

SKRIPSI

**HUBUNGAN KADAR TNF-ALFA SERUM DENGAN FUNGSI GINJAL
SETELAH PEMBERIAN *HIBISCUS SABDARIFFA* PADA TIKUS
WISTAR YANG TERINDUKSI PARASETAMOL**



OLEH :

Andika Sulastriani

C011171377

PEMBIMBING :

dr. Nursyamsi, Sp.M, M.Kes

DOKTER PENGUJI :

Dr. dr. Batari Todja Umar, Sp. M(K)

dr. Triani Hastuti Hatta, Sp.KK, M.Kes

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

2021

DEPARTEMEN HISTOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN

2020

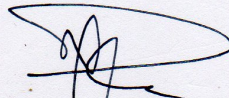
TELAH DISETUJUI UNTUK DICETAK DAN DIPERBANYAK

Judul Skripsi

"HUBUNGAN KADAR TNF-ALFA SERUM DENGAN FUNGSI GINJAL SETELAH
PEMBERIAN *HIBISCUS SABDARIFFA* PADA TIKUS WISTAR YANG TERINDUKSI
PARASETAMOL"

Mengetahui,

Pembimbing,



dr. Nursvamsi, M.Kes, Sp.M
NIP . 19800702 201212 2 002

HALAMAN PENGESAHAN

**HUBUNGAN KADAR TNF-ALFA SERUM DENGAN FUNGSI GINJAL SETELAH
PEMBERIAN *HIBISCUS SABDARIFFA* PADA TIKUS WISTAR YANG TERINDUKSI
PARASETAMOL**

Disusun dan diajukan oleh:

ANDIKA SULASTRIANI
C011171377

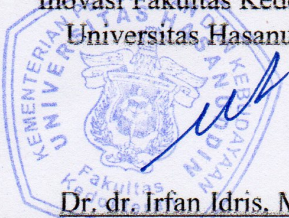
Menyetujui

Panitia Penguji

No.	Nama Penguji	Jabatan	Tanda Tangan
1.	dr. Nursyamsi, M. Kes, Sp.M	Pembimbing	
2.	Dr. dr. Batari Todja Umar, Sp.M(K)	Penguji 1	
3.	dr. Triani Hastuti Hatta, M. Kes, Sp.KK	Penguji 2	

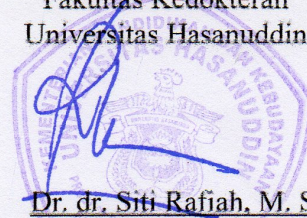
Mengetahui,

Wakil Dekan
Bidang Akademik, Riset &
Inovasi Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Dr. dr. Irfan Idris, M. Kes
NIP. 19671103 199802 1 0001

Ketua Program Studi
Sarjana Kedokteran
Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Dr. dr. Siti Rafiah, M. Si
NIP. 19680530 199703 2 0001

LEMBARAN PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Andika Sulastriani
NIM : C011171377
Program Studi : Pendidikan Dokter
Tempat dan tanggal lahir : Bone, 07 April 1999
Alamat email : andikasulastriani07@gmail.com
Nomor handphone : 085250745452

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Hubungan Kadar Tnf- α Serum Dengan Fungsi Ginjal Setelah Pemberian *Hibiscus Sabdariffa* Pada Tikus Wistar Yang Terinduksi Parasetamol “ adalah karya saya. Apabila ada kutipan atau pemakaian dari hasil karya orang lain berupa tulisan, data, gambar, atau ilustrasi baik yang telah dipublikasi atau belum dipublikasi, telah direferensi sesuai dengan ketentuan akademis.

Saya menyadari plagiarism adalah kejahatan akademik, dan melakukannya akan menyebabkan sanksi yang berat berupa pembatalan skripsi dan sanksi akademik yang lain.

Makassar, 10 Juli 2020
Yang Menyatakan



Andika Sulastriani
C011 17 1377

HALAMAN PENGESAHAN

Telah disetujui untuk dibacakan pada seminar akhir di bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan judul :

**“HUBUNGAN KADAR TNF-ALFA SERUM DENGAN FUNGSI GINJAL SETELAH
PEMBERIAN *HIBISCUS SABDARIFFA* PADA TIKUS WISTAR YANG TERINDUKSI
PARASETAMOL”**

Hari / Tanggal : Jum'at, 10 Juli 2020
Waktu : 13.00 WITA – Selesai
Tempat : tentatif

Mengetahui,

Pembimbing,

dr. Nursvamsi, M.Kes, Sp.M
NIP . 19800702 201212 2 002

ABSTRAK

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI SITOKIN TNF-ALFA PADA GINJAL DENGAN KADAR TNF-ALFA SERUM SETELAH PEMBERIAN *HIBISCUS SABDARIFFA* PADA TIKUS WISTAR YANG TERINDUKSI PARASETAMOL

Andika Sulastriani

Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin,
Makassar

Latar Belakang: Penyakit ginjal di Indonesia masih tergolong tinggi. Data Indonesian Renal Registry (IRR) tahun 2017 menyatakan bahwa jumlah pasien baru yang menjalani dialisi pertama kalinya sebesar 30.831 kasus, sedangkan pasien aktif yang telah lama menjalani hemodialis dan masih hidup sampai 31 desember 2017 tercatat sebanyak 77.892 kasus.). Gangguan fungsi ginjal dapat disebabkan oleh banyak faktor diantaranya hipertensi, infeksi saluran kemih, kelainan autoimun, diabetes melitus, adanya sumbatan pada saluran kemih dan toksisitas. Salah satu penyebab kerusakan ginjal adalah penggunaan obat-obat yang bersifat toksik (nefrotoksitas). Beberapa obat-obatan yang dapat menyebabkan kerusakan diantaranya, karbon tetraklorida, parasetamol dan etanol **Tujuan:** Untuk memperoleh gambaran ekspresi sitokin TNF-alfa pada ginjal dengan kadar TNF-alfa serum setelah pemberian *Hibiscus sabdariffa* pada tikus terinduksi parasetamol. **Manfaat:** Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan data awal untuk uji preklinis selanjutnya pada hewan yang tingkatannya lebih tinggi sampai kepada uji klinis pada manusia, menambah ilmu pengetahuan dan sebagai bahan bacaan,

