium mendapatkan perlakuan ekstrak tapak dara dengan mencit yang diinduksi kadmium mendapatkan vitamin E.

6.2. Saran

Sebagai saran dari peneliti untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Dilakukan pengukuran kadar ureum kreatinin pada seluruh kelompok dan dilakukan pemeriksaan histopatologi preparat tubulus ginjal mencit untuk menilai faktor utama pengaruh keracunan kadmium terhadap apoptosis sel ginjal.
2. Waktu pemberian ekstrak tapak dara dengan hewan coba yang diinduksi kadmium dapat diperpanjang untuk menilai kerusakan ginjal kronis akibat lamanya paparan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sasongko, A., Yulianto, K., & Sarastr, D. Verifikasi Mode Penentuan Logam Kadmium (Cd) dalam Air Limbah Domestik dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom (2017). *Jurnal Sains dan Teknologi* Vol. 6 No.2 pp 228-237
2. Withgott, J. & Brennan S. *Environment : The Science Behind the Stories* (2007). San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings
3. Widowati, W., Sastiono, A., & Jusuf, R., (2008). *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Jakarta : Andi
4. Herman, D. Z. Tinjauan terhadap tailing mengandung unsur pencemar Arsen (As), Merkuri (Hg), Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) dari sisa pengolahan bijih logam (2006). *Jurnal Geologi Indonesia* Vol. 1 No. 1 pp 31-36
5. Paniagua, Lucero. et.al. Cadmium exposure induces interleukin-6 production via ROS-dependent activation of the ERK1/2 but independent of JNK signaling pathway in human placental JEG-3 trophoblast cells (2019). doi:10.1016/j.reprotox.2019.06.008
6. Winata SD. Monitoring, Pencegahan, dan Penanganan Keracunan pada Pekerja Terpapar Cadmium. *J Kesehatan Lingkung Indones*. 2016;13(2):45–50.
7. Hashim *et al*. Bioremediation of Cadmium Induced Renal Toxicity in *Rattus norvegicus* by medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Journal National Center of Biotechnology Information* (2018). doi:10.1016/j.sjbs.2018.09.009.
8. 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.
9. Paraakh, Padma *et al*. *Catharanthus roseus* linn A review. *Department of Pharmacognosy, The Oxford College of Pharmacy, Bengaluru* , 2019. doi: 10.31080/ASPS.2019.03.0393
10. Wang, Zineng *et al*. Effect of Cadmium Exposure on The Immune System and Immune regulation. *Journal frontiers in Immunology* (2021). doi : 10.3389/fimmu.2021.695484

11. Siddiqui, M. F. Cadmium Induced renal toxicity in Male Rats, *Rattus rattus*. Eastern Journal of Medicine 15 (2010) pp 93-96
12. Hashim, *et al.* . Protective Effect of Catharanthus roseus Extract on Cadmium - Induced Toxicity in Albino Rats : A Putative Mechanism of Detoxification. *Journal National Center of Biotechnology Information* (2022) doi: 10.3390/metabo12111059.
13. 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.
14. 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).
15. Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* (1999) doi:10.1038/sj.cdd.4400476.
16. 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.
17. 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.
18. Boatright, K. M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* (2003) doi:10.1016/S1097-2765(03)00051-0.
19. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2007) doi:10.1038/nrm2153.
20. Van Damme, P. *et al.* Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat. Methods* (2005) doi:10.1038/nmeth792.
21. 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.
22. 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.
23. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* (2007) doi:10.1080/01926230701320337.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
34. 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.
 35. Billen, L. P., Shamas-Din, A. & Andrews, D. W. Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene* (2008) doi:10.1038/onc.2009.47.
 36. Rumahlatu, D. Efek Logam Berat Kadmium Terhadap Apoptosis Melalui Aktivasi Protein Caspase-3 pada Bulu Babi *Diadema setosum* (2013). Jurnal Pendidikan Sains, Volume 1, Nomor 1 pp 44-51
 37. 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).
 38. Al-Attar, Atef M. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metal-induced renal and testicular injuries in male mice. *Journal National Center of Biotechnology Information* (2011) doi: 10.1016/j.sjbs.2010.10.004
 39. Raziyeva, K., *et.al.* Immunology of Accute and crhonic wound healing. *Biomolecules*. 2021
 40. Norris C. A. *et.,al.* Synthesys of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuly. *Plos One* 2014.
 41. Castell. JV, *et., al.* Recombinant human interleukin-6 (IL6/ BSF2/HSF) Regulates the synteshys of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 1988
 42. Ruckelr R, *et.al.,.* Air pollution nd inflamation (interleukin-6, C-Reactive protein, fibrinogen) in miocardial infaction survivors. *Environ Health Prespect* 2007
 43. Schmidt-Arras D, Rose John. Il-6 pathway in the liver : from physiopatology to therapy. *Jurnal of hepatology* 2016
 44. Hou X, *et.al.,.* Myloid cell-spesific IL-6 Signalling promote microRNA-223-enriched exosome production to attenoate NAFLD-Assosiated Fibrosis. *Hepatology* .2021.

45. 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)
46. 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
47. Keen MA and Hassan I. Vitamin E in Dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*. 2016, vol. 7: 311 - 315
48. 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
49. 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
50. Rayner, H., Thomas, M. & Milford, D. *Understanding kidney diseases*. (Springer, 2016).
51. Bunprajun, T., Yuajit, C., Noitem, R. & Chatsudthipong, V. Exhaustive exercise decreases renal organic anion transporter 3 function. *J. Physiol. Sci.* 69, 245–251 (2019).
52. 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).
53. Silva, R. et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol. & Ther.* 149, 1–123 (2015).
54. Kusumastuti, Ratih et al. Efek ekstrak kloroform daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L) G.Don) var. albus dan roseus Dlam Induksi Apoptosis berdasarkan Procaspase-3 pada sel HeLa. *Jurnal Kedokteran Universitas Gajah Mada*
55. Utami, et al Effects of Tapak Dara Leaves Extract on Kidney Histology of Aspartame-Induced Mice. *Biosfer : Jurnal Tadris Biologi* (2020) doi:

10.24042/biosfer

56. Ulpa, Maldipa et al. Karakteristik morfologi dan analisis kandungan senyawa fitokimia berbagai tapak dara (*Catharanthus roseus*). *Jurna MAhasiswa Agroteknologi*. 2022. e-ISSN: 2774-2741
57. 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.
58. Yin, Guanyi. *et.,al.* Tim-3 deficiency aggravates cadmium nephrotoxicity via regulation of NF-KB signaling and Mitokondrial damage (2024). *J International Immunopharmacology*. doi: 10.1016/j.imtimp.2023.111434

