

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI mRNA DAN PROTEIN DIHIDROLIPOAMIDE
DEHYDROGENASE (DLD) DAN *KIDNEY INJURY MOLECULE -1*
(KIM-1) PADA GINJAL TIKUS MODEL PADA FASE INISIASI
*ISCHEMIA REPERFUSION INJURY***

***ANALYSIS OF mRNA AND PROTEIN DIHIDROLIPOAMIDE
DEHYDROGENASE (DLD) AND KIDNEY INJURY MOLECULE-1 (KIM-
1) EXPRESSION IN A KIDNEY MODEL OF THE INITIATION PHASE
ISCHEMIA REPERFUSION INJURY***



JERNY DASE

C013171027

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

2022

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI mRNA DAN PROTEIN DIHIDROLIPOAMIDE
DEHYDROGENASE (DLD) DAN KIDNEY INJURY MOLECULE -1 (KIM-1)
PADA GINJAL TIKUS MODEL PADA FASE INISIASI
ISCHEMIA REPERFUSION INJURY**

Disusun dan diajukan oleh

**JERNY DASE
C0131071027**

*Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Ujian dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal 14 Juli 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui

Promotor



Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM, Sp.GK
NIP. 196805301996032001

Co Promotor



Dr. dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phil, DFM
NIP. 196704291992022002

Co Promotor



dr. Muh. Husni Cangara, S.Ked, DFM, Ph.D, Sp.PA(K)
NIP. 197704092002121002

Plt. Ketua Program Studi Doktor
Ilmu Kedokteran,



dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
NIP. 197008211999031001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK
NIP. 196805301996032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : JERNY DASE
NIM : C013171027
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

ANALISIS EKSPRESI mRNA DAN PROTEIN DIHIDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (DLD) DAN
KIDNEY INJURY MOLECULE -1 (KIM-1) PADA GINJAL TIKUS MODEL PADA FASE INISIASI
ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 7 Juli 2022

Yang menyatakan,



JERNY DASE

DAFTAR TIM PENGUJI

Promotor : Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes. Sp.PD-KGH, Sp.GK

Co-Promotor : Dr. dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phil, DFM

dr. Muh. Husni Cangara, DFM, Ph.D, Sp.PA

Anggota : Dr. dr. Yuli Budiningsih, Sp.F(K)

Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Sp.PA(K), Ph.D, Sp.F

Prof. Ir. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An-KIC-KAKV

Dr. dr. Burhanuddin Bahar. MS

Dr. dr. Hasyim Kasim, Sp.PD-KGH-FINASIM

dr. Upik A. Miskad, Ph.D. Sp.PA(K)

PRAKATA

Puji dan syukur pada Tuhan Allah Yang Maha Esa , Maha Kuasa dan Maha Pengasih, atas pertolonganNya dan kasih karuniaNya memberikan kesehatan dan kekuatan sehingga dapat menyelesaikan disertasi ini.

Ischemia reperfusion injury (IRI) ginjal merupakan salah satu penyebab penting terjadinya *acute kidney injury* (AKI). Kematian akibat AKI meningkat signifikan dalam waktu 24-48 jam . Kematian yang terjadi cepat (*sudddent death*) atau tidak terduga (*unexpected death*) merupakan kondisi yang rawan konflik hukum yang diduga sebagai malpraktek medis.

Penentuan penyebab dan mekanisme kematian dapat dibuktikan melalui pemeriksaan histopatologi, imunohistokimia atau biomolekuler. Dokter ahli forensic patologi berperan penting dalam penentuan penyebab dan mekanisme kematian. Bukti medis berbasis biomolekuler mempunyai akurasi yang sangat tinggi sebagai alat bukti ilmiah (*evidence base medicine*) untuk kepentingan penegakan hukum. *Evidence base medicine* berbasis biomolekuler merupakan bukti medis dengan akurasi yang sangat tinggi, yang berpotensi sebagai biomarker, termasuk Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) yang terekspresi pada mitokondria sel ginjal yang cedera akibat iskemia-reperfusion dan *Kidney injury molecule-1* (KIM-1) yang terekspresi pada membrane apikal epitel tubulus proksimal yang cedera akibat iskemia reperfusion.

Penulis berharap , hasil penelitian ini dapat meningkatkan pemahaman mengenai pentingnya pengukuran ekspresi DLD dan KIM-1 sebagai penanda biomarker cedera pada jaringan iskemia reperfusi ginjal.

Berbagai kendala dihadapi dan pengalaman berharga yang diperoleh selama proses penelitian dan penyusunan disertasi ini, namun dengan bantuan berbagai pihak maka semua ini dapat diselesaikan .

Penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada **Dr.Ir. Jamaluddin Jompa, MSc** selaku Rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes. Sp.PD-KGH, Sp.GK** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, **dr.Agussalim Bukhari , M.Med, Ph.D, Sp.GK (K)** selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Hasanuddin.

Penulis juga menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada:

Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes. Sp.PD-KGH, Sp.GK atas kesediaan sebagai promotor yang selalu membimbing di tengah kesibukan dan mendorong penulis dengan penuh kesabaran dan pengertian dari awal hingga selesai.

Dr. dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phil, DFM atas kesediaan sebagai ko-promotor dengan penuh kesabaran selalu bersedia membimbing di tengah kesibukan yang amat dari awal hingga selesai.

dr. Muh. Husni Cangara, DFM, Ph.D, Sp.PA atas kesediaan beliau menjadi ko-promotor atas kesediaan sebagai ko-promotor dengan penuh kesabaran selalu bersedia membimbing di tengah kesibukan yang amat dari awal hingga selesai.

Dr. dr. Yuli Budiningsih, Sp.F(K) sebagai penguji eksternal yang telah meluangkan waktunya untuk memberi masukan, saran yang sangat bermanfaat bagi penulis. Terima kasih atas kesediaan untuk selalu hadir dalam ujian walaupun ditengah kesibukan yang amat padat.

Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Sp.PA(K), Ph.D, Sp.F sebagai penguji yang telah telah meluang waktunya untuk selalu hadir untuk memberi masukan, saran dan koreksi yang sangat bermanfaat bagi penulis dan mengarahkan penulis dari awal hingga selesai.

Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An-KIC-KAKV sebagai penguji yang telah telah meluang waktunya untuk selalu hadir untuk memberi masukan, saran dan koreksi yang sangat bermanfaat bagi penulis dan mengarahkan penulis dari awal hingga selesai.

Dr. dr. Burhanuddin Ilahar. MS sebagai penguji yang telah telah meluang waktunya untuk selalu hadir untuk memberi masukan, saran dan koreksi yang sangat bermanfaat bagi penulis dan mengarahkan penulis dari awal hingga selesai.

Dr. dr. Hasyim Kasim, Sp.PD-KGH-FINASIM sebagai penguji yang telah telah meluang waktunya untuk selalu hadir untuk memberi masukan,

saran dan koreksi yang sangat bermanfaat bagi penulis dan mengarahkan penulis dari awal hingga selesai.

dr. Upik A. Miskad, Ph.D. Sp.PA(K), sebagai penguji yang telah meluangkan waktunya untuk selalu hadir untuk memberi masukan, saran dan koreksi yang sangat bermanfaat bagi penulis dan mengarahkan penulis dari awal hingga selesai.

Perkenankan penulis menyampaikan terima kasih kepada **Dr.dr.Khalid Saleh, Sp,PD-KKV, FINASIM, M.Kes**, selaku Dirut RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo yang lalu dan **Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An-KIC-KAKV** selaku Dirut RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo saat ini atas bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani pendidikan sampai selesai.

Terima kasih juga kepada **Saleh, Sp,PD-KKV, FINASIM, M.Kes**, selaku Dirut RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo yang lalu dan **Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An-KIC-KAKV** selaku Dirut RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo saat ini atas bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani pendidikan sampai selesai.

Terima kasih juga kepada **dr. Muh. Husni Cangara, DFM, Ph.D, Sp.PA** selaku Ketua Departemen Forensik dan Medikolegal Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani pendidikan sampai selesai.

Terima kasih kepada anandaku tercinta **Yesyurun Masiakh Agape** atas doa, kesabaran dan dukungannya sehingga dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih kepada kakak : **Rana Dase, ST, drg.Rina Dase, Sulwan Dase, ST,MT, Feris Dase, SH, MH**, atas doa dan dukungannya sehingga dapat menyelesaikan disertasi ini.

Ungkapan terima kasih juga kami sampaikan kepada mereka yang namanya tidak tercantum namun telah banyak membantu dan mendukung penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Penulis menyadari kemungkinan terdapat kekurangan dan keterbatasan selama penelitian dan penyusunan disertasi ini, oleh karena itu dengan segenap kerendahan hati penulis menyalpaikan maaf yang sebesar-besarnya. Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi kepentingan ilmu pengetahuan bidang kedokteran dan penegakan hukum . Semoga Tuhan Allah Yang Maha Kuasa berkenan memberkati semua pihak yang membantu hingga penulisan disertai ini selesai.

Makassar, Juli 2022

Jerny Dase

ABSTRACT

JERNY DASE. **An Analysis on the Expressions of mRNA and Dihydrilipoamide Dehydrogenase (DLD) Protein and Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in a Kidney Model of the Initiation Phase Ischemia Reperfusion Injury** (supervised by Haerani Rasyid, Rina Masadah, and Muh. Husni Cangara)

The aim of this study is to see if there is a critical time for the increase of expressions of mRNA and DLD protein, the increase of tubular damage and its associated biomarker of KIM-1 mRNA, and protein expression for the first 24 hours of ischemia-reperfusion injury. Dihydrilipoamide dehydrogenase (DLD) is a mitochondrial oxidoreduction enzyme that plays a role in energy metabolism and oxidative stress balance. Kidney injury molecule1 (KIM-1) is a transmembrane glycoprotein that is expressed primarily in the proximal tubular epithelium. This research is an experimental study using five male white rats (*Rattus Norvegicus*) in each group. The bulldog clamp is used to clamp the renal arteries and veins to create renal ischemia. Immunohistochemistry was used for the analysis of DLD and KIM-1 protein expressions. Meanwhile, the score for tubular injury was examined histopathologically. RT-PCR was used for DLD mRNA and KIM-1 expressions. The results indicate that mRNA and DLD protein expression increase after ischemia, IR 30 minutes, IR 2 hours, and IR 24 hours compared to healthy. Expression of mRNA protein expressions increase significantly after 2 hours of reperfusion compared to ischemia. KIM-1 mRNA and protein expression increased higher after ischemia, IR 30 minutes, IR 2 hours and IR 24 hours compared to healthy. Expression of mRNA and KIM-1 protein increase significantly after 2 hours of reperfusion compared to ischemia. Tubular injury (TIS) scores are significantly higher in ischemic than healthy tissues. TIS remains the same after 30 min IR, peaks at 2 hours IR, and decreased after 24 hours IR. Expression of KIM-1 mRNA and protein is higher at IR 30 minutes 2 hours and 24 hours than healthy. Expression of KIM-1 mRNA and protein is higher in ischemia than in healthy KIM-1 mRNA and protein expression significantly increases at 2 hours IR compared to ischemia but decreases after 24 hours IR. In conclusion, expression of DLD mRNA and protein increases in 24 hours IR with a critical time at 2 hours reperfusion. KIM-1 mRNA and protein expressions increase at 24 hours IR with critical time at 2 hours IR.

Keywords: mRNA expression, protein dihydrilipoamide Dehydrogenase (DLD), kidney injury molecule-1 (KIM-1), ischemia reperfusion injury.



ABSTRAK

JERNY DASE. *Analisis Eksperimen mRNA dan Protein Dihidropoliimade Dehydrogenase (DLD) dan Kidney Injury Molecule -1 (KIM-1) pada Ginjal Tikus Model pada Fase Inisiasi Ischemia Reperfusion Injury (dibimbing oleh Haerani Rasyid, Rina Masadah, dan Muh Husni Cangara).*

Tujuan penelitian ini adalah melihat apakah ada waktu kritis untuk peningkatan mRNA dan protein DLD; peningkatan kerusakan tubulus dan biomarker terkaitnya mRNA KIM-1, dan ekspresi protein selama 24 jam pertama cedera iskemia reperfusi. *Dihydrolipomade dehydrogenase* (DLD) adalah enzim oksidoreduktasi mitokondria yang berperan dalam metabolisme energi dan keseimbangan stress oksidatif, Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) dan glikoprotein transmembran yang diekspresikan, terutama pada epitel tubulus proksimal. metode penelitian eksperimental dengan menggunakan lima ekor tikus putih jantan rattus Norvegicus di masing-masing kelompok. Penjepit *bulldog* digunakan untuk menjepit arteri dan vena ginjal untuk menciptakan iskemia ginjal. Imunohistokimia digunakan untuk analisis ekspresi protein DLD dan KIM-1, sedangkan skor cedera tubulus diperiksa secara histopatologi. RT-PCR digunakan untuk ekspresi mRNA DLD dan KIM-1. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi mRNA dan protein DLD meningkat setelah iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam, dan IR 24 jam dibandingkan sehat. Ekspresi mRNA dan protein DLD meningkat sangat tinggi setelah 2 jam reperfusi dibandingkan iskemia. Ekspresi mRNA dan Protein KIM-1 meningkat lebih tinggi setelah iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam, dan IR 24 jam dibandingkan sehat. Ekspresi mRNA dan protein meningkat signifikan setelah 2 jam reperfusi dibandingkan iskemia. Skor cedera tubulus (TIS) signifikan lebih tinggi di jaringan iskemia daripada sehat. TIS tetap sama setelah IR 30 menit, memuncak pada IR 2 jam, dan menurun setelah IR 24 jam. Ekspresi mRNA dan protein KIM-1 lebih tinggi pada IR 30 menit 2 jam, dan 24 jam daripada sehat. Ekspresi mRNA dan protein KIM-1 meningkat signifikan pada IR 2 jam dibandingkan iskemia tetapi dan berkurang setelah IR 24 jam. Ekspresi mRNA dan protein DLD meningkat dalam 24 jam IR Dengan waktu kritis pada 2 jam reperfusi. Ekspresi mRNA dan protein KIM-1 meningkat dalam 24 jam IR dengan waktu kritis pada 2 jam IR.

