

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) adalah salah satu gangguan metabolik yang paling umum dan dianggap sebagai masalah kesehatan masyarakat karena memengaruhi kehidupan manusia (Sani Anis dkk. 2022). Saat ini, diabetes mellitus menjadi salah satu ancaman terbesar bagi kesehatan di seluruh dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa jumlah pasien diabetes mellitus akan meningkat signifikan dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030. Demikian juga, *International Diabetes Federation* (IDF) memperkirakan bahwa jumlah pasien DM akan meningkat dari 10,7 juta pada tahun 2019 menjadi 13,7 juta pada tahun 2030 (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021).

Data Atlas Federasi Diabetes Internasional (IDF) tahun 2019 menunjukkan bahwa Indonesia saat ini berada di urutan ke-7 dari 10 negara dengan jumlah pasien DM terbanyak di dunia yaitu sekitar 10 juta penduduk. Di Indonesia, diperkirakan prevalensi penduduk yang mengalami DM berusia diatas 20 tahun sebesar 14,7% di perkotaan dan 7,2% di pedesaan. Dan diperkirakan pada tahun 2030 akan ada peningkatan prevelensi penduduk Indonesia yang berusia di atas 20 tahun mengalami DM sebesar 28 juta di daerah perkotaan dan 13,9 juta di daerah pedesaan. Sebagai hasil dari laporan hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018, prevalensi DM telah meningkat sebanyak 8,5% (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021).

Diabetes mellitus (DM) adalah kelainan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemik yang disebabkan oleh kelainan dalam sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. DM ditandai dengan hiperglikemik dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Pada penderita diabetes, hiperglikemia kronis menyebabkan kerusakan pada beberapa organ penting, seperti pembuluh darah, saraf, mata, jantung, dan renal yang akhirnya menyebabkan komplikasi mikro dan makrovaskuler seperti aterosklerosis, neuropati, retinopati, dan nefropati diabetes (Dehghan, Firouzeh., et al. 2015).

Komplikasi mikrovaskuler diabetes terjadi terutama di area di mana pengambilan kadar glukosa tidak diatur oleh kerja insulin (misalnya renal, retina, dan endotel vaskular), tetapi berhubungan erat dengan kadar glukosa darah di jaringan tersebut. Penyebab berkembangnya penyakit ini melalui hasil dari kombinasi kerusakan endotel yang dimediasi glukosa, stres oksidatif yang disebabkan oleh kelebihan superoksida, dan produksi sorbitol serta produk glikasi berikutnya akibat hiperglikemia kronis. Sehingga kerusakan metabolik ini yang ditimbulkan berupa perubahan aliran darah dan perubahan permeabilitas sel endotel, koagulasi dan pengendapan protein ekstrasvaskuler yang mengakibatkan disfungsi organ. Hal tersebut ditetapkan sebagai

faktor risiko independen berkembangnya penyakit mikrovaskular (Vithian, Karunakaran., et al. 2010).

Kerusakan renal pada diabetes kemungkinan besar disebabkan oleh berbagai faktor, seperti stress oksidatif, gangguan metabolisme glukosa, berbagai faktor inflamasi dan sitokin, serta perubahan hemodinamik, dan genetik (Ni, Wei-Jian., et al. 2015). Diantaranya stress oksidatif merupakan faktor umum yang menjadi ciri proses utama yang menghubungkan hiperglikemia dengan komplikasi vaskuler melalui dua mekanisme, yaitu perubahan metabolik pada molekul jaringan target dan perubahan hemodinamik renal. Gangguan metabolik dan hemodinamik (mekanik) memiliki efek samping yang sinergis pada jaringan target dan berkontribusi terhadap perkembangan nefropati diabetik (Kashihara, N., et al. 2013).

Hiperglikemia kronis menyebabkan stress oksidatif yang mengakibatkan pengaktifan jalur biosintetik heksosamin, protein kinase teraktivasi mitogen (MAPKs), jalur reduktase sorbitol-aldosa, dan protein kinase C (PKC) (Singh, R., et al. 2021). Stress oksidatif terjadi ketika pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dihasilkan secara berlebihan melalui pengurangan oksigen, hiperglikemia kronis atau ketika sistem pertahanan antioksidan endogen terganggu (Altinoz, E., et al., 2015). Ada sejumlah makromolekul yang telah terlibat dalam peningkatan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS), seperti cacat pada jalur poliol, NAD(P)H oksidase, formasi *Advanced Glycations end Products* (AGE), sintase oksida nitrat tak berpasangan (NOS), faktor transkripsi NF κ B, dan rantai pernapasan mitokondria *melalui* fosforilasi oksidatif (Kashihara, N., et al. 2013).

Pada jalur poliol, aldosa reduktase, enzim intraseluler, mengubah glukosa menjadi sorbitol, yang dalam rangkaian langkah berikutnya disalurkan untuk membentuk fruktosa-3-fosfat (F-3-P) dan 3-deoksiglukosa (3-DG). Biasanya, jumlah glukosa yang dialihkan ke jalur poliol sangat sedikit; namun, dalam keadaan hiperglikemia, lebih dari 10 kali lipat glukosa disalurkan ke jalur aksesori ini. Metabolit F-3-P dan 3-DG mengarah pada formasi *Advanced Glycations end Products* (AGE), yang terakhir setelah berinteraksi dengan reseptornya, RAGE, menghasilkan ROS (Kashihara, N., et al. 2013).

Jumlah ROS yang berlebihan memodulasi aktivasi protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, dan berbagai sitokin dan faktor transkripsi sinyal intraseluler yang akhirnya menyebabkan peningkatan ekspresi gen matriks ekstraseluler (ECM) dengan perkembangan fibrosis dan penyakit renal. Dalam proses ini, banyak molekul pensinyalan responsif redoks dan faktor transkripsi lainnya, termasuk mitogen-activated protein kinase (MAPK), tirosin kinase dan fosfatase, NF- κ B, AP-1 dan SP-1 juga berpartisipasi dan menentukan hasil akhir dari cedera seluler (Kashihara, N., et al. 2013).

Hiperglikemia kronis juga meningkatkan faktor pertumbuhan dan ekspresi sitokin seperti faktor pertumbuhan transformasi (TGF- β), faktor pertumbuhan turunan trombosit, GF mirip insulin, faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), dan faktor nekrotik tumor TNF α . Sitokin utama yang terlibat dalam patogenesis kedua diabetes adalah IL-1, IL-6, dan IL-18, serta TNF- α . Diantara berbagai sitokin pro-inflamasi yang dilepaskan selama hiperglikemia, TNF- α mempunyai potensi untuk mendorong

aktivasi NF- κ B, sehingga menyebabkan apoptosis atau kematian sel terprogram (Ashrafi, Mahboobeh., et al. 2018).

Aktivasi kaskade transduksi sinyal ganda menyebabkan pelepasan mediator pro-inflamasi dan pro-fibrotik, yang mengubah hemodinamik intra-renal. Bersama-sama, faktor-faktor ini berkontribusi terhadap perubahan struktur dan fungsi renal, seperti perubahan permeabilitas glomerulus, hiperfiltrasi glomerulus, penebalan membran basal glomerulus, sintesis matriks mesangial, dan, pada akhirnya, menyebabkan sklerosis glomerulo dan fibrosis interstisial, yang mengakibatkan apoptosis, hilangnya podosit, dan penurunan GFR, yang semuanya merupakan ciri khas nefropati diabetik. (Singh,R, et al. 2021).

Sistem Renin-Angiotensin (RAS) adalah kontributor paling signifikan terhadap patogenesis penyakit renal diabetik. Hal ini disebabkan oleh peningkatan regulasi RAS intrarenal lokal yang pada akhirnya menghasilkan peningkatan reabsorpsi natrium, vasokonstriksi arteriol eferen preferensial, serta peningkatan tekanan dan permeabilitas kapiler glomerulus. Aktivasi sistem renin-angiotensin (RAS) semakin memperburuk cedera renal yang disebabkan oleh ROS pada nefropati diabetik (Bouhairie, Victoria E., et al. 2016).

