

Kerusakan ginjal merupakan salah satu masalah kesehatan yang signifikan di seluruh dunia, dengan prevalensi yang terus meningkat akibat berbagai faktor, termasuk paparan zat beracun, penyakit metabolik, dan penggunaan obat-obatan tertentu yang memengaruhi harapan hidup dan kualitas hidup pasien. Ginjal, organ penting tubuh manusia dan hewan, bertanggung jawab untuk mengeluarkan sisa metabolisme dan menjaga keseimbangan cairan dan elektrolit.

Paparan EG akut (jangka pendek) pada manusia melalui rute oral dapat menyebabkan dampak kesehatan dalam tiga tahap yaitu depresi pada sistem saraf pusat (SSP), gangguan cardiopulmonary, dan kerusakan ginjal. Dalam studi lain, setiap orang terpapar EG pada tingkat rendah melalui rute inhalasi selama satu bulan. Hasil menunjukkan bahwa ini menyebabkan masalah iritasi pada tenggorokan dan saluran pernapasan bagian atas. Selain itu, tikus dan mencit yang secara kronis terpapar EG melalui pakan yang mereka konsumsi menunjukkan dampak buruk pada ginjal dan hati. Demikian pula, beberapa penelitian pada hewan pengerat yang terpapar melalui rute per oral atau inhalasi menunjukkan bahwa EG bersifat fetotoksik (BPOM RI, 2023).

Walean et al., (2018) menemukan bahwa pemberian etilen glikol menyebabkan kerusakan pada glomerulus dan tubulus ginjal, yang ditandai dengan adanya endapan mikrokrystal di dalam lumen tubulus, adanya endapan mikrokrystal di dalam lumen tubulus, adanya endapan mikrokrystal di dalam lumen tubulus. Mekap. (2011) dan Schaldt et al., (1998) menyatakan bahwa etilen glikol menyebabkan kerusakan pada glomerulus dan deposisi kristal dalam histopatologi ginjal. Pada litiasis oleh etilen glikol. Pada lapisan epitelium, tubulus mengalami degenerasi. Gagalnya filtrasi glomerulus dikaitkan dengan adanya endapan mikrokrystal dalam lumen tubulus (Mahriani et al., 2021). Jika kemampuan filtrasi



glomerulus menurun, sel darah, protein, dan zat toksik dapat keluar bersama urin atau tertimbun dalam lumen tubulus (Pongoh et al., 2019).

Metabolisme etilen glikol menghasilkan beberapa jenis radikal bebas dan metabolit reaktif, yang dapat berkontribusi pada stres oksidatif dan toksisitas. Beberapa metabolit kunci yang dihasilkan yaitu glikolaldehid, salah satu metabolit pertama yang terbentuk dan dapat menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) selama metabolisme. Asam glikolat, metabolit ini dapat menyebabkan produksi radikal bebas, yang berkontribusi pada asidosis metabolik dan kerusakan sel. Asam glikoksilat, senyawa ini dimetabolisme lebih lanjut dan juga dapat menghasilkan radikal bebas, yang dapat memperburuk stres oksidatif. Asam oksalat, pembentukan kristal kalsium oksalat dari asam oksalat dapat menyebabkan kerusakan ginjal dan terkait dengan peningkatan stres oksidatif. Spesies Oksigen Reaktif (ROS), sepanjang proses metabolisme, berbagai ROS dihasilkan, yang dapat menyebabkan kerusakan pada komponen seluler, termasuk lipid, protein, dan DNA. Addukt radikal, penelitian menunjukkan bahwa etilen glikol dapat membentuk addukt radikal, yang menunjukkan adanya radikal bebas selama keracunan akut (Kadiiska & Mason, 2000).

Antioksidan diperlukan untuk mencegah terjadinya reaksi oksidatif, yang berperan penting dalam penghambatan terjadinya berbagai penyakit degeneratif seperti efek buruk dari paparan zat nefrotoksik yaitu etilen glikol. Apabila jumlah radikal bebas dan spesies reaktif dalam tubuh melebihi kemampuan antioksidan endogen, maka tubuh memerlukan asupan antioksidan yang didapat dari luar. Senyawa antioksidan pada teripang pasir akan memberikan gugus hidroksilnya kepada etilen glikol untuk menstabilkan sifat radikal yang dibentuk sehingga mengurangi tingkat ketoksikan pada ginjal. Gugus hidroksil akan memberikan OH pada tingkat keelektronegatifan yang rendah sehingga mudah berikatan (Werdhasari, 2014).