serta dapat menjadi sumber informasi bagi penelitian selanjutnya. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian true eksperimental dengan menggunakan desain *post test only control group design* dengan subjek penelitian 40 ekor tikus wistar betina dengan berat 130 - 200 gram. Penelitian dilakukan selama 3 bulan yakni Agustus – Oktober 2019. **Hasil :** Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan tidak ditemukan pengaruh pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada kadar kreatinin, hal ini juga berlaku untuk kadar TNF-alfa. **Kesimpulan :** hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) *Hibiscus Sabdariffa* tidak mempengaruhi kadar kreatinin serum pada ginjal tikus wistar yang terinduksi parasetamol, (2) *Hibiscus Sabdariffa* tidak mempengaruhi kadar TNF-alfa pada ginjal tikus wistar yang terinduksi parasetamol, (3) Hubungan antara kadar TNF-Alfa dengan kadar kreatinin setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada tikus wistar yang terinduksi parasetamol sangat lemah atau tidak signifikan.

Kata Kunci: *Hibiscus sabdariffa*, parasetamol, TNF-alfa, Nefrotoksisitas

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, Yang Telah Melimpahkan Rahmat Dan Berkat-Nya Sehingga Skripsi Penelitian Yang Berjudul “Hubungan Kadar TNF- α Serum Dengan Fungsi Ginjal Setelah Pemberian Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) Pada Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) Yang Terinduksi Parasetamol” dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak serta merta hadir tanpa bantuan dan dukungan dari semua pihak. Mudah-mudahan segala sesuatu yang telah diberikan menjadi bermanfaat dan diberkati oleh Tuhan Yang Maha Esa.

Dalam penyelesaian skripsi ini penulis banyak mendapat bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menghanturkan terima kasih sebesar besarnya kepada :

1. Kedua **Orang tua** penulis, serta **saudara** penulis serta **keluarga** penulis yang telah memberikan doa dan dukungan selama ini ;
2. **dr. Nursyamsi, Sp.M, M.Kes** selaku dosen pembimbing serta penasehat akademik penulis yang telah membimbing penulis mulai dari awal penyusunan hingga selesai ;
3. **Dr. dr. Batari Todja Umar, Sp. M(K)** selaku dosen penguji penulis yang telah memberikan petunjuk dan pengarahan untuk memperbaiki skripsi ini;

4. **dr. Triani Hastuti Hatta, Sp.KK, M.Kes** selaku dosen penguji penulis yang telah memberikan petunjuk dan pengarahan untuk memperbaiki skripsi ini;
5. Para Sahabat “ Ukhty” **Yaumil Dewi Purnama, Nur Annisa Amalia Malik, dan Rezky Rusli,** Serta Tunangan saya **Hadi Prastiawan** atas loyalitas, dukungan moralm serta bimbingan dan saran akan berbagai perkara dari awal kuliah hingga saat ini kepada penulis;
6. Teman-teman **V17REOUS** atas dukungan, kebersamaan, persahabatan yang terus diberikan kepada penulis;
7. Para staf Laboratorium Animal Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin , Laboratorium HUMRC, dan Bagian Histologi yang telah membantu dan memberikan izin;
8. Semua pihak yang tidak semoat disebutkan dan telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis memahami sepenuhnya bahwa skripsi ini tak luput dari kesalahan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat memberikan inspirasi bagi para pembaca untuk melakukan hal yang lebih baik lagi dan semoga skripsi ini bermanfaat dalam rangka mencerdaskan kehidupan bangsa.

Makassar, Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
ABSTRAK	iii
HALAMAN PENGESAHAN	v
HALAMAN PERNYATAAN ANTI PLAGIARISME	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	3
1.3.Tujuan Penelitian	3
1.4.Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Ginjal	5
2.1.1. Anatomi Ginjal	5
2.1.2. Fisiologi Ginjal	6
2.2.Drug Induced Nephrotoxcity	6
2.2.1. Definis Drug Induced Nephrotoxcity	7
2.2.2. Mekanisme Patogen	8
2.2.3. Faktor Resiko	8

2.2.4. Pencegahan	9
2.3.Parasetamol.....	9
2.3.1. Farmakokinetik	9
2.3.2. Farmakodinamik	10
2.3.3. Toksisitas	10
2.4. <i>Hibiscus sabdariffa</i>	10
2.4.1. Klasifikasi <i>Hibiscus sabdariffa</i>	11
2.4.2. Morfologi <i>Hibiscus sabdariffa</i>	12
2.4.3. Manfaat <i>Hibiscus sabdariffa</i>	12
2.5.Tikus Galur Wistar	14
2.6.TNF-alfa	15
2.6.1. Fungsi Biologis TNF-alfa	15
2.7.Toksisitas Parasetamol dengan Ginjal	15
2.8.Kreatinin	16
2.8.1. Pengukuran Kadar Kreatinin.....	17
2.8.2. Batasan Potensial Kadar Kreatinin Serum	18
2.9.ELISA Mouse TNF-alfa Immunoassay	19
2.9.1 Prinsip Kerja	20
2.9.2 Pengumpulan Sampel.....	21
2.9.3 Bahan dan Kondisi Penyimpanan	22
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL, HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1.Kerangka Konsep	23
3.2.Kerangka Teori	24
3.3.Hipotesis Penelitian	25