Terapi antioksidan telah terbukti penting dalam mengurangi kerusakan pada DM dan mencegah komplikasi diabetes. Antioksidan alami melindungi dan memperbaiki sistem pertahanan antioksidan terhadap ROS dan efektif dalam menghambat ROS. Peran pentingnya juga meningkatkan pencegahan penyakit. Saat ini saffron dikenal sebagai tanaman yang memiliki salah satu fungsi sebagai efek antioksidan (Altinoz, E., et al., 2015).

Saffron atau *Crocus sativus* L., adalah tanaman obat dari famili Iridaceae yang tumbuh di banyak tempat di Asia, Afrika, dan Eropa (Anaigoudari Fatemeh, et al., 2023). Saffron (*Crocus sativus* L.) memiliki sifat hipolipemik, anti inflamasi, antioksidan dan antikarsinogenik. Crocin (glikosida crocetin), crocetin dan safranal adalah komponen utama saffron. Saffron juga mengandung protein, gula, vitamin, flavonoid, asam amino, mineral dan senyawa kimia lainnya. Crocin, yang merupakan konstituen saffron yang larut dalam air dan aktif, efektif dalam mencegah cedera reperfusion iskemia dan menghilangkan stres oksidatif pada tikus. Ekstrak Saffron, crocin dan safranal juga telah dilaporkan memiliki aktivitas penangkal ROS yang luar biasa dan aktivitas ini disebabkan oleh sifat antioksidannya (Altinoz, E., et al., 2015). Selain itu, Saffron memiliki efek hipoglikemik dan meningkatkan insulin serum pada tikus diabetes. Efek hipoglikemik ekstrak saffron tampaknya diberikan melalui mekanisme seperti penurunan resistensi insulin, stimulasi penyerapan glukosa oleh jaringan perifer dan penghambatan penyerapan glukosa usus (Elgazar, Aml F., 2013).

Pada penelitian terdahulu didapatkan hasil yaitu saffron dengan sifat antioksidannya dapat memiliki efek protektif pada hemodinamik renal, penurunan signifikan kadar malondialdehid (MDA), aktivitas xantin oksidase (XO), dan peningkatan kadar glutathione (GSH) pada kelompok penderita diabetes, serta sedikit menurunkan kadar plasma Cr dan BUN yang tinggi. Pada penelitian lain mengenai efek crocin secara signifikan menurunkan kadar BUN dan Cr serum pada kelompok Pinealectomy disertai induksi STZ dan pemberian crocin. Pengobatan crocin

memperbaiki perkembangan nefropati diabetik selain mengganggu parameter histopatologi, biokimia, imunohistokimia dan biokimia. Crocin mengurangi TGF- β 1 dan menekan stres oksidatif (Sani, Anis., 2022).

Peningkatan proporsi lemak (<85% total kalori), karbohidrat, garam dan kolesterol dapat menginduksi model hewan untuk penelitian obesitas, resistensi insulin, hipertensi dan dislipidemia. Obesitas merupakan salah satu faktor berkembangnya DM tipe 2. Diet tinggi lemak dapat memberikan karakteristik resistensi insulin dengan toleransi glukosa terganggu. Diet tinggi lemak memberikan manifestasi diabetik setelah 4 minggu pemberian diet namun perlu jangka waktu yang panjang untuk menstabilkan manifestasi DM. (Husna et al. 2019).

STZ adalah bahan kimia, dengan sifat diabetogeniknya pada tahun 1963, yang sering digunakan untuk menimbulkan diabetes tipe 1 atau tipe 2 pada hewan pengerat dalam penelitian (Anaigoudari Fatemeh, et al., 2023). Streptozotocin adalah analog dari N-acetylglucosamine (GlcNAc) yang mudah diangkut ke dalam sel- β pankreas melalui transporter glukosa-2 (GLUT-2) afinitas rendah yang terdapat di membran plasma sel β , sel hepatosit dan sel tubulus renal dan menyebabkan toksisitas sel- β , yang mengakibatkan defisiensi insulin. STZ secara selektif menghambat aktivitas O-GlcNAcase sel- β , yang bertanggung jawab untuk menghilangkan O-GlcNAc dari protein. Hal ini menyebabkan O-glikosilasi ireversibel dari protein intraseluler dan mengakibatkan apoptosis sel- β . STZ dapat bersifat sitotoksik setelah 72 jam pemberian. Hal ini menyebabkan kerusakan pada berbagai jalur pensinyalan metabolik dan dapat terjadi kerusakan sel beta yang menyebabkan depresi dalam produksi insulin (Ali, M A., 2023).

Oleh karena itu, Model diabetes tipe 2 yang cukup stabil dapat dibuat dengan memberikan tikus coba diet tinggi lemak dikombinasi dengan induksi Streptozotocin (STZ) dosis rendah. Model ini dapat memberikan gambaran patogenesis DM pada manusia (husna 2t al.2019). Sehingga pada penelitian ini, peneliti menggunakan model diet tinggi lemak dikombinasi STZ dosis rendah.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimanakah efek pemberian Saffron (*Crocus Sativus*) terhadap gambaran histologi renal pada tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk menguji efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap gambaran histologi renal pada tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Menguji efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap berat renal tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- Menguji efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap fungsi renal melalui pemeriksaan kadar serum BUN dan creatinin tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- Menguji efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap gambaran histopatologi renal tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- Memberi informasi ilmiah mengenai efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap perubahan berat renal, gambaran histopatologi renal serta kadar Creatinin dan Nitrogen urea darah (BUN) tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- Menambah pengetahuan dan referensi terhadap penelitian selanjutnya mengenai kerusakan renal akibat diabetes.

1.4.2 Manfaat Praktis

- Bagi masyarakat: memberi informasi mengenai efektifitas Saffron (*Crocus sativus*) sebagai perbaikan kerusakan renal akibat diabetes.
- Bagi peneliti: sebagai salah satu bentuk kreatifitas dalam pengembangan ilmu pengetahuan.
- Bagi perguruan tinggi: sebagai sumbangsih pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK).