Dalam upaya untuk mengatasi masalah ini, penelitian tentang agen pelindung ginjal menjadi semakin penting. Salah satu sumber yang menjanjikan adalah teripang pasir (*Holothuria scabra*), yang dikenal memiliki berbagai manfaat kesehatan. Teripang pasir (*Holothuria scabra*) adalah spesies teripang yang banyak ditemukan di perairan Indonesia. Selama bertahun-tahun, teripang pasir telah digunakan dalam pengobatan tradisional. Sifat antiinflamasi dan antioksidan dari teripang pasir, organisme laut yang kaya akan senyawa bioaktif, telah dikenal memiliki kemampuan untuk melindungi organ tubuh, termasuk ginjal, dengan memiliki potensi sebagai agen perlindungan ginjal. Dalam hal ini, teripang pasir (*Holothuria scabra*) muncul sebagai organisme laut yang menarik untuk dipelajari

penelitian yang lebih mendalam.

Sumber potensial obat tersebut adalah invertebrata laut, yaitu penelitian terkait senyawa dalam teripang dalam dekade terakhir. Senyawa aktif yang diidentifikasi secara kimia dari hewan ini cukup beragam, seperti glikosaminoglikan (mukopolisakarida) termasuk heparin, fukosilasi sulfat dan fucan sulfat, peptida, fosfolipid dan



glikolipid, termasuk glikosfingolipid (serebrosida), asam lemak tak jenuh ganda, fenol, dan glikosida triterpen (saponin) (Putra et al., 2021).

Berbagai bioaktivitas dari teripang sudah banyak diketahui terutama sebagai antiangiogenik, antikanker, antiokoagulan, anti hipertensi, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antitrombotik, dan sebagai penyembuh luka. Bioaktivitas teripang ini berkaitan dengan kandungan senyawa-senyawa aktif terutama saponin, chondroitin sulfat, glikosaminoglikan, polisakarida sulfat, sterol, peptida, cerberosides dan lektin (Bordbar et al, 2011). Senyawa antioksidan dari teripang juga membantu mengurangi kerusakan sel dan jaringan tubuh, efek antinosisetif (penahan rasa sakit) dan anti-inflamasi (mengurangi peradangan) (Karnila, 2011).

Teripang sendiri mempunyai khasiat yang demikian banyak karena memiliki kandungan gizi yang lengkap. Teripang telah dikenal dengan baik sebagai obat tonik dan obat dalam literatur Cina dan Malaysia untuk mengobati sebagai hipertensi, asma, rematik, luka dan luka bakar. Penelitian terkait aktivitas biologis dan farmakologis dari teripang, yang diekstraksi dari spesies teripang yang berbeda membuktikan potensinya sebagai antiinflamasi. Senyawa yang diduga berpotensi sebagai antiinflamasi di dalam teripang antara lain saponin, flavonoid, asam lemak yaitu eicosapentaenat (EPA), dan docosahexaenat (DHA) (Putra et al., 2021).

Teripang pasir (*Holothuria scabra*) dikenal mengandung banyak senyawa bioaktif, termasuk glikosaminoglikan, kolagen, dan saponin, yang telah terbukti memiliki potensi bermanfaat bagi kesehatan. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa teripang pasir dapat melindungi organ tertentu, termasuk ginjal dari kerusakan. Namun, belum banyak penelitian yang mempelajari potensi perlindungan teripang pasir terhadap kerusakan yang diinduksi oleh etilen glikol. Memanfaatkan biota laut adalah tujuan dari bioteknologi kelautan yang berkembang pesat, salah satunya dengan ekstraksi senyawa bioaktif sebagai obat-obatan dan bahan farmasi yang memiliki efek pengobatan untuk berbagai penyakit (Kalorbobir dan Watuguly, 2017).

Teripang pasir (*Holothuria scabra*) dapat menjadi sumber biofarma baru melalui proses pemisahan senyawa aktif atau ekstraksi. Selain dua glikosida yang telah dikenal, holothurin A dan holothurin B, yang telah ditemukan dari fraksi n-butanol, ekstrak teripang mengandung senyawa triterpen glikosida baru. Metabolit sekunder *Holothuria scabra* sangat banyak. Ini termasuk steroid, sapogenin, saponin, triterpenoid, glikosaminoglikan, lektin, alkaloid, fenol, flavonoid, dan holostan. berdasarkan kandungan metabolit sekunder dari *H. scabra* sehingga dapat digunakan sebagai antikoagulan dan antitrombotik, menurunkan kadar kolesterol dan lemak darah, antikanker dan antitumor, antibakteri, imunostimulan, antijamur,

dan antirematik karena kandungan senyawa bioaktifnya (Kalorbobir dan Watuguly, 2017).

Kalorbobir dan Watuguly, (2016), senyawa antioksidan yang banyak terdapat pada teripang pasir, seperti caratenoid, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E. Selain itu, teripang pasir juga mengandung polifenol, asam dokosaheksaenoat (DHA), dan asam lemak tak jenuh ganda (EPA), serta kondroitin sulfat, dan senyawa bioaktif yang ditemukan pada teripang pasir, seperti saponin (triterpen glikosida), memiliki kemampuan



untuk memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh penyakit. Senyawa-senyawa bioaktif ini sangat berpotensi dalam memperbaiki kerusakan dalam tubuh (Wafa et al., 2014). Senyawa-senyawa antioksidan yang terdapat pada teripang pasir seperti flavonoid, tannin, saponin, dan terpenoid dapat melindungi ginjal dari paparan zat nefrotoksik, memperbaiki fungsi ginjal yang rusak, dan mencegah perkembangan kerusakan ginjal (Fitriani & Eri, 2023).