BAB 4 METODELOGI PENELITIAN

4.1.Desain Penelitian.....	26
4.2.Waktu dan Tempat Penelitian	26
4.2.1 Waktu Penelitian.....	26
4.2.1 Tempat Penelitian	26
4.3.Populasi dan Sampel Penelitian	26
4.3.1 Populasi Penelitian	26
4.3.2 Sampel Penelitian	26
4.4.Variabel Penelitian	27
4.4.1 Variabel Bebas.....	27
4.4.2 Variabel Terikat.....	27
4.4.3 Variabel Kontrol	27
4.5.Definisi Operasional.....	28
4.5.1 <i>Hibiscus sabdariffa</i>	28
4.5.2 Parasetamol	28
4.5.3 Kadar Kreatinin Serum	28
4.5.4 Kadar Serum TNF-alfa.....	29
4.5.5 Tikus Galur Wistar	29
4.6.Instrument Penelitian	29
4.6.1 Alat Penelitian.....	29
4.6.2 Bahan Penelitian.....	30
4.6.3 Pembuatan Infus <i>Hibiscus sabdariffa</i> Terenkapsulasi	30
4.6.4 Pembuatan Larutan <i>Hibiscus sabdariffa</i> Terenkapsulasi.....	31
4.6.5 Pembuatan Suspense Parasetamol.....	31

4.7. Pelaksanaan Penelitian	31
4.7.1 Sebelum Perlakuan.....	31
4.7.2 Pemberian Perlakuan.....	32
4.7.3 Penyondead Hewan Coba	33
4.7.4 Setelah Perlakuan.....	34
4.8. Cara Pengambilan Data.....	36
4.9. Analisa Data	36
4.10 Alur Penelitian.....	37

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1. Gambaran Kadar Kreatinin Terhadap <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	38
5.2. Gambaran Kadar TNF-Alfa Terhadap <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	41
5.3. Hubungan Kadar TNF-Alfa dengan Kadar Kreatinin Setelah Pemberian <i>Hibiscus Sabdariffa</i> pada Ginjal Tikus yang Terinduksi Parasetamol.....	45

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan.....	48
----------------------	----

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan.....	51
7.2. Saran	52

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel 4.11 Jadwal Penelitian.....	37
Tabel 5.1.1 Kadar Kreatinin Setelah Pemberian <i>Hisicuss Sabdariffa</i> Pada Ginjal Tikus Yang Terinduksi Parasetamol	38
Tabel 5.1.2 Pengaruh Pemberian <i>Hibiscus Sabdariffa</i> Terhadap Kadar Kreatinin Pada Ginjal Tikus Yang Terinduksi Parasetamol	40
Tabel 5.2.1 Kadar Sitokin TNF-Alfa Setelah Pemberian <i>Hibiscus Sabdariffa</i> Pada Ginjal Tikus Yang Terinduksi Parasetamol	41
Tabel 5.2.2 Pengaruh Pemberian <i>Hibiscus Sabdariffa</i> Terhadap Kadar Sitokin TNF-Alfa Pada Ginjal Tikus Yang Terinduksi Parasetamol	44
Tabel 5.3.1 Analisis Deskriptif Kadar TNF-Alfa dan Kadar Kreatinin	45
Tabel 5.3.2 Uji Normalitas Kolmogrov Smirnov.....	45
Tabel 5.3.3 Uji Korelasi Spearman Kadar TNF-Alfa dan Kadar Kreatinin.....	46

DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Asam Amino</i>
ACE Inhibitor	: <i>Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor</i>
AKI	: <i>Acute Kidney Injury</i>
ARB	: <i>Angiotensin Receptor Blocker</i>
BPOM RI	: <i>Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia</i>
CMC-NA	: <i>Natrium– Carboxymethyle Cellulose</i>
CKD	: <i>Chronic Kidney Disease</i>
COX	: <i>Cyclo - Oxygenase</i>
DKID	: <i>Drug Induced Kidney Disease</i>
ECD	: <i>Extracellular Domain</i>
ELAM-1	: <i>Endothelial leukocyte adhesion molecule 1</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPOS	: <i>Enhanced Polymer One Step Staining</i>
FAA	: <i>Formalin-Aseto-Alkohol</i>
GFR	: <i>Glomerular Filtration Rate</i>
GGK	: <i>Gagal Ginjal Kronik</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
HE	: <i>Hematoksin Eosin</i>
HUMRC	: <i>Hasanuddin University Medical Research Center</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IRR	: <i>Indonesian Renal Registry</i>
NAPQI	: <i>N-acetyl-para-benpquinone-immie</i>

NBF	: <i>Neutral Buffer Formalin</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NSAID	: <i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
PGES	: <i>Prostaglandin endoperoxidase synthetase</i>
TNF-alfa	: <i>Tumor Necrosis Faktor alfa</i>
USRDS	: <i>The United States Renal Data System</i>
VCAM-1	: <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Anatomi Ginjal.....	5
Gambar 2.2 Tanaman <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	11
Gambar 2.3 Tikus Galur Wistar	14
Gambar 2.4 ELISA	20
Gambar 2.5 Plot hubungan kadar TNF-Alfa dengan kadar kreatinin	47

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

The United States Renal Data System (USRDS) mencatat pada tahun 2016 jumlah pasien yang dirawat karena Acute Kidney Injury (AKI) global diperkirakan meningkat 2 kali lipat selama dekade terakhir yakni pada tahun 2006 sebanyak 2,2% dan tahun 2016 sebanyak 4,4% (USRDS, 2018). Sedangkan secara nasional, pada tahun 2017 jumlah pasien acute kidney injury (AKI) sebanyak 8% atau 2.375 kasus (IRR, 2017). Acute kidney injury (AKI) yang lama beresiko menjadi penyakit ginjal kronik (CKD). Sedangkan untuk *chronic kidney disease (CKD)* atau Gagal Ginjal Kronik (GGK) mengalami peningkatan dari 40,4% menjadi 48,8% dengan tekanan darah < 130/80 mmHg dan dari 61,5% menjadi 68,4% untuk tekanan darah < 140/90 mmHg. (USRDS, 2018).

