



**UJI TOKSISITAS AKUT FLAVONOID RUTINOSIDE ORAL
TERHADAP PERUBAHAN MIKROSKOPIS
GINJAL TIKUS WISTAR**

SKRIPSI

Oleh

**Yulia Mega Pratiwi
NIM 192010101004**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2024



**UJI TOKSISITAS AKUT FLAVONOID RUTINOSIDE ORAL
TERHADAP PERUBAHAN MIKROSKOPIS
GINJAL TIKUS WISTAR**

SKRIPSI

Disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan di Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Oleh

**Yulia Mega Pratiwi
NIM 192010101004**

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

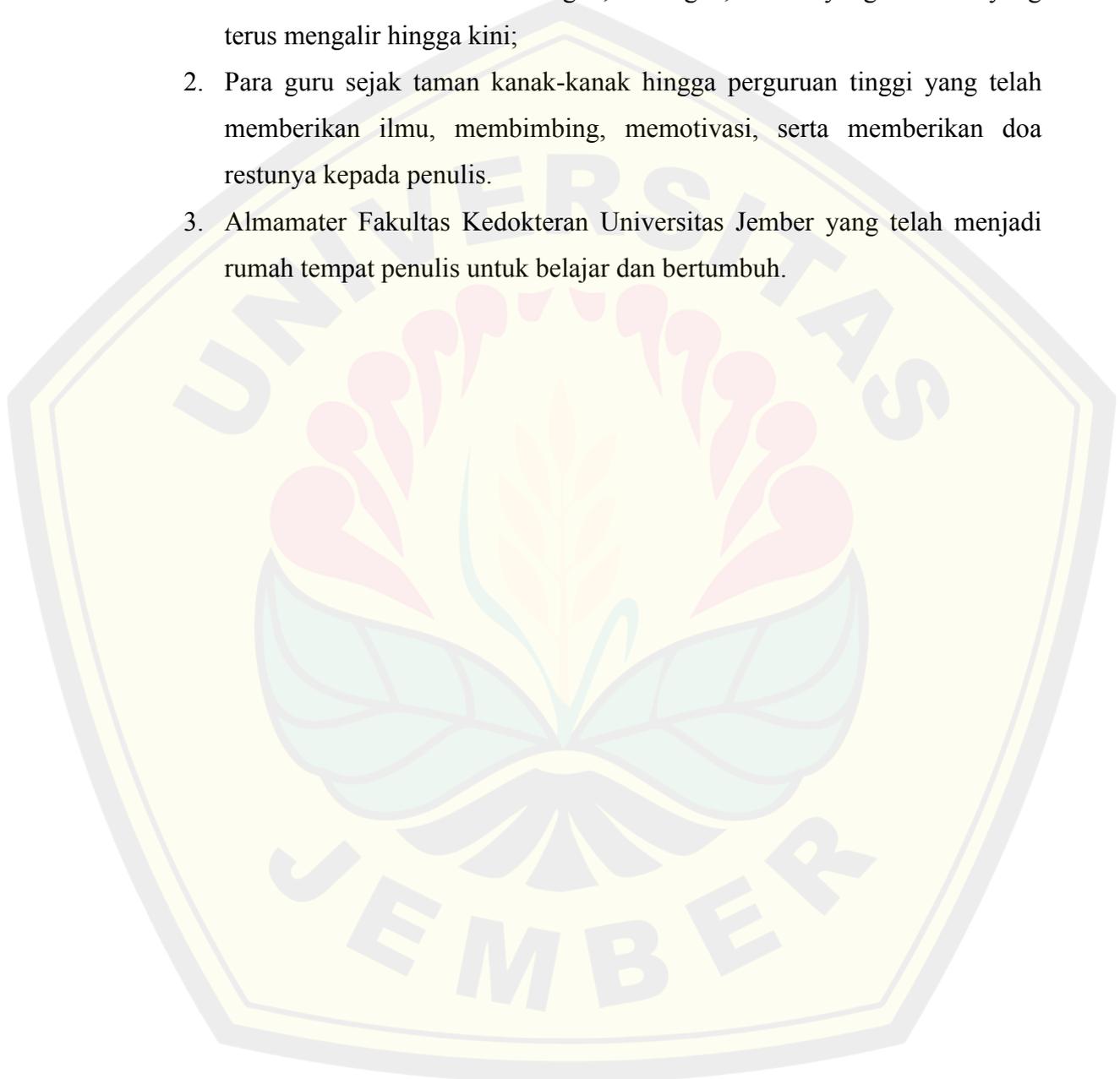
UNIVERSITAS JEMBER

2024

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua, Bapak Suprayitno dan Ibu Sulimah, S.Pd.SD yang senantiasa memberikan bimbingan, dukungan, kasih sayang serta doa yang terus mengalir hingga kini;
2. Para guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu, membimbing, memotivasi, serta memberikan doa restunya kepada penulis.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah menjadi rumah tempat penulis untuk belajar dan bertumbuh.



MOTTO

*“Barang siapa yang keluar untuk mencari ilmu, maka ia berada di jalan Allah
hingga ia pulang.”*

(HR. At-Tirmidzi)



PERNYATAAN

Saya yang beratanda tangan dibawah ini:

Nama : Yulia Mega Pratiwi

NIM : 192010101004

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Flavonoid Rutinoside Oral terhadap Perubahan Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Januari 2024
Yang menyatakan,

Yulia Mega Pratiwi
NIM 192010101004

SKRIPSI

**TOKSISITAS AKUT FLAVONOID RUTINOSIDE ORAL
TERHADAP PERUBAHAN MIKROSKOPIS
GINJAL TIKUS WISTAR**

Oleh

Yulia Mega Pratiwi
NIM 192010101004

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Nindya Shinta R., M.Ked, Sp.THT-KL

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Laksmi Indreswari, Sp.B

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Flavonoid Rutinoside Oral terhadap Perubahan Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar” telah disetujui pada:

Hari, tanggal : Senin, 29 Januari 2024

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

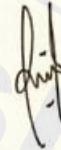
Tim Penguji

Ketua



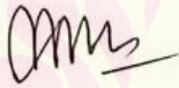
dr. Cholis Abrori, M.Kes, M.Pd.Ked.
NIP 197105211998031003

Anggota I,



dr. Rosita Dewi, M.Biotek.
NIP 198404282009122003

Anggota II,



dr. Nindya Shinta R., M.Ked, Sp.THT-KL.
NIP 197808312005012001

Anggota III,



dr. Laksmi Indreswari, Sp.B.
NIP 198309012008012012

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember



dr. Ulfa Elfiah M.Kes., Sp. BP-RE., Subsp. L.B.L. (K)
NIP 197607192001122001

RINGKASAN

Uji Toksisitas Akut Flavonoid Rutinoside Oral terhadap Perubahan Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar; Yulia Mega Pratiwi, 192010101004; 2024; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Rutinoside merupakan salah satu turunan dari flavonoid. Menurut penelitian, rutinoside memiliki banyak aktivitas farmakologis dan juga memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Antioksidan dapat bersifat menguntungkan dalam kadar yang rendah, namun dalam keadaan tertentu antioksidan dapat berubah menjadi prooksidan dan mendukung stres oksidatif. Salah satu organ penting tempat sasaran utama dari efek toksik berbagai senyawa ialah ginjal, karena toksikan diekskresikan melalui ginjal. Sejauh ini, tidak terdapat uji toksisitas akut untuk flavonoid rutinoside. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dirancang untuk mengetahui toksisitas akut oral dari flavonoid rutinoside berdasarkan perubahan gambaran mikroskopis ginjal pada tikus wistar.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sebenarnya dengan desain *post-test only control group design*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember tahun 2022 di Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*. Jumlah sampel disesuaikan dengan guideline OECD 423. Uji toksisitas akut dilakukan berdasarkan guideline OECD 423 dengan dosis 5000 mg/kgBB. Dilakukan pembuatan preparat ginjal tikus dengan pewarnaan Hematoksilin-eosin, selanjutnya dilakukan skoring pada gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x menggunakan sistem skoring Anggraini. Data yang diperoleh akan dilakukan uji komparasi *Mann-Whitney*.

Hasil uji komparasi *Mann-Whitney* pada penelitian ini adalah $p=0,523$. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian rutinoside dalam dosis 5000 mg/kgBB tidak menyebabkan perubahan yang signifikan pada gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar. Saran pada penelitian berikutnya adalah melakukan penelitian lebih lanjut

seperti uji toksisitas subakut oral, uji toksisitas subkronis oral, dan uji toksisitas kronis oral terhadap flavonoid rutinose.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah subhanahu wata'ala atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Flavonoid Rutinoside Oral terhadap Perubahan Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran. Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan tak terlepas dari doa, bimbingan, dan dukungan banyak pihak, untuk itu saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE., Subsp. L.B.L. (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Nindya Shinta Rumastika, M.Ked., Sp.THT-KL selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Laksmi Indreswari, Sp.B selaku Dosen Pembimbing Anggota yang dengan sabar membimbing, memberikan banyak ilmu, masukan dan saran, serta motivasi untuk penulis dalam menyusun skripsi ini;
3. dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Rosita Dewi, M.Biotek. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan banyak saran dan masukan yang membangun serta bimbingan dalam penyusunan skripsi ini;
4. dr. Rena Normasari, M.Biomed., yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk menjadi bagian dari kelompok penelitian disertasinya serta memberikan arahan, bimbingan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
5. Dr. dr. Hairrudin, M.Kes., selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing, mendukung, dan meluangkan waktu untuk proses akademik penulis;

6. Kedua orang tua, Bapak Suprayitno dan Ibu Sulimah, S.Pd.SD. yang telah sepenuhnya memberikan bimbingan, dukungan, motivasi, kasih sayang, dan doa restu yang terus mengalir untuk penulis;
7. Kedua kakak, Afdian Eko Wibowo, S.T. beserta istri Luluk Maratus Solekhah S.T., dan Hendrick Hernando, S.T., M.M. beserta istri Evi Nila Cristina, S.T. yang senantiasa selalu menyayangi, menjaga, memberikan dukungan dan motivasi serta doa-doa yang selalu menyertai penulis;
8. Pranata Laboratorium Pendidikan Farmakologi, Lilik Maslian, A.Md. yang telah memberikan banyak bantuan dan dukungan untuk penulis selama penyusunan skripsi ini;
9. Keluarga NIM 004 yang senantiasa memberikan banyak bantuan dan dukungan kepada penulis;
10. Teman-teman Angkatan 2019 (Costae) yang telah memberikan banyak dukungan dan semangat kepada penulis;
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, yang dengan dukungan, bantuan, dan doanya telah mengantarkan penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah subhanahu wata'ala senantiasa melimpahkan Rahmat-Nya kepada seluruh pihak yang telah membantu pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan masyarakat.

Jember, 29 Januari 2024

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
SKRIPSI	vi
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.3.1 Tujuan Umum	2
1.3.2 Tujuan Khusus	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Teoritis	3
1.4.2 Manfaat Praktis	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Flavonoid	4
2.2 Rutinoside	6
2.3 Antioksidan dan Prooksidan	9
2.4 Tinjauan Toksikologi	11
2.5 Uji Toksisitas	12

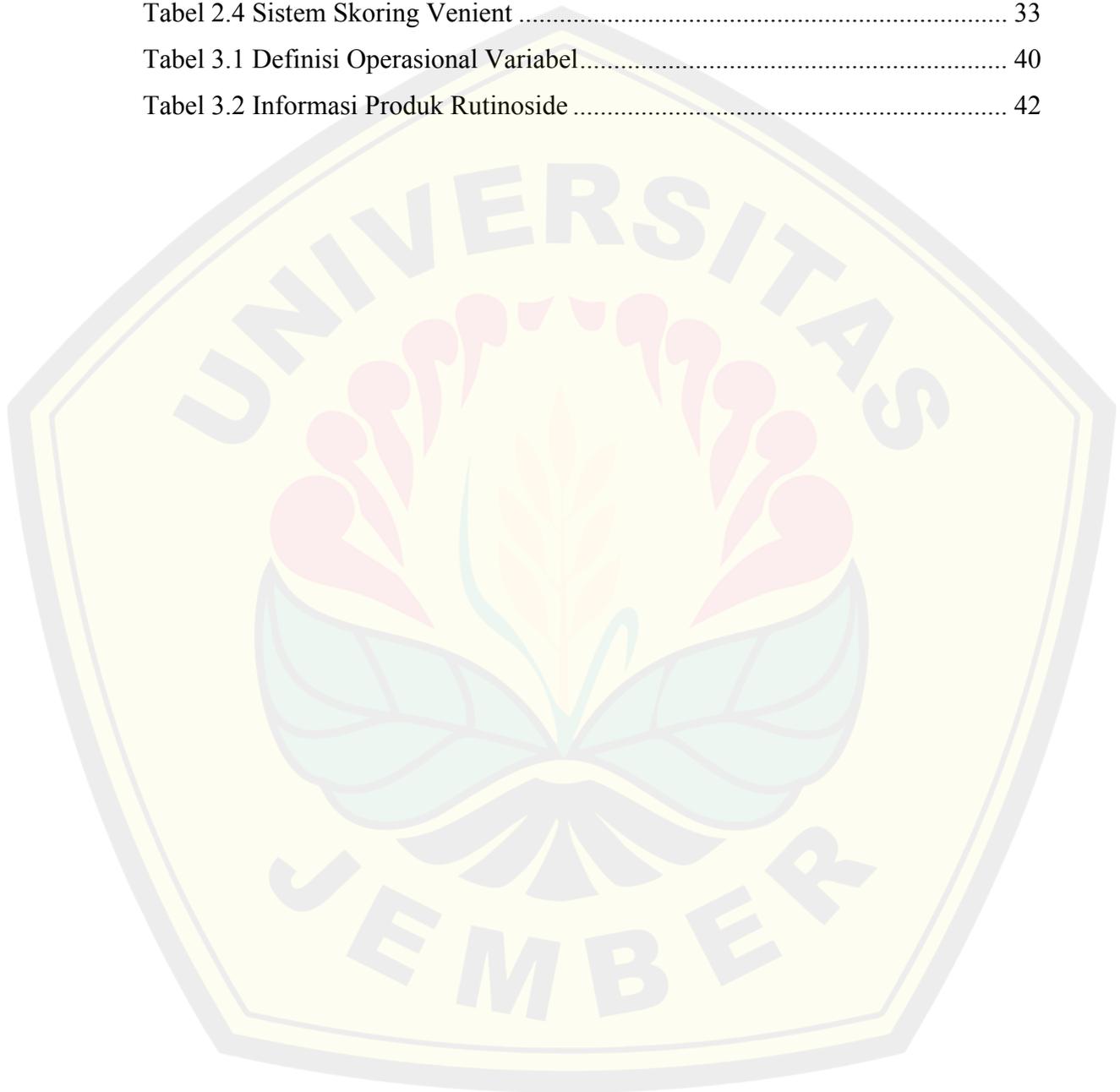
2.6 Uji Toksisitas Akut	13
2.6.1 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 401	13
2.6.2 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 420	14
2.6.3 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 423	14
2.6.4 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 425	16
2.7 Ginjal.....	16
2.7.1 Anatomi Ginjal	16
2.7.2 Fisiologi Ginjal	17
2.7.3 Gambaran Mikroskopis Ginjal.....	20
2.7.4 Perubahan Gambaran Mikroskopis Ginjal.....	25
2.7.5 Skoring Histopatologi Ginjal	31
2.8 Kerangka Teori	34
2.9 Kerangka Konsep.....	35
2.10 Hipotesis Penelitian.....	36
BAB 3. METODE PENELITIAN	37
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	37
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	38
3.2.1 Populasi.....	38
3.2.2 Sampel	38
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	39
3.4 Variabel Penelitian.....	39
3.5 Definisi Operasional.....	40
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	41
3.6.1 Alat Penelitian.....	41
3.6.2 Bahan Penelitian	41
3.7 Prosedur Penelitian.....	42
3.7.1 Uji Kelayakan Etik.....	42
3.7.2 Perawatan Hewan Coba	42
3.7.3 Pembuatan dan Pemberian Larutan DMSO dan Rutinoside....	43
3.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal.....	44
3.7.5 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal.....	45

