

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Hati memiliki peran penting pada proses fisiologis karena terlibat dalam berbagai fungsi vital seperti detoksifikasi berbagai obat dan xenobiotik. Penyakit pada hati termasuk salah satu gangguan kesehatan yang paling serius yang dapat diklasifikasikan sebagai hepatitis akut atau kronis (penyakit hati inflamasi), dan sirosis (gangguan degeneratif yang mengakibatkan fibrosis hati). Penyakit hati terutama disebabkan oleh bahan kimia beracun, konsumsi alkohol berlebihan, infeksi, dan gangguan autoimun. Penyakit atau peradangan pada hati yang disebabkan oleh obat atau penggunaan zat kimia ini disebut sebagai *Drug Induced Liver Injury* (DILI).

DILI dapat disebabkan oleh respons langsung terhadap toksisitas obat, dan bertanggung jawab atas 15% kasus gagal hati akut di negara-negara maju (Allison et al., 2023). Salah satu zat kimia yang metabolitnya bersifat toksik adalah etilen glikol. Etilen glikol merupakan turunan alkohol berupa cairan bening, tidak berwarna, tidak berbau, kental dan berasa manis yang sering digunakan sebagai bahan kimia industri. Paparan zat ini dapat menyebabkan terjadinya kegagalan organ. Pada tahun 2020, *American Association of Poison Control* (AAPCC) melaporkan lebih dari 5000 kasus keracunan etilen glikol yang menyebabkan 13 kematian.

Singh et al. (2016) menyimpulkan bahwa keracunan etilen glikol menempati peringkat ketiga penyebab kematian akibat keracunan, setelah etanol dan karbon monoksida. Toksisitas etilen glikol terutama disebabkan oleh metabolit berbahaya etilen glikol, yaitu asam 2-hidroksietoksiasetat (HEAA), yang bertanggung jawab atas tingginya anion gap dan asidosis metabolik, stres



gangguan biokimia. Hal ini pada gilirannya menyebabkan lera ginjal akut, hingga disfungsi hati dalam beberapa kasus. *Scientific Committee on Consumer Product* (EU SCCP), diijinkan untuk digunakan pada produksi pangan karena keamanannya.

Mekanisme toksisitas seluler HEAA meliputi destabilisasi membran melalui efeknya pada fosfolipid dan saluran ion sehingga mengganggu regulasi cairan transelular. Konsentrasi HEAA yang tinggi berperan penting dalam perkembangan asidosis metabolik dan disfungsi hati. Etilen glikol dapat menyebabkan fibrosis, sirosis, dan hepatokarsinoma karena hati bertanggung jawab atas metabolisme dan detoksifikasi sebagian besar komponen termasuk etilen glikol yang masuk ke dalam tubuh (Akash, 2022).

Sebanyak 80% eliminasi etilen glikol melalui metabolisme hati dengan waktu paruh sekitar 3 - 8 jam. Uji preklinis pada tikus menunjukkan 50-70% etilen glikol akan teroksidasi oleh enzim alkohol dehidrogenase menjadi 2-hydroxyethoxyacetaldehyde yang kemudian teroksidasi oleh enzim aldehyde dehidrogenase menjadi 2-hydroxyethoxyacetic acid (HEAA) yang ekskresinya sebagian besar melalui ginjal. (Alkazarji, 2021).

Studi hepatotoksitas terkait etilen glikol pada subjek manusia sebagian besar merupakan laporan kasus yang berhubungan dengan keracunan yang tidak disengaja. Kerusakan hati dan ginjal secara bersamaan pada keracunan akut sangat sering terjadi. Amin (2015) menyimpulkan bahwa pemberian etilen glikol menyebabkan kelainan pada indeks fungsi hati dengan parameter peningkatan kadar Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT) dan Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT), serta terjadinya penurunan berat badan dan kematian pada tikus yang mengindikasikan terjadinya stress oksidatif pada tikus percobaan.

Stres oksidatif, peradangan yang berlebihan, dan metabolisme energi yang tidak teratur berkontribusi secara signifikan terhadap penyakit hati. Oleh karena itu, penemuan obat terapeutik baru untuk pengobatan penyakit hati sangat dibutuhkan. Selama berabad-abad, flavonoid, saponin, alkaloid memiliki efek kesehatan yang bermanfaat pada penyakit kronis telah digunakan untuk mengobati penyakit manusia. Flavonoid terutama meliputi flavon, Dalam mekanisme hepatoprotektif dan molekuler berbagai flavonoid, saponin, triterpenoid menguraikan jaringan jalur seluler dimana penelitian farmakologi dan toksikologi lebih lanjut diperlukan pada pengembangan produk alami ekstrak yang berasal dari



biota laut dengan kandungan senyawa biokatif sebagai obat dengan prospek yang menarik dalam aplikasi klinis (Li et al, 2022).

