



Peran Nefroprotektif *Pentoxifylline* Terhadap Ekspresi TGF- β 1, Kolagen Tipe-4, MMP-9, Glomerulosklerosis serta Albuminuria pada Mencit Galur Swiss Setelah Diinduksi Doksorubisin

Bambang Purwanto *

ABSTRACT

Nephroprotective effect of pentoxifylline through improvement in the expression of TGF- β 1, type-IV collagen, MMP-9, glomerulosclerosis and albuminuria in swiss strain mice after inducing by doxorubicin

Background: Nephrotoxic effects of doxorubicin (DXR) as a cancer drug is still a problem. Pentoxifylline (PTX) has the nephrotoxic effects. The combination of DXR and PTX might reduce the nephrotoxic effects of DXR. The aim of study was to prove the nephroprotective effect of PTX on DXR nephrotoxicity through the improvement of TGF- β 1, type-4 collagen, MMP-9, as well as the levels of glomerulosclerosis and albuminuria.

Method: Forty-four males Swiss strain mice, divided into three groups as control group (C) injected with NaCl 0.9%; DXR induced nephrotoxicity (D); and effect of PTX on D (P/D) by intraperitoneally, respectively, each group consisted of 8 mice. Injections done once a week for three consecutive weeks. At the 4th and 8th weeks post-treatment, all eight mice of each group were sacrificed. Examination of TGF- β 1, type-4 collagen, and MMP-9 expression was done by immunohistochemistry with monoclonal antibody. Glomerulosclerosis examination was done by a histopathologist, using VvG staining. While albuminuria examination was done by Elisa. The statistic was investigated using one-way ANOVA.

Result: In the fourth week proteins expression was increased from C to D and subsequently decreased in P/D for TGF- β 1, collagen type-IV, glomerulosclerosis and albuminuria. Otherwise MMP-9 expression was increased from C to D and in P/D.

While in the eighth week proteins expression was increased from C to D and subsequently decreased in P/D for TGF- β 1, collagen type-IV, glomerulosclerosis, and albuminuria. Otherwise MMP-9 expression was decreased from C to D and subsequently increased in P/D.

Conclusion: The combination of PTX and DXR can reduce the nephrotoxic effects of DXR. PTX was proved to be nephroprotector inducing by DXR.

Keywords: PTX, nephroprotector, TGF- β 1, type-4 collagen, MMP-9, glomerulosclerosis, albuminuria

ABSTRAK

Latar belakang: Efek nefrotoksik doxorubicin (DXR) sebagai obat kanker masih menjadi masalah. Pentoxifylline (PTX) memiliki efek nefroprotektif. Kombinasi DXR dan PTX diharapkan untuk mengurangi efek nefrotoksik DXR. Tujuan penelitian ini adalah menjelaskan perbedaan ekspresi TGF- β 1, kolagen tipe-IV, MMP-9, serta tingkat glomerulosklerosis dan albuminuria dalam keadaan normal, nefrotoksik dan nefroprotektif.

Metode: Mencit strain Swiss jantan 48 ekor, secara acak dibagi tiga kelompok dengan setiap kelompok 16 ekor. Masing-masing kelompok diberikan intraperitoneal sekali seminggu selama tiga minggu berturut-turut 0,2 ml NaCl 0,9% pada kelompok kontrol (C); 0,038 mg DXR/20 g berat badan untuk kelompok nefrotoksik (D); serta dosis kombinasi 0,038 mg DXR/20 g berat badan dan 1,6 mg PTX/20 g berat badan untuk kelompok terapi (P/D). Pada minggu ke-4 dan 8 setelah pengobatan, 8 mencit masing-masing kelompok dikorbankan untuk pengumpulan sampel. Ekspresi TGF- β 1, kolagen tipe-IV dan MMP-9 dinilai dengan immunohistokimia. Glomerulosklerosis dinilai secara histopatologis, menggunakan pewarnaan VvG. Sementara albuminuria dinilai dengan teknik Elisa. Statistik dianalisis menggunakan one-way ANOVA.

Hasil: Pada minggu keempat terlihat ekspresi meningkat dari C ke D dan kemudian menurun pada P/D untuk TGF- β 1, kolagen tipe-IV, glomerulosklerosis dan albuminuria. Sebaliknya ekspresi MMP-9 meningkat dari C ke D dan pada P/D. Pada minggu ke delapan

* Subbagian Ginjal Hipertensi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret/RSUD Dr. Moewardi, Jl. Ir. Sutami No. 36A Surakarta

terlihat ekspresi meningkat dari C ke D dan kemudian menurun pada P/D untuk TGF- β 1, kolagen tipe-IV, glomerulosklerosis, dan albuminuria. Sebaliknya ekspresi MMP-9 menurun dari C ke D dan selanjutnya meningkat pada P/D.

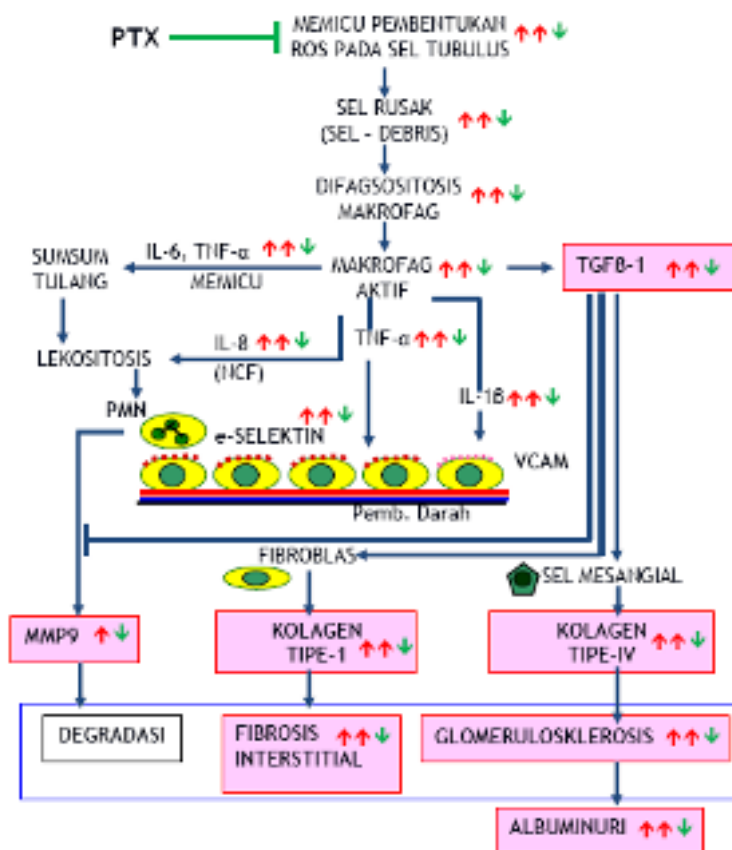
Simpulan: Penggunaan kombinasi PTX dan DXR dapat mengurangi efek nefrotoksik dari DXR.