3.8 Analisis Data.....	45
3.9 Alur Penelitian	46
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
BAB 5. PENUTUP.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Peran dan Mekanisme Kerja Rutinoside.....	8
Tabel 2.2 Sistem Skoring Anggraini.....	32
Tabel 2.3 Sistem Skoring Suhita.....	32
Tabel 2.4 Sistem Skoring Venient.....	33
Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel.....	40
Tabel 3.2 Informasi Produk Rutinoside.....	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur kerangka dasar flavonoid dan kelasnya.....	5
Gambar 2.2 Kelas dan sub-kelas flavonoid.....	6
Gambar 2.3 Struktur kimia flavonoid rutinoside.	7
Gambar 2.4 Klasifikasi antioksidan	10
Gambar 2.5 Tiga fase efek senyawa toksik.....	11
Gambar 2.6 Acuan prosedur pengujian toksisitas akut oral OECD 423.....	15
Gambar 2.7 Struktur anatomi ginjal.....	17
Gambar 2.8 Proses dasar pada ginjal.	19
Gambar 2.9 Gambaran mikroskopis ginjal.	21
Gambar 2.10 Gambaran mikroskopis korteks ginjal.....	22
Gambar 2.11 Korteks ginjal	23
Gambar 2.12 Medula ginjal: papillary region (potongan transversal).	23
Gambar 2.13 Medula ginjal: terminal end of papilla (potongan longitudinal).	24
Gambar 2.14 Duktus-duktus pada medula ginjal.....	24
Gambar 2.15 Degenerasi sel ginjal	25
Gambar 2.16 Pelebaran lumen tubulus	26
Gambar 2.17 Vakuolisasi sel tubulus.....	27
Gambar 2.18 Pelebaran ruang bowman	28
Gambar 2.19 Hiperplasia tubulus.....	28
Gambar 2.20 Kariomegali.....	29
Gambar 2.21 Badan inklusi.....	30
Gambar 2.22 Nekrosis sel.....	31
Gambar 2.23 Skema kerangka teori.....	34
Gambar 2.24 Skema kerangka konsep.....	35
Gambar 3.1 Rancangan penelitian.	37
Gambar 3.2 Skema alur penelitian	46
Gambar 4.1 Gambaran histopatologi ginjal tikus wistar kelompok kontrol	49
Gambar 4.2 Gambaran histopatologi ginjal tikus wistar kelompok perlakuan	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Surat Keterangan Persetujuan Etik	61
Lampiran 3.2 SOP Pemberian flavonoid Rutinoside terhadap Hewan Coba.....	63
Lampiran 3.3 Tabel Pemberian dosis Rutinoside	65
Lampiran 3.4 Tabel Observasi Berat Badan Hewan Coba Pasca Uji	65
Lampiran 3.5 Tabel Observasi Tanda Toksisitas pada Hewan Coba Pasca Uji ...	66
Lampiran 3.6 Tabel data Skoring Histopatologi Ginjal Tikus.....	67
Lampiran 4.1 Tabel Konversi Data Hasil Skoring Histopatologi dengan MSI	68
Lampiran 4.2 Tabel hasil Uji Normalitas Data dengan uji Shapiro-Wilk.....	68
Lampiran 4.3 Tabel hasil Uji Homogenitas Data dengan uji Lavene	68
Lampiran 4.4 Tabel hasil Uji Komparasi Data dengan uji Mann-Whitney	69
Lampiran 4.5 Tabel hasil Uji Reliabilitas dengan uji Cornbach Alpha	69
Lampiran 4.6 Dokumentasi Penelitian.....	70

DAFTAR SINGKATAN

AVMA	: <i>American Vetenary Medical Association</i>
BNF	: <i>Buffer Neutral Formalin</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
DMSO	: Dimetil sulfoksida
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
GGT	: <i>Gamma Glutamyl Transferase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GST	: <i>Glutathion S-transferase</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroksidase</i>
IUPAC	: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD50	: <i>Lethal Dose-50</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSI	: <i>Method of successive interval</i>
NADPH	: <i>Nikotinamida Adenin Dinukleotida Hidrogen Fosfat</i>
NOD	: <i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
NTA	: <i>Nekrosis Tubular Akut</i>
OECD	: <i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistical Program for Social Science</i>
TNF-a	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obat merupakan suatu senyawa yang dapat digunakan untuk mencegah, mengurangi, atau mengobati suatu penyakit atau kondisi tertentu. Seiring berjalannya waktu, manusia terus melakukan pengembangan terhadap obat dan dihasilkan penemuan-penemuan produk baru yang bermanfaat di dunia kesehatan. Berbagai jenis tanaman telah disinyalir memiliki senyawa-senyawa yang bermanfaat bagi manusia, terlebih untuk pengobatan. Diantara banyaknya senyawa yang terkandung dalam tanaman, salah satu diantaranya ialah flavonoid yang merupakan senyawa metabolit sekunder dari polifenol. Flavonoid dapat ditemui dengan mudah pada tanaman atau makanan serta diketahui memiliki berbagai efek bioaktif (Qinghu Wang dkk., 2016). Salah satu turunan atau jenis dari flavonoid adalah rutinoid, Rutinoid dapat ditemukan di beberapa bahan makanan yang familiar pada masyarakat Indonesia, seperti apel, teh, dan daun singkong. Dalam berbagai penelitian, rutinoid memiliki banyak aktivitas farmakologis dan juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Patel dkk., 2019). Dalam kadar yang rendah, antioksidan dapat bersifat menguntungkan bagi suatu sistem biologi, namun dalam jumlah yang tinggi antioksidan dapat menghancurkan keseimbangan sistem tersebut (Purnamasari dkk., 2018). Dalam keadaan tertentu antioksidan justru akan beralih fungsi menjadi prooksidan dan mendukung stress oksidatif (Carocho dan Ferreira, 2013).

Salah satu organ penting dalam tubuh manusia ialah ginjal, yakni organ yang fungsi utamanya menyaring limbah tubuh dalam darah (termasuk makanan, zat kimia, dan obat-obatan) (Malahina, 2018). Karena fungsinya tersebut ginjal merupakan organ tempat sasaran utama dari efek toksik berbagai senyawa sebab toksikan diekskresikan melalui ginjal (Burcham, 2014). Toksisitas pada ginjal tentunya akan menimbulkan kerugian dan ditakutkan akan jatuh pada kondisi gagal ginjal, baik gagal ginjal akut maupun kronik. Suatu senyawa akan tetap memiliki probabilitas menjadi senyawa yang toksik di dalam tubuh. Toksisitas

yang dimaksud disini merujuk pada sifat-sifat zat kimia dimana zat-zat ini memiliki efek samping yang dapat dialami seseorang akibat kontak dengan kulit atau mengkonsumsinya.

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa flavonoid memang memiliki tingkat antioksidan yang tinggi, namun telah diketahui bahwa banyak hal yang sangat berpengaruh dalam situasi ini, salah satunya ialah tingkat konsentrasi. Beberapa diantaranya justru bertindak sebagai prooksidan (Purnamasari dkk., 2018). Melihat flavonoid rutinoside memiliki potensi yang besar untuk dapat digunakan dalam industri, penulis hendak melakukan uji toksisitas akut oral. Melalui uji toksisitas akut oral, dapat dilihat toksisitas senyawa flavonoid rutinoside melalui perubahan gambaran mikroskopis (histopatologi) pada ginjal tikus. Sejauh ini, masih belum terdapat penelitian mengenai uji toksisitas akut oral flavonoid rutinoside terhadap ginjal tikus wistar normal. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dirancang untuk mengetahui toksisitas akut oral dari flavonoid rutinoside berdasarkan perubahan gambaran mikroskopis ginjal pada tikus wistar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan rumusan masalah pada penelitian ini yaitu “Bagaimana pengaruh pemberian flavonoid rutinoside terhadap perubahan gambaran mikroskopis ginjal pada tikus wistar?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengamati efek pemberian flavonoid rutinoside terhadap perubahan gambaran mikroskopis ginjal pada tikus wistar.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini ialah:

- a. Mengetahui efek pemberian flavonoid rutinoside pada tikus normal ditinjau dari histopatologi ginjal pada tikus wistar.

- b. Mengetahui kisaran nilai potensi toksisitas akut (LD_{50}) dari flavonoid rutinoid melalui uji toksisitas akut oral berdasarkan guideline OECD 423.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini dapat menjadi sumber informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian flavonoid rutinoid terhadap perubahan gambaran mikroskopis ginjal pada tikus wistar.

1.4.2 Manfaat Praktis

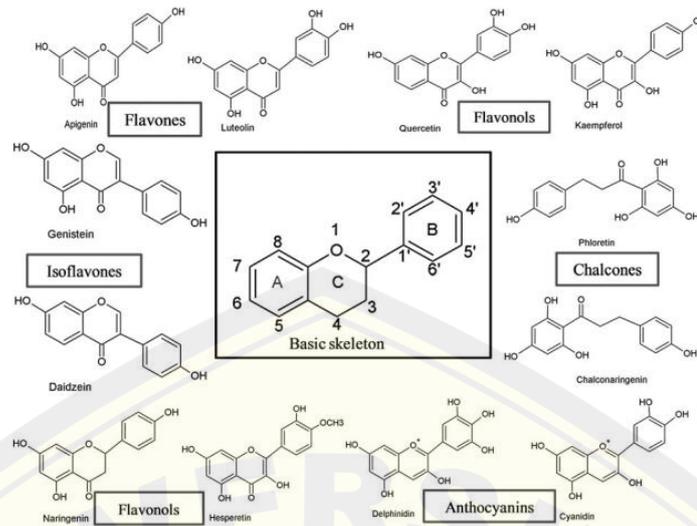
- a. Bagi institusi pendidikan, penelitian ini dapat menjadi bahan bacaan serta dapat menjadi dasar atau acuan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai flavonoid rutinoid.
- b. Bagi masyarakat, penelitian ini dapat menjadi pertimbangan terkait penggunaan flavonoid rutinoid khususnya bagi industri pembuat atau pengolah bahan obat-obatan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan metabolit sekunder tanaman yang berstruktur polifenol. Flavonoid banyak ditemui pada sayuran, buah-buahan, dan minuman tertentu (Panche dkk., 2016). Menurut *Nomenclature of flavonoids* (IUPAC Recommendations, 2017), istilah flavonoid diterapkan untuk (1) senyawa yang secara struktural didasarkan pada turunan dari propilbenzena tersubstitusi fenil yang memiliki kerangka C15, (2) senyawa dengan kerangka C16 yang merupakan fenil atau diganti dengan turunan propilbenzena (rotenoid), (3) flavonolignan berdasarkan turunan dari propilbenzena tersubstitusi fenil yang terkondensasi dengan prekursor lignan C6-C3 (Yonekura-Sakakibara dkk., 2019). Secara sederhana, flavonoid dapat diartikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki 15 atom karbon. Konfigurasi kerangka karbon flavonoid adalah C6-C3-C6, dimana kerangka tersebut terdiri dari dua gugus cincin benzena tersubstitusi (C6) dan disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Tian-Yang dkk., 2018).

Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa subkelompok berdasarkan pada karbon pada cincin C tempat melekatnya cincin B dan derajat ketidakjenuhan serta oksidasi cincin C. Flavonoid dengan cincin B menempel pada cincin C pada posisi ke-3 disebut isoflavon. Flavonoid dengan cincin B terpasang pada posisi 4 disebut neoflavonoid, sedangkan flavonoid dengan cincin B terpasang pada posisi 2 dibagi lagi menjadi beberapa subkelompok berdasarkan karakteristik struktural cincin C. Subkelompok ini adalah: flavonol, flavon, flavanon, flavanonol, flavanol, antosianin, kalkon (Panche dkk., 2016).



Gambar 2.1 Struktur kerangka dasar flavonoid dan kelasnya.

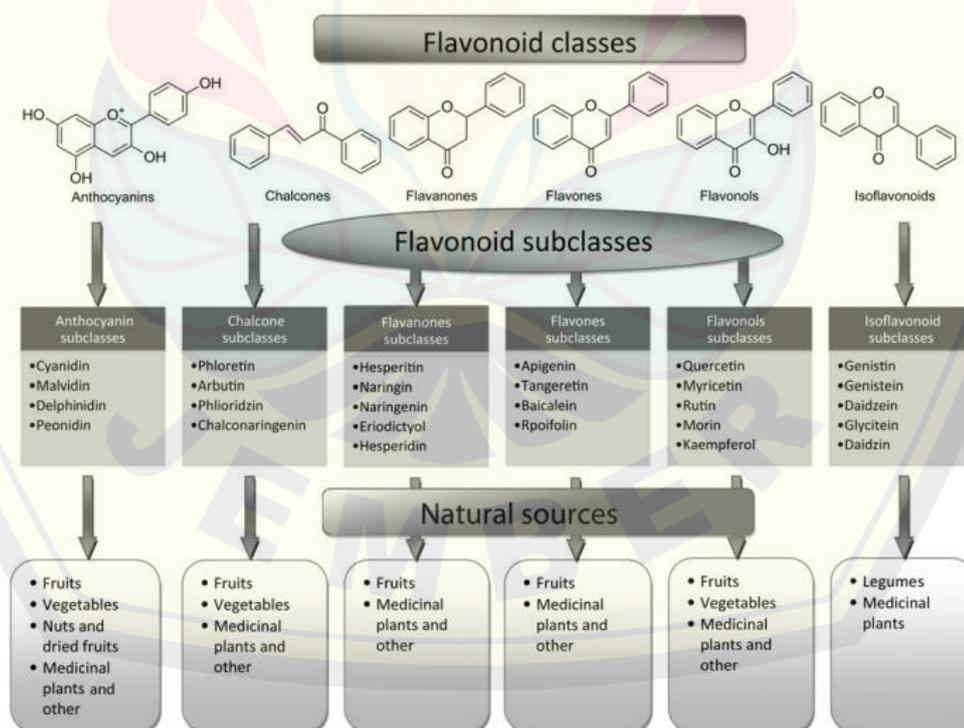
Pada alam, senyawa flavonoid merupakan suatu produk yang didapatkan dari hasil ekstraksi tanaman dan senyawa ini dapat dijumpai pada beberapa bagian dari tanaman. Hingga saat ini, telah lebih dari 9000 senyawa flavonoid telah diisolasi dan diidentifikasi. Flavonoid pada tanaman dapat bertindak sebagai fitoaleksin atau antioksidan yang memiliki kemampuan mengais spesies oksigen reaktif (ROS) dan melindungi tanaman dari kerusakan akibat cekaman biotik dan abiotik, termasuk radiasi UV, cekaman dingin, infeksi patogen, dan serangga (Liu dkk., 2021). Flavonoid juga berfungsi sebagai agen detoksifikasi dan senyawa pertahanan antimikroba pada tanaman. Selain berperan dalam sifat tahan beku serta kekeringan pada tanaman, flavonoid juga berperan dalam aroma dan warna bunga, serta penyerbukan pada buah (Panche dkk., 2016).

Tidak hanya pada tumbuhan, senyawa flavonoid juga merupakan komponen yang sangat dibutuhkan dalam berbagai aplikasi nutrasetikal, obat, farmasi, dan kosmetik (Panche dkk., 2016). Hal ini disebabkan karena sifat antioksidan, anti-mutagenik, anti inflamasi, dan anti-karsinogenik dari flavonoid. Kemampuan antioksidan flavonoid dapat mencegah terjadinya luka akibat radikal bebas. Hal ini terjadi sebab kemampuan dalam metilasi flavonoid yang dapat mendukung peranan senyawa ini. Metilasi dari flavonoid dapat meningkatkan stabilitas metabolik di dalam senyawa tersebut dan meningkatkan transportasi

membran yang terjadi dalam tubuh (Arifin dkk., 2018). Flavonoid juga memiliki kapasitas untuk memodulasi fungsi enzim seluler utama. Senyawa ini juga dapat menjadi inhibitor kuat untuk beberapa enzim, contohnya seperti siklooksigenase (COX), xantin oksidase (XO), lipoksigenase, dan fosfoinositida 3-kinase. Senyawa ini cukup menjanjikan untuk mengobati berbagai penyakit seperti kanker, penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen, radang, disfungsi kardiovaskular (Arifin dkk, 2018).