1.5 Orisinalitas Penelitian

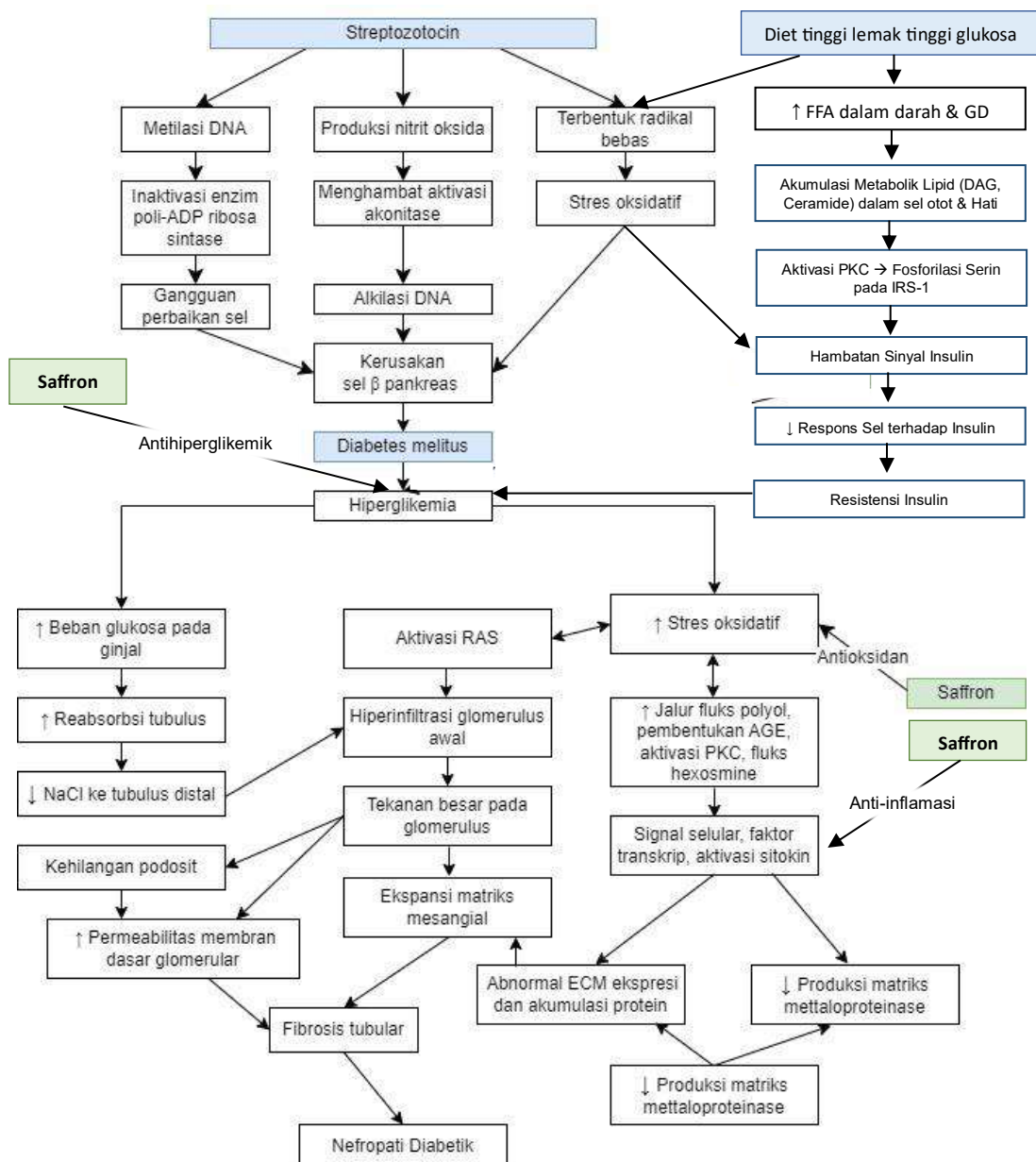
Penelitian yang sudah melaporkan Saffron berperan sebagai antioksidan dan anti inflamasi yang dapat mengurangi kerusakan renal sebagai berikut:

Tabel 1. Penelitian Terdahulu Saffron Terhadap Kerusakan Renal Tikus Diabetes Diiduksi Streptozotocin

Peneliti (Tahun)	Judul	Variabel	Hasil
(Altinoz, E., et al., 2015)	Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on	Renal tikus Wistar betina berat antara 150 dan 200 gram yang diinduksi	Kelompok DM dengan pemberian saffron dapat menurunkan kadar MDA, BUN, dan Cr serta

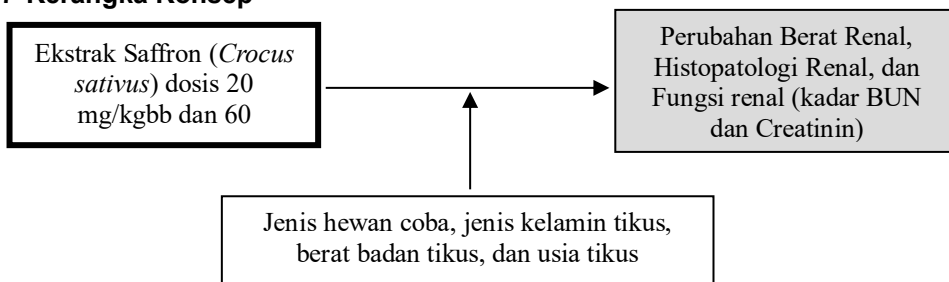
	nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.	streptozotocin (50 mg/kgbb) dengan kelompok DM + saffron dengan dosis 20 mg/kgbb/hari melalui gavage selama 21 hari.	meningkatkan kadar GSH. Selain itu, secara signifikan mengurangi perubahan histopatologis pada renal tikus.
(Ashrafi, Mahboobe h., et al. 2018)	The Effects of Saffron (Crocus sativus) Aqueous Extract on TNF- α Levels in Liver, Kidney, and Lens Tissues of Diabetic Rats.	Renal tikus Wistar jantan usia 7-8 minggu dengan berat 215 gram yang diinduksi streptozotocin (60 mg/kgbb) dengan kelompok DM + ekstrak saffron dengan dosis 200 mg/kgbb/hari melalui gavage selama 5 minggu.	Saffron digunakan sebagai pencegahan hiperglikemia dan menunjukkan kemampuan perlindungan terhadap komplikasi diabetes dengan mencegah produksi TNF- α di hati, renal, dan lensa.
(Hazman, Omer., et al. 2015)	Anti-Inflammatory and Antioxidative Activities of Safranin in the Reduction of Renal Dysfunction and Damage that Occur in Diabetic Nephropathy.	Renal tikus Wistar jantan yang diberikan pakan HFD selama 4 minggu dan diinduksi streptozotocin (30 mg/kgbb i.p) dengan kelompok DM + saffron dan Kelompok HFD + saffron selama 4 minggu.	Safranin ditemukan mengurangi disfungsi (efeknya pada BUN kadar CREA) dan kerusakan (data histopatologis) yang terjadi pada jaringan renal, melalui efek antioksidan dan antiinflamasi pada nefropati diabetik.
(Chen Y, et al. 2021)	<i>Dendrobium</i> mixture attenuates renal damage in rats with diabetic nephropathy by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway	Renal tikus Jantan diberikan pakan HFD-HS selama 6 minggu dan induksi STZ (25 mg/kgBB i.p) sebanyak 2 kali. Intervensi menggunakan obat Dmix dan gliklidone selama 8 minggu.	Tikus dengan DN menunjukkan hipertrofi glomerulus yang nyata, peningkatan matriks mesangial dan fibrosis interstitial renal. DMix secara signifikan mengurangi FBG, lipid darah, Hba1C dan kadar insulin, berat renal, indeks renal dan UAER pada tikus dengan DN serta meningkatkan fungsi renal.

1.6 Kerangka Teori

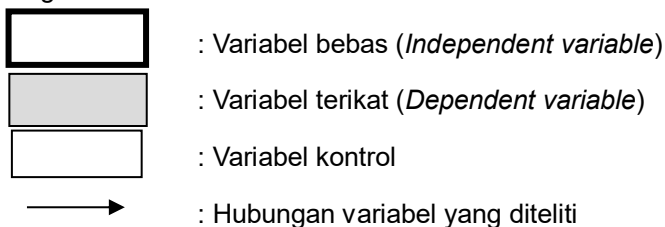


Bagan 1. Kerangka Teori (Singh,R, et al. 2021). Keterangan: NaCl= Natrium Chlorida; RAS=Renin-Angiotensin System; ECM=Extracellular matrix; AGE=Advanced Glycation end Product; PKC=Protein Kinase C

1.7 Kerangka Konsep



Keterangan :



Bagan 2. Kerangka Konsep Penelitian

1.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat efek pemberian saffron (*Crocus Sativus*) terhadap berat renal, gambaran histopatologi renal serta kadar serum BUN dan creatinine tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian menggunakan desain *true experimental study* dengan rancangan penelitian *post-test only control group design* dengan pendekatan *in vivo*. Penelitian ini terdiri atas dua tahap, tahap pertama yaitu *preliminary test* guna melihat kerusakan histologi renal setelah diinduksi oleh diet tinggi lemak tinggi glukosa (HFHGD) dan streptozotocin (STZ) dosis rendah. Kemudian dilakukan penelitian utama, yaitu pemberian bahan uji berupa ekstrak saffron dengan dosis rendah (20 mg/kgbb/hari) dan dosis tinggi (60 mg/kgbb/hari) selama 28 hari untuk melihat efektivitasnya terhadap kadar serum (BUN dan Creatinin) serta gambaran histopatologi renal tikus model diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 hingga Mei 2025.