Penyakit ginjal di Indonesia masih tergolong tinggi. Data Indonesian Renal Registry (IRR) tahun 2017 menyatakan bahwa jumlah pasien baru yang menjalani dialisi pertama kalinya sebesar 30.831 kasus, sedangkan pasien aktif yang telah lama menjalani hemodialis dan masih hidup sampai 31 desember 2017 tercatat sebanyak 77.892 kasus (IRR,2017). Gangguan fungsi ginjal dapat disebabkan oleh banyak faktor diantaranya hipertensi, infeksi saluran kemih, kelainan autoimun, diabetes melitus, adanya

sumbatan pada saluran kemih dan toksisitas. Salah satu penyebab kerusakan ginjal adalah penggunaan obat-obat yang bersifat toksik (nefrotoksitas). Beberapa obat-obatan yang dapat menyebabkan kerusakan diantaranya, karbon tetraklorida, parasetamol dan etanol (Naughton, 2008).

Salah satu obat yang paling sering digunakan oleh masyarakat umum adalah parasetamol. Sehingga ginjal lebih sering mengekresikan obat parasetamol. Penggunaan parasetamol yang berlebihan dapat menyebabkan nekrosis tubulus ginjal (Nurwijaya *et al.*, 2014). Penggunaan parasetamol secara berlebihan juga diketahui berhubungan dengan peradangan, ditandai dengan peningkatan sitokin inflamasi, TNF-alfa dan IL, peningkatan kadar kreatini, serta upregulasi nitrogen oksida dari serum, makrofag dan hepatosit (Afaf *et al.*, 2017). Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai efek protektif adalah *Hibiscus sabdariffa* yang memiliki manfaat sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi serta pemanfaatan dalam bidang kesehatan. Penelitian yang telah dilakukan oleh Kucukler, *et al.*, tahun 2017 tentang pemberian tanaman yang mengandung antioksidan alami pada ginjal tikus terinduksi parasetamol, menyatakan bahwa toksik parasetamol menginduksi reaksi inflamasi dengan meningkatnya kadar TNF-alfa. Namun dengan menggunakan senyawa tanaman yang mengandung antioksidan alami memberikan efek perbaikan terhadap toksitas ginjal. Hasil ini juga menunjukkan berkurangnya ekspresi sitokin proinflamasi (Kucukler,2017).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas maka peneliti

ingin mengetahui lebih lanjut mengenai hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada tikus yang terinduksi parasetamol.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka rumusan masalah untuk penelitian kami adalah Apakah terdapat hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada tikus yang terinduksi parasetamol ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada tikus yang terinduksi parasetamol.

Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui kadar kreatinin setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 125 mg/kgBB pada tikus yang terinduksi parasetamol.
2. Untuk mengetahui kadar kreatinin setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 250 mg/kgBB pada tikus yang terinduksi parasetamol.
3. Untuk mengetahui kadar TNF-alfa serum setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 125mg/kgBB pada tikus yang sudah terinduksi parasetamol.

4. Untuk mengetahui kadar TNF-alfa serum setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 250mg/kgBB pada tikus yang sudah terinduksi parasetamol.
5. Untuk mengetahui hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 125 mg/kgBB pada tikus yang terinduksi parasetamol.
6. Untuk mengetahui hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* 250 mg/kgBB pada tikus yang terinduksi parasetamol.
7. Untuk mengetahui hubungan kadar TNF-alfa serum dengan fungsi ginjal setelah pemberian *Hibiscus Sabdariffa* pada tikus yang terinduksi parasetamol.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan data awal untuk uji preklinis selanjutnya pada hewan yang tingkatannya lebih tinggi sampai kepada uji klinis pada manusia.

1.4.2. Manfaat Keilmuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan dan sebagai bahan bacaan dan sumber informasi bagi peneliti selanjutnya.

1.4.3. Manfaat Bagi Peneliti

Data sampel yang diperoleh dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya.

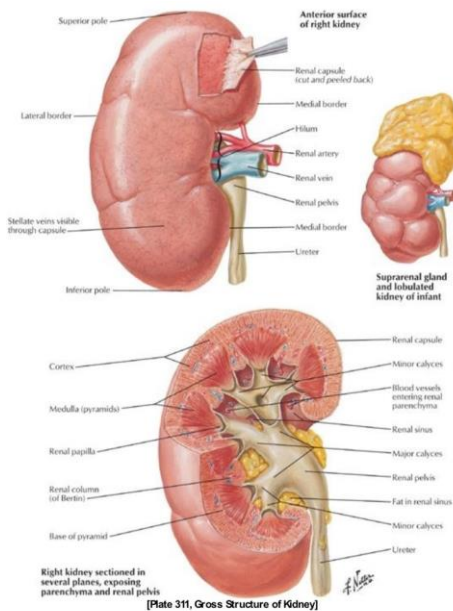
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ginjal

2.1.1. Anatomi Ginjal

Ginjal berbentuk seperti kacang merah dengan ukuran panjang 11 cm, lebar 6 cm dan tebal 3 cm. Ginjal terletak di bagian posterior cavum abdominis, retroperitoneal, di sebelah kiri dan kanan columna vertebralis, setinggi L1-4 pada posisi berdiri. Ginjal kanan terletak lebih rendah ginjal kiri disebabkan oleh adanya hepar disebelah cranial ginjal. Struktur ginjal terdiri dari korteks dan medula. korteks ginjal merupakan lapisan luar ginjal. Sedangkan medula ginjal merupakan lapisan dalam ginjal, terdiri atas piramida renalis berjumlah sekitar 10-18 buah (Netter,2011)



Gambar 2.1. Anatomi Ginjal.

Sumber : Atlas Human Anatomy, 2011

2.1.2.Fisiologi Ginjal

Ginjal merupakan organ yang mempunyai peranan penting dalam tubuh.. Ginjal berfungsi untuk menyaring sisa hasil metabolisme dan toksin dari darah serta mempertahankan homeostatis cairan dan elektrolit yang akan dibuang melalui urine. Fungsi ginjal yang paling esensial adalah pembentukan urine. Selain fungsi tersebut, ginjal juga menjalankan beberapa fungsi lainnya seperti, regulasi keseimbangan elektrolit, regulasi volume dan osmolalitas cairan tubuh, ekskresi produk metabolit dan substansi asing, partisipasi dalam pembentukan eritropoiesis, pengaturan keseimbangan asam-basa, pengaturan tekanan arteri (Guyton,2014).