PENDAHULUAN

Kematian akibat kanker di seluruh dunia diperkirakan akan terus meningkat, dengan perkiraan 12 juta kematian di tahun 2030, 30% kematian akibat kanker dapat dicegah.¹ Doxorubicin (DXR) sangat banyak dipakai dalam pengobatan kanker, tetapi efek samping DXR terhadap kerusakan ginjal yang bersifat destruktif terhadap sel-sel ginjal (nefrotoksik) masih merupakan masalah penting dan belum banyak diteliti. Efek samping tersebut disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang reaktifitasnya sangat tinggi sebagai hasil reaksi DXR dalam terapi kanker. ROS akan merusak sel-sel tubulus proksimal, endotel, membran basalis, sel mesangial, maupun sel viseral glomerulus. Sel-sel yang rusak (debris) akan mengaktifkan makrofag, lewat *toll-like reseptor4* (TLR4), sehingga mengekspresikan sitokin-sitokin, antara lain TNF- α 1,

TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, dan IL-8.^{2,3}

Ikatan TGF- β 1 pada reseptor sel mesangial akan merangsang ekspresi kolagen tipe-IV, yang mengakibatkan terjadinya glomerulosklerosis.⁴ TGF- β 1 berperan dalam pengaturan proliferasi dan diferensiasi sel, perkembangan embrionik, penyembuhan luka dan angiogenesis. TGF- β 1 juga merangsang sel untuk memproduksi komponen-komponen matriks ekstraseluler. Produksi TGF- β 1 yang berlebihan dapat menghasilkan penumpukan matriks ekstraseluler yang terlalu banyak, jaringan parut (fibrosis) yang akhirnya akan menghasilkan kerusakan jaringan.⁵ Selain itu TGF- β 1 juga menghambat ekspresi MMP-9 yang diekspresikan oleh PMN. Pada penelitian ini pemberian DXR akan menyebabkan TGF- β 1 lebih dominan daripada MMP-9, sehingga terjadi glomerulosklerosis.^{6,7}



Gambar 1. Kerangka konseptual

Keterangan :
 → : merangsang/memicu
 —| : menghambat
 ↑↑ : meningkatkan (Efek DXR)
 ↓ : menurunkan (Efek PTX)
 [] : variabel-variabel yang diteliti

Glomerulosklerosis menyebabkan fungsi filtrasi ginjal terganggu, sehingga sisa metabolisme seperti ureum, kreatinin terakumulasi dalam tubuh yang akan menyebabkan sindroma uremia. Glomerulosklerosis dan ROS akan menyebabkan kerusakan dan kebocoran sistem filtrasi yang berakibat terjadinya albuminuri. Albuminuri sesuai dengan hukum homeostasis merupakan bahan yang masih diperlukan oleh tubuh sehingga akan direabsorpsi oleh sel tubulus, akibatnya sel tubulus harus bekerja keras dan hal ini merupakan suatu stresor sehingga sel tubulus mengekspresikan sitokin pro inflamasi (TNF-α1, IL-1β, IL-6, IL-8) dan TGF-β1. Sitokin pro inflamasi tersebut akan lebih merusak sel-sel ginjal. Albuminuri merupakan tanda non invasif yang penting dan sensitif untuk menilai kerusakan ginjal,⁴ albuminuria juga merupakan petanda dini (*marker*) terjadinya disfungsi endotel secara umum meliputi pembuluh darah renal.⁸

Pentoxifyllin (PTX) adalah turunan metilxanthin, yang dapat menghasilkan elektron (donor elektron) sebagai anti-ROS. Sehingga PTX merupakan bahan nefroprotektif, yang bersifat melindungi sel-sel ginjal dari efek destruksi oleh bahan nefrotoksik.⁹⁻¹²

Penelitian ini bertujuan menjelaskan perbedaan ekspresi TGF-β1, kolagen tipe-IV, MMP-9, glomerulosklerosis, dan albuminuria pada keadaan normal, nefrotoksik dan nefroprotektif.

MATERI DAN METODE

Rancangan penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Sampel diambil dari 48 ekor mencit galur Swiss jantan, umur 3-4 bulan dengan berat badan 20-30 gram dibagi dalam tiga kelompok yaitu kelompok kontrol (C), nefrotoksik (D) dan terapi (P/D), masing-masing kelompok 16 ekor.

Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$n = \left[\frac{(Z1/2\alpha + Z\beta)\sigma}{\sigma} \right]^2 \quad (\text{Steel and Torrie, 1980})$$

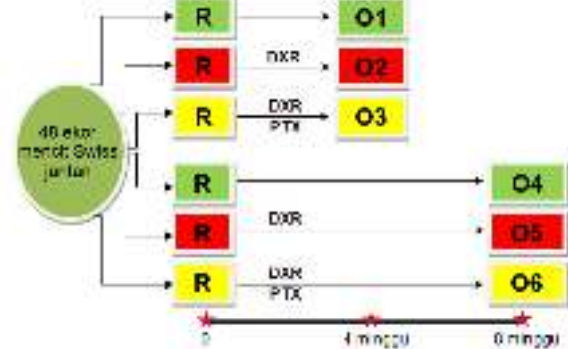
Karena σ² sulit ditaksir dari literatur, studi yang sama sebelumnya atau studi pendahuluan oleh peneliti, maka diasumsikan σ² ≈ δ², sehingga hasilnya n = (Z1/2α + Zβ)²

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7$$

Berdasar rumus didapatkan jumlah sampel minimal adalah 7. Dalam penelitian ini digunakan 8 ekor mencit untuk setiap kelompok observasinya, sehingga telah memenuhi batas minimal sampel.

Kelompok C diinjeksi dengan NaCl 0,9% 0,2 ml intraperitoneal (*i.p.*), kelompok D diinjeksi 0,038 mg DXR/20 gBB secara *i.p.*, dan kelompok P/D diinjeksi

0,038 mg DXR /20 gBB dan 1,6 mg PTX/20 secara *i.p.* Injeksi dilakukan satu kali seminggu selama tiga minggu berturut-turut. Pada minggu ke-4 dan ke-8 pasca perlakuan masing-masing kelompok dikorbkan 8 ekor hewan coba, dengan cara dislokasi servikal.



Gambar 2. Bagan rancangan penelitian

Keterangan:

- R : Randomisasi
- O₁ : Observasi kelompok kontrol setelah 4 minggu
- O₂ : Observasi kelompok nefrotoksik (DXR) setelah 4 minggu
- O₃ : Observasi kelompok terapi (DXR+PTX) setelah 4 minggu
- O₄ : Observasi kelompok kontrol setelah 8 minggu
- O₅ : Observasi kelompok nefrotoksik (DXR) setelah 8 minggu
- O₆ : Observasi kelompok terapi (DXR+PTX) setelah 8 minggu

Batasan operasional

Nefrotoksik adalah bahan yang bersifat destruktif terhadap sel-sel ginjal.¹⁴

DXR adalah obat kanker yang dapat mengakibatkan nefrotoksik. Diberikan secara intraperitoneal tiga kali dengan dosis 0,032 mg/20 g dengan selang waktu satu minggu.¹³

Nefroprotektif adalah bahan yang bersifat melindungi sel-sel ginjal dari efek destruksi oleh bahan nefrotoksik.¹⁴

PTX adalah obat yang bersifat nefroprotektif. Diberikan secara intraperitoneal tiga kali dengan dosis 1,6 mg/20 g dengan selang waktu satu minggu.¹²

Albuminuria adalah urine ditampung dari uretra mencit secara spontan kemudian dilakukan pemeriksaan kadar albumin kuantitatif menggunakan antibodi monoklonal, dengan metode Elisa.¹⁵

Pemeriksaan histopatologi adalah teknik pemeriksaan untuk melihat glomerulosklerosis maupun interstitial fibrosis dengan pengecatan metode VvG.¹⁶