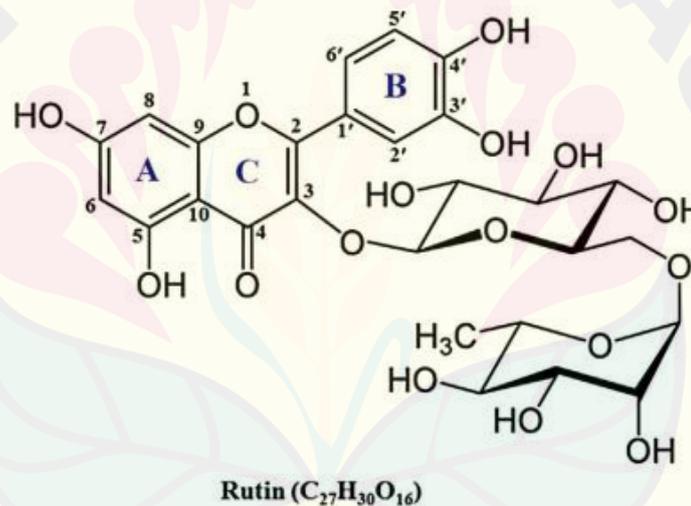
2.2 Rutinoside

Rutinoside atau rutin adalah flavonoid alami polifenol dan dikenal sebagai quercetin-3-O-rutinoside dan vitamin P. Nama rutin berasal dari tanaman *Ruta graveolens*, dimana tanaman ini juga mengandung rutinoside. Rutinoside merupakan subkelas dari flavonoid yang berasal dari kelas flavonol. Rutinoside tersebar secara luas di berbagai tanaman, dari sayuran dan buah-buahan hingga tanaman obat, diantaranya termasuk asparagus, soba, aprikot, apel, ceri, anggur, plum, jeruk, dan teh (Nouri dkk., 2020).



Gambar 2.2 Kelas dan sub-kelas flavonoid.

Rutinoside memiliki berat molekul 610,5 g/mol, dengan sediaan padat berupa bubuk halus dan memiliki titik lebur pada 125 derajat celcius. Secara kimia senyawa ini adalah glikosida yang terdiri dari quercetin aglikon flavonolik dengan rutinosa disakarida, dengan rumus kimia $C_{27}H_{30}O_{16}$. IUPAC juga memiliki nama untuk senyawa Rutinoside, yaitu *3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyloxy] flavone*. Rutinoside merupakan bahan lipofilik yang larut dalam pelarut organik seperti piridin, metanol dan etanol. Rutinoside juga memiliki stabilitas dan bioavailabilitas yang buruk. Sifat fisiko-kimia rutinoside ini disebabkan oleh kelarutannya yang rendah dalam air (Negahdari dkk., 2020).



Gambar 2.3 Struktur kimia flavonoid rutinoside.

Selama bertahun-tahun, aktivitas antioksidan rutinoside telah diselidiki dalam berbagai penelitian baik dalam model *in vitro* atau *in vivo*. Awalnya, dilaporkan bahwa struktur kimia rutin dapat secara langsung mengais ROS. Kedua, rutinoside dapat meningkatkan produksi glutathione dan sistem pertahanan oksidatif seluler, yang dikendalikan dengan peningkatan ekspresi enzim antioksidan seperti katalase dan superoksida dismutase. Ketiga, rutin juga dapat menghambat xantin oksidase yang terlibat dalam menghasilkan ROS. Dari hal-hal tersebut, dapat diketahui potensi terapeutik rutin dalam banyak kondisi

kesehatan terlebih apabila stres oksidatif merupakan penyebab yang mendasari (Enogieru dkk., 2018). Senyawa ini telah menunjukkan sejumlah aktivitas farmakologis, termasuk aktivitas antioksidan, sitoprotektif, vasoprotektif, antikarsinogenik, neuroprotektif, dan kardioprotektif (Ganeshpurkar dkk., 2017). Berikut beberapa aktivitas farmakologis rutinocide beserta mekanisme kerjanya.

Tabel 2.1 Peran dan Mekanisme Kerja Rutinoside

No.	Peranan Rutinoside	Mekanisme Kerja
1.	Anti-mikroba	Menghambat DNA gyrase, mencegah fungsi membran sitoplasma, serta menghambat metabolisme energi.
2.	Anti-arthritis	Menghambat produksi oksida nitrat dari makrofag dan proliferasi sel T.
3.	Anti-alergi	Menghambat aktivasi sel mast melalui penghambatan influks Ca^{2+} serta pelepasan histamin, leukotrien dan prostaglandin.
4.	Antioksidan	Menetralisir radikal bebas dan bertindak sebagai pengkkelat logam transisi.
5.	Anti-kanker	Menghambat proliferasi sel dan menghilangkan spesies oksigen reaktif.
6.	Anti-Inflamasi	Menghambat biosintesis eicosanoid dan aktivitas COX, lipoksigenase, serta PLA2.
7.	Anti-diabetes	Meningkatkan pelepasan insulin dari pulau langerhans, menurunkan resistin, meningkatkan ekspresi gen PPAR.
8.	Penyembuhan luka	Bertindak sebagai pemulung radikal bebas pada spesies pengoksidasi seperti superoksida radikal.

(Sumber: Negahdari dkk., 2020)

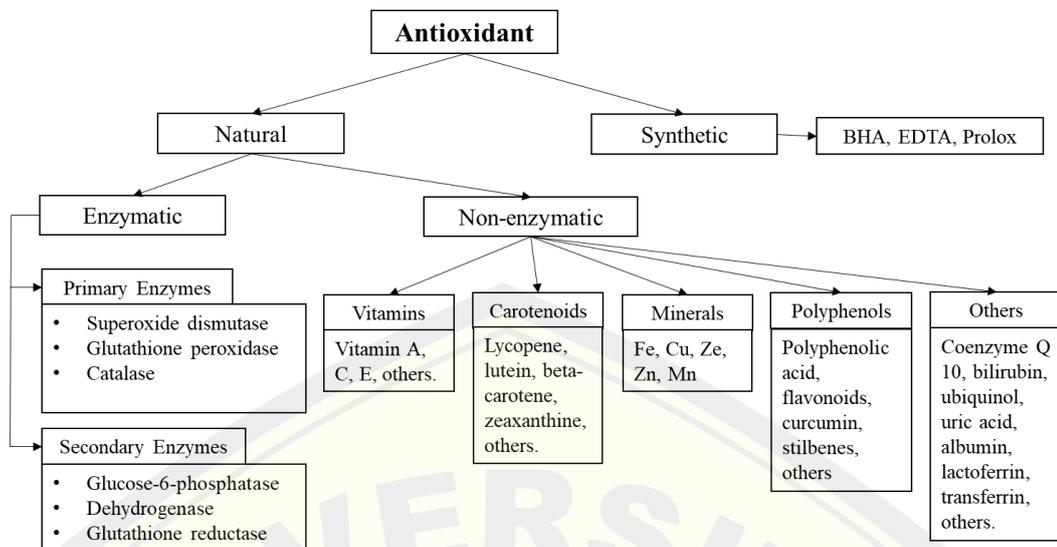
Dalam beberapa penelitian yang lain, flavonoid rutinocide justru tidak memberikan efek yang baik. Penelitian yang dilakukan oleh Tamura dkk. pada tahun 2010 menunjukkan bahwa rutinocide yang telah terdekomposisi secara enzimatis meningkatkan konsentrasi kalsium urin, meningkatkan ekskresi kalsium harian, mineralisasi di pelvis ginjal dan biasa dikaitkan dengan adanya sel-sel inflamasi, infiltrasi sel inflamasi dan/atau hiperplasia sel transisional pada kelompok tikus jantan dan peningkatan ekskresi kalsium harian pada kelompok tikus betina. Percobaan injeksi rutinocide secara intraperitoneal pada tikus *Swiss Albino* juga menunjukkan tingkat mortalitas yang tinggi (100%). Hal ini diduga karena rutinocide memiliki kemampuan untuk menginhibisi Asetilkolinesterase (AChE) (Sahib dkk., 2021). Rutinocide juga dapat meningkatkan resistensi obat

dalam tubuh (Ganeshpurkar dkk., 2017). Hal ini disebabkan karena rutinoides memiliki kesamaan struktur/derivat γ -benzopyrone yang dapat mengembangkan sifat induktif untuk sistem enzim metabolisme obat.

2.3 Antioksidan dan Prooksidan

Antioksidan ialah zat apapun yang mencegah, menunda, atau menghilangkan kerusakan oksidatif pada molekul target (Halliwell dan Gutteridge, 2015). Adapun definisi antioksidan lainnya ialah zat apapun yang secara langsung menghilangkan ROS atau secara tidak langsung menghambat produksi ROS. Menurut Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA), antioksidan ialah zat yang digunakan untuk mengawetkan makanan dengan memperlambat kerusakan, bau, atau perubahan warna akibat oksidasi. Antioksidan juga memiliki peran penting bagi ahli biologi dan dokter karena perannya yang dapat memberikan perlindungan bagi tubuh manusia terhadap penyakit akibat ROS dengan mengatur enzim yang berkaitan dengan ROS (Shalaby, 2019).

Aktivitas antioksidan efektif melalui berbagai cara, beberapa diantaranya yaitu dengan menghentikan penyebaran reaksi berantai autooksidasi, penghambat reaksi oksidasi radikal bebas, penghambat enzim prooksidatif, dan sebagai zat pereduksi yang mengubah hidroperoksida menjadi senyawa stabil (Sotler dkk, 2019). Antioksidan dapat diklasifikasikan sebagaimana yang tertera pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Klasifikasi antioksidan

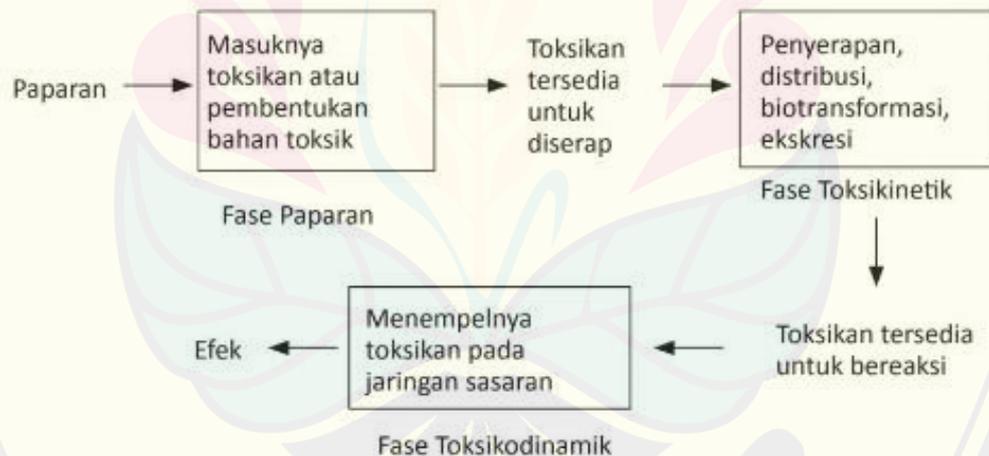
Prooksidan didefinisikan sebagai bahan kimia yang menginduksi stres oksidatif, melalui pembentukan ROS atau dengan menghambat sistem antioksidan. Agen dengan sifat prooksidan dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa kategori, seperti: obat-obatan, logam aktif redoks, pestisida, latihan fisik, kecemasan mental, kondisi patofisiologis, faktor lingkungan (polutan udara dan radiasi), produk disinfektan air, serta dari golongan antioksidan. Dalam keadaan tertentu, antioksidan dapat memiliki sifat prooksidan. Setidaknya terdapat tiga faktor yang dapat mempengaruhi fungsi antioksidan yang mengubahnya menjadi prooksidan. Faktor-faktor ini ialah keberadaan ion logam, konsentrasi antioksidan dalam lingkungan matriks dan potensi redoksnya (Sotler dkk., 2019).

Diketahui, antioksidan eksogen termasuk polifenol dianggap sebagai “pedang bermata dua” dalam keadaan redoks seluler. Beberapa penelitian mengenai antioksidan eksogen menunjukkan hasil yang kontroversial, terutama bila diberikan dalam dosis tinggi. Jenis, dosis, dan matriks antioksidan eksogen dapat menjadi faktor penentu yang mempengaruhi keseimbangan antara efek menguntungkan atau merugikan dari senyawa alami ini (Yordi dkk., 2012). Senyawa fenolik juga dapat menunjukkan efek prooksidan, terutama dalam sistem yang mengandung logam aktif redoks. Adanya besi atau tembaga dapat mengkatalisis siklus redoks dari senyawa tersebut dan menyebabkan pembentukan

fenolik radikal. Flavonoid juga telah dilaporkan dapat bertindak sebagai prooksidan dalam suatu sistem yang mengandung logam transisi. Flavonoid dengan logam transisi ini akan menginduksi kerusakan DNA serta peroksidasi lipid (Sotler dkk., 2019).

2.4 Tinjauan Toksikologi

Toksikologi ialah satu bidang ilmu yang mempelajari efek toksik atau efek berbahaya dari suatu bahan kimia. Dalam arti lain, toksikologi dapat diartikan sebagai studi mengenai *adverse effects* atau efek-efek yang tidak diinginkan dari suatu zat kimia terhadap organisme hidup (Yulianto dkk., 2017). Racun dapat diartikan sebagai bahan atau zat kimia yang berbahaya bagi tubuh. Kata racun "toxic" berasal dari bahasa Yunani dengan akar kata tox, yang berarti panah. Berdasarkan mekanisme kerjanya, terdapat tiga fase kerja senyawa toksik yaitu fase paparan, toksikokinetik, dan toksikodinamik.



Gambar 2.5 Tiga fase efek senyawa toksik.

Istilah toksisitas mengacu pada sifat-sifat suatu zat kimia yang memiliki efek samping yang mungkin dialami seseorang akibat adanya konsumsi atau kontak dengan kulit. Oleh karena itu, penting dilakukan pemeriksaan toksikologi terutama dalam pengembangan obat baru serta terapi dari suatu zat/senyawa yang telah diketahui sebelumnya. Penelitian mengenai toksikologi mulai dilakukan pada hewan di tahun 1920. Pada tahun 1980, *Organization for Economic Co-*

Operation and Development (OECD) mengeluarkan pedoman untuk melakukan uji toksisitas dari suatu senyawa baik obat atau yang berkaitan dengan farmasi (Parasuraman, 2011). Pedoman ini telah disetujui sebagai standar internasional untuk uji keamanan.

2.5 Uji Toksisitas

Uji toksisitas ialah pengujian untuk mengetahui atau mendeteksi efek toksik suatu zat terhadap suatu sistem biologi. Uji toksisitas juga dapat dilakukan untuk mendapatkan data dosis-respon dari suatu sediaan uji. Dalam arti lain, uji toksisitas ialah uji untuk mengamati aktivitas farmakologi dari suatu sediaan uji yang terjadi dalam waktu singkat setelah paparannya atau pemberian dengan dosis tertentu (Jelita dkk., 2020). Prinsip dalam uji toksisitas ialah komponen bioaktif akan bersifat toksik apabila diberikan dengan dosis yang tinggi, namun akan menjadi obat pada dosis yang rendah (Makiyah dkk., 2017). Data yang diperoleh dari uji ini dapat dipergunakan untuk melihat informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji jika sediaan tersebut terpapar pada manusia, sehingga nantinya dapat ditentukan dosis sediaan uji yang aman untuk digunakan oleh manusia. Uji ini menggunakan hewan uji sebagai modelnya. Hal ini berguna untuk mengetahui adanya reaksi seperti reaksi biokimia, fisiologis, serta patologis pada manusia terhadap suatu zat/senyawa. Hasil dari uji toksisitas dapat menjadi petunjuk toksisitas relatif suatu zat uji dan dapat membantu identifikasi efek toksik apabila terjadi paparan, namun tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu sediaan uji pada manusia.

