



UNIVERSITAS INDONESIA

**Efek pemberian kurkumin dan nanokurkumin pada tikus dengan
nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin melalui jalur ERK1/2**

TESIS

**SHINTA DEWI PERMATA SARI
1406655646**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2017**



UNIVERSITAS INDONESIA

**Efek pemberian kurkumin dan nanokurkumin pada tikus dengan
nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin melalui jalur ERK1/2**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

**SHINTA DEWI PERMATA SARI
1406655646**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI
JAKARTA
JUNI 2017**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Shinta Dewi Permata Sari
NPM : 1406655646

Tanda Tangan :



Tanggal : 14 Juni 2017

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Shinta Dewi Permata Sari
NPM : 1406655646
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Efek Pemberian Kurkumin dan Nanokurkumin
pada Tikus dengan Nefrotoksitas yang diinduksi
Cisplatin Melalui Jalur ERK1/2

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Vivian Soetikno, Sp.FK, PhD

(.....)

Pembimbing II : Dr. Melva Louisa, S.Si, M.Biomed

(.....)

Penguji I : Prof. dr. Franciscus D. Suyatna, PhD, Sp.FK

(.....)

Penguji II : Prof. dr. Mohammad Sadikin, D.Sc

(.....)

Penguji III : Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS

(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 14 Juni 2017

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik
Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Jurusan Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan, penelitian sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

(1) dr.Vivian Soetikno, Sp.FK, PhD selaku dosen pembimbing pertama dalam tesis. Terima kasih atas semua saran, inspirasi, bimbingan, bantuan, dukungan, dan waktu yang telah diberikan sejak awal penelitian hingga akhir penyusunan tesis ini.

(2) Dr.Melva Louisa, S.Si, M.Biomed selaku dosen pembimbing kedua yang telah bersedia menyediakan waktu, memberikan inspirasi, masukan, bimbingan, dan koreksi serta mengarahkan saya dalam penelitian hingga akhir penyusunan tesis ini.

(3) Dr. Dra. Ari Estuningtyas, Apt., M.Biomed sebagai ketua kekhususan yang telah memberikan saran, inspirasi, dukungan, dan semangat selama penelitian hingga akhir penulisan tesis demi kemajuan studi penulis.

(4) Prof. dr. Franciscus D. Suyatna, PhD, Sp.FK sebagai penguji pertama yang telah memberikan masukan, evaluasi, dan koreksi untuk perbaikan tesis yang lebih baik.

(5) Prof dr. Mohammad Sadikin, D.Sc sebagai penguji kedua yang telah meluangkan waktu, memberikan saran dan arahan untuk penyempurnaan tesis.

(6) Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS sebagai penguji ketiga yang telah memberikan saran, koreksi, dan evaluasi untuk perbaikan tesis.

(7) Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M(K) sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa Program Magister Ilmu Biomedik.

(8) Dr. rer. Physiol. dr Septelia Inawati Wanandi sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI yang telah membantu penulis selama masa studi.

- (9) Seluruh staf Laboratorium Farmakologi dan Terapeutik dan staf laboratorium hewan yang telah banyak membantu dalam penelitian yang saya lakukan;
- (10) Orang tua dan keluarga saya yang tercinta, yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral serta doa yang tidak henti-hentinya untuk saya sehingga saya dapat menyelesaikan
- (11) Sahabat kesayangan Desy Kusuma Fitri S.Si, MBA dan The Barbies (dr. Salinah M.Biomed; dr. Dayu Swasti Kharisma M.Biomed; dr. Audia Nizhma Nabilah M.Biomed; Nessa S.Farm, Apt, M.Biomed; Meylida Ichsyani, S.Si M.Biomed, dan Diah Ayu Aguspa Dita S.Kep, Ners, M.Biomed) yang selalu memberikan semangat, nasihat, kasih sayang, dukungan, dan bantuan dengan tulus ikhlas selama masa perkuliahan hingga akhir penyusunan tesis.
- (12) Teman-teman kesayangan penulis di Departemen Farmakologi, dr. Lulu Ul Maknun M.Biomed, Dony Hermanto S.Farm M.Biomed, dr. Rahmaniah M.Biomed, dr. Yuyuntia M.Biomed, dr.Marliana Sri Rejeki Sp.FK yang telah memberikan semangat dan bantuan selama masa penelitian hingga akhir penyusunan tesis.
- (13) Teman-teman Biomedik yang senantiasa memberikan semangat dan bantuannya selama penelitian.
- (14) Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan namanya satu persatu yang telah membantu penulis selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, penulis mengucapkan ungkapan penghargaan dan terima kasih. Semoga Allah SWT membalas kebaikan semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan tesis ini. Semoga tesis ini bermanfaat untuk masyarakat dan bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 14 Juni 2017

Shinta Dewi Permata Sari

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shinta Dewi Permata Sari

NPM : 1406655646

Program Studi : Ilmu Biomedik

Departemen : Farmakologi

Fakultas : Kedokteran

Jenis karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Efek Pemberian Kurkumin dan Nanokurkumin pada Tikus dengan Nefrotoksisitas yang diinduksi Cisplatin Melalui Jalur ERK1/2, beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 14 Juni 2017

Yang menyatakan



(Shinta Dewi Permata Sari)

ABSTRAK

Nama : Shinta Dewi Permata Sari
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Efek pemberian kurkumin dan nanokurkumin pada tikus dengan nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin melalui jalur ERK1/2.

Nefrotoksisitas merupakan efek samping utama yang membatasi penggunaan cisplatin sebagai obat anti-tumor. Kurkumin memiliki beberapa aktivitas farmakologis salah satunya, yaitu sebagai nefroprotektor. Akan tetapi kurkumin kurang larut di dalam air, sehingga digunakan nanokurkumin yang lebih mudah larut/terdispersi dalam air. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kurkumin dan nanokurkumin terhadap nefrotoksisitas tikus yang diinduksi cisplatin melalui jalur ERK1/2. Perlakuan hewan coba dilakukan selama 10 hari, menggunakan tikus Sprague Dawley yang dibagi menjadi 5 kelompok, (n=6), yaitu kelompok normal, cisplatin (CIS), Cisplatin + kurkumin 100 mg/kgBB/hari p.o (Cis + Kurku100), Cisplatin + nanokurkumin 50 mg/kgBB/hari p.o (Cis + Nanokur50), Cisplatin + nanokurkumin 100 mg/kgBB/hari p.o (Cis + Nanokur100). Pada hari ke-7 dilakukan injeksi cisplatin (7 mg/kgBB, i.p) dan 72 jam setelah injeksi cisplatin dilakukan pengambilan darah dan organ ginjal.

Cisplatin dosis tunggal pada kelompok CIS menyebabkan peningkatan kadar BUN dan kreatinin dalam plasma, kadar MDA, peningkatan rasio ekspresi BCL-2/Bax, serta peningkatan rasio ekspresi protein p-ERK/ERK secara signifikan, dibandingkan kelompok normal. Pemberian kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin 100 mg/kgBB berperan sebagai antioksidan untuk mencegah progresifitas nefrotoksisitas akibat cisplatin, dilihat melalui terjadinya penurunan kadar BUN dan kreatinin dalam plasma, penurunan kadar MDA, dan peningkatan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax secara signifikan dibandingkan kelompok CIS, serta penurunan rasio ekspresi protein p-ERK/ERK secara signifikan dibandingkan kelompok CIS. Cisplatin dosis tunggal (7 mg/kgBB) dapat menyebabkan nefrotoksisitas pada tikus yang menyerupai AKI (*Acute Kidney Injury*) pada manusia. Kurkumin 100 mg/kgBB cenderung memiliki efek nefroprotektor yang lebih baik dalam mencegah progresifitas nefrotoksisitas akibat cisplatin melalui jalur stress oksidatif dan apoptosis.

Kata kunci: cisplatin, nefrotoksisitas, apoptosis, kurkumin, nanokurkumin.

ABSTRACT

Name : Shinta Dewi Permata Sari
Study Program : Biomedical Science
Title : The effects of curcumin and nanocurcumin on cisplatin-induced nephrotoxicity through ERK1/2 pathway in the rat.

Nephrotoxicity is the major limitation for the clinical use of cisplatin as an antitumor. Curcumin has some pharmacological activity, one of them as nephroprotector. However, curcumin less soluble in water, so it is used nanocurcumin which is readily dispersed in aqueous media. The purpose of this study is to investigate the effects of curcumin and nanocurcumin against cisplatin induced nephrotoxicity in rats through ERK1/2 pathway. This study conducted for 10 days treatment, five groups (n=6) of male Sprague-Dawley rats were examined: normal, cisplatin (CIS) 7 mg/kgBW, Cis+curcumin (Cis+Curcu100) 100 mg/kg BW/day, Cisplatin+nanocurcumin 50 mg/kg BW/day (Cis+Nanocur50), and Cisplatin+nanocurcumin 100mg/kg BW/day (Cis+Nanocur100). After 72 h following injection cisplatin, specimens were collected. This study resulted a single dose of cisplatin in CIS group caused a significant increased in plasma BUN, plasma creatinine, MDA levels, decreased ratio expression of BCL-2/Bax gene, and increased ratio of p-ERK/ERK as compared to normal group.

Pre-treatment with curcumin 100 mg/kgBW and nanocurcumin (50 and 100 mg/kgBW) acts as an antioxidant to prevent progression of nephrotoxicity cisplatin, were reduced plasma BUN levels, plasma creatinine levels, MDA levels in kidney, increased GSH level in kidney, increased ratio expression of BCL-2/Bax gene in kidney, and decreased ratio of p-ERK/ERK protein in kidney compared with cisplatin-induced nephrotoxicity rats without treatment. Cisplatin with single dose (7 mg/kgBW) is able to induced nephrotoxicity in rats that mimicked acute kidney injury in human. Curcumin 100 mg/kgBW tend to have a better nephroprotector effect in preventing the progression of cisplatin-induced nephrotoxicity through oxidative stress pathways and apoptosis.

Keywords: cisplatin, nephrotoxicity, apoptosis, curcumin, nanocurcumin

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN TESIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Kerangka Teori.....	6
1.6 Kerangka Konsep.....	7
1.7 Hipotesis.....	7
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Cisplatin.....	8
2.2 Biotransformasi Cisplatin di Ginjal.....	9
2.3 Akumulasi Cisplatin di Sel Ginjal.....	10
2.4 Target Selular Cisplatin.....	11
2.5 Karakteristik Klinis dari Nefrotoksisitas Cisplatin.....	12
2.5.1 Amifostin, obat sintetik sebagai pelindung ginjal akibat radiasi dan kemoterapi.....	13
2.6 Mekanisme Kematian Sel pada Nefrotoksisitas yang Diinduksi Cisplatin.....	14
2.6.1 Jalur Apoptosis Mitokondrial (Intrinsik).....	15
2.6.2 Jalur Ekstrinsik bergantung Caspase-8.....	17
2.7 Protein BCL-2 dan Fungsi Mitokondria.....	18
2.7.1 ROS sebagai Mediator ERK dalam Menginduksi Kematian Sel.....	20
2.8 Kurkumin.....	21
2.8.1 Bioavailabilitas dan Metabolisme dari Kurkumin.....	23
2.8.2 Nanokurkumin.....	26
2.8.3 Studi In Vitro Kurkumin Nanoformulasi.....	26
3. METODE PENELITIAN.....	28
3.1 Desain penelitian.....	28
3.2 Waktu dan tempat penelitian.....	28
3.3 Etika Penelitian.....	28
3.4 Hewan uji.....	28
3.5 Obat uji.....	28

3.6 Bahan Penelitian.....	29
3.6.1 Persiapan induksi hewan uji.....	29
3.6.2 Persiapan perlakuan hewan uji.....	29
3.6.3 Persiapan sampel hewan uji.....	29
3.6.4 Penetapan kadar MDA.....	29
3.6.5 Penetapan kadar urea dan kreatinin dalam darah dan urin.....	29
3.6.6 Penetapan kadar protein homogenat ginjal.....	29
3.6.7 Penetapan kadar GSH.....	29
3.6.8 Pemeriksaan ekspresi gen Bax dan BCL-2.....	29
3.7 Alat penelitian.....	29
3.8 Prosedur penelitian.....	30
3.8.1 Pembagian hewan uji.....	30
3.8.2 Alur penelitian.....	32
3.9 Cara Kerja	32
3.9.1 Persiapan urin dan plasma untuk pemeriksaan kadar urea dan kreatinin.....	32
3.9.2 Pembuatan homogenat untuk penetapan kadar MDA, GSH, dan protein.....	33
3.9.3 Isolasi RNA dan sintesis cDNA untuk pemeriksaan qRT-PCR...	33
3.9.4 Pemeriksaan kadar urea dalam urin dan plasma.....	33
3.9.5 Pemeriksaan kadar kreatinin dalam urin dan plasma.....	34
3.9.6 Penetapan kadar protein.....	34
3.9.7 Pemeriksaan kadar MDA.....	35
3.9.8 Pemeriksaan kadar GSH dalam homogenat.....	35
3.9.9 Pemeriksaan ekspresi gen Bax dan BCL-2.....	36
3.9.10 Pemeriksaan ekspresi rasio protein P-ERK/ERK.....	37
3.10 Analisis statistik.....	38
4.. HASIL PENELITIAN.....	39
4.1 Berat Badan Hewan uji.....	39
4.1.1 Perubahan Berat badan hewan uji.....	39
4.1.2 Rasio berat ginjal dengan berat badan tikus.....	40
4.2 Kadar BUN dalam urin dan plasma.....	42
4.3 Kadar kreatinin dalam urin dan plasma.....	43
4.4 Klirens Kreatinin.....	46
4.5 Kadar MDA dalam homogenat ginjal.....	47
4.6 Kadar GSH dalam homogenat ginjal.....	49
4.7 Ekspresi rasio protein p-ERK/ERK pada ginjal.....	50
4.8 Ekspresi gen Bax dan BCL-2 pada ginjal.....	52
5 PEMBAHASAN.....	54
6..KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur molekul cisplatin.....	8
Gambar 2.2 Jalur cisplatin menginduksi kematian sel epitel.....	11
Gambar 2.3 Mekanisme nefrotoksiasis yang diinduksi cisplatin melalui jalur apoptosis intrinsik, apoptosis ekstrinsik, inflamasi, dan jalur retikulum endoplasma (RE).....	15
Gambar 2.4 Tanaman <i>Kurkuma Longa</i> (kunyit).....	22
Gambar 2.5 Struktur molekul kurkumin.....	22
Gambar 2.6 Jalur metabolisme kurkumin.....	24
Gambar 4.1. Berat badan tikus kelompok normal, CDDP, CDDP+CMN, CDDP+NC100, dan CDDP+NC50 selama 10 hari perlakuan.....	39
Gambar 4.2. Rasio berat ginjal kiri per berat badan tikus setelah 10 hari perlakuan.....	41
Gambar 4.3 Rasio berat ginjal kanan per berat badan tikus setelah 10 hari perlakuan.....	41
Gambar 4.4 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar BUN dalam urin.....	43
Gambar 4.5 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar BUN dalam plasma.....	44
Gambar 4.6 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar kreatinin dalam urin.....	45
Gambar 4.7 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar kreatinin dalam plasma.....	46
Gambar 4.8 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap klirens kreatinin.....	47
Gambar 4.9 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar MDA.....	49
Gambar 4.10 Pengaruh CDDP, CMN, dan NC terhadap kadar GSH.....	50
Gambar 4.11. Ekspresi rasio protein p-ERK/ERK.....	51
Gambar 4.12. Rasio Ekspresi gen Bax dan BCL-2.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kondisi amplifikasi gen Bax dan BCL-2..... 37

DAFTAR SINGKATAN

AIF	: <i>Apoptosis Inducing Factor.</i>
AKI	: <i>Acute Kidney Injury.</i>
APAF-1	: <i>Apoptotic Protease Activating Factor.</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
AUC	: <i>Area Under Curve</i>
BUN	: <i>Blood Urea Nitrogen.</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
CDDP	: <i>Cis- diammine-dichloroplatinum (II)</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNCH	: <i>Darmas National Cancer Hospital.</i>
DUSP	: <i>Dual-Specificity Phosphatase.</i>
ERK	: <i>Extracellular Regulated Kinase.</i>
FADD	: <i>Fas Associated Death Domain.</i>
GGT	: <i>Gamma Glutamyl Transpeptidase.</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
GSH	: <i>Reduced Glutathione</i>
GST	: <i>Glutathione S-Transferase</i>
HDAC	: <i>Histon Deacetylases.</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibition Concentration 50%</i>
IMM	: <i>Internal Membran Mitochondria.</i>
JNK	: <i>Jun N-Terminal Kinase.</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase.</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.</i>

NP-SH	: <i>Non-Protein Thiols</i>
OCT	: <i>Organic Cation Transporter.</i>
PIDD	: <i>Protein Induced Death Domain.</i>
PPAR- α	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α.</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species.</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
RTEC	: <i>Renal Tubular Epithelial Cell.</i>
SAHA	: <i>Suberoylanilide Acid Hydroxamic.</i>
SAPK	: <i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism.</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase.</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric Acid</i>
TBARS	: <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor.</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor.</i>
TRAIL	: <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TSA	: <i>Trichostatin A.</i>
TSG	: <i>Tumor Suppressor Gen.</i>
γ GCL	: <i>γ-Glutamylcysteine Ligase</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Persetujuan Kaji Etik.....	71
Lampiran 2 Perhitungan Parameter Penelitian.....	72
Lampiran 3 Data Hasil Pengukuran.....	80
Lampiran 4 Perhitungan Statistik Data Hasil Pengukuran.....	88
Lampiran 5 COA Kurkumin dan Nanokurkumin.....	109
Lampiran 6 Ukuran Partikel Kurkumin dan Nanokurkumin.....	111
Lampiran 7 Draft Artikel.....	113
Lampiran 8 Daftar Riwayat Hidup.....	118

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini kanker merupakan penyebab utama kematian di negara-negara maju dan penyebab kedua kematian di negara-negara berkembang setelah penyakit jantung.¹ Jumlah kasus kanker di Indonesia semakin meningkat, hal tersebut dilihat berdasarkan data Rumah Sakit Kanker Nasional Dharmais (DNCH) yang menunjukkan bahwa ada peningkatan sekitar 30% kasus kanker dari 1.653 kasus pada tahun 2003 menjadi 2387 kasus pada tahun 2007.² Selanjutnya, jumlah ini meningkat menjadi 3083 pada tahun 2013. Jenis kanker yang paling umum pada DNCH adalah kanker nasofaring, kanker paru-paru, kanker serviks dan kanker payudara.³ Kemoterapi merupakan salah satu pilihan untuk pengobatan kanker. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum [II]) adalah obat kemoterapi berbasis platinum yang banyak digunakan untuk mengobati tumor padat dan sudah digunakan selama lebih dari 30 tahun.⁴ Cisplatin dapat digunakan sebagai obat tunggal atau sebagai komponen standar kombinasi kemoterapi di beberapa jenis kanker seperti kanker ovarium dan rahim, kanker testis, kanker leher termasuk nasofaring, dan kanker paru-paru. Cisplatin masih tergolong obat antikanker yang poten, sudah lama digunakan, dan harganya relatif murah. Saat ini telah ditemukan turunan platinum seperti carboplatin dan oxaliplatin, akan tetapi cisplatin masih memberikan tingkat kelangsungan hidup yang lebih baik di beberapa jenis kanker seperti kanker paru-paru.⁵ Selain itu, efek anti kanker carboplatin tidak sama untuk beberapa tipe tumor serta harganya yang relatif lebih mahal dibandingkan cisplatin.⁶

Cisplatin memiliki beberapa efek samping diantaranya, yaitu toksisitas gastrointestinal, ototoksitas, neurotoksisitas, nefrotoksitas, hepatotoksitas, myelosupresi, rambut rontok, reaksi alergi, mual, dan muntah. Namun, dari beberapa efek samping tersebut, nefrotoksitas adalah efek samping utama yang dapat membatasi penggunaan terapi cisplatin.⁷ Berdasarkan suatu studi, akumulasi cisplatin paling tinggi ditemukan pada organ hati, ginjal, dan prostat. Biotransformasi cisplatin di ginjal menghasilkan senyawa yang bersifat toksik sehingga menyebabkan nefrotoksitas. Efek toksik terjadi terutama di tubulus

proksimal ginjal, khususnya di sel epitel tubulus segmen S-3. Efek nefrotoksisitas akibat cisplatin yang paling parah adalah cedera ginjal akut (AKI) terjadi pada 20-30% penderita yang diobati dengan cisplatin. Nefrotoksisitas ditemukan pada 28-36% pasien yang menerima dosis tunggal cisplatin (50 mg/m²).⁸ Meskipun nefrotoksisitas bersifat sementara dan tergantung dosis, hal tersebut dapat menurunkan tingkat filtrasi glomerulus (GFR), yang dapat secara klinis dievaluasi dari peningkatan serum kreatinin dan penurunan klirens kreatinin.⁹

Faktor-faktor lain yang diketahui meningkatkan risiko nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin, yaitu variasi genetik, ras, jenis kelamin, usia, komorbiditas, merokok, dan hipoalbuminemia.⁹ Sekarang ini cisplatin masih merupakan obat standar pada DNCH untuk mengobati beberapa jenis kanker seperti kanker nasofaring, kanker paru-paru dan kanker ovarium. Oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui kejadian nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin, faktor-faktor yang mempengaruhi hal itu, serta mengetahui mekanisme molekuler terjadinya nefrotoksisitas akibat cisplatin. Beberapa mekanisme molekuler yang terlibat dalam terjadinya nefrotoksisitas cisplatin, yaitu inflamasi, stress oksidatif, dan apoptosis.⁹ Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa cisplatin menyebabkan apoptosis pada sel tubulus ginjal. Apoptosis tersebut terjadi karena adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan stress oksidatif.

Saat ini telah banyak penelitian menggunakan bahan alam yang diketahui memiliki efek antioksidan dan diharapkan dapat berperan juga sebagai nefroprotektor. Salah satu bahan alam yang telah banyak diteliti efek nefroprotektornya adalah kurkumin. Kurkumin merupakan senyawa polifenol hidrofobik yang berasal dari rimpang herbal *Curcuma longa*, memiliki berbagai aktivitas biologis dan farmakologis. Kurkumin memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, antimikroba, dan anti karsinogenik. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa kurkumin dapat berperan sebagai hepatoprotektor dan nefroprotektor,¹⁰ supressor trombosis, dan antirematik.¹¹ Antunes et al.¹² melaporkan bahwa pemberian kurkumin (8 mg/kg sebelum dan setelah injeksi cisplatin) memberikan efek perlindungan terhadap nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin (dievaluasi dengan serum kreatinin dan klirens kreatinin) dan stres oksidatif (dievaluasi dengan kadar MDA dan GSH) pada tikus.¹² Selain itu, Kuhad

et al.¹³ merancang pra perlakuan kurkumin selama dua hari dan perlakuan secara paralel dari 15, 30 dan 60 mg/kgBB kurkumin pada sebuah model hewan dengan nefrotoksisitas. Kelompok yang mendapat pengobatan cisplatin menerima kurkumin dengan dosis 60 mg/kgBB menunjukkan fungsi ginjal yang normal (dievaluasi dengan mengukur kadar urea dan kreatinin), yang berhubungan dengan penurunan peroksidasi lipid.¹³ Ueki et al melaporkan bahwa pemberian kurkumin secara oral dengan dosis 100 mg/kgBB menunjukkan efek nefroprotektor melalui mekanisme inflamasi yg terlibat dalam patogenesis nefrotoksisitas akibat cisplatin.¹⁴

Berbagai studi pada hewan coba ataupun pada manusia telah membuktikan bahwa kurkumin sangat aman bahkan pada dosis yang sangat tinggi. Aktivitas biologis dan farmakologis dari kurkumin terhalang oleh beberapa sifat kurkumin yang tidak menguntungkan seperti kelarutannya yang rendah, ketidakstabilan sifat fisika – kimianya, bioavailabilitasnya yang rendah, kadar serum yang rendah, metabolisme yang cepat, distribusi ke jaringan yang terbatas, dan waktu paruh yang pendek.¹¹ Yang et al. menunjukkan bahwa 10 mg/kg kurkumin diberikan secara intravena pada tikus menghasilkan kadar kurkumin maksimum dalam serum sebesar $0.36 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$, sedangkan dosis kurkumin yang 50 kali lipat lebih tinggi diberikan secara oral hanya memberikan $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ kadar serum maksimum pada tikus.¹⁵ Dosis oral kurkumin 1 g/kg pada tikus menghasilkan kadar maksimum serum kurkumin sebesar $0.5 \mu\text{g/mL}$ setelah 45 menit dari pemberian dosis kurkumin.¹⁶

Penelitian terkait nanokurkumin dimulai pada tahun 2005 untuk meningkatkan farmakokinetik kurkumin, bioavailabilitas sistemik, dan aktivitas biologis melalui enkapsulasi atau memuat kurkumin dalam bentuk nano (*nanoformulations*). Nanokurkumin diharapkan memiliki kelarutan yang lebih baik daripada kurkumin, memiliki sifat fisiko kimia yang lebih baik seperti ukuran partikel yang lebih kecil, sehingga diharapkan nanokurkumin dapat berperan secara efektif dan lebih baik daripada kurkumin sebagai protektor pada nefrotoksisitas akibat cisplatin.

1.2 Rumusan Masalah

Telah diketahui bahwa kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologis salah satunya sebagai nefroprotektor, tetapi karena bioavailabilitasnya yang rendah, hanya sedikit kadarnya yang mencapai organ target, sehingga diperlukan suatu bentuk sediaan yang dapat meningkatkan bioavailabilitas kurkumin dan sifat farmakokinetiknya. Bentuk sediaan nanokurkumin diharapkan dapat meningkatkan bioavailabilitas kurkumin dan sifat farmakokinetiknya, akan tetapi belum ada penelitian yang membuktikan secara *in vivo* efek terapi sediaan ini, khususnya efek protektor terhadap nefrotoksisitas akibat cisplatin. Oleh karena itu masalah yang terdapat dalam penelitian yang akan dilakukan adalah:

1. Bagaimana efek nefroprotektor nanokurkumin dapat berperan lebih baik dibandingkan kurkumin terhadap nefrotoksisitas akibat pemberian cisplatin melalui jalur ERK1/2.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Mendapatkan pengobatan yang optimal untuk mengatasi nefrotoksisitas akibat cisplatin.

1.3.2 Tujuan Khusus

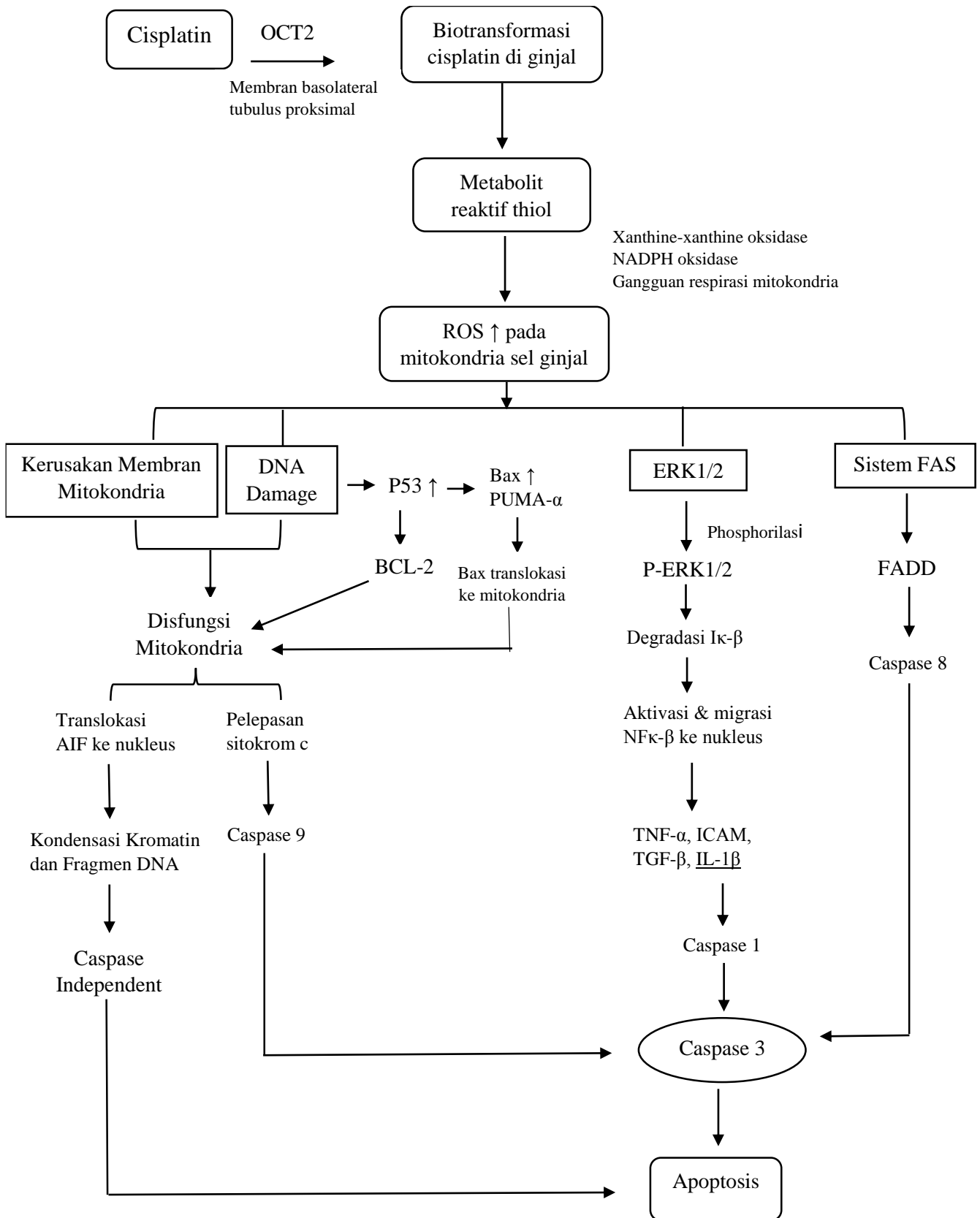
1. Membandingkan efek nefroprotektor antara kurkumin 100 mg/kgBB dengan nanokurkumin 50 mg/kgBB pada parameter penelitian, yaitu kadar BUN dan kreatinin dalam urin dan plasma, klirens kreatinin, kadar MDA dan GSH dalam jaringan ginjal, rasio ekspresi protein p-ERK/ERK, dan rasio ekspresi mRNA gen BCL-2/Bax dalam jaringan ginjal.
2. Membandingkan efek nefroprotektor antara kurkumin 100 mg/kgBB dengan nanokurkumin 100 mg/kgBB pada parameter penelitian, yaitu kadar BUN dan kreatinin dalam urin dan plasma, klirens kreatinin, kadar MDA dan GSH dalam jaringan ginjal, rasio ekspresi protein p-ERK/ERK, dan rasio ekspresi mRNA gen BCL-2/Bax dalam jaringan ginjal.
3. Membandingkan efek nefroprotektor antara nanokurkumin 50 mg/kgBB dengan nanokurkumin 100 mg/kgBB pada parameter penelitian, yaitu kadar

BUN dan kreatinin dalam urin dan plasma, klirens kreatinin, kadar MDA dan GSH dalam jaringan ginjal, rasio ekspresi protein p-ERK/ERK, dan rasio ekspresi mRNA gen BCL-2/Bax dalam jaringan ginjal.

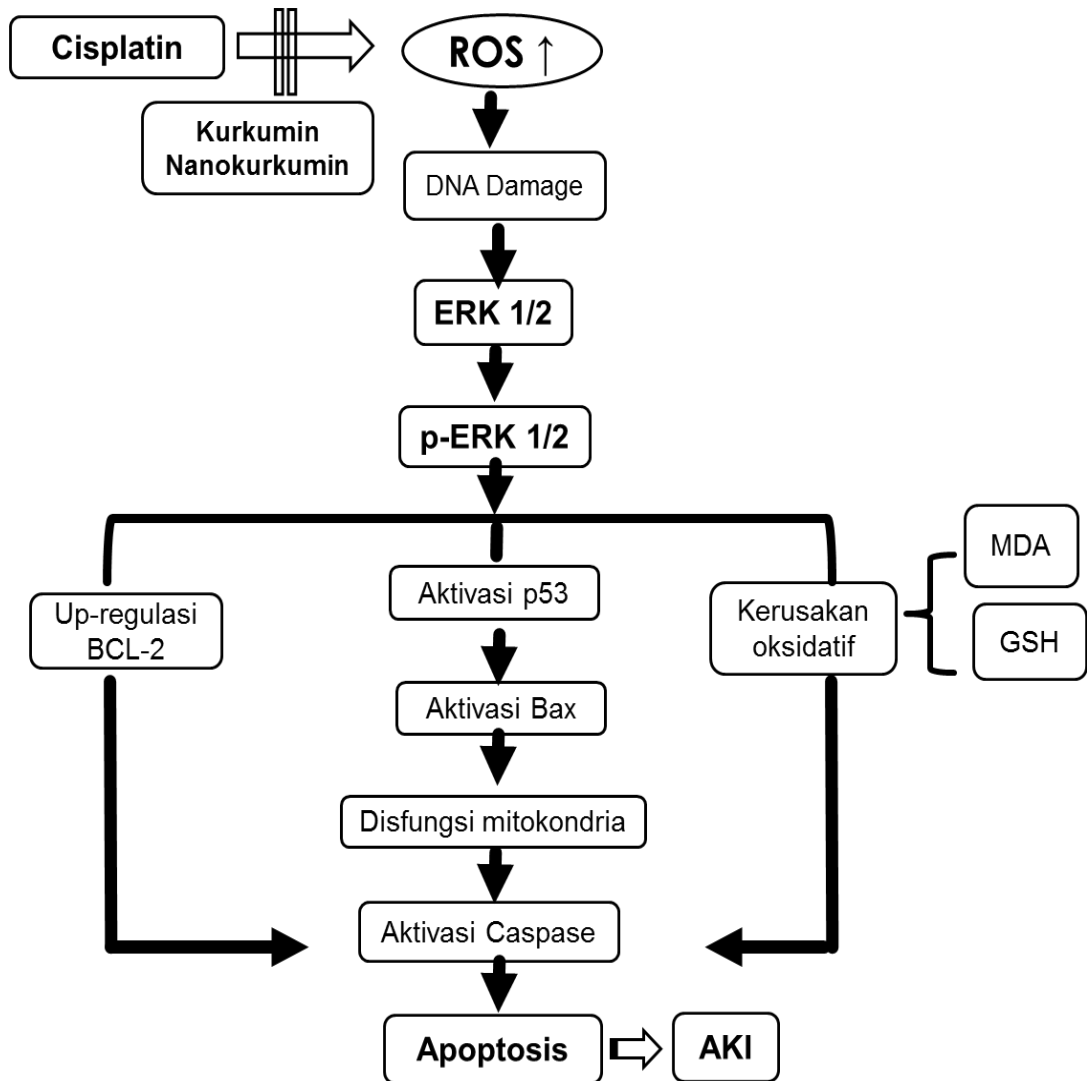
1.4 Manfaat penelitian

- Bagi bidang akademik
Sebagai sarana pendidikan dalam proses melakukan penelitian, melatih cara berpikir analitik sistemik, dan meningkatkan wawasan pengetahuan mengenai nefrotoksisitas akibat penggunaan cisplatin.
- Bagi bidang pelayanan masyarakat
Hasil penelitian dapat menjadi data dasar untuk mengetahui kegunaan kurkumin dan nanokurkumin yang banyak di Indonesia sehingga dapat dijadikan sebagai terapi pencegahan terjadinya nefrotoksisitas akibat penggunaan cisplatin.
- Bagi bidang penelitian
Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar penelitian selanjutnya, baik studi *in vitro* maupun *in vivo*, pada manusia maupun hewan coba untuk menilai potensi kurkumin dan nanokurkumin sebagai terapi pencegahan yang dapat melindungi jaringan ginjal terhadap stress oksidatif, proses inflamasi dan apoptosis yang merupakan dasar terjadinya efek samping pada penggunaan cisplatin.