2.2.2 Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin : Tempat adaptasi dan penelitian hewan coba.
- b. Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin : Tempat pengujian uji proksimat pakan diet tinggi lemak.
- c. Laboratorium Fitofarmaka dan Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin : Tempat pembuatan dan pengujian uji kualitatif ekstrak saffron.
- d. Laboratorium Hewan Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin : Tempat pemeriksaan kimia darah sampel hewan coba.
- e. Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri (RSPTN) Universitas Hasanuddin : Tempat pembuatan dan pemeriksaan preparat histologi renal sampel hewan coba.

2.3 Populasi dan Sampel

2.3.1 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan metode *Simple Random Sampling*. Dalam metode pengambilan sampel sederhana (SRS), setiap hewan coba dalam populasi memiliki peluang yang sama untuk dipilih sebagai sampel agar mencegah bias dalam pemilihan hewan, yang membuat hasil penelitian valid dan dapat

digeneralisasi (Kerlinger, 2006). Dimana pengambilan sampel dari populasi Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) galur *Wistar* jantan dengan berat 165 - 200 gram yang berusia 8 - 12 minggu yang diperoleh dari tempat Gold Mice (Makassar) secara acak.

Besar sampel sesuai dengan *group comparison - one way ANOVA*, dimana sampel minimal menggunakan $DF = 10$, sedangkan sampel maksimal menggunakan $DF = 20$ (Zahiruddin, et al., 2017).

Sampel minimal :

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 10/4 + 1$$

$$n = 2,5 + 1$$

$$n = 3,5$$

Sampel maksimal :

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 20/4 + 1$$

$$n = 5 + 1$$

$$n = 6$$

Keterangan:

n : jumlah sampel per kelompok

DF : *degrees of freedom* (derajat kebebasan)

K : jumlah kelompok

Didapatkan hasil $3,5 \leq n \leq 6$, yang artinya sampel minimal tiap kelompok adalah 4 ekor tikus putih dan jumlah sampel maksimal adalah 6 ekor tikus putih. Sehingga total sampel pada penelitian ini adalah 19 ekor tikus, dengan pembagian sampel sebagai berikut :

Tabel 2. Besar Sampel Penelitian

Kelompok non-diabetes (K-)	4 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi diet tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah (Kd)	5 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi diet tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah dan ekstrak saffron dosis 20 mg/dl/kgbb (P1)	5 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi diet tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah dan ekstrak saffron dosis 60 mg/dl/kgbb (P2)	5 ekor
Total	19 ekor

2.3.2 Kriteria Sampel

- a. Kriteria Inklusi
 - Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) galur *Wistar*
 - Sehat (tampak bergerak aktif, tidak terlihat rambut kusam, sakit, luka pada kulit, dan cacat)
 - Berjenis kelamin jantan
 - Berusia 8-12 minggu
 - Berat badan 150-200 gram
 - Kadar glukosa darah puasa ≥ 250 mg/dl pada kelompok diabetes (Mohammad, R., 2011)
- b. Kriteria Eksklusi
 - Tikus sakit, cacat, atau luka
 - Kadar glukosa darah puasa < 250 mg/dl pada kelompok diabetes (Mohammad, R., 2011)

2.4 Klasifikasi Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas (*independent variabel*)
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak saffron (*Crocus sativus*).
- 2) Variabel terikat (*dependent variabel*)
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah :
 - Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kadar *Creatinin* serum tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
 - Berat renal tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah
 - Gambaran histopatologi renal tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- 3) Variabel kontrol
Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah galur hewan coba, jenis kelamin tikus, berat badan tikus, usia tikus, dan standarisasi pemberian diet.

2.5 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel Bebas			
Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Unit	Skala
Saffron	Tanaman yang mengandung apokarotenoid termasuk crocin, crocetin, dan safranin. Saffron yang digunakan Herat saffron Afghanistan (KEMTAN RE PL 36.03-B.III.00-02-000057-03/21)	mg/kgbb	Nominal

	dengan dosis yang digunakan adalah 20 dan 60 mg/kgBB dan diberikan melalui sonde (Altinoz, E., et al., 2015)		
Diet tinggi lemak (DTL)	Pemberian DTL merujuk pada penelitian Soetikno et al (2023) dalam bentuk pelet dengan dengan komposisi minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan dan tepung kedelai. Dengan nilai makronutrien meliputi : - Lemak: 45.88% - Karbohidrat: 32.6% - Protein: 11.24% Pakan diberikan dengan formula 10% dari berat badan setiap hari selama 12 minggu.	Gram (gr)	Nominal
Diet tinggi glukosa (DTG)	Pemberian glukosa 20% merujuk pada penelitian Soetikno et al (2023) dengan melarutkan dekstrosa bubuk sebanyak 300 gram ke dalam 1.200 ml air yang dituang ke dalam tempat minum tikus yang berisi 50 ml kemudian diberikan selama 12 minggu.	gr/ml	Nominal
Streptozotocin (STZ)	Senyawa yang alami terdapat pada bakteri <i>Streptomyces achromogenes</i> yang bersifat diatogenik. STZ ke dalam sel melalui transporter glukosa-2 (GLUT2) di membran plasma sel β, sel hepatosit dan sel tubulus renal. STZ diinjeksi intraperitoneal dengan dosis 35 mg/kgbb menggunakan merk <i>Santa Cruz</i> (CA, USA, #sc-200719). (Husna, Fauzal., 2019).	mg/kgbb	Nominal

Variabel Terikat

Variabel Penelitian	Variabel Penelitian	Variabel Penelitian	Variabel Penelitian
Berat renal tikus	Berat renal diukur setelah terminasi pada hari ke-28 perlakuan, ditimbang dengan menggunakan timbangan digital dan dilaporkan dalam gram. Berat normal renal tikus yaitu 0,8 – 1,1 gram.(Reprotoxicology Studies).	Gram (gr)	Rasio
Perubahan histopatologi renal	Derajat kerusakan dianalisis secara semikuantitatif dengan delapan lapang pandang pada pembesaran 10x. Kerusakan jaringan yang dinilai dari	-	Ordinal

Glomerular, Tubulo/Interstitial, Tubular dan Endotel.

- 0 : tidak ada kerusakan endotelial, Glomerular, Tubular & Tubulo/Interstitial.
- 1 : Penebalan membran basalis kapsul bowman pada glomerulus, edema endotel, hilangnya *Brush Border* (BB) < 25% pada sel tubular, serta Inflamasi dan hemorage < 25% di jaringan.
- 2 : Retraksi tuft glomerulus dan ekspansi mesangial, disruption endotel, hilangnya *Brush Border* (BB) > 25% pada sel tubular & Membran basal menebal serta Inflamasi dan hemorage < 25% di jaringan.
- 3 : fibrosis glomerular, kehilangan jaringan endotel, Hilangnya *Brush Border* (BB) > 25% pada sel tubular & Membran basal menebal & Inflamasi hingga 60% sel tubular dan tubulointerstisial serta hingga 60%.
- 4 : Hilangnya *Brush Border* (BB) > 25% pada sel tubular & Membran basal menebal & Inflamasi dan nekrosis lebih dari 60% sel tubular dan tubulointerstisial.