Salah satu biota laut yang mengandung antioksidan adalah *Holothuria scabra*. *Holothuria scabra* memiliki kandungan polisakarida berupa kondroitin sulfat dan fukoidan, kolagen, asam amino, saponin, flavonoid, tanin, dan steroid (Li et al, 2022). *Holothuria scabra* memiliki nutrisi berkualitas tinggi yang terdiri dari protein, asam-asam amino, vitamin, dan mineral. Berbagai bioaktivitas dari teripang sudah banyak diketahui terutama sebagai antiangiogenik, antikanker, antiokoagulan, anti hipertensi, dan antiinflamasi. Pencegahan kerusakan hati oleh etilen glikol dapat dilakukan dengan mengkonsumsi bahan pangan yang memiliki khasiat sebagai hepatoprotektor. Hepatoprotektor adalah kemampuan suatu senyawa tertentu atau zat berkhasiat dalam bahan pangan yang dapat melindungi maupun memperbaiki sel-sel hati terhadap pengaruh zat toksik yang menyebabkan terjadinya kerusakan hati yang dapat bersifat akut jika tidak ditangani sesegara mungkin (Andayani et al, 2017).

Penelitian yang dilakukan Anitha et al. (2020) menyimpulkan bahwa ekstrak *Holothuria scabra* positif mengandung saponin, alkaloid, steroid, dan triterpenoid dimana saponin dan steroid merupakan senyawa yang paling dominan terkandung pada *Holothuria scabra* yang berpotensi sebagai antioksidan. Kandungan senyawa bioaktif mayor pada *Holothuria scabra* adalah saponin. Saponin merupakan golongan bahan alam yang sangat penting dan banyak dihasilkan oleh teripang dari kelas Holothuroidea. Selain itu, telah ditemukan dua macam senyawa saponin yang terdapat dalam *Holothuria scabra* yaitu Holothurin A dan Holothurin B. Disamping memiliki kandungan saponin yang tinggi, dinding tubuh teripang juga tersusun dari kolagen dalam jumlah yang besar. Kolagen memiliki banyak fungsi dalam memperbaiki jaringan yang rusak (Anitha et al, 2020)



co yang dilakuakn oleh Wargaseria (2023), untuk melihat peran KEAP1 dan iNOS dalam jalur antioksidan dan anti-rawa aktif *Holothuria scabra* menjelaskan bahwa Senyawa *lothurinoside G* yang terkandung dalam *Holothuria scabra* berpotensi tertinggi sebagai agen antioksidan dan anti-inflamasi

karena mereka memiliki potensi untuk menghambat aktivitas protein KEAP1 dan iNOS.

Berdasarkan uraian diatas beberapa senyawa yang terkandung dalam *Holothuria scabra* telah terbukti secara ilmiah mempunyai sifat antioksidan dan antiinflamasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya senyawa aktif ini terbukti dapat meredam radikal bebas dan mencegah berbagai penyakit degeneratif salah satunya yang disebabkan oleh xenobiotik yang memicu peningkatan prevalensi DILI. Peningkatan prevalensi DILI ini pada akhirnya menekankan tingginya kebutuhan akan strategi pencegahan dan pengobatan yang efektif. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak *holothuria scabra* terhadap kerusakan hati tikus putih yang diinduksi etilen glikol.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah yaitu, “bagaimana efek terapi teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap kerusakan hati tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi etilen glikol?”

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek terapi ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap kerusakan hati tikus putih yang diinduksi etilen glikol.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini yaitu:

1. Mengevaluasi efek terapi teripang pasir terhadap fungsi hati tikus putih yang mengalami kerusakan akibat paparan etilen glikol melalui pengukuran kadar SGOT SGPT .
2. Mengevaluasi efek terapi ekstrak teripang pasir terhadap fungsi hati pada tikus putih yang mengalami kerusakan akibat paparan etilen glikol.



gamtan histopatologi.