Glomerulosklerosis adalah suatu keadaan terjadi penumpukan kolagen tipe-IV pada glomerulosklerosis ginjal terutama pada sekitar sel mesangial. Dimana pada pengecatan VvG dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x akan terlihat kemerahan. Derajat untuk penilaian histopatologik glomerulosklerosis ditentukan sebagai berikut: 30 glomerulus diseleksi secara acak dan derajat

ekspansi matrik glomerulosklerosis atau indeks sklerosis (IS) ditentukan secara semi-kuantitatif menurut metode Tamaki *et al* (1994). Menurut metode ini terdapat dua tahap penentuan indeks sklerosis, yaitu sebagai berikut:

Tahap pertama. Menentukan persentase sklerosis pada tiap glomerulus, yaitu:

Skor 0 : bila tidak terjadi sklerosis

Skor 1 : bila derajat sklerosis antara 1% hingga 25%

Skor 2 : bila derajat sklerosis antara 26% hingga 50%

Skor 3 : bila derajat sklerosis antara 51% hingga 75%

Skor 4 : bila derajat sklerosis antara 75% hingga 100%

Tahap kedua. Menentukan indeks sklerosis (IS) dengan rumus sebagai berikut:

$$IS = \left[\frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4}{30} \right] \times 100$$

Keterangan :

n_0 = Jumlah glomerulus dengan skor 0

n_1 = Jumlah glomerulus dengan skor 1

n_2 = Jumlah glomerulus dengan skor 2

n_3 = Jumlah glomerulus dengan skor 3

n_4 = Jumlah glomerulus dengan skor 4

Cara mendapatkan lapangan pandang sama dengan prosedur pengamatan imunohistokimia. Pengamatan dibatasi pada 30 glomerulus yang berbeda. Pada manusia 10 glomerulus sudah dianggap representatif. Pada penelitian ini yang menggunakan mencit galur Swiss sebagai hewan coba, pengamatan dilakukan terhadap 30 glomerulus yang berbeda. Pada setiap glomerulus yang diamati selanjutnya dilakukan skoring terhadap derajat sklerotik yang terjadi (angka masuk dalam tabel). Nilai skoring dari glomerulus ke-1 hingga ke-30 dimasukkan ke dalam rumus kemudian dibagi 30 dan dikalikan 100 untuk mendapatkan nilai indeks sklerosis.

Eksresi TGF- β 1 adalah penilaian positifitas pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap TGF- β 1. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap 1000 sel makrofag sebagai sel yang mengekspresikan TGF- β 1. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercatat coklat perak, pada membran sel. Jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dijumlahkan dan selanjutnya dimasukkan sebagai data (bilangan dalam tabel untuk tiap hewan coba).^{17,18}

Eksresi MMP-9 adalah penilaian positifitas pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap MMP-9. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap 1000 sel, yang terdiri PMN sebagai yang mengekspresikan MMP-9. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercatat coklat

perak, pada membran sel. Jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dijumlahkan dan dimasukkan sebagai data (bilangan dalam tabel untuk tiap hewan coba).^{17,18}

Eksresi kolagen tipe-IV adalah penilaian positifitas pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap ekspresi kolagen tipe-IV. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap 30 glomerulus. Kemudian dihitung jumlah sel mesangial yang imunoreaktif tercatat coklat perak, pada membran sel mesangial. Jumlah sel imunoreaktif yang ditemukan pada semua glomerulus kemudian dijumlahkan dan dimasukkan sebagai data (bilangan dalam tabel untuk tiap hewan coba).^{17,18}

Data dianalisis menggunakan uji Anova, dengan program SPSS, untuk mendapatkan perbedaan ekspresi TGF- β 1, kolagen tipe-IV, MMP-9, glomerulosklerosis dan albuminuri pada keadaan normal, nefrotoksik dan nefroprotektif, baik pada minggu ke-4 maupun ke-8 pasca perlakuan.

HASIL

Eksresi TGF- β 1, kolagen tipe-IV dan MMP-9 pada jaringan ginjal setelah minggu ke-4 dan ke-8.

Hasil penelitian memperlihatkan, pemberian DXR meningkatkan jumlah rerata ekspresi TGF- β 1 secara bermakna setelah minggu ke-4 ($p=0,001$) maupun minggu ke-8 ($p<0,001$) dibandingkan kontrol. Pemberian kombinasi DXR+PTX menurunkan jumlah rerata ekspresi TGF- β 1 secara bermakna baik setelah minggu ke-4 ($p=0,001$) maupun minggu ke-8 ($p<0,001$) dibandingkan kelompok perlakuan (hanya diberikan DXR, tanpa pemberian PTX) (Tabel 1).

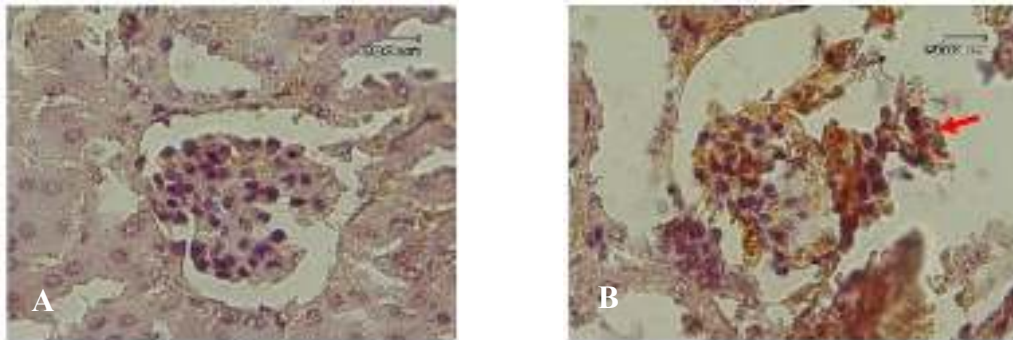
Hasil ekspresi TGF- β 1 dilakukan dengan pemeriksaan imunohistokimia pada membran di sel-sel makrofag menggunakan mikroskop cahaya seperti terlihat pada Gambar 3.

Pemberian DXR meningkatkan jumlah rerata ekspresi kolagen tipe-IV di jaringan ginjal secara bermakna ($p=0,003$) setelah minggu ke-4, maupun setelah minggu ke-8 ($p<0,001$) dibandingkan kontrol. Pemberian kombinasi DXR+PTX setelah minggu ke-4 menurunkan jumlah rerata ekspresi kolagen tipe-IV namun tidak berbeda ($p=0,991$), sebaliknya pada minggu ke-8 penurunan terjadi secara bermakna ($p=0,044$) dibandingkan kelompok DXR (Tabel 2).

Hasil ekspresi kolagen tipe-IV setelah empat dan delapan minggu perlakuan, dilakukan dengan pemeriksaan imunohistokimia pada membran di sel-sel fibroblas menggunakan mikroskop cahaya seperti terlihat pada Gambar 4.