1.5 Kerangka Teori



1.6 Kerangka Konsep



1.7 Hipotesis

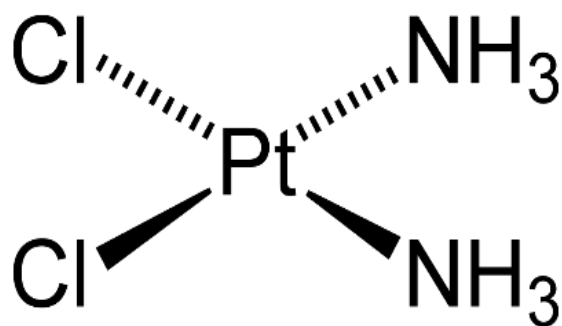
Nanokurkumin mempunyai efek nefroprotektor yang lebih baik dibandingkan kurkumin pada nefrotoksisitas akibat pemberian cisplatin, melalui jalur ERK1/2.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cisplatin

Cisplatin (cis-Diamminedichloroplatinum (II)) merupakan senyawa kompleks anorganik yang terbentuk oleh atom platinum yang dikelilingi oleh atom klorin (Cl) dan amonia pada posisi cis dari bidang horizontal. Studi farmakokinetik cisplatin pada manusia menunjukkan waktu paruh awal cisplatin adalah 58-73 jam dan terbentuk ikatan dengan protein secara cepat hingga 90% selama 2 jam.¹⁷ Cisplatin digunakan sebagai obat kemoterapi yang sangat efektif. Penggunaan cisplatin secara klinis telah disetujui oleh FDA pada bulan Desember 1978. Sejak itu, penerapan cisplatin telah diperluas ke beberapa jenis kanker dan telah digunakan baik secara tunggal atau dikombinasikan dengan obat lain, sebagai “*first line*” terapi, adjuvant, atau terapi neoadjuvant, serta prosedur lain seperti pembedahan atau radioterapi. Efek sitotoksik cisplatin terjadi melalui beberapa mekanisme, termasuk penghambatan sintesis protein, cedera mitokondria, dan kerusakan DNA, akhirnya menyebabkan aktivasi jalur kematian sel terprogram pada sel tumor, serta dalam sel tubulus ginjal.¹⁸ Beberapa penelitian menunjukkan bahwa spesies oksigen reaktif (ROS) atau radikal bebas terlibat dalam nefrotoksisitas cisplatin.¹⁸



Gambar 2.1 Struktur molekul cisplatin.

Aktivitas terapeutik cisplatin tergantung pada dosisnya, tetapi potensi penggunaan untuk terapinya terbatas terutama karena efek nefrotoksisitas. Selama beberapa dekade, studi pengukuran kadar cisplatin pada organ target yang berbeda

telah dilaporkan. Hasil pengukuran kadar cisplatin pada jaringan manusia dari pasien dengan tumor yang berbeda dan mengalami perlakuan yang berbeda yang dianalisis dengan X-Ray Fluorescence, yaitu hati, ginjal dan prostat merupakan organ dengan kadar cisplatin tertinggi. Konsentrasi yang lebih rendah ditemukan pada kandung kemih, otot, testis, pankreas dan limpa, selanjutnya konsentrasi terendah terdeteksi di usus, adrenal kelenjar, jantung, paru-paru, otak dan cerebellum.¹⁹

Penurunan fungsi ginjal sekitar 25-35% ditemukan pada pasien yang diobati dengan dosis tunggal cisplatin. Penurunan 20-40% dari filtrasi glomerulus, peningkatan BUN (darah urea nitrogen), peningkatan konsentrasi serum kreatinin serta penurunan kadar magnesium dan kalium dalam serum sering terjadi pada pasien yang diobati dengan cisplatin.²⁰

2.2 Biotransformasi Cisplatin di Ginjal

Studi pada tikus dan mencit menunjukkan bahwa cisplatin mengalami aktivasi metabolik di ginjal menghasilkan senyawa toksik. Proses tersebut dimulai dengan pembentukan konjugat GSH-platinum dalam hati, yang dimediasi oleh *glutathione-S-transferase*. Selanjutnya konjugat tersebut ditransport ke luar sel oleh MRP2 (*multidrug resistance-associated protein*), kemudian konjugat glutathione melewati ginjal dan dibelah menjadi konjugat sisteinil-glisin oleh *gamma glutamyl transpeptidase* (GGT) dan diekspresikan pada permukaan sel-sel tubulus proksimal. Konjugat sisteinil-glisin dimetabolisme lebih lanjut menjadi konjugat sistein oleh aminopeptidase dan diekspresikan pada permukaan sel-sel tubulus proksimal. Konjugat sistein ditransport ke dalam sel tubulus proksimal kemudian dimetabolisme lebih lanjut oleh konjugat s-sistein beta-lyase menjadi tiol yang sangat reaktif. Gangguan pada jalur biotransformasi ini telah diusulkan sebagai pendekatan untuk mencegah pembentukan metabolit nefrotoksik, sehingga dapat meminimalkan nefrotoksisitas cisplatin. Hal tersebut telah menunjukkan bahwa kekurangan GGT pada tikus menyebabkan resistensi terhadap efek nefrotoksik dari cisplatin.²¹

2.3 Akumulasi Cisplatin di Sel Ginjal

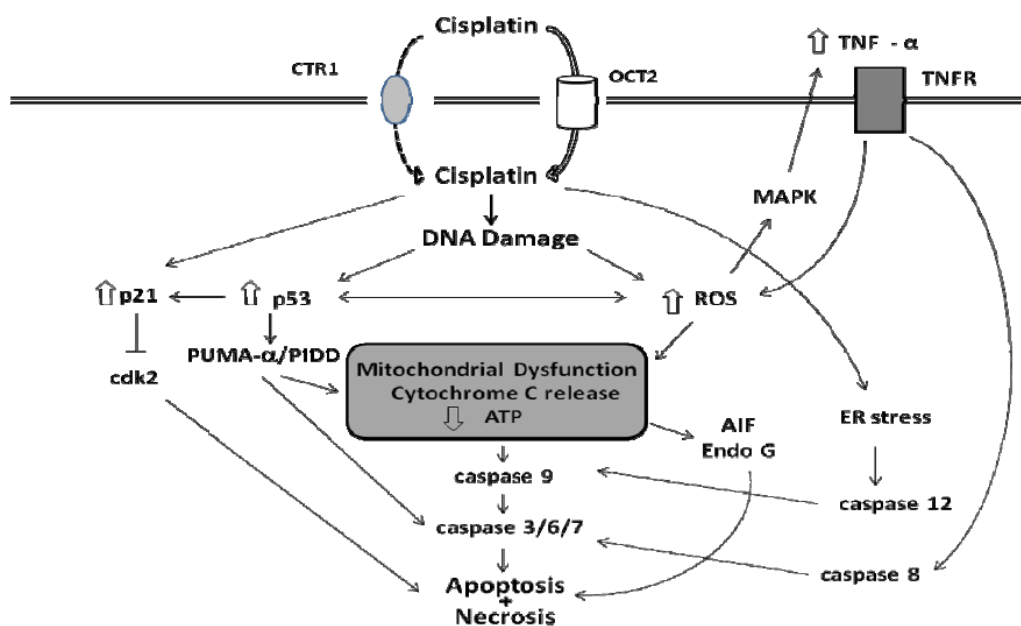
Cisplatin dibersihkan oleh ginjal melalui filtrasi glomerulus dan sekresi tubular. Selama proses ekskresi, cisplatin terkonsentrasi dan bahkan kadar non toksik cisplatin dalam darah dapat mencapai kadar toksiknya di ginjal. Telah dilaporkan bahwa konsentrasi cisplatin dalam sel epitel tubulus ginjal sebesar lima kali lipat lebih tinggi dibandingkan dalam darah. Efek toksik terjadi terutama di tubulus proksimal ginjal, khususnya di sel epitel tubulus segmen S-3.¹⁷

Sistem transportasi aktif telah dikaitkan dengan toksisitas cisplatin. Sistem transport terfasilitasi yang telah dikaitkan dengan nefrotoksitas cisplatin dimediasi oleh transporter OCT2 dan Ctr1. Transporter OCT2 diekspresikan sangat tinggi dalam membran basolateral dari tubulus proksimal dan berpartisipasi terhadap akumulasi cisplatin dalam ginjal. Ctr1 adalah transporter tembaga yang juga digunakan untuk memediasi serapan cisplatin ke dalam sel mamalia, termasuk sel-sel kanker ovarium. Ctr1 banyak terdapat dalam ginjal orang dewasa dan terlokalisasi pada membran basolateral dari tubulus proksimal.²²

Downregulation dari ekspresi Ctr1 dalam sel ginjal secara *in vitro* dapat menurunkan baik serapan cisplatin maupun sitotoksitas. Peran Ctr1 pada nefrotoksitas cisplatin secara *in vivo* belum diperiksa. Cisplatin terbukti menghambat *uptake* dari substrat OCT2 lainnya. Demikian juga cimetidine sebagai substrat dari OCT2, mengurangi *uptake* cisplatin dan sitotoksitas secara *in vitro* serta nefrotoksitas cisplatin secara *in vivo*. Dua penelitian terbaru menunjukkan peranan penting OCT2 dalam memediasi *uptake* cisplatin ginjal dan toksisitas. Pertama, *knockout* gen OCT2 secara signifikan mengurangi ekskresi cisplatin melalui urin dan nefrotoksitas. Kedua, *single-nucleotide polymorphism* (SNP) pada gen OCT2 (rs316019) dikaitkan dengan penurunan nefrotoksitas yang diinduksi cisplatin pada pasien.²²

2.4 Target Selular Cisplatin

Senyawa platinum diyakini memediasi efek sitotoksik melalui interaksinya dengan DNA (Gambar 2). Pada lingkungan berair, ligan klorida dari cisplatin diganti dengan molekul air menghasilkan elektrofil bermuatan positif. Elektrofil ini bereaksi dengan situs nukleofilik pada makromolekul intraseluler untuk membentuk adisi protein, DNA, dan RNA. Cisplatin mengikat DNA yang mengarah pada pembentukan ikatan silang inter dan *intra-strand*. Ikatan silang antara DNA dan cisplatin mengarah pada penurunan replikasi dan transkripsi, menghasilkan penghentian/penahanan siklus sel dan akhirnya apoptosis.²²



Gambar 2.2 Jalur cisplatin menginduksi kematian sel epitel. Cisplatin masuk ke dalam sel epitel ginjal melalui transporter OCT2. Cisplatin menyebabkan kerusakan DNA inti dan mitokondria, dan menghasilkan peningkatan produksi ROS yang memicu aktivasi baik jalur mitokondrial maupun non-mitokondrial dari apoptosis dan nekrosis.

Cisplatin dihidrolisis untuk menghasilkan metabolit bermuatan positif yang akan terakumulasi dalam mitokondria bermuatan negatif. Dengan demikian, sensitivitas sel untuk cisplatin tampaknya berkorelasi dengan densitas mitokondria dan membran potensial mitokondria. DNA mitokondria akan lebih rentan terhadap kerusakan yang diinduksi cisplatin dibandingkan DNA inti, karena kurang efisiennya mekanisme DNA *repair*.²³ Pengamatan tersebut menunjukkan bahwa DNA mitokondria menjadi sasaran penting dalam toksisitas cisplatin. Energetika mitokondria juga terganggu oleh cisplatin dan dapat menyebabkan nefrotoksitas.

Asam lemak merupakan sumber energi utama untuk tubulus proksimal, tempat utama dari cedera ginjal akibat cisplatin. Cisplatin dapat menghambat oksidasi asam lemak di ginjal tikus dan di sel tubulus proksimal terkultur melalui reduksi PPAR- α , dimediasi ekspresi gen yang terlibat dalam pemanfaatan asam lemak selular. Agonis PPAR- α mengurangi nefrotoksisitas cisplatin secara *in vivo*. Paparan cisplatin pada sel tubulus proksimal terkultur secara *in vitro* menghambat kompleks I–IV rantai respirasi mitokondria dan sebagai hasilnya terjadi penurunan ATP tingkat intraseluler.²⁴ Adanya gangguan pada rantai respirasi mitokondria juga dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ROS, sehingga terjadi kerusakan mitokondria. Pengobatan dengan cisplatin secara *in vivo* juga mengakibatkan disfungsi mitokondria yang dibuktikan dengan penurunan potensial elektrokimia membran, penurunan jumlah *uptake* kalsium mitokondria dan penipisan sistem pertahanan antioksidan mitokondria.²⁴

2.5 Karakteristik Klinis dari Nefrotoksisitas Cisplatin

Laporan pertama studi nefrotoksisitas pada hewan pada tahun 1971 menunjukkan perubahan histopatologi dari nekrosis tubular akut dengan azotemia. Pada awal penggunaan cisplatin secara klinis, menunjukkan bahwa cisplatin bergantung dosis menginduksi gagal ginjal akut pada 14 – 100% pasien dengan insiden yang bervariasi, dengan dosis kumulatif. Timbulnya insufisiensi ginjal dimulai beberapa hari setelah pemberian dosis cisplatin, dilihat melalui peningkatan konsentrasi serum kreatinin dan *blood urea nitrogen* (BUN). Hipomagnesemia juga terjadi setelah pemberian dosis berulang dari cisplatin. Perbaikan fungsi ginjal biasanya terjadi selama periode waktu 2-4 minggu.²⁵ Nefrotoksisitas meningkat dengan adanya peningkatan dosis dan frekuensi pemberian cisplatin serta adanya akumulasi dosis cisplatin. Puncak plasma yang tinggi dari cisplatin telah dihubungkan dengan nefrotoksisitas dan salah satu studi telah menunjukkan laju filtrasi glomerulus dan konsentrasi magnesium dalam plasma menurun setelah pemberian dosis cisplatin yang lebih tinggi dari pada 50 mg/m² luas permukaan badan, tetapi tidak ada perubahan apabila dosisnya dibawah 20 mg/m².²⁶

Secara umum, munculnya kembali disfungsi ginjal dapat meningkatkan risiko AKI (*acute kidney injury*). Pada cisplatin, terdapat keterbatasan data kejadian

nefrotoksisitas pada populasi dengan penyakit ginjal kronis karena banyak uji yang tidak mengikutsertakan pasien dengan insufisiensi ginjal. Diabetes menurunkan risiko nefrotoksisitas cisplatin pada model hewan. Namun studi klinis belum menemukan dampak diabetes pada nefrotoksisitas pada manusia. Pasien dengan polimorfisme gen OCT2 yang mengatur transportasi platinum ke sel-sel ginjal, dapat mengurangi risiko terjadinya nefrotoksisitas.²⁷

2.5.1 Amifostin, obat sintetik sebagai pelindung ginjal akibat radiasi dan kemoterapi

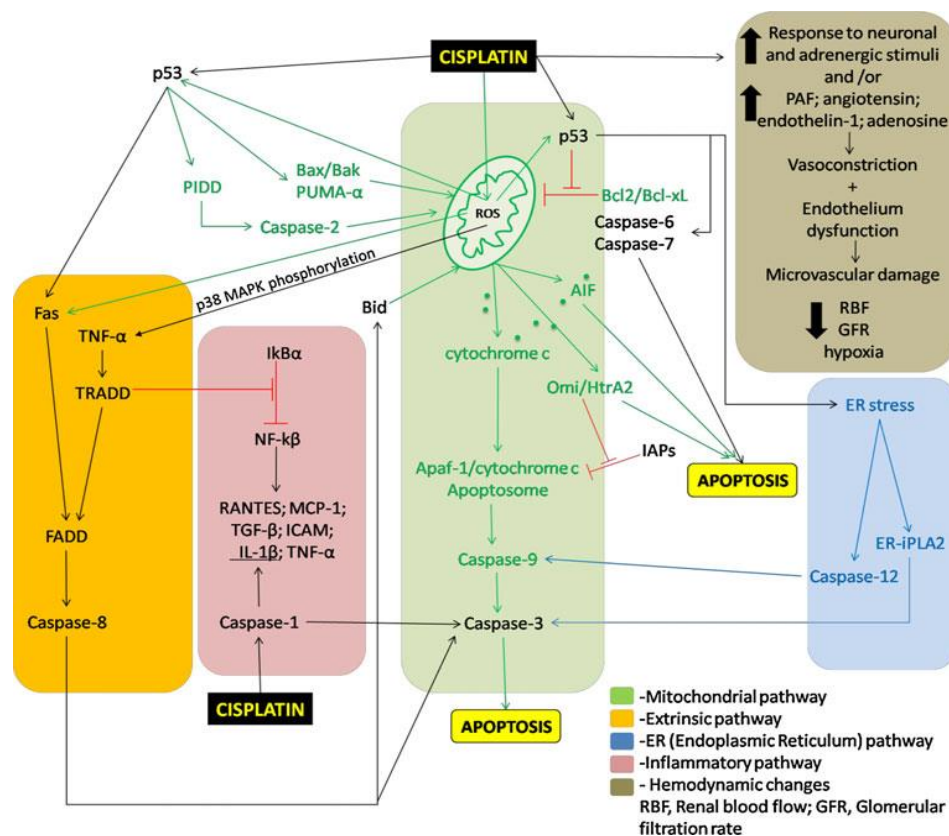
Amifostin (WR-2721) merupakan senyawa anorganik thiophosphate, kaya akan gugus sulfhidril dan memiliki efek sitoprotektif pada jaringan normal tanpa mengurangi respon anti-tumor. Amifostin merupakan *pro-drug* yang perlu diaktivasi terlebih dahulu menjadi metabolit aktif (WR-1065) melalui alkalin fosfatase terikat membran yang ditemukan pada konsentrasi tinggi pada jaringan normal. Metabolit aktif tersebut dibersihkan dari plasma dengan kisaran waktu paruh 1 – 3 menit. Pembuatan amifostin pada awalnya bertujuan sebagai pelindung kerusakan akibat paparan sinar radiasi dan terbukti dapat melindungi jaringan normal secara baik, kemudian amifostin dikembangkan untuk digunakan sebagai pelindung efek toksik kemoterapi seperti cisplatin. Kemampuan amifostin dalam melindungi jaringan normal dari efek toksik penggunaan cisplatin telah diteliti pada beberapa macam hewan coba dan pada penderita kanker. Hasil penelitian membuktikan bahwa amifostin dapat mengurangi efek toksik penggunaan cisplatin dan waktu optimal pemberian amifostin adalah 30 menit sebelum pemberian terapi cisplatin.²⁸

Metabolit amifostin bekerja di dalam tubuh secara selektif, yaitu dengan selektif bekerja hanya pada sel yang normal dan tidak pada sel kanker. Amifostin dimetabolisme oleh fosfatase basa menjadi bentuk aktifnya. Fosfatase basa itu sendiri jumlahnya sangat sedikit pada sel kanker dibandingkan pada sel normal, sehingga sedikit pula amifostin yang dimetabolisme oleh fosfatase basa menjadi bentuk aktifnya dalam sel kanker. Akan tetapi ternyata penggunaan amifostin ini belum terlalu efektif untuk mengurangi efek nefrotoksisitas akibat penggunaan cisplatin.²⁸

2.6 Mekanisme kematian sel pada nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin.

Mekanisme nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin sangatlah kompleks, melibatkan beberapa jalur sinyal dan molekul. Jalur sinyal yang terlibat dalam nefrotoksisitas akibat cisplatin adalah jalur ERK (*Extracellular Regulated Kinase*). Aktivasi ERK mengontrol berbagai respon sel, seperti proliferasi, migrasi, diferensiasi, dan kematian sel. Cisplatin menginduksi dua model kematian sel, yaitu apoptosis dan nekrosis. Aktivitas ERK dapat mengaktifkan jalur apoptosis melalui induksi pelepasan sitokrom c dari mitokondria, aktivasi caspase 8, atau aktivasi caspase 3 yang mengontrol apoptosis pada sel tubulus ginjal. Studi *in vitro* pada tahun 1996 menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi cisplatin (800 μM) menyebabkan terjadinya nekrosis dalam kultur sel tubulus proksimal ginjal tikus, sementara konsentrasi yang lebih rendah (8 μM) menyebabkan apoptosis.²⁹ Nekrosis telah dihubungkan dengan dosis tinggi dari cisplatin, beberapa kerusakan mitokondria, dan deplesi ATP, sedangkan apoptosis merupakan proses yang bergantung pada energi ATP selanjutnya dikaitkan dengan perubahan mitokondria yang disebabkan oleh dosis terapi. Akan tetapi studi secara *in vivo* menunjukkan bahwa cisplatin menginduksi kematian sel baik nekrosis maupun apoptosis.²⁹

Jalur apoptosis yang berbeda, dipicu oleh cisplatin pada RTEC (*Renal Tubular Epitel Cell*). Jalur utama yang dilaporkan, yaitu (a) jalur intrinsik, yang dipicu oleh mitokondria dan (b) jalur ekstrinsik, yaitu dimediasi oleh reseptor/ligan TNF (tumor necrosis factor) dan Fas (APO -1 atau CD95) / sistem Fas ligan. Selain itu, jalur stress retikulum endoplasma (tekanan ER) juga telah ditunjukkan dalam apoptosis yang diinduksi cisplatin pada RTEC.³⁰ Mekanisme nefrotoksisitas yang disebabkan oleh cisplatin diringkas dalam Gambar 3.



Gambar 2.3 Mekanisme nefrotoksisitas yang diinduksi cisplatin melalui jalur apoptosis intrinsik, apoptosis ekstrinsik, inflamasi, dan jalur retikulum endoplasma (RE).³⁰

2.6.1 Jalur apoptosis Mitokondrial (Intrinsik)

Mitokondria merupakan sumber penghasil energi untuk sel, tempat disintesisnya ATP. Kerusakan mitokondria menyebabkan berbagai gangguan fungsi mitokondria, misalnya gangguan pada produksi ATP, *calcium buffering capacity* dan produksi spesies oksigen reaktif (ROS).³¹ Mitokondria merupakan sumber mediator yang penting dalam apoptosis. Berbagai senyawa antikanker bekerja dengan mengganggu fungsi mitokondria dan menyebabkan apoptosis yang selektif pada sel kanker. Perubahan fungsi mitokondria sel tumor mengarah pada kelangsungan hidup sel dan resistensi sel tumor terhadap kemoterapi.³²

Paparan cisplatin pada sel epitel ginjal menyebabkan kerusakan mitokondria pada RTEC (*Renal Tubular Epitel Cell*) sehingga memicu jalur apoptosis mitokondrial melalui stimulan yang berbeda, seperti peningkatan produksi ROS dan aktivasi protein pro-apoptosis (Bax, Bak, PUMA-α). Stres

oksidatif akibat adanya peningkatan ROS juga terlibat dalam nefrotoksisitas cisplatin. ROS diproduksi melalui sistem *xanthine-xanthine oksidase*, mitokondria, dan NADPH oksidase dalam sel. Cisplatin dapat merusak rantai respirasi mitokondria serta dapat menurunkan sintesis ATP dan meningkatkan produksi anion superoksida yang nantinya dapat berubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Radikal hidroksil merupakan oksidan yang sangat kuat dan induksinya telah didemonstrasikan pada ginjal tikus yang diberi pengobatan cisplatin. Kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh cisplatin dihubungkan dengan deplesi sistem pertahanan antioksidan enzimatis (SOD, katalase, glutathion peroksidase, glutathion transferase, dan glutathion reduktase) dan non-enzimatis (GSH dan NADPH) pada ginjal tikus.³³

Berbagai ROS dapat menyebabkan kerusakan lipid yang merupakan komponen dari membran sel melalui peroksidasi lipid. Selain itu, kerusakan mitokondria akibat ROS juga menyebabkan terjadinya kerusakan DNA sehingga terjadi translokasi Bak dari sitosol ke mitokondria dan aktivasi caspase-2 yang diaktifkan oleh PIDD (*Protein Induced Death Domain*), sebuah protein p53 yang diinduksi oleh *death domain*. Faktor transkripsi p53 mengaktifkan gen pro-apoptosis yang mengkode Bax, Bak, PUMA- α , dan PIDD. Adanya protein anti-apoptosis (Bcl-2) menjaga integritas membran mitokondria, mencegah pelepasan sitokrom c dan translokasi AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) ke inti.³⁴

Membran mitokondria merupakan target dari ROS yang menyerang protein dan lipid, terutama *anion phospholipid cardiolipin* yang berada di IMM (*Internal Membran Mitochondria*), sehingga membran mitokondria kehilangan integritasnya kemudian terjadi pelepasan faktor pro-apoptosis seperti sitokrom c, Omi/HtrA2, dan AIF (*Apoptosis Inducing Factor*). Sitokrom c akan bermigrasi ke sitosol dan berikatan dengan Apaf-1 membentuk kompleks apoptosome. Selanjutnya apoptosome akan mengaktifkan caspase 9 yang diikuti dengan aktivasi caspase 3, lalu mengaktifkan sinyal apoptosis. AIF adalah sebuah protein yang terletak di ruang antar membran mitokondria dan terdapat dalam sel epitel ginjal.³³ AIF bertranslokasi ke nukleus ketika membran mitokondria rusak, kemudian memicu kondensasi kromatin dan fragmen DNA skala besar. AIF mempromosikan apoptosis tanpa aktivasi caspase. Caspase merupakan keluarga dari protease

kematian sel yang memainkan peran penting dalam terjadinya apoptosis pada sel epitel tubular ginjal yang diinduksi cisplatin, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Aktivasi caspase 3, 8, dan 9 terjadi segera setelah 12 jam pemberian cisplatin pada sel epitel ginjal secara *in vitro*.³³

2.6.2 Jalur Ekstrinsik bergantung Caspase-8

Jalur apoptosis ekstrinsik diaktifkan jika ligan mengikat *death receptor* pada membran sel sitoplasma, merekrut, dan mengaktifkan caspase-8, yang selanjutnya akan mengaktifkan efektor caspase-3. Cisplatin mengatur ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α , yang aktivitasnya terutama dimediasi oleh *death receptor* TNFR1 dan TNFR2 yang juga di up-regulasi oleh cisplatin. TNFR1 dapat langsung menginduksi apoptosis jalur ekstrinsik, sedangkan TNFR2 tidak langsung menginduksi apoptosis dan nekrosis di RTEC karena TNFR2 tidak memiliki *death domain* untuk memicu apoptosis secara langsung. TNFR2 dikaitkan dengan respon inflamasi, yang menguatkan efek TNFR1.

Cisplatin mengatur sistem reseptor/ligan Fas, keduanya (Fas dan TNFR1) berinteraksi dengan *Fas associated death domain* (FADD), yang mengarah pada aktivasi caspase-8, aktivasi caspase-3, dan kematian sel apoptosis. Telah dilaporkan bahwa pelemahan nefrotoksisitas cisplatin terjadi pada tikus dengan defisiensi TNFR1, tikus defisiensi TNF- α , dan tikus defisiensi TNFR2. Hal tersebut juga menyebutkan bahwa peningkatan produksi ROS dalam mitokondria berperan dalam apoptosis yang dimediasi TNF- α dan ekspresi Fas-L.³⁵

Faktor transkripsi p53 juga mengaktifkan gen yang mengkode Fas, oleh karena itu p53 memainkan peran penting dalam jalur apoptosis ekstrinsik melalui Fas / FADD *signaling*. Selain itu, telah dilaporkan bahwa tikus defisiensi p53 yang diobati dengan cisplatin memiliki tingkat apoptosis yang lebih rendah pada sel tubulus ginjal, penurunan kerusakan jaringan ginjal, dan peningkatan fungsi ginjal dibandingkan dengan hewan jenis *wild-type* yang diberi cisplatin.³⁶

Jalur *death receptor* yang dimediasi oleh TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) juga diaktivasi oleh cisplatin, jalur ini selektif menginduksi apoptosis pada beberapa sel kanker tetapi tidak pada sel normal. Terdapat lima jenis reseptor TRAIL; namun, sebagian besar sel-sel kanker

mengaktifkan sinyal melalui DR4 (TRAIL-R1) dan DR5 (TRAIL-R2). Aktivasi *death domain* pada reseptor TRAIL menyebabkan aktivasi pro-caspase-8 dan kemudian aktivasi caspase-3. Pada beberapa jenis sel, sejumlah caspase-8 yang diaktifkan dengan jalur ini tidak cukup untuk mengaktifkan caspase hilir tapi cukup untuk membelah Bid, yang kemudian memicu jalur mitokondria. Cisplatin telah dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi DR5, oleh karena itu terjadi potensiasi apoptosis yang diinduksi TRAIL pada sel kanker prostat dan kanker kolon. Hal tersebut telah dilaporkan meningkatkan kematian sel yang diinduksi oleh TRAIL pada karsinoma sel ginjal manusia (ACHN), kanker kandung kemih (T24), kanker paru-paru (MAC10), dan sel kanker serviks (Hela). Signaling TRAIL telah dikaitkan dengan aktivitas antitumor dari cisplatin, bukan dengan aksi nefrotoksiknya.³⁶

2.7 Protein BCl-2 dan Fungsi Mitokondria

BCl-2 merupakan *prosurvival factor* yang pertama, diekspresikan oleh folikel sel B-2 limfoma. Semua sel mamalia mengekspresikan protein BCl-2 yang meregulasi pertumbuhan dan perkembangan (mengacu pada program kematian sel) sel normal, serta meregulasi apoptosis dalam kondisi patologis yang mengacu pada *catastrophic cell death*. Pada sel kanker, keseimbangan homeostasis antara ketahanan hidup sel dan faktor kematian (*death factor*) sel cenderung mengarah pada ketahanan hidup sel, sehingga terjadi proliferasi sel yang cepat dan abnormal. Selain itu, adanya ekspresi yang berlebihan dari gen anti-apoptosis dan/atau kurangnya ekspresi dari gen pro-apoptosis dapat memicu pertumbuhan sel kanker. Pada jaringan normal, ketiadaan protein BCl-2 pro-apoptosis dapat menurunkan kemampuan hewan untuk bertahan hidup hingga dewasa, khususnya ketika semua protein BCl-2 pro-apoptosis dieliminasi. Pada kondisi patologis, sinyal sel pro-apoptosis menyebabkan kematian sel dengan mengganggu keseimbangan antara protein BCl-2 anti-apoptosis dan pro-apoptosis pada semua jaringan, termasuk ginjal. Protein BCl-2 juga berperan pada sel sehat dalam morfogenesis, transport elektron, dinamika mitokondria, dan *autophagy*, proses yang menentukan vitalitas (daya hidup) sel dan jika terganggu dapat memicu kematian sel. Selain itu, protein

BCL-2 memiliki 2 sisi, yaitu sebagai regulator kematian sel dan berperan aktif dalam fungsi harian yang menjaga kesehatan sel.³⁸

Keluarga BCL-2 terdiri dari anggota yang saling bertentangan yang mengatur kelangsungan hidup sel dengan mengantagoniskan satu sama lain. Anggota keluarga BCL-2 harus memiliki minimal satu domain homologi BCL-2 (disebut sebagai BH domain). Bax (BCL (sel B limfoma)-terkait X) mempromosikan kematian sel, sedangkan BCL-2 lainnya secara langsung melawan efek kematian sel dari Bax. Meskipun Bax dan BCL-2 sama-sama memiliki domain BH-4, hanya domain BH-4 dari BCL-2 yang mendukung sifat anti-apoptosis. Sebagian protein BCL-2 yang lebih kecil hanya mengandung domain BH-3 dan bertindak sebagai sensor utama dari stress sel. Secara umum, protein yang hanya memiliki domain BH-3 memerlukan Bax atau Bak untuk memicu kematian sel. Akan tetapi kelompok yang hanya memiliki domain BH-3 seperti tBid dan bim, dapat secara langsung mengaktifkan Bax dan Bak. Berdasarkan penelitian Soriano dan Scorrano,³⁹ menyatakan bahwa protein BCL-2 anti-apoptosis seperti bcl-xl berinteraksi dengan bax pada permukaan membran mitokondria, bukan di sitosol, mencegah penetrasi membran luar dengan cara melepaskan mediator pro-apoptosis. Meskipun mitokondria dan retikulum endoplasma (RE) mengekspresikan BCL-2, bax hanya ternetralisasi dengan vektor BCL-2 yang ada di mitokondria. Bax menjadi bersifat mitotoksik dengan melewati lingkungan hidrofilik dari sitosol dan bagian membran luar yang bersifat hidrofobik.³⁸

Protein BCL-2 selain berperan pada jalur kematian sel yang berpusat pada permeabilitas membran luar mitokondria, protein BCL-2 juga memberikan efek yang baik pada fungsi sel yang sehat. Bax merupakan protein yang pertama diketahui berperan dalam kematian sel, protein yang mempromosikan fusi mitokondria. Beberapa peneliti berpendapat bahwa sebelum terjadi MPT (*mitochondrial pore transition*) dan kematian sel, bax memicu fragmentasi mitokondria. Sedangkan beberapa peneliti lainnya menyatakan bahwa fragmentasi hanya meningkatkan efisiensi “*bax attack*” pada membran luar mitokondria. Inseri bax ke dalam membran luar mitokondria menyebabkan pelepasan substansi apoptosis seperti sitokrom c, AIF, SMAC, diabalo, dan endonuklease yang berperan dalam morfologi apoptosis.