Hasil rerata skoring EGTI dikelompokkan pada skoring berikut :

- Skor 0 : Normal
- Skor 0,5 : Area kerusakan fokus kecil
- Skor 1 : Zona kerusakan korteks < 10%
- Skor 2 : Zona kerusakan korteks 10-25%
- Skor 3 : Zona kerusakan korteks 25-75%
- Skor 4 : Zona kerusakan > 75% (Toprak Tuncay, 2020) dengan modifikasi.

BUN dan Creatinine	Pemeriksaan fungsi renal dilakukan dengan menguji kadar kreatinin serum dan nitrogen urea darah (BUN). Kadar ureum normal pada tikus yaitu 15-21 mg/dl dan	mg/dl	Nominal
--------------------	--	-------	---------

kadar kreatinin normal pada tikus adalah 0,2-0,8 mg/ dl. (Wientarsih Ietje et al., 2012).

2.6 Alat dan Bahan Penelitian

2.6.1 Alat Penelitian

- a. Alat Pemeliharaan Tikus
 - Kandang plastik dengan ukuran 40 cm x 20 cm x 20 cm dilengkapi botol minum.
 - Sonde lambung ukuran 18 ga dan spoit 3 cc
 - Timbangan tikus (Mettler PE 3600/DeltaRange®) dengan wadah plastik (dalam gram).
- b. Alat Perlakuan Tikus
 - Sarung tangan
 - Spuit 1 ml
- c. Alat Pembuatan Ekstrak Saffron (*Crocus sativus*)
 - Kertas saring Whatman No. 1
 - Gelas ukur
- d. Alat Pemeriksaan Glukosa Tikus
 - Glucometer (Accu-chek Instant®, Altek Biotechnology Corporation, China)
 - Strip glucometer (Accu-chek Instant set®, batch number 07819382, Altek Biotechnology Corporation, China)
- e. Alat Pemeriksaan Fungsi Renal (BUN dan Creatinin)
 - Tabung vacuum tube plain 3 ml
 - Tabung pipa kapiler (Nesco®)
 - *Cup serum*
 - HUMAN Humalyzer4000 (HUMAN®, Labor Biomedical Technologies GMBH, Germany).
- f. Alat Pembuatan Preparat Histologi Renal
 - Sarung tangan
 - Wadah fiksasi
 - Water bath
 - Mikrotome rotary
 - Mikroskop cahaya
 - Object glass, cover glass, bak lilin.
 - Tissue
 - Alat bedah minor : scalpel, gunting bedah, pinset chirurgis, kassa, jarum

2.6.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan Pemeliharaan Tikus
 - Tikus *Wistar* usia 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 19 ekor
 - Pakan standar (Rat Bio)
 - Pakan tikus diet tinggi lemak: minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan, tepung kedelai
 - Dekstrosa bubuk *Glukosa Monohidrat* (Rofa Laboratorium Centre, 50-99-7)
 - Sekam
 - Air matang
 - Aquades
- b. Bahan Perlakuan Tikus
 - Streptozotocin *Santa Cruz* (CA, USA, #sc-200719) 350 mg
 - Sitrat buffer 0.01 M (pH 4,5)
 - Cairan NaCl 0,9%
- c. Bahan Pembuatan Ekstrak Saffron (*Crocus sativus*)
 - Benang saffron ekstra super negin dari Herat saffron Afghanistan (KEMTAN RE PL 36.03-B.III.00-02-000057-03/21) kering 24 gram
 - Etanol 96%
- d. Bahan Pemeriksaan Glukosa Tikus
 - Serum darah 2-3 cc
- e. Bahan Pemeriksaan Fungsi Renal
 - Serum darah 2-3 cc
- f. Bahan Anestesi
 - Ketamin Hcl 100mg/ml KEMENTAN RI No.I.231072329 PKC
 - Xylazin 50 ml KEMENTAN RI No.I.11113241 PKC
- g. Bahan Pembuatan Preparat Histologi Renal
 - Netral buffer formalin 10%
 - Parafin 58
 - Etanol absolut I, II, dan III
 - Alkohol 95%, 90%, 80%, 70%, alkohol asam
 - Xylol I, II, dan III
 - Larutan *Mayer Hematoxylin & Eosin*
 - Larutan *Eosin*
 - Kertas label
 - Entelan

2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus galur *Wistar* jantan, berusia 8 hingga 12 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 23 ekor.

Hewan coba diperoleh dari penangkaran hewan coba Gold Mice di Makassar, Sulawesi Selatan. Tikus dipelihara pada suhu ruangan yang berkisar 18-26°C, dengan cukup ventilasi, dan kelembaban udara 5-6%, disertai siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam.

Setelah mendapatkan izin etik dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, maka dilakukan proses aklimatisasi yaitu dengan 1 kandang berisi 1 ekor tikus agar lebih mudah mengontrol dan mengamati asupan harian tikus. Kandang dibersihkan 3 hari sekali dengan cara mengganti sekam, adapun pakan dan minuman diberikan setiap hari. Tikus mulai di adaptasi selama 7 hari dengan diberikan pakan standar dan akses bebas terhadap air minum.

2.7.2 Pemberian Diet

Pada proses adaptasi selama 1 minggu, semua hewan coba diberikan diet standar berupa pakan standar dan air matang secara *ad libitum*. Pada hari ke-8 dilakukan randomisasi dan membagi hewan menjadi 4 kelompok, hewan coba kemudian diberi diet sesuai dengan kelompoknya masing-masing, sebagai berikut :

- K- : Kelompok K- merupakan kontrol non-diabetes yang diberi diet standar. Pakan standar menggunakan pakan komersil (RatBio, Indonesia), dengan komposisi nutrisi adalah 20% protein, 60% karbohidrat, 4% lemak, 4% serat kasar, 0.7% fosforus, dan 12% kalsium. Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan tikus perhari (gr) (Yustisia et al., 2022). Minuman pada kelompok K- diberikan air matang sebanyak *ad libitum*.
- Kd, P1 dan P2 : Kelompok Kd, P1 dan P2 diberi diet tinggi lemak tinggi glukosa. Pakan tinggi lemak diberikan dalam bentuk pelet dengan komposisi minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan dan tepung kedelai, yang setelah di uji proksimat didapatkan kandungan makronutrien adalah sebagai berikut : lemak (45,88%), karbohidrat (32,6%), protein (11,24%) yang telah diuji melalui uji proksimat dari Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin (018/LKP/I/2025). Pakan tinggi lemak dalam penelitian ini merupakan pakan non-komersial yang diformulasikan sendiri sesuai kandungan makronutrien yang diinginkan dan diproduksi oleh UD Bancar Jaya Jawa Timur dengan menggunakan metode pengeringan vakum untuk mempertahankan kestabilan kandungan lemak dan nutrien. Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan tikus perhari (gr). Adapun asupan tinggi glukosa didapatkan dari dekstrose bubuk *Glukosa Monohidrat* (Rofa Laboratorium Centre, 50-99-7) sebanyak 300 gram ke dalam 1.200 ml air yang dihitung ke dalam tempat minum tikus yang berisi 50 ml sehingga didapatkan glukosa dengan kadar 20%.

2.7.3 Pengukuran Berat Badan Tikus

Pengukuran berat badan tikus dilakukan pada minggu pertama setelah dilakukan randomisasi (sebelum mulai diberikan perlakuan) dan dilakukan setiap minggu hingga sebelum minggu terminasi. Prosedur pengukurannya adalah tikus ditempatkan dalam wadah plastik pada timbangan digital (Mettler PE 3600/DeltaRange®) khusus tikus kemudian berat badan dicatat dalam gram (gr).