Kata kunci: ekspresi mRNA, protein dihidropoliimade dehidrogenase (DLD), Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), *ischemia referfusion injury*



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	1
HALAMAN PENGESAHAN.....	2
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	3
DAFTAR TIM PENGUJI	4
PRAKATA.....	5
ABSTRAK.....	10
ABSTRACT.....	11
DAFTAR ISI.....	12
DAFTAR TABEL.....	15
DAFTAR GAMBAR	16
BAB I PENDAHULUAN	17
I.1 . LATAR BELAKANG.....	177
I.2. RUMUSAN MASALAH.....	19
I.3. TUJUAN PENELITIAN.....	19
I.4 MANFAAT PENELITIAN.....	20
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	22
II.1 SISTEM RESPIRASI SEL	22
II.2. DIHIDROLIPOAMIDE DEHIDROGENASE (DLD)	27
II. 3. CEDERA GINJAL ISKEMIA	36
II.4. CEDERA GINJAL ISKEMIA-REPERFUSI (<i>KIDNEY ISCHEMIA</i>	43
<i>REPERFUSION INJURY</i>)	43
II.5. <i>KIDNEY INJURY MOLECULE-1</i> (KIM-1)	51
II.5.1 Struktur dan Fungsi KIM-1.....	32
II.5.2. Ekspresi KIM-1 pada cedera ginjal akut	35
II.5.3. Regulasi ekspresi KIM-1	37
II.6. KERANGKA TEORI.....	56
II.7. KERANGKA KONSEP DAN VARIABEL PENELITIAN	56

II.8. HIPOTESA	57
II.9. DEFINISI OPERASIONAL	58
BAB III METODE PENELITIAN.....	60
III.1. DESAIN PENELITIAN.....	60
III.2. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN.....	60
III.3. POPULASI DAN SAMPEL.....	60
III.4. CARA PEMILIHAN SAMPEL	61
III.5. PERKIRAAN BESAR SAMPEL	61
III.6. CARA PENGAMBILAN SAMPEL.....	62
III.7. PERSETUJUAN ETIK.....	62
III.8. PROSEDUR EKSPERIMAN.....	62
III.9. ALAT DAN BAHAN.....	67
III.10. PENGUMPULAN DAN PEMERIKSAAN SAMPEL.....	69
III.11. ANALISA DATA	75
III.12. ALUR PENELITIAN	77
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	78
IV.1. HASIL PENELITIAN	78
IV.1.1. Gambaran umum dan karakteristik sampel	59
IV.1.2. Skor cedera tubulus pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	62
IV.1.3. Perbandingan Skor cedera tubulus pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	63
V.1.4. Ekspresi mRNA DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	65
V.1.5. Perbandingan ekspresi mRNA DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	66
V.1.4. Ekspresi protein DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia	

reperfusi.....	68
V.1.6 Perbandingan ekspresi protein DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	70
V.1.7 Ekspresi mRNA KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	72
V.1.8 Perbandingan ekspresi mRNA KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	74
V.1.9 Ekspresi protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	75
V.1.10 Perbandingan ekspresi protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	77
V.1 11 Korelasi	78
IV.2. PEMBAHASAN	9980
BAB V PENUTUP.....	1079
V.1 RINGKASAN	109
V.2 KESIMPULAN.....	109
V.3 KETERBATASAN PENELITIAN	11090
V.4SARAN	110
DAFTAR PUSTAKA	112

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Skor cedera tubulus pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	62
Tabel 2. Perbandingan scor cedera tubulus antara ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	64
Tabel 3 . Ekspresi mRNA DLD pada pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	66
Tabel 4. Perbandingan ekspresi mRNA DLD antara ginjal ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	67
Tabel 5. Ekspresi protein mRNA DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	69
Tabel 6. Perbandingan ekspresi protein DLD pada ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	71
Tabel 7. Ekspresi mRNA KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	73
Tabel 8. PerbandingN Ekspresi mRNA KIM-1 ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	74
Tabel 9. Ekspresi protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	75
Tabel 10. Perbandingan ekspresi protein KIM-1 pada ginjal antara ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	77
Tabel 11. Korelasi dan kekuatan korelasi antara mRNA DLD, mRNA KIM-1, protein DLD, protein KIM-1 dan skor cedera tubulus.....	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.3. Histopatologi tubulus ginjal sehat, ginjal sehat, iskemia, iskemia reperfusi	63
Gambar 4.4. Perbandingan skor cedera tubulus ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi.....	65
Gambar 4.5. Perbandingan ekspresi mRNA DLD antara kelompok ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	68
Gambar 4.6. Gambar ekspresi protein DLD pada ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	70
Gambar 4.7 Perbandingan ekspresi protein DLD antara ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi.....	72
Gambar 4.8. Perbandingan ekspresi mRNA KIM-1 ginjal antara ginjal sehat, iskemia dan iskemia reperfusi	75
Gambar 4.9. Ekspresi protein KIM-1 ginjal sehat, iskemia dan iskemia Reperfusi	76
Gambar 4.10. Perbandingan ekspresi protein KIM-1 ginjal sehat, iskemia, dan iskemia reperfusi	78

BAB 1

PENDAHULUAN

I.1 . LATAR BELAKANG

Iskemia adalah penurunan aliran darah, oksigenasi darah yang tidak memadai karena kegagalan kardiorespirasi, dan penurunan kapasitas pembawa oksigen darah (anemia atau keracunan karbon monoksida atau setelah kehilangan darah yang sangat banyak). Iskemia mengakibatkan hipoksia sel yaitu kekurangan oksigen yang menyebabkan cedera sel akibat dari berkurangnya respirasi oksidatif aerobik. Hipoksia merupakan penyebab yang sangat penting dan umum dari cedera sel dan kematian sel. Sel yang mengalami iskemia, dapat beradaptasi, cedera atau mati, tergantung pada tingkat keparahan hipoksia, Misalnya, jika arteri menyempit, jaringan yang disuplai oleh pembuluh tersebut pada awalnya mungkin menyusut ukurannya (atrofi), sedangkan hipoksia yang lebih parah atau mendadak menyebabkan cedera dan kematian sel (1,2)

Iskemia-reperfusi (IR) adalah mengalirnya kembali aliran darah ke jaringan iskemia. Reperfusi dapat menyebabkan cedera disebut sebagai cedera iskemia-reperfusi (*ischemia reperfusion injury*) (1,2).

Ischemia reperfusion injury (IRI) ginjal merupakan salah satu penyebab penting terjadinya *acute kidney injury* (AKI) (1–4). AKI berkontribusi menyebabkan gagal ginjal akut pada 50% pasien rawat inap (1) , sekitar 50-60% menjalani transplantasi ginjal (5), sekitar 25-

40% menyebabkan kematian pada pasien rawat inap (6), sekitar 54,24% kematian pada pasien Covid-19 (7). Kematian pada AKI meningkatkan signifikan dalam waktu 24-48 jam (8).

Kematian pada cedera ginjal akut (*kidney injury acute*), meningkat signifikan dalam waktu 24-48 jam (8). Hal ini berarti, periode waktu tersebut perlu mendapat perhatian termasuk tatalaksana dan respon time serta lama observasi di pelayanan gawat darurat Rumah Sakit. Respon time pertama kegawat daruratan adalah waktu 30 menit pertama, respon time kedua adalah 2 jam kedua dan lama observasi di gawat darurat adalah minimal 6 jam dan maksimal 8 jam sebelum ditransfer ke ruang perawatan. Apakah periode waktu respon time tersebut merupakan *golden periode* untuk cedera iskemia-reperfusi ? belum banyak diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian.

Kematian yang terjadi cepat (*suddent death*) atau tidak terduga (*unexpected death*) merupakan kondisi yang rawan konflik hukum yang diduga sebagai malpraktek medis. Penentuan penyebab dan mekanisme kematian dapat dibuktikan melalui pemeriksaan histopatologi, immunohistokimia atau biomolekuler. Dokter ahli forensik patologi berperan penting dalam penentuan penyebab dan mekanisme kematian berdasarkan (*evidence base medicine*). Bukti medis berbasis biomolekuler diketahui mempunyai akurasi yang sangat tinggi sehingga dapat digunakan untuk kepentingan penegakan hukum. *Evidence base*

medicine berbasis biomolekuler berpotensi sebagai biomarker termasuk penentuan cedera dan kematian sel.

Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) adalah protein *house-keeping* yang terletak pada matriks mitokondia yang apabila tidak ada, akan menyebabkan cedera dan kematian (9,10). DLD merupakan enzim yang terlibat langsung dalam pembentukan ATP dan keseimbangan reduksi-oksidasi (11). Namun penelitian tentang DLD belum banyak diketahui terutama perannya sebagai biomarker pada fase inisiasi *Ischemia reperfusion injury* (IRI) ginjal.

Kidney injury molecule-1 (KIM-1) adalah protein spesifik pada epitel tubulus yang terekspresi banyak pada epitel tubulus proksimal cedera, merupakan biomarker cedera struktur epitel tubulus proksimal (8). Fase inisiasi IRI ginjal ditandai dengan penurunan ATP yang drastis (3,4,9,12,13). Pada fase inisiasi IRI ginjal, protein KIM-1 terekspresi banyak pada permukaan epitel tubulus proksimal ginjal dan tetap tinggi selama fase remodeling (8,14–16). Tingkat ekspresi KIM-1 berkorelasi kuat dengan beratnya cedera struktur epitel tubulus proksimal (17–21). Namun belum banyak penelitian tentang ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada fase inisiasi *Ischemia reperfusion injury* (IRI) ginjal.

I.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang tersebut maka disusunlah rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana gambaran histologi jaringan ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam dan IR 24 jam ?
2. Bagaimana perbandingan gambaran histologi cedera tubulus pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2jam , dan IR 24 jam ?
3. Bagaimana ekspresi mRNA dan protein DLD pada ginjal sehat , iskemia, IR 30 menit, IR 2jam , dan IR 24 jam ?
4. Bagaimana perbandingan ekspresi mRNA dan protein DLD pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2jam dan IR 24 jam ?
5. Bagaimana ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam, dan IR 24 jam ?
6. Bagaimana perbandingan ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2jam dan IR 24 jam ?

I.3. TUJUAN PENELITIAN

I.3.1 Tujuan umum

Membandingkan ekspresi mRNA DLD dan KIM-1, protein DLD dan KIM-1 dan gambaran histopatologi pada jaringan ginjal sehat, iskemia dan iskemia repererfusi.

I.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan skor cedera tubulus pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam dan IR 24 jam.
2. Membandingkan scor cedera tubulus pada ginjal sehat dibandingkan pada iskemia dan IR 30 menit, IR 2jam , IR 24 jam.?
3. Mengukur tingkat ekspresi mRNA dan protein DLD pada ginjal sehat iskemia dan IR 30 menit, IR 2jam , IR 24 jam
4. Membandingkan ekspresi mRNA dan protein DLD ginjal sehat dibandingkan pada iskemia dan IR 30 menit, IR 2jam , IR 24 jam
5. Mengukur tingkat ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal sehat, iskemia, IR 30 menit, IR 2 jam, dan IR 24 jam.
6. Membandingkan ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal sehat. Iskemia, IR 30 menit, IR 2jam dan IR 24 jam.

I.4 MANFAAT PENELITIAN

1) Untuk pengembangan ilmu

- a. Diharapkan dapat menambah informasi ilmiah mengenai ekspresi mRNA DLD dan KIM-1, protein DLD dan KIM-1 dan gambaran histopatologi tubulus pada iskemia reperfusi ginjal.
- b. Diharapkan menjadi rujukan untuk uji klinis pada manusia.

2) Untuk pengembangan Klinis

Penelitian ini belum dapat diaplikasikan di klinis, sebab merupakan penelitian eksperimen pada hewan coba. Namun, jika dilakukan uji klinis dan hasilnya sama, maka manfaatnya adalah :

- a. Ekspresi mRNA dan protein DLD pada jaringan ginjal berpotensi sebagai biomarker cedera epitel tubulus pada iskemia-reperfusi .
- b. Ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal berpotensi sebagai biomarker pada cedera struktur epitel tubulus proksimal hingga fase remodeling pada iskemia reperfusi ginjal
- c. Ekspresi mRNA / protein DLD dan KIM pada ginjal keduanya berpotensi sebagai alat bukti medis (*Evidence base medicine*) dalam bidang kedokteran forensik medikolegal dalam menentukan penyebab kematian (autopsy forensic) untuk penegakan hukum dan pengembangan ilmu kedokteran (autopsy klinis)

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 SISTEM RESPIRASI SEL

Respirasi seluler adalah suatu mekanisme molekuler dimana sel mengkonsumsi oksigen (O_2) pada fase katabolisme aerobik di mitokondria dan membentuk karbon dioksida (CO_2). Oksidasi biologis adalah transfer elektron dari koenzim tereduksi ke oksigen melalui rantai pernapasan. ATP terbentuk dari energi yang dilepaskan selama proses ini. Fosforilasi oksidatif adalah kombinasi dari oksidasi dan fosforilasi. Oksidasi ini terjadi di dalam tubuh melalui serangkaian proses dehidrogenasi. Aliran elektron dikendalikan oleh serangkaian enzim dehidrogenase yang dikenal sebagai rantai transpor elektron (ETC). (22,23).