Terdapat beberapa agen kemoterapi yang dapat menyebabkan terjadinya nefrotoksisitas cedera ginjal akut, salah satunya adalah cisplatin dan gentamisin yang dapat memicu apoptosis pada sel epitel ginjal melalui peningkatan ROS, proses stres oksidatif, dan gangguan ekspresi RNA BCL-2. Sel ginjal yang terpapar cisplatin dikaitkan dengan perubahan rasio Bax:BCL-2, menyebabkan peningkatan ekspresi Bax dan penurunan ekspresi BCL-2 yang sebagian dipicu oleh stress oksidatif.³⁸

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) diketahui terlibat dalam memediasi kelangsungan hidup sel. Peran ERK menjadi kontroversial, dimana aktivasinya dapat menghasilkan proliferasi sel dan kematian sel. Suatu penelitian melaporkan bahwa aktivasi ERK dapat menyebabkan kerusakan DNA, yang menuju pada siklus sel istirahat (*arrest*) dan apoptosis. Selain itu, aktivasi ERK dijadikan sebagai respon terhadap adanya stress RE (Retikulum Endoplasma) yang menginduksi apoptosis, dimana aktivasinya dapat diinduksi oleh agen sitotoksik.⁴⁰

Cisplatin juga mengaktifkan protein MAPK termasuk ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), p38, dan JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*). Mekanisme cisplatin dalam mengaktifkan MAPK masih belum jelas, adanya hambatan aktivasi MAPK dapat menghambat progresifitas nefrotoksisitas akibat cisplatin. ERK diaktivasi oleh sinyal EGFR (*Epidermal Growth Factor Reseptor*). Cisplatin juga mengaktifkan EGFR/Src yang dapat memicu aktivasi ERK dan caspase 3 mengarah pada apoptosis dan terjadinya nefrotoksisitas. P38 dan JNK diaktivasi oleh berbagai jalur stress seluler termasuk stres oksidatif dan inflamasi. Aktivasi p38 mengarah pada induksi transkripsional dari TNF- α , berkontribusi dalam nefrotoksisitas. Masih belum jelas bagaimana JNK berperan dalam nefrotoksisitas, tetapi penelitian terbaru menyatakan bahwa JNK berperan dalam respon apoptosis maupun inflamasi.⁴¹

2.7.1 ROS sebagai mediator ERK dalam menginduksi kematian sel

Aktivasi ERK telah dikaitkan dengan kematian sel yang diakibatkan oleh berbagai senyawa anti-tumor. ERK spesifik phosphatase sangat sensitif terhadap ROS, sehingga dispekulasikan bahwa aktivasi ERK dikarenakan adanya peningkatan ROS, mungkin menceminkan tingkat *scavenger* ROS pada setiap

model tertentu. Penggunaan inhibitor ROS menunjukkan bahwa aktivasi ERK membutuhkan produksi ROS untuk menginduksi kematian sel. Beberapa oksidan kimia, seperti H₂O₂, peroksinitrit (ONOO) atau NO menginduksi ERK, sedangkan banyak stimuli/rangsangan yang melibatkan ERK dalam kematian sel, memicu produksi ROS. Aktivitas ERK juga terlibat dalam aktivasi jalur ekstrinsik dari apoptosis melalui ligan *death receptors*, seperti TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TNF- α , dan sistem Fas ligan. ROS memediasi aktivasi ERK berkepanjangan yang mungkin menjadi mekanisme penting dalam melibatkan fungsi jalur ERK pada kematian sel.⁴² Jalur ERK berperan utama dalam regulasi pertumbuhan sel dan diferensiasi sel, menjadi sangat terinduksi aktivasinya sebagai respon terhadap *growth factors* dan sitokin. ERK juga diaktivasi oleh beberapa kondisi seperti stress sel dan cedera oksidan.⁴³

Pada sebagian besar penelitian terkait kematian sel yang diinduksi oleh jalur ERK, aktivasi ERK biasanya tidak berkepanjangan, ERK dijaga fosforilasinya selama 6 sampai 72 jam.⁴⁴ Aktivitas ERK dapat diperpanjang melalui inhibisi tirosin phosphatase dan DUSP (*Dual-specificity phosphatases*) oleh ROS, selain itu ROS dapat menstimulasi jalur ERK melalui aktivasi reseptor tirosin kinase seperti EGFR. DUSP dapat mendefosforilasi residu threonine dan serin dalam aktivasi MAPK.⁴⁴

2.8. Kurkumin

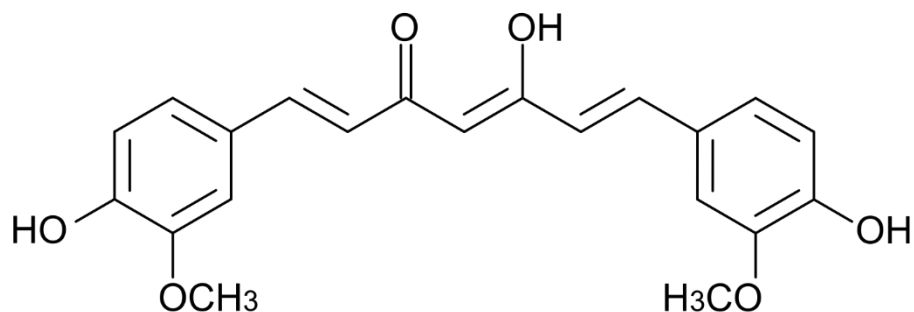
Kurkumin [1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiene-3,5-dione] yang disebut juga diferuloylmethane, adalah polifenol alami utama yang ditemukan dalam rimpang *Curcuma longa* (kunyit) dan *Curcuma spp* lainnya. *Curcuma longa* telah digunakan secara tradisional di Asia negara sebagai ramuan medis untuk beberapa penyakit, sebagai antioksidan, anti-inflamasi, antimutagenik, antimikroba, dan antikanker.⁴⁵ Selain itu kurkumin juga dapat berperan sebagai nefroprotektor dan hepatoprotektor.⁴⁶ Namun, selain kurkumin terdapat komponen lain dalam *Curcuma longa* yang disebut kelompok kurkuminoid diantaranya, yaitu demethoxycurcumin dan bis-demethoxycurcumin. Kurkumin adalah senyawa yang paling melimpah dari kelompok kurkuminoid (77% dari total berat) dan kandungan kelompok ini sekitar 5% dari komponen total *Curcuma longa*.⁴⁷ Berdasarkan

struktur molekulnya, beberapa peneliti telah menyimpulkan bahwa gugus metoksi pada cincin fenil dari kurkumin penting untuk efek kesehatan.



Gambar 2.4 Tanaman *Kurkuma longa* (kunyit).⁴⁷

Kurkumin komersial mengandung tiga kurkuminoid utama, yaitu kurkumin (~77%), demethoxy kurkumin (~ 17%) dan bis-demethoxykurkumin (~ 3%). Kurkumin berwarna kuning bercahaya pada pH 2.5 hingga 7 dan berubah menjadi warna merah pada pH ≥ 7 . Kurkumin memiliki titik leleh 183 °C, rumus molekul $C_{21}H_{20}O_6$, dan berat molekul 368.37 g/mol. Kurkumin tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti dimetil sulfoksida, etanol, metanol dan aseton.⁴⁸ Sehubungan dengan sifat kelarutannya, kurkumin larut dalam alkali atau pelarut yang sangat asam.⁴⁹



Gambar 2.5 Struktur molekul kurkumin

Kurkuma mengandung 60-70% karbohidrat, 8.6% protein, 5-10% lemak, 2-7% serat, 3-5% kurkuminoid (50-70% kurkumin) dan hingga 5% resin minyak essensial. Kurkuminoid yang terkandung dalam kunyit sangat bervariasi antara 2 – 9% tergantung kondisi dan letak geografis. Komposisi kurkuminoid, yaitu sekitar 70% kurkumin, 17% demethoxykurkumin, 3% bis-demethoxykurkumin dan 10% cyclocurcumin.⁵⁰ Berdasarkan penelitian yang sudah banyak dilakukan, gugus fungsi yang berkaitan dengan struktur kimia dari kurkumin adalah bis- α,β unsaturated β -diketone, dua gugus metoksi, dua gugus hidroksi fenolik dan dua ikatan rangkap terkonjugasi yang mungkin berperan penting dalam aktivitas anti-inflamasi dan antiproliferatif dari kurkumin.⁵¹

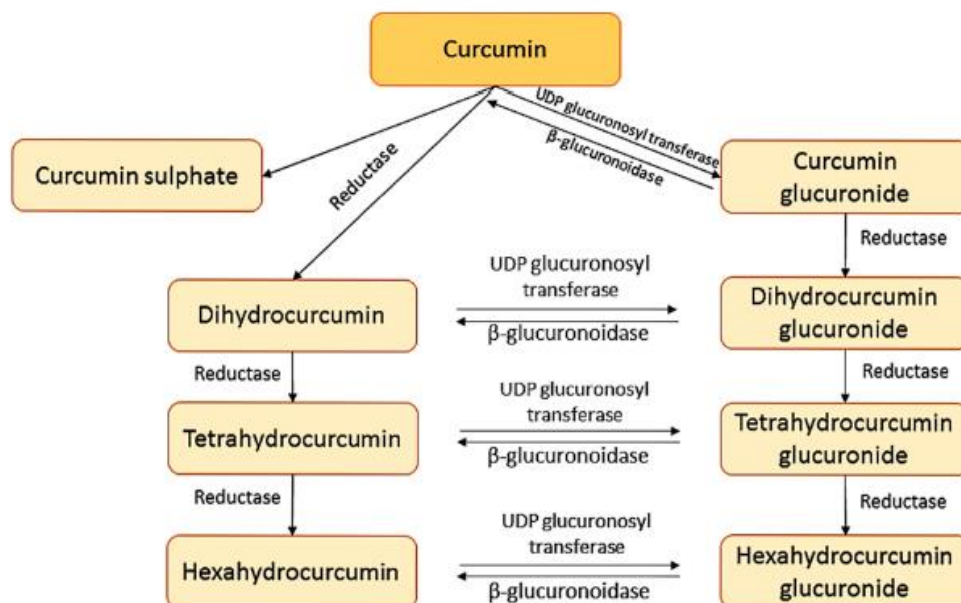
2.8.1 Bioavailabilitas dan metabolisme dari kurkumin.

Dalam sepuluh tahun terakhir, banyak studi *in vivo* dan *in vitro* telah dilakukan dengan tujuan menetapkan mekanisme kerja kurkumin dan aktivitasnya terhadap beberapa keadaan patologi. Untuk alasan ini, ada banyak penelitian yang bertujuan untuk mempelajari bioavailabilitas kurkumin. Studi pertama yang dilakukan untuk menentukan bioavailabilitas kurkumin dilakukan oleh Wahlstrom dan Blennow pada tahun 1978, dimana kurkumin diberikan pada tikus Sprague-Dawley dengan dosis 1 g/kg. Suatu studi menunjukkan bahwa kurkumin diberikan pada tikus secara oral dengan dosis 2000 mg/kg untuk menghasilkan konsentrasi serum maksimum sebesar $1.35 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ meskipun pada manusia tidak terdeteksi.⁵² Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa pemberian kurkumin secara oral pada tikus dengan dosis 2 g/kg menghasilkan kadar serum maksimum sebesar $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$, yang diamati pada waktu 0.83 jam, sedangkan pada manusia dengan dosis kurkumin yang sama menghasilkan kadar serum yang jauh lebih rendah ($0.006 \pm 0.005 \mu\text{g/mL}$ saat 1 jam setelah pemberian kurkumin) bahkan hingga tidak terdeteksi.⁵³

Pan dkk,⁵⁴ melakukan studi farmakokinetik kurkumin pada mencit dengan pemberian baik secara oral maupun intraperitoneal (i.p). Pemberian kurkumin dengan dosis 1g/kg secara oral menghasilkan kadar plasma yang rendah sebesar $0.13 \mu\text{g/mL}$ setelah 15 menit. Sedangkan kadar maksimumnya dalam plasma sebesar $0.22 \mu\text{g/mL}$, yang diamati setelah 1 jam. Kadar plasma nya menurun

dibawah limit deteksi setelah 6 jam. Selanjutnya kadar kurkumin dalam plasma secara berbeda ditemukan setelah pemberian kurkumin 0.1 g/kg secara intraperitoneal (i.p), menghasilkan kadar kurkumin dalam plasma sebesar 2.25 $\mu\text{g/ml}$ yang diamati setelah 15 menit dan kadarnya menurun secara cepat dalam waktu 1 jam. Selain itu, penelitian dari Yang dkk,⁵⁵ juga menunjukkan bahwa pemberian kurkumin secara oral pada tikus dengan dosis 1 g/kg menghasilkan kadar kurkumin dalam serum maksimum sebesar 0.5 $\mu\text{g/mL}$ setelah 45 menit dari pemberian dosis kurkumin.

Beberapa penelitian dengan tikus menunjukkan bahwa bioavailabilitas oral kurkumin adalah sekitar 1%, sehingga diperlukan dosis yang sangat tinggi dari kurkumin (3600 - 12.000 mg) untuk mencapai efek yang bermanfaat.⁵⁶ Sharma dkk,⁵⁷ menjelaskan bahwa tidak ada efek toksik dari kurkuma yang diberikan secara oral pada pasien kanker kolorektal. Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa metabolit kurkumin terdeteksi dalam plasma ketika pasien mengonsumsi 3600 mg kurkumin terutama, yaitu sebagai kurkumin glukuronida dan kurkumin sulfat. Pada sampel urin, kurkumin dan metabolitnya terdeteksi terutama sebagai kurkumin, diikuti oleh glukuronida dan akhirnya sebagai bentuk sulfat.



Gambar 2.6 Jalur metabolisme kurkumin

Suatu penelitian yang dilakukan pada hati untuk menentukan sifat metabolit kurkumin menunjukkan bahwa pertama-tama kurkumin diubah menjadi dihidrokurkumin dan tetrahidrokurkumin oleh reduktase, selanjutnya berubah menjadi konjugat monoglukuronida sebagai dihidrokurkumin-glukuronida dan tetrahidrokurkumin-glukuronida oleh β -glukuronidase (Gambar 6).⁵⁶ Adanya transformasi kurkumin dalam usus dan hati dapat memicu terbentuknya glukuronida kurkumin dan sulfat kurkumin atau molekul tereduksi seperti heksahidrokurkumin.⁵⁶

Penelitian Ryu dkk⁵⁸ menunjukkan bahwa pemberian kurkumin secara intravena pada mencit menghasilkan akumulasi kurkumin pada hati, otak, paru-paru, dan limpa. Metabolisme kurkumin pada manusia dan tikus dapat diperoleh melalui jalur konjugasi ataupun reduksi. Pemberian secara oral menghasilkan metabolisme melalui jalur konjugasi dengan hasil akhir berupa kurkumin glukuronida dan sulfat. Sedangkan kurkumin yang diberikan secara intraperitoneal atau sistemik menghasilkan metabolisme melalui jalur reduksi untuk menghasilkan tetrahidrokurkumin dan oktahidrokurkumin.⁵⁹

Distribusi kurkumin di dalam jaringan juga memainkan peran penting dalam aktivitas farmakologi dan pemberian kurkumin secara intraperitoneal (i.p) dapat meningkatkan distribusinya dalam jaringan. Kadar maksimum pada mencit dicatat sebesar 73 ± 20 , 200 ± 23 , $9,1 \pm 1,1$, 16 ± 3 , $8,4 \pm 6,0$, 78 ± 03 dan $2,9 \pm 0,4$ nmol/g secara berturut-turut pada hati, usus mukosa, jantung, paru-paru, otot, ginjal dan otak masing-masing setelah injeksi intraperitoneal (i.p.) kurkumin dengan dosis 100 mg/kg.⁶⁰ Ekskresi metabolit kurkumin bergantung pada rute pemberiannya, untuk pemberian oral sekeitar 75% metabolit kurkumin ditemukan hanya di feses tetapi tidak di urin. Sedangkan pada pemberian kurkumin secara intraperitoneal, sekitar 73% % metabolit kurkumin ditemukan di feses dan sekitar 11% di urin.⁶¹

Kapasitas antioksidan dari kurkumin ditentukan oleh kemampuannya untuk menginduksi ekspresi protein sitoprotektif seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), glutathion, reduktase (GR), katalase, (CAT), dan glutathion-S-transferase (GST). Oleh karena itu, telah dilaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan sintesis dan konsentrasi glutathion tereduksi (GSH) pada astrosit dan neuron oleh induksi γ GCL.⁵⁶

2.8.2. Nanokurkumin

Nanokurkumin memiliki peran ganda sebagai partikel terfluidasi dan inti nukleasi yang heterogen. Nanokurkumin menjadi *scavenger* radikal bebas yang efektif dengan aktivitas antioksidan dan berpotensi untuk menghambat stres oksidatif. Pada kurkumin untuk menjadi efektif dalam efek biologis pada pengobatan, kelarutannya sangat penting supaya dapat diserap oleh usus dan memasuki aliran darah. Tetapi karena kelarutannya yang sangat rendah sehingga eliminasi dari tubuh sangat cepat dan oleh karena itu perlu dosis yang sangat besar dan akan meninggalkan sisa rasa yang tidak enak. Nanopartikel berpotensi tidak dikenali oleh sistem retikuloendotelial dalam tubuh dan dapat mengalir ke dalam darah untuk waktu yang lama karena ukurannya yang kecil, sehingga melalui mekanisme penyerapan partikel obat terjadi peningkatan bioavailabilitas.⁶²

Salah satu tehnik yang telah banyak digunakan adalah dengan teknologi nanopartikel yang mampu memodifikasi material dengan dimensi keseluruhan dalam skala nano. Metode nanopartikel ini secara umum dibagi menjadi dua kategori antara lain, *top down* dan *bottom-up*. Penggunaannya tergantung dengan karakteristik bahan yang akan diproses. Metode *top down* adalah dengan menggunakan partikel padat yang berukuran besar dan kemudian dibentuk menjadi partikel yang kecil, contoh dari tehnik ini adalah *wet milling* (penggilingan basah) dengan menggunakan tekanan tinggi. Sedangkan *bottom up* adalah partikel dari bentuk molekul kemudian dibentuk menjadi nanopartikel dengan mengontrol karakteristik partikel, contohnya adalah penguapan larutan.⁶³

Nanokurkumin memiliki banyak fungsi biologis seperti aktivitas antikanker, aktivitas anti-inflamasi, aktivitas antioksidan, aktivitas antiamyloid, aktivitas antimikroba, dan aktivitas antifibrosis. Beberapa sifat fisikokimia dari nanokurkumin yang menyebabkan peningkatan bioavailabilitas kurkumin, yaitu ukuran partikel, muatan permukaan, luas permukaan, dan hidrofobisitas.⁶⁴

2.8.3 Studi in vitro kurkumin nanoformulasi

Sitotoksitas nanoformulasi kurkumin telah dipelajari dalam berbagai jenis sel kanker. Relevansi interpretasi dari hasil studi in vitro seringkali sulit karena sel mendapatkan pajanan yang cukup lama dari kurkumin dengan konsentrasi yang

tinggi (baik dalam bentuk bebas ataupun dalam bentuk nanoformulasi) akan tetapi tidak selalu terkait dengan konsentrasi yang dicapai secara *in vivo*. Penelitian Yallapu dkk menunjukkan bahwa retensi obat intraseluler formulasi Nano-CUR6 lebih baik dari kurkumin (terlarut dalam DMSO), karena adanya pelepasan obat secara berkelanjutan. Formulasi ini juga meningkatkan serapan seluler hingga 2 sampai 6 kali lipat dalam sel kanker payudara metastatik (MDA-MB-231) dan sel kanker ovarium akibat cisplatin (A2780CP), masing-masing dibandingkan dengan kurkumin bebas. Hasil IC_{50} (50% *Inhibitory Concentration*) dari Nano-CUR6 sebesar 13.9 dan 9.1 mM masing-masing terhadap sel A2780CP dan sel MDA-MB-231. Sedangkan hasil IC_{50} dari kurkumin bebas lebih tinggi daripada Nano-CUR6 (15.2 mM dan 16.4 mM masing-masing terhadap sel A2780CP dan MDA-MB-231).⁶⁵

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini berupa studi pra-klinis eksperimental pada tikus dengan rancangan acak, berpembandingan, dan paralel.

3.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI selama bulan Juli 2016 – Mei 2017. Total penelitian sebanyak sepuluh bulan.

3.3 Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UI.

3.4 Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur *Sparague Dawley* dengan berat badan 150 – 300 gram yang berasal dari Lembaga Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LITBANGKES). Hewan uji ditempatkan pada ruangan dengan suhu dan kelembaban udara konstan, penerangan yang cukup, makanan pellet dan air minum *ad libitum*.

3.5 Obat Uji

Kurkumin dalam bentuk serbuk diperoleh dari PT. Plamed green Science Limited (China). Nanokurkumin dalam bentuk serbuk diperoleh dari PT Xi'an Pincredit Bio-Tech Co.,Ltd (China). Kurkumin dengan dosis 100 mg/kg BB/hari dan nanokurkumin dengan dosis 50 mg/kg BB/hari dan 100 mg/kg BB/hari.^{66, 67} Kurkumin yang digunakan memiliki ukuran partikel sekitar 339.8 nm dan nanokurkumin yang digunakan memiliki ukuran partikel sekitar 240.7 nm. Data kemurnian kurkumin dan nanokurkumin yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.6 Bahan Penelitian

3.6.1 Persiapan induksi hewan uji

Cisplatin (PT Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), NaCl 0.9 % (Otsuka), dan Aquabidest (PT Widatra Bakti).

3.6.2 Persiapan perlakuan hewan uji

Kurkumin (PT Plamed green Science Limited, China), Nanokurkumin (PT Xi'an Pincredit Bio-Tech Co.,Ltd, China) dan CMC-Na.

3.6.3 Persiapan sampel hewan uji

NaCl 0.9% (Otsuka), Eter, dan Formalin.

3.6.4 Penetapan kadar MDA

Standar MDA: 1,1,3,3-tetrametoksiopropan 99 (TMEP) (Sigma 108383), Asam tiobarbiturat, TBA (T5500-25G, Merck Millipore), dan Asam trikloroasetat, TCA (T6399-100G, Merck Millipore).

3.6.5 Penetapan kadar urea dan kreatinin dalam darah dan urin

Kit Kreatinin FS (DiaSys) dan Kit Urea FS (DiaSys).

3.6.6 Penetapan kadar protein dalam homogenate ginjal

Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit

3.6.7 Penetapan kadar GSH

Amplite Rapid Fluorometric Glutathione GSH/GSSG Ratio Assay Kit (AAT Bioquest).

3.6.8 Pemeriksaan ekspresi gen Bax dan Bcl-2

Jaringan ginjal dihomogenisasi untuk mendapatkan total RNA menggunakan kit isolasi RNA (Macherey Nagel), kemudian dilakukan sintesis *complementary* DNA menggunakan enzim reverse transcription. Ekspresi gen akan dianalisa dengan qRT-PCR.

3.7 Alat Penelitian

Freezer -80°C (Panasonic), -20°C (Panasonic), -4°C (LG), timbangan analitik (Precisa ES 220A), *Glass Pestle*, sentrifugator, pH meter (Inolab), spektrofotometer UV/Vis (Perkin Elmer), PCR-RT, Xmark *microplate spectrophotometer* (Biorad), *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, tabung eppendorf, *microplate 96-sumuran-flat-bottom* (TPP92096), pipet 5 ml, 100-1000 µL, 20-200

μL , 0.5-10 μL , 0.25-2.5 μL (Biorad, Gilson, Fannpipette), alat sonde, perlengkapan bedah (gunting, scalpel, pinset), dan alat-alat gelas (Pyrex).

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembagian Hewan Uji

Setelah mendapat persetujuan dari komisi etik FK UI, seluruh hewan uji diaklimatisasi di kandang hewan Departemen Farmakologi FK UI selama 2 minggu. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 30 ekor. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok ($n=6$), berikut ini pembagian kelompoknya:

1. Kelompok I (normal), $n=6$ ekor

Mendapatkan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB) p.o. melalui sonde selama 7 hari, dan injeksi i.p. dosis tunggal normal saline (NS) (0.9% NaCl) (1mg/mL) pada hari ke 7, dilanjutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB) p.o. selama 2 hari setelah injeksi NS.

2. Kelompok II (kontrol negatif), $n=6$ ekor

Mendapatkan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB) p.o. melalui sonde selama 7 hari, dan injeksi i.p. dosis tunggal cisplatin (CP) (7 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.9% NaCl; 1 mg/mL) pada hari ke 7, dilanjutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB) p.o. selama 2 hari setelah injeksi CP.

3. Kelompok III (cisplatin + kurkumin 100 mg/kgBB):

Mendapatkan kurkumin (100 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. melalui sonde selama 7 hari, dan injeksi i.p. dosis tunggal cisplatin (CP) (7 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.9% NaCl; 1 mg/mL) pada hari ke 7, dilanjutkan dengan kurkumin (100 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. selama 2 hari setelah injeksi CP.

4. Kelompok IV (cisplatin + nanokurkumin 100 mg / kg BB)

Mendapatkan nanokurkumin (100 mg/kgBB dilarutkan dengan 5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. melalui sonde selama 7 hari, dan injeksi i.p. dosis tunggal cisplatin (CP) (7 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.9% NaCl; 1 mg/mL) pada hari ke 7, dilanjutkan dengan nanokurkumin (100 mg/kgBB

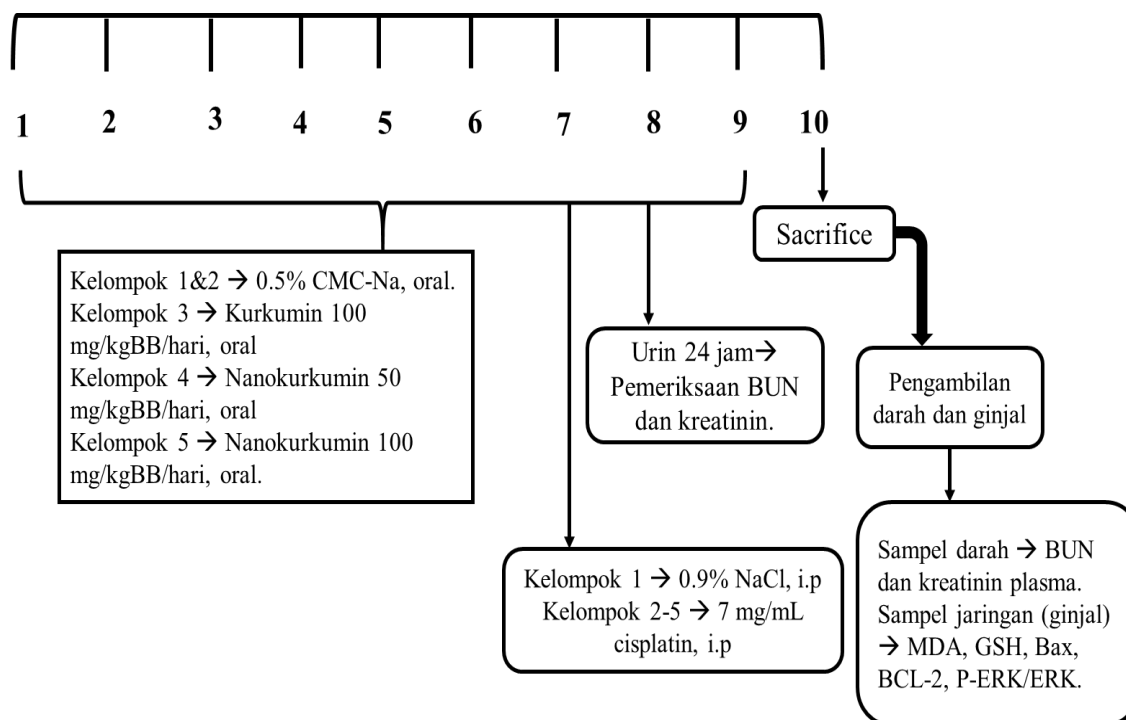
dilarutkan dengan 5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. selama 2 hari setelah injeksi CP.

5. Kelompok V (cisplatin + nanokurkumin 50 mg / kg BB):

Mendapatkan nanokurkumin (50 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. melalui sonde selama 7 hari, dan injeksi i.p. dosis tunggal cisplatin (CP) (7 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.9% NaCl; 1 mg/mL) pada hari ke 7, dilanjutkan dengan nanokurkumin (50 mg/kgBB dilarutkan dengan 0.5% CMC-Na (5 mL/kgBB)) p.o. selama 2 hari setelah injeksi CP.

3.8.2 Alur Penelitian

Perlakuan Hewan Coba



Data berat badan diperoleh setiap hari ditimbang sebelum perlakuan. Satu hari sebelum tikus dimatikan (hari ke-8 perlakuan), tikus dimasukkan ke dalam kandang metabolik selama 24 jam untuk pengumpulan urinnya. Diakhir perlakuan seluruh tikus dimatikan dengan cara dibius dengan eter, kemudian darah diambil melalui *heart puncture*, dikumpulkan dalam tabung EDTA kira-kira sebanyak 5 mL, lalu dipisahkan plasmanya untuk pemeriksaan biokimia pada darah. Kemudian jaringan ginjal tikus segera dikeluarkan dan diambil untuk pemeriksaan biokimia dan biologi molekuler. Selama 10 hari eksperimen, tikus diperlakukan sesuai standar yang berlaku dan setiap hari dimonitor dan dicatat tanda-tanda toksisitas umum seperti penurunan berat badan dan kematian.

3.9 Cara Kerja

3.9.1 Persiapan urin dan plasma untuk pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin

Sampel urin yang telah ditampung selama 24 jam disentrifugasi 3,000 x g (10 menit, 4°C), supernatannya diambil dan disimpan pada suhu -80 °C. Sampel darah yang telah dikumpulkan dalam tabung EDTA juga disentrifugasi pada 3,000

x g (10 menit, 4°C) untuk mendapatkan plasma, kemudian disimpan pada suhu -80°C.

3.9.2. Pembuatan homogenat untuk penetapan kadar MDA, GSH dan Protein

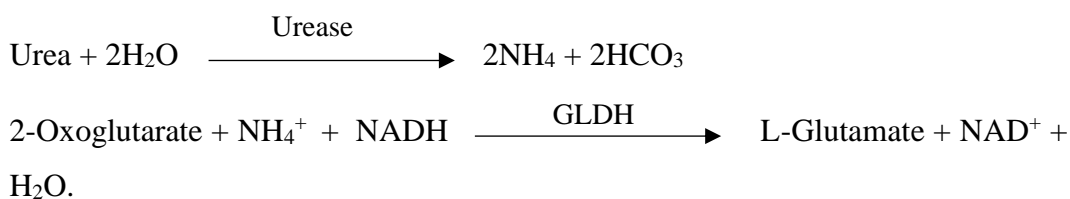
Homogenat ginjal dibuat dengan cara homogenasi 100 mg jaringan ginjal dalam 1 ml Normal Saline 0.9% kemudian disentrifugasi 3000 rpm (10 menit, 4°C). Supernatannya diambil dan disimpan di -80°C sampai saat pengukuran.

3.9.3 Isolasi RNA dan sintesis cDNA untuk pemeriksaan qRT-PCR

Jaringan ginjal dihomogenisasi dengan buffer yang terdapat pada Kit Macherey-Nagel untuk mendapatkan total RNA, kemudian dilakukan sintesis complementary DNA menggunakan Kit Agilent. Ekspresi gen kemudian dianalisa menggunakan qRT-PCR. Kemurnian RNA yang diukur pada absorbansi 260/280 harus bernilai antara 1.7 – 2. Selanjutnya cDNA yang digunakan untuk analisis diukur kemurniannya menggunakan nanodrop.

3.9.4 Pemeriksaan Kadar Urea dalam urin dan plasma

Kadar urea dalam urin dan plasma diperiksa dengan menggunakan metode Urease – GLDH (Glutamate Dehydrogenase): enzymatic UV test, menggunakan kit Urea FS DiaSys. Prinsip reaksinya yaitu sebagai berikut:



3.9.4.1 Prosedur

Sampel berupa urin perlu dilakukan pengenceran dengan cara menambahkan 1 µL sampel urin dengan 100 µL akuades, lalu dicampur hingga homogen dan diambil 10 µL untuk pemeriksaan kadar urea. Monoreagent dibuat dengan mencampurkan R1 dan R2 dengan perbandingan 4:1, lalu ke dalam tabung sentrifus yang berisi 10 µL sampel urin/darah/standard ditambahkan 1000 µL monoreagent, diinkubasi selama 30 – 40 detik. Absorbansi diukur pada panjang

gelombang 365 nm. Absorbansi A1 dibaca setelah inkubasi 40 detik, lalu absorbansi A2 dibaca setelah 60 detik selanjutnya.

3.9.5 Pemeriksaan Kadar Kreatinin dalam urin dan plasma

3.9.5.1 Prinsip

Kadar kreatinin dalam urin dan plasma diperiksa dengan menggunakan metode Jaffe. Prinsipnya adalah kreatinin membentuk kompleks berwarna merah-oranye dalam larutan alkaline picrate.

3.9.5.2 Prosedur

Sampel berupa urin perlu dilakukan pengenceran dengan cara menambahkan 1 μL sampel urin dengan 49 μL akuades, dicampur hingga homogen. Monoreagent dibuat dengan menambahkan R1 dan R2 dengan perbandingan 4:1, lalu ke dalam tabung sentrifus yang telah berisi 50 μL standard/sampel darah/sampel urin yang sudah diencerkan ditambahkan 1000 μL monoreagent, kemudian diinkubasi selama 60 detik. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 492 nm. Absorbansi A1 dibaca setelah inkubasi 60 detik, lalu absorbansi A2 dibaca setelah 60 detik selanjutnya.

3.9.6 Penetapan Kadar Protein

Penetapan kadar protein menggunakan metode kolorimetri untuk pengukuran total protein dalam sampel. Standar yang digunakan, yaitu BSA (*Bovine Serum Albumine*), standar BSA dibuat dengan mengencerkan larutan stok BSA 2mg/mL menjadi 5 konsentrasi yang berbeda (25 $\mu\text{g/mL}$ - 1500 $\mu\text{g/mL}$) dan satu blanko. Sampel dan standar sebanyak 10 μL dimasukkan ke dalam microplate sumur 96 dan dilanjutkan dengan penambahan 300 μL Coomassie Plus Reagent. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kompleks warna yang terbentuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Kadar protein pada sampel dengan satuan mg/mL diperoleh dari hasil ekstrapolasi absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar BSA.