1 dosis ekstrak teripang pasir yang dapat memberikan efek fungsi hati pada tikus putih yang mengalami kerusakan akibat etilen glikol.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

1.4.1 Manfaat Praktis

1. Penelitian ini dapat memberikan landasan untuk pengembangan terapi baru berbasis teripang pasir yang memiliki potensi protektif terhadap kerusakan hati. Manfaatnya dapat dirasakan dalam pengembangan obat atau suplemen yang dapat membantu melindungi hati dari efek hepatotoksisitas etilen glikol.
2. Memberikan wawasan tentang kemungkinan pencegahan kerusakan hati yang diinduksi oleh zat kimia berbahaya, seperti etilen glikol. Implikasinya dapat berkontribusi pada upaya pencegahan dan perlindungan hati dalam konteks paparan bahan-bahan kimia tertentu.
3. Jika teripang pasir terbukti efektif dalam melindungi hati, hal ini dapat membuka pintu untuk pengembangan alternatif terapi tambahan yang dapat digunakan bersamaan dengan metode pengobatan yang sudah ada.

1.4.2 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini dapat memberikan pemahaman lebih mendalam tentang mekanisme ekstrak teripang pasir terhadap kerusakan hati. Informasi ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut dalam memahami sifat-sifat biokimia dan molekuler yang mendasari efek protektifnya.
2. Temuan ini dapat memberikan kontribusi pada kajian bioteknologi laut dengan menyoroti potensi teripang pasir sebagai sumber bahan bioaktif yang memiliki efek kesehatan positif.
3. Penelitian ini dapat mengembangkan model eksperimental yang dapat digunakan dalam penelitian lanjutan mengenai efek teripang pasir dan kerusakan hati, memberikan dasar bagi penelitian lebih lanjut di bidang ini.



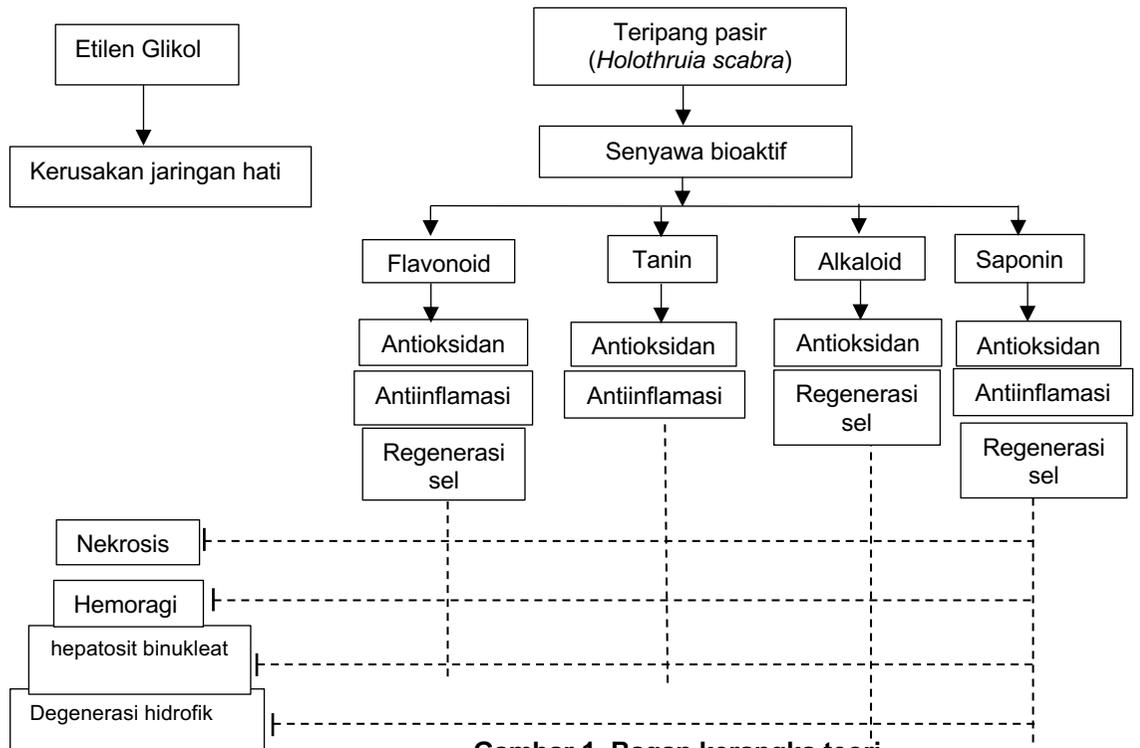
Penelitian ini dapat memberikan sumbangan penting terhadap ilmu dan farmakologi dengan menyediakan informasi tentang teripang pasir sebagai agen hepatoprotektor yang dapat meningkatkan pemahaman kita tentang interaksi antara bahan alam dan

1.5 Hipotesis

Pemberian ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) memiliki efek terapi terhadap kerusakan hati tikus putih yang diinduksi oleh etilen glikol.