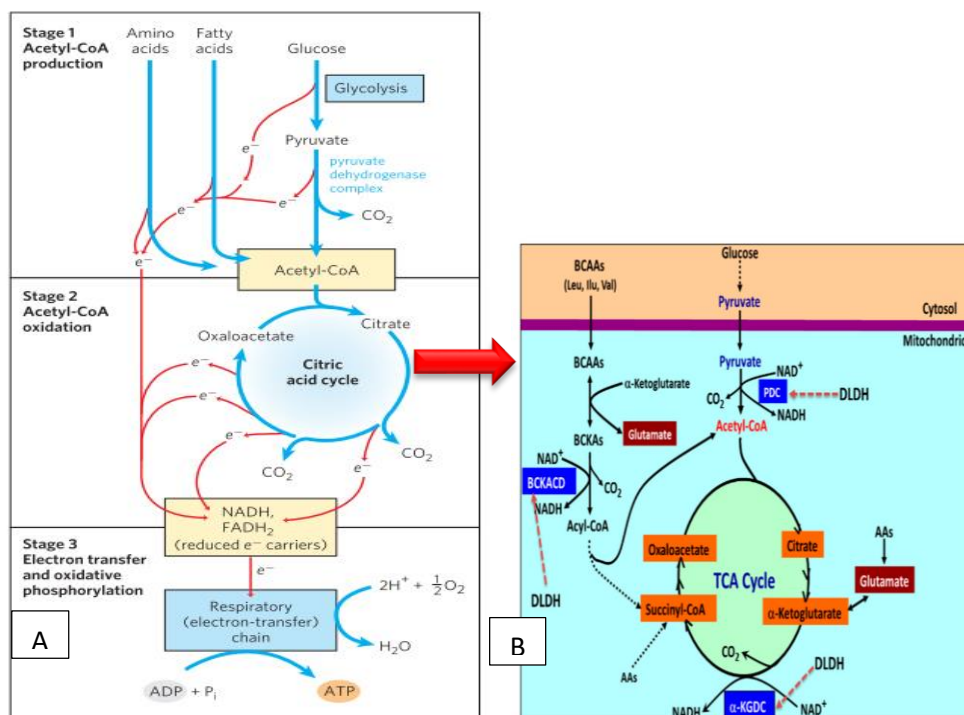
Ada tiga langkah untuk respirasi seluler, 1) Molekul organik termasuk glukosa, asam lemak, dan asam amino tertentu dioksidasi untuk menghasilkan dua fragmen karbon seperti asetil-koenzim A. (asetil-KoA). Gugus asetil dilewatkan ke dalam siklus asam sitrat pada langkah kedua, di mana mereka dioksidasi secara enzimatik menjadi CO_2 ; energi yang dilepaskan disimpan dalam pembawa elektron tereduksi NADH dan $FADH_2$. Koenzim tereduksi ini dioksidasi pada tahap ketiga respirasi, melepaskan proton (H^+) dan elektron. Elektron dikirim ke O_2 , akseptor elektron terakhir, melalui rantai pernapasan, yang terdiri dari molekul pembawa elektron dikirim ke O_2 ,

akseptor elektron terakhir, melalui rantai pernapasan, yang terdiri dari molekul pembawa elektron (Gambar 1A)(22).

II.1.1. Siklus asam trikarboksilat (TCA)

Siklus asam trikarboksilat (TCA) atau siklus Krebs adalah jalur katabolik sentral yang hampir universal di mana senyawa yang berasal dari pemecahan karbohidrat, lemak, dan protein dioksidasi menjadi CO₂, dengan sebagian besar energi oksidasi sementara disimpan dalam pembawa elektron. Sejumlah besar energi yang dilepaskan selama transfer elektron disimpan dalam bentuk ATP melalui proses yang disebut fosforilasi oksidatif. Aktivitas metabolisme bertanggung jawab atas peningkatan kadar oksigen. Konversi piruvat menjadi gugus asetil, diikuti dengan masuknya ke dalam siklus asam siklus Krebs. FADH₂ dan NADH merupakan elektron yang diangkut ke O₂ selama metabolisme aerobik, dan pergerakan elektron dipertahankan sebagai energi ATP. Konversi piruvat menjadi gugus asetil awalnya dipertimbangkan, diikuti dengan masuknya mereka ke dalam siklus asam sitrat, umumnya dikenal sebagai siklus asam trikarboksilat (TCA) atau siklus Krebs (Hans Krebs). Tiga molekul NADH dan FADH₂ dan satu nukleotida trifosfat (ATP atau GTP) diperoleh untuk oksidasi asetil-KoA dalam setiap siklus asam sitrat. Selain asetil-KoA, siklus asam sitrat dapat mengoksidasi bahan kimia apa pun seperti asam amino yang menghasilkan 4-5 karbon (Gambar 1 A) (22)

Dihydrolipomide dehydrogenase (DLD) adalah unit dari enzim kompleks PDH (piruvat dehidrogenase) (Gambar 2 B) dan α -KGDH (alfa-ketoglutarat dehidrogenase) yang berperan penting dalam metabolisme energi (ATP) dan keseimbangan redoks intramitokondria (Gambar 1 B) (9,22,24–29).

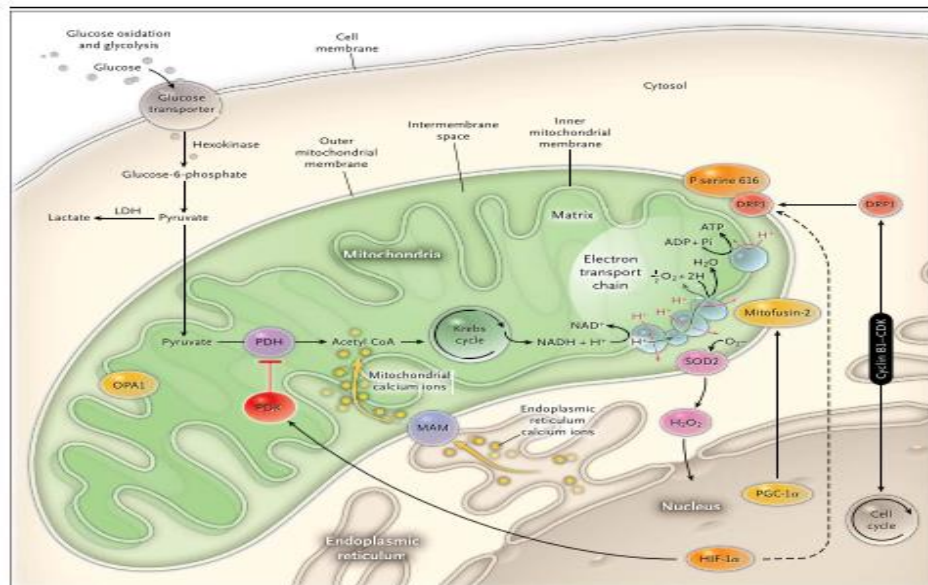


Gambar 1. Ada tiga langkah respirasi sel, protein, lipid, dan karbohidrat dikatabolisme. Tahap 1: Asetil-KoA diproduksi oleh oksidasi asam lemak, glukosa, dan asam amino tertentu. Dalam siklus asam sitrat, tahap 2: oksidasi gugus asetil mengandung empat fase di mana elektron diekstraksi. Tahap 3: elektron yang dibawa oleh NADH dan $FADH_2$ diarahkan ke rantai pernapasan, yang terdiri dari pembawa elektron mitokondria (terikat membran plasma) yang mereduksi O_2 menjadi H_2O (A) (22,23).

Panah merah putus-putus mewakili kompleks yang terlibat DLD. TCA: asam trikarboksilat; BCKAD: asam keto rantai bercabang; BCKAD: kompleks dehidrogenase asam alfa keto rantai bercabang; PDC: kompleks piruvat dehidrogenase. Jalur piruvat menjadi asetil-KoA, jalur -ketoglutarat menjadi suksinil-KoA, dan rantai cabang asam amino (leusin, isoleusin, dan valin) ke jalur asil-KoA merupakan jalur metabolisme mitokondria yang memerlukan dihydrolipomide dehydrogenase (DLD) (B). (13)

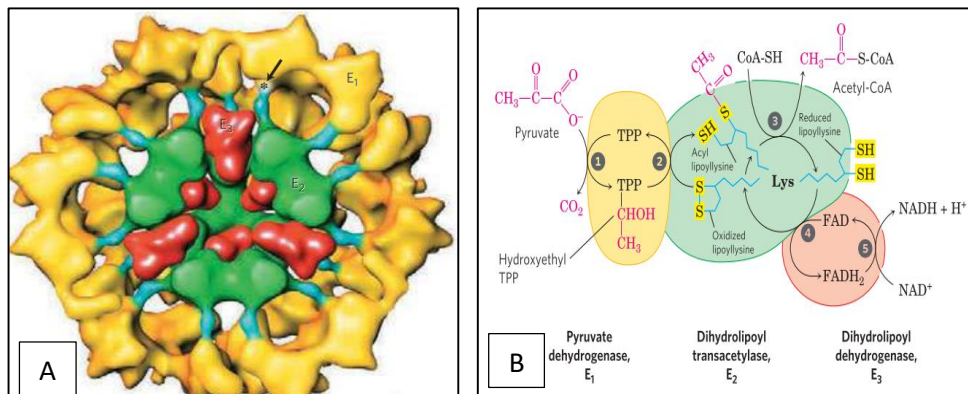
PDH berperan mengkatalisis hasil glikolisis piruvat menjadi asetil-KoA, prekursor siklus asam sitrat. α -KGDH berperan mengkatalisis alfa-ketoglutarat menjadi suksinil-CoA (9,13,25). Rantai cabang ketoacid dehydrogenase kompleks (BCKDC) pada membran dalam mitokondria mengkatalisis langkah ireversibel dalam katabolisme asam amino rantai cabang L-isoleusin, L-valin, dan L-leusin, bekerja pada turunan deaminasinya (L-alpha-keto-beta-methylvalerate, alpha-ketoisovalerate, dan alpha-ketoisocaproate) dan mengubahnya menjadi Methylbutyryl-CoA, Isobutyryl-CoA dan Isovaleryl-CoA (30,31).

Piruvat dehydrogenase (PDH) merupakan pengatur utama metabolisme oksidatif mitokondria dengan mengubah piruvat menjadi asetil koenzim A (CoA). Piruvat dihasilkan dari proses glikolisis di sitosol, masuk ke mitokondria dan mengoksidasi bahan bakar metabolisme oksidatif atau tetap berada di sitosol dan diubah menjadi laktat oleh lactate dehydrogenase (LDH) jika metabolisme mitokondria dihambat. PDH dapat dihambat oleh piruvat dehydrogenase kinase (PDK) atau diaktifkan oleh peningkatan kalsium mitokondria. Asetil KoA memicu siklus Krebs dan menghasilkan donor elektron (NADH dan flavin adenine dinucleotide), yang melewatkan elektron ke rantai transpor elektron untuk mereduksi oksigen molekuler. (32,33).

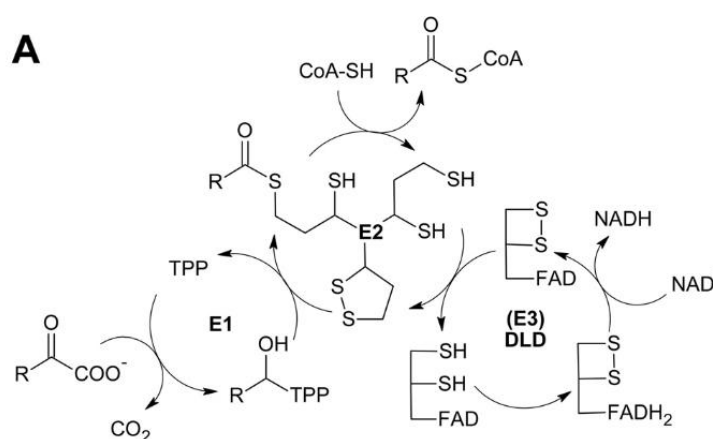


Gambar 2. Peran PDH dalam metabolisme energi

Kompleks PDH terdiri dari piruvat dehidrogenase (E1) (dengan kofaktor terikatnya TPP); dihidrolipoyltransacetylase (E2) (dengan gugus lipoil yang terikat secara kovalen); dan dihidrolipoyl dehidrogenase (E3) (dengan gugus lipoil yang terikat secara kovalen). E3 dihidrolipoyl dehidrogenase (dengan FAD dan NAD sebagai kofaktor) Perlekatan lipoat ke ujung rantai samping Lys di E2 menghasilkan lengan yang panjang dan fleksibel yang dapat berpindah dari bagian aktif E1 ke aktif E2 dan E3. Dihidrolipoyl dehidrogenase (E3) PDH, identik dengan E3 dari AKGDH dan BCKDH (Gambar 3) (22). Regulasi DLD (E3) bersifat independen dan proporsional dari komponen E1 dan E2 dalam enzim kompleks (22,34)



Gambar 3. Struktur tiga dimensi kompleks PDH, menunjukkan struktur subunit: E1, piruvat dehidrogenase (kuning); E2, dihidrolipoil transacetylase (hijau); dan E3, dihidrolipoil dehidrogenase (merah) (A). Kompleks PDH mengandung tiga enzim—piruvate dehidrogenase (E1), dihidrolipoil transacetylase (E2), dan dihidrolipoil dehidrogenase (E3). Dekarboksilasi oksidatif kompleks PDH dari piruvat menjadi asetil-KoA. Reaksi piruvat digambarkan dengan warna merah. Pada langkah 1, piruvat bergabung dengan piruvat dehidrogenase (terikat E1)'s tiamin pirofosfat (TPP) untuk membentuk turunan hidroksietil. Langkah 2 adalah transfer dua elektron dan gugus asetil dari TPP ke bentuk teroksidasi dari gugus lipoililil dari enzim utama, dihidrolipoil transasetilase (E2), untuk menghasilkan asetil tioester dari gugus lipoil tereduksi. Langkah 3 melibatkan penggantian gugus —SH dari CoA dengan gugus —SH dari E2, menghasilkan asetil-KoA dan bentuk gugus lipoil yang tereduksi sepenuhnya (ditiol). Langkah 4 meningkatkan dihidrolipoil dehidrogenase(E3) memfasilitasi transfer dua atom hidrogen dari grup lipoil tereduksi E2 ke grup prostetik FAD E3, mengembalikan grup lipoilysyl E2 ke keadaan teroksidasinya. Pada langkah 5, FADH₂ E3 yang berkurang membentuk NADH dengan mentransfer ion hidrida ke NAD. Kompleks enzim sekarang siap untuk memulai siklus katalitik baru . (22)