3.9.7. Pemeriksaan kadar MDA

3.9.7.1 Prinsip

Salah satu produk peroksidasi lipid adalah malondialdehida (MDA). MDA dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan metode TBA. MDA akan bereaksi dengan asam tiobarbiturat (TBA) pada suasana asam, membentuk senyawa berwarna yang mengabsorpsi cahaya pada λ 530 nm. Dalam penetapan kadar MDA ini, standar MDA yang digunakan adalah 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (TMEP).

3.9.7.2 Prosedur

Larutan stok standar MDA standar dibuat dalam aquabidestilatatilitata. Pengenceran larutan stok MDA standar dilakukan dengan membuat larutan stok MDA 6000 nmol, dilanjutkan dengan konsentrasi 6 nmol/ μ L, 0.06 nmol/ μ L, dan 0.015 nmol/ μ L. Selanjutnya larutan standar MDA disiapkan menjadi enam konsentrasi yang berbeda (blanko standar, 10 – 3200 nmol/mL). Larutan TCA 20% dan TBA 0.67% (b/v) dilarutkan dalam aquabidestilata. Selanjutnya ditambahkan aquabidestilata sebanyak 1800 μ L ke dalam tabung sentrifus berisi 200 μ L sampel atau larutan standar MDA. Lalu ditambahkan 1000 μ L larutan TCA 20% dan divorteks, serta ditambahkan 2000 μ L larutan TBA 0.67% kemudian dicampur sampai homogen dengan vorteks dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah larutan mencapai suhu ruang, tabung sampel ditutup dengan parafilm dan disentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit menggunakan sentrifus berpendingin.

Supernatan dipindahkan ke dalam kuvet 1 mL dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 530$ nm terhadap blanko. Blanko diperlakukan sama seperti sampel kecuali sampel diganti dengan aquabidestilata. Kadar MDA dalam sampel ditentukan dengan menggunakan kurva standar MDA. Hasil yang diperoleh dibagi dengan kadar protein homogenat sehingga diperoleh satuannya dalam nmol/mg protein.

3.9.8 Pemeriksaan Kadar GSH dalam homogenat

3.9.8.1 Prinsip

Glutation merupakan tripeptida yang terdiri dari sistein, asam glutamate, dan glisin, selain itu merupakan protein intraseluler terkecil di dalam sel. Glutation berperan mencegah kerusakan sel yang diakibatkan oleh ROS. Glutation tereduksi

(GSH) merupakan antioksidan utama dalam jaringan. Pengukuran kadar GSH dalam jaringan menggunakan metode Fluorometrik menggunakan kit Amplitude Rapid Fluorometric Glutathione GSH/GSSG Ratio Assay.

3.9.8.2 Prosedur

Pertama-tama dilakukan pembuatan larutan stok standard GSH, larutan stok standar GSSG, larutan stok 100X Thiolite Green 520WS, larutan GAM (GSH Assay Mixture), dan pembuatan serial larutan standar GSH. Sebanyak 10 μL larutan stok standard GSH ditambahkan dengan 990 μL assay buffer untuk menghasilkan 10 μM (10 pmol/ μL) larutan standard GSH. Selanjutnya dibuat serial larutan standard GSH dengan konsentrasi sebagai berikut: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563, 0.0781, dan 0 μM .

Pengukuran kadar GSH dalam sampel dilakukan dengan cara sebanyak 50 μL sampel/larutan standard GSH dimasukkan ke dalam 96-well plate, selanjutnya ditambahkan 50 μL larutan GAM pada masing-masing sumur yang telah berisi sampel atau standard GSH. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit hingga 1 jam, dan lindungi sampel dari cahaya. Pengukuran fluoresens dilakukan dengan fluorescence plate reader dengan Ex/Em= 490/520 nm.

3.9.9 Pemeriksaan ekspresi gen Bax dan BCl-2 dengan qRT-PCR

Uji *real time* qRT-PCR dilakukan untuk mengetahui ekspresi suatu gen dalam bentuk mRNA. Sampel cDNA yang telah diisolasi dipindahkan dari suhu -20°C ke dalam kotak es untuk di *thawing*. Konsentrasi sampel cDNA yang telah diperoleh dari proses sebelumnya diencerkan dengan *RNase-free water* hingga mencapai konsentrasi 100 ng untuk PCR. Hasil pengenceran diukur dengan spektrofotometer Nanodrop 2000 lalu dihitung volume yang dibutuhkan untuk memperoleh sejumlah tertentu *template* cDNA yang akan digunakan untuk reaksi. Sementara itu, primer dilarutkan dengan *PCR grade water* agar didapat konsentrasi yang optimal untuk reaksi. Selanjutnya dilakukan pembuatan *PCR mix* dengan mencampurkan 3 μL *PCR grade water* (vial 2), masing-masing 1 μL primer *forward* dan *reverse*, dan 10 μL *master mix* (vial 1) sehingga volume akhir untuk satu reaksi adalah 15 μL , pencampuran dilakukan di tabung eppendorf. Volume yang dipipet disesuaikan dengan jumlah reaksi yang ingin dilakukan. Selanjutnya,

disiapkan tabung PCR dan dilakukan pipetasi PCR mix sebanyak 15 µl pada masing-masing tabung PCR, lalu ditambahkan sampel sebanyak 5 µl ke dalam masing-masing tabung PCR sehingga volume akhir reaksi adalah 20 µL. Proses PCR dilakukan dengan alat *real-time PCR* LightCycler Nano. Amplifikasi diulang sebanyak 45 kali. Setelah amplifikasi, dilakukan proses *melting* untuk menganalisis *melting curve*. Kondisi amplifikasi yang digunakan untuk masing-masing gen dijelaskan di Tabel 1.

Tabel 1 Kondisi amplifikasi PCR masing-masing gen

Gen	Jumlah template	Konsentrasi Primer	Hold	Denaturasi	Annealing	Elongasi
Beta Aktin	100 ng	10 µM	95 °C, 600 detik	95 °C, 20 detik	60 °C, 20 detik	72 °C, 1 detik
Bax	100 ng	10 µM	95 °C, 600 detik	95 °C, 20 detik	57 °C, 20 detik	72 °C, 9 detik
Bcl-2	100 ng	10 µM	95 °C, 600 detik	95 °C, 20 detik	57 °C, 20 detik	72 °C, 9 detik

Perhitungan tingkat ekspresi mRNA dilakukan dengan metode Livak-Schmittgen (*relative quantification*) dengan rumus sebagai berikut:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{kelompok perlakuan}} - \Delta Ct_{\text{kelompok normal}}$$

$$\text{Tingkat ekspresi mRNA} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.9.10 Pemeriksaan ekspresi rasio protein P-ERK/ERK dengan Western Blot

Pertama-tama dilakukan pembuatan running gel dan stacking gel yang akan digunakan untuk elektroforesis. Komposisi pembuatan gel (running dan stacking) bergantung pada berat molekul dari protein yang akan diperiksa. Untuk protein ERK dilakukan pembuatan gel 10% - 12.5% (untuk berat molekul 15 – 70 Kd). Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan 1x Tank Buffer, dengan cara mencampurkan 100 mL 10xTank Buffer dengan 900 mL miliQ. Lalu dilakukan persiapan elektroforesis dan loading sampel dalam sumur gel yang telah dibuat, elektroforesis dilakukan selama 1 jam, 150 – 200 V. Selanjutnya dilakukan perendaman *thick membrane*, *thin membrane*, *nitrocellulose membrane* dalam

larutan Towbin Buffer. Setelah elektroforesis selesai, dilakukan perendaman gel hasil elektroforesis dalam Towbin Buffer selama ± 15 menit.

Persiapan transfer protein dari gel elektroforesis ke membran nitroselulosa dilakukan dengan menyusun membran terlebih dahulu dengan urutan sebagai berikut: 1) *Thick membrane*, 2) *Thin membrane*, 3) *Nitrocellulose membrane*, 4) Gel, 5) *Thick membrane*. Proses transfer berlangsung selama 1 jam, 10 V. Setelah proses transfer selesai, dilakukan pewarnaan dengan Ponceau, dilanjutkan dengan blocking membran menggunakan 5% susu non-fat yang telah dilarutkan dalam TBST. Blocking membran dilakukan selama 1 – 3 jam. Dilakukan proses pencucian membran setelah blocking menggunakan larutan TBST, pencucian dilakukan selama 2 menit x 2 dan 5 menit x 1. Selanjutnya dilakukan inkubasi antibodi primer (Cell Signaling) dengan perbandingan antibodi 1:1000 selama semalaman pada suhu 4°C. Pada keesokan harinya, dilakukan kembali pencucian membran menggunakan larutan TBST selama 5 menit x 3. Inkubasi antibodi sekunder (Cell Signaling) dilakukan selama 1 jam pada suhu ruang, dengan perbandingan antibodi 1:5000. Setelah inkubasi antibodi sekunder, dilakukan pencucian membran kembali menggunakan larutan TBST selama 5 menit x 2. Lalu dilakukan pembuatan ECL untuk *imaging* hasil *Western blot*.

3.10 Analisis Statistik

Data disajikan dalam nilai rata-rata \pm SD. Masing-masing data diuji homogenitas variannya dengan uji *Levene* dan diuji normalitas distribusinya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Data yang terdistribusi normal dan homogen akan dianalisis dengan uji parametrik Anova satu arah (perbedaan dianggap bermakna secara statistik bila $p < 0.05$), dilanjutkan dengan uji perbandingan *Tukey*. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen akan dilakukan transformasi data dengan Logaritma. Akan tetapi jika sudah dilakukan transformasi, data tetap tidak normal dan homogen maka analisis statistik dilakukan dengan uji non-parametrik Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan uji perbandingan *Mann Whitney*.

BAB 4

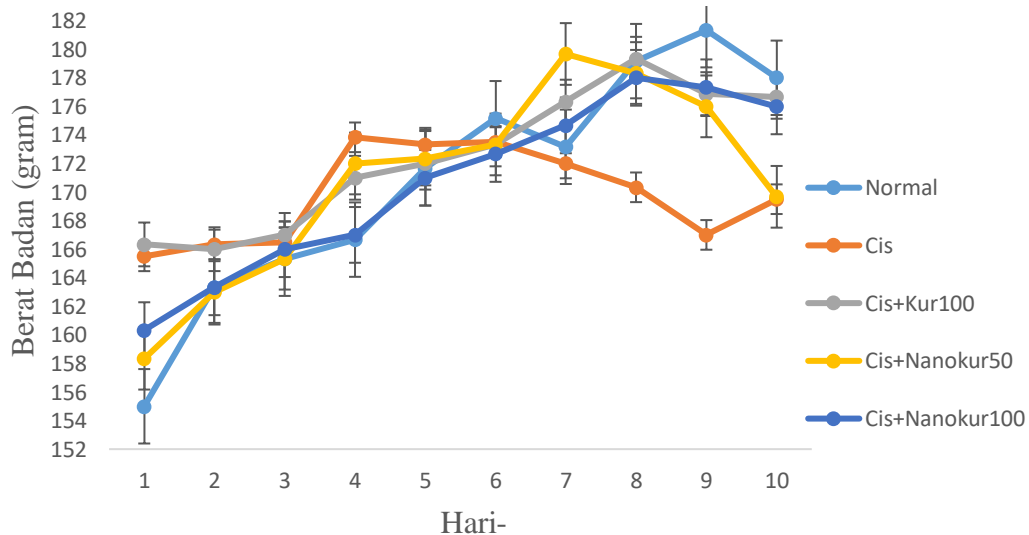
HASIL PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian kurkumin dan nanokurkumin oral untuk pencegahan terjadinya nefrotoksitas akibat pemberian Cisplatin. Perlakuan hewan coba dilakukan selama 10 hari yang bertempat di laboratorium hewan coba Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.1. Berat Badan Hewan Uji

4.1.1 Perubahan Berat Badan Hewan Uji

Pengukuran berat badan tikus dilakukan selama 10 hari perlakuan, berat badan tikus dari setiap kelompok dirata-ratakan setiap harinya. Hasil rata-rata berat badan tikus pada kelompok CIS menunjukkan penurunan berat badan setelah injeksi Cisplatin (hari ke-7) dibandingkan dengan kelompok normal. Selain itu, Gambar 4.1 menunjukkan bahwa adanya perlakuan dengan pemberian kurkumin maupun nanokurkumin mencegah terjadinya penurunan berat badan tikus secara signifikan setelah injeksi Cisplatin dibandingkan dengan kelompok CIS.

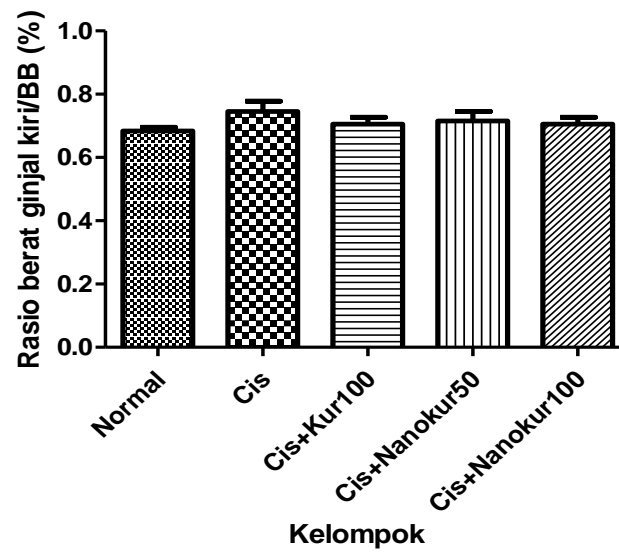


Gambar 4.1 Berat badan tikus kelompok normal, CIS, CIS+KUR100, CIS+NANOKUR100, dan CIS+NANOKUR50 selama 10 hari perlakuan.

Data berat badan tikus selama 10 hari perlakuan memiliki nilai yang normal dan homogen berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas, sehingga dapat dilakukan uji parametrik ANOVA satu arah, dilanjutkan dengan uji *post-hoc Tukey*. Data perubahan berat badan tikus selama 10 hari perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan $p=0.902$ ($p>0.05$). Kelompok normal, kelompok CIS+KUR100, CIS+NANOKUR50, dan CIS+NANOKUR100 cenderung mengalami peningkatan berat badan setelah injeksi cisplatin. Sedangkan kelompok CIS tanpa perlakuan, memiliki berat badan yang cenderung menurun setelah injeksi cisplatin.

4.1.2. Rasio Berat Ginjal dengan Berat Badan Tikus

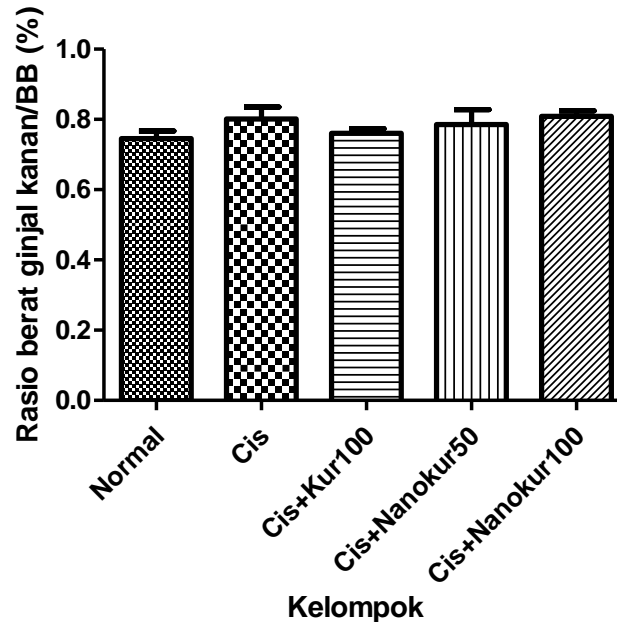
Data rasio berat ginjal kiri per berat badan menunjukkan bahwa data tersebut terdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik ANOVA satu arah, dilanjutkan dengan uji *post-hoc test Tukey*. Rasio berat ginjal kiri per berat badan pada semua tikus kelompok penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan nilai $p=0.425$ (>0.05). Pada kelompok CIS terdapat peningkatan rasio berat ginjal kiri per berat badan dibandingkan dengan kelompok normal (Gambar 4.2), meskipun perbedaannya tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p=0.687$ (>0.05). Adanya perlakuan dengan pemberian kurkumin dan nanokurkumin cenderung mencegah peningkatan rasio berat ginjal kiri per berat badan.



Rerata	1.215	1.275	1.245	1.252	1.28
SD	0.079	0.043	0.079	0.074	0.11

Gambar 4.2. Rasio berat ginjal kiri per berat badan tikus setelah 10 hari perlakuan.

Pada uji ANOVA rasio berat ginjal kiri per berat badan kelompok Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai $p > 0.05$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD.



Rata-Rata	1.32	1.37	1.342	1.37	1.372
SD	0.041	0.04	0.052	0.076	0.087

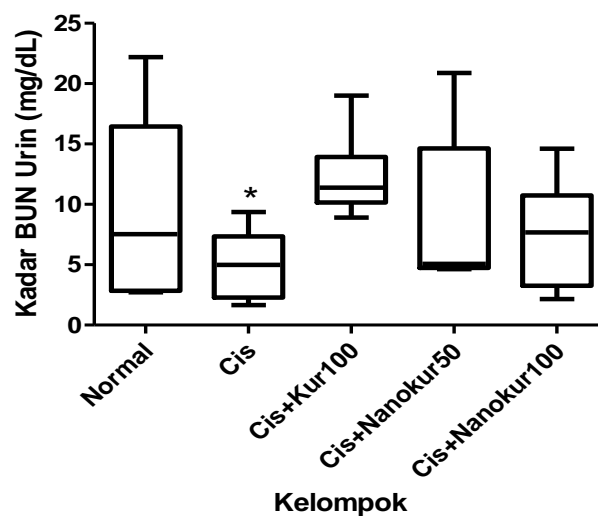
Gambar 4.3. Rasio berat ginjal kanan per berat badan tikus setelah 10 hari perlakuan.

Pada uji Mann-Whitney rasio berat ginjal kanan per berat badan: kelompok Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai $p > 0.05$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD.

Berdasarkan uji normalitas dan homogenitas, rasio berat ginjal kanan per berat badan menunjukkan bahwa data tersebut tidak terdistribusi normal dan homogen sehingga harus dilakukan uji statistik non-parametrik, yaitu Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji *post hoc* Mann Whitney. Rasio berat ginjal kanan per berat badan tikus pada semua kelompok penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji Kruskal-Wallis dengan nilai $p=0.534$ ($p>0.05$). Pada kelompok CIS, rasio berat ginjal kanan per berat badan tikus meningkat dibandingkan kelompok normal (Gambar 4.3), meskipun tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p=0.631$ (>0.05). Sedangkan adanya perlakuan dengan kurkumin cenderung mencegah peningkatan rasio berat ginjal per berat badan dibandingkan kelompok CIS. Kelompok NANOKUR50 dan NANOKUR100 cenderung memiliki rasio berat ginjal per berat badan yang sama dengan kelompok CIS.

4.2 Kadar BUN dalam urin dan plasma

Kadar BUN dalam urin menunjukkan perbedaan tidak bermakna pada semua kelompok tikus penelitian pada uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis, dengan nilai $p=0.172$ (>0.05). Gambar 4.4 menunjukkan kadar BUN urin yang paling rendah terdapat pada kelompok CIS, akan tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik jika dibandingkan dengan kelompok normal, dengan nilai $p=0.337$ ($p>0.05$). Sedangkan kadar BUN urin yang paling tinggi terdapat pada kelompok KURKU100 dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok CIS, dengan nilai $p=0.006$ (<0.01). Perbedaan kadar BUN urin antara kelompok CIS dengan kelompok NANOKUR (50 dan 100 mg/kg BB) juga tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji Mann-Whitney, CIS vs CIS+NANOKUR100 dan CIS vs CIS+NANOKUR50 dengan nilai p berturut-turut sebagai berikut: 0.262 dan 0.337 (>0.05). Meskipun tidak ada perbedaan yang signifikan, tetapi kurkumin dan nanokurkumin berpotensi dalam meningkatkan kadar BUN dalam urin pada kondisi penggunaan cisplatin yang dapat menyebabkan terjadinya nefrotoksitas.

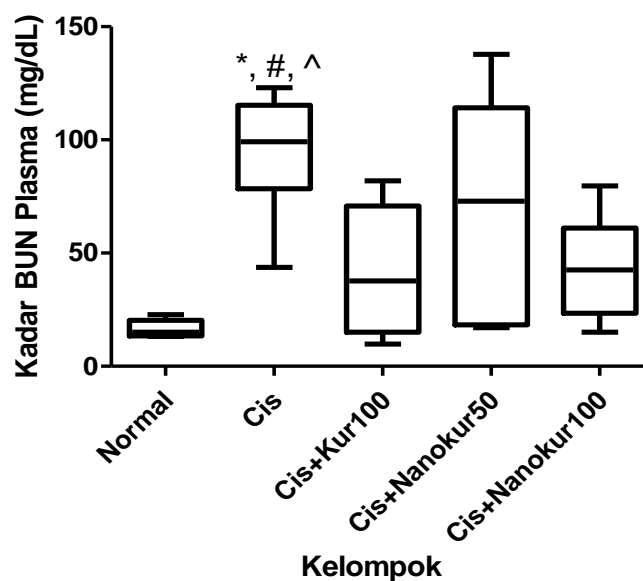


Rerata	9.567	5.026	12.251	8.833	7.534
SD	8.432	2.830	3.833	7.155	4.479

Gambar 4.4 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar BUN dalam urin.

Pada uji Mann-Whitney kadar BUN urin: kelompok Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p berturut-turut, $p=0.337$, $p=0.006$, $p=0.337$, $p=0.262$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD. *($p<0.01$ vs Cis+Kur100).

Kadar BUN dalam plasma menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik pada semua kelompok penelitian dengan uji non-parametrik Kruskal Wallis, $p=0.006$ (<0.05). Gambar 4.5 menunjukkan kadar BUN plasma yang paling tinggi terdapat pada kelompok CIS, hal tersebut menunjukkan bahwa telah ada kerusakan ginjal pada kelompok tanpa perlakuan kurkumin dan nanokurkumin. Selain itu kadar BUN plasma pada kelompok CIS memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok normal dengan nilai $p=0.004$ (<0.01). Kelompok KURKU100 memiliki kadar BUN plasma yang paling rendah diantara kelompok perlakuan lainnya dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok CIS dengan nilai $p=0.016$ (<0.05). Selain itu, kadar BUN kelompok NANOKUR100 juga memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok CIS dengan nilai $p=0.016$ (<0.05). Akan tetapi, kadar BUN plasma kelompok NANOKUR50 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok CIS dengan nilai $p=0.423$ (>0.05).



Rerata	16.510	94.639	41.808	70.968	43.520
SD	3.834	28.122	30.079	49.835	22.901

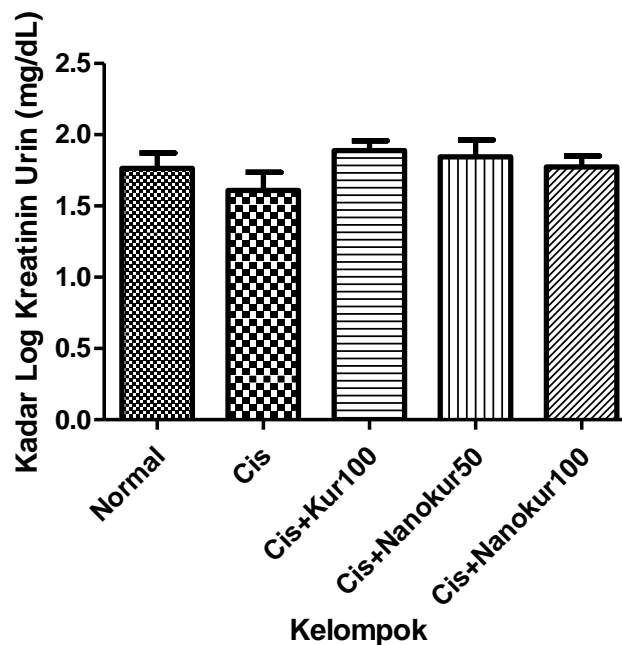
Gambar 4.5. Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar BUN dalam plasma

Pada uji Mann-Whitney kadar BUN plasma: kelompok Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p berturut-turut, $p=0.004$, $p=0.016$, $p=0.423$, $p=0.016$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD. *($p<0.01$ vs normal), #($p<0.05$ vs Cis+Kur100), ^($p<0.05$ vs Cis+Nanokur100).

4.3 Kadar Kreatinin dalam Urin dan Plasma

Kadar kreatinin dalam urin pada semua kelompok tikus penelitian menunjukkan distribusi yang normal, tetapi tidak homogen. Oleh karena itu dilakukan transformasi logaritma data kadar kreatinin dalam urin sehingga menghasilkan distribusi data yang homogen. Hasil uji statistik parametrik dengan ANOVA satu arah menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna pada semua kelompok penelitian dengan nilai $p=0.389$ (>0.05). Selain itu dilakukan uji Tukey sebagai uji *post-hoc* untuk melihat perbedaan antara kelompok yang satu dengan yang lainnya. Kadar kreatinin urin paling rendah terdapat pada kelompok CIS, yang kemungkinan telah mengalami kerusakan ginjal sehingga kreatinin yang dikeluarkan melalui urin menjadi lebih sedikit. Selain itu kadar kreatinin urin kelompok CIS juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok normal, dengan nilai $p=0.82$ (>0.05). Gambar 4.6 menunjukkan kadar kreatinin urin paling tinggi terdapat pada kelompok NANOKUR50, tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik

dibandingkan kelompok CIS dengan nilai $p=0.497$ (>0.05). Selain itu, kadar kreatinin urin antara kelompok NANOKUR100 dan KURKU100 terhadap kelompok CIS juga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji Tukey, dengan nilai p berturut-turut $p=0.781$ dan $p=0.331$.



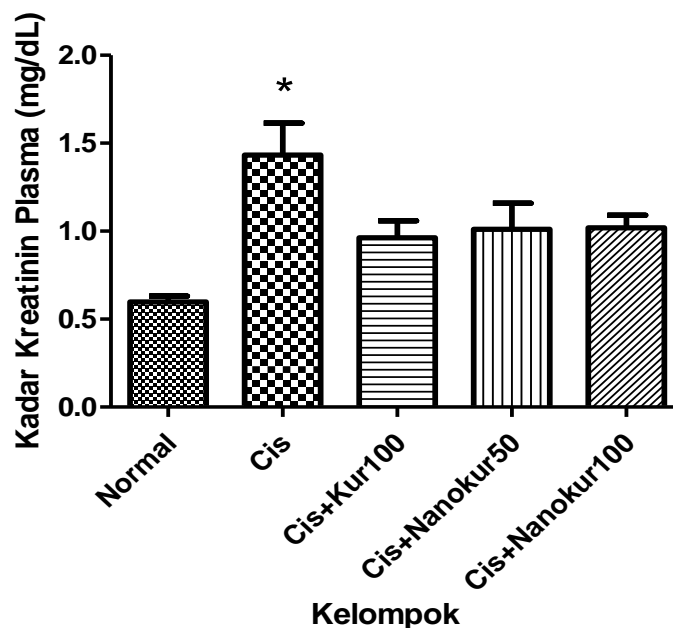
Log Rerata	1.764	1.610	1.888	1.844	1.775
SD	0.263	0.308	0.169	0.292	0.185

Gambar 4.6 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar kreatinin dalam urin.

Pada uji ANOVA satu arah kadar kreatinin urin pada kelompok: Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai $p>0.05$. Data disajikan sebagai nilai log rerata \pm SD.

Kadar kreatinin dalam plasma pada semua kelompok tikus penelitian menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan $p=0.01$ (<0.05). Selain itu dilakukan uji Tukey sebagai uji *post-hoc* untuk melihat perbedaan antara kelompok yang satu dengan yang lainnya. Gambar 4.7 menunjukkan bahwa kadar kreatinin plasma paling tinggi terdapat pada kelompok CIS dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok normal dengan nilai $p<0.01$. Sedangkan, kadar kreatinin plasma paling rendah diantara kelompok perlakuan terdapat pada kelompok KURKU100 dan tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok CIS dengan nilai $p=0.068$ (>0.05). Selain itu, perbedaan kadar kreatinin plasma antara kelompok

NANOKUR (100 dan 50 mg/kg BB) terhadap kelompok CIS juga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik, CIS vs CIS+NANOKUR50 dan CIS vs CIS+NANOKUR100, dengan nilai $p=0.122$ dan $p=0.135$. Hal tersebut mungkin mengindikasikan bahwa pemberian kurkumin maupun nanokurkumin untuk menurunkan kadar kreatinin dalam plasma tidak bersifat *dose-dependent*.



Gambar 4.7 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar kreatinin dalam plasma.

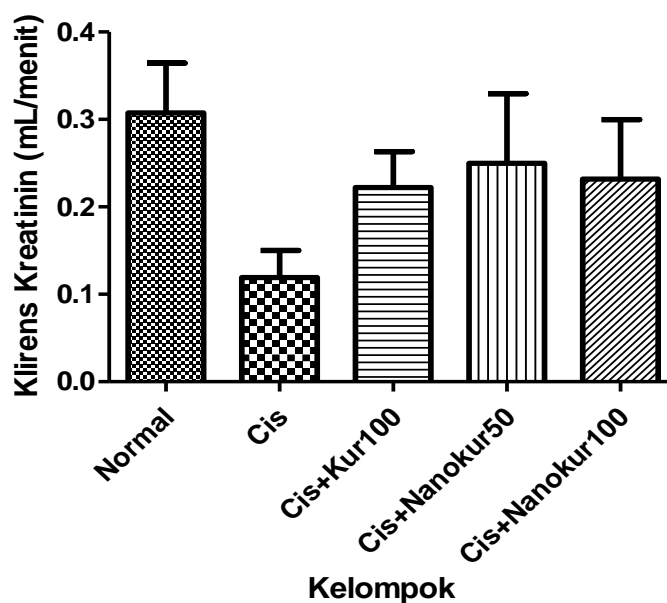
Pada uji ANOVA satu arah kadar kreatinin plasma pada kelompok: Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p berturut-turut, $p<0.01$, $p=0.068$, $p=0.122$, $p=0.135$ ($p>0.05$). Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD. * $p<0.01$ vs Normal.

4.4 Klirens Kreatinin

Klirens kreatinin pada semua kelompok tikus penelitian tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan nilai $p=0.269$ (>0.05). Uji statistik dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat perbedaan klirens kreatinin antara kelompok yang satu dengan yang lainnya. Gambar 4.8 menunjukkan bahwa klirens kreatinin paling rendah terdapat pada

kelompok CIS tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok normal dengan nilai $p= 0.181 (>0.05)$.

Klirens kreatinin yang paling tinggi diantara seluruh kelompok perlakuan terdapat pada kelompok NANOKUR50 dan tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok CIS dengan nilai $p= 0.518 (>0.05)$ pada uji Tukey. Selain itu juga tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada klirens kreatinin kelompok KURKU100 dan kelompok NANOKUR100 terhadap kelompok CIS dengan nilai p berturut-turut sebesar 0.721 dan 0.651 (>0.05).



Rerata	0.308	0.119	0.222	0.250	0.232
SD	0.140	0.076	0.100	0.196	0.166

Gambar 4.8 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap klirens kreatinin.

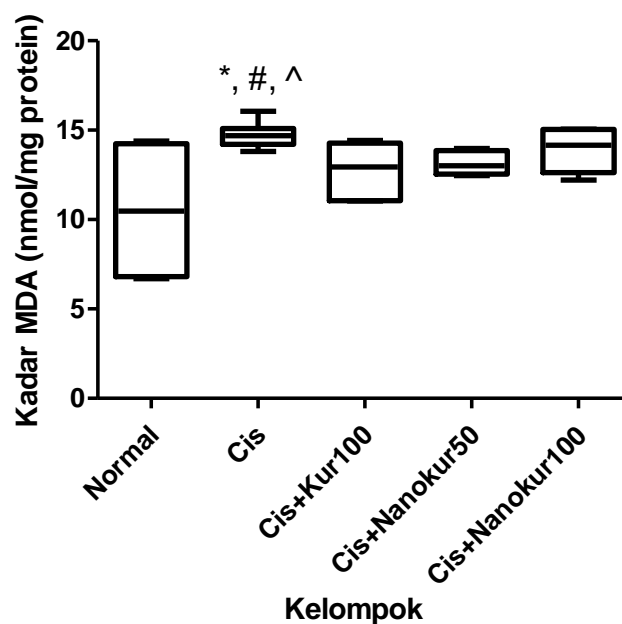
Pada uji ANOVA satu arah kadar kreatinin urin pada kelompok: Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai $p>0.05$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD.

4.5 Kadar MDA dalam homogenat ginjal

Kadar MDA pada semua kelompok tikus penelitian memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji non-parametrik Kruskal Wallis dengan nilai $p= 0.035 (<0.05)$. Uji Mann-Whitney dilakukan sebagai uji *post-hoc* untuk melihat perbedaan kadar MDA antara satu kelompok dengan kelompok lainnya. Gambar

4.9 menunjukkan bahwa kadar MDA paling tinggi terdapat pada kelompok CIS. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok CIS terdapat banyak ROS sehingga terjadi peroksidasi lipid yang selanjutnya menghasilkan banyak produk MDA. Kadar MDA pada kelompok CIS memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok normal dengan nilai $p=0.016$ (<0.05) pada uji Mann-Whitney.

Kadar MDA paling rendah terdapat pada kelompok KURKU100 dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan kelompok CIS, dengan nilai $p=0.016$ (<0.05) pada uji Mann-Whitney. Selain itu, kadar MDA kelompok NANOKUR50 terhadap kelompok CIS juga memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dengan nilai $p=0.01$ (<0.05). Sedangkan, kadar MDA kelompok NANOKUR100 terhadap kelompok CIS tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dengan nilai $p=0.423$ (>0.05). Data pada Gambar 15 menunjukkan bahwa kurkumin dan nanokurkumin berpotensi dalam mencegah terjadinya peningkatan peroksidasi lipid akibat ROS dengan berperan sebagai *radical scavenger*. Sehingga lebih sedikit ROS yang bereaksi dengan membran lipid dan menghasilkan produk MDA.