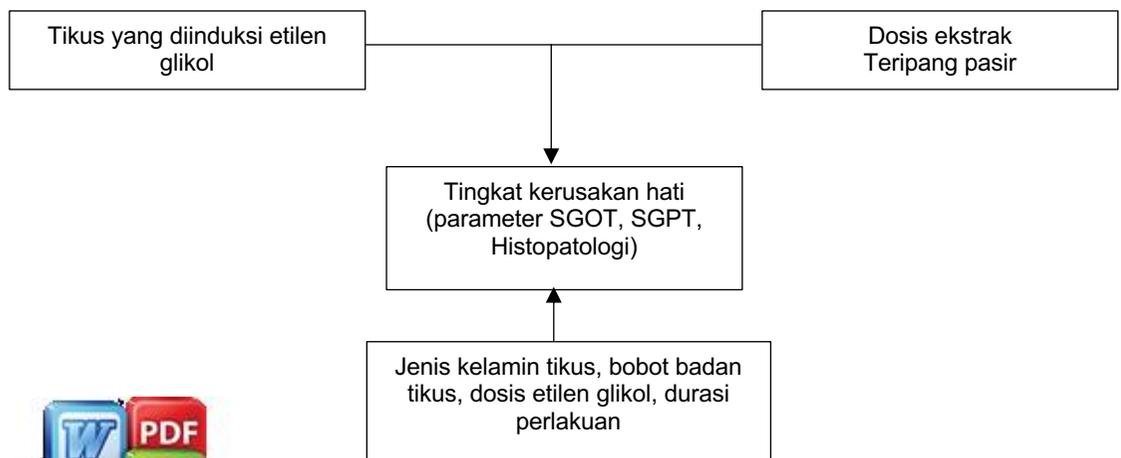


1.6 Kerangka Teori



Gambar 1. Bagan kerangka teori

1.7 Kerangka Konsep



: Tingkat kerusakan hati

: Dosis ekstrak teripang pasir

s kelamin, bobot badan, dosis etilrn glikol, durasi perlakuan

Gambar 2. Bagan kerangka konsep



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Etik Penelitian

Seluruh prosedur penggunaan hewan coba telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dengan Surat Persetujuan Etik Hewan Nomor : 578/UN4.6.4.5.31/PP36/2024

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental labolatorium menggunakan *desain "Pre post test control group design"*. Penelitian menggunakan 30 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* dengan 1 ekor tikus cadangan pada masing-masing kelompok. Tikus yang digunakan berumur 10-16 minggu dengan berat 200-300 gram yang dikelompokkan dengan teknik randomisasi menjadi 5 kelompok.

2.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2024 sampai November 2024. Pembuatan ekstrak teripang pasir, pengujian senyawa fitokimia, dan perlakuan hewan uji dilaksanakan di Labolatorium Fitokimia dan Labolatorium Farmakologi Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Pembuatan preparat histopatologi hati dilaksanakan di Labolatorium Patologi dan Toksikologi Balai Besar Veteriner (BBVeT) Maros, dan pembacaan slide histopatologi hati dilaksanakan di Labolatorium Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

2.4 Penentuan Populasi dan Sampel

2.4.1 Populasi Penelitian



ng digunakan untuk penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus* ur 10 sampai 16 minggu dengan berat badan 200-300 gram Labolatorium Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak. Digunakan 5 kelompok untuk mengetahui bagaimana keadaan normal hati, kerusakan hati yang diinduksi etilen glikol serta pengaruh ekstrak etanol teripang pasir terhadap kerusakan hati tersebut.