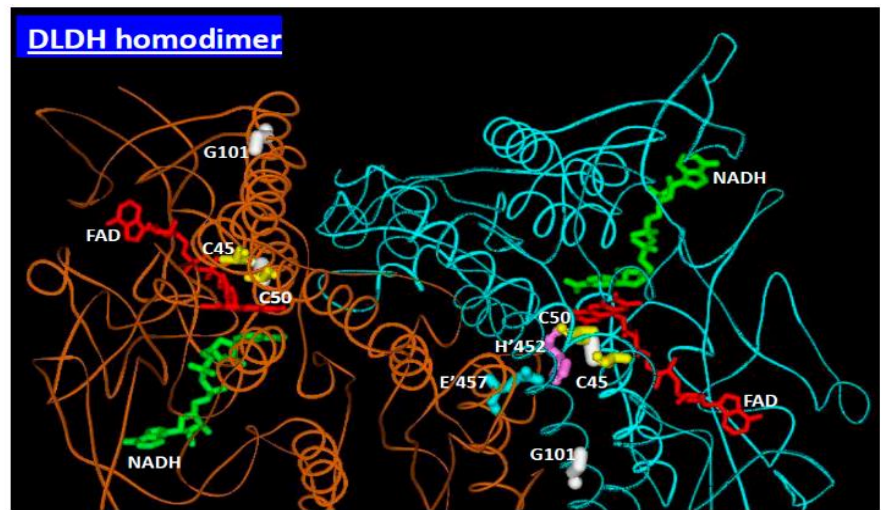
Gambar 4. E1 (α -ketoglutarat dehidrogenase); E2 (dihydrolipoamide succinyltransferase); E3(dihydrolipoamida dehidrogenase) ; TPP(tiamin pirofosfat). Pembentukan ROS oleh subunit E3 yang diinduksi oleh NADH tanpa adanya substrat (9,28,29)

II.2. DIHIDROLIPOAMIDE DEHIDROGENASE (DLD)

Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) adalah enzim golongan oksidoreduktase intramitokondria dan merupakan unit unit E3 dari tiga kompleks enzim yaitu kompleks 1) Pyruvate dehydrogenase (PDH) (E1= piruvat dehydrogenase, E2 = dihydrolipoyl transacetylase (DLAT) ; 2) alpha ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH) dan 3) rantai bercabang ketoacid dehydrogenase (BCKD). PDH dan α -KGDH keduanya berperan penting dalam metabolisme energi siklus Kreb's dalam matriks mitokondria (9,13,25).

a. Struktur DLD

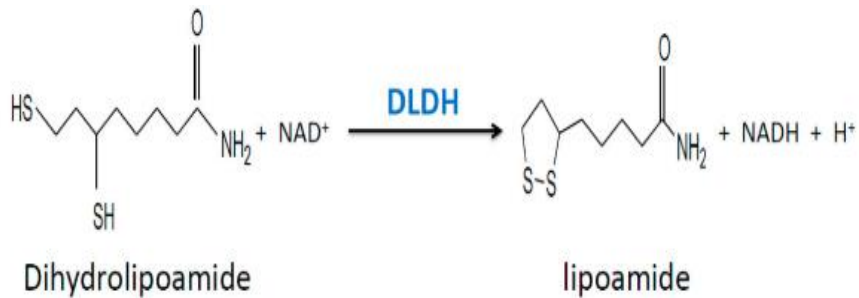
DLD memiliki dua residu sistein redoks-reaktif di pusat aktifnya yang sangat diperlukan untuk fungsi katalitiknya dan membuatnya sensitif terhadap redoks. Struktur aktif molekul DLD adalah homodimer stabil dengan masing-masing monomer memiliki molekul FAD non-kovalen tetapi terikat kuat, molekul NAD atau NADH terikat sementara, dan pusat aktif redoks yang mengandung dua residu sistein (Cys-45 dan Cys-50) yang secara langsung terlibat dalam reaksi pertukaran tiol-disulfida selama katalisis (Gambar 5) (35).



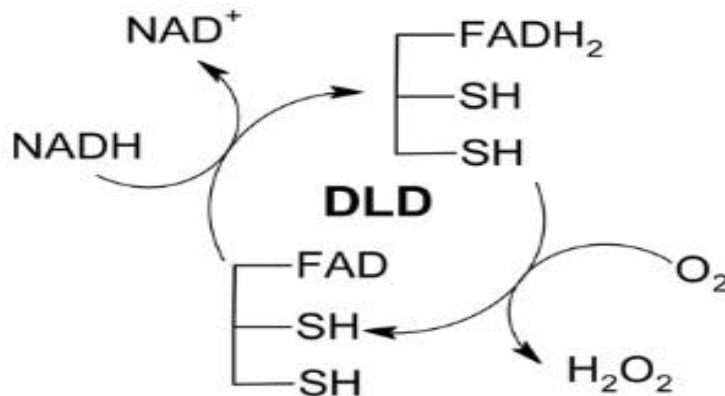
Gambar 5. Struktur homodimer DLD. Setiap monomer menyumbangkan residu asam amino yang terlibat dalam aktivitas enzim. Setiap monomer mengandung molekul flavin adenine dinucleotide (FAD) yang terikat erat, sebuah molekul NAD dan dua residu sistein (C45 dan C50 pada gambar) di pusat aktif. Kedua sistein membentuk ikatan disulfida (kuning) selama katalisis. Elektron dari substrat dihidrolipoamide akhirnya diangkut ke NAD melalui dua residu sistein dan molekul FAD (35).

b. Fungsi DLD

Dihidrolipoamide dehydrogenase (DLD) berperan dalam metabolisme ATP dan keseimbangan redoks intrasel (11,13). Pada reaksi katalitik dehydrogenase (*forward reaction*), DLD mengkatalisis proses kimia. Dengan mengorbankan NAD^+ , dihidrolipoamida dioksidasi menjadi lipoamida. Akibatnya, proses yang dikatalisis DLDH menciptakan NADH, yang dimasukkan ke dalam rantai transpor elektron membran bagian dalam mitokondria (Gamabr 6) (13). Pada reaksi balik (*reverse reaction*) dimana aktivitas diaphorase terbentuk ROS yang diinduksi oleh NADH tanpa adanya substrat (9,28,29) yang bergantung pada FAD dan NADH (donor elektron) (Gambar 7) (22,36,37).



Gambar 6. DLD mengkatalisis proses kimia. Dengan mengorbankan NAD⁺, dihidrolipoamida dioksidasi menjadi lipoamida. Akibatnya, proses yang dikatalisis DLDH menciptakan NADH, yang dimasukkan ke dalam rantai transpor elektron membran bagian dalam mitokondria.(13)



Gambar 7. Pembentukan ROS oleh DLD yang diinduksi oleh NADH tanpa adanya substrat (9,28,29)

c. Inaktivasi DLD

Inaktivasi DLD reversibel dapat disebabkan oleh spesies nitrogen reaktif dan spesies oksigen reaktif (ROS) (13,38–40). Selain itu, DLD sangat peka terhadap peningkatan keasaman (pH↓) mitokondria (13,41–46). pH sitosol adalah ~7,6 , pH ruang intermembrane (6,88+/-0,09) secara signifikan

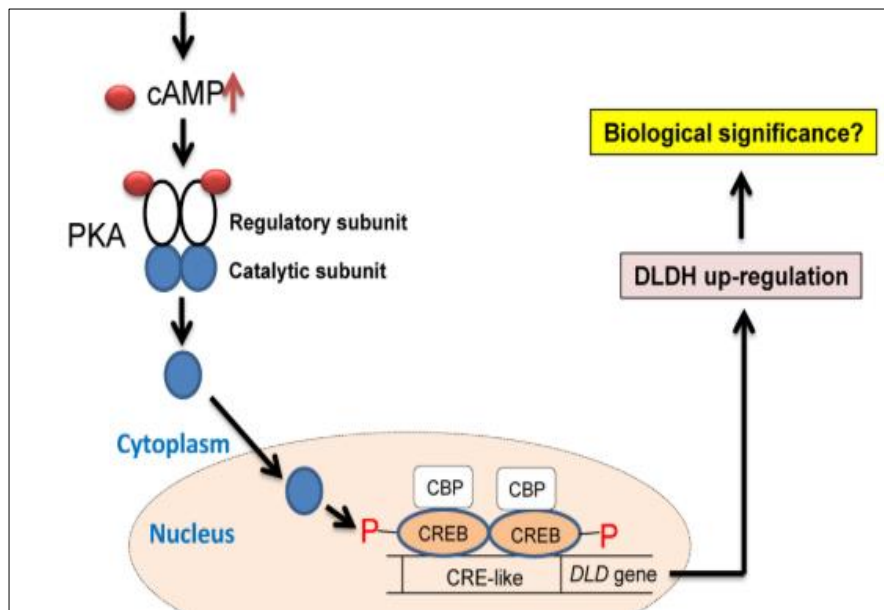
lebih rendah daripada sitosol (7,59+/-0,01). pH matriks mitokondria lebih tinggi 0,9 unit pH daripada pH di ruang intermembrane (7,5 dan 8,2) (47,48). pH plasma 7,38 hingga 7,42 , ion hidrogen 40 nanomol per liter. pH cairan interstisial lebih rendah 0,5 dari pH plasma. Asidosis terjadi ketika pH turun di bawah 7,38. Asidosis menyebabkan depresi dan koma pada sistem saraf pusat. Ketika pH turun di bawah 7,0, dapat beresiko menyebabkan kematian Alkalosis terjadi ketika tingkat pH melebihi 7,42. Jika pH meningkat melebihi 7,55, maka bersiko juga mengancam jiwa .(23).

Pada pH 7,3, aktivitas katalitik/dehydrogenase DLD meningkat dan aktivitas diaforase DLD menurun (41). Pada penurunan pH intrasel, DLD mengalami denaturasi yaitu $\text{pH} < 7,3$, molekul dimer/ tetramer (katalitik) mengalami denaturasi reversibel menjadi oligomer/monomer (diaphorase) (45,46). Pada pH 5,8, hanya monomer DLD sehingga hanya aktivitas diaforase yang ada, mengakibatkan pembentukan ROS meningkat (45). Tetapi penemuan lain menyebutkan bahwa pada pH 5,5-6,8 aktivitas katalitik DLD berkurang signifikan hingga 40-50%, dan peningkatan aktivitas diaforase dengan konsekuensi pembentukan ROS hingga 81% (13,42-44). Inaktivasi DLD menyebabkan hambatan konversi dihydrolipoamide menjadi lipoamida sehingga menginduksi akumulasi dihydrolipoamide intrasel (13). Sebagai residu sistein redoks-reaktif , DLD rentan inaktivasi reversibel H₂O₂. DLD mereduksi radikal bebas H₂O₂ pada gugus sistein di sisi aktifnya (27,36,49,50)

Pada jaringan iskemia, peningkatan H^+ dan asam laktat intrasel mengakibatkan pH lebih asam mengakibatkan inaktivasi DLD sehingga pemulihan ATP menjadi terhambat selama reperfusi (45). Pada reperfusi iskemia, fungsi dehidrogenase DLD meningkat sehingga pembentukan ROS intramitokondria meningkat yang berkontribusi memperburuk cedera stres oksidatif mitokondria. (45) bahkan dapat mengakibatkan destruksi sel (13,43,51,52). Reperfusi mengakibatkan juga influx Ca^{2+} sitosol ke dalam mitokondria sehingga keasaman mitokondria meningkat yang memicu peningkatan ekspresi DLD (34).

d. Regulasi DLD

Regulasi DLD dikendalikan oleh faktor transkripsi pensinyalan cAMP (CREB) nucleus (13,22,34,53). cAMP adalah *second messenger* yang melekat pada subunit regulator dari PKA (cAMP/PKA). cAMP berperan mengaktivasi enzim fosforilasi dan protein kinase A dalam metabolisme *tricarboxylic acide* serta pengaturan glikolisis dan keseimbangan energi seluler. Jika kadar glukosa (sumber karbon) sel cukup, maka aktivitas adenilat siklase terhambat dan ATP tidak dikatalis menjadi cAMP sehingga level cAMP rendah dan enzim fosofrilasi dan PKA tidak teraktivasi. Penghambatan Cyclic AMP dependent protein kinase (cAMP/PKA) mengakibatkan penurunan ekspresi DLD (Gambar 9,10)(23).