Uji toksisitas dapat diklasifikasikan berdasarkan waktu dan organ targetnya. Terdapat berbagai macam uji toksisitas praklinik secara *in vivo*, diantaranya adalah uji toksisitas akut oral, uji toksisitas subkronik oral, serta uji toksisitas kronik oral. Terdapat pula uji teratogenesis, uji iritasi mata, uji iritasi/korosi akut dermal, uji toksisitas akut dermal, uji toksisitas subkronik dermal, uji sensitisasi kulit, uji iritasi mukosa vagina, dan uji toksisitas karsinogenesis.

2.6 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut ialah uji untuk mengetahui toksisitas suatu sediaan uji yang diberikan pada hewan uji dengan dosis tunggal yang pengamatannya dilakukan selama 24 jam (Chinedu dkk., 2013). Dalam beberapa kasus, pengamatan dapat dilakukan selama 7-14 hari untuk melihat reversibilitas. Tujuan adanya uji ini ialah untuk mendeteksi apakah terdapat toksisitas pada sediaan uji serta menentukan organ sasaran dan kepekaannya. Tujuan lainnya ialah untuk mendapatkan data bahaya suatu zat setelah pemberian secara akut serta memperoleh informasi awal yang dapat dipergunakan untuk menetapkan tingkat dosis yang dibutuhkan untuk uji toksisitas berikutnya (Riskiana dkk., 2021).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji toksisitas akut ialah metode OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). Metode ini telah mengalami beberapa kali pembaruan dan telah menggunakan hewan uji yang jumlahnya lebih sedikit dari metode yang lainnya. Metode pertama yang dikeluarkan oleh OECD ialah metode OECD 401, dilanjutkan dengan OECD 420, OECD 423, dan OECD 425. Selain digunakan untuk menentukan dosis toksik dari suatu sediaan uji, metode ini juga dapat digunakan untuk menentukan nilai LD50 (Chinedu dkk., 2013).

2.6.1 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 401

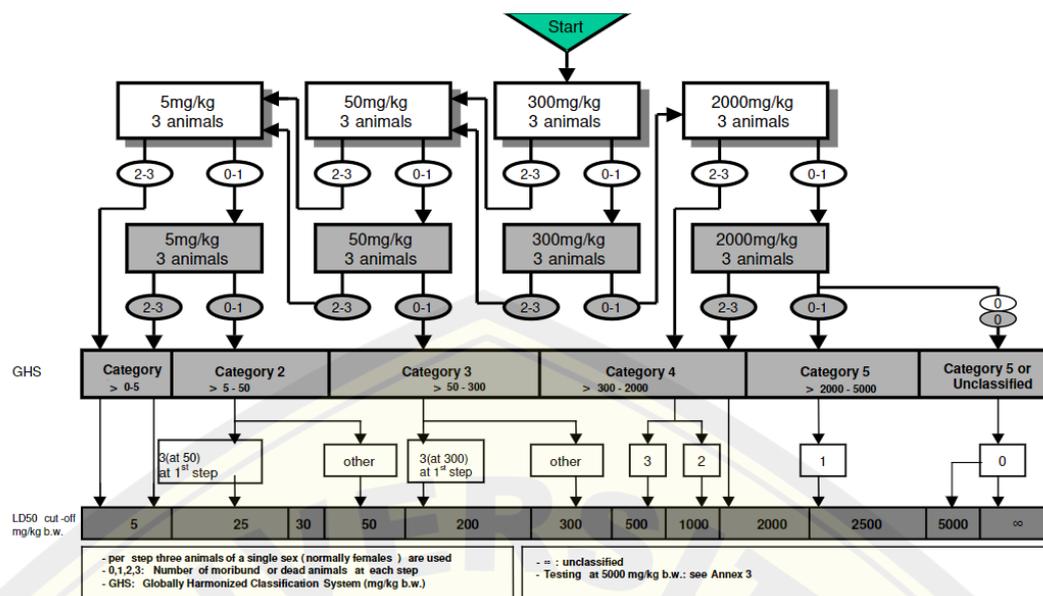
Uji toksisitas akut oral metode 401 dirilis oleh OECD pada tahun 1987. Prinsip uji toksisitas metode ini ialah mengelompokkan hewan uji dengan jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan. Metode OECD 401 ini menggunakan minimum 4 dosis dengan jumlah hewan uji 5 ekor di setiap kelompok dan masing-masing jenis kelamin, sehingga total dapat menggunakan 40 ekor hewan coba ditambah dengan 5 ekor untuk uji kontrol. Namun, metode OECD 401 dihapuskan pada tahun 2002 dan digantikan dengan metode OECD 420, 423 dan 425. Penghapusan metode ini dianggap sangat efektif karena mengurangi penggunaan hewan coba.

2.6.2 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 420

Salah satu metode uji toksisitas akut oral yang menggantikan metode OECD 401 ialah metode OECD 420. Metode OECD 420 ini dipublikasikan terlebih dahulu oleh OECD pada tahun 2001 sebelum metode 401 dihapuskan setahun setelahnya. Prinsip uji toksisitas akut oral metode 420 ini ialah hewan uji dikelompokkan berdasar pada jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan. Dosis yang ditetapkan pada metode ini ialah 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg dengan jumlah hewan uji 5 ekor untuk setiap kelompok.

2.6.3 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 423

Selain metode 420, metode lain untuk mengganti metode OECD 401 ialah metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode uji toksisitas akut oral OECD 423. *Acute Toxic Class Method*/OECD 423 yang ditetapkan adalah prosedur bertahap dengan penggunaan tiga hewan percobaan dari satu jenis kelamin per langkah. Bergantung pada kematian dan/atau kesakitan hewan, rata-rata 2-4 langkah mungkin diperlukan untuk memungkinkan penilaian toksisitas akut dari bahan uji. Dosis yang digunakan dalam metode ini sama dengan dosis pada metode OECD 420 yakni 5, 50, 300, dan 2000 mg/kgBB. Perbedaan metode ini dengan metode OECD 420 ialah jumlah hewan uji pada setiap dosisnya.



Gambar 2.6 Acuan prosedur pengujian toksisitas akut oral OECD 423.

Penggunaan dosis awal dipilih berdasarkan studi pengamatan dosis. Jika tidak ditemukan informasi mengenai studi penggunaan dosis pada penelitian sebelumnya, maka digunakan dosis awal sebesar 300 mg/kgBB. Sedangkan, apabila informasi yang ada menunjukkan pada penggunaan dosis tertinggi yakni 2000 mg/kgBB tidak menimbulkan kematian, maka uji batas harus diberikan dosis 5000 mg/kgBB. Penggunaan tingkat dosis tambahan 5000 mg/kgBB dapat dipertimbangkan. Untuk alasan kesejahteraan hewan dalam kategori GHS (*Globally Harmonized Classification System*) kategori 5 (berkisar 2000-5000 mg/kg) tidak disarankan dan hanya boleh dipertimbangkan untuk dilakukan bila ada kemungkinan kuat bahwa hasil uji tersebut memiliki relevansi langsung untuk melindungi hewan atau manusia. Apabila dilakukan pengujian pada dosis 5000 mg/kg, diperlukan hanya satu langkah uji menggunakan 3 ekor hewan uji. *Limit test* umumnya digunakan pada situasi dimana terdapat informasi yang menunjukkan bahwa zat uji yang diujikan dicurigai tidak toksik atau baru menunjukkan ketoksikannya diatas dosis yang biasa digunakan. *Limit test* pada tingkat dosis 2000 mg/kg BB dapat dilakukan dengan menggunakan 6 hewan uji. Pada limit test tingkat dosis 5000 mg/kg BB dapat dilakukan dengan

menggunakan 3 hewan uji. Apabila pada dosis ini terjadi kematian, maka diperlukan pengujian lebih lanjut pada tingkat dosis yang lebih rendah.

Pada metode ini, hewan coba diamati secara individual setelah diberikan pajanan (sediaan uji). Pengamatan dilakukan pada 30 menit pertama dilanjutkan secara periodic selama 24 jam pertama. Dalam 24 jam pertama juga diamati apakah terjadi kematian pada hewan coba. Pengamatan dilanjutkan setiap hari selama 14 hari. Pengamatan kepada hewan coba ini bertujuan untuk melihat kondisi toksik yang terjadi setelah dilakukan pemejanan.

2.6.4 Uji Toksisitas Akut Oral Metode OECD 425

Prinsip dari metode OECD 425 adalah uji dengan satu pemberian dosis secara progresif dari 1 hewan coba setiap tahapannya. Hewan uji pertama akan mendapatkan dosis yang lebih rendah dari estimasi nilai LD50 suatu zat uji. Apabila tidak terdapat informasi, maka pemberian dosis dimulai dari 175 mg/kgBB. Observasi atas respon dan/atau kematian hewan coba dilakukan hingga 14 hari setelah pemberian sediaan uji. Pemberian dosis sediaan uji selanjutnya dilakukan berdasarkan status hewan uji pada dosis sebelumnya setelah observasi selama 48 jam. Apabila hewan uji tidak mengalami kematian maka dosis selanjutnya akan dinaikkan dengan faktor kenaikan 3,2. Sebaliknya, apabila hewan uji mengalami kematian maka dosis berikutnya akan diturunkan dengan faktor penurunan 3,2.

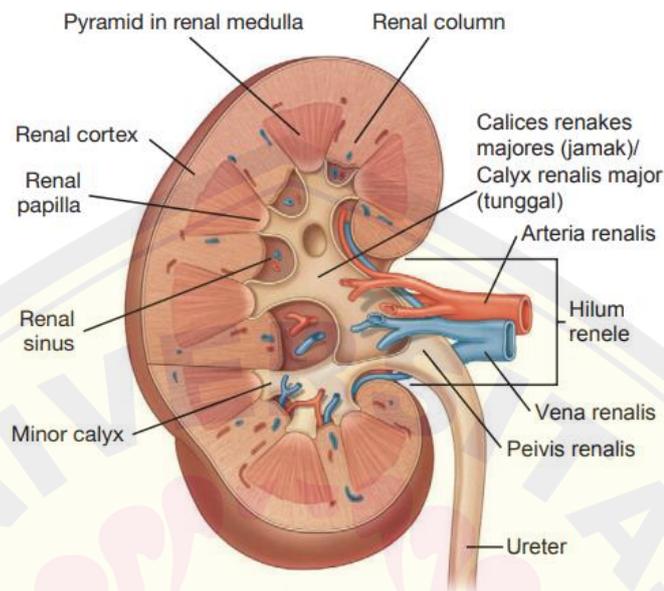
2.7 Ginjal

Ginjal adalah organ penting dalam tubuh manusia yang memiliki fungsi utama sebagai organ ekskresi yang menyaring limbah dalam darah dan mengeluarkannya dalam bentuk urin. Lebih dari itu, ginjal juga memiliki fungsi untuk menjaga homeostasis cairan tubuh agar tetap berfungsi dengan baik.

2.7.1 Anatomi Ginjal

Ginjal berbentuk mirip seperti biji kacang dan letaknya retroperitoneal pada regio abdominalis posterior. Organ ini terletak kira-kira setinggi vertebra

Torakal-XII di superior dan vertebra Lumbal-III di inferior dengan ginjal kanan terletak lebih rendah dari ginjal kiri pada posisi supinasi (Drake dkk., 2012).



Gambar 2.7 Struktur anatomi ginjal.

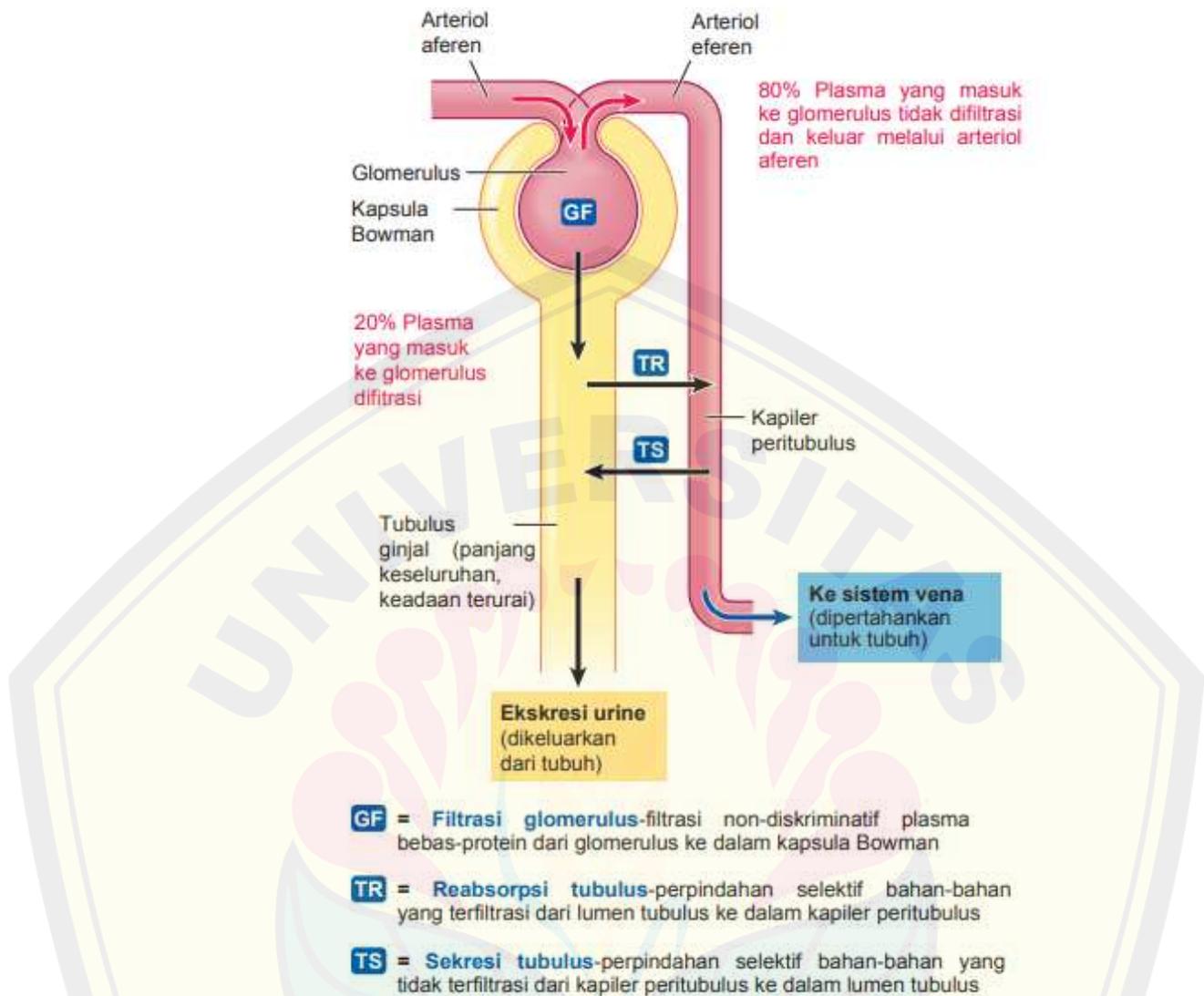
Pada umumnya, anatomi ginjal manusia terbagi menjadi tiga bagian yakni bagian korteks, medula, dan pelvis ginjal. Bagian terluar ialah korteks ginjal. Bagian luar korteks ginjal terbungkus oleh kapsul berupa jaringan lemak yang berperan untuk melindungi bagian dalam ginjal. Pada bagian medula, terdapat lengkung Henle bentuk piramida ginjal yang terdiri dari nefron dan tubulus. Bagian pelvis ginjal merupakan bagian paling dalam dan berbentuk corong. Pelvis ginjal memiliki fungsi sebagai jalur untuk cairan menuju ke kandung kemih (Julisawaty dkk., 2020).