2.4.3 Kelompok Perlakuan

1. **Kontrol Kesehatan (KS):** Tikus hanya diberi air suling dan pakan standar.
2. **Etilen Glikol (EG):** Tikus diberi 2 mL etilen glikol (EG) secara oral selama 10 hari, dan tidak diobati selama 14 hari berikutnya.
3. **EG + HSE 500:** Tikus diobati dengan EG, diikuti dengan pemberian ekstrak *Holothuria scabra* secara oral (HSE, 500 mg/kg berat badan) selama 14 hari.
4. **EG + HSE 1000:** Tikus diperlakukan dengan EG dan HSE (1000 mg/kg berat badan) selama 14 hari.
5. **EG + HSE 1500:** Tikus diperlakukan dengan EG dan HSE (1500 mg/kg berat badan) selama 14 hari

2.4.4 Kriteria Inklusi

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif).
2. Memiliki berat badan 200-300 gram.
3. Berjenis kelamin jantan.
4. Berusia \pm 10 sampai 16 minggu.

2.4.5 Kriteria Eksklusi

1. Selama masa observasi tampak sakit atau perilaku tidak normal
2. Tikus yang mati sebelum proses randomisasi

2.5 Bahan dan Alat Penelitian



Alat Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang pasir, aluminium foil, etilen glikol, tikus putih jantan, pakan tikus, masker, sarung tangan, underpad, tissue, ketamin KSI, NaCl dan alat lain yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi

dengan metode paraffin meliputi larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, 80%, 90%, absolute, xilol, akuades, pewarna haematoxylin dan eosin, paraffin, dan reagen SGOT dan SGPT.

2.5.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain box pendingin, kandang hewan percobaan, timbangan, food dehidrator, blender, toples kaca, gelas ukur, batang pengaduk, evaporator, cawan porselin, waterbath, pot sampel, spoit, tabung vacutainer, tabung pipa kapiler hematokrit, sentrifuge, tabung eppendorf, tip dan mikropipet, tabung reaksi, fotometer humalyzer 4000, sonde, gelas beaker, botol sampel, set alat bedah, sarung tangan, dan kamera, neraca analitik, mikroskop elektron olympus cx33, objek glass, cover glass, mikrotom, floating bath, inkubator.

2.6 Prosedur Penelitian

2.6.1 Penyiapan Bahan Uji

Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) diperoleh dari PPLH Puntondo Kab. Takalar, dikumpulkan kemudian disortasi basah lalu dibersihkan kotorannya dengan air mengalir, setelah itu teripang pasir ditimbang kemudian dikeringkan menggunakan food dehidrator, setelah kering teripang pasir dihaluskan hingga menjadi serbuk.

2.6.2 Pembuatan Ekstrak *Holothuria scabra*

Serbuk *Holothuria scabra* dimaserasi dengan etanol 96% dalam wadah maserasi dengan perbandingan pelarut 100 g/L. Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam, terlindung dari sinar matahari, sambil sesekali diaduk. Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring, dan filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental *Holothuria scabra*.

2.6.3 Analisis Skrining Fitokimia



Optimized using
trial version
www.balesio.com

an fitokimia digunakan untuk mendeteksi adanya metabolit kan golongannya dan juga sebagai informasi awal untuk ian senyawa kimia yang mempunyai aktivitas biologis dari m bentuk ekstrak. Pengujian dilakukan terhadap golongan flavonoid, tanin dan saponin yang dilakukan secara kualitatif

dengan reaksi warna atau pengendapan. Skrining fitokimia berfungsi sebagai metode kualitatif untuk mendeteksi keberadaan metabolit sekunder dan memberikan wawasan awal mengenai golongan senyawa kimia bioaktif dalam ekstrak *Holothuria scabra*. Analisis ini menargetkan kelompok senyawa seperti alkaloid menggunakan metode Dragendorff (Sabdoningrum et al., 2021), flavonoid menggunakan metode asam borat (Neumann et al, 2022), tanin menggunakan Uji Ferric chloride ($FeCl_3$) (Gonfa et al., 2020), dan saponin menggunakan asam klorida (HCL) (Rai et al., 2023). Kehadiran masing-masing kelompok yang diuji dikonfirmasi dengan perubahan warna khas atau pembentukan endapan selama reaksi tertentu.

2.6.4 Pembuatan Bahan Uji

Ekstrak etanol teripang pasir ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan rerata berat badan tikus. Setelah ditimbang ekstrak teripang kemudian dilarutkan dengan aquades selanjutnya diambil sebanyak 2 ml dan diberikan kepada tikus secara oral menggunakan sonde selama 14 hari.

2.6.5 Pembuatan larutan Etilen Glikol

Etilen glikol sebanyak 30 mL dimasukkan ke dalam gelas ukur kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL dengan aquades. Tikus diinduksi etilen glikol dengan dosis 20% melalui oral selama 10 hari. Etilen glikol diberikan ke tikus sebesar 2 ml/hari.