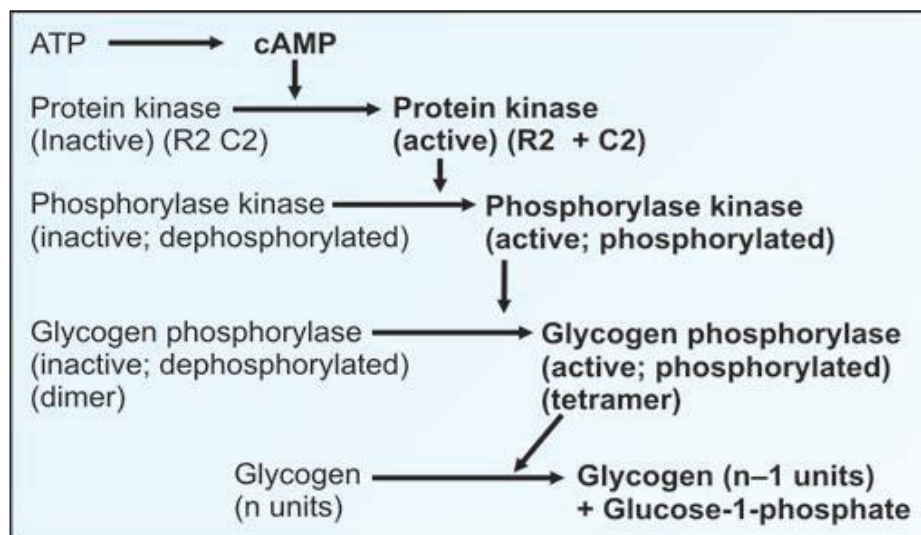


Gambar 8. Jalur pensinyalan peningkatan regulasi DLD yang diinduksi melalui jalur pensinyalan cAMP (CREB) (22,34).

e. Regulasi DLD Pada jaringan Iskemia-Reperfusi

Regulasi DLD dihambat oleh konsentrasi ATP yang tinggi tetapi dirangsang oleh rendahnya ATP untuk keseimbangan produksi dan penggunaan energi. Penurunan rasio $[ATP]/[AMP]$ pada iskemia/reperfusi, mengaktifkan cAMP protein kinase (cAMPK) yang mengaktifkan respons seluler yaitu fosforilasi protein esensial, transpor glukosa, merangsang glikolisis dan oksidasi asam lemak sebagai respons terhadap tingginya AMP dan rendahnya ATP (22). Ketika jumlah cAMP turun, subunit regulator mengalami defosforilasi, dan protein fosfatase diaktifkan, menghidrolisis gugus fosfat dari enzim (Gambar 10) (23).

Jika sel kekurangan glukosa tetapi ada laktosa terjadi akumulasi cAMP. Kompleks *catabolite activator protein* (CAP)-cAMP menstimulasi transkripsi gen *lactose operon* (*lac operon*) yang diperlukan untuk transportasi dan metabolisme laktosa sebagai sumber karbon. Gen *lac operon* hanya akan ditranskripsi kuat pada saat glukosa tidak ada dan laktosa ada. RNA polimerase tidak dapat memulai transkripsi apabila jumlah kompleks CAP-cAMP rendah yang karena adenilat siklase terhambat oleh konsentrasi glukosa yang cukup. CAP adalah aktivator transkripsional *trans-acting* yang mengaktifkan transkripsi melalui interaksi protein dengan subunit dari RNA Polymerase. CAP disebut juga *cAMP receptor protein* (CRP). CAP berikatan dengan cAMP diperlukan agar RNA polimerase dapat melekat pada promoter secara efisien di hulu promoter menyebabkan transkripsi berlangsung (Gambar 9) (22,23).



Gambar 10. Skema aktivasi cAMP/PK ketika sel kekurangan glukosa (23)

Regulasi DLD meningkat signifikan setelah reperfusi dibandingkan iskemia(34).Peningkatan regulasi DLD merupakan kompensasi atas kekurangan energi dan upaya untuk memenuhi kebutuhan untuk mempertahankan agar sel tidak mati (54), tanpa disertai peningkatan aktivitas diaforase meskipun aktivitas dehydrogenase meningkat (55). Peningkatan DLD akan meningkatkan jumlah NADH dan lipoamide yang penting untuk pembentukan energi dan antioksidan (9). DLD diregulasi secara independen dalam kompleks enzimnya, sehingga jika berlebihan maka tidak menyebabkan kompleknya berlebihan tetapi berguna sebagai antioksidan yang penting untuk melindungi sel dari cedera stres oksidatif (34).

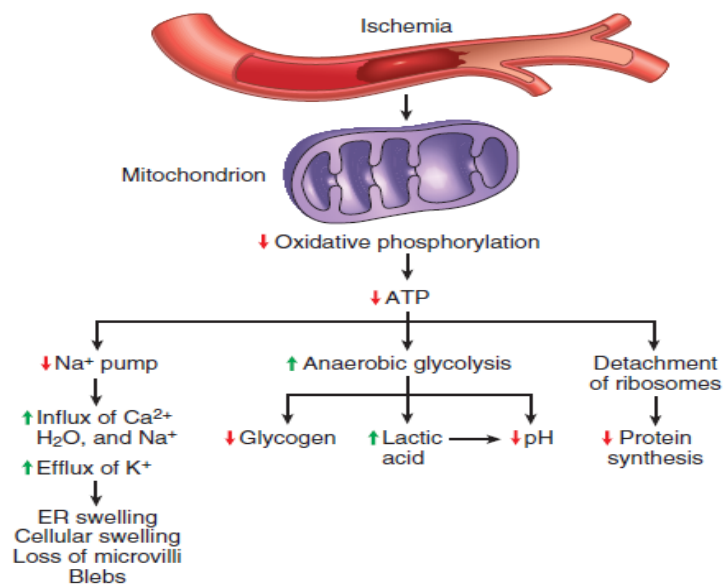
II. 3. CEDERA GINJAL ISKEMIA

Iskemia mengakibatkan proses fosforilasi oksidatif terhenti yang mengakibatkan berbagai perubahan biokimia intrasel terutama penurunan ATP yang drastis. (2).

Iskemia sel selama 5-15 menit mengakibatkan kerusakan reversibel, tetapi iskemia sekitar > 30 menit dapat mengakibatkan kerusakan ireversibel. (2). Iskemia ginjal \leq 30 menit tidak menyebabkan cedera permanen(2,3).

Penurunan ATP sebanyak 5%-10% dari nilai normal sudah dapat menyebabkan edema dan dilatasi retikulum endoplasma; akumulasi laktat dengan inaktivasi enzim intrasel; peningkatan permeabilitas transisi mitokondria (mPT) yang mengakibatkan kegagalan pembentukan ATP dan

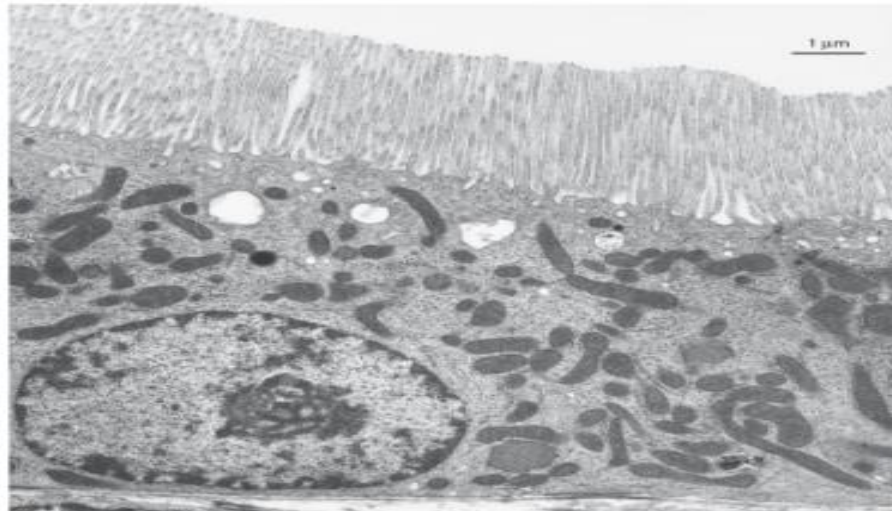
kerusakan struktur retikulum endoplasma, ribosom terlepas dan sintesis protein terhenti. Akibat perubahan tersebut maka terjadi kerusakan pada mitokondria dan membrane lisosom yang irreversibel yaitu kematian sel nekrosis(2).



Gambar 11. Perubahan biokimia akibat penurunan ATP pada iskemia (1,2)

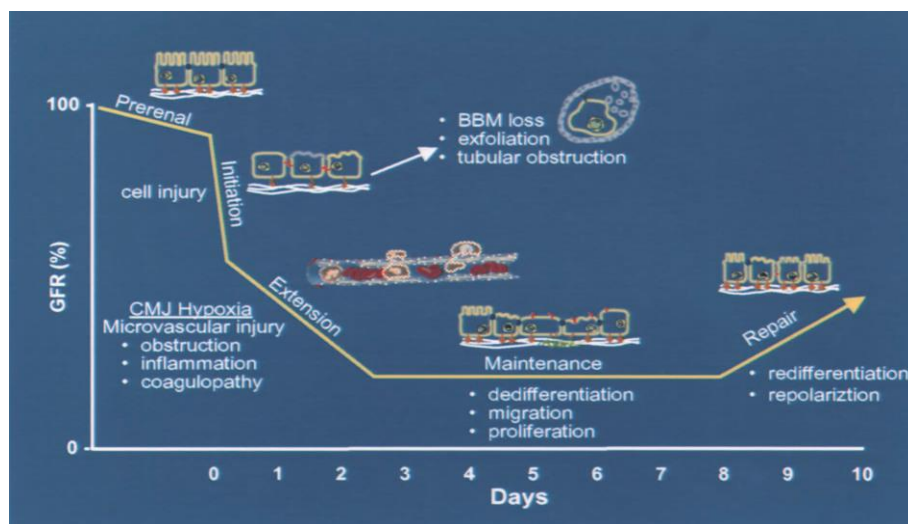
II.3.1 Cedera Tubulus Ginjal Akut Pada Iskemia

Ginjal bagian tubulus sangat sensitive terhadap iskemia, terutama bagian proksimal segmen S3 (2,56). Segmen S3 adalah sisa dari tubulus proksimal terletak di korteks bagian dalam dan garis luar medula luar. (57).



Gambar 12. Tubulus proksimal segmen S3. Batas *brush border* tinggi, tetapi aparatus endositik-lisosom kurang menonjol dibandingkan segmen S1 dan S2. Invaginasi basolateral jarang, dan mitokondria tersebar secara acak di seluruh sitoplasma (57)

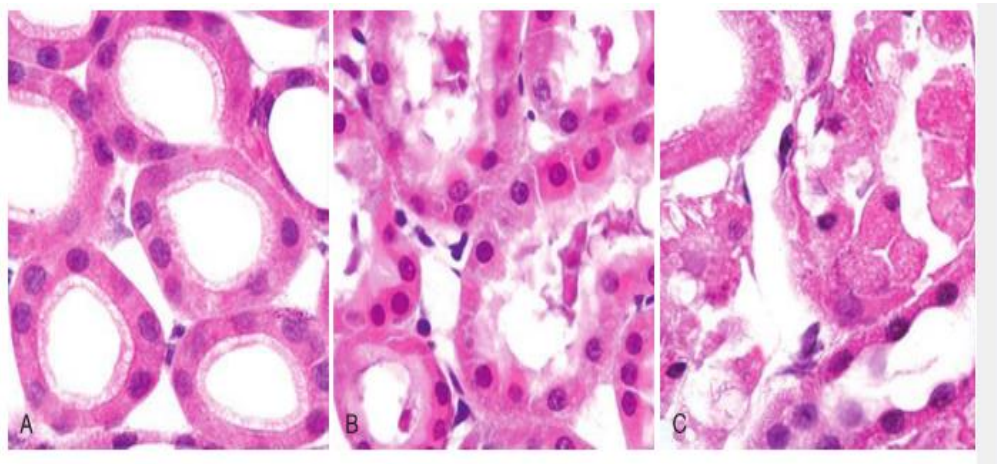
Fase-fase cedera tubulus ada 4 yaitu fase *inisiasi*, *ekstensi*, *maintenance* dan *recovery* (Gambar 13) .



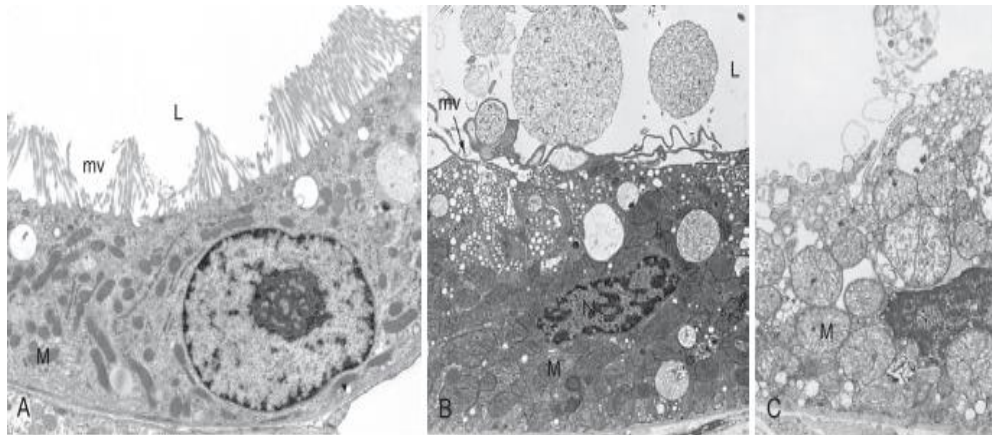
Gambar 13. Fase-fase cedera tubulus akut pada iskemia/reperfusi (4)

1. Fase Inisiasi

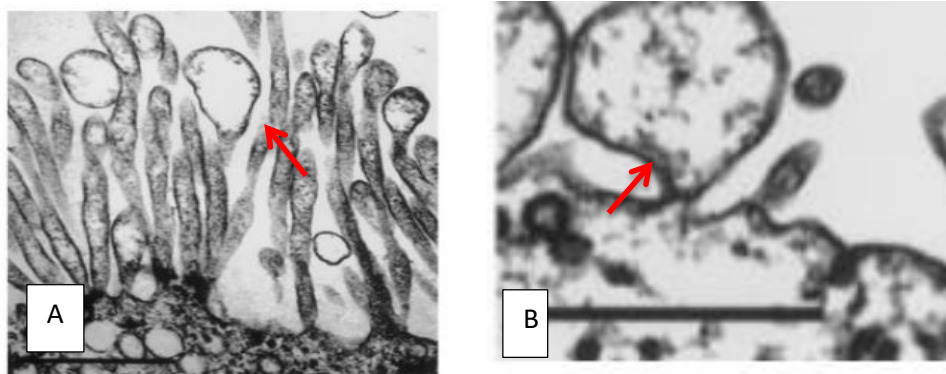
Fase inisiasi merupakan fase cedera sub-letal (reversibel). Fase ini diawali oleh perubahan biokimia yang drastis terutama penurunan ATP, peningkatan kalsium intraseluler, depolarisasi sel, gangguan sitoskeleton basolateral dan apical epitel tubulus (3,12). Kurangnya ATP sel mengakibatkan kegagalan pompa ion energi-dependent pada membran plasma (Na/K ATPase) sehingga cairan tertarik ke dalam sel mengakibatkan gangguan homeostasis ion dan cairan, edema mitokondria dan organelnya lainnya.(1,2,58).