2.7.2 Fisiologi Ginjal

Ginjal melakukan berbagai fungsinya untuk mempertahankan homeostasis di dalam tubuh. Ginjal memiliki fungsi regulatorik yakni fungsi untuk menjaga stabilitas volume, komposisi elektrolit, dan osmolaritas cairan ekstraseluler (Sherwood, 2018). Ginjal mempertahankan hampir seluruh elektrolit di dalam tubuh, air, dan keseimbangan antara produksi metabolik serta keluarannya. Ginjal melaksanakan pengaturan untuk menciptakan kestabilan lingkungan internal yang

dibutuhkan oleh sel untuk melakukan berbagai aktivitasnya. Selain peran regulatorik, organ ini juga memiliki fungsi untuk mengekskresikan bahan sisa metabolik yang memiliki potensi toksik serta senyawa asing dari tubuh. Ginjal akan mengeliminasi zat-zat yang tidak diinginkan dari filtrat dengan cara mengekskresikan zat-zat tersebut ke dalam urine. Sementara itu, zat yang diperlukan oleh tubuh akan dikembalikan oleh ginjal ke dalam darah (Guyton, 2018). Beberapa fungsi ginjal secara singkat ialah menjaga keseimbangan air dan osmolaritas cairan tubuh, mengatur jumlah dan konsentrasi sebagian besar ion cairan ekstraseluler, menjaga volume plasma dan keseimbangan asam-basa, mengekskresikan produk-produk sisa metabolisme dan senyawa asing non-nutritif, menghasilkan hormon eritropoietin dan renin, serta mengubah vitamin D menjadi bentuk aktifnya (Sherwood, 2018).

Ginjal terdiri atas sekitar 1 juta unit fungsional mikroskopik yang memiliki kemampuan untuk membentuk urine. Unit fungsional mikroskopik tersebut dikenal sebagai nefron. Nefron terdiri dari kumpulan kapiler atau disebut dengan glomerulus yang bertugas memfiltrasi darah dan tubulus yakni tempat untuk mengubah hasil filtrasi menjadi urine. Untuk membentuk urin, ginjal memiliki tiga proses dasar yakni filtrasi glomerulus, reabsorpsi tubulus, dan sekresi tubulus.



Gambar 2.8 Proses dasar pada ginjal.

Filtrasi glomerulus terjadi ketika darah mengalir melalui glomerulus menuju ke dalam kapsula bowman. Langkah ini merupakan langkah awal dalam pembentukan urin. Untuk mencapai kapsula bowman, cairan akan melewati tiga lapisan yang menyusun membran glomerulus, yakni lapisan dinding kapiler, membran basalis, dan lapisan dalam kapsula bowman. Selain adanya zat sisa, cairan filtrasi juga masih mengandung elektrolit, nutrien, dan komponen lain yang masih diperlukan oleh tubuh. Komponen-komponen esensial ini akan dikembalikan ke dalam tubuh melalui reabsorpsi tubulus (Sherwood, 2018).

Reabsorpsi tubulus merupakan salah satu proses yang sangat selektif. Filtrat akan mengalir melalui bagian-bagian nefron secara berurutan mulai dari tubulus proksimal hingga duktus koligens. Dalam perjalanan yang dilalui, beberapa zat akan direabsorpsi dengan selektif untuk dikembalikan ke dalam darah. Zat yang akan direabsorpsi harus diangkut terlebih dahulu untuk melintasi membran epitel tubulus ke dalam cairan interstisial ginjal dan kemudian melintasi membran kapiler peritubulus untuk menuju kembali ke dalam darah (Guyton, 2018).

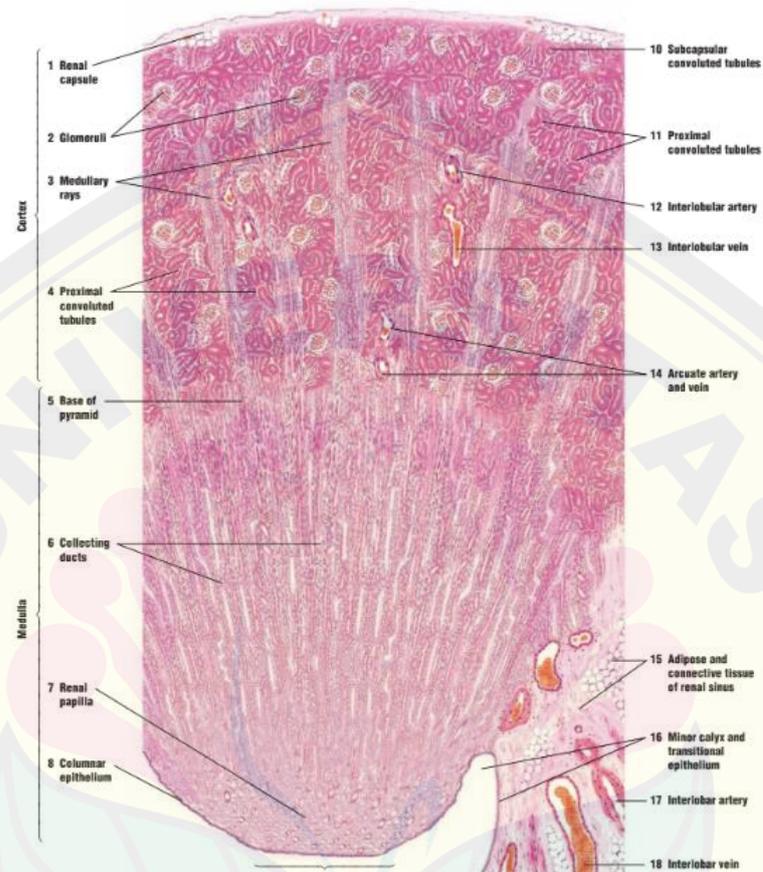
Proses yang terjadi setelah reabsorpsi tubulus ialah sekresi tubulus. Proses ini melibatkan transport transepitel seperti proses reabsorpsi tubulus, namun dengan langkah yang terbalik. Adanya pemindahan bahan dari kapiler peritubulus menuju ke dalam lumen tubulus menjadi mekanisme terakhir sebelum urine diekskresikan. Beberapa bahan yang disekresikan antara lain ialah ion kalium, ion hidrogen, serta anion dan kation organik. Dari sekitar 125 ml plasma yang difiltrasi per menit, sekitar 124 ml/menit akan direabsorpsi sehingga jumlah akhir urine yang terbentuk ialah 1 ml/menit. Hasil akhirnya, urine akan membawa berbagai produk sisa dalam konsentrasi yang tinggi serta bahan lainnya yang telah diatur oleh ginjal dalam jumlah yang berbeda-beda, dan zat yang memiliki benefit akan dikembalikan ke tubuh melalui proses reabsorpsi (Sherwood, 2018).

2.7.3 Gambaran Mikroskopis Ginjal

Ginjal dibagi menjadi dua bagian pada potongan sagital, yakni korteks pada bagian luar yang warnanya lebih gelap dan medula pada bagian dalam yang memiliki warna lebih terang. Bagian korteks dilapisi dengan kapsul ginjal jaringan ikat yang padat dan tidak teratur. Korteks memiliki tubulus distal dan proksimal, glomerulus, dan *medullary rays*. Di dalam korteks juga terdapat arteri dan vena interlobularis.

Bagian medula terdiri dari piramida ginjal. Dasar setiap piramid berbatasan dengan korteks dan puncaknya membentuk papila renalis runcing yang menjorok ke sekelilingnya. Terdapat struktur mirip corong yang disebut dengan *calyx minor*, yang mewakili bagian ureter yang berdilatasi. Terdapat area cribrosa

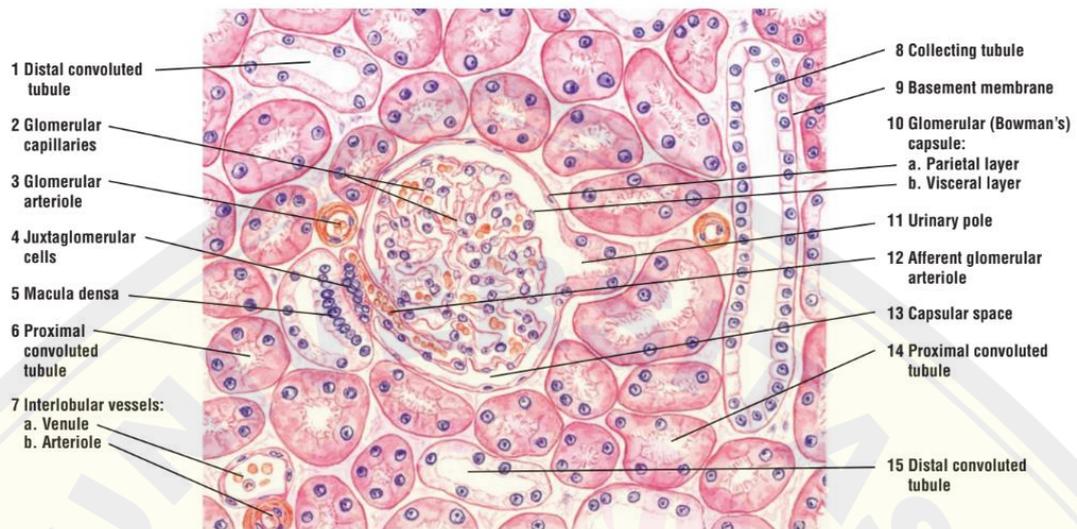
yang ditembus oleh lubang-lubang kecil, yang merupakan pembuka dari ductus kolektivus ke dalam *calyx minor*. Ujung dari papila ginjal biasanya ditutupi dengan epitel kolumnar sederhana (Eroschenko, 2013).



Gambar 2.9 Gambaran mikroskopis ginjal.

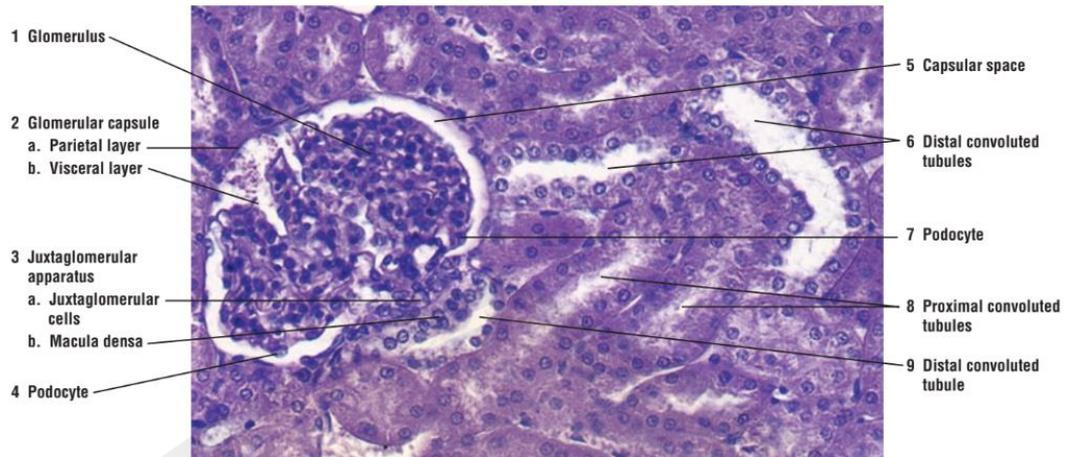
Apabila dilakukan pembesaran pada bagian korteks ginjal akan menggambarkan corpuscle renalis, tubulus-tubulus, dan apparatus juxtaglomerular. Pada corpuscle renalis terdapat kapiler glomerulus, lapisan parietal dan visceral dari kapsul glomerulus (Bowman), dan ruang kapsuler (*capsular space*). Terdapat *brush borders* dan sel asidofilik yang membedakan tubulus proksimal dari tubulus distal yang lebih kecil, lebih pucat dan tidak memiliki *brush borders*. Sel-sel kuboid dari tubulus kolektivus menjadi garis luar sel dan memiliki sitoplasma yang pucat. Setiap corpuscle renalis memiliki

vascular pole di mana terdapat arteriol glomerulus aferen dan eferen. Pada sisi yang berlawanan juga terdapat *urinary pole* (Eroschenko, 2013).



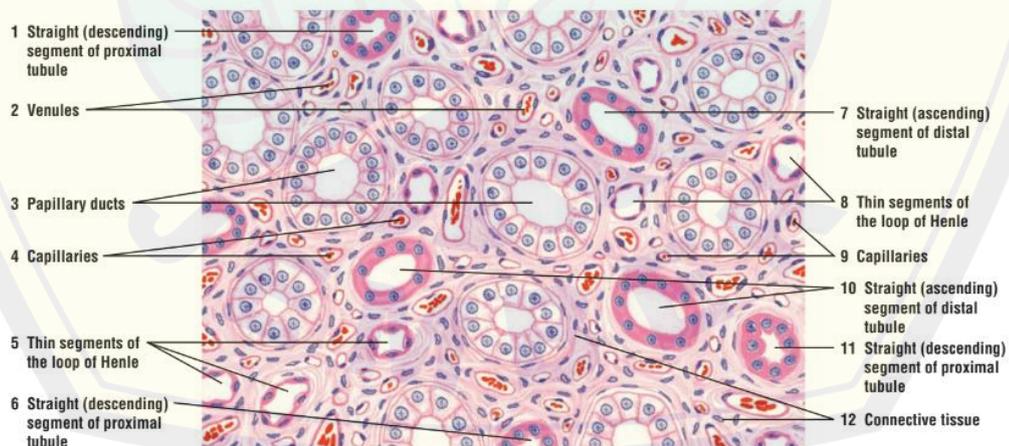
Gambar 2.10 Gambaran mikroskopis korteks ginjal.

Pada *vascular pole*, sel epiteloid yang dimodifikasi dengan butiran sitoplasma menjadi pengganti sel otot polos di tunika media dari arteriol glomerulus aferen. Sel-sel ini ialah sel juxtaglomerular. Pada pembesaran korteks ginjal juga dapat terlihat area dengan susunan sel yang lebih padat dan gelap yang disebut disebut makula densa. Sel juxtaglomerular di arteriol glomerulus aferen dan makula densa di tubulus distal akan membentuk aparatus juxtaglomerular (Eroschenko, 2013).

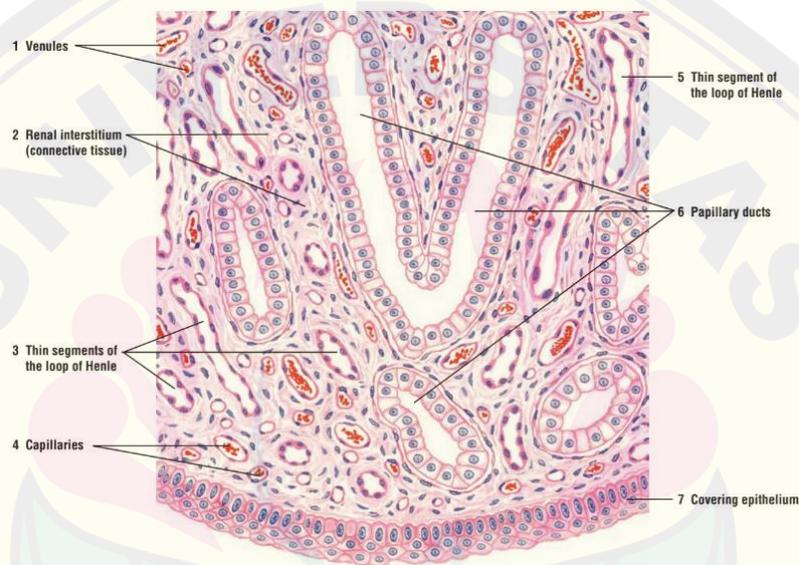


Gambar 2.11 Korteks ginjal

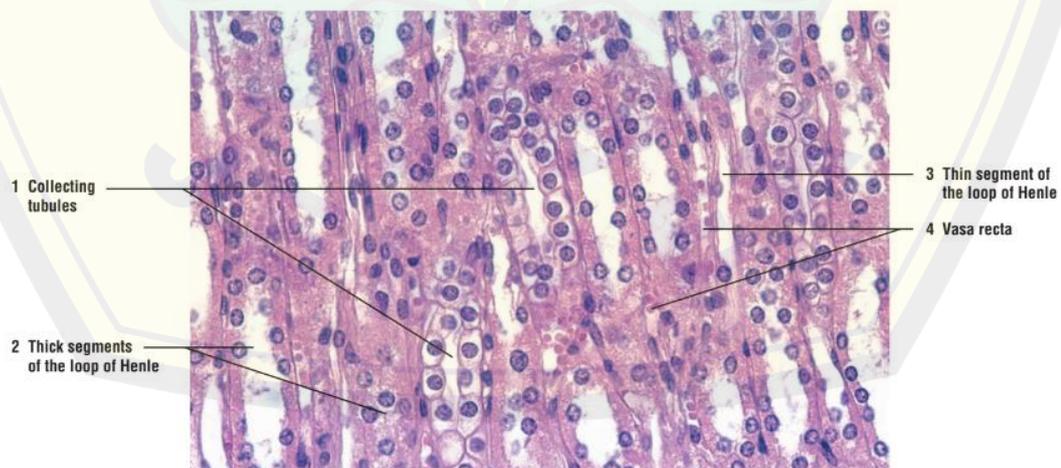
Pada bagian medula ginjal apabila diperbesar akan tampak bentukan ductus papiler. Duktus papiler memiliki diameter yang besar dan lumina lebar, serta dilapisi oleh sel kolumnar tinggi yang pucat. Terdapat pula segmen lurus (naik) dari tubulus distal dan segmen lurus (turun) dari tubulus proksimal. Di antara tubulus-tubulus tersebut terdapat bagian melintang dari segmen tipis lengkung Henle yang mirip dengan kapiler atau venula kecil. Perbedaan kapiler dan venula kecil dari segmen tipis lengkung Henle ialah memiliki dinding yang lebih tipis dan adanya sel darah yang terdapat pada luminanya (Eroschenko, 2013).