2.7.4 Induksi Streptozotocin

Pada hari ke-22 setelah pemberian diet tinggi lemak tinggi glukosa, kelompok Kd, P1 dan P2 diinduksi dengan streptozotocin dosis rendah. Streptozotocin dilarutkan dalam 0.01 M sodium sitrat buffer (pH 4,5) kemudian disuntikkan sebagai dosis tunggal ke peritoneum (35 mg/kgbb). Sedangkan pada kelompok K- disuntikkan sodium sitrat buffer sebanyak 10 μ l. Setelah 3 hari, tikus dipuasakan selama 8 jam kemudian dilakukan pengambilan darah di lateral ekor tikus. Setelah darah terkumpul, dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah puasa menggunakan *glucometer Accu Check Instant*. Tikus dengan kadar glukosa darah puasa lebih dari sama dengan 250 mg/dl dianggap diabetes dan dimasukkan menjadi sampel penelitian. Jika tikus tidak mencapai kadar glukosa darah puasa lebih dari sama dengan 250 mg/dl, maka tikus tersebut diinduksi kembali dengan dosis setengah dari dosis awal, setelah 3 hari penyuntikan dilakukan pengukuran glukosa darah puasa kepada tikus.

Prosedur penyuntikan streptozotocin pada tikus melalui intraperitoneal sebagai berikut (UBC Animal Care Guidelines, 2014) :

- a. Identifikasi penanda anatomi untuk menyuntikkan ke area yang sesuai di abdomen. Biasanya tempat penyuntikan berada di kuadran kanan bawah abdomen tikus.
- b. Masukkan jarum dengan bevel menghadap atas ke kuadran kanan bawah abdomen dengan kepala membentuk sudut 30° - 40° terhadap horizontal. Seluruh bevel harus berada di dalam rongga abdomen.
- c. Tarik kembali pendorong untuk memastikan tekanan negatif sebelum penyuntikan setelah itu dorong pendorong hingga larutan masuk ke dalam rongga abdomen.
- d. Tarik lurus jarum keluar dan masukkan spuit/jarum langsung ke dalam wadah benda tajam tanpa menutupnya kembali. Gunakan jarum suntik baru untuk setiap hewan.



Gambar 1. Prosedur Injeksi Peritoneal

Sebagai *preliminary test* untuk melihat apakah telah terbentuk kerusakan renal yang diinduksi oleh diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah, sejumlah 1 ekor dari masing-masing kelompok (Kd, P1 dan P2) dan memastikan apakah kelompok non-diabetes (K-) tidak mengalami kerusakan renal yang akan diterminasi setelah 7 hari pemberian streptozotocin kemudian renal akan diperiksa secara mikroskopis. Apabila telah terbentuk kerusakan renal, maka 1 hari setelah dinyatakan terjadi kerusakan renal maka dapat dilakukan pemberian ekstrak saffron. Dari hasil *preliminary test* pada kelompok Kd, P1 dan P2 tidak terjadi kerusakan sehingga pemberian ekstrak saffron dilakukan setelah 4 minggu pasca induksi Streptozotocin dengan memantau berat badan tikus dan glukosa darah puasa setiap minggu pada kelompok Kd, P1 dan P2.

2.7.5 Pembuatan Ekstrak Saffron

Dua puluh empat gram benang saffron kering ditambahkan 500 ml pelarut etanol 96%, lalu dimaserasi selama 3 hari dalam wadah toples kaca yang tertutup rapat di suhu ruangan. Campuran tersebut disaring lalu dipilih ekstrak saffron selanjutnya dilakukan evaporasi pada suhu 40°C dengan menggunakan alat rotatory evaporator vakum selama 6 jam. Setelah dilakukan evaporasi didapatkan ekstrak kental yang telah diletakkan diatas *waterbath* selama 1 hari. Pembuatan ekstrak saffron pada penelitian merujuk pada penelitian Mohammad (2011) dengan modifikasi.

Pada ekstrak saffron dilakukan uji kualitatif fitokimia dengan mendapatkan hasil kandungan kelompok senyawa flavanoid, tannin, alkaloid, dan saponin.

2.7.6 Pemberian Ekstrak Saffron

Kelompok P1 dan P2 diberikan ekstrak saffron disertai pemberian diet tinggi lemak tinggi glukosa selama 28 hari. Ekstrak saffron diberikan dengan dosis 20 mg/kgbb (P1) dan 60 mg/kgbb (P2) serta kelompok Kd diberikan sodium sitrat buffer 10 ml/kgbb melalui sonde setiap pagi hari antara jam 10.00 – 12.00 selama 28 hari. Pemberian dosis ini mengacu pada beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin

yang menunjukkan adanya perubahan pada kerusakan renal tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin dengan rentang dosis 20 mg/kgbb hingga 60 mg/kgbb selama 4 – 8 minggu.

Prosedur pencampuran saffron berdasarkan (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 2006*)

Rumus Umum Campuran ekstrak saffron :

$$V = \frac{m}{C}$$

Keterangan:

- V = volume cairan yang diperlukan (dalam **mL**)
- m = massa saffron yang ingin digunakan (dalam **mg**)
- C = konsentrasi ekstrak saffron dalam pelarut (10 **mg/mL**)

Rumus massa saffron yang digunakan :

$$m = D \times B$$

Keterangan:

- m = massa saffron yang ingin digunakan (dalam **mg**)
- D = dosis saffron (**mg/kgBB**)
- B = berat badan subjek (**kg**)

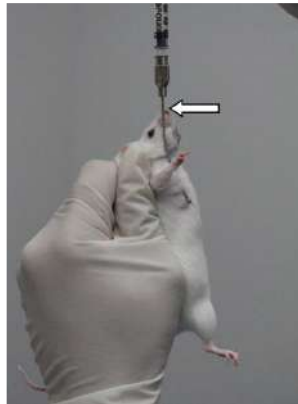
Prosedur pemberian saffron adalah sebagai berikut (*International Animal Care and Use Committee, 2023*):

1. Jika sonde digunakan kembali, dilakukan disinfeksi terlebih dahulu.
2. Sebelumnya telah disiapkan ekstrak saffron yang diberikan : (P1) 20 mg/kgbb dan (P2) 60 mg/kgbb.
3. Gunakan sonde dengan ukuran 18 ga, seperti berikut :



Gambar 2. Ukuran sonde untuk tikus

4. Memeriksa panjang sonde dengan mengukur dari ujung kepala ke bagian bawah sternum. Tandai sonde di bagian hidung dan jangan masukkan tabung melewati titik tersebut agar tidak terjadi perforasi lambung, seperti pada gambar berikut :



Gambar 3. Prosedur mengukur panjang sonde

5. Cara memegang hewan coba: pegang bagian tengkuk tikus, kemudian pegang kulit dibagian pundak dengan ibu jari dan jari tengah. Lalu, pegang kulit di atas pundak sehingga kaki depan direntangkan ke samping, jaga agar kaki depan tidak mendorong sonde menjauh. Cara agar menahan tikus : tahan tikus di dekat area dada dan topang tubuh bagian bawah.
6. Pegang kepala tikus dengan memanjangkan kepala ke belakang secara perlahan, sehingga membentuk garis lurus melalui leher dan kerongkongan.
7. Tempatkan sonde di dalam diastema mulut, tabung dimajukan dengan lembut disepanjang langit-langit atas hingga mencapai esofagus. Seperti pada gambar berikut : Masukkan sonde dengan lembut dalam satu gerakan, jika ada hambatan, jangan paksakan sonde untuk masuk, tarik perlahan dan dicoba kembali.
8. Setelah penempatan yang tepat, ekstrak saffron diberikan melalui spuit yang ada di ujung sonde. Jangan memutar sonde, karena ujungnya bisa merusak esofagus.
9. Setelah pemberian, lepaskan sonde dengan lembut mengikuti sudut yang sama seperti pada saat pemasangan.
10. Kembalikan tikus ke kandang, selama 5-10 menit pantau tanda-tanda pernafasan.