2.6.6 Prosedur Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Tikus putih sebelum diberikan perlakuan, terlebih dahulu diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu. Selama proses pemeliharaan tikus diberikan pakan dan minum secara ad libitum. Pemberian perlakuan dilakukan pada minggu kedua setelah proses aklimatisasi yaitu: Kelompok kontrol sehat



di aquades selama 14 hari, kelompok kontrol negatif (EG) etilen glikol dosis 2 ml/grBB selama 14 hari secara oral tanpa teripang, kelompok P1 (**EG + HSE 500**) diinduksi etilen glikol dan diberikan ekstrak etanol teripang pasir dosis 500 mg/Bb secara oral, kelompok P2 (**EG + HSE 1000**) diinduksi etilen glikol

dosis 2 ml/grBB dan diberikan ekstrak teripang pasir dosis 1000 mg/Bb selama 14 hari secara oral, dan kelompok P3 (**EG + HSE 1500**) diinduksi etilen glikol dosis 2 ml/grBB dan diikuti dengan pemberian ekstrak etanol teripang pasir dosis 1500 mg/Bb 14 hari secara oral menggunakan sonde lambung.

2.6.7 Pengukuran Biomarker Serum

Pengambilan darah tikus dilakukan dengan menggunakan mikrohematokrit melalui pleksus retro orbitalis. Sampel darah dimasukkan kedalam tabung vacutainer untuk mendapatkan serumnya. Sampel darah kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit kemudian serum yang diperoleh dimasukkan kedalam tabung eppendrof untuk disimpan didalam lemari pendingin (4°C) hingga pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT.

2.6.8 Analisis Morfologi dan Histopatologi

Tikus dieutanasia melalui dislokasi serviks, dan dilakukan nekropsi untuk mengumpulkan sampel hati. Hati dipotong dengan hati-hati, dibersihkan dari jaringan asing, dikeringkan, dan ditimbang untuk menghitung berat hati relatif menggunakan rumus:

$$\text{Berat relatif hati} = \frac{\text{Berat aboslut hati (g)}}{\text{Berat badan tikus (g)}}$$

Pembuatan preparat histologi:

1. Dilakukan laparatomi pada tikus yang dinarkosis dengan kloroform dan diambil hati untuk dibuat sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan *Hematoksilin & Eosin*.
2. Sampel organ hati difiksasi dengan formalin 10%, kemudian dikirim ke Labolatorium Patologi Toksikologi Balai Besar Veteriner (BBVeT) kemudiaan pembuatan sediaan dikerjakan oleh staff ahli laboratorium terkait.



histopatologi yaitu:

an fiksasi spesimen berupa potongan organ hati yang telah ngan larutan formalin 10%.

an pencucian spesimen dengan air mengalir.

b. *Trimming*

- 1) Mengecilkan organ ± 3 mm.
- 2) Memasukkan potongan organ hati tersebut kedalam *embedding cassette*.

c. *Dehidrasi*

- 1) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
- 2) Melakukan perendaman organ hati berturut-turut dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing-masing selama 2 jam, selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolut I, II, III selama 1 jam.

d. *Clearing*

Membersihkan sisa Alkohol menggunakan xilol I, II, III masing- masing selama 1 jam.

e. *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan parafin I, II, III selama 2 jam.

f. *Embedding*

- 1) Membersihkan sisa parafin yang ada pada pan dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan usap dengan kapas.
- 2) Menyiapkan parafin cair dengan memasukkannya ke dalam cangkir logam kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu diatas 58°C .
- 3) Menuangkan parafin cair ke dalam pan.
- 4) Memindahkan satu-persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
- 5) Memasukkan pan ke dalam air.
- 6) Melepaskan parafin yang berisi potongan hati ke dalam suhu $4-6^{\circ}\text{C}$



i saat.

ig parafin sesuai dengan letak jaringan dengan akan scalpel hangat.

an pada blok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya

eruncing.