Tabel 1. Distribusi rerata ekspresi TGF-β1 masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8 setelah perlakuan

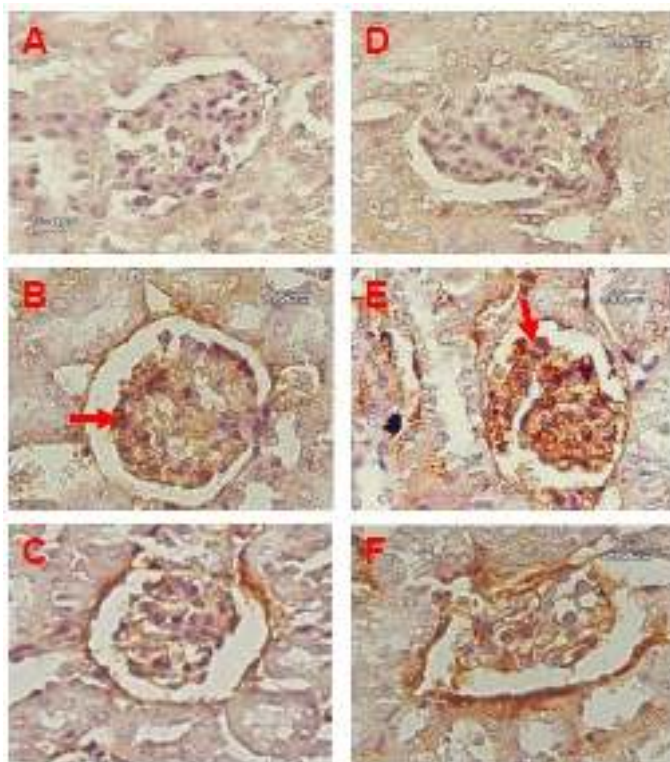
| Kelompok hewan coba | n | Ekspresi TGF-β1 (sel imunoreaktif/1.000 sel makrofag) | | | |
|---------------------|---|---|-------|----------------|--------|
| | | Minggu ke-4 | p | Minggu ke-8 | p |
| Kontrol | 8 | 3,25 ± 4,98 | 0,001 | 4,50 ± 3,89 | <0,001 |
| DXR | 8 | 74,63 ± 12,50 | 0,001 | 177,88 ± 68,78 | <0,001 |
| DXR+PTX | 8 | 15,75 ± 3,41 | | 36,88 ± 9,51 | |



Gambar 3. Ekspresi protein TGF β1 (A) negatif pada sel-sel mesangial glomerulus sebagai sel target, (B) positif pada sel makrofag disekitar glomerulus (panah). (Pewarnaan imunohistokimia; pembesaran 1000x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel).

Tabel 2. Distribusi rerata ekspresi kolagen tipe-IV masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8 setelah perlakuan

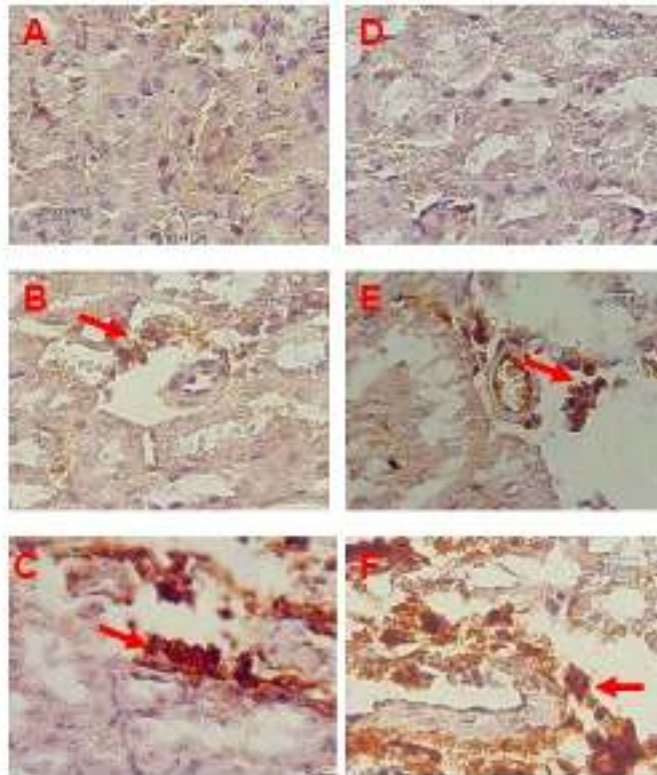
| Kelompok hewan coba | n | Ekspresi kolagen tipe-IV (sel mesangial imunoreaktif/30 glomerulus) | | | |
|---------------------|---|---|-------|-----------------|--------|
| | | Minggu ke-4 | p | Minggu ke-8 | p |
| Kontrol | 8 | 5,50 ± 5,50 | 0,003 | 10,50 ± 11,76 | <0,001 |
| DXR | 8 | 31,88 ± 21,18 | 0,991 | 199,25 ± 123,31 | 0,044 |
| DXR+PTX | 8 | 19,50 ± 22,83 | | 61,13 ± 97,03 | |



Gambar 4. Perbandingan gambaran protein kolagen tipe IV yang diekspresikan oleh sel-sel mesangial glomerulus pada berbagai perlakuan dan waktu yang berbeda. Ekspresi kolagen tipe IV pada membran sel-sel fibrolas nampak berwarna coklat perak (panah). Ekspresi kolagen tipe IV pada kelompok perlakuan empat minggu, masing-masing untuk (A) kelompok kontrol, (B) kelompok yang diberi perlakuan DXR, (C) dan kelompok kombinasi yang diberi DXR dan PTX. Ekspresi kolagen tipe IV pada kelompok perlakuan delapan minggu, masing-masing untuk (D) kelompok kontrol, (E) kelompok yang diberi perlakuan DXR, dan (F) kelompok kombinasi yang diberi DXR dan PTX. (Pewarnaan imunohistokimia; pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel).

Tabel 3. Distribusi rerata ekspresi MMP-9 masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8 setelah perlakuan

| Kelompok hewan coba | n | Ekspresi MMP-9 (sel imunoreaktif/1.000 sel PMN) | | | |
|---------------------|---|---|-------|----------------|--------|
| | | Minggu ke-4 | p | Minggu ke-8 | p |
| Kontrol | 8 | 50,13 ± 71,13 | 0,368 | 124,50 ± 72,47 | 0,002 |
| DXR | 8 | 103,63 ± 120,55 | 0,226 | 50,75 ± 34,97 | <0,001 |
| DXR+PTX | 8 | 213,25 ± 178,30 | | 243,63 ± 59,70 | |



Gambar 5. Perbandingan gambaran MMP-9 yang diekspresikan sel-sel PMN diantara perlakuan dalam waktu yang berbeda pada ginjal mencit. Ekspresi MMP-9 pada membran sel-sel PMN (panah), nampak berwarna coklat perak. Ekspresi MMP-9 pada kelompok perlakuan empat minggu, masing-masing untuk (A) kelompok kontrol, (B) kelompok yang diberi perlakuan doxorubicin, dan (C) kelompok kombinasi yang diberi doxorubicin dan pentoxifylin. Sedangkan ekspresi MMP-9 pada kelompok perlakuan delapan minggu, masing-masing untuk (D) kelompok kontrol, (E) kelompok yang diberi perlakuan doxorubicin, dan (F) kelompok kombinasi yang diberi doxorubicin dan pentoxifylin. Nampak bahwa ekspresi MMP-9 pada kelompok kombinasi yang diberi pentoxifylin baik perlakuan empat maupun delapan minggu, secara bermakna memiliki ekspresi yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi pentoxifylin. (Pewarnaan immunohistokimia; pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel).