Dengan melibatkan tinjauan mendalam terhadap keterkaitan antara teripang pasir dan kerusakan ginjal yang diinduksi oleh etilen glikol, penelitian ini dapat memberikan kontribusi signifikan terhadap pengetahuan ilmiah dan aplikasi klinis di bidang nefrologi dan bioteknologi laut. Penelitian yang terkait dengan hal ini masih terbatas, sehingga peneliti tertarik melakukan penelitian ini.

Penelitian preklinik mengenai efek protektif teripang pasir terhadap kerusakan ginjal menjadi penting untuk mengisi celah pengetahuan ini. Dengan memahami mekanisme aksi teripang pasir dan dampaknya pada tingkat histopatologis ginjal, penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk pengembangan terapi protektif ginjal baru. Selain itu, hasil penelitian ini dapat memiliki implikasi praktis dalam pengembangan strategi pencegahan dan perlindungan terhadap kerusakan ginjal yang disebabkan oleh paparan etilen glikol.

Dengan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi teripang pasir sebagai agen pelindung terhadap kerusakan ginjal yang diinduksi oleh etilen glikol pada tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru mengenai penggunaan teripang sebagai terapi alternatif dalam pengobatan kerusakan ginjal, serta membuka jalan untuk penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme dan aplikasi klinis dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam teripang pasir.

1.2 RUMUSAN MASALAH

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

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek protektif ekstrak teripang pasir terhadap kerusakan ginjal tikus putih yang diinduksi etilen glikol.



ius

a penelitian ini yaitu untuk:

ek protektif teripang pasir terhadap fungsi ginjal pada tikus putih
kerusakan akibat etilen glikol melalui pengukuran kadar urea

- b. Mengevaluasi efek protektif teripang pasir terhadap fungsi ginjal pada tikus putih yang mengalami kerusakan akibat etilen glikol melalui pengamatan histopatologi.
- c. Menentukan dosis ekstrak yang dapat memberikan efek protektif terhadap fungsi ginjal pada tikus putih yang mengalami kerusakan akibat etilen glikol.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

1.4.1 Manfaat Praktis

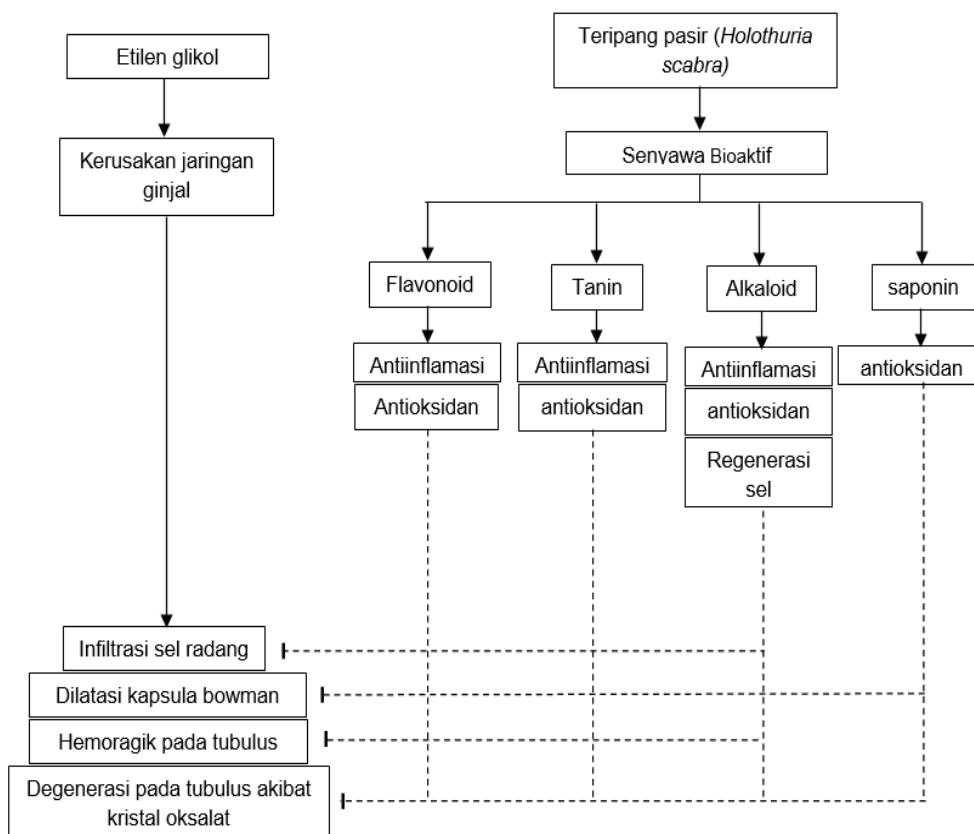
- a. Penelitian ini dapat memberikan landasan untuk pengembangan terapi baru berbasis teripang pasir yang memiliki potensi protektif terhadap kerusakan ginjal. Manfaatnya dapat dirasakan dalam pengembangan obat atau suplemen yang dapat membantu melindungi ginjal dari efek nefrotoksik etilen glikol.
- b. Hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan tentang kemungkinan perlindungan dari kerusakan ginjal yang diinduksi oleh zat kimia berbahaya, seperti etilen glikol. Implikasinya dapat berkontribusi pada upaya perlindungan ginjal dalam konteks paparan bahan-bahan kimia tertentu.
- c. Jika teripang pasir terbukti efektif dalam melindungi ginjal, 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