9) Memblok parafin siap dipotong dengan mikrotom.

g. *Cutting*

- 1) Melakukan pemotongan pada ruangan dingin.
- 2) Sebelum memotong, dinginkan blok terlebih dahulu.
- 3) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- 4) Memilih lembaran potongan yang paling baik kemudian apungkan pada air dan hilangkan kerutan dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- 5) Memindahkan lembaran jaringan kedalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- 6) Dengan gerakan menyendok ambil lembaran jaringan dengan *slide* bersih dan tempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah untuk mencegah agar tidak ada gelembung udara dibawah jaringan.
- 7) Menempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator (37° C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

h. *Staining dengan Hematoxylin Eosin.*

Setelah jaringan melekat sempurna, pilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan dimasukkan ke dalam zat kimia dengan waktu sebagai berikut:

- 1) zat kimia yang pertama digunakan adalah xilol I, II, III masing-masing 5 menit.
- 2) Zat kimia yang digunakan adalah alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit.
- 3) Zat kimia selanjutnya adalah akuades selama 1 menit.
- 4) Potongan organ dimasukkan dalam zat warna *Hematoxylin* selama



nit.

dian dimasukkan kedalam akuades selama 1 menit dengan

: digoyangkan.

- 6) Potongan organ dicelupkan kedalam alkohol sebanyak 2-3 celupan.
- 7) Potongan organ dibersihkan dengan akuades bertingkat masing-masing 1 dan 15 menit.
- 8) Potongan organ dimasukkan kedalam eosin selama 12 menit.
- 9) Secara berurutan, potongan organ dimasukkan dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit.
- 10) Potongan organ dimasukkan kedalam xilol IV dan V masing-masing selama 5 menit.

i. *Mounting*

j. Membaca slide dengan mikroskop elektron olympus

Slide diperiksa dengan pembesaran 400x

2.7 Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak <i>Holothuria scabra</i>	Pemberian ekstrak etanol <i>Holothuria scabra</i>	Alat ukur dosis	ekstrak <i>Holothuria scabra</i> dengan dosis	Kategorik
Histopatologi hati	Gambaran histopatologi hati dilihat menggunakan mikroskop elektron dengan perbesaran 400x pada 3 lapang pandang untuk menentukan degenerasi hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis dan hemoragi berdasarkan kriteria sebagai berikut: Skor 1 = <10% hepatosit yang mengalami degenerasi hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis dan hemoragi Skor 2 = 11% - 20% hepatosit yang mengalami degenerasi	Mikroskop elektron	Total skoring degenerasi hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis, dan hemoragi	Numerik



hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis dan hemoragi

Skor 3 = 21% -40% hepatosit yang mengalami degenerasi hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis dan hemoragi

Skor 4 = >41 % hepatosit yang mengalami degenerasi hidrofik, hepatosit berinti dua, nekrosis dan hemoragi (Djabir et al, 2021).

2.8 Pemeriksaan Sediaan Histopatologi

Tikus dieutanasia melalui dislokasi serviks, dan nekropsis dilakukan untuk mengumpulkan sampel hati. Jaringan hati difiksasi dalam formaldehida buffer 10% selama 24 jam. Jaringan yang difiksasi menjalani proses dehidrasi menggunakan larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan absolut), diikuti dengan pembersihan dalam xilena. Sampel ditanamkan dalam parafin cair, didinginkan untuk membentuk blok padat, dan dipotong (5 mikron) menggunakan mikrotom. Potongan jaringan diwarnai dengan Hematoxylin-Eosin (HE) untuk pemeriksaan mikroskopis.

Setiap spesimen diamati di bawah mikroskop cahaya yang terhubung ke layar komputer oleh dua pengamat. Penampakan mikroskopis difoto di bawah tiga bidang mikroskopis pada perbesaran 400X. Struktur mikroanatomi hati dianalisis secara semi kuantitatif dan dibuatkan skor derajat kerusakan menggunakan software *ImageJ* dengan ketentuan persen kerusakan diperoleh dengan cara membagi jumlah area kerusakan dengan jumlah 88 total area