2.2 Drug Induced Nephrotoxicity

Nefrotoksisitas yang diinduksi obat semakin dikenal sebagai kontributor signifikan terhadap penyakit ginjal termasuk Acute Kidney Injury (AKI) dan Chronic Kidney Disease (CKD). Nefrotoksisitas memiliki spektrum yang luas, mencerminkan kerusakan pada segmen nefron yang berbeda berdasarkan pada individu tergantung bagaimana mekanisme obat tersebut. Glomerular dan tubular diakui sebagai target toksisitas obat dan mungkin mengakibatkan perubahan fungsional ginjal. Manifestasi klinis Drug Induced Kidney Disease (DIKD) sering tidak dikenali, terutama dalam pengaturan paparan obat pendek . Ini menimbulkan tantangan dalam menilai kejadian, keparahan dan konsekuensi jangka panjang dari DIKD. Pengetahuan kami tentang epidemiologi nefrotoksisitas berfokus terutama pada AKI yang diinduksi obat. Studi kohort AKI telah mendokumentasikan frekuensi

nefrotoksisitas yang diinduksi oleh obat menjadi sekitar 14-26% dalam populasi orang dewasa. Nefrotoksisitas adalah masalah signifikan pada pediatri dengan 16% AKI yang dirawat di rumah sakit peristiwa yang disebabkan terutama oleh obat. Epidemiologi gangguan tubular tidak jelas jika ingin dijadikan sebagai standar (Awdishu., *et al.*,2017).

2.2.1. Definisi Drug Induced Nephrotoxicity

Saat ini, tidak ada definisi standar dari DIKD dan kejadian nefrotoksisitas bervariasi tergantung pada definisi yang digunakan dan obat penyebab. Obat-obatan umum yang menyebabkan DIKD termasuk antibiotik, agen antivirus, antiinflamasi non-steroid agen, dan kemoterapi. Sebagian besar penelitian telah mendefinisikan nefrotoksisitas sebagai 0,5 mg / dL atau kenaikan 50% di kreatinin selama 24-72 jam dan minimum 24-48 jam paparan obat. Namun definisi tersebut menimbulkan tantangan karena peningkatan kreatinin 50% mungkin tidak memiliki spesifisitas tinggi untuk DIKD sejak penyakit yang mendasarinya sedang dirawat serta faktor-faktor risiko AKI lainnya bisa signifikan terhadap atribusi risiko. Setidaknya 1 dari 4 kriteria utama harus terpenuhi untuk semua obat yang diduga menyebabkan DKID, yakni (1) paparan obat harus minimal 24 jam sebelum kejadian, (2) kekuatan antara hubungan obat yang dikaitkan dengan fenotipe harus didasari pada durasi paparan obat, (3) data lengkap di sekitar periode paparan obat, hal ini diperlukan untuk memperhitungkan faktor resiko bersamaan dan paparan terhadap agen nefrotoksik lainnya, dan (4) dapat dijelaskan mekanisme paparan obat,

metabolisme serta imunogenisitas obat penyebab (Awdishu., *et al.*,2017).

2.2.2. Mekanisme Patogen

Sebagian besar obat yang ditemukan dapat menyebabkan nefrotoksisitas. Memberikan efek toksik oleh satu atau lebih mekanisme patogen yang umum. Tergantung efek toksik yang diberikan oleh obat itu sendiri. Ada beberapa mekanisme patogen nefrotoksisitas seperti, hemodinamik intraglomerular, toksisitas sel tubular, peradangan, nefropati kristal, rhabdomyolysis, dan mikroangiopathy trombotik. Pengetahuan mengenai efek toksik obat dan mekanisme patogennya sangat penting untuk diketahui agar dapat terhindar dari penyakit ginjal yang diinduksi oleh obat (Naughton, 2008).

2.2.3. Faktor resiko

Faktor resiko yang berhubungan dengan pasien agak bervariasi tergantung pada paparan obat. Namun, beberapa faktor resiko umum terjadi pada semua nefrotoksin yakni, usia tua <60 tahun, insufisiensi ginjal, diabetes, gagal jantung, dan sepsis.

Faktor resiko yang berhubungan dengan obat tergantung obat apa yang digunakan. Misal, obat dengan golongan NSAID, ACE inhibitor, ARB akan memberikan faktor resiko berupa insufisiensi ginjal yang mendasari (Naughton, 2008).

2.2.4. Pencegahan

Pencegahan nefrotoksisitas tergantung pada fenotipe, keparahan cedera dan kondisi yang mendasari obat yang diresepkan. Langkah langkah pencegahan yang dapat dilakukan misal, menggunakan obat yang sama efektifnya tetapi non nefrotoksik bila memungkinkan, memperbaiki faktor resiko nefrotoksisitas, menilai fungsi ginjal sebelum memulai terapi, menyesuaikan dosis obat untuk fungsi ginjal, dan menghindari kombinasi obat nefrotoksik (Naughton, 2008).

2.3 Parasetamol

Parasetamol (asetaminofen) adalah golongan para aminofenol bersama dengan fenasetin. Parasetamol mempunyai mekanisme kerja sebagai obat analgesik dan antipiretik, tetapi tidak mempunyai anti-inflamasi dan antitrombotik. Efek samping golongan ini serupa dengan salisilat yakni dapat menurunkan suhu tubuh dalam keadaan demam dan menghilangkan nyeri sedang. Sehingga parasetamol hanya menghambat sintesis prostaglandin secara lemah (Yusuf, 2017).

2.2.1. Farmakokinetik

Parasetamol cepat diabsorpsi dari saluran pencernaan, dengan kadar serum dicapai dalam 30-60 menit.. waktu paru dari obat ini kira kira 2 jam. Setelah dikonsumsi, 90% parasetamol di metabolisme menjadi inaktif secara farmakologi. Tetapi, 5% dari hasil metabolisme parasetamol berubah menjadi senyawa toksik berupa N-acetyl-p-

benzopyrone (NAPQI). Dimana toksik ini dapat menyebabkan disfungsi renal (Hisage, 2018).