- a. Penelitian ini dapat memberikan pemahaman lebih mendalam tentang mekanisme protektif teripang pasir terhadap kerusakan ginjal. Informasi ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut dalam memahami sifat-sifat biokimia dan molekuler yang mendasari efek protektifnya.
- b. Temuan ini dapat memberikan kontribusi pada kajian bioteknologi laut dengan menyoroti potensi teripang pasir sebagai sumber bahan bioaktif yang memiliki efek kesehatan positif.
- c. Penelitian ini dapat mengembangkan model eksperimental yang dapat digunakan dalam penelitian lanjutan mengenai efek protektif teripang pasir dan kerusakan ginjal, memberikan dasar bagi penelitian lebih lanjut di bidang ini.
- d. Hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangan penting terhadap ilmu kedokteran dan farmakologi dengan menyediakan informasi tentang potensi teripang pasir sebagai agen protektif ginjal, memperkaya pemahaman kita tentang interaksi antara bahan alam dan organ tubuh.

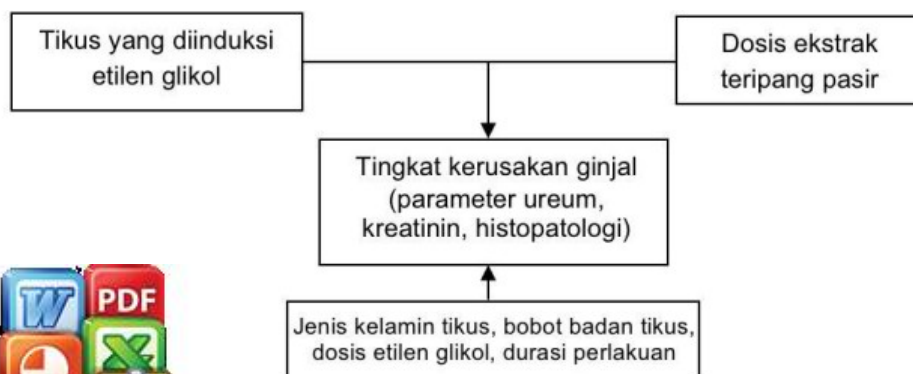


1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Bagan kerangka teori

1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Bagan kerangka konsep



Keterangan:

Variabel dependen: Tingkat kerusakan ginjal

Variabel independen: Dosis ekstrak teripang pasir

Variabel kontrol: jenis kelamin, bobot badan, dosis etilen glikol, durasi perlakuan

1.7 Hipotesis

Pemberian ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) memiliki efek protektif terhadap kerusakan ginjal yang diinduksi oleh etilen glikol pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Etik Penelitian

Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Perguruan Tinggi Negeri Universitas Hasanuddin, Makassar dengan nomor surat persetujuan etik: 579/UN4.6.4.5.31/PP36/ 2024.

2.2 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Pre post test control group design*”. Desain penelitian ini termasuk dalam kategori eksperimental karena melibatkan manipulasi variabel independen (ekstrak teripang pasir) untuk mengamati efeknya pada variabel dependen (tingkat kerusakan ginjal yang diinduksi oleh etilen glikol).

2.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Farmakologi Toksikologi, dan Laboratorium Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Balai Besar Veteriner (Bbvet) Maros.

2.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – November 2024.

2.4 Populasi dan Sampel Penelitian

2.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

2.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan sesuai dengan kriteria.



1. Jantan
2. Galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan keturunan murni dan belum pernah digunakan dalam penelitian apapun.
3. Sehat (aktif bergerak aktif)
4. Berat badan 200-300 gram

b. Kriteria Eksklusi

- Selama observasi 7 hari tampak sakit atau perilaku tidak normal
- Tikus yang mati sebelum proses randomisasi

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 5 ekor tikus.