2.7.7 Prosedur Terminasi Hewan Coba

Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 24 jam lalu dilakukan prosedur pembedahan. Setelah itu, tikus di euthanasia menggunakan injeksi ketamin/xylazin 50 mg per kgBB/5 mg per kgBB. Kemudian, setelah tikus tampak tidak sadarkan diri, berdasar pada *Internasional Animal Care and Use Committee* (IACUC), untuk memastikan tikus telah mati dilakukan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk peneliti ditempatkan pada kedua sisi leher di bagian dasar tengkorak atau tepat di belakang telinga. Sambil menjaga bagian kepala tetap diam dan stabil, tangan lainnya kemudian menarik pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat dan dengan gerakan

yang mantap dan stabil, sehingga terjadi pemisahan antara tengkorak dengan *cervicalis* atau tulang leher (AVMA, 2013).

2.7.8 Prosedur Pengambilan Darah Sinus Orbita

Setelah dilakukan pembiusan dengan ketamin/xylazin, dilakukan pengambilan darah melalui bagian sinus orbita mata, prosedurnya adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan mikrohematokrit dan tabung *vacuum tube plain*.
2. Menggoreskan mikrohematokrit ke bagian sinus orbita melalui kantung medial dibawah bola mata ke arah foramen opticus. Sisi lainnya mengarah pada tabung *vacuum tube plain* untuk menampung darah.
3. Mikrohematokrit diputar sebanyak 3-4 kali hingga melukai pleksus, kemudian kembalikan putaran sebanyak putaran sebelumnya.
4. Pengambilan darah sebanyak 4 cc.
5. Darah yang telah didapatkan kemudian disentrifugasi selama 10-20 menit pada kecepatan 3000 rpm. Kemudian, serum dipisahkan dengan menggunakan pipet dan disimpan dalam suhu -20 derajat celcius hingga akan digunakan.

2.7.9 Prosedur Pembedahan

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus terlebih dahulu di euthanasia yang telah dijelaskan sebelumnya. Teknik pembedahan dilakukan dengan prosedur pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Tikus yang telah dieuthanasia ditempatkan pada papan bedah dan difiksasi dengan menggunakan jarum pentul.
- b. Tikus kemudian dibedah dimulai dari bagian abdomen menggunakan gunting bengkok.
- c. Organ renal diambil dengan menggunakan gunting lurus.
- d. Organ renal kemudian dibersihkan dengan cara mencuci dengan aquades kemudian dicuci kembali dengan NaCl 0.9% hingga bersih dari darah.
- e. Setelah dicuci, organ dikeringkan.
- f. Setelah kandungan air telah berkurang, organ renal kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam pot berisi larutan buffer formalin 10%.

2.7.10 Pengukuran Berat Organ Renal

Organ Renal ditimbang dalam kondisi segar dan setelah bersih dari darah. Renal ditimbang dengan menggunakan timbangan *digital pocket scale* dengan akurasi 0.001 dan dicatat dalam gram (g).

2.7.11 Pemeriksaan Fungsi Renal (BUN dan Creatinin)

Pemeriksaan fungsi renal akan dilakukan dengan cara mengukur kadar BUN dan Creatinin. Sampel darah yang telah diambil sebanyak 2-3 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacuum tube plain*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 10-15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah serum terpisah dari plasma, serum kemudian dipisahkan dan dimasukkan kedalam *cup serum* dan kemudian diberi label kode hewan coba. Masing-masing *cup serum* kemudian dimasukkan ke dalam HUMAN Humalyzer4000 (HUMAN®, Labor Biomedical Technologies GMBH, Germany). Menurut penelitian Malole dan Pramono (1989), Kadar ureum normal pada tikus yaitu 15-21 mg/dl dan kadar kreatinin normal pada tikus adalah 0,2-0,8 mg/ dl. (Wientarsih Ietje et al., 2012).

2.7.12 Persiapan Preparat Histologi Renal

Prosedur persiapan preparat dilakukan dengan metode sebagai berikut (Parkinson & Mortimer, 2019)

- Organ renal difiksasi dengan merendamnya dalam larutan *normal buffer formalin* selama kurang lebih 24 jam, hingga seluruh jaringan terendam dalam larutan fiksatif.
- Kemudian jaringan mengalami proses *dehidrasi* menggunakan alkohol bertingkat, dimulai dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol absolut sebanyak 2 kali, masing-masing selama 1 jam.
- *Clearing* dilakukan dengan merendam jaringan dengan menggunakan xylol. Jaringan dimasukkan ke dalam xylol I selama 1 jam, kemudian xylol II juga selama 1 jam.
- *Impregnasi* dilakukan dengan merendam jaringan ke dalam paraffin yang telah di cairkan pada suhu 56-60°C.
- *Embedding* dilakukan dengan membenamkan jaringan pada paraffin I, II, dan III masing-masing selama 30 menit, kemudian didinginkan hingga paraffin membeku.
- *Trimming* merupakan proses selanjutnya, yaitu cetakan paraffin dirapikan sehingga dapat diiris dengan menggunakan mikrotom.
- Pemotongan jaringan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom setebal kurang lebih 5 µm.
- Potongan jaringan berbentuk pita paraffin dipindahkan dengan menggunakan kuas kedalam water bath yang temperaturnya diatur dengan suhu 37-40°C, dan dibiarkan beberapa saat hingga pita paraffin mengembang.
- Setelah pita mengembang dengan baik ditempelkan pada kaca objek yang telah *dicoated* dengan menggunakan albumin, kemudian memasukkan kaca objek pada waterbath dan menggerakkannya ke arah

pita paraffin, kemudian dengan bantuan kuas ditempelkan pada kaca objek, lalu dikeluarkan pelan-pelan agar tidak melipat.

- Kaca objek yang telah berisi jaringan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* agar sisa paraffin yang masih melekat pada kaca objek mencair.
- Prosedur terakhir dilakukan pewarnaan *Hematoksilin-eosin* (HE) sesuai prosedur standar.

2.7.13 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Prosedur pewarnaan *Hematoksilin-eosin* (HE) dilakukan berdasarkan metode Bancroft et al. (2019). Prinsip utama dalam prosedur ini adalah inti sel atau nukleus yang bersifat asam akan menarik zat atau larutan yang bersifat basa, sehingga akan menunjukkan warna biru. Adapun sitoplasma yang bersifat basa akan menarik zat atau larutan yang bersifat asam sehingga akan memunculkan warna merah. Berikut adalah tahapan pada pewarnaan dengan menggunakan *Hematoksilin-Eosin* :

- Deparafinisasi guna melarutkan paraffin yang ada pada jaringan, proses ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 15 menit.
- Kemudian dilakukan proses rehidrasi untuk memasukkan kembali air ke dalam jaringan, proses ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat, pertama adalah alkohol absolut, kemudian alkohol 90%, dan 80% masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, cuci dengan menggunakan air yang mengalir hingga alkohol diyakini bersih.
- Pewarnaan pertama dilakukan untuk memberikan warna pada nukleus dan sitoplasma sel. Preparat direndam ke dalam hematoksilin selama 15 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir hingga hematoksilin tidak luntur.
- Diferensiasi dilakukan untuk mengurangi warna biru pada nukleus, serta menghilangkan warna biru pada sitoplasma yang normalnya berwarna merah. Preparat dimasukkan ke dalam alkohol asam sebanyak 2 kali, dan hanya dicelupkan saja. Kemudian dicuci dengan air mengalir, dan dicuci kembali dengan cara merendam preparat ke dalam aquades sekitar 15 menit, hingga aquades tampak berwarna biru.
- Pewarnaan kedua dilakukan untuk memberikan warna merah pada sel sitoplasma. Preparat direndam ke dalam eosin selama 5 menit.
- Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan air dari jaringan, dilakukan dengan merendam preparat kembali pada larutan alkohol 70%, 80%, 90%, dan absolut masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir.
- Kemudian rendam kembali dalam xylol I dan II selama masing-masing 3 menit.
- Kemudian lakukan *mounting* untuk mengawetkan jaringan, dengan cara meneteskan entellan 1 hingga 2 tetes pada preparat. Setelah itu,

melekatkan kaca penutup dengan hati-hati. Perhatikan apakah ada gelembung atau tidak. Lalu, biarkan mengering.