2.2.2. Farmakodinamik

Parasetamol mempunyai mekanisme kerja obat sebagai analgesik dan antipiretik. Namun, parasetamol tidak mempunyai anti-inflamasi dan antitrombotik. Penghambatan kerja enzim siklooksigenase (COX) menyebabkan tromboksan, protaglandin dan prostasiklin tidak terbentuk. Parasetamol menekan efek zat pirogen endogen dengan menghambat prostaglandin (Hisage, 2018).

2.2.3. Toksisitas

pada dosis terapi, salah satu metabolit parasetamol bersifat didetoksifikasi dan hepatotoksik. Jalur metabolisme utama parasetamol yakni glukoronidasi dan sulfasi di hepar, NAPQI yang dihasilkan dari dosis terapi dapat didetoksifikasi melalui konjugasi dengan glutathion (GSH). Parasetamol merupakan obat yang paling sering menyebabkan keracunan, Oleh karena itu pada penanggulangan keracunan Parasetamol terapi ditujukan untuk menstimulasi sintesa glutathion. Dengan proses yang sama Parasetamol juga bersifat nefrotoksik (Hisage,2018).

2.4 *Hibiscus sabdariffa*

Hibiscus sabdariffa dikenal sebagai bunga rosella di Indonesia. Hampir seluruh bagian dari tanaman ini dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan

tradisional. *Hibiscus sabdariffa* memiliki potensi sebagai sumber pangan fungsional, antioksidan, antibakteri serta dapat digunakan sebagai zat pewarna. Tingginya nilai kemanfaatan tanaman ini disebabkan karena kandungan senyawa fitokimia alami potensial yang dimilikinya hampir diseluruh bagian bunga tersebut (Nurnasari,2017).

2.4.1. Klasifikasi *Hibiscus sabdariffa*

- Kingdom : *Plantea*
- Subkingdom : *Tracheobionia*
- Superdivisio : *Spermatophya*
- Division : *Magnoliophya*
- Kelas : *Magnoliopsida*
- Sub-kelas : *Dilleniidae*
- Ordo : *Malvales*
- Familia : *Malvaceae*
- Genus : *Hibiscus L.*
- Spesies : *Hibiscus sabdariffa L.*



Gambar 2.2. Tanaman *Hibiscus sabdariffa*
Sumber : 8villages.com

2.4.2. Morfologi *Hibiscus sabdariffa*

Hibiscus sabdariffa merupakan tanaman yang berumur satu tahun dengan tinggi mencapai 3,5 meter. Memiliki batang bulat, tegak, berkayu dan berwarna merah. Tangkai daun berbentuk bulat berwarna hijau dengan panjang 4-7 cm. Daunnya tunggal, berbentuk bulat telur, ujung tumpul, pertulangannya menjari, dan pangkal berlekuk. *Hibiscus sabdariffa* ini mempunyai 8-11 helai kelopak bunga yang berbulu, panjangnya kira kira 1 cm, pangkal saling berlekatan dan berwarna merah. Kelopak ini yang sering dianggap sebagai bunga oleh masyarakat, dan bagian inilah yang sering dimanfaatkan sebagai makanan dan minuman (Marwati, 2010)

2.4.3. Manfaat *Hibiscus sabdariffa*

Hibiscus sabdariffa memiliki cukup banyak manfaat dikarenakan terkandung senyawa fitokimia alami yang potensial di seluruh bagian tanaman. Komponen fitokimia tersebut mengandung fenol, alkaloid, tannin, flavonoid, saponin, asam organik, antosianin, dan polisakarida. Sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan, antibakteri, zat pewarna bahkan pengobatan dalam bidang kesehatan (Nurnasari *et al.*, 2017).

Sebagai antiinflamasi, salah satu kandungan yang senyawa polifenol dalam rosella berfungsi sebagai anti-inflamasi. BPOM RI (2010) melaporkan bahwa senyawa polifenol dalam *Hibiscus sabdariffa* dapat menghambat enzim ksantin oksidase, menghambat

nitrat, dan dapat menurunkan perubahan patologis hewan coba (Nurnasari *et al.*, 2017).

Sebagai antioksidan, salah satu kandungan yang penting dalam *Hibiscus sabdariffa* yakni senyawa antosianin dan flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan antosianin lebih besar jika dibandingkan dengan alfa tokoferol, asam askorbat dan beta karoten. Senyawa antosianin mampu menangkal radikal bebas (Nurnasari *et al.*, 2017).

2.5 Tikus Galur Wistar

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar menurut Myres & Armitage (2004):

- Kingdom : *Animalia*
- Filum : *Chordata*
- Kelas : *Mamalia*
- Ordo : *Rodentia*
- Subordo : *Sciurognathi*
- Famili : *Muridae*
- Sub-Famili : *Murinae*
- Genus : *Rattus*
- Spesies : *Rattus norvegicus*
- Galur/Strain : *Wistar*



Gambar 2.3 Tikus Galur Wistar

Sumber : wordpress.com

Hewan coba sangat diperlukan dalam sebuah penelitian *in vivo* di bidang biomedik. Sebelum dipublikasikan kepada manusia, serangkaian penelitian menggunakan hewan coba pun dilakukan. Anggota rodentia seperti mencit dan tikus sering sekali di jadikan hewan coba dikarenakan memiliki sistem fisiologi yang mirip dengan manusia. Tikus Wistar adalah salah satu jenis hewan yang paling sering digunakan sebagai hewan coba penelitian (Fitria,*et al.*, 2014)

Tikus galur wistar adalah tikus dengan ciri ciri bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, mata berwarna merah, telinga tebal dan pendek pendek dengan rambut halus, dan ekornya yang tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. tikus ini memiliki lama hidup antara 4-5 tahun dengan berat badan pada betina berkisar 225-325 gram (Swari, 2017)

2.6 TNF-alfa

Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF-alfa) adalah salah satu mediator inflamasi yang penting, yang dihasilkan oleh makrofag, monosit, limfosit T dan limfosit B. Fungsi utama TNF-alfa adalah sebagai proinflamasi, mengaktifasi sel NK, serta sebagai trombosis (Adhi, K.C., *et al.*, 2015).