2.5 Alat dan Bahan

2.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas, blender, evaporator, botol sampel, kandang tikus 1 set, neraca analitik, sringe/spoit, canula, tabung vacutainer merah, pipa hematokrit, tabung Eppendorf, alat bedah, handschoen, waterbath, food dehydrator, pot organ, mikrotom, object glass, dan mikroskop kamera, hotplate, *Creatinine kit*, *Ureum kit*.

2.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel teripang pasir (*Holothuria scabra*), etanol 96%, aluminium foil, tikus wistar (*Rattus norvegicus*), pakan, sekam padi/kayu, akuades, alkohol, kapas, masker, sarung tangan, ketamin, eter, formalin, xylol, paraffin, pewarnaan Hematoksilin dan Eosin.

2.6 Prosedur Penelitian

2.6.1 Persiapan alat dan bahan

Alat-alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu. Adapun lokasi pengambilan sampel *Holothuria scabra* yaitu di PPLH Puntondo, Takalar yang kemudian dibawa ke laboratorium farmasi Fakultas Farmasi UNHAS untuk dilakukan ekstraksi. 25 ekor tikus jantan dipelihara dan diadaptasikan selama 7-10 hari pada kandang berukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm. Selama pemeliharaan, tikus diberi pakan pellet sebanyak 20 gram dan diberi minum secara ad libitum.

2.6.2 Ekstraksi

Simplisia *Holothuria scabra* diperoleh dari *Holothuria scabra* yang dibekukan, dicuci dengan air, lalu dipotong kecil, kemudian dikeringkan menggunakan *food dehydrator* lalu diblender dan ditimbang lalu diekstraksi. Ekstraksi *Holothuria scabra* dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. *Holothuria scabra* yang sudah diblender halus kemudian dimasukkan ke dalam botol, dan direndam dengan pelarut dengan perbandingan 1:2 (b/v) dalam aluminium foil selama 24 jam pada suhu ruang. Pelarut dikawatirkan dan diulangi sebanyak tiga kali. Sebelum pergantian pelarut, sampel dikawatirkan, disaring hingga menghasilkan maserat. Maserat 1, 2, 3 dicampurkan menjadi satu kemudian disaring kembali dan



selanjutnya diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan 80-150 rpm hingga pelarut menguap sempurna yang ditandai dengan ekstrak berwujud kental, yaitu berupa pasta kemudian dimasukkan ke botol sampel, sehingga diperoleh ekstrak kental etanol *Holothuria scabra*.

2.6.3 Uji kualitatif fitokimia

Uji kualitatif fitokimia dari ekstrak teripang pasir dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan reagen spesifik. Kehadiran alkaloid diidentifikasi dengan menggunakan plate KLT dengan reagen Dragendorff yang baru, menghasilkan pewarnaan oranye-cokelat yang menunjukkan adanya alkaloid. Flavonoid terdeteksi menggunakan metode asam borat, dengan perubahan warna menjadi hijau kekuningan yang mengonfirmasi keberadaan flavonoid. Tanin diidentifikasi menggunakan reagen Ferric Chloride (FeCl_3), yang menghasilkan warna biru-hitam (Sureshkumar, 2021). Triterpenoid dikonfirmasi dengan munculnya noda merah-ungu setelah perlakuan dengan reagen Liebermann-Burchard. Saponin diuji dalam tabung reaksi dengan mengencerkan ekstrak dalam air; pembentukan busa stabil setelah dikocok menunjukkan adanya saponin (Godlewska et al., 2022).

2.6.4 Perlakuan hewan coba

Tikus dikelompokkan dalam 5 kelompok dengan masing-masing 5 ekor tikus tiap kelompoknya.

- Kelompok 1 sebagai kontrol sehat (KS): tidak diberi ekstrak teripang pasir maupun paparan etilen glikol, tetapi diberikan akuades 2 ml per hari.
- Kelompok 2 sebagai kontrol negatif (EG): diberi etilen glikol sebanyak 2 ml per hari secara oral selama 10 hari, tidak diberi ekstrak teripang pasir tetapi diberikan akuades 2 ml per hari selama 14 hari.
- Kelompok 3 sebagai perlakuan 1 (EG + ETP 500): dipaparkan etilen glikol sebanyak 2 ml per hari selama 10 hari berturut-turut, kemudian diberi ekstrak teripang pasir 500 mg/kgbb secara oral selama 14 hari berturut-turut.
- Kelompok 4 sebagai perlakuan 2 (EG + ETP 1000): dipaparkan etilen glikol sebanyak 2 ml per hari selama 10 hari berturut-turut, kemudian diberi ekstrak teripang pasir 1000 mg/kgbb secara oral selama 14 hari berturut-turut.
- Kelompok 5 sebagai perlakuan 3 (EG + ETP 1500): dipaparkan etilen glikol sebanyak 2 ml per hari selama 10 hari berturut-turut, kemudian diberi ekstrak teripang pasir 1500 mg/kgbb secara oral selama 14 hari berturut-turut.



dari penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa teripang 500 mg/kg memberikan efek perbaikan pada hati tikus yang iracetamol (Abdulkadir dan Robert, 2018).