Gambar 14. Morfologi tubulus ginjal pada cedera ginjal reversibel dan nekrosis. (A) Sel epitel yang hidup di tubulus ginjal normal. (B) Bleb permukaan, peningkatan eosinofilia sitoplasma, dan edema beberapa sel pada cedera iskemia awal (reversibel). (C) Nekrosis sel epitel (cedera ireversibel), dengan hilangnya inti, fragmentasi sel, dan kebocoran isi.(2).



Gambar 15. tanda-tanda ultrastruktural menunjukkan kerusakan sel yang reversibel dan ireversibel (nekrosis). (A) Mikrograf elektron dari sel epitel tubulus ginjal proksimal normal. Permukaan luminal dilapisi dengan banyak mikrovili (mv) (L). (B) Kerusakan sel awal akibat reperfusi iskemia pada sel epitel tubulus proksimal. Mikrovili telah hilang dan terintegrasi ke dalam sitoplasma apikal, sedangkan bleb telah terbentuk dan dikeluarkan ke dalam lumen. Mitokondria (M) akan mengembang selama iskemia, tetapi dengan cepat terkondensasi dan menjadi padat elektron setelah reperfusi. (C) Cedera lanjut pada sel tubulus proksimal, yang ireversibel. Mitokondria yang membesar dengan endapan padat elektron, yang diperkirakan menyimpan kalsium dan protein. Mikrograf sel pada perbesaran yang lebih tinggi akan mengungkapkan plasma yang terganggu.(2)

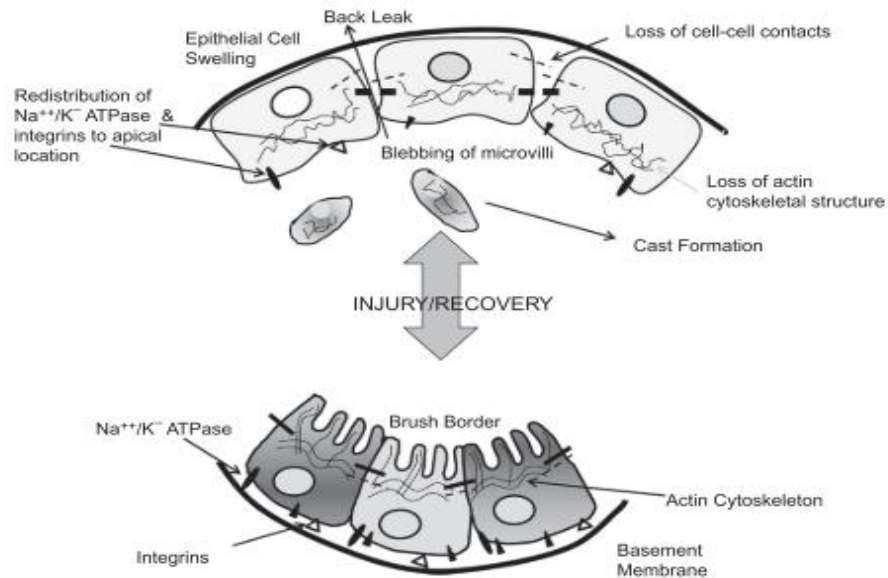


Gambar 16. Mikroskopik tubulus proksimal pada fase awal cedera iskemik (reversibel) menunjukkan *bleb* di permukaan ujung mikrovili (A). Blebs di sisi apikal sel tubulus proksimal yang rusak parah yang telah kehilangan mikrovili akibat kehabisan energi sel (B) (59)

Pada fase ini, terjadi degenerasi inti F-aktin mikrovillar dengan cepat dan progresif, menyebabkan depolimerisasi dan kerusakan aktin mikrovillar (*brush border*) dan bagian apikal hilang melalui pembentukan *blebbing*, vakuolisasi dan terlepasnya sel dari membrane basal.

Depolarisasi mengakibatkan redistribusi protein membrane (pompa Na⁺, K⁺-ATPase) dari basolateral ke permukaan lumen sel-sel tubulus (58). Letak Blebs saat cedera sub-lethal adalah di ujung mikrovili sedangkan bila sudah rusak lebih parah dan kehilangan mikrovili maka blebs terletak di sisi apikal (59).

Setelah reperfusi, dan ATP telah kembali normal, maka pompa Na/K/ATPase kembali ke lokasi basolateral. Degenerasi inti F-aktin mikrovillar bulbus proksimal dengan cepat dan progresif, yang menyebabkan depolarisasi aktin mikrovillar sehingga struktur morfologi mikrovillar berubah yaitu hilangnya membran plasma bagian apikal melalui pembentukan *blebbing* (Gambar 17). (58). Depolarisasi mengakibatkan penurunan reabsorpsi natrium oleh tubulus proksimal dan meningkatnya transfer natrium ke tubulus distal yang mengakibatkan vasokonstriksi arteriole aferen yang memperburuk cedera ketika reperfusi.



Gambar 17. Sketsa cedera subletal pada sel tubulus. (58)

2. Fase ekstensi cedera

Fase ekstensi ini terjadi pada 1 sampai 2 hari setelah reperfusi iskemia ginjal. Fase ini lebih berat dari cedera pada fase inisiasi, yang disertai dengan cedera endotel kapiler (4), peningkatan vasokonstriktor endotelin (ET-1) endotel dan penurunan vasodilator nitrit oksida (NO) dan prostaglandin (1). Cedera endotel ini mengakibatkan disfungsi endotel dan pelepasan mediator inflamasi. Sel-sel epitel yang cedera berat mengalami dediferensiasi dan repolarisasi epitel.(58).

3. Fase Maintenance : Fase ini terjadi perbaikan, migrasi, apoptosis, dan proliferasi.

4. **Fase Recovery:** Fase ini terjadi diferensiasi sel lanjutan, polaritas sel dan fungsi sel kembali normal (4)

II.4. CEDERA GINJAL ISKEMIA-REPERFUSI (*KIDNEY ISCHEMIA REPERFUSION INJURY*)

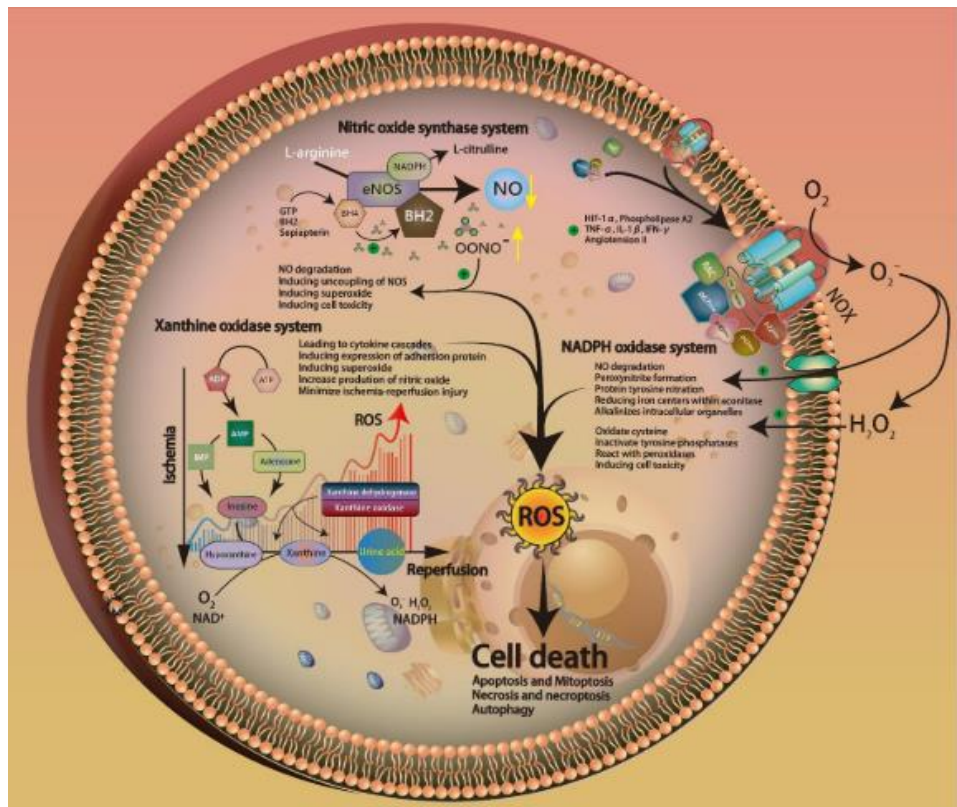
Reperfusi bertujuan untuk memulihkan ATP melalui respirasi aerobik seluler (58). Walaupun demikian, reoksigenasi pada jaringan iskemia dapat membangkitkan respon patologis yang dengan cepat menimbulkan cedera baru sehingga menimbulkan cedera yang lebih daripada cedera iskemianya. Cedera ini disebut *ischemia reperfusion injury* (60). *Ischemia reperfusion injury* (IRI) merupakan penyebab utama *Acute Kidney Injury* (AKI) (1–3).

II.4.1 Mekanisme cedera iskemia-reperfusi.

Patogenesis IRI secara umum melibatkan *stres oksidatif* (Gambar 18), “*no-reflow*” (Gambar 19), dan inflamasi steril (61) .

a. Stres oksidatif

Setelah iskemia-reperfusi, ROS sangat cepat terbentuk yaitu sekitar 20 detik setelah reperfusi (62). Pembentukan ROS saat reoksigenasi oksidase bersumber dari terlepasnya elektron dari rantai respirasi mitokondria yang cedera saat iskemia, oksidasi hipoxantin menjadi xantin lalu asam urat (sistem xantin oksidase) dan NADPH oksidase (Gambar 18) (63).



Gambar 18. Mekanisme pembentukan ROS pada cedera iskemia-reperfusi.(63)

Stres oksidatif setelah reperfusi merupakan penyebab awal *Ischemia reperfusion injury* (4,64–74). Stres oksidatif menyebabkan disfungsi endotel ginjal yaitu hilangnya respon vasodilator terhadap asetilkolin dan bradikinin, gangguan fungsi kaskade koagulasi dan/atau proses inflamasi, peningkatan nitrit oksida (NO) ginjal sebagai respon untuk mempertahankan fisiologis endotel, peningkatan reaktivitas Angiotensin II di korteks ginjal dan medulla dan efek vasokonstriktor adenosine. Terjadi ketidakseimbangan eNOS dan iNOS dan penurunan eNOS sekunder akibat kerusakan endotel, menyebabkan hilangnya sifat antitrombogenik endotel dan

peningkatan kerentanan terhadap trombosis mikrovaskular. Aktivasi *thrombocyte factor* melalui fosfolipase A2 yang dipicu oleh Ca^{++} . (75).

b. Inflamasi steril.

Inflamasi steril dimulai sejak 30 menit pertama reperfusi yang diawali dari adhesi neutrofil, infiltrasi makrofag dan sel NK, serta aktivasi komplemen (76,77). Interaksi neutrofil dengan endotel mengakibatkan disfungsi arteriolar, kapiler, dan pascapiler pada mikrosirkulasi tubulus ginjal (78) yaitu peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan penurunan integritas sel epitel tubulus dan endotel diakibatkan oleh pelepasan mieloperoksidase dan protease, spesies oksigen reaktif dan sitokin. (2-4,77,79-81).