Pemberian DXR meningkatkan rerata ekspresi MMP-9 setelah minggu ke-4 di jaringan ginjal pada sel imunoreaktif/1.000 sel PMN, namun dibandingkan kontrol tidak bermakna ($p=0,368$). Pemberian kombinasi DXR+PTX meningkatkan ekspresi MMP-9 meskipun tidak bermakna ($p=0,226$) dibandingkan kelompok yang hanya mendapatkan DXR saja. Sebaliknya setelah minggu ke-8 ekspresi MMP-9 di jaringan ginjal menurun secara bermakna ($p=0,002$) pada pemberian DXR dibandingkan kelompok mencit normal. Pemberian kombinasi DXR+PTX mampu meningkatkan ekspresi MMP-9 secara sangat bermakna ($p<0,001$) dibandingkan kelompok yang hanya diberikan DXR saja (Tabel 3).

Hasil ekspresi MMP-9 setelah empat dan delapan minggu perlakuan, dilakukan dengan pemeriksaan immunohistokimia pada membran di sel-sel PMN menggunakan mikroskop cahaya seperti terlihat pada Gambar 5.

Glomerulosklerosis di jaringan ginjal pada minggu ke-4 dan ke-8.

Pemberian agen nefrotoksik (DXR) secara bermakna meningkatkan perubahan histopatologi glomerulosklerosis pada minggu ke-4 maupun minggu ke-8 ($p<0,001$) dibandingkan kelompok kontrol. Pemberian kombinasi DXR+PTX pada hewan coba secara bermakna menurunkan perubahan histopatologi glomerulosklerosis pada minggu ke-4 ($p=0,002$) maupun minggu

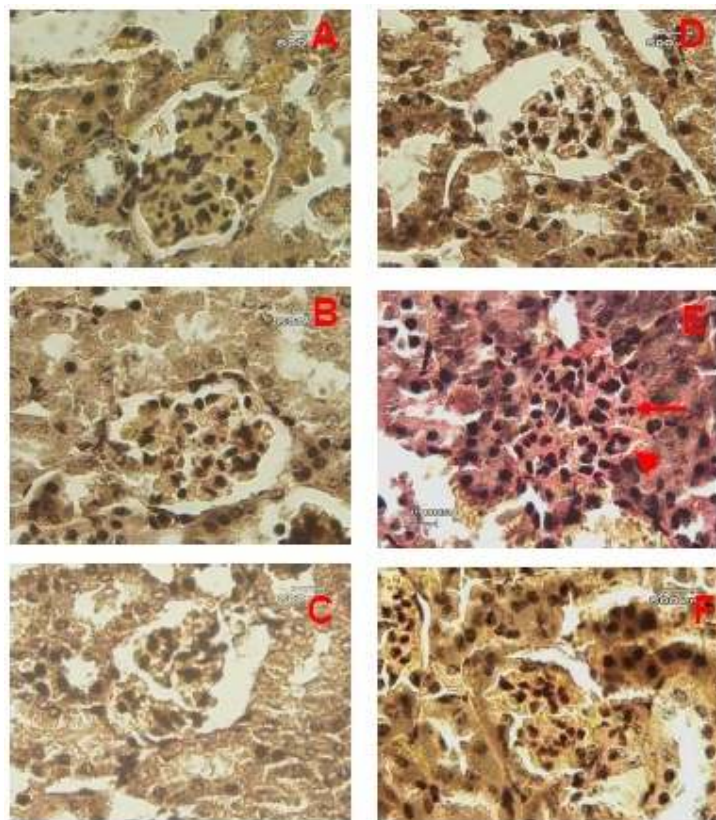
ke-8 ($p < 0,001$) dibandingkan kelompok perlakuan (hanya diberikan DXR, tanpa pemberian PTX).

Hasil nilai rerata indeks sklerosis masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8 disajikan pada Tabel 4.

Hasil pemeriksaan histologis glomerulosklerosis dengan teknik pewarnaan Verhoeff van Gieson (VvG) setelah empat dan delapan minggu perlakuan, menggunakan mikroskop cahaya seperti terlihat pada Gambar 6.

Tabel 4. Distribusi rerata indeks sklerosis masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8

| Kelompok hewan coba | n | Perubahan histopatologi glomerulosklerosis (Indeks Sklerosis) | | | |
|---------------------|---|---|--------|----------------|--------|
| | | Minggu ke-4 | p | Minggu ke-8 | p |
| Kontrol | 8 | 35,38 ± 12,83 | <0,001 | 76,63 ± 12,39 | <0,001 |
| DXR | 8 | 152,63 ± 47,04 | 0,002 | 272,00 ± 58,09 | <0,001 |
| DXR+PTX | 8 | 76,00 ± 31,32 | | 135,75 ± 35,31 | <0,001 |



Gambar 6. Perbandingan gambaran glomerulosklerosis, yang timbul setelah perlakuan pada waktu yang berbeda. Jaringan sklerotik nampak berwarna merah (panah) yang terletak diantara sel-sel mesangial glomerulus. Glomerulosklerosis pada kelompok perlakuan empat minggu, masing-masing untuk (A) kelompok kontrol, (B) kelompok yang diberi perlakuan DXR, dan (C) kelompok kombinasi yang diberi DXR dan PTX. Sedangkan glomerulosklerosis pada kelompok perlakuan delapan minggu, masing-masing untuk (D) kelompok kontrol, (E) kelompok yang diberi perlakuan DXR, dan (F) kelompok kombinasi yang diberi DXR dan PTX. Nampak bahwa kelompok perlakuan delapan minggu (E) menunjukkan derajat sklerosis yang terberat, dimana pertumbuhan jaringan sklerotik yang luas pada glomerulus telah mengakibatkan Bowman's space menyempit (kepala panah). (Pewarnaan Verhoeff van Geison; pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel).

Tabel 5. Distribusi rerata albuminuria masing-masing kelompok hewan coba pada minggu ke-4 dan ke-8

| Kelompok hewan coba | n | Albuminuria (ng/dL) | | | |
|---------------------|---|---------------------|-------|-----------------|-------|
| | | Minggu ke-4 | p | Minggu ke-8 | p |
| Kontrol | 8 | 499,95 ± 268,81 | 0,001 | 713,81 ± 245,79 | 0,258 |
| DXR | 8 | 989,35 ± 264,63 | 0,002 | 896,55 ± 313,22 | 0,586 |
| DXR+PTX | 8 | 544,21 ± 206,79 | | 809,64 ± 371,76 | |

Albuminuria pada minggu ke-4 dan ke-8

Pemberian agen nefrotoksik (DXR) pada minggu ke-4 secara bermakna meningkatkan kadar albuminuria ($p=0,001$) dibandingkan kontrol, namun pada minggu ke-8 tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0,258$). Pemberian kombinasi DXR+PTX pada minggu ke-4 secara bermakna menurunkan albuminuria ($p=0,002$), penurunan kadar albuminurianya mendekati kelompok kontrol. Namun, pada minggu ke-8 tidak berbeda ($p=0,586$) dibandingkan kelompok DXR. Hasil rerata kadar albuminuria pada minggu ke-4 dan ke-8 masing-masing kelompok hewan coba disajikan pada Tabel 5.

PEMBAHASAN

Penggunaan DXR untuk menginduksi nefrotoksik pada hewan coba telah banyak dipergunakan. Proses terjadinya kerusakan ginjal dimulai dari pemberian DXR yang akan berikatan dengan reseptor membran sel tubulus proksimal kemudian merangsang koenzim NADPH oksidase yang berada pada mitokondria sehingga membentuk ROS. Proses ini sesuai dengan *initial stage (incubation period/sub clinical)*.