Gambar 2.12 Medula ginjal: *papillary region* (potongan transversal).

Beberapa duktus kolektif bergabung dalam papila medula ginjal untuk membentuk tubulus lurus besar yang disebut sebagai duktus papiler (*papillary ducts*), yang dilapisi oleh epitel kuboid atau kolumnar sederhana. Bagian awal dari duktus papiler di ujung papilla menghasilkan penampakan seperti saringan di papilla yang disebut area cribrosa. Di daerah kribosa, epitel penutup biasanya merupakan tipe kolumnar tinggi sederhana yang bersambungan dengan duktus papiler. Di sekeliling pembuluh darah dan duktus papiler terdapat interstitium ginjal (jaringan ikat) (Eroschenko, 2013).



Gambar 2.13 Medula ginjal: *terminal end of papilla* (potongan longitudinal).



Gambar 2.14 Duktus-duktus pada medula ginjal.

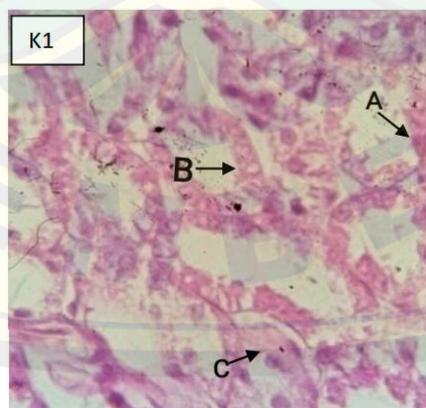
Daerah medula ginjal terdiri dari berbagai ukuran tubulus dan pembuluh darah dari vasa recta. Tubulus dengan sel kuboid besar berwarna terang adalah tubulus kolektivus. Berdekatan dengan tubulus kolektivus adalah segmen tebal dari lengkung Henle dengan sel kuboid berwarna lebih gelap. (Eroschenko, 2013).

2.7.4 Perubahan Gambaran Mikroskopis Ginjal

Ginjal merupakan organ yang rentan menjadi sasaran utama dari efek toksik karena seluruh senyawa yang masuk ke dalam tubuh sebagian besar akan diekskresi melalui organ ini (Burcham, 2014). Proses ekskresi ginjal meliputi filtrasi glomerula, reabsorpsi tubular, dan sekresi aktif tubular. Terdapat berbagai macam perubahan gambaran mikroskopis pada ginjal. Pada pemeriksaan histologi, kerusakan ginjal jika ditinjau dari segi histopatologis diantaranya ialah sebagai berikut.

a. Degenerasi Sel

Degenerasi sel merupakan tahap awal dari suatu proses kematian sel (Rahman dkk., 2020). Kriteria kerusakan ini dapat ditandai dengan adanya gangguan metabolik dimana sebuah sel kehilangan struktur normal sehingga terjadi penimbunan bahan-bahan baik intraseluler maupun ekstraseluler (Gani dkk., 2021). Degenerasi sel bersifat sementara (reversibel) sebab apabila paparan toksin dihentikan, sel masih dapat kembali ke keadaan normalnya (Almunawati dkk., 2017).

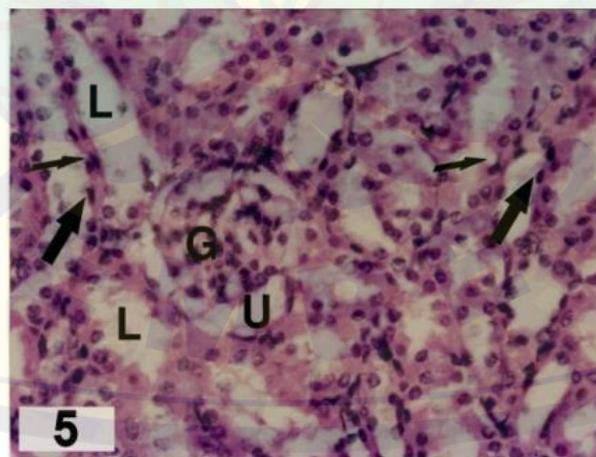


Gambar 2.15 Degenerasi sel ginjal (B: degenerasi hidropik, C: degenerasi parenkim) dalam pewarnaan HE 1000x (Almunawati dkk., 2017)

Terdapat beberapa jenis degenerasi sel, diantaranya ialah degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik, dan degenerasi lemak. Degenerasi parenkimatososa atau yang dikenal dengan sebutan lain yakni degenerasi albuminosa/degenerasi keruh/*cloudy swelling* memiliki tanda khas yakni terjadi pembengkakan dan sitoplasma yang keruh/bergranula akibat adanya protein yang mengendap. Degenerasi hidropik adalah degenerasi dengan tanda khas yakni gambaran vakuola dari kecil sampai besar tanpa lemak namun terisi air (Almunawati dkk., 2017). Degenerasi lemak terjadi sebab gangguan metabolisme pada apparatus golgi dan mitokondria yang berakibat air serta trigliserida tidak dieliminasi dan akhirnya tertimbun di dalam sel (Purnamasari dkk., 2018).

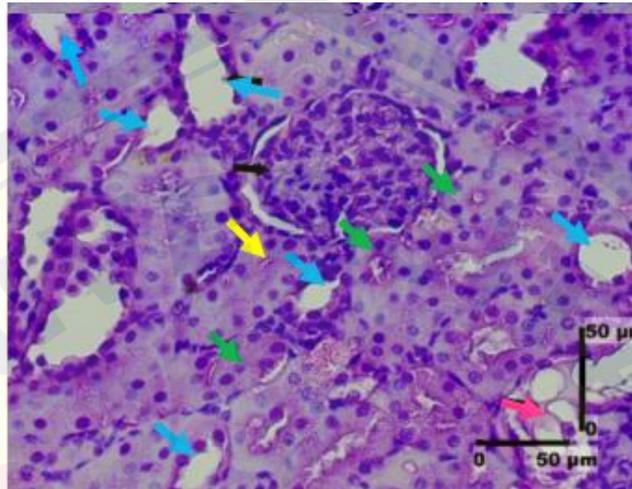
b. Pelebaran, Vakuolisasi, dan Akumulasi Sel Debris dalam Lumen Tubulus

Pelebaran atau dilatasi lumen tubulus pada ginjal dapat disebabkan oleh adanya protein-protein yang membentuk cast sehingga menyebabkan penyaluran yang terhambat. Selain itu, pelebaran dapat terjadi karena hilangnya *brush border* atau kematian sel pada tubulus sehingga lumen tampak mengalami pelebaran (Permana dkk., 2022; Qodar, 2018). Adanya senyawa tertentu seperti peroksinitrit juga dapat menyebabkan relaksasi otot polos dari pembuluh darah sehingga menimbulkan pelebaran lumen tubulus (Ichsan dkk., 2022). Adanya kematian sel akan meninggalkan sisa atau debris di dalam lumen tubulus (Qodar, 2018).



Gambar 2.16 Pelebaran lumen tubulus dan sel debris dalam pewarnaan HE 400x (Hemmaid, 2010)

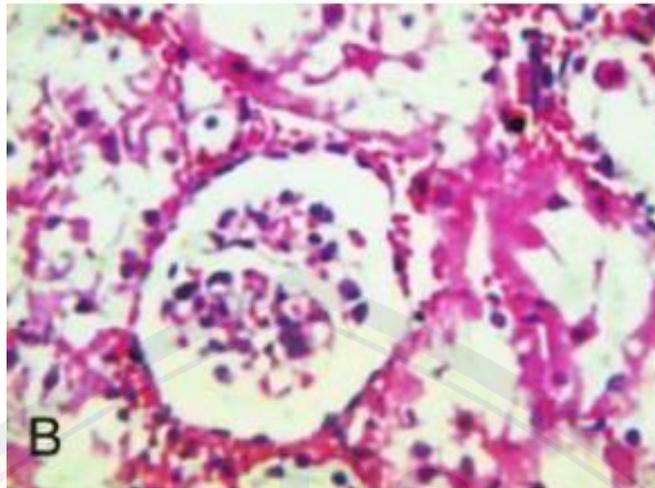
Vakuolisasi dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti tertimbunnya senyawa aktif osmotik seperti gula dalam lumen tubulus yang akan mengakibatkan osmotik nefrosis (Qodar, 2018). Adanya paparan atau pemberian zat kimia yang mengandung radikal bebas terlalu banyak juga dapat menyebabkan vakuolisasi (Purba dkk., 2021).



Gambar 2.17 Vakuolisasi sel tubulus dalam pewarnaan HE 400x (Permana dkk., 2022)

c. Pelebaran Ruang Bowman

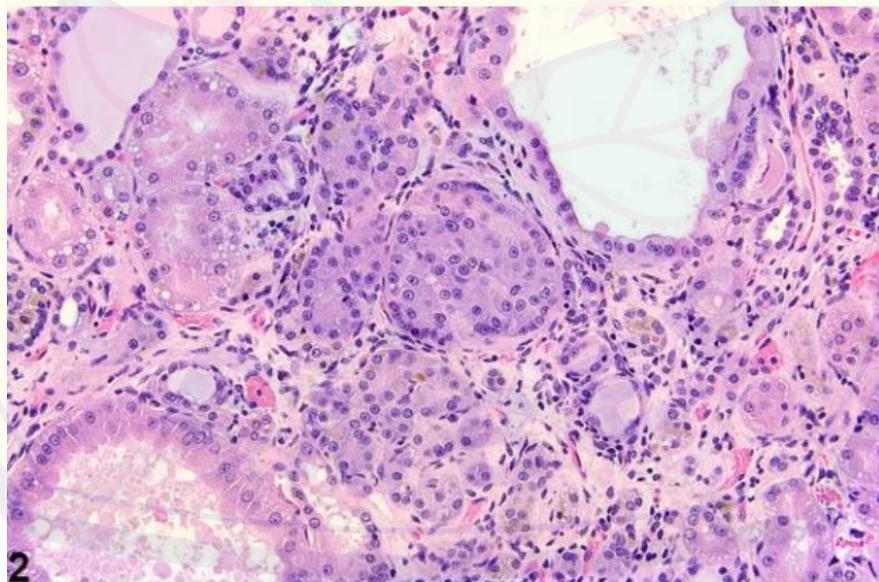
Pelebaran ruang bowman dapat terjadi karena adanya atrofi glomerulus (penurunan jumlah atau ukuran jaringan sel). Hal ini dapat disebabkan karena adanya perlambatan dari kemampuan penyaringan sehingga protein ataupun sel darah dapat lolos bersama urin dan terjadi penimbunan pada tubulus (Gani dkk., 2021). Pelebaran ruang bowman juga dapat disebabkan karena glomerulus mengalami hiperfiltrasi dan *glomerulosclerosis* (Kotyck dkk., 2016; Fahrianti dkk., 2015). Pelebaran ruang bowman dapat juga terjadi sebab hipoksia, karena kerusakan lebih lanjut akibat hipoksia akan membuat atrofi dan fibrosis pada glomerulus sehingga kapsula bowman akan tampak lebih lebar (Lin dkk., 2013).



Gambar 2.18 Pelebaran ruang bowman dalam pewarnaan HE 400x (Ashtiyani dkk., 2013)

d. Hiperplasia

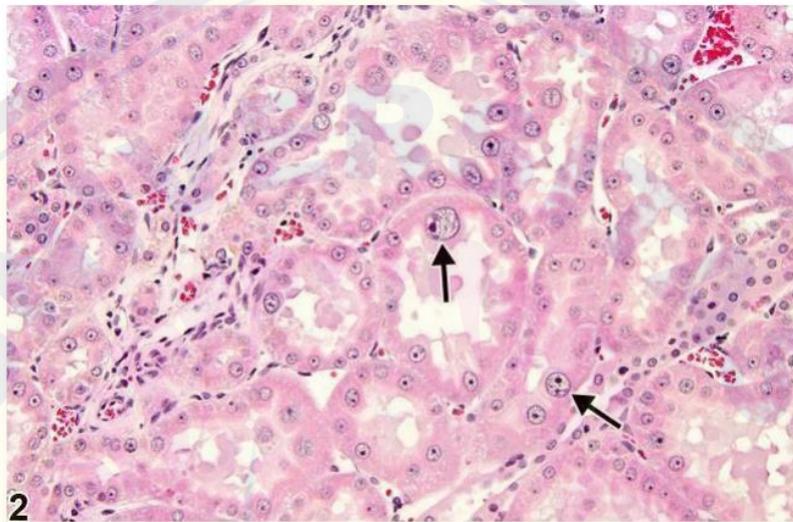
Hiperplasia dapat disebabkan oleh hipoksia dan cedera iskemik. Kurangnya oksigen dalam darah dapat meningkatkan kadar enzim ATPase, sehingga terjadi mitosis atau pembelahan sel yang tidak terkontrol dan terjadi hiperplasia (Ichsan dkk., 2022). Hiperplasia juga dapat terjadi secara spontan atau terjadi akibat paparan zat kimia tertentu (Qodar, 2018).



Gambar 2.19 Hiperplasia tubulus dalam pewarnaan HE 400x (Seely dan Brix, 2014)

e. Kariomegali

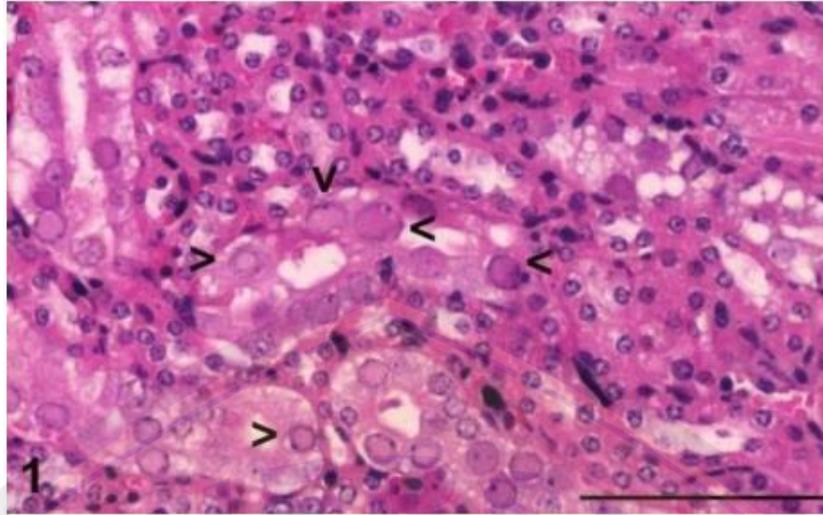
Replikasi asam nukleat tanpa melewati proses pembelahan inti sel akan mengakibatkan pembesaran inti sel secara tidak normal yang disebut sebagai kariomegali. Kariomegali juga dapat disebabkan karena adanya paparan zat kimia tertentu. Kariomegali ditandai dengan pembesaran inti sel yang hiperkromatik dengan adanya beberapa anak inti (Qodar, 2018).