2.6.5 Induksi etilen glikol

Dosis yang digunakan untuk induksi etilen glikol adalah 30%. Sebanyak 30 ml etilen glikol dilarutkan pada aquades steril sebanyak 70 ml untuk membuat stok etilen glikol sebanyak 100 ml. Tikus diinduksi etilen glikol dengan dosis 30% melalui oral menggunakan canula selama 10 hari. Etilen glikol diberikan ke tikus sebesar 2 ml/kgBB per hari (Nielsen dan Ole, 2013).

2.6.6 Pengambilan darah

Pengambilan darah diambil melalui plexus retroorbitalis pada mata dilakukan sebanyak 2 kali sebelum induksi etilen glikol dan setelah treatment ekstrak teripang pasir. Jumlah darah yang akan diambil 3 ml dengan menggunakan pipa kapiler atau hematokrit untuk memungkinkan pengambilan volume darah yang lebih besar tanpa merusak sel-sel darah. Darah dimasukkan ke dalam tabung vacutainer tutup merah lalu di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum yang diperoleh dimasukkan kedalam tabung Eppendorf untuk disimpan dalam lemari pendingin (4°C) hingga pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin dilakukan.

2.6.7 Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin

Untuk mengetahui fungsi ginjal, biasanya dinilai kadar kreatinin dan ureum. Kreatinin adalah hasil metabolisme otot yang dihasilkan oleh kreatin. Ureum adalah hasil metabolisme protein dalam tubuh, jika terjadi gangguan atau kerusakan pada ginjal, kadar zat ini dapat meningkat (Tuldjanah et al, 2021). Pemeriksaan ureum dan kreatinin dilakukan menggunakan alat *HumaLyzer 4000 Human* dan dilakukan sebanyak 2 kali sebelum induksi etilen glikol dan setelah treatment pemberian ekstrak teripang pasir. Cara untuk mengukur kadar ureum adalah sampel serum sebanyak 10 µL dan reagen 1 sebanyak 1000 µL atau 1 mL dicampur kemudian di homogenkan. Setelah homogen, inkubasi pertama dilakukan secara eksternal selama 3 menit pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan penambahan reagen 2 sebanyak 1000 µL atau 1 mL. Kemudian dilakukan inkubasi kedua secara eksternal selama 5 menit pada suhu 37°C. Lalu diukur absorbansinya dan nilai akan muncul pada layar *Humalyzer* tersebut. Hasilnya dinyatakan dalam satuan seperti miligram per desiliter (mg/dL).

Pengukuran kadar kreatinin dapat dilakukan dengan cara mencampur PIC dan NaOH dengan perbandingan 1:4 lalu dihomogenkan untuk mendapatkan *working reagent*. Setelah itu sampel serum diambil sebanyak 100 µL dan *working reagent* kemudian dihomogenkan. Setelah homogen, internal dalam humalyzer selama 90 detik pada suhu 37°C bsorbansinya dan nilai akan muncul pada layar *Humalyzer* dinyatakan dalam satuan seperti miligram per desiliter (mg/dL) iter (µmol/L). Kadar ureum tikus normal yaitu 13,9-28,3 mg/dL eatinin tikus normal adalah 0,3 -1,0 mg/dL (Anshar et al, 2018).



2.6.8 Pemberian ekstrak

Ekstrak *Holothuria scabra* yang dalam bentuk pasta, sebelum diberikan harus diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan aquades. Pemberian ekstrak *Holothuria scabra* diberikan secara per oral dan dosis pemberian sesuai dengan masing-masing perlakuan.

2.6.9 Pembuatan preparat histologi

Pembuatan preparat histologi dimulai dengan pengambilan organ ginjal hewan coba yang dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai. Setiap tikus pada tiap kelompok diterminasi atau dibius terlebih dahulu dengan kloroform dengan tujuan untuk membebaskan dari rasa nyeri, stress, dan kecemasan. Kemudian dibedah dan diambil organ ginjal dan dibuat sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksin-Eosin. Adapun tahapan kerjanya yaitu (Santi et al, 2018):