Terjadinya kerusakan pada jaringan ginjal bisa dideteksi dari: (1) tingkat molekuler (ekspresi TGF- β 1 dan kolagen tipe-IV) yang dilakukan pemeriksaan imunobiologi dengan metode imunohistokimia; (2) tingkat seluler (glomerulosklerosis) yang dideteksi dari perubahan histopatologis dengan teknik pewarnaan Verhoeff van Gieson dan (3) tingkat klinis (albuminuria) menggunakan antibodi monoklonal albumin dengan teknik elisa.

Pada tahapan *emergence stage* DXR sebagai bahan nefrotoksik, bersifat destruktif terhadap sel-sel ginjal. Efek samping tersebut disebabkan oleh ROS yang memiliki reaktivitas sangat tinggi. ROS akan merusak sel-sel tubulus proksimal dan endotel, serta membran basalis pembuluh darah glomerulus. Sel-sel yang rusak akan membentuk *debris*. *Debris* akan mengaktifkan makrofag, lewat *TLR-4*, sehingga makrofag mengekspresikan sitokin-sitokin TNF- α 1, TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, dan IL-8.²

IL-6 dan TNF- α 1 akan merangsang leukositosis termasuk PMN maupun monosit yang bergerak menuju lesi pada ginjal. IL-8 akan menarik PMN dalam sirkulasi mendekati permukaan endotel pembuluh darah ginjal. Ikatan TGF- β 1 akan merangsang reseptor sel mesangial sehingga mengekspresikan kolagen tipe-IV, sehingga terjadi glomerulosklerosis.^{4,13}

TNF- α 1 akan merangsang endotel pembuluh darah sehingga endotel tersebut akan mengekspresikan e-selektin. E-selektin akan mengikat PMN, kemudian PMN akan mengekspresikan MMP-9. MMP-9 akan

mendegradasi kolagen tipe-IV. TGF- β 1 bersifat menghambat ekspresi MMP-9 (antagonis). Pada tahapan *active stage* pemberian DXR menyebabkan TGF- β 1 lebih dominan dibanding MMP-9, sehingga terjadi *imbalance*.^{2,6,7}

Pemberian kombinasi DXR+PTX pada penelitian ini, dalam hal ini PTX berperan sebagai anti-ROS, sehingga kerusakan sel (*debris*) berkurang, akibatnya rangsangan terhadap makrofag lewat *TLR-4* berkurang pula. Akibatnya ekspresi TGF- β 1 oleh sel makrofag juga berkurang, sehingga PTX berperan dalam memperbaiki keadaan *imbalance* tersebut.⁹⁻¹² Karena, keadaan *imbalance* ini akan berujung pada terjadinya glomerulosklerosis akibat ekspresi kolagen tipe-IV. Terjadinya glomerulosklerosis, merupakan suatu kondisi yang *irreversible (terminal stage)*.

Albuminuria merupakan petanda dini (*marker*) terjadinya disfungsi endotel secara umum meliputi pembuluh darah renal, kardial, maupun serebral. Adanya albuminuria secara mudah dapat dideteksi lewat urin, dengan mengetahui albuminuria yang dimulai dengan mikroalbuminuria, kita menjadi lebih dini mengetahui disfungsi endotel tersebut sehingga prognosinya lebih baik karena disfungsi endotel tersebut masih reversibel.^{8,19}

Ekspresi TGF- β 1

Pada penelitian ini ekspresi TGF- β 1 di jaringan ginjal pada kelompok mencit yang diinduksi DXR sebagai agen nefrotoksik terlihat lebih tinggi daripada mencit normal sebagai kontrol. Peningkatan ekspresi TGF- β 1 secara bermakna sudah terlihat pada minggu ke-4, bertambahnya waktu induksi DXR (minggu ke-8) lebih meningkatkan ekspresi TGF- β 1. Peningkatan ekspresi TGF- β 1 ini karena pada pemberian DXR akan terjadi *DXR iron complex*. *DXR iron complex* tersebut akan menghasilkan ROS yang bersifat merusak struktur sel sehingga terbentuk *debris*. *Debris* merangsang makrofag melalui *TLR-4*, sehingga melepaskan ikatan Nf- κ B dengan I κ B akibatnya Nf- κ B menjadi aktif. Nf- κ B sebagai faktor transkripsi akan menyebabkan makrofag mengekspresikan sejumlah sitokin pro inflamasi, dan TGF- β 1.^{4,20-22} TGF- β 1 memainkan peran kunci dalam terbentuknya sklerosis ginjal pada manusia dan hewan coba. Menurut Koli *et al*, protease, thrombospondin-1, ROS, dan pH rendah merupakan faktor-faktor yang mungkin mampu memperantarai aktivasi TGF- β 1 di ginjal.²³ Menurut Wang *et al*, TGF- β 1 akan berikatan pada reseptor TGF- β tipe II (TGFR-II) yang aktif, yang pada gilirannya akan merekrut dan mengaktifkan reseptor TGF- β tipe I (TGFR-I). TGFR-I yang aktif, kemudian akan mengaktifkan Smad2 dan Smad3 untuk membentuk kompleks hetero-oligomeric dengan Smad4, yang selanjutnya akan translokasi ke dalam

nukleus untuk mengatur transkripsi gen target.²⁴ Banyak penelitian yang telah membuktikan bahwa blokade TGF- β 1 dapat memperbaiki sklerosis ginjal.⁵

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi DXR+PTX secara signifikan menghambat produksi TGF- β 1 pada nefrotoksik akibat DXR, pemberian PTX sebagai agen nefroprotektif yang dikombinasikan dengan DXR terlihat menurunkan TGF- β 1 baik pada minggu ke-4 ataupun ke-8. PTX adalah derivat xanthin, sebagai penghambat fosfodiesterase, dapat mendorong peningkatan cAMP intraselular, pelebaran pembuluh darah dan otot polos, perbaikan mikrosirkulasi. Kemampuan PTX dalam menurunkan ekspresi TGF- β 1 dimungkinkan, karena PTX selain dalam reaksi oksidasi bertindak sebagai donor elektron dan memiliki kemampuan menghambat fosfodiesterase.²⁵ Dengan kemampuannya sebagai donor elektron, maka PTX dapat bersifat sebagai anti ROS akibatnya kerusakan struktur sel dapat dicegah. Pencegahan kerusakan sel-sel akibat ROS ini akan menyebabkan berkurangnya debris, sehingga rangsangan terhadap TLR-4 juga akan berkurang. Keadaan ini menyebabkan aktifitas NF κ B pada makrofag berkurang, akibatnya ekspresi sitokin TGF- β 1 juga berkurang.¹⁰⁻¹² Hasil ini memberikan hipotesis lebih lanjut bahwa kombinasi PTX dengan DXR akan menghambat peningkatan ekspresi TGF- β 1 sehingga dapat mengurangi glomerulosklerosis.

Pengalaman klinis, PTX banyak digunakan untuk perawatan vaskuler perifer dan penyakit serebrovaskuler. PTX mampu menghambat proliferasi sel-sel limfosit, fibroblas, dan mesangial, selain PTX juga mampu menurunkan produksi protein-protein ECM.^{26,27}

Ekspresi kolagen tipe-IV

Hasil pemeriksaan imunohistokimia di jaringan ginjal pada penelitian ini kelompok mencit yang diinduksi agen nefrotoksik (DXR) memperlihatkan jumlah sel-sel mesangial imunoreaktif yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Dari analisis statistik terdapat adanya peningkatan ekspresi kolagen tipe-IV pada minggu ke-4 dan ke-8, peningkatan ekspresi kolagen tipe-IV lebih bermakna terlihat pada minggu ke-8.