Gambar 2.20 Kariomegali dalam pewarnaan HE 400x (Seely dan Brix, 2014)

f. Badan Inklusi

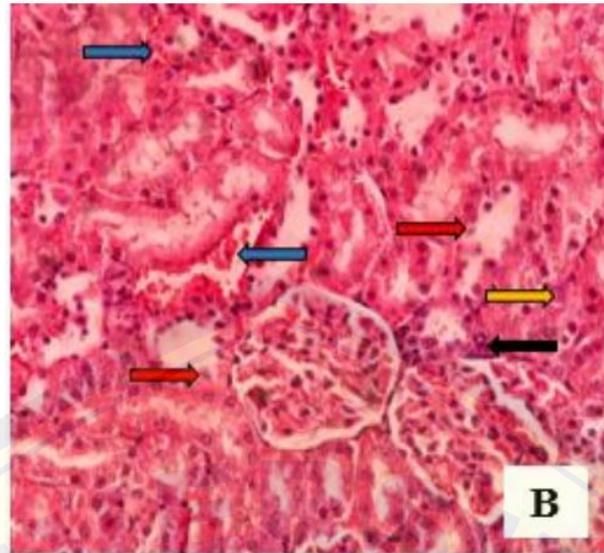
Badan inklusi dapat terjadi akibat beberapa hal seperti adanya virus, paparan zat toksik, dan adanya kerusakan DNA (Ichsan dkk., 2022). Apabila zat tertentu atau gen asing dimasukkan ke dalam sel, sel inang akan memberikan respon pesan dari RNA untuk mengkode protein. Jika hal ini gagal, maka akan terjadi kegagalan transportasi dan kondensasi sel yang akan membentuk badan inklusi (Krishnamoorthy dan Sangeetha, 2008). Badan inklusi memiliki ciri bulat, eosinofilik, serta dikelilingi halo transparan dengan halo kromatin (Radi dkk., 2013).



Gambar 2.21 Badan inklusi dalam pewarnaan HE 400x (McInnes dkk., 2015)

g. Nekrosis

Nekrosis adalah kematian sel semasa individu masih hidup. Pada ginjal, nekrosis dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya ialah infeksi virus (maligna virus), gangguan metabolik, dan adanya racun yang kuat (Suhita dkk., 2013). Pembentukan dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih juga dapat mengakibatkan epitel pada tubulus rusak dan mengalami NTA (Jannah dan Budijastuti, 2022). Secara mikroskopis, akan tampak adanya gambaran sel menjadi keriput dan tidak vasikuler, inti lebih padat dan berwarna gelap (piknosis), inti terbagi menjadi fragmen-fragmen atau robek (karioreksis), atau inti menjadi pucat tidak nyata (kariolisis). Semakin lama ginjal terpapar senyawa yang toksik maka akan semakin banyak jumlah sel jaringan ginjal yang akan mengalami nekrosis (Almunawati dkk., 2017).



Gambar 2.22 Nekrosis sel (panah merah) dalam pewarnaan HE 400x (Darmayanti dkk., 2020)

2.7.5 Skoring Histopatologi Ginjal

Untuk mendeteksi adanya perubahan mikroskopis atau adanya kerusakan pada organ ginjal, dapat dilakukan pemeriksaan yakni dengan pemeriksaan biokimia dan histopatologi. Salah satu *golden standard* untuk diagnostik dan penilaian prognostik adalah pemeriksaan histopatologi. Pemeriksaan histopatologi juga dapat dilakukan sebagai pemeriksaan untuk menuntun panduan terapi pada penyakit ginjal. Terdapat beberapa sistem skoring histopatologi ginjal, antara lain:

a. Sistem Skoring Anggraini

Sistem skoring ini dilakukan dengan membaca setiap preparat jaringan ginjal dalam 5 lapang pandang dengan mikroskop. Perbesaran yang digunakan ialah 400 kali. Setiap lapang pandangnya akan diamati adanya perubahan mikroskopis atau kerusakan sesuai dengan kriteria berikut.

Tabel 2.2 Sistem Skoring Anggraini

Skor	Kriteria kerusakan
1	Tidak terjadi kerusakan jaringan ginjal (pelebaran lumen tubulus, akumulasi sel-sel debris dalam lumen, vakuolisasi lumen tubulus, pelebaran ruang bowman, degenerasi, hiperplasia, kariomegali, dan benda benda inklusi).
2	Bila ditemukan 1-2 kriteria diatas.
3	Bila ditemukan 3-5 kriteria diatas.
4	Bila ditemukan 6-8 kriteria diatas.

(Sumber: Anggraini, 2008)

Terdapat beberapa kelebihan dari sistem skoring ini, yaitu pada sistem skoring ini kriteria kerusakan yang dicari dapat mewakili kerusakan akut pada ginjal (Gu dkk., 2016). Terdapat pula tahap *masking (blinding)* yang dapat digunakan untuk mencegah bias dalam penilaian preparat jaringan ginjal. Sistem skoring ini juga memiliki kriteria kerusakan yang didasarkan pada lesi-lesi yang spesifik pada jaringan ginjal. Konsistensi dari interpretasi hasil juga dapat terjaga dengan baik karena mudah dibedakan (Gibson-Corley dkk., 2013).

b. Sistem Skoring Suhita

Sistem skoring ini dilakukan dengan mengamati setiap preparat jaringan ginjal dalam 5 lapang pandang. Perbesaran yang digunakan ialah 400 kali. Tiap lapang pandangnya akan dilihat kerusakan atau perubahan berdasarkan kriteria berikut.

Tabel 2.3 Sistem Skoring Suhita

Skor	Kriteria kerusakan
0	Tidak terjadi nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal tiap lapang pandang.
1	Ditemukan lesi fokal seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal tiap lapang pandang.
2	Ditemukan lesi difus/merata seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal tiap lapang pandang.

(Sumber: Suhita dkk, 2013)

c. Sistem Skoring Venient

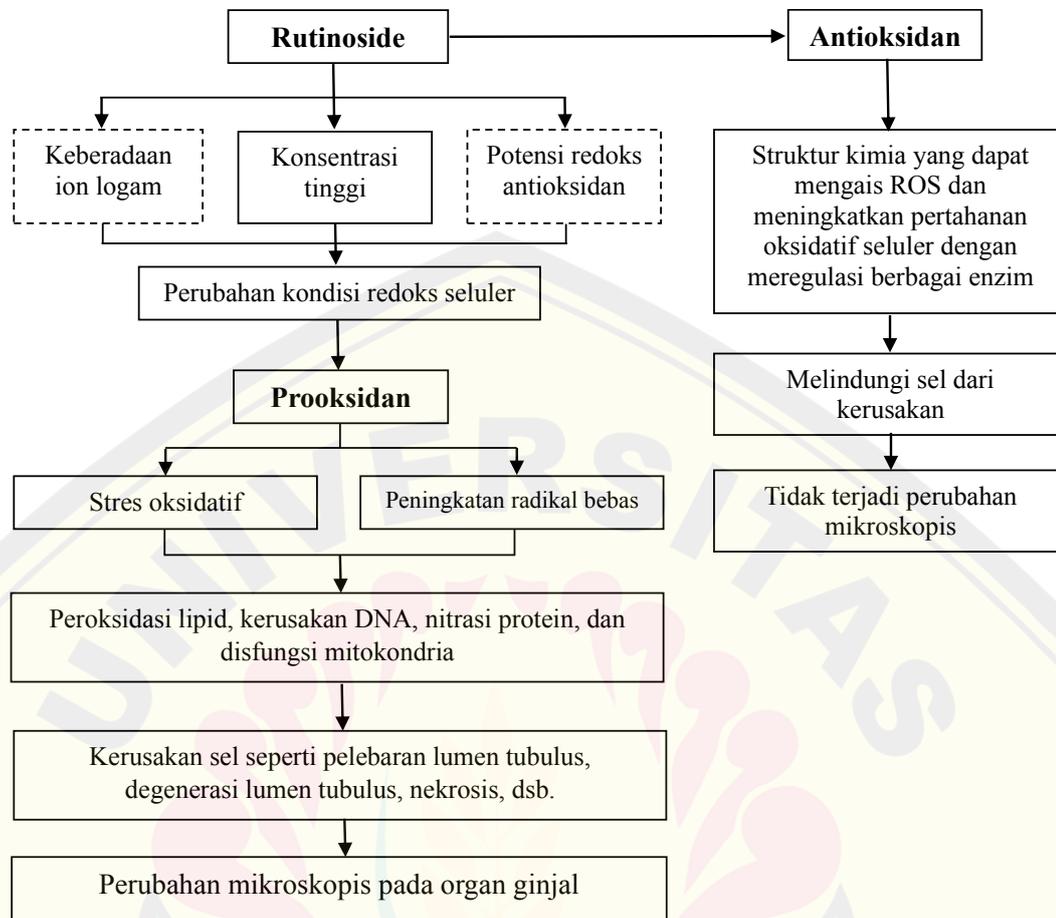
Skoring Venient dilakukan dengan cara menghitung persentase sel abnormal yang ada pada preparat jaringan ginjal, lalu diamati menggunakan mikroskop Cahaya. Perbesaran yang digunakan ialah 400 kali dalam 5 lapang pandang sejumlah 100 sel.

Tabel 2.4 Sistem Skoring Venient

Skor	Kriteria kerusakan
1	Lesi < 25% total lapang pandang.
2	Lesi 25-<50% total lapang pandang.
3	Lesi 50-<75% total lapang pandang.
4	Lesi >75% total lapang pandang.

(Sumber: Wibowo, 2012)

2.8 Kerangka Teori



Gambar 2.23 Skema kerangka teori.

Keterangan:

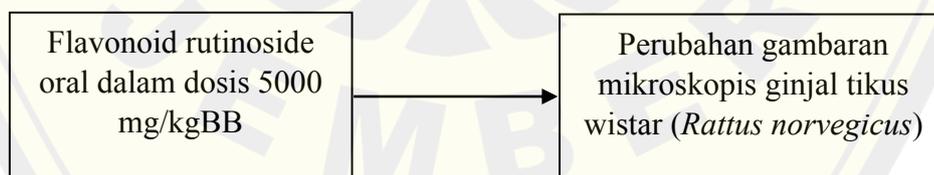
□ : diteliti

→ : memicu

Rutinoside merupakan salah satu turunan flavonoid dari kelas flavonol. Diketahui, flavonoid termasuk rutinoside memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Aktivitas antioksidan pada rutinoside telah diteliti baik dalam model *in vitro* maupun *in vivo*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, struktur kimia dari rutinoside dapat secara langsung mengais ROS atau dikenal sebagai *free radical scavenger*. Rutinoside juga dapat menaikkan produksi glutathione dan sistem pertahanan oksidatif seluler. Hal tersebut diyakini diregulasi oleh

peningkatan berbagai enzim antioksidan, seperti katalase dan superoxide dismutase. Rutinoside juga dapat menghambat xanthine oksidase yang terlibat dalam menghasilkan ROS. Tetapi, terdapat beberapa faktor yang dapat mengubah fungsi antioksidan menjadi prooksidan, yakni adanya keberadaan ion logam, konsentrasi antioksidan dalam lingkungan matriks, dan potensi redoksnya (Sotler dkk., 2019). Dalam penelitian yang lain, prooksidan juga dapat terbentuk pada saat konsentrasi tertentu, pemberian dosis tinggi, atau adanya ion logam (Yordi dkk., 2012). Terbentuknya prooksidan berlebih akan menyebabkan ketidakseimbangan dimana keadaan ini disebut sebagai stress oksidatif. Stres oksidatif dapat menimbulkan gangguan fungsi biologi seperti homeostasis ion, aktivitas enzim, integrasi membran, fungsi sel, hingga kerusakan atau kematian sel (Yuslianti, 2018). Stres oksidatif juga dapat menyebabkan kerusakan dalam mekanisme yang berbeda-beda, seperti mendorong peroksidasi lipid, kerusakan pada DNA, dan modifikasi protein (Jha dkk., 2016). Dalam kondisi stress oksidatif, radikal bebas atau spesies oksigen reaktif yang dihasilkan juga akan lebih besar. Radikal bebas akan mencetuskan terjadinya reaksi peroksidasi lipid yang akan mengganggu integritas dari membran sel hingga perubahan susunan struktur pada membran sel (Yuslianti, 2018). Ginjal merupakan organ yang sangat rentan terhadap kerusakan akibat ROS sebab ginjal memiliki banyak asam lemak tak jenuh ganda rantai panjang dalam komposisi lipid ginjal (Ozbek, 2012). Kerusakan tersebut dapat dilihat melalui perubahan gambaran mikroskopis ginjal.

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.24 Skema kerangka konsep.

2.10 Hipotesis Penelitian

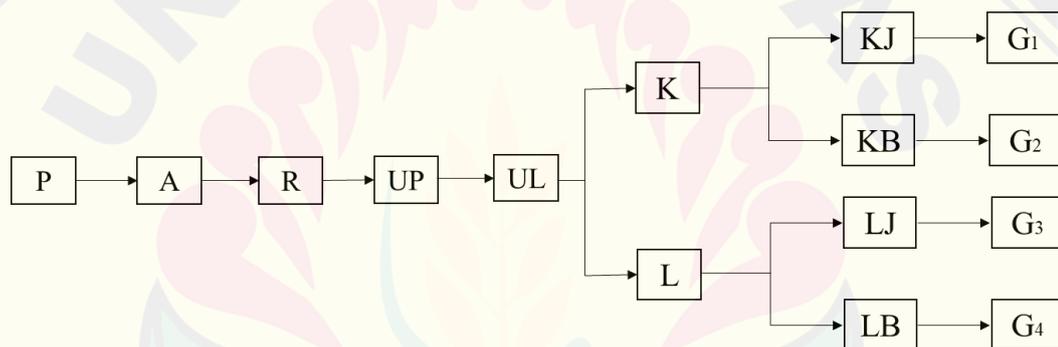
Hipotesis dari penelitian ini ialah dari hasil uji toksisitas oral akut yang dilakukan, rutinoid tidak memberikan efek toksik dan menimbulkan kerusakan pada ginjal tikus dilihat dari gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental sebenarnya (*true experimental laboratories*). Rancangan penelitian yang digunakan ialah *post-test only control group design*. Penelitian akan dimulai secara bertahap mengikuti alur pada guideline OECD 423 dan dimulai dari dosis 2000 mg/kgBB terlebih dahulu. Hasil dari pengamatan pada kelompok dosis 2000 mg/kgBB akan menjadi pertimbangan untuk melakukan uji lanjutan pada dosis 5000 mg/kgBB. Penilaian pada dosis 5000 mg/kgBB akan dilakukan setelah intervensi pada semua kelompok selesai. Rancangan penelitian untuk tikus dengan kelompok dosis 5000 mg/kgBB dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian kelompok tikus dengan dosis 5000 mg/kgBB.

Keterangan:

- P : Populasi
- A : Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari
- R : Randomisasi
- UP : *Limit test* dan *main test* pada dosis 2000 mg/kgBB
- UL : Uji lanjutan (*main test*) pada dosis 5000 mg/kgBB
- K : Kelompok kontrol.
- KJ : Kelompok kontrol, yaitu tiga ekor tikus jantan.
- KB : Kelompok kontrol, yaitu tiga ekor tikus betina.
- L : Kelompok perlakuan, diinduksi dengan larutan rutinosiside 5000mg/kgBB *single dose*
- LJ : Kelompok perlakuan, yaitu tiga ekor tikus jantan
- LB : Kelompok perlakuan, yaitu tiga ekor tikus betina
- G₁ : Gambaran Histopatologi KJ
- G₂ : Gambaran Histopatologi KB
- G₃ : Gambaran Histopatologi LJ
- G₄ : Gambaran Histopatologi LB

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina. Untuk menggunakan tikus sebagai sampel, ditetapkan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Kriteria inklusi sampel penelitian ialah:

- a. Tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan dan betina.
- b. Sehat dan bergerak aktif.
- c. Tidak terdapat kelainan anatomi;
- d. Berat badan tikus berkisar antara 150 gram hingga 300 gram.
- e. Belum pernah dan tidak sedang hamil.
- f. Belum pernah digunakan dalam penelitian apapun sebelumnya.