2.6.1. Fungsi Biologis dari TNF-alfa

Sitokin diklasifikasikan sebagai subtype Th1 dan Th2. Sitokin Th1 yang utamanya bersifat proinflamasi adalah TNF-alfa, IL-1, IL-6 dan interferon. TNF-alfa bersifat multifungsional, dimana sitokin proinflamasi yang dapat memediasi berbagai fungsi biologis. Fungsi biologis yang luas dari TNF-alfa adalah kemampuan untuk menginduksi ekspresi sejumlah besar produk genetik, seperti reseptor, enzim, komplemen dan sebagainya, TNF-alfa adalah sitokin penting yang mengatur proses peradangan, pertahanan tubuh, apoptosis serta respon imun. Fungsi biologis utama TNF-alfa adalah menginduksi inflamasi melalui peningkatan transkrip gen (Tampubolon, 2018).

2.7 Toksisitas Parasetamol Terhadap Ginjal

Terdapat beberapa teori mengenai mekanisme toksisitas obat parasetamol terhadap ginjal. Secara garis besar teori-teori tersebut menjelaskan bahwa parasetamol merusak ginjal melalui mekanisme vasokonstriksi dan nekrosis tubular ginjal. Namun 2 teori yang paling sering digunakan adalah teori sitokrom-P450 dan teori *Prostaglandin endoperoxidase synthetase* (PGES) (Edy, A.J., *et al.* 2019).

Teori Pertama yakni *Prostaglandin endoperoxidase synthetase* (PGES). PGES adalah enzim yang ditemukan di ginjal yang mengaktifkan parasetamol menjadi metabolit toksis, kemungkinan besar N-acetyl-p-benzquinone (NAPQI). PGES terjadi di medula ginjal. PGES juga berikatan dengan glutathion yang menyebabkan malfungsi sehingga jumlah metabolit NAPQI yang dapat direduksi menjadi berkurang. Hal ini mendorong terjadinya semakin banyak nekrosis jaringan ginjal (Edy, A.J., *et al.* 2019).

Teori selanjutnya yakni sitokrom-P450. Sitokrom -P450 adalah suatu enzim yang juga dihasilkan oleh ginjal, terutama di bagian korteks ginjal. Sama seperti PGES, sitokrom-P450 ini juga dapat mengoksidasi parasetamol dan menghasilkan NAPQI. NAPQI dapat berikatan dengan protein yang terdapat pada dinding sel dan menginduksi pembentukan lisosom secara berlebihan. Pembentukan lisosom yang berlebihan dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel, sehingga terjadi nekrosis jaringan ginjal (Edy, A.J., *et al.* 2019).

Mekanisme lain dari parasetamol adalah vasokonstriksi pembuluh darah ginjal. Vasokonstriksi pembuluh darah ginjal akan membuat aliran darah yang masuk ke glomerulus menurun sehingga GFR ginjal juga akan ikut menurun. Kadar kreatinin serum akan meningkat (Edy, A.J., *et al.* 2019).

2.8 Kreatinin

Kreatinin adalah hasil pemecahan kreatin fosfat otot, disintesis di hati, pankreas, dan ginjal dari transaminasi asam amino arginine, glisin dan metionin yang berhubungan dengan massa otot dimana menggambarkan fungsi ginjal dan perubahan kreatinin (Verdiansyah. 2016). Kreatinin serum digunakan dalam

deteksi dan penilaian terhadap penyakit ginjal akut dan penyakit ginjal kronis. Keterbatasan kreatinin serum sebagai penanda fungsi ginjal harus dipertimbangkan. Diperkirakan Glomerulus Filtrat Rate (GFR) adalah penanda yang lebih baik fungsi ginjal daripada kreatinin serum saja (Thomas, D., *et al.* 2017).

2.8.1. Pengukuran Serum Kreatinin

Kreatinin sebagian besar terbentuk dari kreatin dan fosfokreatin dalam otot rangka. Kreatinin bebas diekskresikan melalui ginjal, sehingga dapat ditafsirkan sebagai salah satu penanda fungsi ginjal. Metode pengukuran yang paling umum dari kreatinin serum didasarkan pada reaksi Jaffé. Kreatinin bereaksi dengan picrate dalam medium alkali dan menghasilkan kompleks orange-merah yang diukur menggunakan spektrofotometri. Beberapa faktor yang dapat mengganggu tes kreatinin adalah protein dalam serum, glukosa dan ketoasid dalam kadar tinggi (diabetes ketoasidosis). Kurangnya kekhususan adalah masalah utama dengan metode ini. Analisis otomatis mengukur generasi warna biasanya membutuhkan antara 20 - 80 detik. Metode enzimatik dianggap lebih spesifik, tetapi bilirubin dan IgG monoklonal ditemukan mengganggu hasil. Kalibrasi metode dilakukan untuk standarisasi dan mengurangi variasi dalam pengukuran kreatinin antar laboratorium. Setelah standarisasi tes kreatinin pada level serum kreatinin 2010 diukur oleh sebagian besar laboratorium berkurang 0,1-0,3 mg / dL. Modifikasi Diet pada

Penyakit Ginjal (MDRD) formula direvisi untuk standar kreatinin serum. Penyakit ginjal kronis Rumus Kolaborasi Epidemiologi (CKD-EPI) adalah dibuat hanya untuk digunakan dengan kreatinin serum standar. Persamaan Cockcroft-Gault tidak direvisi dan akan menghasilkan kesalahan yang lebih besar jika digunakan dengan serum standar kreatinin.