Kelompok mencit yang diberikan kombinasi PTX dan DXR, memperlihatkan jumlah sel-sel mesangial imunoreaktif yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang hanya mendapatkan DXR saja. Dari analisis statistik terdapat adanya penurunan ekspresi kolagen tipe-IV pada minggu ke-4 dan ke-8, dengan penurunan lebih bermakna pada minggu ke-8. PTX memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi sel-sel mesangial.^{26,27} Sejalan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan kelompok yang diberikan kombinasi PTX dan DXR memperlihatkan ekspresi TGF- β 1 lebih rendah di-

bandingkan kelompok yang hanya diberikan DXR, maka akan menurunkan ikatan TGF- β 1 pada reseptor membran sel mesangial.⁴ Penurunan ikatan TGF- β 1 pada reseptor membran sel mesangial akan menurunkan stimulasi ekspresi kolagen tipe-IV,^{4,13} sesuai hasil penelitian kami kelompok yang diberikan kombinasi PTX dan DXR terjadi penurunan ekspresi kolagen tipe-IV, penurunan lebih bermakna pada minggu ke-8.

Ekspresi MMP-9

Salah satu peran TGF- β 1 adalah menghambat ekspresi MMP-9,²⁸ pada minggu ke-4 peningkatan ekspresi TGF- β 1 pada hewan coba yang diinduksi DXR belum maksimal. Bertambahnya waktu induksi DXR, akan lebih meningkatkan ekspresi TGF- β 1. Menurut Tamaki *et al.*, puncak ekspresi TGF- β 1 terlihat pada minggu ke-16.¹³ Sehingga pada minggu ke-4 kemampuan TGF- β 1 dalam menghambat ekspresi MMP-9 belum maksimal, hal ini terlihat ekspresi MMP-9 di jaringan ginjal pada kelompok mencit yang diinduksi DXR pada minggu ke-4 tidak berbeda dengan mencit kontrol. Bertambahnya waktu lebih lama meningkatkan penghambatan TGF- β 1 terhadap ekspresi MMP-9, hal ini terlihat pada kelompok mencit yang diinduksi DXR pada minggu ke-8 terjadi penurunan yang bermakna dari ekspresi MMP-9.

Pemberian kombinasi PTX dan DXR meningkatkan ekspresi MMP-9, hal ini terlihat pada kelompok terapi terjadi peningkatan ekspresi MMP-9 dibandingkan kelompok perlakuan yang hanya mendapatkan DXR. Pada minggu ke-4 ekspresi MMP-9 kelompok terapi tidak berbeda dengan perlakuan. Peningkatan waktu induksi akan meningkatkan ekspresi MMP-9, hal ini terlihat pada minggu ke-8 terjadi peningkatan yang bermakna dari kelompok terapi dibandingkan kelompok perlakuan.

Glomerulosklerosis

Hasil pemeriksaan histologis glomerulus dengan teknik pewarnaan VvG pada penelitian ini kelompok mencit yang diinduksi agen nefrotoksik (DXR) memperlihatkan derajat ekspansi matrik glomerulus atau indeks sklerosis yang lebih tinggi daripada mencit normal sebagai kontrol. Dari analisis statistik terdapat adanya peningkatan yang bermakna glomerulosklerosis pada minggu ke-4 dan ke-8. Tetapi peningkatan glomerulosklerosis lebih tinggi pada minggu ke-8. Hasil ini sesuai dengan penelitian Guo *et al.*²⁹

Kelompok mencit yang diberikan kombinasi PTX dan DXR, memperlihatkan indeks sklerosis (glomerulosklerosis) yang lebih rendah daripada mencit yang hanya diberikan DXR saja. Analisis statistik menginformasikan adanya penurunan indeks sklerosis yang bermakna baik pada minggu ke-4 ataupun ke-8.

Penurunan indeks sklerosis lebih bermakna pada minggu ke-8. Hasil ini mengisyaratkan semakin lama penggunaan DXR akan semakin menambah dampak kerusakan pada glomerulus. Pemakaian DXR yang dikombinasikan dengan PTX, akan menurunkan derajat kerusakan glomerulus secara bermakna. Kemampuan PTX dalam menghambat proses glomerulosklerosis, dimungkinkan sejalan hasil penelitian pada variabel-variabel lainnya yaitu ekspresi TGF- β 1 dan kolagen tipe-IV yang terlihat lebih rendah dibandingkan kelompok yang hanya diberikan DXR. Penurunan ekspresi TGF- β 1 akan menurunkan rangsangan pada reseptor sel mesangial yang akan menyebabkan penurunan sinyal (*cytoplasmic signal transduction pathway*) sehingga ekspresi kolagen tipe-IV lebih rendah, yang mengakibatkan terjadinya penghambatan proses glomerulosklerosis.^{4,11}

Albuminuria

Albuminuria adalah faktor risiko bagi perkembangan penyakit ginjal, albuminuria selama perawatan menjadi prediktor tingkat penurunan GFR. Albuminuria tidak hanya merupakan *marker* disfungsi endotel pembuluh darah pada ginjal, tetapi juga merupakan *marker* pembuluh darah yang lain baik di otak, jantung, dan lain-lain. Oleh karena itu, terapi renoprotektif harus bertujuan pada tercapainya efek maksimal antialbuminuria. Hasil penelitian ini memperlihatkan kelompok mencit yang diinduksi DXR terjadi peningkatan albuminuria, peningkatan secara bermakna terlihat pada minggu ke-4, sedangkan pada minggu ke-8 peningkatan albuminuria kurang bermakna dibandingkan kelompok kontrol.

Pentoxifylline adalah turunan metilxanthin dengan efek menguntungkan pada aliran darah mikrosirkulasi. Penelitian terkini menunjukkan bahwa PTX mengurangi ekskresi albuminuria pada individu dengan diabetes, baik dengan fungsi ginjal normal dan gagal ginjal. Dalam penelitian sebelumnya peningkatan konsentrasi TNF- α terkait dengan ekskresi albuminuria yang lebih tinggi, pemberian PTX secara bermakna menurunkan TNF- α dan albuminuria.³⁰ TNF- α bersifat sitotoksik terhadap glomerulus, mesangial, dan sel-sel epitel dan dapat menyebabkan kerusakan ginjal yang bermakna.

Pada penelitian ini kelompok kombinasi PTX dan DXR memperlihatkan penurunan albuminuria, penurunan yang bermakna terlihat pada minggu ke-4, namun pada minggu ke-8 penurunannya kurang bermakna daripada kelompok yang hanya diberikan DXR saja.

Berdasarkan prinsip epistemologi, secara keseluruhan hasil penelitian kami mengenai pengaruh DXR sebagai obat nefrotoksik dengan variabel TGF- β 1, kolagen tipe-IV, glomerulosklerosis dan albuminuria, sesuai dengan penelitian Tamaki *et al*,¹³ tetapi pada penelitian ini kami

tambahkan pemberian PTX sebagai obat nefro-protektif. Dari hasil penelitian ini didapatkan pemberian kombinasi DXR+PTX secara bermakna menghambat ekspresi variabel-variabel penyebab nefrotoksik.