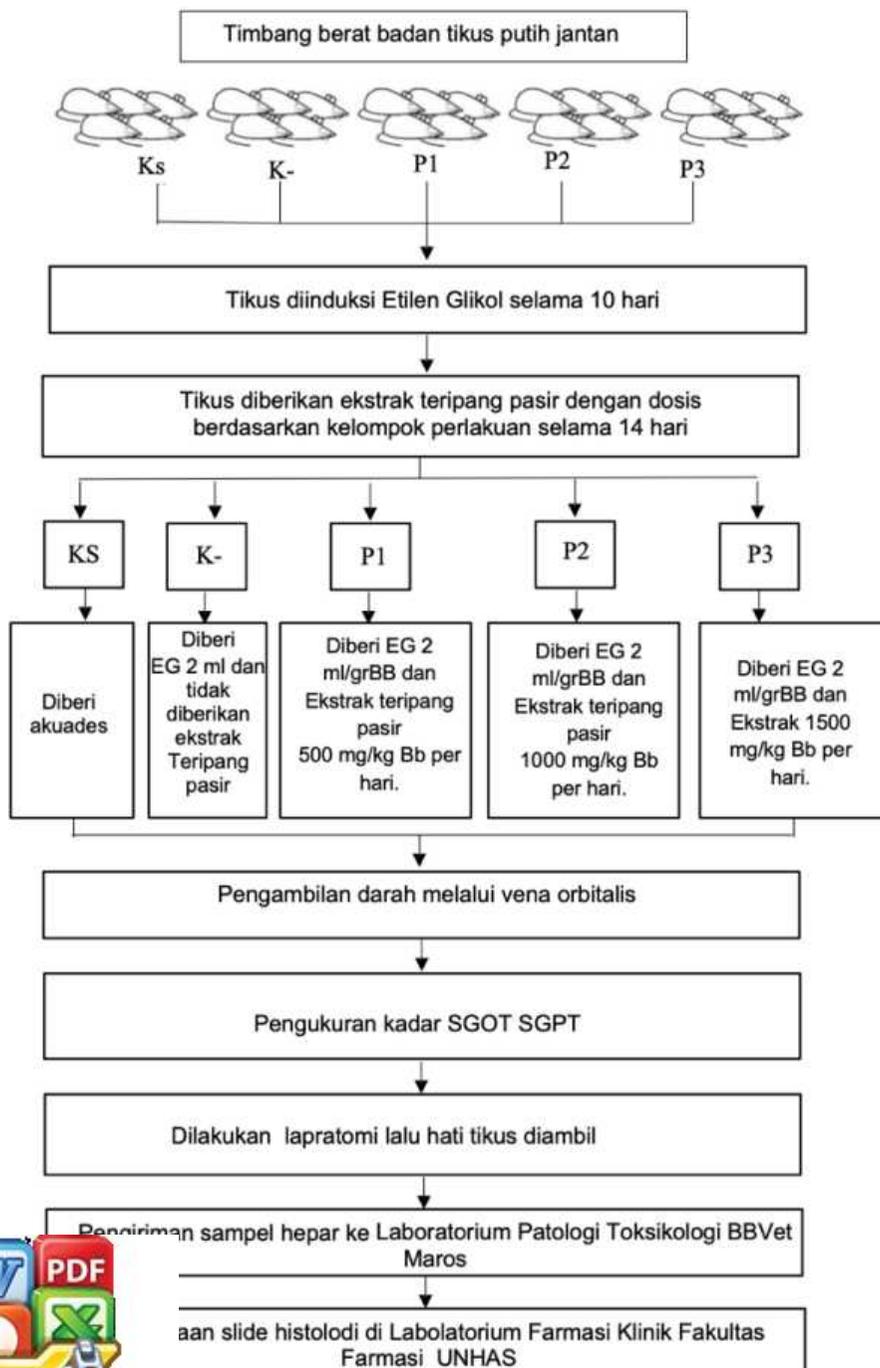
kali 100. Kriteria cedera hati diadopsi dari penelitian oleh . Skor 1 menunjukkan kerusakan normal atau minimal yang)% dari area yang diamati pada perbesaran 400X, skor 2 akan 11-20%, skor 3 menunjukkan kerusakan multifokal (21-enunjukkan kerusakan difus (>41%) (Djabir et al., 2021)

2.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS. Penilaian awal meliputi uji normalitas dan homogenitas untuk menentukan apakah data mengikuti distribusi normal dan homogen. Untuk data yang memenuhi kriteria ini, ANOVA satu arah diterapkan untuk menilai perbedaan antar kelompok, diikuti oleh uji post hoc untuk mengidentifikasi perbedaan spesifik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jika data tidak memenuhi asumsi normalitas atau homogenitas, uji Kruskal-Wallis digunakan sebagai gantinya. Untuk mengevaluasi perbedaan berpasangan antar kelompok, uji Tukey's HSD diterapkan. Data disajikan sebagai mean \pm simpangan baku (mean \pm SD), dengan signifikansi statistik ditetapkan pada $p < 0,05$.



2.10 Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram Alur Penelitian





Optimized using
trial version
www.balesio.com