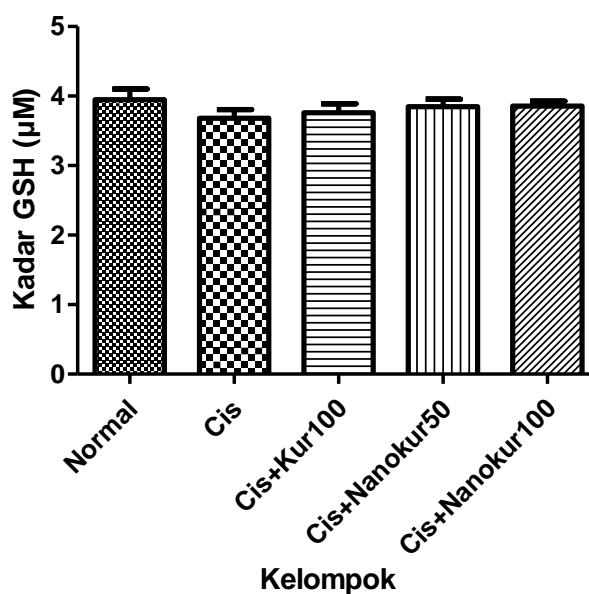
Rerata	10.512	14.728	12.777	13.139	13.898
SD	3.833	0.741	1.520	0.688	1.187

Gambar 4.9 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar MDA dalam jaringan ginjal.

Pada uji Mann-Whitney kadar MDA dalam jaringan pada kelompok: Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p berturut-turut $p=0.016$, $p=0.016$, $p=0.01$, $p=0.423$ ($p>0.05$). Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD. * ($p<0.05$ vs normal), # ($p<0.05$ vs Cis+Kur100), ^ ($p<0.05$ vs Cis+Nanokur50).

4.6 Kadar GSH dalam homogenat ginjal

Kadar GSH pada semua kelompok tikus penelitian memiliki perbedaan yang tidak bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan nilai $p=0.607$ (>0.05). Uji Tukey HSD digunakan sebagai uji *post-hoc* untuk melihat perbedaan kadar GSH antara satu kelompok dengan kelompok lainnya. Gambar 4.10 menunjukkan bahwa kadar GSH paling rendah terdapat pada kelompok CIS dan memiliki perbedaan yang tidak bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok normal, dengan nilai $p=0.551$ (>0.05) pada uji Tukey. Selain itu kadar GSH kelompok KURKU100, NANOKUR50 dan NANOKUR100 juga tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok CIS pada uji Mann-Whitney, kelompok CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100, dengan nilai p berturut-turut, yaitu 0.991; 0.873; 0.848 ($p>0.05$).



Rerata	3.947	3.683	3.759	3.847	3.857
SD	0.3834	0.3020	0.3206	0.2658	0.1740

Gambar 4.10 Pengaruh CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 terhadap kadar GSH dalam homogenat ginjal.

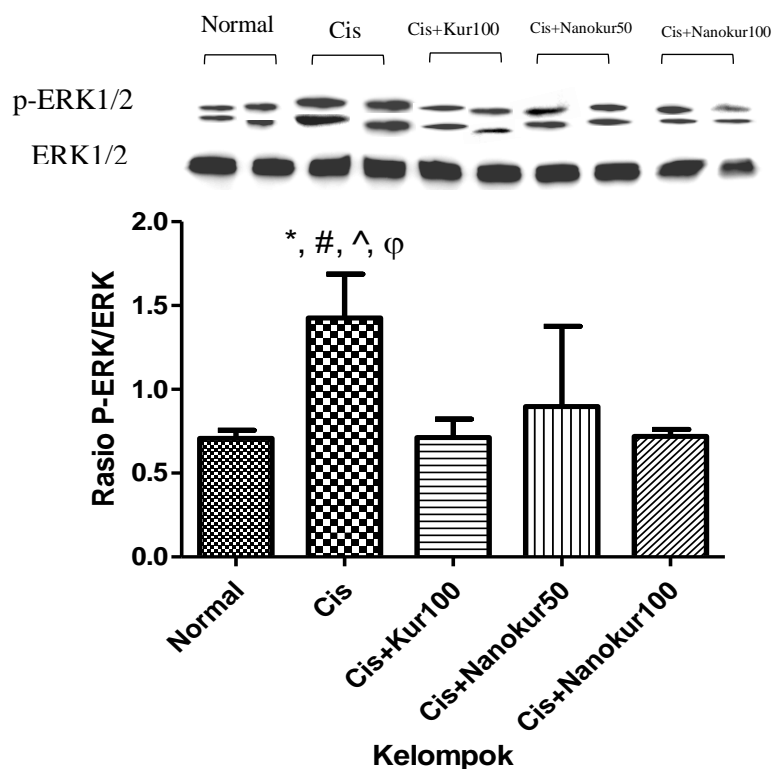
Pada uji ANOVA satu arah kadar GSH pada kelompok: Normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai $p > 0.05$. Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD.

4.7 Ekspresi rasio protein p-ERK/ERK pada ginjal

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data ekspresi rasio protein p-ERK/ERK memiliki distribusi yang normal dan homogen setelah dilakukan transformasi logaritma, sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik ANOVA satu arah. Ekspresi rasio protein p-ERK/ERK pada semua kelompok penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik pada uji ANOVA satu arah dengan nilai $p = 0.003$. Selanjutnya dilakukan uji Tukey sebagai uji *posthoc* untuk melihat adanya perbedaan ekspresi rasio protein p-ERK/ERK antar kelompok penelitian.

Gambar 4.11 menunjukkan bahwa rasio p-ERK/ERK paling tinggi terdapat pada kelompok CIS dan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok normal, dengan nilai $p = 0.006$. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya pemberian cisplatin dosis tunggal sudah dapat mengaktifkan jalur ERK, melalui fosforilasi ERK. Selain itu, kelompok KURKU100 menunjukkan rasio p-ERK/ERK paling rendah diantara yang lainnya dan memiliki perbedaan

yang bermakna terhadap kelompok CIS, dengan nilai $p=0.007$ (<0.05). Rasio p-ERK/ERK pada kelompok NANOKUR100 dan NANOKUR50 juga memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan kelompok CIS, dengan nilai $p=0.008$ dan $p=0.038$. Hal tersebut menunjukkan bahwa baik kurkumin 100 mg/kgBB maupun nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB dapat berpotensi sebagai nefroprotektor yang dapat mencegah terjadinya fosforilasi ERK akibat cisplatin. Akan tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna antara rasio p-ERK/ERK antara kelompok KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100, yang menunjukkan bahwa kurkumin dosis 100 mg/kgBB/hari memiliki efektivitas yang hampir sama dengan nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB/hari dalam hal mencegah terjadinya aktivasi jalur ERK.



Kelompok	Rerata	SD
Normal	0.707	0.049
Cis	1.426	0.261
Cis+Kur100	0.713	0.109
Cis+Nanokur50	0.897	0.479
Cis+Nanokur100	0.719	0.043

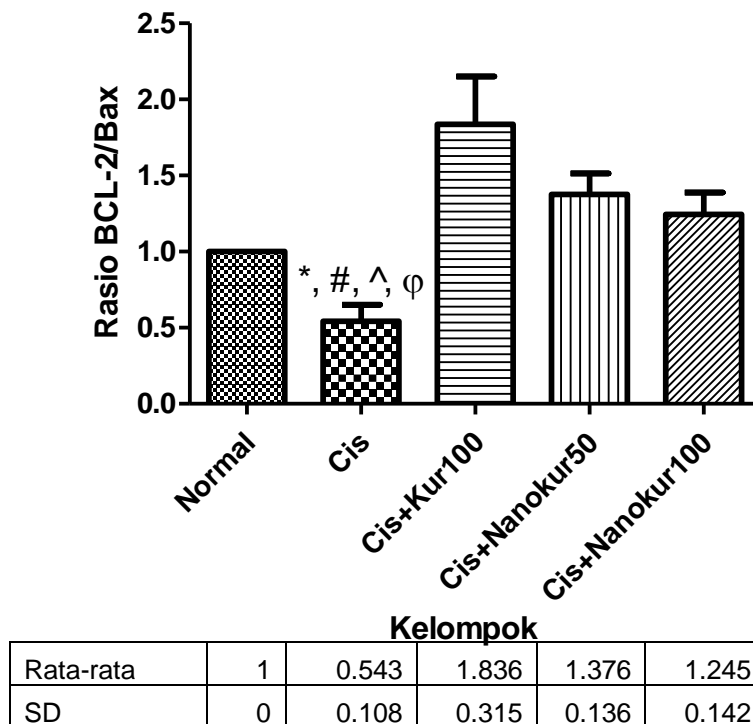
Gambar 4.11 Rasio protein p-ERK/ERK pada kelompok Normal, CIS, CIS+KUR100, CIS+NANOKUR50, dan CIS+NANOKUR100.

Pada uji parametrik ANOVA satu arah rasio protein P-ERK/ERK pada kelompok: normal vs CIS, CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, dan CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p berturut-turut, 0.006; 0.007; 0.038; 0.008. Dimana *($p<0.01$ vs normal), #($p<0.01$ vs Cis+Kur100), ^($p<0.05$ vs Cis+Nanokur50), ϕ ($p<0.01$ vs Cis+Nanokur100).

4.8 Rasio Ekspresi gen Bax dan BCL-2

Berdasarkan hasil uji homogenitas dan normalitas, data tingkat ekspresi gen mRNA Bax (pro-apoptosis) dan BCL-2 (anti-apoptosis) pada kelompok CIS, KURKU100, NANOKUR50, dan NANOKUR100 menunjukkan data yang terdistribusi normal akan tetapi tidak homogen. Tingkat ekspresi rasio mRNA gen BCL-2/Bax pada semua kelompok tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna berdasarkan uji statistik ANOVA satu arah, dengan nilai p sebesar <0.01 . Uji *post-hoc* Tukey dilakukan untuk melihat perbedaan tingkat ekspresi rasio gen BCL-2/Bax antar kelompok.

Gambar 4.12 menunjukkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax yang paling rendah terdapat pada kelompok CIS dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok normal dengan nilai $p < 0.01$. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok CIS cenderung terjadi apoptosis akibat cisplatin. Pada kelompok dengan pemberian kurkumin 100 mg/kgBB menunjukkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax yang paling tinggi diantara kelompok perlakuan lainnya dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik dibandingkan kelompok CIS, dengan nilai $p < 0.01$. Selain itu, pemberian nanokurkumin 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB juga memiliki rasio ekspresi gen BCL-2/Bax yang cukup tinggi dan memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap kelompok CIS, dengan nilai $p < 0.01$.



Gambar 4.12. Tingkat ekspresi mRNA rasio gen BCL-2/Bax pada kelompok normal, CIS, CIS+KUR100, CIS+NANOKUR50, dan CIS+NANOKUR100.

Pada uji ANOVA satu arah tingkat ekspresi mRNA gen BCL-2 pada kelompok: CIS vs CIS+KUR100, CIS vs CIS+NANOKUR50, dan CIS vs CIS+NANOKUR100 dengan nilai p sebesar <0.01 . Data disajikan sebagai nilai rerata \pm SD. *(<0.01 vs Normal), #(<0.01 vs Cis+Kur100), ^(<0.01 vs Cis+Nanokur50), ϕ (<0.01 vs Cis+Nanokur100).

BAB 5

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh kurkumin dan nanokurkumin (kurkumin dalam bentuk nanopartikel) terhadap pencegahan nefrotoksisitas yang diakibatkan oleh cisplatin. Kurkumin diketahui memiliki aktivitas farmakologis sebagai nefroprotektor, tetapi terhalang oleh bioavailabilitasnya yang rendah dan kelarutannya dalam air kurang baik.⁶⁸ Oleh karena itu, digunakan nanokurkumin dengan kelarutannya yang lebih baik dibandingkan kurkumin untuk berperan sebagai nefroprotektor. Nanopartikel dengan ukuran diameter 100-200 nm sangat baik digunakan dalam bidang kedokteran.⁶⁹ Kurkumin dan nanokurkumin yang digunakan pada penelitian ini memiliki ukuran partikel masing-masing sebesar 339.8 nm dan 240.7 nm, nanokurkumin yang digunakan memiliki penurunan ukuran partikel sekitar 29% dari ukuran partikel kurkumin. Meskipun nanokurkumin yang digunakan belum termasuk kedalam ukuran nanopartikel, tetapi ukurannya masih lebih kecil dibandingkan kurkumin. Sehingga diharapkan memiliki hasil yang lebih baik daripada kurkumin dalam mencegah terjadinya nefrotoksisitas. Ciplatin sebagai obat kemoterapi masih banyak digunakan dalam berbagai pengobatan jenis kanker dan nefrotoksisitas menjadi efek samping utama yang paling membatasi penggunaan cisplatin. Setelah pemberian dosis tunggal cisplatin (50 – 100 mg/m²) pada pasien, sekitar satu hingga tiga pasien mengalami progresi nefrotoksisitas. Nefrotoksisitas dapat dikurangi tetapi tidak sepenuhnya dapat dicegah, melalui berbagai strategi seperti fraksinasi dosis,⁷⁰ hidrasi,⁷¹ dan diuresis.⁷² Selain itu juga tidak ada rejimen standar untuk hidrasi cisplatin.⁷³

Cisplatin dalam bentuk tidak terikat dieliminasi oleh ginjal melalui filtrasi glomerular dan sekresi tubular, kemudian terakumulasi pada sel parenkimal ginjal. Cisplatin dimetabolisme menjadi nefrotoksin pada tubulus proksimal dan mempengaruhi regulasi gen sehingga menyebabkan sitotoksisitas langsung melalui peningkatan ROS, aktivasi MAPK (*mitogen activated protein kinase*), menginduksi apoptosis, dan disfungsi mitokondria.⁷⁴ Beberapa peneliti mengamati bahwa

penurunan fungsi ginjal terjadi sejak siklus pertama penggunaan cisplatin, yang dikarakterisasi melalui penurunan kreatinin klirens, penurunan kadar kreatinin dan urea dalam urin serta peningkatan kadar kreatinin dan urea dalam darah.⁷⁵ Progresivitas nefrotoksisitas meningkat seiring dengan peningkatan dosis dan frekuensi pemberian cisplatin.⁷⁵

Berdasarkan penelitian Yukihiro Wada dkk,⁷⁶ menunjukkan bahwa pemberian cisplatin dosis tunggal (i.p 7 mg/kgBB) pada tikus menyebabkan penurunan berat badan yang menunjukkan adanya gangguan kesehatan. Selain itu, rasio berat ginjal per berat badan juga meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok tikus normal. Penelitian Antunes dkk,⁷⁷ juga menunjukkan bahwa pemberian cisplatin (i.p 7 mg/kgBB) pada tikus dapat menurunkan berat badan tikus, hal tersebut mungkin dikarenakan adanya toksisitas gastrointestinal akibat penggunaan cisplatin. Penelitian Reem N dan El-Naga,⁷⁸ juga menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal cisplatin (i.p 7 mg/kgBB) pada tikus menyebabkan penurunan berat badan sekitar 23.7% dibandingkan berat badan tikus kelompok normal dan terdapat peningkatan rasio berat ginjal per berat badan sebanyak 1.5 kali dibandingkan kelompok normal. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini yang cenderung menunjukkan penurunan berat badan pada tikus kelompok CIS dibandingkan kelompok normal. Adanya penurunan berat badan tersebut mungkin dikarenakan adanya efek samping lain dari penggunaan cisplatin, yaitu toksisitas gastrointestinal. Selain itu pada kelompok CIS terjadi peningkatan rasio berat ginjal per berat badan sebanyak 1 kali lipat dibandingkan kelompok normal.

Cisplatin dibersihkan oleh ginjal melalui filtrasi glomerular dan sekresi tubular, selanjutnya cisplatin mengalami biotransformasi di ginjal menjadi thiol yang sangat reaktif. Umumnya timbulnya insufisiensi ginjal dimulai beberapa hari setelah pemberian dosis cisplatin, menghasilkan terjadinya nefrotoksisitas akut yang ditandai dengan adanya peningkatan serum kreatinin dan BUN, serta penurunan klirens kreatinin.⁷⁹ Kreatinin merupakan suatu metabolit kreatin yang diekskresikan seluruhnya dalam urin melalui filtrasi glomerulus, sehingga meningkatnya kadar kreatinin dalam darah menjadi indikasi rusaknya fungsi ginjal.⁸⁰ Klirens kreatinin merupakan volume plasma yang dibersihkan dari senyawa atau racun oleh mekanisme ekskresi ginjal setiap satuan waktu. Kreatinin

difiltrasi oleh ginjal secara keseluruhan dan diekskresikan melalui urin dalam bentuk tidak berubah.⁸⁰

BUN dan kreatinin merupakan uji pendahuluan/uji skrining untuk fungsi ginjal, karena ditangani terutama melalui filtrasi glomerulus. Adanya perubahan kecil dalam fungsi ginjal dapat menyebabkan peningkatan kadar serum BUN dan kreatinin. Penelitian Yukihiro Wada dkk,⁷⁶ menunjukkan bahwa injeksi dosis tunggal cisplatin (i.p 7 mg/kg BB) pada tikus menyebabkan kadar serum kreatinin dan BUN meningkat secara signifikan dibandingkan pada tikus kelompok normal, serta penurunan yang signifikan pada klirens kreatinin. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Reem N dan El-Naga,⁷⁸ menunjukkan bahwa cisplatin menyebabkan peningkatan kadar kreatinin dan BUN dalam serum berturut-turut sebesar 8 kali dan 5.4 kalinya, dibandingkan dengan kelompok normal. Pada penelitian ini juga didapatkan peningkatan kadar kreatinin dan BUN plasma yang signifikan pada kelompok CIS berturut-turut sebesar 2.4 dan 5.7 kalinya dibandingkan kelompok normal. Selain itu terjadi penurunan klirens kreatinin serta penurunan kadar kreatinin dan BUN dalam urin pada kelompok CIS meskipun tidak signifikan dibandingkan kelompok normal. Berdasarkan hasil uji fungsi ginjal tersebut menunjukkan bahwa injeksi cisplatin dosis tunggal (i.p 7 mg/kg BB) pada tikus dapat menyebabkan terjadinya nefrotoksisitas akut yang menyerupai AKI (*acute kidney injury*).

Beberapa penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa cisplatin dapat menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) di ginjal sehingga terjadi peroksidasi membran lipid dan menghasilkan produk berupa MDA (malondialdehida). Peningkatan produksi MDA pada ginjal tikus yang mendapatkan cisplatin ditentukan dengan TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*). Penelitian Kuhad dkk,⁸¹ menunjukkan bahwa pemberian cisplatin (i.p 5 mg/kg BB) dosis tunggal pada tikus menyebabkan peningkatan kadar MDA yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian cisplatin dosis 7 mg/kgBB menyebabkan peningkatan ROS pada kelompok CIS yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar MDA yang signifikan dibandingkan kelompok normal.

Sumber ROS pada ginjal terdapat pada sel pembuluh darah, makrofag yang teraktivasi, dan berbagai sel glomerulus. Keseimbangan pembentukan ROS dan mekanisme protektif antioksidatif bergantung pada aktivitas enzim seperti katalase, NO-sintase, SOD, dan glutathion peroksidase.⁸² Kompleks endogen dalam sel dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis.⁸³ Antioksidan non-enzimatis juga diklasifikasi lagi menjadi antioksidan nutrisi dan antioksidan metabolik. Antioksidan nutrisi termasuk ke dalam antioksidan eksogen, yaitu senyawa yang tidak diproduksi di dalam tubuh dan harus disediakan melalui makanan atau suplemen,⁸⁴ salah satu contohnya adalah kurkumin. Aktivitas antioksidan tidak langsung dari kurkumin memiliki kemampuan untuk memicu ekspresi protein sitoprotektif seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion reduktase (GR), glutathion tereduksi (GSH), katalase (CAT),⁸⁵ glutathion peroksidase (GPx),⁸⁶ glutathion s-transferase, NADPH, dan *heme-oxygenase* 1 (HO-1).⁸²

Telah dilaporkan bahwa mitokondria mengandung sumber GSH/NP-SH yang berperan penting dalam detoksifikasi H₂O₂ yang diproduksi oleh matriks. GSH mitokondria berperan dalam menjaga fungsi mitokondria dan berperan lebih signifikan daripada GSH sitosol dalam menjaga fungsi seluler dan kelangsungan hidup sel.⁸⁷ GSH merupakan antioksidan tripeptida utama dalam sel dan berperan penting dalam detoksifikasi senyawa toksik seperti obat kemoterapi, hasil metabolisme nutrisi dan regulasi berbagai jalur untuk menjaga homeostasis seluler. Reaksi enzimatis dan non-enzimatis dapat terlibat dalam GSH yang memediasi *scavenging* radikal bebas dan ROS lainnya.⁸⁷

Penelitian dari Arjumand menunjukkan bahwa setelah injeksi cisplatin (7 mg/kg BB, i.p) pada tikus, terjadi deplesi GSH pada jaringan ginjal dan meningkatkan H₂O₂ sehingga terjadi peroksidasi lipid.⁸⁷ Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan adanya penurunan kadar GSH pada kelompok tikus CIS dibandingkan kelompok normal. Sehingga terjadi ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan produksi ROS semakin meningkat, yang berakibat pada terjadinya stres oksidatif. Adanya peningkatan ROS akibat cisplatin juga dapat mengaktifkan jalur ERK sehingga dapat memicu apoptosis jalur intrinsik maupun ekstrinsik melalui induksi pelepasan sitokrom c dari mitokondria, up-regulasi protein proapoptosis seperti Bax, up-regulasi p53,

serta down-regulasi protein antiapoptosis seperti BCL-2 pada sel ginjal⁸⁸ atau adanya aktivasi caspase-8. ERK yang teraktivasi ditemukan pada membran mitokondria. Jalur apoptosis intrinsik diregulasi oleh aktivitas protein BCL-2 yang berperan dalam menjaga integritas membran mitokondria. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) merupakan mediator jalur ERK yang menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik. ERK dapat secara langsung mengaktivasi cPLA2 melalui fosforilasi pada serine 505.⁸⁹

Suatu penelitian menunjukkan bahwa cisplatin dapat menyebabkan kerusakan tubulus proksimal baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, melalui apoptosis jalur caspase dan non-caspase.⁹⁰ Penelitian Arany dkk,⁹¹ menunjukkan bahwa dengan inhibitor yang spesifik, adanya inhibisi ERK secara signifikan dapat meningkatkan ketahanan hidup sel melalui penghambatan apoptosis setelah pemberian cisplatin. Hal tersebut menunjukkan bahwa ERK memediasi cisplatin dalam menginduksi kematian sel ginjal. Selain itu, Penelitian Nowak dkk^{92,93} menunjukkan bahwa pada sel kultur tubulus ginjal yang diberi perlakuan cisplatin, terjadi peningkatan ekspresi ERK1/ERK2, serta terjadi fosforilasi ERK1/2 yang terdeteksi pada mitokondria dan berkaitan dengan hilangnya fungsi mitokondria. ERK khususnya teraktivasi hanya pada sel saraf dan sel epitel ginjal akibat adanya paparan dari toksikan seperti cisplatin.⁹⁴ Penelitian Joe dkk,⁹⁵ secara *in vivo* melaporkan bahwa ERK1/2 bertindak sebagai *upstream* dari caspase 3 pada kematian sel ginjal yang diinduksi cisplatin.

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi protein ERK dengan *Westernblot*, ERK yang terekspresi adalah ERK1/2. Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian cisplatin dosis 7 mg/kgBB dapat meningkatkan ekspresi ERK terphosphorilasi (p-ERK) pada kelompok CIS sehingga terjadi peningkatan rasio p-ERK/ERK secara signifikan dibandingkan kelompok normal. ERK merupakan jalur *upstream* dari nefrotoksisitas akibat cisplatin. Sehingga teraktivasi nya jalur ERK ini dapat mengaktifkan jalur yang menuju apoptosis sel ginjal baik secara intrinsik maupun ekstrinsik. Cisplatin mengaktivasi jalur ERK akibat adanya peningkatan ROS, yang juga dapat dilihat dari peningkatan kadar MDA pada kelompok CIS.

Cisplatin diketahui dapat memicu terjadinya peningkatan ROS sehingga dapat menyebabkan terjadinya aktivasi ERK sehingga mengakibatkan terjadinya up-regulasi gen Bax dan down-regulasi gen BCL-2. Penelitian Kim dkk,⁹⁶ melaporkan bahwa pada sel epitel ginjal terjadi peningkatan ekspresi Bax setelah adanya paparan dari cisplatin atau H₂O₂, dan adanya inhibisi dari jalur ERK dapat menurunkan ekspresi Bax. Selain itu, penelitian Shin HS dkk juga menyatakan bahwa cisplatin dapat menyebabkan peningkatan ekspresi Bax dan penurunan ekspresi BCL-2 yang dipicu oleh adanya stres oksidatif. Pada penelitian ini, menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen Bax (pro apoptosis) pada kelompok CIS dibandingkan kelompok normal. Selain itu, diketahui juga bahwa pada kelompok CIS telah terjadi stres oksidatif yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar MDA nya, sehingga pada kelompok CIS terjadi penurunan ekspresi mRNA gen BCL-2 (anti-apoptosis) yang juga lebih rendah tingkat ekspresinya dibandingkan gen Bax. Hasil tersebut juga dapat dilihat melalui rasio ekspresi gen BCL2-/Bax pada kelompok CIS yang meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok normal, dan cenderung mengarah pada terjadinya apoptosis sel ginjal.

Berdasarkan hasil seluruh parameter biokimia maupun fungsi ginjal pada kelompok CIS, diketahui bahwa cisplatin dosis 7 mg/kgBB berhasil menyebabkan terjadinya nefrotoksisitas yang menyerupai AKI (*acute kidney injury*) melalui jalur apoptosis. Selanjutnya akan dilihat bagaimana efek nefroprotektor kurkumin 100 mg/kgBB, nanokurkumin 50 mg/kgBB, dan nanokurkumin 100 mg/kgBB dalam mencegah nefrotoksisitas akibat cisplatin pada jalur apoptosis. Pada tanda-tanda toksisitas umum, seperti berat badan dan rasio berat ginjal per berat badan menunjukkan bahwa kelompok KURKU100 maupun NANOKUR50 dan NANOKUR100, cenderung mencegah terjadinya penurunan berat badan tikus pada hari setelah injeksi cisplatin. Selain itu, adanya pemberian kurkumin dan nanokurkumin tersebut juga cenderung mencegah terjadinya peningkatan rasio berat ginjal per berat badan. Hasil rasio berat ginjal per berat badan pada kelompok KUR100, NANOKUR 50 dan 100 cenderung tidak memiliki perbedaan yang bermakna antar kelompoknya dan jika dibandingkan dengan kelompok normalnya. Hal tersebut menunjukkan tidak adanya perbedaan efek yang signifikan antara

pemberian kurkumin 100 mg/kgBB dengan nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB dalam hal mencegah terjadinya tanda-tanda toksisitas umum akibat cisplatin.

Pemberian kurkumin 100 mg/kgBB serta nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB beberapa hari sebelum dan sesudah injeksi cisplatin pada hewan coba bertujuan mencegah ataupun menghambat progresi nefrotoksitas akibat cisplatin melalui penurunan yang signifikan pada kadar BUN dan kreatinin dalam plasma serta peningkatan klirens kreatininnya. Kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin 100 mg/kgBB ternyata bekerja lebih baik dalam mencegah terjadinya peningkatan kadar BUN plasma dilihat dari perbedaan kadar BUN plasma kelompok KUR100 dan NANOKUR100 yang signifikan dibandingkan kelompok CIS. Adanya pemberian kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin 100 mg/kgBB menunjukkan bahwa keduanya memiliki efektivitas yang sama dalam mencegah nefrotoksitas akibat cisplatin dilihat berdasarkan parameter fungsi ginjalnya.

Penelitian Alasubramanyam dkk,⁹⁷ menunjukkan bahwa adanya pemberian kurkumin dengan dosis 60 mg/kg BB secara oral dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan pada ginjal tikus. Hal tersebut dikarenakan kurkumin memiliki mekanisme aktivitas antioksidan secara langsung melalui reaksinya dengan ROS dan aktivitas antioksidan tidak langsung melalui stimulasi up-regulasi beberapa antioksidan endogen dan protein sitoprotektif. Adanya gugus fenolik pada struktur kurkumin menunjukkan kemampuannya untuk bereaksi dengan ROS dan RNS, serta menjadi satu-satunya mekanisme dimana kurkumin dapat menjaga sel epitel tubulus ginjal dari kerusakan oksidatif yang diinduksi H₂O₂.⁹⁸

Penelitian Kazim Sahin dkk,⁹⁹ menunjukkan pemberian kurkumin 50 mg/kgBB secara oral dapat menurunkan kadar MDA pada ginjal tikus meskipun tidak signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatifnya. Selain itu, penelitian Wei Yu dkk,¹⁰⁰ juga menunjukkan bahwa pemberian kurkumin 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif pada tikus yang diinduksi diabetes. Penelitian Gosh dkk,¹⁰¹ menunjukkan bahwa pemberian kurkumin 75 mg/kgBB per oral juga dapat menurunkan kadar MDA pada ginjal tikus yang diinduksi 5/6 nefrektomi. Pada penelitian ini perlakuan dengan kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin 50mg/kgBB cenderung dapat mencegah terjadinya peningkatan ROS, ditandai penurunan kadar MDA yang

signifikan dibandingkan tikus kelompok CIS. Akan tetapi kelompok tikus dengan perlakuan kurkumin 100 mg/kg BB menghasilkan kadar MDA yang paling rendah dibandingkan kelompok nanokurkumin 50 dan 100 mg/kg BB. Hal tersebut menunjukkan bahwa mungkin kurkumin 100 mg/kgBB berperan lebih baik dalam menangkal kelebihan produksi ROS dan mengurangi terjadinya stres oksidatif akibat penggunaan cisplatin. Selain itu, pada penelitian ini kerja kurkumin dan nanokurkumin sebagai antioksidan tidak bergantung dosis. Hal tersebut dilihat dari kadar MDA kelompok NANOKUR50 yang lebih rendah dibandingkan kelompok NANOKUR100. Kurkumin dan nanokurkumin dapat mengurangi produksi MDA dengan cara bereaksi dengan kelebihan ROS yang sudah tidak dapat diatasi dengan sistem antioksidan endogen, sehingga dapat mengurangi terjadinya peroksidasi lipid dan produksi MDA.

Penelitian Lavoie dkk,¹⁰² melaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan sintesis dan konsentrasi glutathion tereduksi (GSH) pada astrosit dan neuron yang diinduksi oleh γ GCL (γ -Glutamilsistein Ligase).¹⁰³ Penelitian Kuhad dkk, juga menunjukkan bahwa pemberian kurkumin 60 mg/kgBB secara oral dapat meningkatkan kadar GSH pada ginjal tikus yang diinduksi cisplatin meskipun tidak secara signifikan. Produksi ROS pada proses seluler yang normal secara segera didetoksifikasi oleh antioksidan endogen seperti GSH, katalase, GR, GPx, GST, dll, tetapi adanya akumulasi ROS yang berlebihan akibat cisplatin menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan ROS, sehingga memicu deplesi GSH.¹⁰⁴

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan kurkumin 100 mg/kg BB dan nanokurkumin 50 dan 100 mg/kg BB cenderung mencegah penurunan kadar GSH dibandingkan dengan kelompok CIS. Kurkumin dan nanokurkumin berperan sebagai antioksidan non-enzimatik yang dapat bereaksi dengan ROS secara langsung dan memicu up-regulasi ekspresi antioksidan non-enzimatik terutama GSH sehingga dapat mencegah terjadinya kelebihan ROS akibat cisplatin dan mengurangi peroksidasi lipid. GSH sebagai antioksidan non-enzimatik dapat bekerja langsung dengan menetralkan ROS ataupun bekerja sebagai substrat dari reaksi enzimatik glutathion peroksidase (GPx) untuk mengubah H_2O_2 menjadi H_2O .

Pada aktivasi jalur ERK di sel ginjal yang dipicu oleh adanya peningkatan ROS, pemberian kurkumin dan nanokurkumin berperan sebagai antioksidan untuk menetralkan kelebihan ROS, sehingga tidak memicu aktivasi ERK dan fosforilasi ERK. Berdasarkan hasil penelitian, pemberian kurkumin 100 mg/kgBB serta nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB dapat secara signifikan menekan terjadinya fosforilasi ERK. Kurkumin 100 mg/kg dan nanokurkumin 100 mg/kgBB memiliki efektivitas yang hampir sama dalam mencegah fosforilasi ERK, dilihat dari nilai rasio p-ERK/ERK yang tidak jauh berbeda antar kelompok tersebut. Adanya pencegahan aktivasi dan fosforilasi jalur ERK juga dapat mencegah teraktivasinya jalur apoptosis baik intrinsik maupun ekstrinsik. Hal tersebut mungkin dikarenakan ukuran partikel kurkumin dan nanokurkumin yang tidak berbeda jauh, meskipun nanokurkumin memiliki ukuran partikel yang lebih kecil. Sejauh ini belum banyak penelitian mengenai efek kurkumin maupun nanokurkumin dalam menekan atau menghambat aktivasi ERK untuk mencegah terjadinya nefrotoksisitas akibat cisplatin.

Pada pemeriksaan ekspresi gen Bax dan BCL-2, adanya pemberian kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin (50 dan 100 mg/kgBB) menghasilkan tingkat ekspresi mRNA gen Bax yang lebih rendah dibandingkan BCL-2, sehingga menghasilkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax yang lebih tinggi dibandingkan kelompok CIS, serta memiliki perbedaan yang signifikan. Hal tersebut dikarenakan kurkumin dan nanokurkumin menetralkan kelebihan ROS dengan cara bereaksi secara langsung dengan ROS, sehingga menghambat aktivasi ERK dan mencegah terjadinya up-regulasi gen Bax dan down-regulasi gen BCL-2. Rasio ekspresi gen BCL-2/Bax menunjukkan bahwa kurkumin 100 mg/kgBB dapat menurunkan ekspresi gen Bax lebih baik dibandingkan nanokurkumin 50 dan 100 mg/kgBB. Sedangkan nanokurkumin 50 mg/kgBB bekerja lebih baik dalam meningkatkan ekspresi gen BCL-2 dibandingkan kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin 100 mg/kgBB. Berdasarkan hasil rasio ekspresi BCL-2/Bax, pemberian kurkumin 100 mg/kgBB dan nanokurkumin (50 dan 100 mg/kgBB) cenderung dapat mencegah terjadinya nefrotoksisitas akibat cisplatin melalui jalur apoptosisnya dan kurkumin 100 mg/kgBB bekerja lebih baik dalam meningkatkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax dibandingkan kelompok nanokurkumin.