Secara keseluruhan manfaat hasil penelitian ini adalah kombinasi DXR+PTX dapat mencegah progresivitas glomerulosklerosis, dan albuminuria akibat pemberian DXR. Pencegahan progresivitas glomerulosklerosis dan albuminuria tersebut akan berefek mengurangi kumulatif sisa-sisa metabolisme protein sehingga dapat mencegah terjadinya sindroma uremia.

Selain itu manfaat ilmiah dari penelitian ini adalah sebagai informasi dalam melengkapi, mengembangkan, memperdalam patogenesis dan respon imun nefrotoksik dan nefroprotektif. Sedangkan manfaat praktisnya adalah sebagai dasar dalam penyempurnaan, pencegahan dan pengelolaan terjadinya glomerulosklerosis dan interstitial fibrosis akibat DXR.

Dalam penelitian ini masih ada dua keterbatasannya, yaitu pertama pemberian PTX pada penelitian ini, kami gunakan dosis terapi yang minimal (sesuai definisi operasional yaitu 1,6 mg/20 g *i.p.*) sehingga untuk mendapatkan efek maksimal masih dimungkinkan untuk ditingkatkan dosisnya. Dimana dosis PTX maksimal yang dianjurkan pada manusia adalah tidak melebihi 1.200 mg/24 jam. Keterbatasan kedua adalah proses glomerulosklerosis dan interstitial fibrosis sampai minggu ke-8 masih progresif. Hal ini terbukti, pada penelitian didapatkan adanya peningkatan kuantitas variabel pada minggu ke-8 yang lebih tinggi dibandingkan minggu ke-4. Sementara penelitian kami dihentikan pada minggu ke-8 (sesuai dengan kerangka operasional penelitian).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian DXR terbukti meningkatkan ekspresi TGF- β 1 yang merangsang bertambahnya ekspresi kolagen tipe-IV, selain itu TGF- β 1 mencegah peningkatan ekspresi MMP-9 sel PMN ginjal, sehingga akan berpengaruh pada menurunnya degradasi kolagen tipe-IV oleh MMP-9, kemudian menyebabkan glomerulosklerosis ginjal, yang akhirnya menyebabkan gangguan fungsi ginjal dan albuminuria. Selanjutnya kombinasi PTX dan DXR mencegah peningkatan ekspresi TGF- β 1 dan meningkatkan ekspresi MMP-9 sel PMN ginjal, yang menurunkan ekspresi kolagen tipe-IV, kemudian menghambat glomerulosklerosis ginjal, yang akhirnya memperbaiki gangguan fungsi ginjal dan albuminuria.

Pada penelitian ini pemberian obat nefroprotektif (PTX) memang bermanfaat untuk mengurangi efek nefrotoksik

DXR, tetapi akan lebih baik bila dibandingkan dengan obat-obatan nefroprotektif lainnya.

Ucapan terima kasih

Ungkapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya peneliti sampaikan kepada Prof. Dr. HA. Guntur Hermawan, dr, SpPD-KPTI, Prof. R. Moh. Yogyantoro, dr, SpPD-KGH, dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Cancer. 2010. Available from URL: <http://www.who.int/cancer>.
2. Wang Y and Wang YP. Role of CD 8th cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int.* 2001; 59:941-49.
3. Erlan JF and Desmant. Transfers of ferritin-bound iron to andriamycin. *FEBS Lett.* 2001;176: 97-100.
4. Robbins and Cotran. General pathology. Basic Pathology Disease. Jakarta. EGC I. 2005;20-43.
5. Blobel GC, Schiemann WP, and Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med.* 2000. 343(3):1350-58.
6. Sankar. Handbook of transcription factor κ B. Boca Raton. CRC ISBN. 2006;8493-2794-6.
7. Gameson R and Reeves WB. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J. Clin Invest.* 2007;110: 835-42.
8. Loscalzo J. Azotemia and urinary abnormalities. In Harrison's Manual of Medicine. 17th edition. New York, McGraw Hill, 2009;274-280.
9. Suryohudoyo P. Oksidan, anti-oksidan dan radikal bebas. Kapita Selekta. Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta. CV Agung Seto. 2000;31-47.
10. Kupsakova, Docolomansky P, Ryber M and Brier A. Carbonyl group of aliphatic side chain on pentoxifyllin does not play role for p.glycoprotein antagonizing effect of pentoxifyllin. *Gen Physiol Biophys.* 2002;21:471-8.
11. Mayes PA. Structure and function of lipophilic vitamin. Harpers Biochemistry. 25th edition. 2003;613-622.
12. Davila ME, Esqueda, Martinez F, and Morales. Pentoxifyllin diminishes the oxidative damage to renal tissue induced streptozotocin in rat. *Experimental Diab Res.* 2004;5:245-51.
13. Tamaki K, Seiya O and Takashi A. TGF- β in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis, of andriamycin nephropathy. *Kidney Int.* 1994;45:525-36.
14. Dorland's. 2002. Illustrated Medical Dictionary. WB Saunders Company, Philadelphia.
15. Kresno SB. 2007. Imunologi: diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi keempat. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
16. Luna LG. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. McGraw-Hill, New York.
17. Tomino Y. Enzyme antibody method. In laboratory techniques in renal cell and molecular biology. Bunkodo Co., Ltd., Tokyo, Japan. 2000;82-93.
18. Susilo I. Ekspresi Protei c-erbB2, p53, pRb dan MIB-1 pada karsinoma duktal payudara insitu, invasif dan metastasis. Naskah Disertasi Program Doktor Studi Ilmu Kedokteran Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. 2006.
19. Bawazier LA. Albuminuri. Buku ajar penyakit dalam: Ed IV. Dept. Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2006.
20. Weir MR. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Nephrol.* 2007;2:581-90.
21. Guntur AH. SIRS dan SEPSIS (Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan). Sebelas Maret University Press. Surakarta. 2006.
22. Baratawidjaja KG dan Iris R. Imunologi dasar. Edisi VIII. FK Universitas Indonesia. Jakarta. 2009.
23. Koli K, Saharinen J, Hyytiainen M, Penttinen C and Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF- β . *Microsc Res Tech.* 2001;52:354-62.
24. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor- β and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton).* 2005;10:48-56.
25. Fang CC, Lai MN, Chien CT, Hung KY, Tsai CC, Tsai TJ, and Hsieh BS. Effects of pentoxifylline on peritoneal fibroblasts and silica-induced peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int.* 2003;23:228-36.
26. Strutz F, Heeg M, Kochsiek T, Siemers G, Zeisberg M, and Muller GA. Effects of pentoxifylline, pentifylline and gamma-interferon on proliferation, differentiation, and matrix synthesis of human renal fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1535-46.
27. Lin SL, Chen YM, Chien CT, Chiang WC, Tsai CC, and Tsai TJ. Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2916-29.
28. Usta Y and Ismailaglu. Effect of pentoxifylline adriamycin (DXR) induced renal disease in rats. *Pediatric Nephrol.* 2004;19:840-43.
29. Guo J, Ananthakrishnan R, Qu W, Lu Y, Reiniger N, Zeng S, Ma W, Rosario R, Yan SF, Ramasamy R, D'Agati V, and Schmidt AM. RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:961-72.
30. Navarro JF, Mora C, Muros M, and Garcia J. Additive antialbuminuric effect of pentoxifylline in patients with type 2 diabetes under angiotensin II receptor blockade: a short-term, randomized controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2119-26.