- a. Fiksasi (*fixation*): Jaringan difiksasi dengan buffer formalin 10 % pada pH 7,0-7,4 selama 12-18 jam.
 - b. Dehidrasi (*dehydration*): Jaringan dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi yang makin meningkat yaitu etanol 70%, etanol 90%, etanol 95%, dan etanol 100%.
 - c. Pembeningan (*Clearing*): Jaringan dimasukkan ke dalam xylol I selama 1 jam selanjutnya dimasukkan ke dalam xylol II lalu diinkubasi selama ½-1 jam.
 - d. Pembenaman (*embedding/impregnasi*): Jaringan dimasukkan dalam parafin dengan suhu lebur rendah kira-kira 56 – 59°C selama ½ jam.
 - e. Pemblokkan (*blocking*): Pembuatan blok parafin
 - f. Pemotongan dan perekatan (*sectioning and Mouting*) dengan cara blok parafin yang mengandung preparat direkatkan pada tempatnya di mikrotom. Pisau mikrotom diletakkan di tempatnya dengan sudut kemiringan 20-30° selanjutnya preparat dipotong dengan ketebalan antara 4 - 6 µm dengan cara pemotongan secara teratur dan ritmis, jaringan dipotong secara melintang. Pita-pita parafin yang awal tanpa jaringan dibuang sehingga didapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan. Pita yang mengandung jaringan kemudian dipindahkan dengan kuas yang telah dibasahi air diletakkan pada permukaan waterbath suhu 37 - 40 °C, dibiarkan beberapa saat sampai pita tersebut mengembang. Selanjutnya kaca objek yang telah disalut dengan poly L- lisine dimasukkan ke dalam waterbath dan menggerakkannya ke arah pita parafin dengan menggunakan kuas ditempelkan pada kaca objek, setelah melekat kaca objek pada suhu kamar selanjutnya diletakkan di dalam oven selama 24 jam dengan suhu 60°C selama satu malam.
- atoksilin-Eosin:
- : preparat/ slide direndam dalam larutan xylol I, II dan III dalam masing-masing selama 5 menit lalu dilakukan rehidrasi dengan etanol dengan konsentrasi menurun dari etanol 100%, 95%,



80% selama masing-masing 3 menit, selanjutnya dicuci dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

- 2) *Counter staining*: Direndam slide dalam chamber berisi larutan Hematoxyllin-Eosin (HE) biarkan 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir.
- 3) *Clearing* : Dihilangkan air sekitar slide lalu dehidrasi menurun dengan etanol 80, 95%, 100% selama masing-masing 5 menit selanjutnya di rendam dalam xilol I,II,III selama masing-masing 5 menit.
- 4) *Mounting* : Ditetesi counter glass pada kedua sisinya kemudian direkatkan. Hindari jangan sampai slide kering dan ada gelembung.
- 5) Diinkubasi pada suhu kamar selama ± 1 minggu.

2.6.10 Pengamatan

Slide diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Setiap preparat ginjal diambil 3 lapang pandang kemudian struktur mikroanatomi ginjal dianalisis secara semi kuantitatif dan dibuat skor derajat kerusakan ginjal.

2.7 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

2.7.1 Ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*)

Didefinisikan sebagai spesimen teripang pasir yang diambil dari PPLH Puntondo, Takalar dan dilakukan pemilihan spesimen (ukuran dan kondisi spesimen), lalu dilakukan ekstraksi teripang pasir dengan metode maserasi dengan pelarut alkohol 96%, selanjutnya dilakukan pemberian ekstrak teripang pasir sesuai dengan metode meliputi dosis, rute pemberian dan lama pemberian.

2.7.2 Kerusakan ginjal

Parameter ini dapat diukur melalui pemeriksaan kadar ureum, kreatinin dan histopatologi ginjal tikus putih. Kadar ureum tikus normal yaitu 13,9-28,3 mg/dL sedangkan untuk kreatinin tikus normal adalah 0,3 -1,0 mg/dL (Anshar et al, 2018). Analisis histopatologi ginjal meliputi evaluasi struktur sel ginjal (penilaian mikroskopis terhadap struktur sel ginjal tikus putih untuk mengidentifikasi perubahan patologis) dan pemberian skor histopatologi (penggunaan skala tertentu untuk memberikan nilai pada tingkat kerusakan ginjal berdasarkan analisis histopatologi).



ata

1 data berat ginjal dan morfologi ginjal

pembedahan dan pengambilan organ ginjal tikus, kemudian ng dan diamati keadaan morfologisnya.

2.8.2 Penentuan kerusakan ginjal

Struktur mikroanatomi ginjal dianalisis secara semi kuantitatif dan dibuat skor derajat kerusakan. Skoring menggunakan *software* ImageJ dengan ketentuan 88 area lapang pandang pengamatan tiap gambar. Persen kerusakan diperoleh dengan cara membagi jumlah area kerusakan dengan jumlah total area 88 lapang pandang dikali 100.