Berdasarkan hasil pengukuran beberapa parameter fungsi ginjal dan parameter biokimia untuk pemeriksaan apoptosis, kurkumin dengan dosis 100 mg/kgBB cenderung memiliki efektivitas yang lebih baik sebagai nefroprotektor pada nefrotoksisitas akibat cisplatin melalui jalur apoptosis. Hal tersebut mungkin dikarenakan ukuran partikel nanokurkumin yang digunakan belum termasuk ke dalam ukuran nanopartikel (100 – 200 nm) serta mekanisme pembuatan nanopartikel yang kurang efektif. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa pembuatan nanopartikel dengan cara enkapsulasi dapat meningkatkan kelarutannya dalam air, meningkatkan bioavailabilitasnya, serta sifat-sifat farmakokinetiknya, sehingga diharapkan pembuatan nanopartikel dengan cara enkapsulasi juga dapat berperan lebih baik sebagai nefroprotektor dibandingkan dengan kurkumin.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan keseluruhan hasil yang didapat maka kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

6.1 KESIMPULAN

1. Kurkumin dan nanokurkumin memiliki efek nefroprotektor. Pemberian kurkumin dosis 100 mg/kgBB bekerja lebih baik dibandingkan nanokurkumin 50 mg/kgBB dalam hal menurunkan kadar BUN plasma dan kreatinin plasma, meningkatkan kadar BUN urin dan kreatinin urin, menurunkan kadar MDA di jaringan ginjal, menurunkan rasio ekspresi protein p-ERK/ERK di jaringan ginjal dan meningkatkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax di jaringan ginjal.
2. Kurkumin dan nanokurkumin memiliki efek nefroprotektor. Pemberian kurkumin dosis 100 mg/kgBB bekerja lebih baik dibandingkan nanokurkumin dosis 100 mg/kgBB dalam hal menurunkan kadar BUN plasma dan kreatinin plasma, meningkatkan kadar BUN urin dan kreatinin urin, menurunkan kadar MDA di jaringan ginjal, menurunkan rasio ekspresi protein p-ERK/ERK di jaringan ginjal dan meningkatkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax di jaringan ginjal.
3. Nanokurkumin memiliki efek nefroprotektor. Pemberian nanokurkumin 50 mg/kgBB bekerja lebih baik dibandingkan nanokurkumin 100 mg/kgBB dalam hal menurunkan kadar BUN dan kreatinin dalam plasma, meningkatkan kadar BUN dan kreatinin dalam urin, meningkatkan klirens kreatinin, menurunkan kadar MDA di jaringan ginjal, dan meningkatkan rasio ekspresi gen BCL-2/Bax di jaringan ginjal.

6.2 SARAN

1. Pembuatan nanopartikel kurkumin dilakukan dengan cara enkapsulasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
2. Sinuraya ES. The hospital based-cancer registry at Dharmais cancer hospital 2003-2007. Jakarta. *Indonesian J Cancer.* 2012;11-67.
3. DNCH Research and Development 2013.
4. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, et al. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* 2010;2:2490-518.
5. Erten C, Demir L, Somali I, et al. Cisplatin plus gemcitabine for treatment of breast cancer patients with brain metastases; a preferential option for triple negative patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:3711-7.
6. Go RS, Adjie AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:409-422.
7. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanism and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008;73:994-1007.
8. Tezcan S, Izzettin FV, Sancar M, et al. Nephrotoxicity evaluation in outpatients treated with cisplatin-based chemotherapy using a short hydration method. *Pharmacol Pharmacy.* 2013;4:296-302.
9. De Jongh FE, Van Veen RN, Veltman SJ, et al. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer.* 2003;88:1199-206.
10. Masaaki U, Jun M, and Nobuhiro M. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2011; 115:547-551.
11. Preetha A, Ajaikumar B, Kunnumakkara, Robert A, Newman, and Bharat B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharmaceutics.* 2007;4(6):807-818.
12. Antunes LM, Darin JD, Bianchi. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipidperoxidation in rats. *Pharmacological Research.* 2001;43:145-150.
13. Kuhad A, Pilkhwai S, Sharma S, Tirkey N, and Chopra K. Effect of curcumin in inflammation and oxidative stress in cisplatin - induced experimental nephrotoxicity. *J. Agric. Food. Chem.* 2007;55:10150-10155.
14. Masaaki U, Jun M, and Nobuhiro M. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2013; 115:547-551.
15. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007;853(1-2):183-9.
16. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int. J. Pharm.* 2007;330(1-2):155-63.
17. Neife AGS, Rodrigues MAC, Martins NM, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86:1233-1250.
18. Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:858-865.
19. Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot- Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis.* 2008;13:11-32.
20. Tezcan S, Izzettin FV, Sancar M, et al. Nephrotoxicity evaluation in outpatients treated with cisplatin-based chemotherapy using a short hydration method. *Pharmacol Pharmacy.* 2013;4:296-302.
21. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanism of Cisplatin Nephrotoxicity. 2010;2:2490-2518.
22. Pabla N, Murphy R.F, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009;296:505-511.

23. Olivero O.A, Chang PK, Lopez Larraza DM, Semino Mora MC, Poirier MC. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 1997;391:79–86.
24. Kruidering M, Van de Water B, De Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;280:638–649.
25. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib. Nephrol.* 2005;148:107–121.
26. Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int. J. Cancer.* 1999;83:866–869.
27. Filipski, K.K.; Mathijssen, R.H.; Mikkelsen, T.S.; Schinkel, A.H.; Sparreboom, A. contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009;86:396–402.
28. Andreassen CN, Grau G, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology.* 2003;13(1):62-72.
29. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:307–320.
30. Liu H, Baliga R. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:1985–1992.
31. Florea AM and Büsselberg D. Cisplatin as anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. 2011;3:1351-1371.
32. Ralph, S.J.; Neuzil, J. Mitochondria as targets for cancer therapy. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:9–28.
33. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol.* 2004;23:29–34.
34. Adams JM and Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:61–66.
35. Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* 2003;63:72–82.
36. Wei Q, Dong G, Yang T, Megyesi J, Price PM, Dong Z. Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1282–F1291.
37. Wu XX, Kakehi Y. Enhancement of lexatumumab-induced apoptosis in human solid cancer cells by Cisplatin in caspasedependent manner. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2039–2047.
38. Borkan SC. The role of BCL-2 family members in acute kidney injury. *Seminars in Nephrology.* 2016;36:237-250.
39. Soriano ME, Scorrano L. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell.* 2011;145:15-7.
40. Tan BJ. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and ERK activation in triptolide-induced apoptosis. *International Journal of Oncology.* 2013;42:1605-1612.
41. Karasawa T, Steyger PS. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicology Letters.* 2015;237:219-227.
42. Cagnol S, Chambard JC. ERK cell death: mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal.* 2010;277:2-21.
43. Wang X, Jennifer L, Martindale, Nikki JH. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *JBC Papers.* 2000;275:39435-39443.
44. Dapus no.87 dari tesis sebelumnya
45. Vera-Ramirez L, Perez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-Tortosa M, Battino M, Quiles JL. Curcumin and liver disease. *Biofactors.* 2013;39:88–100.

46. Preetha A, Ajaikumar B, Kunnumakkara, Robert A, Newman, and Bharat B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharmaceutics*. 2007;4(6):807-818.
47. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: A review pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014;35:3365–3383.
48. Alrawaiq NS, Abdullah A. A Review of Antioxidant Polyphenol Curcumin and its Role in Detoxification. *Int.J.PharmTech Res*. 2014;6(1):280-289.
49. Rao EV and Sudheer P. Revisiting curcumin chemistry part I: A new strategy for the synthesis of curcuminoids. *Indian J. Pharm. Sci*. 2011;73:262–270.
50. Anand P , Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology*. 2008;76:1590–15611.
51. Aggarwal BB and Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacology – logical Sciences*. 2009;30:85–94.
52. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 1998;64:353–356.
53. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 1998;64:353–356.
54. Pan, M. H, Huang T, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos*. 1999;27(4):486–94.
55. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. 2007;853:(1–2):183–9.
56. Moran MP, Fernandez JM, Tortosa CR, Ramirez MC. Curcumin and Health. *Molecules*. 2016;21:1-22.
57. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin. Cancer Res*. 2004;10:6847–6854.
58. Ryu EK, Choe YS, Lee KH, Choi Y, Kim BT. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: Synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J. Med. Chem*. 2006;49:6111–6119.
59. Garcea G, Berry DP, Jones DJ, et al. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamics consequences. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005;14(1):120-125.
60. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2002;11(6):535-540.
61. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*. 1978;8:761–768.
62. Yallapu MM, Prashanth K, Nagesh B, Jaggi M, and Chauhan S. Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations. *The AAPS Journal*. 2015;17(6):1342-1356.
63. Ranjit Konwar, Baquee Ahmed Abdul. Nanoparticle: An Overview of Preparation, Characterization and Application. *International Research Journal of Pharmacy*. 2013; 4(4): 47-57.
64. Pal M, Sachdeva M, Gupta N, Mishra P, Yadav M, Tiwari A. Lead exposure in different organs of mammals and prevention by curcumin-nanocurcumin: a review. *Biol Trace Elem Res*. 2015;168:380-391.

65. Naksuriya O, Okonogi S, Schifflers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014;35:3365-3383.
66. Wei Yu, Jiliang Wu, Fei Cai, Jizhou Xiang, Wenliang Zha, Dan Fan, Shuang Guo, Zhangyin Ming, Chao Liu. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *Plos One*. 2012;7:1-11.
67. Ghosh S, Bhattacharyya S, Rashid K, Sil PC. Curcumin protects rat liver from streptozotocin-induced diabetic pathophysiology by counteracting reactive oxygen species and inhibiting the activation of p53 and MAPKs mediated stress response pathways. *Toxicology Reports*. 2015;2:365-376
68. Naksuriya O, Okonogi S, Schifflers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: A review pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014;35:3365–3383.
69. Yallapu MM, Prashanth K, Nagesh B, Jaggi M, and Chauhan S. Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations. *The AAPS Journal*. 2015;17(6):1342-1356.
70. Arunkumar PA, Viswanatha GL, Radheshyam N, et al. Science behind cisplatin-induced nephrotoxicity in humans: a clinical study. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2: 640- 4.
71. Tiseo M, Martelli O, Mancuso A, et al. Short hydration regimen and nephrotoxicity of intermediate to high-dose cisplatin-based chemotherapy for outpatient treatment in lung cancer and mesothelioma. *Tumori*. 2007;93:138-44
72. Moon HH, Seo KW, Yoon KY, et al. Prediction of nephrotoxicity induced by cisplatin combination chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2011;17: 3510-7..
73. Prasaja Y, Sutandyo N, Andrajati R. Incidence of cisplatin-induced nephrotoxicity and associated factors among cancer patients in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(3):1117-1122.
74. Naughton CA. Drug-induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician*. 2008;78:743-50.
75. Tezcan S, Izzettin FV, Sancar M, et al. Nephrotoxicity evaluation in outpatients treated with cisplatin-based chemotherapy using a short hydration method. *Pharmacol Pharmacy*. 2013;4:296-302.
76. Wada Y, Iyoda M, Matsumoto K, Shindo-Hirai Y, Kuno Y, Yamamoto Y, Suzuki T, Saito T, Iseri K, Shibata T. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition with Erlotinib Partially Prevents Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats *Plos One*. 2014;9:1-11.
77. Antunes G, Lusiana M, Darin JD, Bianchi MDL. Effect of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*. 2001;43:1-6.
78. Reem N, El-Naga. Pre-treatment with cardamonin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: impact on NOX-1, inflammation and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;274:87-96.
79. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanism of Cisplatin Nephrotoxicity. 2010;2:2490-2518.
80. Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar, Asas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko, Edisi I, Alih Bahasa oleh Edi Nugroho, Jakarta:Universitas Indonesia Press.
81. Kuhad A, Pilkhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. 2007;55:10150-10155.
82. Ghosh SS, Krieg R, Massey HD, Sica DA, Fakhry I, Ghosh S, Gehr TW, Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. *Renal Physiology—American Journal of Physiology*. 2012;302:439–454.
83. Nasri H, Abedi-Gheshlaghi Z, Rafieian-Kopaei M. Curcumin and kidney protection: current findings and new concept. *Acta Persica Pathophysiol*. 2016;1(1):1-6.
84. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4:118-26.

85. Bhullar KS, Jha A, Youssef D, Rupasinghe HP. Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules*. 2013;18:5389-404.
86. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Tubular kidney protection by antioxidants. *Iran J Public Health*. 2013;42:1194-1196.
87. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol*. 2012;2012:465897.
88. Kim YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK 1 cells and rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29:2436–2441.
89. Li H, Wang X, Li N, Qiu J, Zhang Y & Cao X. hPEBP4 resists TRAIL-induced apoptosis of human prostate cancer cells by activating Akt and deactivating ERK1/2 pathways. *J Biol Chem*. 2007;282:4943–4950.
90. Cagnol S and Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal*. 2010;277:2-21.
91. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:1-7.
92. Nowak, G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J. Biol. Chem.*2002;277:43377-43388.
93. Zeneida HP, Norbert G and Harsh D. A comprehensive review on the genetic regulation of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Current Genomics*. 2016;17:279-293.
94. Bee J T and Gigi N.C. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and ERK activation in triptolide-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*. 2013;42:1605-1612.
95. Jo SK, Cho WY, Sung SA, Kim HK, and Won NH. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int*. 2005;67:458–466.
96. Kim YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK 1 cells and rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29:2436–2441.
97. Alasubramanyam M, Koteswari A, Kumar R, Monickaraj S, Maheswari J, Ohan V. Curcumin induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J. Biosci*. 2003;28:715–721.
98. Nasri H, Abedi-Gheslaghi Z, Rafieian-Kopaei M. Curcumin and kidney protection: current findings and new concepts. *Acta Persica Pathophysiologicala*. 2016;1(1):1-6.
99. Kazim Sahin & Cemal Orhan & Mehmet Tuzcu & Irfana Muqbil & Nurhan Sahin & Hasan Gencoglu & Osman Guler & Subhash B. Padhye & Fazlul H. Sarkar & Ramzi M. Mohammad. Comparative In Vivo Evaluations of Curcumin and Its Analog Difluorinated Curcumin Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Biol Trace Elem Res*. 2014;157:156–163.
100. Wei Yu, Jiliang Wu, Fei Cai, Jizhou Xiang, Wenliang Zha, Dan Fan, Shuang Guo, Zhangyin Ming, Chao Liu. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *Plos One*. 2012;7:1-11.
101. Ghosh SS, Krieg R, Massey HD, Sica DA, Fakhry I, Ghosh S, Gehr TW, Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. *Renal Physiology—American Journal of Physiology*. 2012;302:439–454.
102. Lavoie S, Chen Y, Dalton T.P, Gysin R, Cuénod M, Steullet P, K.Q, D.O. Curcumin, quercetin, and Tbhq modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *Journal of Neurochemistry*. 2009;108:1410–1422.
103. Waseem M, Parvez S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: modulatory role of curcumin. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;53:334-342.

104. Kim YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK 1 cells and rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29:2436–2441.

Lampiran 1

Persetujuan Kaji Etik

UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236,
F 62 21 3912477, 31930372, 3157288,
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor : 536 /UN2.F1/ETIK/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Evaluasi Efek Nefroproteksi Kurkumin dan Nanokurkumin pada Tikus dengan Nefrotoksisitas Akibat Pemberian Cisplatin Melalui Jalur Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)".

Peneliti Utama : dr. Vivian Soetikno, SpFK, PhD
Principal Investigator

Nama Institusi : Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.

** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini ethical approval harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2

Perhitungan Parameter Penelitian

1. Perhitungan kadar BUN dalam urin dan plasma

Kadar BUN dalam sampel urin dan plasma diperoleh dari rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar urea (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)}$$

$$\text{Kadar BUN (mg/dl)} = \text{Kadar urea} / 2.14$$

dimana:

$$\Delta A \text{ sampel} = (\text{Absorbansi 1} - \text{Absorbansi 2}) \text{ sampel}$$

$$\Delta A \text{ standar} = (\text{Absorbansi 1} - \text{Absorbansi 2}) \text{ standar}$$

$$\text{Konsentrasi standar} = 50 \text{ mg/dL}$$

Contoh perhitungan kadar urea dalam urin:

Pada pengukuran salah satu sampel urin dari kelompok Kurkumin100 diperoleh hasil absorbansi sampel, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.8165 dan absorbansi 2 sebesar 0.8013. Nilai absorbansi standar urea yang diperoleh, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.8351 dan absorbansi 2 sebesar 0.8109.

$$\begin{aligned} \text{Kadar urea dalam urin (mg/dL)} &= \\ \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)} &= \end{aligned}$$

$$= \frac{(0.8165 - 0.8013)}{(0.8351 - 0.8109)} \times 50 \text{ mg/dL}$$

$$= 25.826 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Kadar BUN dalam urin (mg/dL)} = \text{Kadar urea (mg/dL)} \times 0.467$$

$$= 25.826 \times 0.467$$

$$= 12.061 \text{ mg/dL}$$

Contoh perhitungan kadar urea dalam plasma:

Pada pengukuran salah satu sampel plasma dari kelompok Kurkumin100 diperoleh hasil absorbansi sampel, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.8502 dan absorbansi 2 sebesar 0.8268. Nilai absorbansi standar urea yang diperoleh, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.8184 dan absorbansi 2 sebesar 0.7917.

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar urea dalam plasma (mg/dL)} &= \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)} \\
 &= \frac{(0.8502 - 0.8268)}{(0.8184 - 0.7917)} \times 50 \text{ mg/dL} \\
 &= 43.82 \text{ mg/dL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar BUN dalam plasma (mg/dL)} &= \text{Kadar urea (mg/dL)} \times 0.467 \\
 &= 43.82 \times 0.467 \\
 &= 20.464 \text{ mg/dL}
 \end{aligned}$$

2. Perhitungan kadar kreatinin dalam urin dan plasma

Kadar kreatinin dalam sampel urin dan plasma diperoleh dari rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar kreatinin (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)}$$

dimana:

$$\Delta A \text{ sampel} = (\text{Absorbansi 2} - \text{Absorbansi 1}) \text{ sampel}$$

$$\Delta A \text{ standar} = (\text{Absorbansi 2} - \text{Absorbansi 1}) \text{ standar}$$

$$\text{Konsentrasi standar} = 2 \text{ mg/dL}$$

Contoh perhitungan kadar kreatinin dalam urin:

Pada pengukuran salah satu sampel urin dari kelompok Kurkumin100 diperoleh hasil absorbansi sampel, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.2317 dan absorbansi 2 sebesar 0.2399. Nilai absorbansi standar kreatinin yang diperoleh, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.1561 dan absorbansi 2 sebesar 0.1683.

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar kreatinin (mg/dL)} &= \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)} \\
 &= \frac{(0.2399 - 0.2317)}{(0.1683 - 0.1561)} \times 2 \text{ mg/dL} \\
 &= 67.213 \text{ mg/dL}
 \end{aligned}$$

Contoh perhitungan kadar kreatinin dalam plasma:

Pada pengukuran salah satu sampel plasma dari kelompok Kurkumin100 diperoleh hasil absorbansi sampel, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.2672 dan

absorbansi 2 sebesar 0.2745. Nilai absorbansi standar kreatinin yang diperoleh, yaitu absorbansi 1 sebesar 0.1602 dan absorbansi 2 sebesar 0.1752.

$$\begin{aligned} \text{Kadar kreatinin (mg/dL)} &= \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)} \\ &= \frac{(0.2745 - 0.2672)}{(0.1752 - 0.1602)} \times 2 \text{ mg/dL} \\ &= 0.973 \text{ mg/dL} \end{aligned}$$

3. Perhitungan kreatinin klirens

Klirens kreatinin (mL/menit) pada sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(\text{Kadar kreatinin dalam urin} \times \text{volume urin 24 jam})}{(\text{kadar kreatinin dalam plasma} \times t)}$$

dimana:

t : waktu (1440 menit)

Contoh perhitungan:

Pada pengukuran salah satu sampel dari kelompok Kurkumin100 diperoleh kadar kreatinin dalam urin dan plasma berturut-turut sebesar 50 mg/dL dan 0.973 mg/dL, dengan volume urinya sebesar 8 mL.

Klirens kreatinin (mL/menit):

$$\begin{aligned} &\frac{(\text{Kadar kreatinin dalam urin} \times \text{volume urin 24 jam})}{(\text{kadar kreatinin dalam plasma} \times t)} \\ &= \\ &\frac{(50 \text{ mg/dl} \times 8 \text{ mL})}{(0.973 \text{ mg/dL} \times 1440 \text{ menit})} = 0.285 \text{ mL/menit} \end{aligned}$$

4. Perhitungan kadar protein homogenat ginjal

Kadar protein diperoleh dari hasil ekstrapolasi absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar BSA. Persamaan linier kurva standar sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

dimana:

y = nilai absorbansi standar BSA

x = kadar standar BSA (mg/mL)

a = *intercept* kurva standar BSA

b = *slope* kurva standar BSA

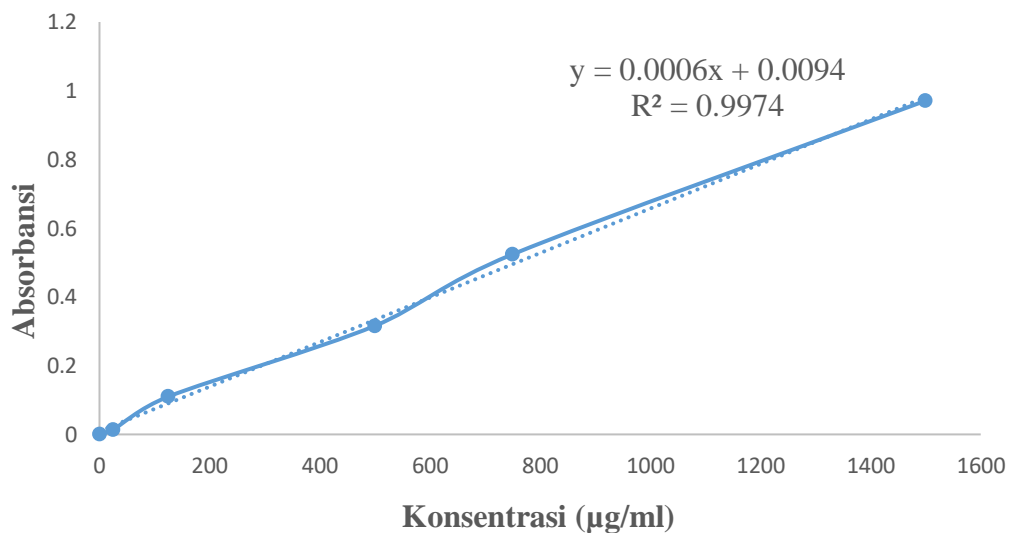
Perhitungan kadar protein dalam sampel yaitu:

$$\text{Kadar protein (mg/mL)} = x \cdot F_p$$

dimana:

- x = kadar protein sampel berdasarkan kurva standar (mg/mL)
 Fp = faktor pengenceran sampel

Contoh kurva standar protein:



Contoh perhitungan:

Pada pengukuran salah satu sampel kelompok Kurkumin100 diperoleh hasil absorbansi sebesar 0.486

$$y = 0.0006x + 0.0094$$

$$0.486 = 0.0006x + 0.0094$$

$$x = \frac{(0.486 - 0.0094)}{0.0006}$$

$$x = 794.333 \mu\text{g/mL} = 0.794333 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Kadar protein (mg/mL)} = x \cdot F_p$$

$$\text{Kadar protein} = 0.794333 \text{ mg/mL} \times 100$$

$$\text{Kadar protein} = 79.433 \text{ mg/mL}$$

5. Perhitungan kadar MDA homogenat ginjal

Kadar MDA dihitung berdasarkan ekstrapolasi absorbansi sampel terhadap persamaan kurva standar MDA (1,1,3,3-TEMP). Persamaan linier kurva standar MDA sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

dimana:

- y = nilai absorbansi standar MDA
- x = kadar standar MDA (nmol/mL)
- a = *intercept* kurva standar MDA
- b = *slope* kurva standar MDA

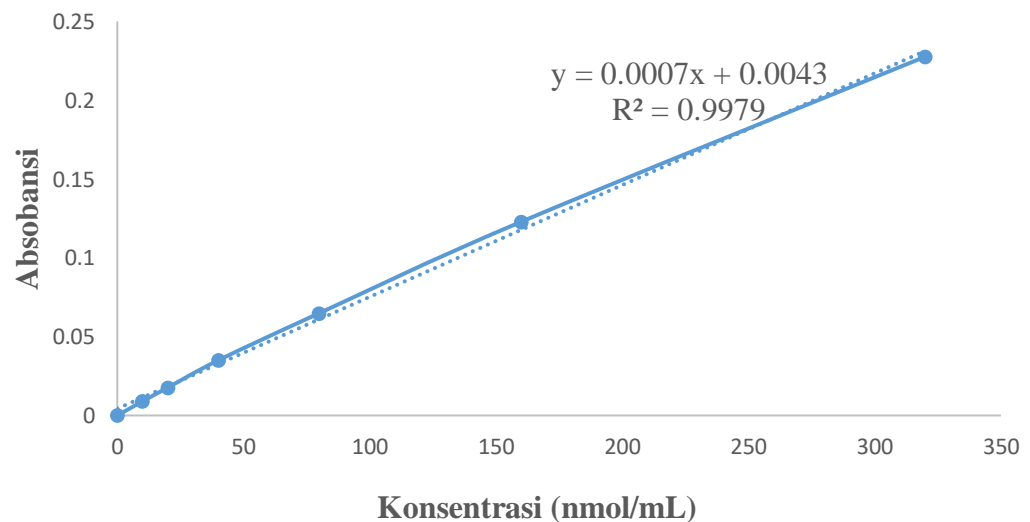
Perhitungan kadar MDA dalam sampel:

$$\text{Kadar MDA (nmol/mg protein)} = \frac{x \cdot F_p}{C_p}$$

dimana:

- x = kadar MDA berdasarkan kurva standard (nmol/mL)
- F_p = faktor pengenceran sampel
- C_p = kadar protein sampel (mg/mL)

Contoh kurva standar MDA:



Contoh perhitungan:

Pada pengukuran salah satu sampel kelompok Kurkumin100 diperoleh absorbansi sampel sebesar 0.1551, sehingga :

$$y = 0.0007x + 0.0043$$

$$0.1551 = 0.0007x + 0.0043$$

$$x = \frac{(0.1551 - 0.0043)}{0.0007}$$

$$x = 215.429 \text{ nmol}/200 \text{ }\mu\text{L} = 1077.143 \text{ nmol}/\text{mL}$$

$$\text{Kadar protein} = 79.433 \text{ mg}/\text{mL}$$

$$\text{Pengenceran} = 1x$$

$$\text{Kadar MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{1077.143 \text{ nmol}/\text{mL} \times 1}{79.433 \text{ mg}/\text{mL}}$$

$$\text{Kadar MDA} = 13.56 \text{ nmol}/\text{mg protein}$$

6. Perhitungan kadar GSH homogenat ginjal

Kadar GSH dihitung berdasarkan ekstrapolasi absorbansi sampel terhadap persamaan kurva standar GSH. Persamaan linier kurva standar MDA sebagai berikut:

$$y = a + bx, \text{ dimana:}$$

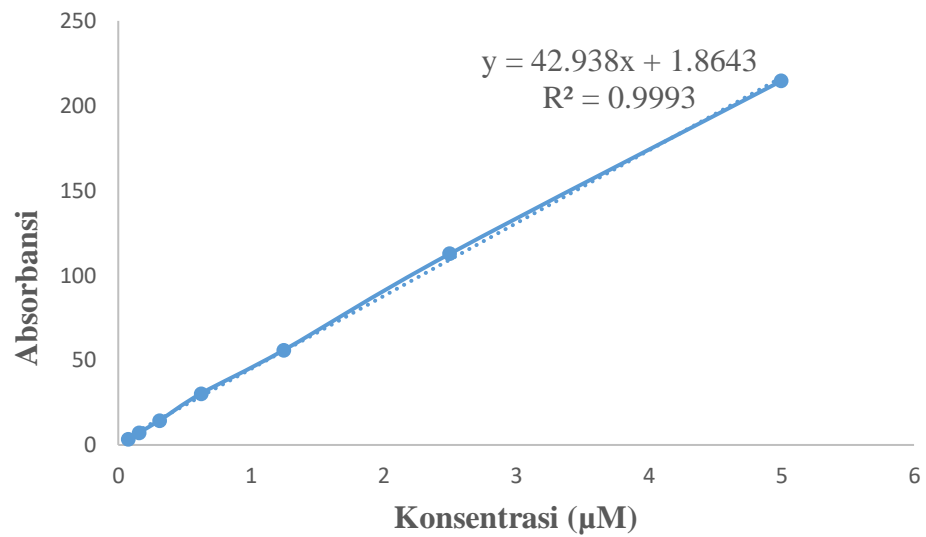
$$y = \text{nilai absorbansi standar GSH}$$

$$x = \text{konsentrasi standar GSH } (\mu\text{M})$$

$$a = \textit{intercept} \text{ kurva standar GSH}$$

$$b = \textit{slope} \text{ kurva standar GSH}$$

Contoh kurva standar GSH:



Contoh perhitungan kadar GSH dalam homogenate ginjal :

Pada pengukuran salah satu sampel kelompok Kurkumin100 diperoleh absorbansi sampel sebesar 163.799, sehingga:

$$y = a + bx$$

$$163.799 = 42.938x + 1.8643$$

$$x = \frac{(163.799 - 1.8643)}{42.938}$$

$$x = 3.771 \mu\text{M}$$

7. Perhitungan tingkat ekspresi mRNA Bax dan BCL-2

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ housekeeping gene}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ kelompok perlakuan} - \Delta Ct \text{ kelompok normal}$$

a) $\Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok normal} = Ct \text{ BCL-2} - Ct \text{ beta-actin}$

$$\Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok normal} = 32.641 - 27.890 = 4.751$$

b) $\Delta Ct \text{ Bax kelompok normal} = Ct \text{ Bax} - Ct \text{ beta-actin}$

$$\Delta Ct \text{ Bax kelompok normal} = 32.388 - 27.890 = 4.499$$

c) $\Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok KURKU100} = Ct \text{ BCL-2} - Ct \text{ beta-actin}$

$$\Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok KURKU100} = 29.225 - 27.067 = 2.158$$

d) $\Delta Ct \text{ Bax kelompok KURKU100} = Ct \text{ BCL-2} - Ct \text{ beta-actin}$

$$\Delta Ct \text{ Bax kelompok KURKU100} = 29.781 - 27.067 = 2.714$$

e) $\Delta\Delta Ct \text{ BCL-2} = \Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok KURKU100} - \Delta Ct \text{ BCL-2 kelompok normal}$

$$\Delta\Delta Ct \text{ BCL-2} = 2.158 - 4.751 = -2.593$$

$$\text{Tingkat ekspresi mRNA BCL-2} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-2.593)} = 6.034$$

f) $\Delta\Delta Ct \text{ Bax} = \Delta Ct \text{ Bax kelompok KURKU100} - \Delta Ct \text{ Bax kelompok normal}$

$$\Delta\Delta Ct \text{ Bax} = 2.714 - 4.499 = -1.785$$

$$\text{Tingkat ekspresi mRNA Bax} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-1.785)} = 3.446$$

Lampiran 3

Data Hasil Pengukuran

1. Data Berat Badan Hewan Uji

Hari ke-	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR10 0	CIS+NANOKUR5 0
1	155	165.5	166.333	158.333	160.333
2	163.330	166.33	166	163	163.333
3	165.333	166.5	167	165.333	166
4	166.670	174	171	172	167
5	171.667	173.333	172	172.333	171
6	175.167	173.5	173.333	173.333	172.667
7	173	169.5	176.333	179.667	174.667
8	179.167	170	179.333	178.333	178
9	181.333	167	176.857	176	177.333
10	178	172	176.667	169.667	176
Rerata	170.883	169.816	172.486	170.800	170.633
SD	8.324	3.381	4.899	7.234	6.230

2. Data rasio berat organ ginjal dan berat badan tikus

Kelompok		Ginjal (gram)		BB (gram)	Ginjal/BB x 100%		Rerata		SD	
		Kanan	Kiri		Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
Normal	1	1.36	1.19	170	0.8	0.7	1.320	1.215	0.041	0.079
	2	1.27	1.14	168	0.756	0.679				
	3	1.27	1.11	162	0.784	0.685				
	4	1.35	1.28	192	0.703	0.667				
	5	1.35	1.28	176	0.767	0.727				
	6	1.32	1.29	200	0.660	0.645				
CIS	1	1.35	1.3	182	0.742	0.714	1.370	1.275	0.040	0.043
	2	1.33	1.28	186	0.715	0.688				
	3	1.38	1.21	160	0.863	0.756				
	4	1.4	1.24	192	0.729	0.646				
	5	1.43	1.33	156	0.917	0.853				
	6	1.33	1.29	158	0.842	0.816				
CIS+KUR100	1	1.37	1.25	184	0.745	0.679	1.342	1.245	0.052	0.079
	2	1.39	1.22	190	0.732	0.642				
	3	1.26	1.11	164	0.768	0.677				
	4	1.39	1.35	170	0.818	0.794				
	5	1.31	1.28	178	0.736	0.719				
	6	1.33	1.26	174	0.764	0.724				
CIS+NANOKUR50	1	1.48	1.28	150	0.987	0.853	1.370	1.252	0.076	0.074
	2	1.28	1.12	174	0.736	0.644				
	3	1.41	1.25	174	0.810	0.718				
	4	1.37	1.33	184	0.745	0.723				
	5	1.39	1.3	196	0.709	0.663				
	6	1.29	1.23	178	0.725	0.691				
CIS+NANOKUR100	1	1.37	1.21	166	0.825	0.729	1.372	1.280	0.087	0.110
	2	1.35	1.25	170	0.794	0.735				
	3	1.39	1.22	168	0.827	0.726				
	4	1.25	1.2	170	0.735	0.706				
	5	1.35	1.31	160	0.844	0.819				
	6	1.52	1.49	184	0.826	0.810				