2.8.2. Batasan Potensial Kadar Kreatinin Serum

1. Pasien dengan kelebihan cairan memiliki serum kreatinin yang lebih rendah karena pengenceran darah. Malnutrisi dan ketidakaktifan menurunkan otot massa, sehingga mengurangi kreatinin serum.
2. Orang dewasa, laki-laki dan ras Afrika dapat meningkatkan produksi kreatinin karena peningkatan massa otot. Sekitar 2% dari kreatin dalam tubuh dikonversi menjadi kreatinin setiap hari. Kondisi patologis dengan peningkatan kerusakan otot (rhabdomyolysis) dapat meningkatkan serum kreatinin bahkan hingga 5 mg / hari Sebagian kecil kreatinin serum aktif dikeluarkan oleh tubulus proksimal secara menyeluruh.
3. Obat-obatan seperti; simetidin, trimethoprim, corticosteroids, pyrimethamine, phenacemide, salisilat dan metabolit vitamin D aktif dapat memblokir sekresi tubular aktif serum kreatinin dan meningkatkan kreatinin serum.

4. Penyakit yang menyebabkan GFR terganggu adalah tekanan darah tinggi, diabetes mellitus, gagal jantung kongesif, penyakit pada ginjal transplantasi.
5. Kreatinin serum tidak akan bertambah jika terjadi kerusakan pada tubulointerstisial atau vascular di ginjal. Kreatinin serum hanya akan meningkat ketika terjadi penurunan secara signifikan pada filtrasi glomerulus. Sensitivitas kreatinin serum pada ginjal ringan sampai sedang penurunan nilai buruk. Jadi kreatinin serum adalah penanda kerusakan ginjal yang tidak lengkap.

2.9 ELISA Mouse TNF-alfa Immunoassay

TNF- alfa adalah molekul yang menjalankan peran sentral dalam peradangan, pengembangan sistem kekebalan tubuh, apoptosis, dan metabolisme lipid. Mouse TNF-alfa di sintesis sebagai protein transmembrane tipe II 26 kDa yang terdiri dari 35 domain sitoplasmik asam amino(aa), segmen transmembran 21 aa, dan 179 asam amino domain ekstraseluler (ECD).

Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay adalah ELISA fase padat 4,5 jam yang dirancang untuk mengukur kadar TNF- α tikus dalam supernat kultur sel, serum, dan plasma. Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay mengandung *E. coli* yang diekspresikan tikus rekombinan TNF- α dan antibodi yang meningkat melawan rekombinan faktor. Immunoassay ini telah terbukti mengkuantifikasi TNF- α tikus rekombinan akurat. Hasil yang diperoleh dengan menggunakan mouse alami TNF- α menunjukkan kurva

dosis-respons itu sejajar dengan kurva standar yang diperoleh dengan menggunakan standar kit Quantikine®. Ini hasil menunjukkan bahwa kit ini dapat digunakan untuk menentukan nilai massa relatif untuk tikus alami TNF- α .



Gambar 2.4 ELISA KIT

Sumber : fn.test.com

2.9.1. Prinsip Kerja

Pengujian ini menggunakan teknik immunoassay enzim sandwich kuantitatif. Monoklonal antibodi spesifik untuk tikus TNF- α telah dilapisi ke dalam lempeng mikro. Standar, kontrol, dan sampel dipipet ke dalam sumur dan TNF- α apa pun terikat oleh yang diimobilisasi antibodi. Setelah membasuh zat yang tidak terikat, antibodi poliklonal terkait-enzim spesifik untuk mouse TNF- α ditambahkan ke sumur. Mengikuti pencucian untuk menghilangkan yang tidak terikat pereaksi antibodi-enzim, larutan

substrat ditambahkan ke sumur. Reaksi enzim menghasilkan produk biru yang berubah menjadi kuning ketika Stop Solution ditambahkan. Intensitas warna yang diukur sebanding dengan jumlah TNF- α yang terikat pada langkah awal. Contoh nilai-nilai tersebut kemudian dibaca dari kurva standar.

2.9.2. Pengumpulan Sampel

1. **Cell Culture Supernat**, buang partikulat dengan sentrifus dan lakukan uji segera, atau simpan sampel pada ≤ -20 ° C. Hindari siklus pencairan-beku berulang.
2. **Serum**, biarkan sampel darah menggumpal selama 2 jam pada suhu kamar sebelum di sentrifus 20 menit pada kecepatan 2000rpm. Hapus serum dan lakukan uji segera atau simpan sampel pada ≤ -20 ° C. Hindari siklus pencairan-beku berulang.
3. **Plasma**, kumpulkan plasma menggunakan EDTA atau heparin sebagai antikoagulan. Sentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 2000rpm dalam 30 menit pengumpulan. lakukan uji segera atau simpan sampel pada ≤ -20 ° C. Hindari siklus pencairan-beku berulang.

2.9.3. Bahan dan Kondisi Penyimpanan

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	CATALOG # MTA00B	CATALOG # SMTA00B	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Mouse TNF- α Microplate	893961	2 plates	6 plates	96 well polystyrene microplates (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for mouse TNF- α .	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Mouse TNF- α Standard	893963	3 vials	9 vials	Recombinant mouse TNF- α in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for the reconstitution volume.</i>	Use a new standard and control for each assay. Discard after use.
Mouse TNF- α Control	893964	3 vials	9 vials	Recombinant mouse TNF- α in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. The assay value of the control should be within the range specified on the label.	
Mouse TNF- α Conjugate	893962	1 vial	3 vials	23 mL/vial of a polyclonal antibody specific for mouse TNF- α conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Assay Diluent RD1-63	895352	1 vial	3 vials	12 mL/vial of a buffered protein base with preservatives.	
Calibrator Diluent RD5K	895119	1 vial	3 vials	21 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>For cell culture supernate samples.</i>	
Calibrator Diluent RD6-12	895214	1 vial	3 vials	21 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>For serum/plasma samples.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	2 vials	6 vials	21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	1 vial	3 vials	12 mL/vial of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	1 vial	3 vials	12 mL/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895174	1 vial	3 vials	23 mL/vial of diluted hydrochloric acid.	
Plate Sealers	N/A	8 strips	24 strips	Adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

MTA00B contains sufficient materials to run ELISAs on two 96 well plates.

SMTA00B (SixPak) contains sufficient materials to run ELISAs on six 96 well plates.