Tabel 1. Skoring histopatologi ginjal (Wibowo et al., 2012)

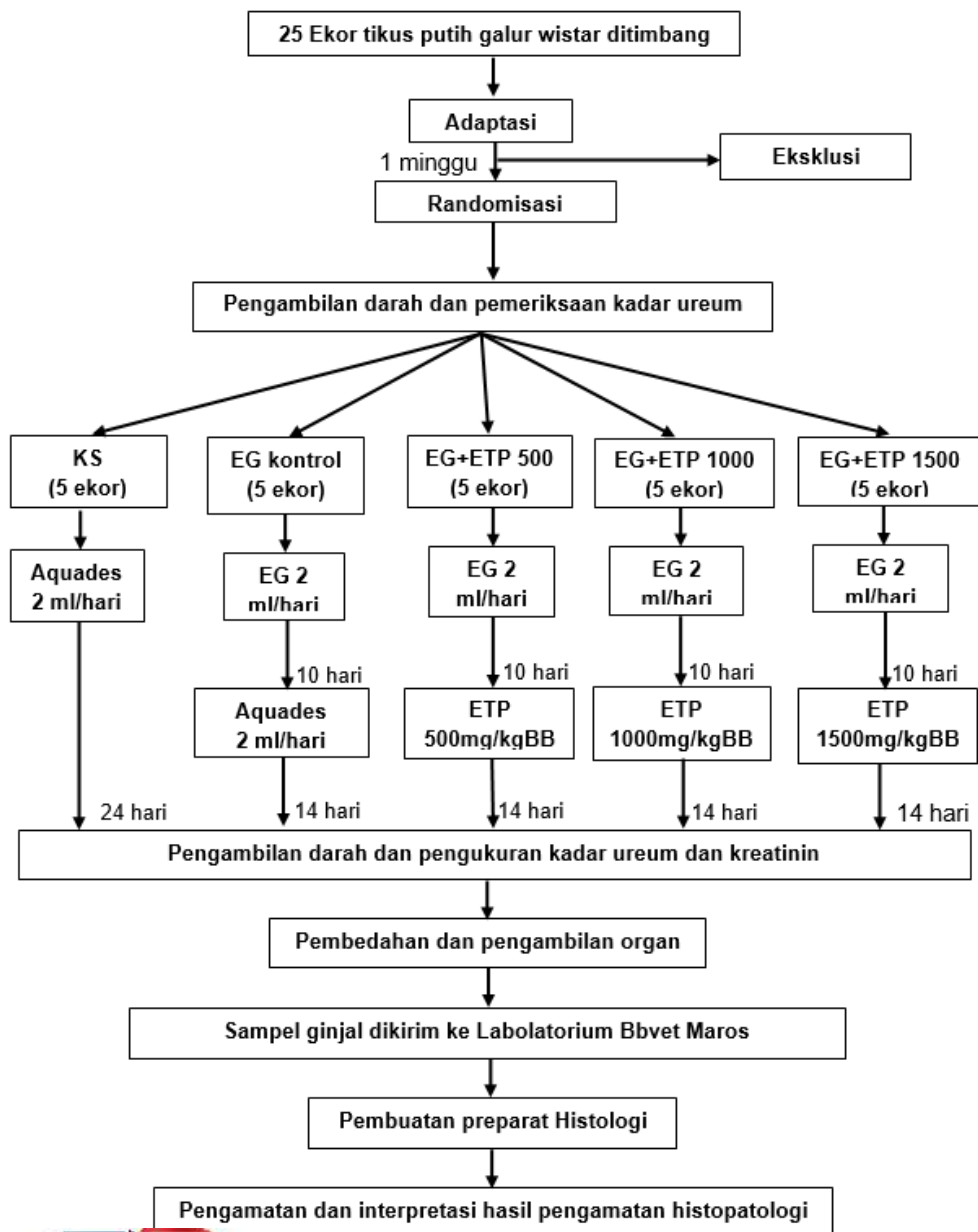
Skor	Kriteria kerusakan
1	<25% sel ginjal yang mengalami infiltrasi sel radang, dilatasi kapsula bowman, hemoragik pada tubulus dan degenarasi pada tubulus akibat kristal oksalat, penumpukan protein dalam tubulus
2	25% - 50% sel ginjal yang mengalami infiltrasi sel radang, dilatasi kapsula bowman, hemoragik pada tubulus dan degenarasi pada tubulus akibat kristal oksalat, penumpukan protein dalam tubulus
3	50% - 75% sel ginjal yang mengalami infiltrasi sel radang, dilatasi kapsula bowman, hemoragik pada tubulus dan degenarasi pada tubulus akibat kristal oksalat, penumpukan protein dalam tubulus
4	≥75% - 100% sel ginjal yang mengalami infiltrasi sel radang, dilatasi kapsula bowman, hemoragik pada tubulus dan degenarasi pada tubulus akibat kristal oksalat, penumpukan protein dalam tubulus

2.9 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS. Data dari hasil pengamatan histopatologi yang telah dikumpulkan dan diskoring kemudian dianalisis. Analisis data dilakukan pada data hasil pemeriksaan mikroskopik. Tahap pertama dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Jika data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, akan dilakukan uji *One Way ANOVA*. Bila terdapat perbedaan, akan dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat perbedaan antar kelompok kontrol dan masing-masing perlakuan. Jika data tidak berdistribusi normal atau tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Untuk melihat adanya perbedaan antar dua kelompok digunakan uji *Mann Whitney* (Soekidjo, 2012).



2.10 Alur Kerja Penelitian



Gambar 3. Diagram alur kerja penelitian