3. Data Kadar BUN dalam urin

No	Kadar BUN Urin(mg/dL)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	3.667	6.658	10.710	5.017	9.455
2	11.385	9.359	19.008	4.631	8.105
3	22.192	4.535	12.061	12.543	7.236
4	2.887	5.445	12.211	4.785	14.604
5	2.723	1.650	8.911	20.870	2.145
6	14.515	2.489	10.561	5.116	3.630
Rerata	9.562	5.023	12.243	8.827	7.529
SD	7.918	2.817	3.524	6.650	4.436

4. Data kadar BUN dalam plasma

No	Kadar BUN Plasma (mg/dL)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR100	CIS+NANOKUR50
1	13.118	43.639	20.464	106.256	48.624
2	14.429	90.339	9.759	17.053	26.236
3	13.468	107.917	16.791	137.738	36.555
4	15.741	112.639	67.076	95.848	15.042
5	19.502	123.047	54.745	18.715	54.833
6	22.738	89.902	81.856	49.935	79.670
Rerata	16.499	94.580	41.782	70.924	43.493
SD	3.832	28.104	30.061	49.804	22.887

5. Kadar Kreatinin dalam Urin

No	Kadar Kreatinin dalam Urin (mg/dL)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR 50	CIS+NANOKUR1 00
1	59.836	40.983	58.196	49.18	46.721
2	63.114	73.77	122.131	44.262	75.409
3	84.426	75.409	67.213	160.655	63.114
4	57.377	68.032	69.672	35.245	120.491
5	18.852	18.852	50	163.934	37.705
6	111.475	15.573	127.049	57.377	44.262
Rerata	65.84667	48.76983	82.37683	85.10883	64.617
SD	30.8252	27.43511	33.46737	60.2253	30.65772

6. Kadar Kreatinin dalam plasma

No	Kadar Kreatinin dalam plasma (mg/dL)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	0.586	0.866	0.746	1.226	1.026
2	0.64	1.16	0.786	0.72	0.946
3	0.706	1.453	0.88	1.56	1.08
4	0.493	2.186	1.413	1.173	0.733
5	0.52	1.586	0.973	0.746	1.08
6	0.64	1.346	0.973	0.64	1.253
Rerata	0.598	1.433	0.962	1.011	1.020
SD	0.081	0.446	0.240	0.365	0.173

7. Data Kadar Protein Homogenat Ginjal

No	Kadar Protein (mg/mL)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	78.267	77.433	73.1	78.6	77.433
2	80.1	77.767	78.433	79.433	78.1
3	76.433	77.433	76.933	78.6	77.433
4	77.267	77.433	79.433	79.433	78.933
5	77.767	78.1	76.6	79.433	77.433
6	77.267	77.267	76.933	78.933	77.433
Rerata	77.850	77.572	76.905	79.072	77.794
SD	1.259	0.306	2.159	0.414	0.618

8. Data Kadar MDA Homogenat Ginjal

No	Kadar MDA (nmol/mg protein)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	6.699	14.695	11.038	13.977	15.036
2	6.835	14.692	11.076	13.812	15.063
3	7.579	14.778	12.331	13.45	13.957
4	13.377	16.051	13.56	12.571	14.37
5	14.393	14.341	14.237	12.454	12.758
6	14.19	13.811	14.419	12.569	12.204
Rerata	10.512	14.728	12.777	13.139	13.898
SD	3.833	0.741	1.520	0.688	1.187

9. Data Kadar GSH Homogenat Ginjal

No	Kadar GSH (μM)				
	Kelompok				
	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	4.586	3.294	3.636	3.913	3.701
2	3.955	3.583	3.483	3.657	3.848
3	3.957	3.965	3.771	3.606	3.811
4	3.785	3.438	3.75	3.615	3.711
5	3.995	3.746	3.543	4.037	3.892
6	3.401	4.072	4.372	4.253	4.177
Rerata	3.947	3.683	3.759	3.847	3.857
SD	0.383	0.302	0.320	0.265	0.174

10. Data Rasio protein P-ERK/ERK pada jaringan ginjal

No	Normal	CIS	CIS+KUR100	CIS+NANOKUR50	CIS+NANOKUR100
1	0.733	1.696	0.863	0.756	0.758
2	0.634	1.136	0.723	1.608	0.690
3	0.729	1.589	0.648	0.583	0.752
4	0.731	1.284	0.619	0.642	0.674
Rerata	0.707	1.426	0.713	0.897	0.719
SD	0.049	0.261	0.109	0.479	0.043

11. Data Tingkat Ekspresi mRNA gen Bax dan BCL-2

Kelompok	No	Ekspresi Bax	Ekspresi BCL-2	Rasio BCL-2/Bax
Normal	1	1	1	1
	2	1	1	1
	3	1	1	1
	4	1	1	1
	5	1	1	1
	6	1	1	1
Rerata		1	1	1
SD		0	0	0
Cisplatin	1	9.292	4.102	0.442
	2	8.427	4.329	0.514
	3	8.225	5.374	0.653
	4	8.025	4.499	0.561
	5	8.131	5.493	0.675
	6	9.710	4.011	0.413
Rerata		8.635	4.635	0.543
SD		0.696	0.643	0.108
CMN100	1	3.959	8.462	2.138
	2	4.081	9.350	2.291
	3	4.807	8.580	1.785
	4	5.374	8.462	1.575
	5	5.428	9.432	1.737
	6	5.470	8.157	1.491
Rerata		4.853	8.740	1.836
SD		0.690	0.524	0.315
NC100	1	7.295	10.830	1.485
	2	6.774	9.788	1.445
	3	8.770	10.095	1.151
	4	7.025	8.923	1.270
	5	6.873	10.211	1.486
	6	7.690	10.932	1.422
Rerata		7.405	10.130	1.376
SD		0.746	0.737	0.136
NC50	1	9.710	9.754	1.005
	2	7.561	10.748	1.422
	3	9.292	11.039	1.188
	4	8.751	11.612	1.327

	5	8.991	11.100	1.235
	6	9.085	11.753	1.294
Rerata		8.898	11.001	1.245
SD		0.731	0.717	0.142

Lampiran 4

Perhitungan statistik data hasil pengukuran

1. Analisis Statistik Berat Badan

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat Badan 10 hari perlakuan	Normal	.139	10	.200 [*]	.955	10	.725
	CIS	.199	10	.200 [*]	.889	10	.164
	CIS+KUR100	.186	10	.200 [*]	.913	10	.300
	CIS+NANOKUR100	.170	10	.200 [*]	.955	10	.733
	CIS+NANOKUR50	.143	10	.200 [*]	.935	10	.495

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Berat Badan	Based on Mean	2.120	4	45	.094
	Based on Median	1.528	4	45	.210
	Based on Median and with adjusted df	1.528	4	31.362	.218
	Based on trimmed mean	1.972	4	45	.115

ANOVA

Berat Badan selama 10 hari perlakuan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38.811	4	9.703	.260	.902
Within Groups	1681.889	45	37.375		
Total	1720.700	49			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Berat Badan
Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	1.10040	2.73406	.994	-6.6683	8.8691
	CIS+KUR100	-1.61890	2.73406	.976	-9.3876	6.1498
	CIS+NANOKUR100	.06680	2.73406	1.000	-7.7019	7.8355
	CIS+NANOKUR50	.23340	2.73406	1.000	-7.5353	8.0021
CIS	Normal	-1.10040	2.73406	.994	-8.8691	6.6683
	CIS+KUR100	-2.71930	2.73406	.856	-10.4880	5.0494
	CIS+NANOKUR100	-1.03360	2.73406	.996	-8.8023	6.7351
	CIS+NANOKUR50	-.86700	2.73406	.998	-8.6357	6.9017
CIS+KUR100	Normal	1.61890	2.73406	.976	-6.1498	9.3876
	CIS	2.71930	2.73406	.856	-5.0494	10.4880
	CIS+NANOKUR100	1.68570	2.73406	.972	-6.0830	9.4544
	CIS+NANOKUR50	1.85230	2.73406	.960	-5.9164	9.6210
CIS+NANOKUR100	Normal	-.06680	2.73406	1.000	-7.8355	7.7019
	CIS	1.03360	2.73406	.996	-6.7351	8.8023
	CIS+KUR100	-1.68570	2.73406	.972	-9.4544	6.0830
	CIS+NANOKUR50	.16660	2.73406	1.000	-7.6021	7.9353
CIS+NANOKUR50	Normal	-.23340	2.73406	1.000	-8.0021	7.5353
	CIS	.86700	2.73406	.998	-6.9017	8.6357
	CIS+KUR100	-1.85230	2.73406	.960	-9.6210	5.9164
	CIS+NANOKUR100	-.16660	2.73406	1.000	-7.9353	7.6021

2. Analisis Statistik Rasio Berat Ginjal dan Berat Badan

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio Ginjal Kiri/BB	Normal	.170	6	.200*	.949	6	.728
	CIS	.158	6	.200*	.966	6	.862
	CIS+KUR100	.199	6	.200*	.942	6	.677
	CIS+NANOKUR50	.292	6	.120	.860	6	.189
	CIS+NANOKUR100	.322	6	.051	.819	6	.086

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio Ginjal Kiri/BB	Based on Mean	1.517	4	25	.228
	Based on Median	1.244	4	25	.318
	Based on Median and with adjusted df	1.244	4	18.230	.327

Rasio Berat Ginjal Kanan/BB**Uji Normalitas**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio Ginjal Kanan/BB	Normal	.149	6	.200*	.980	6	.951
	CIS	.222	6	.200*	.913	6	.455
	CIS+KUR100	.240	6	.200*	.865	6	.208
	CIS+NANOKUR50	.317	6	.060	.755	6	.022
	CIS+NANOKUR100	.329	6	.042	.810	6	.072

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio Ginjal Kanan/BB	Based on Mean	3.328	4	25	.026
	Based on Median	1.558	4	25	.216
	Based on Median and with adjusted df	1.558	4	8.878	.267
	Based on trimmed mean	2.971	4	25	.039

Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank
Rasio Ginjal Kanan/BB	Normal	6	13.83
	CIS	6	16.50
	CIS+KUR100	6	13.17
	CIS+NANOKUR50	6	13.33
	CIS+NANOKUR100	6	20.67
	Total	30	

Uji Statistik^b

Rasio Ginjal Kanan/BB	
Chi-Square	3.147
df	4
Asymp. Sig.	.534

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Uji Non-Parametrik Post-Hoc Analisis: Mann-Whitney**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rasio Ginjal Kanan/BB	Normal	6	6.00	36.00
	CIS	6	7.00	42.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	Rasio Ginjal Kanan/BB
Mann-Whitney U	15.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-.480
Asymp. Sig. (2-tailed)	.631
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rasio Ginjal Kanan/BB	CIS	6	6.83	41.00
	CIS+KUR100	6	6.17	37.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	Rasio Ginjal Kanan/BB
Mann-Whitney U	16.000
Wilcoxon W	37.000
Z	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 ^b

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rasio Ginjal Kanan/BB	CIS	6	6.67	40.00
	CIS+NANOKUR 50	6	6.33	38.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	Rasio Ginjal Kanan/BB
Mann-Whitney U	17.000
Wilcoxon W	38.000
Z	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rasio Ginjal Kanan/BB	CIS	6	6.50	39.00
	CIS+NANOKUR100	6	6.50	39.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	Rasio Ginjal Kanan/BB
Mann-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	39.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

3. Analisis statistik kadar BUN dalam urin**Uji Normalitas**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BUN Urin (mg/dL)	Normal	.272	6	.189	.865	6	.206
	CIS	.149	6	.200*	.971	6	.898
	CIS+KUR100	.337	6	.032	.806	6	.067
	CIS+NANOKUR10 0	.165	6	.007*	.721	6	.010
	CIS+NANOKUR50	.378	6	.200*	.961	6	.827

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BUN Urin (mg/dL)	Based on Mean	2.780	4	25	.049
	Based on Median	1.244	4	25	.318
	Based on Median and with adjusted df	1.244	4	13.572	.339
	Based on trimmed mean	2.582	4	25	.062

Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank
BUN Urin (mg/dL)	Normal	6	15.67
	CIS	6	9.50
	CIS+KUR100	6	22.17
	CIS+NANOKUR100	6	14.17
	CIS+NANOKUR50	6	16.00
	Total	30	

Uji Statistik^{a,b}

	BUN Urin (mg/dL)
Chi-Square	6.387
df	4
Asymp. Sig.	.172

a. Kruskal Wallis Test

Uji Non-Parametrik Post-Hoc Analisis: Mann-Whitney**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN Urin (mg/dl)	Normal	6	7.50	45.00
	CIS	6	5.50	33.00
	Total	12		

Uji Statistik

	BUN Urin (mg/dL)
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN Urin (mg/dL)	CIS	6	3.67	22.00
	CIS+KUR100	6	9.33	56.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN Urin (mg/dL)
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-2.722
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN Urin (mg/dL)	CIS	6	5.50	33.00
	CIS+NANOKUR50	6	7.50	45.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN Urin (mg/dL)
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN Urin (mg/dL)	CIS	6	5.33	32.00
	CIS+NANOKUR100	6	7.67	46.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN Urin (mg/dL)
Mann-Whitney U	11.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-1.121
Asymp. Sig. (2-tailed)	.262
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

4. Analisis statistik kadar BUN dalam plasma**Uji Normalitas**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BUN Plasma (mg/dL)	Normal	.245	6	.200*	.871	6	.229
	CIS	.267	6	.200*	.881	6	.274
	CIS+KUR100	.261	6	.200*	.892	6	.331
	CIS+NANOKUR100	.143	6	.200*	.979	6	.948
	CIS+NANOKUR50	.192	6	.200*	.910	6	.435

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BUN Plasma (mg/dL)	Based on Mean	6.908	4	25	.001
	Based on Median	6.575	4	25	.001
	Based on Median and with adjusted df	6.575	4	16.974	.002
	Based on trimmed mean	6.899	4	25	.001

Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis

Ranks

		Kelompok	N	Mean Rank
BUN PLASMA (mg/dL)	Normal		6	6.17
	CIS		6	24.33
	CIS+KUR100		6	13.17
	CIS+NANOKUR100		6	14.67
	CIS+NANOKUR50		6	19.17
	Total		30	

Uji Statistik^{a,b}

		BUN Plasma
Chi-Square		14.301
df		4
Asymp. Sig.		.006

- a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Kelompok

Uji Non-Parametrik Post-Hoc Analisis: Mann-Whitney

Ranks

		Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN PLASMA (mg/dL)	Normal		6	3.50	21.00
	CIS		6	9.50	57.00
	Total		12		

Uji Statistik^a

		BUN PLASMA (mg/dL)
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		21.000
Z		-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)		.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.002 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN PLASMA (mg/dL)	CIS	6	9.00	54.00
	CIS+KUR100	6	4.00	24.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN PLASMA (mg/dL)
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN PLASMA (mg/dL)	CIS	6	9.00	54.00
	CIS+NANOKUR 100	6	4.00	24.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN PLASMA (mg/dL)
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BUN PLASMA (mg/dL)	CIS	6	7.33	44.00
	CIS+NANOKU R50	6	5.67	34.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	BUN PLASMA (mg/dL)
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 ^b

5. Analisis statistik kadar kreatinin dalam urin**Uji Normalitas**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Log_Kreatinin urin	Normal	.325	6	.047	.858	6	.181
	CIS	.266	6	.200*	.827	6	.102
	CIS+KUR100	.270	6	.194	.869	6	.221
	CIS+NANOKUR100	.215	6	.200*	.935	6	.617
	CIS+NANOKUR50	.282	6	.148	.823	6	.094

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Log_Kreatinin Urin	Based on Mean	1.057	4	25	.398
	Based on Median	.563	4	25	.692
	Based on Median and with adjusted df	.563	4	20.233	.692
	Based on trimmed mean	1.014	4	25	.419

ANOVA

Log_Kreatinin Urin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.269	4	.067	1.077	.389
Within Groups	1.562	25	.062		
Total	1.831	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Log_Kreatinin Urin
Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	.154415	.144301	.820	-.26938	.57821
	CIS+KUR100	-.123389	.144301	.910	-.54718	.30040
	CIS+NANOKUR100	-.010935	.144301	1.000	-.43473	.41286
	CIS+NANOKUR50	-.079897	.144301	.980	-.50369	.34390
CIS	Normal	-.154415	.144301	.820	-.57821	.26938
	CIS+KUR100	-.277804	.144301	.331	-.70160	.14599
	CIS+NANOKUR100	-.165349	.144301	.781	-.58914	.25844
	CIS+NANOKUR50	-.234311	.144301	.497	-.65810	.18948
CIS+KUR100	Normal	.123389	.144301	.910	.30040	.54718
	CIS	.277804	.144301	.331	.14599	.70160
	CIS+NANOKUR100	.112454	.144301	.934	.31134	.53625
	CIS+NANOKUR50	.043492	.144301	.998	.38030	.46729
CIS+NANOKUR100	Normal	.010935	.144301	1.000	.41286	.43473
	CIS	.165349	.144301	.781	.25844	.58914
	CIS+KUR100	-.112454	.144301	.934	-.53625	.31134
	CIS+NANOKUR50	-.068962	.144301	.989	-.49276	.35483
CIS+NANOKUR50	Normal	.079897	.144301	.980	.34390	.50369
	CIS	.234311	.144301	.497	.18948	.65810
	CIS+KUR100	-.043492	.144301	.998	-.46729	.38030
	CIS+NANOKUR100	.068962	.144301	.989	.35483	.49276

6. Analisis statistik kadar kreatinin dalam plasma

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kreatinin Plasma (mg/dL)	Normal	.201	6	.200*	.948	6	.725
	CIS	.199	6	.200*	.961	6	.830
	CIS+KUR100	.315	6	.064	.832	6	.112
	CIS+NANOKUR100	.197	6	.200*	.950	6	.741
	CIS+NANOKUR50	.266	6	.200*	.893	6	.332

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kreatinin Plasma (mg/dL)	Based on Mean	2.581	4	25	.062
	Based on Median	2.458	4	25	.072
	Based on Median and with adjusted df	2.458	4	13.189	.097
	Based on trimmed mean	2.575	4	25	.062

ANOVA

Kreatinin Plasma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.107	4	.527	6.180	.001
Within Groups	2.131	25	.085		
Total	4.237	29			

Post Hoc Test

Multiple Comparison

Kreatinin Plasma
Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	-.835233 [*]	.168548	.000	-1.33024	-.34023
	CIS+KUR100	-.364233	.168548	.227	-.85924	.13077
	CIS+NANOKUR100	-.422067	.168548	.122	-.91707	.07294
	CIS+NANOKUR50	-.413233	.168548	.135	-.90824	.08177
CIS	Normal	.835233 [*]	.168548	.000	.34023	1.33024

	CIS+KUR100	.471000	.168548	.068	-.02400	.96600
	CIS+NANOKUR100	.413167	.168548	.135	-.08184	.90817
	CIS+NANOKUR50	.422000	.168548	.122	-.07300	.91700
CIS+KUR100	Normal	.364233	.168548	.227	-.13077	.85924
	CIS	-.471000	.168548	.068	-.96600	.02400
	CIS+NANOKUR100	-.057833	.168548	.997	-.55284	.43717
	CIS+NANOKUR50	-.049000	.168548	.998	-.54400	.44600
CIS+NANOKUR 100	Normal	.422067	.168548	.122	-.07294	.91707
	CIS	-.413167	.168548	.135	-.90817	.08184
	CIS+KUR100	.057833	.168548	.997	-.43717	.55284
	CIS+NANOKUR50	.008833	.168548	1.000	-.48617	.50384
CIS+NANOKUR 50	Normal	.413233	.168548	.135	-.08177	.90824
	CIS	-.422000	.168548	.122	-.91700	.07300
	CIS+KUR100	.049000	.168548	.998	-.44600	.54400
	CIS+NANOKUR100	-.008833	.168548	1.000	-.50384	.48617

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

7. Analisis Statistik Kreatinin Klirens (CCR)

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CCR	Normal	.173	6	.200*	.974	6	.921
	Cis	.241	6	.200*	.848	6	.151
	Cis+Kur100	.202	6	.200*	.915	6	.473
	Cis+Nanokur50	.307	6	.080	.818	6	.084
	Cis+Nanokur100	.161	6	.200*	.957	6	.795

Uji Homogenitas

CCR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.652	4	25	.193

ANOVA

CCR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.112	4	.028	1.382	.269
Within Groups	.506	25	.020		
Total	.618	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CCR
Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	.188333	.082163	.181	-.05297	.42963
	CIS+KUR100	.085333	.082163	.835	-.15597	.32663
	CIS+NANOKUR 100	.075667	.082163	.886	-.16563	.31697
	CIS+NANOKUR 50	.057833	.082163	.954	-.18347	.29913
CIS	Normal	-.188333	.082163	.181	-.42963	.05297
	CIS+KUR100	-.103000	.082163	.721	-.34430	.13830
	CIS+NANOKUR 100	-.112667	.082163	.651	-.35397	.12863
	CIS+NANOKUR 50	-.130500	.082163	.518	-.37180	.11080
CIS+KUR100	Normal	-.085333	.082163	.835	-.32663	.15597
	CIS	.103000	.082163	.721	-.13830	.34430
	CIS+NANOKUR 100	-.009667	.082163	1.000	-.25097	.23163
	CIS+NANOKUR 50	-.027500	.082163	.997	-.26880	.21380
CIS+NANOKUR 100	Normal	-.075667	.082163	.886	-.31697	.16563
	CIS	.112667	.082163	.651	-.12863	.35397
	CIS+KUR100	.009667	.082163	1.000	-.23163	.25097
	CIS+NANOKUR 50	-.017833	.082163	.999	-.25913	.22347
CIS+NANOKUR 50	Normal	-.057833	.082163	.954	-.29913	.18347
	CIS	.130500	.082163	.518	-.11080	.37180
	CIS+KUR100	.027500	.082163	.997	-.21380	.26880
	CIS+NANOKUR 100	.017833	.082163	.999	-.22347	.25913

8. Analisis statistik kadar MDA homogenat ginjal

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA (nmol/mg protein)	Normal	.278	6	.163	.770	6	.031
	CIS	.306	6	.082	.890	6	.318
	CIS+KUR100	.202	6	.200*	.869	6	.223
	CIS+NANOKUR100	.186	6	.200*	.897	6	.356
	CIS+NANOKUR50	.295	6	.111	.834	6	.117

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MDA (nmol/mg protein)	Based on Mean	38.600	4	25	.000
	Based on Median	33.232	4	25	.000
	Based on Median and with adjusted df	33.232	4	19.874	.000
	Based on trimmed mean	37.707	4	25	.000

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MDA (nmol/mg protein)	30	13.01077	2.330315	6.699	16.051
Kelompok	30	3.0000	1.43839	1.00	5.00

Uji Statistik^{a,b}

	MDA (nmol/mg protein)
Chi-Square	10.348
df	4
Asymp. Sig.	.035

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Uji Non-Parametrik Post-Hoc Analisis: Mann-Whitney

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA (nmol/mg protein)	Normal	6	4.00	24.00
	CIS	6	9.00	54.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	MDA (nmol/mg protein)
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA (nmol/mg protein)	CIS	6	9.00	54.00
	CIS+KUR100	6	4.00	24.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	MDA (nmol/mg protein)
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA (nmol/mg protein)	CIS	6	7.33	44.00
	CIS+NANOKUR100	6	5.67	34.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	MDA (nmol/mg protein)
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA (nmol/mg protein)	CIS	6	9.17	55.00
	CIS+NANOKUR50	6	3.83	23.00
	Total	12		

Uji Statistik^a

	MDA (nmol/mg protein)
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

9. Analisis statistik kadar GSH homogenat ginjal

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GSH (μM)	Normal	.283	6	.145	.917	6	.484
	CIS	.158	6	.200*	.962	6	.837
	CIS+KUR100	.319	6	.057	.811	6	.074
	CIS+NANOKUR100	.253	6	.200*	.856	6	.177
	CIS+NANOKUR50	.262	6	.200*	.878	6	.261

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GSH (μM)	Based on Mean	.436	4	25	.781
	Based on Median	.415	4	25	.796
	Based on Median and with adjusted df	.415	4	16.708	.796
	Based on trimmed mean	.457	4	25	.766

ANOVA

GSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.243	4	.061	.688	.607
Within Groups	2.210	25	.088		
Total	2.453	29			

Multiple Comparisons

GSH

Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	.263500	.171660	.551	-.24064	.76764
	CIS+KUR100	.187333	.171660	.809	-.31681	.69148
	CIS+NANOKUR100	.089833	.171660	.984	-.41431	.59398
	CIS+NANOKUR50	.099667	.171660	.977	-.40448	.60381
CIS	Normal	-.263500	.171660	.551	-.76764	.24064
	CIS+KUR100	-.076167	.171660	.991	-.58031	.42798
	CIS+NANOKUR100	-.173667	.171660	.848	-.67781	.33048
	CIS+NANOKUR50	-.163833	.171660	.873	-.66798	.34031
CIS+KUR100	Normal	-.187333	.171660	.809	-.69148	.31681

	CIS	.076167	.171660	.991	-.42798	.58031
	CIS+NANOKUR100	-.097500	.171660	.979	-.60164	.40664
	CIS+NANOKUR50	-.087667	.171660	.986	-.59181	.41648
CIS+NANOKUR100	Normal	-.089833	.171660	.984	-.59398	.41431
	CIS	.173667	.171660	.848	-.33048	.67781
	CIS+KUR100	.097500	.171660	.979	-.40664	.60164
	CIS+NANOKUR50	.009833	.171660	1.000	-.49431	.51398
CIS+NANOKUR50	Normal	-.099667	.171660	.977	-.60381	.40448
	CIS	.163833	.171660	.873	-.34031	.66798
	CIS+KUR100	.087667	.171660	.986	-.41648	.59181
	CIS+NANOKUR100	-.009833	.171660	1.000	-.51398	.49431
	0					

10. Analisis Statistik Rasio Ekspresi mRNA Gen BCL-2/Bax

Uji Normalitas

	KELOMP	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio BCL-2/Bax	CIS	.180	6	.200*	.930	6	.581
	CIS+KUR100	.231	6	.200*	.920	6	.504
	CIS+NANOKUR100	.298	6	.105	.832	6	.112
	CIS+NANOKUR50	.177	6	.200*	.962	6	.836

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio BCL-2/Bax	Based on Mean	3.796	3	20	.026
	Based on Median	1.915	3	20	.160
	Based on Median and with adjusted df	1.915	3	10.722	.187
	Based on trimmed mean	3.542	3	20	.033

ANOVA

Rasio BCL-2/Bax

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.457	4	1.364	45.496	.000
Within Groups	.750	25	.030		
Total	6.207	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Rasio BCL-2/Bax

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	.457000 [*]	.099979	.001	.16337	.75063
	CIS+KUR100	-.836167 [*]	.099979	.000	-1.12979	-.54254
	CIS+NANOKUR100	-.376500 [*]	.099979	.007	-.67013	-.08287
	CIS+NANOKUR50	-.245167	.099979	.134	-.53879	.04846
CIS	Normal	-.457000 [*]	.099979	.001	-.75063	-.16337
	CIS+KUR100	-1.293167 [*]	.099979	.000	-1.58679	-.99954
	CIS+NANOKUR100	-.833500 [*]	.099979	.000	-1.12713	-.53987
	CIS+NANOKUR50	-.702167 [*]	.099979	.000	-.99579	-.40854
CIS+KUR100	Normal	.836167 [*]	.099979	.000	.54254	1.12979
	CIS	1.293167 [*]	.099979	.000	.99954	1.58679
	CIS+NANOKUR100	.459667 [*]	.099979	.001	.16604	.75329
	CIS+NANOKUR50	.591000 [*]	.099979	.000	.29737	.88463
CIS+NANOKUR100	Normal	.376500 [*]	.099979	.007	.08287	.67013
	CIS	.833500 [*]	.099979	.000	.53987	1.12713
	CIS+KUR100	-.459667 [*]	.099979	.001	-.75329	-.16604
	CIS+NANOKUR50	.131333	.099979	.686	-.16229	.42496
CIS+NANOKUR50	Normal	.245167	.099979	.134	-.04846	.53879
	CIS	.702167 [*]	.099979	.000	.40854	.99579
	CIS+KUR100	-.591000 [*]	.099979	.000	-.88463	-.29737
	CIS+NANOKUR50	-.131333	.099979	.686	-.42496	.16229

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

11. Analisis Statistik Rasio Ekspresi Protein p-ERK/ERK

Tests of Normality

	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
log_ERK	Normal	.660	4	.063
	Cis	.931	4	.599
	Cis+Kur100	.928	4	.584
	Cis+Nanokur50	.825	4	.155
	Cis+Nanokur100	.847	4	.217

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
log_ERK.NEW	Based on Mean	3.821	4	15	.051
	Based on Median	1.449	4	15	.266
	Based on Median and with adjusted df	1.449	4	3.721	.372
	Based on trimmed mean	3.206	4	15	.043

ANOVA

log_ERK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.266	4	.066	6.353	.003
Within Groups	.157	15	.010		
Total	.423	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: log_ERK

Tukey HSD

(I)Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	CIS	-.30016*	.07231	.006	-.5234	-.0769
	CIS+KUR100	-.00114	.07231	1.000	-.2244	.2221
	CIS+NANOKUR 100	-.06604	.07231	.887	-.2893	.1572
	CIS+NANOKUR 50	-.00739	.07231	1.000	-.2307	.2159
CIS	Normal	.30016*	.07231	.006	.0769	.5234
	CIS+KUR100	.29902*	.07231	.007	.0757	.5223

	CIS+NANOKUR 100	.23412*	.07231	.038	.0108	.4574
	CIS+NANOKUR 50	.29277*	.07231	.008	.0695	.5161
CIS+KUR10 0	Normal	.00114	.07231	1.000	-.2221	.2244
	CIS	-.29902*	.07231	.007	-.5223	-.0757
	CIS+NANOKUR 100	-.06490	.07231	.893	-.2882	.1584
	CIS+NANOKUR 50	-.00625	.07231	1.000	-.2295	.2170
CIS+NANO KUR100	Normal	.06604	.07231	.887	-.1572	.2893
	CIS	-.23412*	.07231	.038	-.4574	-.0108
	CIS+KUR100	.06490	.07231	.893	-.1584	.2882
	CIS+NANOKUR 50	.05865	.07231	.923	-.1646	.2819
CIS+NANO KUR50	Normal	.00739	.07231	1.000	-.2159	.2307
	CIS	-.29277*	.07231	.008	-.5161	-.0695
	CIS+KUR100	.00625	.07231	1.000	-.2170	.2295
	CIS+NANOKUR 100	-.05865	.07231	.923	-.2819	.1646

Lampiran 5

SERTIFIKAT KURKUMIN DAN NANOKURKUMIN



Plamed Green Science Limited

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name	Curcumin
Batch Number	PMC150605
Batch Quantity	500KG
Manufacture Date	2015-06-05
Expiration Date	2017-06-04
Inspection Reference	CP2010

ANALYSIS	SPECIFICATION	RESULTS
Assay	Curcuminoids $\geq 95\%$	95.1% HPLC
Organoleptic		
Appearance	Orange Yellow	Complies
Odor	Characteristic	Complies
Taste	Characteristic	Complies
Solubility	Soluble in Ethanol	Complies
Particle Size	NLT100% Through 80 mesh	Complies
Loss on Drying	$\leq 5.0\%$	3.21%
Residue on ignition	≤ 4	0.6
Arsenic (As) mg/kg	≤ 3	Not Detected
Lead mg/kg	≤ 5	Not Detected
Heavy metal (Pb) mg/kg	≤ 40	1.0
Total Plate Count	≤ 1000 cfu/g	Complies
Total Yeast & Mold	≤ 100 cfu/g	Complies
E.Coli	Negative	Negative
Salmonella	Negative	Negative
Staphylococcus	Negative	Negative
Inspection Conclusion	This product is qualified according to the CP2010	

Packing and Storage: Packed in paper drums and two plastic bags inside. Store in well closed container away from moisture



西安品诚生物科技有限公司
Xi'an Pincredit Bio-tech Co.,Ltd

Certificate of Analysis

General Information			
Product Name:	Water soluble curcumin powder	Form	Fine Powder
GMO Status	GMO Free	Produce date	2016-03-02
Specification	Nano	Batch #	PI-CI-150302
Test method	HPLC	Analysis Date	2016-03-07
Representative QTY	120kg	Exp. Date	2018-03-12
Item	Specification	Method	Result
Physical Property			
Appearance	Fine Powder	Organoleptic	Conforms
Color	Yellow Powder	Organoleptic	Conforms
Odor	Characteristic	Organoleptic	Conforms
Mesh Size	Nano size		
General Analysis			
Identification	Identical to R.S. Sample		
Ash	≤5.0%		Conforms
Loss on Drying	≤5.0%		Conforms
Contaminants			
Solvents Residue	Meet Eur.Ph6.0<5.4>	Eur.Ph 6.0<2.4.24>	Conforms
Pesticides Residue	Meet USP32<561>	USP32<561>	Conforms
Lead(Pb)	≤5.0mg/kg	Eur.Ph6.0<2.2.58>ICP-MS	1.03
Arsenic(As)	≤2.0mg/kg	Eur.Ph6.0<2.2.58>ICP-MS	0.85
Cadmium(Cd)	≤1.0mg/kg	Eur.Ph6.0<2.2.58>ICP-MS	0.04
Mercury(Hg)	≤0.1mg/kg	Eur.Ph6.0<2.2.58>ICP-MS	0.03
Microbiological			
Total Plate Count	≤1000cfu/g	USP30<61>	Conforms
Yeast & Mold	≤100cfu/g	USP30<61>	Conforms
E.Coli.	Negative	USP30<62>	Conforms
Salmonella	Negative	USP30<62>	Conforms
Shelf Life	24 months under the conditions below, no antioxidant used		
Package & Storage	Standard packed in fiber-drum and two plastic bags inside Store in a cool, dry place away from Moisture, Light, Oxygen		
Manufacturer	Xi'an Pincredit Bio-tech Co., Ltd.		