- Pemberian label : nomor dan kelompok tikus putih, nama organ, tanggal pembuatan preparat.

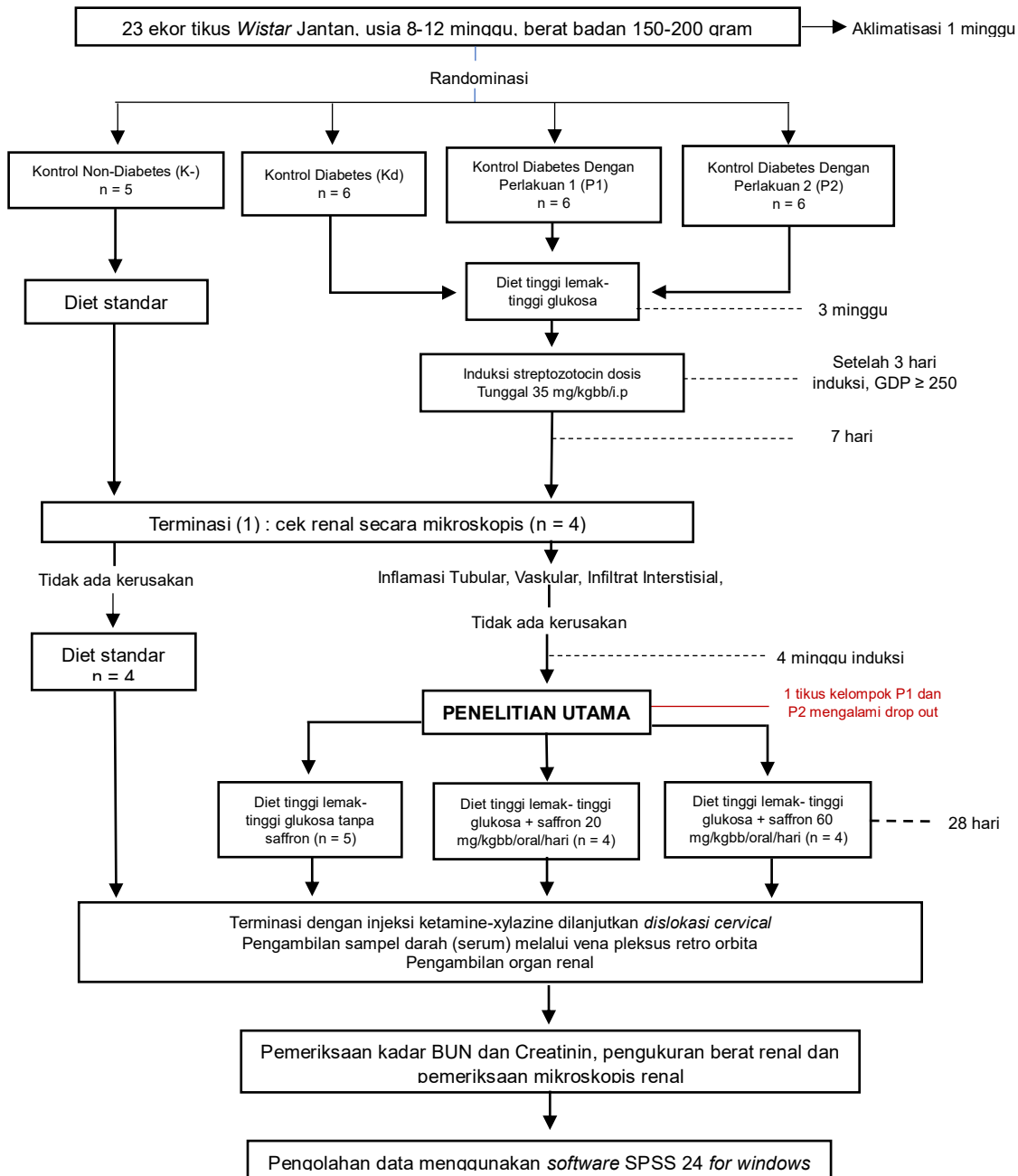
2.7.14 Penilaian Histopatologi Renal

Penilaian histopatologi jaringan renal dilakukan oleh ahli dibidang patologi anatomi, yaitu dokter spesialis patologi anatomi yang dilakukan secara blinded. Penilaian ini menggunakan skoring sistem EGTI penilaian histologi yang dianalisis secara semikuantitatif dengan delapan lapang pandang pada pembesaran 10x dengan pengelompokkan sebagai berikut (Khalid, 2016) :

Tabel 4. Penilaian Semikuantitatif Histopatologi Renal (Khalid Usman,2016)

Komponen Jaringan	Deskripsi Kerusakan	Skor
Glomerular	Tidak ada kerusakan	0
	Penebalan Membran basalis, Kapsula bowman	1
	Retraksi glomerular tuft, ekspansi mesangial	2
	Fibrosis glomerular	3
	Tidak ada kerusakan	0
Tubulo/Interstitial	Inflamasi, perdarahan pada jaringan < 25%	1
	Skor 1, Nekrosis jaringan < 25%	2
	Skor 1, Nekrosis jaringan < 60%	3
	Skor 1, Nekrosis jaringan ≥ 60%	4
	Tidak ada kerusakan	0
Tubular	Brush Border berkurang < 25% pada sel tubulus	1
	Brush Border berkurang ≥ 25% pada sel tubulus,	2
	Penebalan Membran Basal	
	Skor 2 disertai Inflamasi, formasi cast, nekrosis sel tubulus hingga 60%	3
	Skor 3 disertai nekrosis sel tubulus ≥ 60%	4
Endotel	Tidak ada kerusakan	0
	Edema Endotelial	1
	Disrupsi Endotelial, infiltrasi inflamasi ringan	2
	Kehilangan endotel, infiltrasi inflamasi berat	3

2.8 Alur Penelitian



Bagan 3. Alur Penelitian

2.9 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Protokol Izin penelitian dilakukan pada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar dengan mendapatkan nomor rekomendasi persetujuan etik Nomor : 76/UN4.6.4.5.31/PP36/2025

2.10 Jenis Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yang diperoleh dari variabel penelitian, yaitu : data berat renal tikus, tampilan mikroskopis renal berdasarkan skor kerusakan kronik renal, dan kadar serum BUN dan Creatinin.

2.11 Teknik Analisis Data

Data hasil pemeriksaan dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS versi 24 *for windows*. Seluruh data yang didapatkan dari ketiga kelompok diuji normalitas dengan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Setelah dilakukan uji normalitas, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene's Test*. Data dikatakan terdistribusi normal dan homogen jika nilai $p \geq 0.05$. Data kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One Way Anova* jika data terdistribusi normal, dengan signifikansi ditentukan berdasarkan nilai $\alpha = 0.05$. Jika tidak terdistribusi normal, maka akan dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Setelah itu, dilanjutkan dengan adalah uji *post hoc Tukey Test* untuk mengetahui beda antar perlakuan. Pengukuran data primer pada berat organ renal menggunakan uji *One Way Anova* sedangkan pengukuran data pada hasil BUN dan Creatinin menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

Hasil skoring histologi organ renal menggunakan GraphPad Prisma 10.5.0 *for windows*. Data kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dengan signifikansi ditentukan berdasarkan nilai $p \text{ value} < 0.05$). Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk grafik tabung.