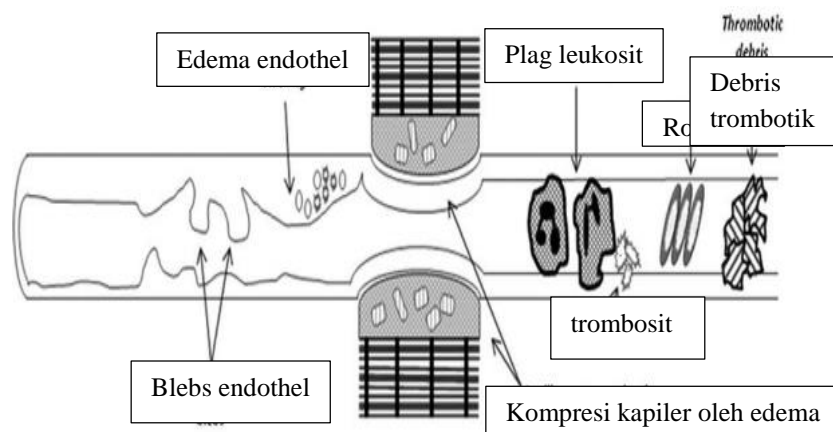
Ekspresi *intercelluler molecule adhesi-1* (ICAM1) endotel kapiler peritubular mengakibatkan peningkatan perlengketan neutrophil pada setelah 2 hingga 4 jam reperfusi (78), sedangkan induksi IL-1, TNF- α , terlihat setelah 6 jam reperfusi dan tetap meningkat hingga 48 jam reperfusi (82,83). Diferensiasi monosit darah menjadi makrofag jaringan terjadi setelah 1 jam reperfusi, yang memuncak setelah 24 jam reperfusi, bertahan selama tujuh hari (84).

c. Fenomena “no-reflow”

Fenomena *no-reflow* adalah kegagalan sebagian besar kapiler untuk mengalirkan darah ke jaringan yang telah mengalami iskemia (76,85–89). Pada iskemia - reperfusi, kejadian *no-reflow* sekitar 5% - 50% (86). “No - reflow” mengakibatkan iskemia sekunder (65,67,73,90–93). Mekanisme terjadinya ‘no-reflow’ :

- 1) Autoregulasi vaskular yaitu peningkatan aktivitas saraf simpatik, aktivasi sistem endotelin alfa - adrenergik yang mengakibatkan vasokonstriksi kapiler peritubulus (88,89,94).
- 2) Disfungsi endotel yaitu penurunan sintesis vasodilator endotel seperti nitrat oksida (95). Pada permukaan endoluminal sel yang terluka menyebabkan pelepasan sitokin vasoaktif dalam jumlah banyak (misalnya, faktor nekrosis tumor-alfa (TNF-alfa) dan berbagai interleukin, serta endotelin, sebagai akibat dari interaksi leukosit-endotel, oklusi lumen mikrovaskular, dan migrasi leukosit ke dalam cairan interstitial. Peningkatan vasokonstriksi diakibatkan oleh produksi sitokin vasoaktif dalam jumlah banyak (misalnya, faktor nekrosis tumor-alfa (TNF-alfa) dan berbagai interleukin, serta endotelin, sebagai akibat dari interaksi leukosit-endotel (3). Degradasi vascular selama iskemia reperfusi mengakibatkan integritas kapiler hilang dan *vaskular rhexis* (96).
- 3) Aktivasi trombosit yang mengekspresikan P-selectin dan ligannya kompleks *interceluler adhesion molecule -1* (ICAM-1) memediasi

- adhesi trombosit ke sel endotel dan leukosit, serta migrasi leukosit (88,89). Trombosit yang teraktivasi melepaskan sejumlah molekul proinflamasi dan mitogenik, termasuk IL-1b terlarut (83), hidrogen peroksida (97) dan molekul proapoptotik (calpain, transforming growth factor beta /TGF- β) (85,88,98).
- 4) Edema pasca iskemik berperan penting mengakibatkan kompresi ekstravaskular karena dikelilingi oleh struktur yang membatasi ekspansi jaringan. Peningkatan filtrasi cairan transmikrovaskular dari darah ke ruang interstitial, ketika digabungkan dengan perubahan fluks ion seluler dan edema sel menghasilkan peningkatan hematokrit mikrovessel sehingga resistensi mikrovaskuler terhadap aliran darah meningkat akibat peningkatan viskositas darah, yang dapat memperburuk perfusi kapiler pada jaringan postiskemik (88,96).



Gambar 19. Mekanisme “no-reflow” (88).

d. Aktivasi komplemen.

Deposisi komplemen berkontribusi mengubah homeostasis pembuluh darah dan mengakibatkan “*no-reflow*“ kapiler setelah reperfusi iskemia. Deposisi komplemen C3 di sepanjang sel tubulus ginjal dapat dilihat sejak 6 jam setelah reperfusi (3). C5a menginduksi respon inflamasi dengan menginduksi produksi sitokin MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein -1*), TNF- α , IL-1, dan IL-6. C5b-9 dan C3b dapat mengubah homeostasis pembuluh darah. C5b-9 dapat mengaktifkan NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) untuk meningkatkan transkripsi dan ekspresi molekul adhesi leukosit. C5b-9 mengubah tonus pembuluh darah dengan menghambat relaksasi endotel dan penurunan cyclic guanosin monofosfat(cGMP) endotel (2,3,99).

II.4.2 Mekanisme kematian sel pada cedera iskemia-reperfusi.

Stress oksidatif berperan penting untuk menginduksi kematian sel pada iskemia reperfusi ada 4 yaitu autophagy, apoptosis, nekrosis dan nekroptosis (4,63,66,71,72,100–106).

a) Autophagy:

Reperfusi pada jaringan iskemia mengaktifasi proses autophagy sebagai respons terhadap krisis ATP dan stres oksidatif yang berkontribusi pada proteostasis. Pembentukan ATP yang dimediasi autophagy, mengurangi krisis energi selama fase iskemia. Namun,

autophagy yang hiperaktif akan menghilangkan protein atau organel yang diperlukan sel sehingga menyebabkan disfungsi seluler dan kematian sel autophagi. Mitophagy mengkompensasi cedera mitokondria selama IRI. (63,102).

b) Apoptosis

Reperfusion iskemia menyebabkan kematian sel apoptosis selain nekrosis. Apoptosis membentuk *apoptotic bodies* melalui proteolisis yang memicu fragmentasi inti dan pembentukan (2,4,105,107–109).

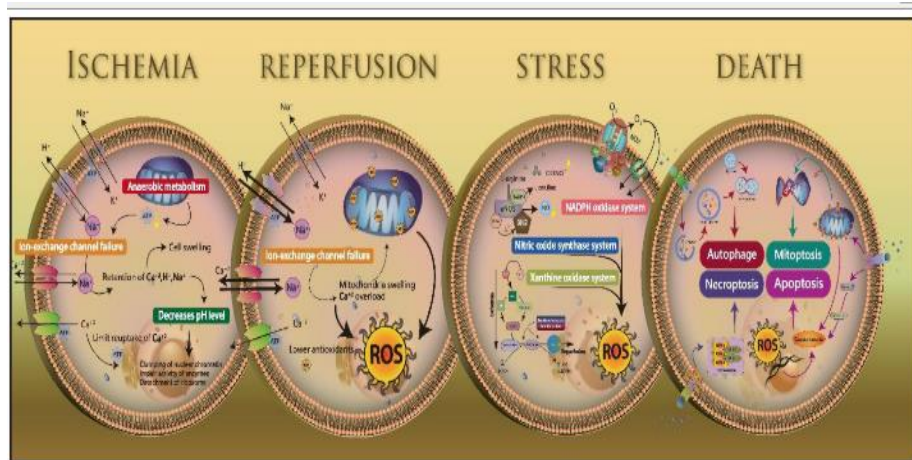
ROS menginduksi ligan kematian, TNF- α , mengaktifkan kaskade kaspase untuk menyebabkan kematian sel melalui proteolisis. (63).

Peningkatan ROS setelah reperfusion mengaktifkan Bcl-2- pro-apoptosis sehingga terbuka *mitochondria permeability transition pore* (mPTP) yang mengakibatkan edema mitokondria dan pelepasan factor pro-apoptosis seperti sitokrom-c ke sitoplasma yang memicu aktivasi kaspase kaskade untuk menyebabkan kematian sel melalui proteolisis yang memicu fragmentasi inti dan pembentukan *apoptotic bodies*. (2,4,105,107–109)

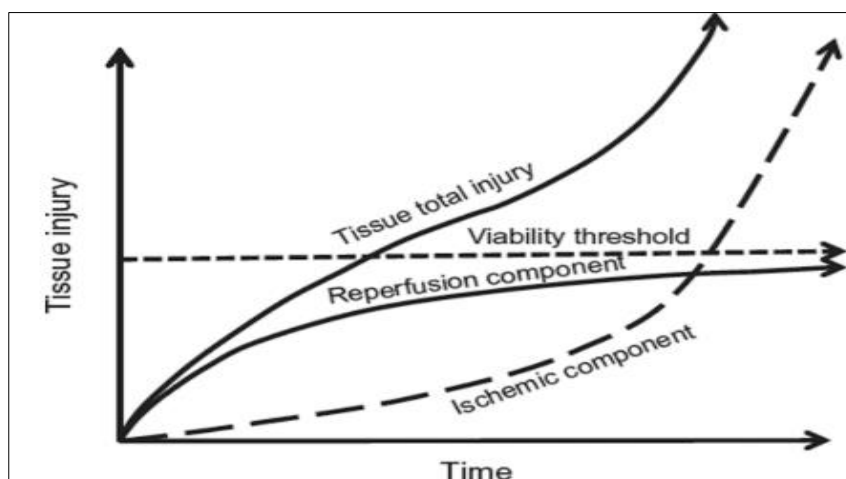
c) Nekrosis dan nekroptosis.

Kematian sel nekrosis setelah reperfusion diakibatkan oleh mPTP yang terbuka (110). Nekrosis yang terprogram melalui jalur molekuler khusus disebut nekroptosis. Nekroptosis diprakarsai oleh sitokin mirip TNF yang mengaktifkan RIP (*receptor-interacting protein*) kinase untuk memediasi nekrosis melalui peningkatan ROS dan *overload*

kalsium yang memodulasi mPTP mitokondria, menyebabkan deplesi ATP, produksi ROS bertambah, edema dan ruptur membran mitokondria. Nekroptosis dan apoptosis diakibatkan oleh disfungsi mitokondria (73,111–114). Nekrosis dan apoptosis dan dapat menyebabkan autophagi begitupun sebaliknya serta dapat menyebabkan nekroptosis (115), (80)



Gambar 20. Mekanisme cedera iskemia-reperfusion yang menginduksi kematian sel. (63).



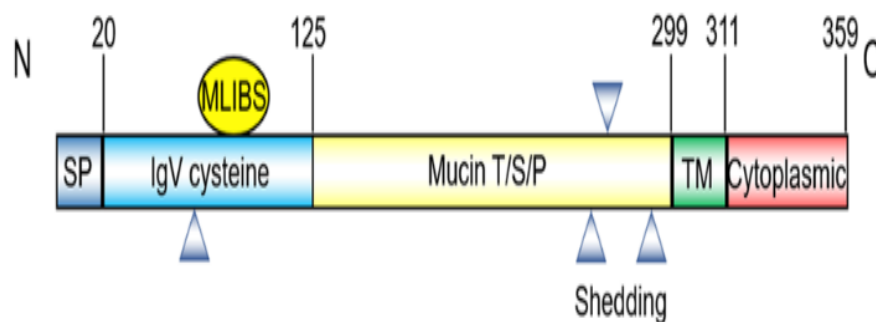
Gambar 21. Cedera pada reperfusion lebih cepat menghasilkan cedera berat dibandingkan iskemia (60)

II.5. KIDNEY INJURY MOLECULE-1 (KIM-1)

II.5.1 Struktur dan fungsi KIM-1

a. Struktur KIM-1

Struktur protein KIM-1 adalah sinyal peptida(SP), IgV, musin, transmembran (TM), dan domain sitoplasma (gambar 22). *Kidney injury molecule-1* (KIM-1) adalah glikoprotein membran sel tipe I yang mengandung domain immunoglobulin dan domain musin (ekstraseluler). KIM-1 terlokalisasi terutama pada membran apikal sel tubulus proksimal ginjal (20,116)



Gambar 22: Skema KIM-1, menunjukkan domain sinyal peptide (SP), IgV cysteine – MLIBS= situs pengikatan ligan yang bergantung pada ion logam, musin – T/S/P = treonin/serin/prolin, transmembran (TM), dan sitoplasma. Segitiga adalah lokasi glikosilasi terkait-N. (20)

b. Fungsi KIM-1

1. Fagosit semiprofessional:

Domain immunoglobulin (IgV) yang mengandung enam-sistein bertanggung jawab untuk interaksi matriks sel-sel dan sel ekstraseluler. Domain musin yang mengandung Thr/Ser/Proline berperan ganda dalam

konfigurasi dan perlindungan serta terlibat dalam adhesi sel. Domain sitoplasma KIM-1 relatif pendek dan memiliki situs fosforilasi potensial, menunjukkan bahwa KIM-1 merupakan molekul pensinyalan (117).

Domain immunoglobulin (IgV) adalah komponen antibodi, reseptor, dan molekul adhesi, dan berfungsi sebagai pengikatan fosfatidilserin dan fosfolipid teroksidasi yang ada pada permukaan sel apoptosis (118). Sel-sel apoptotik dan fragmennya menghasilkan sejumlah sinyal “*eat me*”, yaitu fosfatidilserin yang “membalik” ke bagian luar membrane sel apoptosis sehingga dikenali oleh fagosit (2) dan protein KIM-1(119).

Epitel tubulus yang mengekspresikan KIM-1 akan yang mengikat dan menginternalisasi tubuh apoptosis dan fragmennya. KIM-1 mampu secara khusus mengenali epitop fosfatidilserin spesifik permukaan sel apoptosis, dan lipoprotein teroksidasi yang diekspresikan oleh sel epitel tubular apoptosis. Sel yang mengekspresikan KIM-1 dapat menelan dan menghilangkan sel-sel apoptosis, yang melindungi ginjal setelah cedera akut dengan menurunkan innate immunity dan inflamasi. (120,121).

2. Fungsi antiinflamasi

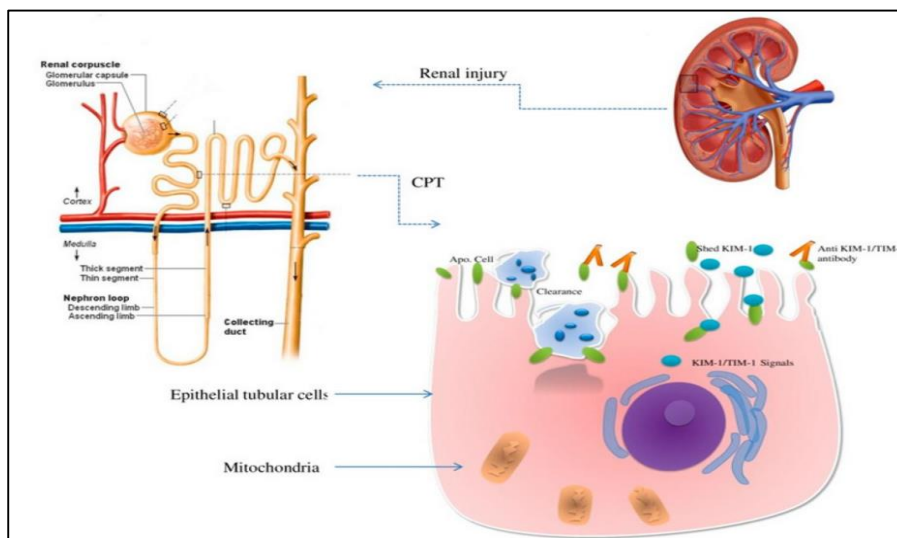
Keampuan KIM-1 untuk memfagositosis benda apoptosis dan debris nekrosis akan mengurangi atau mencegah respon innate immunity dan inflamasi (120,121). Ekspresi KIM-1 juga mengaktivasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) nucleus sehingga menekan ekspresi sitokin proinflamasi dan membatasi infiltrasi sel imun (122,123).