QC MANAGER:
Jin Kang

INSPECTOR:
Yang Jian



ANALYST:
Li Meng

Room 22005, Unit 2, Shuzi Building 1, Technology Five Road 8, Hi-tech District, Xi'an, Shaanxi, 710065
T: +86-29-89198270 F: +86-29-89198270 E: pincredit.justin@gmail.com

Lampiran 6

UKURAN PARTIKEL KURKUMIN DAN NANOKURKUMIN

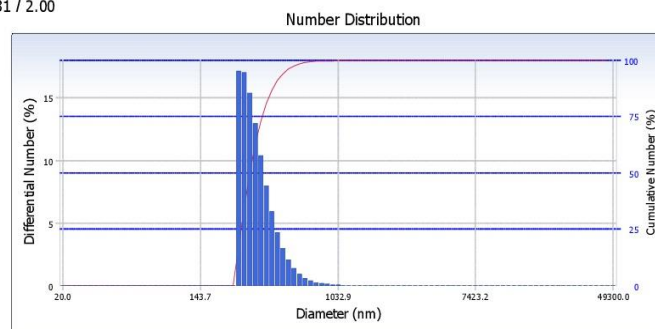


Delsa™ Nano
DelsaNano

Number Distribution S/N :

User : DelsaNano Group : Repetition : 1/1
 Date : 9/14/2016 File Name : SINTA_20160914_123630
 Time : 12:36:30 Sample Information :
 SOP Name : Nanotech Security : Security

Version 2.31 / 2.00



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	331.2	91.0
2	8,651.4	2,162.7
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	339.8	291.2
Residual :	2.348e-002	(N.G)

Cumulants Results

Diameter (d)	: 1723.4	(nm)
Polydispersity Index (P.I.)	: 0.630	
Diffusion Const. (D)	: 2.854e-009	(cm ² /sec)
Measurement Condition		
Temperature	: 25.0	(°C)
Diluent Name	: WATER	
Refractive Index	: 1.3332	
Viscosity	: 0.8878	(cP)
Scattering Intensity	: 12916	(cps)

Number Distribution Table

d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)
20.0	0.0	0.0	143.7	0.0	0.0	1032.9	0.0	99.9	7423.2	0.0	99.9
21.6	0.0	0.0	155.5	0.0	0.0	1117.7	0.0	99.9	8032.5	0.0	100.0
23.4	0.0	0.0	168.3	0.0	0.0	1209.5	0.0	99.9	8691.8	0.0	100.0
25.3	0.0	0.0	182.1	0.0	0.0	1308.7	0.0	99.9	9405.3	0.0	100.0
27.4	0.0	0.0	197.1	0.0	0.0	1416.2	0.0	99.9	10177.3	0.0	100.0
29.7	0.0	0.0	213.2	0.0	0.0	1532.4	0.0	99.9	11012.7	0.0	100.0
32.1	0.0	0.0	230.7	0.0	0.0	1658.2	0.0	99.9	11916.6	0.0	100.0
34.7	0.0	0.0	249.7	17.1	17.1	1794.3	0.0	99.9	12894.8	0.0	100.0
37.6	0.0	0.0	270.2	17.0	34.1	1941.6	0.0	99.9	13953.2	0.0	100.0
40.7	0.0	0.0	292.3	15.4	49.5	2101.0	0.0	99.9	15098.6	0.0	100.0
44.0	0.0	0.0	316.3	13.0	62.5	2273.4	0.0	99.9	16337.9	0.0	100.0
47.6	0.0	0.0	342.3	10.4	72.9	2460.0	0.0	99.9	17679.0	0.0	100.0
51.5	0.0	0.0	370.4	8.0	80.9	2661.9	0.0	99.9	19130.1	0.0	100.0
55.8	0.0	0.0	400.8	5.9	86.8	2880.4	0.0	99.9	20700.4	0.0	100.0
60.4	0.0	0.0	433.7	4.2	91.0	3116.9	0.0	99.9	22399.5	0.0	100.0
65.3	0.0	0.0	469.3	3.0	94.0	3372.7	0.0	99.9	24238.2	0.0	100.0
70.7	0.0	0.0	507.8	2.0	96.0	3649.6	0.0	99.9	26227.7	0.0	100.0
76.5	0.0	0.0	549.5	1.4	97.4	3949.1	0.0	99.9	28380.6	0.0	100.0
82.7	0.0	0.0	594.6	0.9	98.3	4273.3	0.0	99.9	30710.2	0.0	100.0
89.5	0.0	0.0	643.4	0.6	98.9	4624.1	0.0	99.9	33231.0	0.0	100.0
96.9	0.0	0.0	696.2	0.4	99.3	5003.6	0.0	99.9	35958.7	0.0	100.0
104.8	0.0	0.0	753.4	0.2	99.5	5414.3	0.0	99.9	38910.3	0.0	100.0
113.4	0.0	0.0	815.2	0.1	99.7	5858.8	0.0	99.9	42104.2	0.0	100.0
122.8	0.0	0.0	882.2	0.1	99.8	6339.7	0.0	99.9	45560.3	0.0	100.0
132.8	0.0	0.0	954.6	0.1	99.8	6860.1	0.0	99.9	49300.0	0.0	100.0
D (10%) :		241.6 (nm)	D (50%) :		293.2 (nm)	D (90%) :		425.6 (nm)			

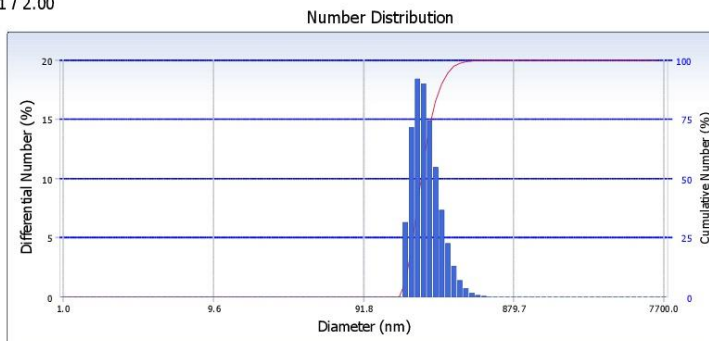
Ukuran Partikel Nanokurkumin



Delsa™ Nano
DelsaNano

Number Distribution		S/N :
User : DelsaNano	Group :	Repetition : 1/1
Date : 9/14/2016	File Name : SINTA_20160914_114958	
Time : 11:49:58	Sample Information :	
SOP Name : Nanotech		Security : Security

Version 2.31 / 2.00



Distribution Results (Contin)			Cumulants Results		
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	Diameter (d)		(nm)
1	240.7	53.5	Polydispersity Index (P.I.)	: 0.304	
2	0.0	0.0	Diffusion Const. (D)	: 1.281e-008	(cm ² /sec)
3	0.0	0.0	Measurement Condition		
4	0.0	0.0	Temperature	: 25.0	(°C)
5	0.0	0.0	Diluent Name	: WATER	
Average	240.7	53.5	Refractive Index	: 1.3332	
Residual :	2.494e-002	(N.G)	Viscosity	: 0.8878	(cP)
			Scattering Intensity	: 10366	(cps)

Number Distribution Table											
d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)	d (nm)	f(%)	f(cum.%)
1.0	0.0	0.0	9.6	0.0	0.0	91.8	0.0	0.0	879.7	0.0	100.0
1.1	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0	100.5	0.0	0.0	962.9	0.0	100.0
1.2	0.0	0.0	11.5	0.0	0.0	110.0	0.0	0.0	1054.0	0.0	100.0
1.3	0.0	0.0	12.6	0.0	0.0	120.4	0.0	0.0	1153.7	0.0	100.0
1.4	0.0	0.0	13.8	0.0	0.0	131.8	0.0	0.0	1262.8	0.0	100.0
1.6	0.0	0.0	15.1	0.0	0.0	144.3	0.0	0.0	1382.3	0.0	100.0
1.7	0.0	0.0	16.5	0.0	0.0	157.9	0.0	0.0	1513.1	0.0	100.0
1.9	0.0	0.0	18.0	0.0	0.0	172.9	6.3	6.3	1656.2	0.0	100.0
2.1	0.0	0.0	19.7	0.0	0.0	189.2	14.3	20.6	1812.9	0.0	100.0
2.3	0.0	0.0	21.6	0.0	0.0	207.1	18.4	39.0	1984.4	0.0	100.0
2.5	0.0	0.0	23.7	0.0	0.0	226.7	18.0	57.0	2172.1	0.0	100.0
2.7	0.0	0.0	25.9	0.0	0.0	248.1	14.9	71.9	2377.6	0.0	100.0
3.0	0.0	0.0	28.3	0.0	0.0	271.6	10.9	82.8	2602.6	0.0	100.0
3.2	0.0	0.0	31.0	0.0	0.0	297.3	7.3	90.1	2848.8	0.0	100.0
3.5	0.0	0.0	34.0	0.0	0.0	325.4	4.5	94.7	3118.3	0.0	100.0
3.9	0.0	0.0	37.2	0.0	0.0	356.2	2.6	97.3	3413.3	0.0	100.0
4.2	0.0	0.0	40.7	0.0	0.0	389.9	1.4	98.7	3736.2	0.0	100.0
4.6	0.0	0.0	44.5	0.0	0.0	426.8	0.7	99.4	4089.7	0.0	100.0
5.1	0.0	0.0	48.8	0.0	0.0	467.2	0.3	99.8	4476.6	0.0	100.0
5.6	0.0	0.0	53.4	0.0	0.0	511.4	0.1	99.9	4900.1	0.0	100.0
6.1	0.0	0.0	58.4	0.0	0.0	559.8	0.1	100.0	5363.7	0.0	100.0
6.7	0.0	0.0	64.0	0.0	0.0	612.7	0.0	100.0	5871.1	0.0	100.0
7.3	0.0	0.0	70.0	0.0	0.0	670.7	0.0	100.0	6426.5	0.0	100.0
8.0	0.0	0.0	76.6	0.0	0.0	734.2	0.0	100.0	7034.5	0.0	100.0
8.8	0.0	0.0	83.9	0.0	0.0	803.6	0.0	100.0	7700.0	0.0	100.0
D (10%) :	177 (nm)		D (50%) :	218.9 (nm)		D (90%) :	296.8 (nm)				

Effects of nanocurcumin against cisplatin induced-nephrotoxicity in rats

Shinta Dewi Permata Sari, Lulu UI Maknun, Melva Louisa, Ari Estuningtyas, Vivian Soetikno*

Department of Pharmacology & Therapeutics, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, 10430, Indonesia

*Author for correspondence: vivian_09st@yahoo.com

Nephrotoxicity is the major limitation for the clinical use of cisplatin as an antitumor. Nanocurcumin, unlike curcumin, is readily dispersed in aqueous media. The purpose of this preliminary study was to investigate the potential of nanocurcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. This study conducted for 9 days treatment, five groups of male Sprague-Dawley rats were examined: normal, cisplatin (CDDP) 7 mg/kgBW, CDDP+curcumin (CMN) 100 mg/kg BW/day, CDDP+nanocurcumin (NC) 50 mg/kg BW/day, and CDDP+NC 100 mg/kg BW/day. After 72 h following injection cisplatin, specimens were collected. Plasma blood urea nitrogen (BUN), plasma creatinine, urinary ureum levels, urinary creatinine levels, MDA levels in kidney, and GSH levels in kidney were investigated. Rats were weighed before and after study. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). This study resulted a single dose injection of cisplatin caused a significant increase in plasma BUN, plasma creatinine, and MDA levels by 6 fold, 2.4 fold, and 1.4 fold respectively as compared to normal group. Pre-treatment with CMN and NC were reduced plasma BUN levels, plasma creatinine levels, MDA levels in kidney and increased GSH level in kidney compared with CDPP-induced nephrotoxicity rats without treatment. At the end of treatment, the difference of body weight between normal group and CDDP group was statistically significant. CDPP is able to induce nephrotoxicity in rats that mimicked acute kidney injury in human. CMN and NC tend to reduce the CDPP-induced nephrotoxicity.

Keywords: cisplatin, nephrotoxicity, curcumin, nanocurcumin

1. INTRODUCTION

Cisplatin is one of the most effective chemotherapeutic agents, and it is used in the management of a variety of tumors, including testicular cancer, ovarian germ cells tumors, head and neck cancer, non-small cell lung cancer, and adrenocortical carcinoma [1]. Cisplatin has been used as both alone or a standard component of combination chemotherapy in several cancers. Although platinum derivatives with fewer adverse events, such as carboplatin and oxaliplatin, have been developed more recently, cisplatin still provides better survival rate in some cancers such as lung cancer [2]. Pharmacokinetics studies in humans indicate an initial cisplatin plasma half-life of 25–49 min and a secondary half-life of 58–73h and protein binding occurs rapidly, up to 90% in 2h [3].

The therapeutic activity of cisplatin is dose dependent and the clinical usage limited by its undesirable side effects, including nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity,

ototoxicity [2]. Among these factors, nephrotoxicity has been reported as the major side effect that may restrict the therapeutic use of cisplatin. Nephrotoxicity is found in 28–36% patients who received a single dose (50 mg/m²) of cisplatin [4]. Although nephrotoxicity is temporary and dose dependent, it can decrease glomerular filtration rate (GFR), which can be clinically evaluated from increased serum creatinine and decreased creatinine clearance [2].

For several decades, studies measuring the cisplatin content in different target organs have been reported. Human tissues from patients with different tumours and subjected to treatments based on cisplatin were analysed by X-Ray Fluorescence. Liver, kidney and prostate were the organs with the highest cisplatin levels. Lower concentrations were found in bladder, muscle, testicles, pancreas and spleen, being the lowest concentrations detected in bowel, adrenal gland, heart, lung, brain and cerebellum [5]. Studies in rats and mice indicate that cisplatin undergoes metabolic activation in the kidney to a more potent toxin [6].

Cisplatin concentrations within the kidney exceed those in

blood suggesting an active accumulation of drug by renal parenchymal cells. The toxic effects occur primarily in the renal proximal tubules, particularly in the epithelial tubular cells of S-3 segment, glomeruli and distal tubules are also affected afterward [7]. Studies in recent years have identified two different membrane transporters capable of transporting cisplatin into cells: Ctr1 and OCT2. Ctr1 is a copper transporter which was also shown to mediate cisplatin uptake into mammalian cells, including ovarian cancer cells [8]. The mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity are complex and involve multiple pathways and molecules, such as inflammation, oxidative stress, and apoptosis. There have been studies confirming that cisplatin induces the formation of reactive oxygen species (ROS), which responsible for the life-threatening nephrotoxicity induced cisplatin via apoptosis pathway [9].

Natural antioxidants as potential nutraceuticals have been studied to reduce severe side effects as well as enhance anticancer activities of antitumor drugs [10]. Curcumin (CMN), a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome of the herb *Curcuma longa* has a wide spectrum of biological and pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticarcinogenic activities. The use of CMN has been reported as a therapeutic agent to mitigate various kinds of toxicity including cardiotoxicity, nephrotoxicity, hepatotoxicity and neurotoxicity [11]. Various animal models or human studies proved that CMN is extremely safe even at very high doses.

The clinical implication of CMN is hindered due to low intrinsic activity, poor absorption, inactivity of metabolic products and/or rapid elimination and clearance from the body, low solubility, physico-chemical instability. However, these issues can be overcome by utilizing an efficient delivery system. In 2005, an active scientific research was initiated to improve CMN's pharmacokinetics, systemic bioavailability, and biological activity by loading CMN into nanoform(s) (nanoformulations) [12]. Considering this perspective, this study provides an *in vivo* study to assess the effects of CMN and nanocurcumin especially nephroprotective effect. In addition, if this study of CMN and nanocurcumin nephroprotective proven to have any effect on cisplatin-induced nephrotoxicity, then it can be used for further research in human.

2. METHODS

Ethics statement and experimental animals

Male Sprague Dawley rats (150–300 g), bred in the Research and Development Institute of Health (LITBANGKES) were used. The rats were acclimatized for a week before start of the experiments. The animals were housed under standard laboratory condition at temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with relative humidity at $65 \pm 10\%$. Standard pellet rodent diet and water were provided to the animals *ad libitum*. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of Universitas Indonesia.

Drugs and chemicals

Cisplatin were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). CMN and nanocurcumin (NC) were purchased from PT Plamed green Science Limited (China). Cisplatin (CDDP) was dissolved in normal saline (0.9%) and

administered intraperitoneally. CMN and NC was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) and administered orally. Reduced glutathione (GSH) was purchased from PT AAT Bioquest (Mercury Drive, Sunnyvale), MDA was purchased from PT Merck Millipore (Indonesia), urea and creatinine kit were purchased from PT DiaSys Diagnostic System GmbH (Holzheim, Germany).

Experimental design

The CDPP dose used in this experiment was similar to that previously described by Wada Y et al., (2014). The dose of CMN was based on previously published reports Zhongfa L, et al., (2012). Thirty animals were randomly divided into 5 groups containing 6 rats in each. Group 1 (Normal), rats were administered with 0.5% CMC-Na once daily orally for 9 consecutive days and a single intraperitoneally (i.p.) injection of 0.9% normal saline on 7th day. Group 2 (CDPP), rats were administered with 0.5% CMC-Na once daily orally for 9 consecutive days and a single i.p. injection of CDPP (7 mg/kg dissolved in 0.9% normal saline) on 7th day. Group 3 (CDPP+CMN), rats were administered CMN (100 mg/kg/day dissolved in 0.5% CMC-Na) orally for 9 consecutive days and a single i.p. injection of CDPP (7 mg/kg dissolved in 0.9% normal saline) on 7th day. Group 4 (CDPP+NC50), rats were administered NC (50 mg/kg/day dissolved in 0.5% CMC-Na) orally for 9 consecutive days and a single i.p. injection of CDPP (7 mg/kg dissolved in 0.9% normal saline) on 7th day. Group 5 (CDPP+NC100), rats were administered NC (100 mg/kg/day dissolved in 0.5% CMC-Na) orally for 9 consecutive days and a single i.p. injection of CDPP (7 mg/kg dissolved in 0.9% normal saline) on 7th day. Animals were weighed regularly during the experiment. Twenty-four hours after CDPP injection, all rats were placed individually in the metabolic cage for urine collection. At the end of the experiment (i.e. on 10th day), the animals were anesthetized with ether and sacrificed by cervical decapitation. Blood was collected from all the experimental rats and plasma was separated. The left and right kidneys were isolated, and a midline incision was performed. The kidney samples were stored at -80°C for further biochemical analysis. Plasma samples were stored at -80°C and assayed for blood urea nitrogen (BUN) and creatinine using standard diagnostic kits.

Preparation of Tissue Homogenates

Kidney tissue was homogenized with ice-cold saline (0.9% sodium chloride) using a rotorstator homogenized, and the mixture was centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was separated and stored at -80°C until analyzed.

Measurement of levels BUN and creatinine in urine and plasma

Urine samples were centrifuged at $3000 \times g$ (10 min, 4°C) and the supernatant was collected. Levels of BUN in urine and plasma were measured using urease – GLDH: UV enzymatic test with DiaSys kit. Levels of creatinine in urine and plasma were measured using Jaffe method with DiaSys kit.

Measurement of MDA in homogenate

MDA standard solution was prepared with concentrations of 0, 10, 20, 40, 80, 160, and 320 nmol/mL. A total of 200 mL sample was added to 1800 mL of distilled water, and added in 1 mL of 20% TCA and 2 mL of 0.67% TBA, mixed and heated at

100°C for 10 minutes. The mixture was centrifuged and the supernatant was collected. The absorbance was read at 530 nm wavelength.

Measurement of GSH in homogenate

GSH standard solution prepared with concentration 0; 0.0781; 0.1563; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; dan 5 µM. GSH concentration were measured using Amplitude Rapid Fluorimetric Glutathione GSH/GSSG Ratio Assay Kit. Absorbance was read by a fluorescence microplate reader at Ex/Em= 490/520 nm.

Statistical analysis

Data were shown as mean ± SEM and were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test as post-hoc analysis. Values of $p < 0.05$ were considered as significant. All the statistical analyses were performed using IBM SPSS software.

3. RESULT

Body weight changes

For calculation of body weight gain or loss, we considered the day of CDPP injection as day 0. In CDPP alone administered group of rats, we observed a 2%-5.7% body weight loss when compared to other groups at day 7th (i.e. the day of CDPP injection). The loss of body weight of CDPP alone group was even more lower (5%-7.9%) at day 9th of the experiment. CMN and both doses of NC treatment along with CDPP attenuated the body weight loss when compared to CDPP alone treated rats (FIGURE 1[A]). The relative weight of kidney to body weight in CDPP alone treated rats were increased compared to that of normal group. Nanocurcumin treatment at both doses and curcumin attenuated the increase of ratio kidney weight to body weight compared to CDPP alone treated rats (FIGURE 1[B]).

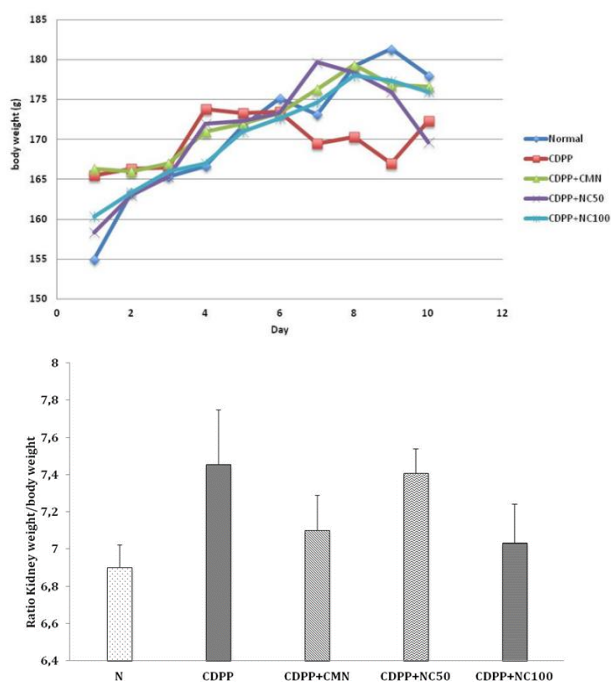


FIGURE 1[A]. Effect of curcumin and nanocurcumin on the body weight of rats during the study period. [B] Effect of curcumin and nanocurcumin on the kidney weight to body weight ratio. Results are expressed as mean ± SEM. n = 6 per group. Normal, age-matched

normal rats; CDPP, acute kidney injury rats induced by cisplatin administered with vehicle; CDPP+CMN, acute kidney injury rats induced by cisplatin administered with curcumin 100 mg/kg/day; CDPP+NC50, acute kidney injury rats induced by cisplatin administered with nanocurcumin 50 mg/kg/day; CDPP+NC100, acute kidney injury rats induced by cisplatin administered with nanocurcumin 50 mg/kg/day. * $p < 0.05$ vs CDPP, # $p < 0.05$ vs CDPP.

BUN levels in urine and plasma

The urine BUN levels decreased in CDPP alone group compared to that of normal group. Treatment with CMN and NC at both doses could increase the urine BUN levels, although there was no statistically significant difference in all groups ($p > 0.05$) (FIGURE 2[A]). As shown in FIGURE 2 [B], the plasma BUN concentration increased significantly in the CDPP alone group as compared to that of the normal group. Treatment with CMN could decrease the plasma BUN concentration significantly to that of CDPP alone group, treatment with NC at both doses also decrease the concentration of plasma BUN, though it did not reach a statistically significant as compared to that of CDPP alone group.

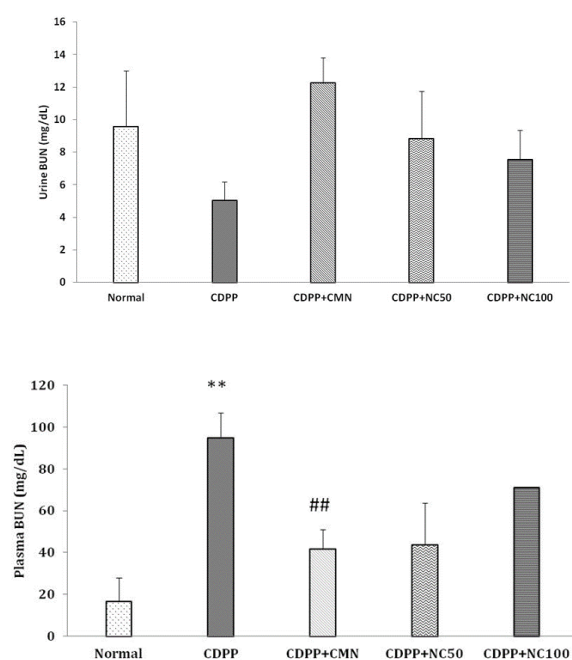


FIGURE 2. Effects of CDDP, CMN, and NC on urine and plasma BUN levels were determined by specific kit. Values were expressed as mg/dL. Each value represented as mean (n=6). Significant differences were indicated by * $p < 0.05$ vs normal group, ## $p < 0.05$ vs CDDP group.

Creatinine levels in urine and plasma

Similarly with the result of urine BUN levels, the urine creatinine level decreased in the CDPP alone group. Treatment with CMN and NC at both doses could increase the level of urine BUN (FIGURE 3). The level of plasma creatinine was increased significantly in the CDPP alone group compared to that of normal group. Curcumin treatment could decrease the plasma creatinine level significantly as compared to that of CDPP alone group. Nanocurcumin treatment at both doses, also decrease the plasma creatinine level compared to that of CDPP alone group (FIGURE 4).

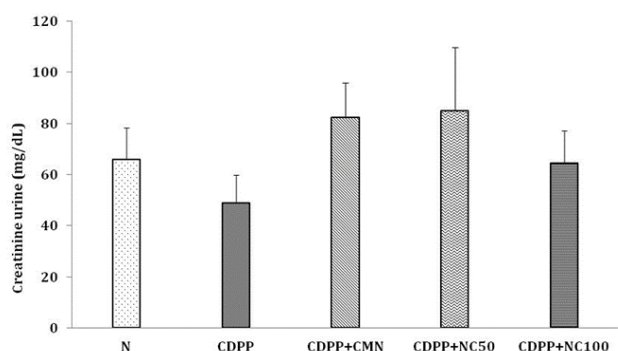


FIGURE 3 Effect of CDDP, CMN, and NC on the urine creatinine levels were determined by specific kit. Values were expressed as mg/dL. Each value represented as mean (n=6).

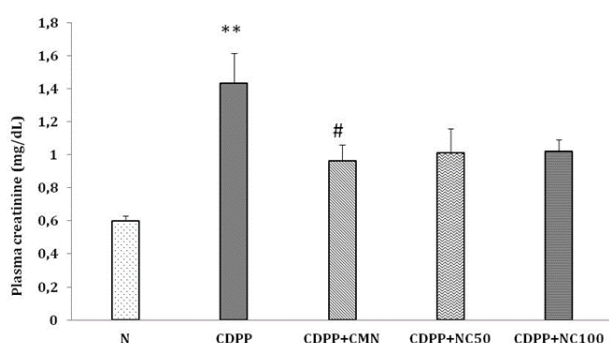


FIGURE 4. Effect of CDDP, CMN, and NC on the plasma creatinine level were determined by specific kit. Values were expressed as mg/dl. Each value represented as mean (n=6). Significant differences were indicated by **p<0.001 compared with normal group, #p<0.05 compared to CDDP group

MDA and GSH levels in kidney

The CDDP administration produced a reduction in the kidney GSH content and an elevation in the kidney MDA production in comparison with the normal group. CDDP plus CMN treatment and NC treatment at both doses increased the kidney GSH and reduces the kidney MDA production but not significantly.

4. DISCUSSION.

Nephrotoxicity is a frequent disturbing adverse effect of cisplatin chemotherapy. The distinctive pharmacological profile of curcumin has attracted considerable attention in the field of cancer research. Unfortunately, curcumin has a poor bioavailability that hindered its utility in the cancer treatment. In this study, we used nanocurcumin that is more readily dispersed in aqueous solution and better physical-chemical properties compared to that of curcumin.

In this preliminary study, we provide evidence that protection against the development of cisplatin-induced nephrotoxicity that is mimicked acute kidney injury in human, by nanocurcumin treatment involves changes in the urine and plasma BUN and creatinine levels, kidney MDA levels, as well as activity of GSH levels. We here showed that single cisplatin injection produced loss of body weight. Nanocurcumin and

curcumin treatment prevented the development of nephrotoxicity induced by cisplatin injection by significantly lowering the plasma BUN and creatinine levels. Furthermore, nanocurcumin and curcumin treatment maintained the body weight of animals throughout the study period. We also found that pretreatment with nanocurcumin and curcumin could reduce MDA levels and could increase the activity of GSH.

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II)) is an inorganic complex formed by an atom of platinum surrounded by chlorine and ammonia atoms in cis position of a horizontal plane.³ Cisplatin is cleared by the kidney by both glomerular filtration and tubular secretion. Cisplatin undergoes biotransformation in the kidney to highly reactive thiols [13]. Typically, the onset of renal insufficiency begins several days after the dose cisplatin, as revealed by increase in the plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) concentration [13]. Nephrotoxicity increases with an increase in dosage and frequency of administration cisplatin.

The BUN and creatinine are screening test of renal function, because they are handled primarily by glomerular filtration with little or no renal regulation or adaptation in the course of declining renal function, they essentially reflect GFR [14]. BUN is the mass of nitrogen within urea, not the mass of urea. Urea and creatinine are nitrogenous end products of metabolism. Urea is the primary metabolite derived from dietary protein and tissue protein turnover. Creatinine is the product of muscle creatine catabolism. Small changes in kidney function can produce large increments in BUN and creatinine [14].

Several investigation have shown that cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with elevated ROS that damages cell membranes by peroxidation lipid in radical-mediated chain reaction and the inhibition of this process by curcumin is mainly attributed to the ability of scavenger free radicals [15]. Malondialdehyde (MDA) is a degradation product from lipid hydroperoxide, provides an index of the peroxidation of lipids in biological tissue. It is well documented that cisplatin cause lipid peroxidation in the kidneys via ROS generation [16].

In this study, we found an increased production of MDA as measured by TBARS in the kidney of cisplatin treated rats. MDA levels in cisplatin group significantly increased compared to that of normal group, the administration of curcumin and nanocurcumin reduced the levels of MDA, however it did not reach a statistically significant. We suggest that nanocurcumin and curcumin act as antioxidant to scavenge ROS, eventually abrogating oxidative stress and improve kidney functions.

Oxidative damage induced by cisplatin has been associated with the depletion of enzymatic antioxidant defense system (SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione transferase and glutathione reductase) and non-enzymatic (GSH and NADPH) in the rats kidneys.⁷ GSH is one of the essential compounds for maintaining cell integrity against ROS and being non-enzymatic free radical scavenger, it participates in the detoxification of ROS.⁹ In this study, we have shown that the activity of GSH was significantly decreased in the kidney of cisplatin treated rats compared to that of normal group. Nanocurcumin and curcumin administration to the cisplatin-induced rats could increase the activity of GSH which suggests that curcumin and nanocurcumin could maintain the non-enzymatic antioxidant defense system. Furthermore, it has been

reported that curcumin can increase the synthesis and concentration of reduced glutathione (GSH). Curcumin is a bifunctional antioxidant, it applies antioxidant activity in a direct and an indirect way through scavenging reaction oxygen species and provoking an antioxidant response [17].

5. CONCLUSION

Single intraperitoneal injection of cisplatin at the dose of 7 mg/kgBW in rats could induce nephrotoxicity that mimicked acute kidney injury in human. The administration of nanocurcumin and curcumin protect against the development of acute kidney injury that is induced by cisplatin injection, which involves abrogation of oxidative stress. Moreover, the antioxidant effects of nanocurcumin and curcumin are responsible for the reduction of lipid peroxidation and the increase of antioxidant activity. The antioxidant effects of nanocurcumin did not show in a dose-dependent manner.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all technicians of the clinical laboratory and provincial key laboratory of the pharmacology department in University of Indonesia for their technical supports.

REFERENCE AND NOTES

1. Santos NAG, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi MLP, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative-stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol.* 2007;81:495-504.
2. Prasaja Y, Sutandyo N, Andrajati R. Incidence of cisplatin-induced nephrotoxicity and associated factors among cancer patients in Indonesia. *Asian Pac J Cancer.* 2015;16(3):1117-1122.
3. Chirino YI, Chavern JP. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicology Pathology.* 2009;61:223-242.
4. Tezcan S, Izzettin FV, Sancar M, et al. Nephrotoxicity evaluation in outpatients treated with cisplatin-based chemotherapy using a short hydration method. *Pharmacol Pharmacy.* 2013;4:296-302.
5. Fernandez DE, Gordaliza EM, Canas B, Palacios MA, Gomez MM. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics.* 2009;2:19-38.
6. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, et al. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. 2010. *Toxins;*2:2490-518.
7. Santos NAG, Rodrigues MA, Martins NM, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86:1233-1250.
8. Holzer, A.K.; Samimi, G.; Katano, K.; Naerdemann, W.; Lin, X.; Safaei, R.; Howell, S.B. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 2004, 66, 817–823.
9. Waseem M, Parvez S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: modulatory role of curcumin. *Food and Chemical Technology.* 2013;53:334-342.
10. Zhang X, Yeung E.D, Wang J, Panzhinskiy E.E, Tong C, Li W, Li J. Isoliquiritigenin, a natural antioxidant, selectively inhibits the proliferation of prostate cancer cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37:841–847.
11. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharmaceutics.* 2007;4(6):807-818.
12. Yallapu MM, Nagesh PK, Jaggi M, Chauhan S. Therapeutic application of curcumin nanoformulation. *AAPS Journal.* 2015;17(6):1341-1356.
13. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanism of Cisplatin Nephrotoxicity. 2010;2:2490-2518.
14. Hosten AO. BUN and Creatinine. In: Walker HK, Hall WD, and Hurst JW, editors. *The history, physical, and laboratory examination.* Boston: Butterworths; 1990. p. 874-878.
15. Sreejayan N, Rao MNA, Pryadarsini KI, Devasagayan TPA. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by curcumin. *Int J Pharm.* 1997;151:127-30.
16. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med.* 1998;131:518-526.
17. Nasri H, Gheshlaghi ZA, Kopaei MR. Curcumin and kidney protection; current findings and new concepts. *Acta Persica Pathophysiological.* 2016;1(1):1-6.

Lampiran 8
Daftar Riwayat Hidup

Nama Lengkap : Shinta Dewi Permata Sari

Jenis Kelamin : Perempuan

Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 05 Juli 1992

Kewarganegaraan : WNI

Status : Lajang

Agama : Islam

Alamat : Jl. Tanah Baru 1, Rt 002/013, No.28, Kebayoran Lama,
Jakarta Selatan, 12210.



Pendidikan

2015-sekarang : Program Magister Ilmu Biomedik FKUI (sedang ditempuh)

2009-2014 : Pendidikan Sarjana, jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

2006-2009 : SMAN 29 Jakarta Selatan

2003-2006 : SMPN 16 Jakarta Barat

1997-2003 : SDN Grogol Utara 03

Sumber Dana Penelitian : Hibah Publikasi Internasional Terindeks Untuk Tugas
Akhir Mahasiswa UI (PITA)
Rp. 90.000.000, 00