3. Fungsi remodeling

Deformasi sel epitel tubulus proksimal menjadi fagosit semiprofessionnal (KIM-1) berperan penting untuk modulasi respon imun dan proses perbaikan tubulus yang cedera (121,124,125). Sel epitel tubulus yang mengekspresikan protein KIM-1 adalah sel yang membran apikalnya telah kehilangan *brush border* (microvilli) (126).

II.5.2 Ekspresi KIM-1 Pada Cedera Tubulus Ginjal Akut

Pada iskemia reperfusi ginjal, KIM-1 terekspresi tinggi pada epitel tubulus proksimal yang cedera (14,15,20,127). Semakin berat cedera tubulus maka semakin tinggi ekspresi protein KIM-1 (17–21). Ekspresi KIM-1 ini merupakan respons sel terhadap cedera (128) yang terekspresi cepat sejak fase inisiasi cedera (16).



Gambar 23. Imunoglobulin - musin KIM-1 terekspresi dalam sel tubulus proksimal (CPT) setelah memfagosit sel-sel apoptosis setelah kerusakan ginjal. KIM-1 sebagai reseptor phosphatidylserine mempromosikan fagositosis apoptosis dan debris nekrotik setelah domain ekstraseluler hilang (129,130)

KIM-1 diekspresikan dalam sel epitel tubulus proksimal yang terdiferensiasi di daerah yang cedera. Sel-sel epitel tubulus proksimal yang hidup yang berbatasan dengan area yang rusak akan mengalami diferensiasi dan proliferasi untuk regenerasi epitel tubulus dan menyusun kembali lapisan epitel fungsional yang utuh. Transisi sel epitel dari normal ke terdediferensiasi ini terlibat dalam peningkatan progresif regulasi ekspresi KIM-1 (117). Peningkatan ekspresi KIM-1 juga terdapat pada sel yang migrasi yang terdediferensiasi dan memfasilitasi pemulihan lapisan epitel (8,131,132). Peningkatan ekspresi KIM-1 mempercepat penyembuhan cedera tubulus dan mengurangi respon inflamasi ginjal pada tahap awal cedera tubulus ginjal. (122,123,133).

KIM-1 terekspresi juga pada epitel tubulus yang sedang replikasi dalam fase remodeling dan berlangsung sampai sel pulih sepenuhnya (134–137). Ekspresi berlebih KIM-1 yang bersifat sementara ini dapat meningkatkan migrasi dan proliferasi sel epitel tubulus ginjal dengan aktivasi jalur pensinyalan ERK/MAPK sehingga memfasilitasi proses perbaikan ginjal (138).

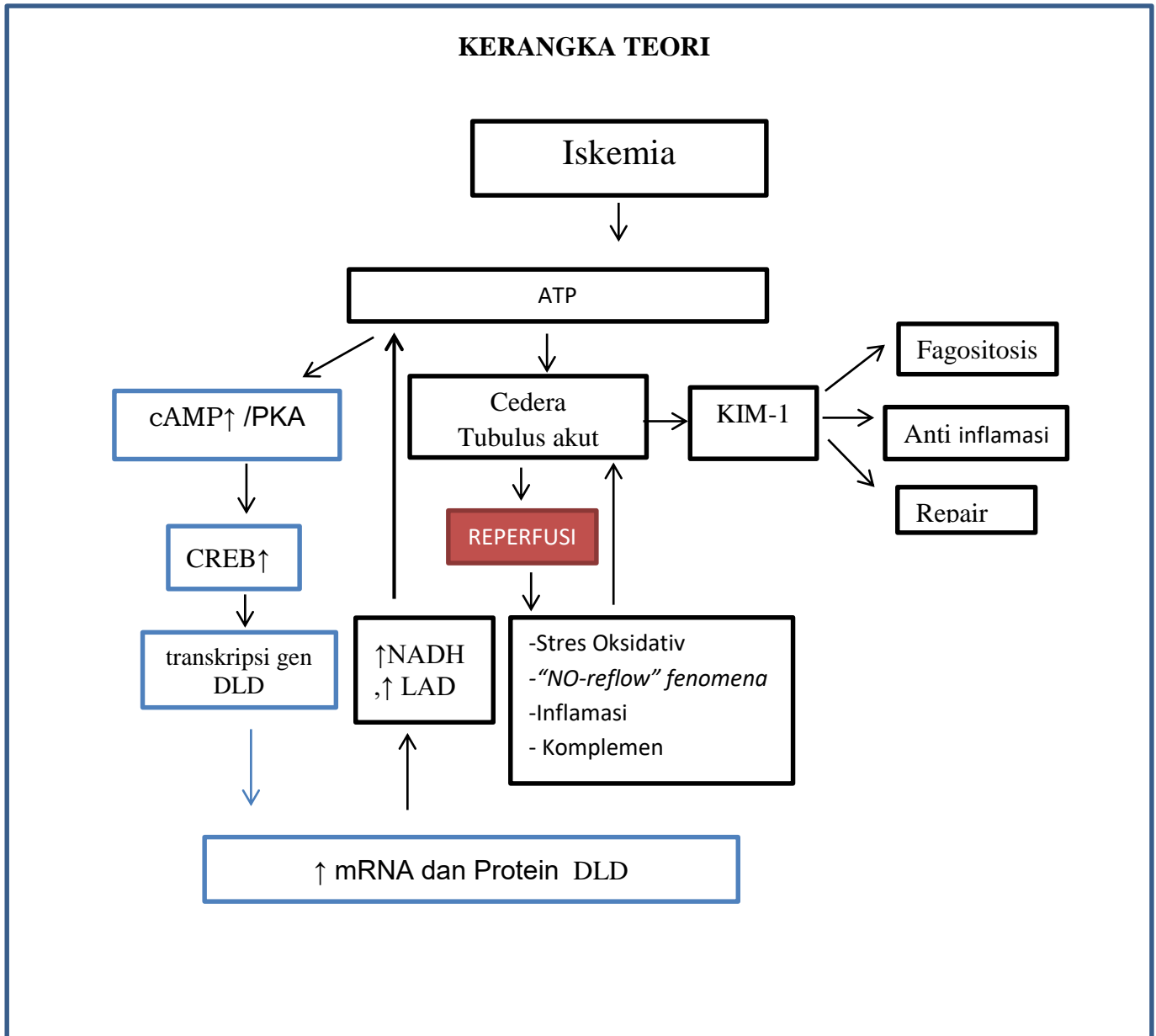
KIM-1 diekspresikan juga terkepresi dalam limfosit teraktivasi dan/atau sel myeloid pada ginjal yang terluka. KIM-1 tubulus berkontribusi untuk pembersihan sel apoptosis dan nekrotik, namun jika ekspresinya diperpanjang, itu juga dapat berkontribusi pada penyerapan lipid teroksidasi. Dalam respon imun yang diinduksi cedera, limfosit teraktivasi dapat mengekspresikan sedikit KIM-1.

Antibodi dapat mempromosikan atau menghambat pengikatan ligan ke KIM-1, termasuk LDL (low-density lipoprotein).(130)

II.5.3 Regulasi Ekspresi KIM-1

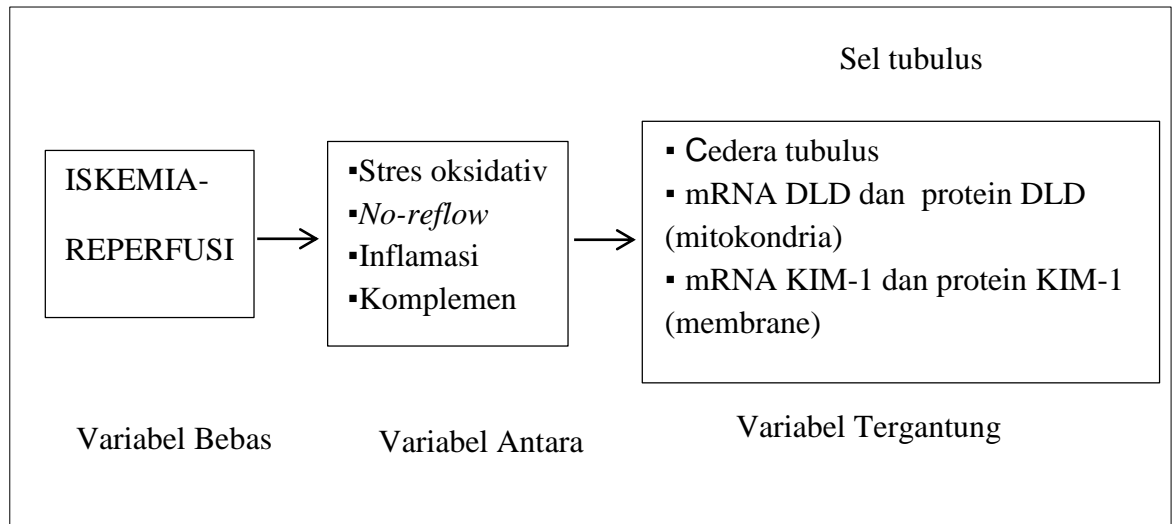
Regulasi ekspresi KIM-1 ,bergantung pada aktivasi *extracellular signal- regulated kinase 1/2* (ERK1/2). ERK1/2 adalah jalur pensinyalan sentral yang mengatur berbagai macam proses seluler yang distimulasi, terutama proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup, serta apoptosis dan respons stres. Peningkatan ERK1/2 akan meningkatkan fosforilasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) nukleus. STAT3 nukleus dengan mengikat promotor spesifik KIM-1 sehingga meningkatkan level mRNA dan protein KIM-1 (139,140). Penekanan ERK1/2 akan menghambat peningkatan fosforilasi STAT3, sehingga menurunkan ekspresi mRNA KIM-1(141).

II.6. KERANGKA TEORI PENELITIAN



II.7. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

GINJAL



II.8. HIPOTESA

1. Terdapat peningkatan cedera tubulus ginjal iskemia reperfusi dibandingkan pada iskemia dan sehat
2. Terdapat peningkatan ekspresi mRNA dan protein DLD pada ginjal iskemia reperfusi iskemia dibandingkan pada iskemia dan sehat
3. Terdapat peningkatan ekspresi mRNA dan protein KIM-1 pada ginjal iskemia reperfusi dibandingkan pada iskemia dan sehat

II.9. DEFINISI OPERASIONAL

1. Iskemia ginjal adalah terhentinya aliran darah ke ginjal setelah oklusi total arteri dan vena renalis selama 30 menit dengan menggunakan mikro-clamp vascular (*bulldog clamp*). Lamanya waktu iskemia, diukur dengan menggunakan timer
2. Reperfusi adalah mengalirnya aliran darah arteri dan vena renalis yang telah dijepit dengan cara melepas mikro-clamp vascular (*bulldog clamp*)
3. Ekspresi mRNA DLD adalah ekspresi *messenger RNA* gen DLD yang diperiksa dengan metode *Real Time* PCR dan dinyatakan dalam satuan *Fold Change*.
4. Ekspresi mRNA KIM-1: adalah ekspresi *messenger RNA* gen KIM-1 yang diperiksa dengan metode *Real Time* PCR dan dinyatakan dalam satuan *Fold Change*.
5. Ekspresi protein DLD adalah ekspresi protein DLD pada jaringan ginjal yang diperiksa dengan metode imunohistokimia. Evaluasi menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali pada 10 lapangan oleh ahli patologi anatomi yang tidak mengetahui kelompok hewan yang dianalisa. Hasil dinyatakan dalam skoring ekspresi skor 0 sampai 4, yaitu : 0, tidak terekspresi ; 1, area terekspresi < 25% tubulus; 2, area terekspresi 26-50% tubulus; 3, area terekspresi 51-75% tubulus; 4, area terekspresi > 75 % tubulus.

6. Ekspresi protein KIM-1 adalah ekspresi protein KIM-1 pada jaringan ginjal yang diperiksa dengan metode immunohistokimia. Evaluasi menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali pada 10 lapangan oleh ahli patologi anatomi yang tidak mengetahui kelompok hewan yang dianalisa. Hasil dinyatakan dalam skoring ekspresi skor 0 sampai 4, yaitu : 0, tidak terekspresi ; 1, area terekspresi < 25% tubulus; 2, area terekspresi 26-50% tubulus; 3, area terekspresi 51-75% tubulus; 4, area terekspresi > 75 % tubulus.
7. Cedera tubulus adalah perubahan morfologi pada interstitium tubulus berdasarkan pemeriksaan histopatologis menggunakan pewarnaan Hermotoxylin-Eosin (HE), yang ditandai dengan edema epitel tubulus, degenerasi, nekrosis, infiltrasi sel inflamasi, dan fibrosis interstitial tubulus. Beratnya cedera dinyatakan dengan skor cedera tubulus skala 0 sampai 4, yaitu : 0, normal; 1, area kerusakan 1- 25% tubulus; 2, area kerusakan 26-50% tubulus; 3, area kerusakan 51-75% tubulus; 4, area kerusakan > 75 % tubulus.