Sedangkan untuk kriteria eksklusi sampel penelitian ialah sebagai berikut:

- a. Tikus yang menunjukkan perilaku tidak normal (terlihat sakit, lemah, atau tidak aktif).
- b. Tikus yang memiliki kelainan anatomi.
- c. Tikus yang tidak mendapat perlakuan sesuai dengan rancangan dalam penelitian.
- d. Tikus yang mati sebelum proses randomisasi.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari populasi menggunakan teknik pengambilan sampel acak sederhana (*simple random sampling*). Kemudian, sampel dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Rumus yang digunakan oleh peneliti untuk menentukan besar sampel yaitu mengikuti guideline dari OECD 423, yakni tiga ekor setiap jenis kelamin (jantan dan betina). Berdasarkan guideline tersebut, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 6 ekor pada setiap

kelompok, sehingga jumlah total sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah dua belas ekor tikus.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di tiga tempat, yaitu Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi untuk pemeliharaan tikus, Laboratorium Histologi untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal tikus, dan Laboratorium Patologi Anatomi untuk pemeriksaan preparat histopatologi ginjal tikus yang telah dibuat. Seluruh laboratorium berada di Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini dilaksanakan selama tiga bulan, yaitu dari bulan Oktober-Desember tahun 2022.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis Rutinoside yang diberikan pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah perubahan mikroskopis ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Terdapat pula variabel terkontrol dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Jenis kelamin hewan coba.
- b. Berat badan hewan coba.
- c. Usia hewan coba.
- d. Pemeliharaan dan perlakuan yang diberikan pada hewan coba.
- e. Waktu dan lama perlakuan yang diberikan pada hewan coba.
- f. Dosis dan frekuensi pemberian rutinoside pada hewan coba.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dari variabel penelitian dapat dilihat dalam Tabel 3.1

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Pengukuran	Skala Data
Pemberian senyawa Rutinoside	Pemberian rutinoside terhadap hewan coba yang dilakukan sekali (<i>single dose</i>) menggunakan sonde lambung setelah dilarutkan dengan aquadest dan DMSO 5%.	Ditimbang 2000mg/kgBB atau 5000mg/kgBB menggunakan timbangan yang sudah terkalibrasi.	Rasio
Perubahan mikroskopis ginjal tikus wistar	Perubahan histologi ginjal pada tikus wistar setelah terminasi tikus yang diamati dengan pengamatan mikroskopik pada preparat dengan pewarnaan <i>Haematoksin-Eosin (HE)</i> pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x.	Perhitungan terhadap kriteria kerusakan yang ada pada preparat menggunakan sistem skoring Anggraini (2008). Kriteria pada sistem skoring Anggraini ialah: <ul style="list-style-type: none"> • Skor 1: Tidak terjadi kerusakan jaringan ginjal (pelebaran lumen tubulus, akumulasi sel-sel debris dalam lumen, vakuolisasi lumen tubulus, pelebaran ruang bowman, degenerasi, hyperplasia, kariomegali, dan benda benda inklusi). • Skor 2: Bila ditemukan 1-2 kriteria diatas. • Skor 3: Bila ditemukan 3-5 kriteria diatas. • Skor 4: Bila ditemukan 6-8 kriteria diatas. 	Ordinal

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat untuk membuat sediaan larutan rutinoid menggunakan *beaker glass*, neraca timbang, pengaduk, spuit, vortex dan *handscoon*.
- b. Alat untuk memberikan larutan rutinoid menggunakan *beaker glass*, *handscoon*, dan spuit sonde.
- c. Alat untuk pemeliharaan tikus menggunakan kandang (terdiri atas wadah/bak plastik dan penutup), tempat pakan, tempat minum, timbangan digital, *handscoon* serta kertas label.
- d. Alat untuk terminasi (pengambilan organ ginjal pada tikus) menggunakan papan fiksasi, spuit, jarum pentul, gunting dan pisau bedah, pinset, tabung organ, kertas label, dan *handscoon*.
- e. Alat untuk membuat preparat ginjal tikus menggunakan *cassette*, mikrotom, *preparate slide*, dan kertas label.
- f. Alat untuk membaca preparat ginjal tikus menggunakan mikroskop Olympus CX21.
- g. Alat untuk mengambil foto preparat ginjal tikus menggunakan kamera Optilab Advance Miconos.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas:

- a. Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan tikus terdiri atas pakan berupa *pellet*, air mineral, dan sekam.
- b. Bahan untuk membuat sediaan larutan stok rutinoid menggunakan isolat rutinoid, normal salin, dan DMSO. Informasi mengenai produk rutinoid yang digunakan ialah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Informasi Produk Rutinoside

No.	Keterangan	Informasi Produk
1.	Nama produk	Rutin hydrate
2.	Produksi	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.
3.	Nomor produk	R0035
4.	CAS RN	207671-50-9
5.	<i>MDL number</i>	MFCD00006830
6.	<i>Molecular formula</i>	$C_{27}H_{30}O_{16}$
7.	<i>Molecular weight</i>	610,52
8.	Kemurnian	>94.0%
9.	Tampilan	Bubuk atau kristal berwarna kuning kehijauan.
10.	Bentuk	Solid (padat)
11.	Kondisi yang harus dihindari	<i>Air sensitive</i>
12.	Kelarutan dalam air	<i>Practically insoluble</i>

- c. Bahan yang digunakan untuk terminasi (pengambilan organ ginjal pada tikus) adalah obat anestesi Ketamine HCl dan Xylazine, formalin 10%, air mineral, dan kertas aluminium foil.
- d. Bahan yang digunakan untuk membuat preparat histopatologi ginjal tikus adalah formalin 10%, parafin, dan hematoksilin eosin.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus wistar sebagai subjeknya, sehingga sebelum penelitian dimulai harus ada sertifikat kelayakan etik yang didapatkan dari Komisi Etik Kedokteran. Prosedur ini bertujuan untuk melindungi dan menjaga prinsip kesejahteraan hewan coba, menjamin keamanan peneliti, serta memperjelas tujuan dari penelitian sehingga data yang diperoleh dari penelitian yang dilakukan dapat dipertanggungjawabkan dan memiliki validitas yang tinggi.

3.7.2 Perawatan Hewan Coba

Perawatan hewan dimulai sejak hewan coba sampai di Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sebelum penelitian, hewan coba melalui proses aklimatisasi selama tujuh hari yang bertujuan agar hewan coba dapat beradaptasi

dengan lingkungan yang baru. Hewan coba diberikan tempat tinggal berupa kandang berbentuk persegi panjang dengan ukuran 45 x 30 x 25 cm dan diberikan serutan kayu. Setiap kandang berisi satu ekor hewan coba, lengkap dengan wadah pakan dan minum. Jenis pakan yang diberikan adalah *pellet* dan minum yang diberikan adalah akuades. Pada masa aklimatisasi, hewan coba akan ditimbang beratnya setiap dua hari sekali. Setelah masa aklimatisasi, hewan coba akan diberikan perlakuan. Selanjutnya, hewan coba akan diamati selama dua minggu dan ditimbang setiap hari untuk menilai apakah ada perubahan atau tanda-tanda toksisitas yang terjadi pada hewan coba.

3.7.3 Pembuatan dan Pemberian Larutan DMSO dan Rutinoside

Sebelum diberikan, rutinoside harus dilarutkan terlebih dahulu menggunakan DMSO. Perhitungan dosis dilakukan berdasarkan tingkatan dosis yang digunakan dalam uji. Perhitungan untuk dosis rutinoside 5000 mg/kgBB ialah sebagai berikut:

- a. Menghitung dosis rutinoside untuk setiap tikus. Sebagai contoh, berat tikus ialah 200 gram, maka penghitungannya ialah:

$$\text{Dosis rutinoside: } \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} = \frac{x}{200 \text{ gram}}$$

$$x : \frac{5000}{5} \text{ gram}$$

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

- b. Menghitung dosis untuk membuat DMSO 5%. Jika jumlah tikus adalah 6 ekor dan setiap ekornya akan diberikan sebanyak 5 mL larutan stok rutinoside, maka penghitungannya ialah:

$$\text{DMSO : } \frac{5 \text{ mL}}{100 \text{ mL aquadest}} = \frac{x}{30 \text{ mL aquadest}}$$

$$x : \frac{150}{100} \text{ mL}$$

$$x = 1,5 \text{ mL}$$

- c. Kemudian disiapkan alat dan bahan untuk membuat larutan stok.
- d. Ditimbang isolat rutinoside sebanyak 6 gram dalam satu beaker glass.
- e. Dalam beaker glass yang sama, ditambahkan DMSO sebanyak 1,5 mL. Aduk hingga tercampur.
- f. Kemudian campuran tersebut ditambahkan aquadest hingga 30 mL. Setelahnya diaduk menggunakan vortex agar tercampur merata.
- g. Kemudian diambil menggunakan spuit 5 cc. Jumlah yang diambil disesuaikan kembali dengan berat badan tikus, menggunakan perbandingan perhitungan:

$$\text{Dosis yang diberikan: } \frac{x}{200 \text{ gram}} \times 5 \text{ mL}$$

- h. Diberikan kepada hewan coba secara peroral menggunakan sonde lambung.

3.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Pembuatan preparat histopatologi ginjal tikus dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- a. Dilakukan terminasi pada tikus untuk mengambil organ ginjal. Tikus diinjeksi menggunakan campuran Ketamine 50 mg/kgBB dan Xylazine 5 mg/kgBB. Dosis yang digunakan sesuai dengan pedoman AVMA (*American Veterinary Medical Association*) untuk euthanasia hewan coba, yaitu 10:1.
- b. Setelah organ ginjal didapatkan, ginjal dibilas menggunakan normal salin untuk membersihkan sisa darah.
- c. Setelah bersih, ginjal dimasukkan kedalam wadah kecil dan difiksasi menggunakan larutan BNF 10%.
- d. Dibuat sediaan dengan metode parafin, kemudian jaringan dipotong menggunakan mikrotom.

- e. Dilanjutkan dengan tahap *staining* (pewarnaan) menggunakan pewarna Routine-HE (hematoksilin-eosin).

3.7.5 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal

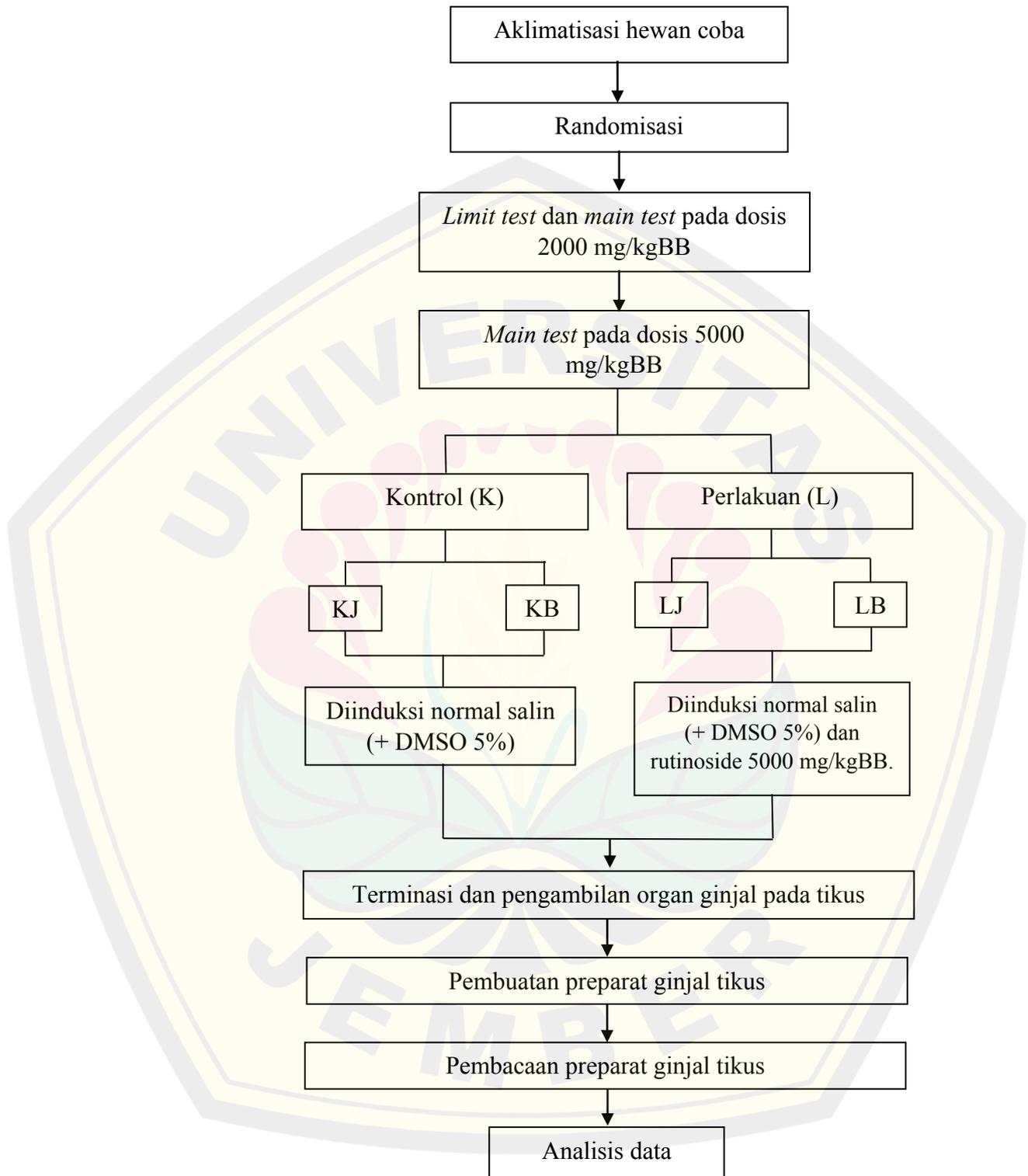
Preparat yang sudah jadi akan diamati menggunakan mikroskop Cahaya Olympus CX21. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Preparat histopatologi ginjal dari tikus akan diamati pada lima lapang pandang dengan perbesaran 400x. Dalam pengamatan preparat histopatologi ginjal, peneliti menggunakan sistem skoring Anggraini dengan teknik *double blind*. Teknik ini melibatkan dua orang pengamat, dimana keduanya mengamati lapang pandang yang sama. Untuk menghindari bias, peneliti melakukan teknik pengamatan *double blind* dalam satu waktu dan terlebih dulu mengambil foto lapang pandang yang akan diamati. Foto lapang pandang diambil menggunakan kamera penunjang pada mikroskop, yakni Optilab Advance Miconos.

3.8 Analisis Data

Setelah melakukan skoring pada preparat histopatologi ginjal tikus didapatkan data berupa data ordinal. Kemudian, data tersebut akan diubah menjadi data interval menggunakan *method of successive interval* (MSI). Data yang telah dikonversi selanjutnya akan diolah menggunakan perangkat lunak komputer dengan program *SPSS for Windows*.

Penelitian ini menggunakan uji statistik berupa uji komparasi. Sebelum itu, peneliti melakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji *Saphiro Wilk* serta melakukan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene*. Apabila data telah dinyatakan terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji komparasi menggunakan uji *Independent Sample T-test* ($p < 0,05$). Namun, apabila data dinyatakan tidak terdistribusi normal dan homogen maka uji komparasi dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Peneliti juga melakukan uji reliabilitas *Cornbach Alpha* pada data yang diperoleh.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Hasil Uji pada Tingkat Dosis 2000 mg/kgBB

Uji toksisitas akut pada penelitian ini dilakukan bertahap sesuai dengan guideline OECD 423. Uji dimulai dengan *limit test* pada tingkat dosis 2000 mg/kgBB pada 1 ekor tikus. Tikus diberikan sediaan uji rutinosiside 2000 mg/kgBB yang telah dilarutkan menggunakan normal salin dan 4% DMSO (*single dose*) menggunakan sonde lambung dan dilakukan observasi khusus pada rentang waktu 30 menit pertama, 4 jam pertama, dilanjutkan hingga 24 jam pertama. Selama observasi tersebut, hewan coba tidak mengalami tanda-tanda toksisitas seperti perubahan pada kulit, bulu, mata, atau selaput lendir. Tikus juga tidak menunjukkan perubahan pola perilaku, tidak lesu dan tidak mengalami diare, serta tidak mengalami kematian. Hal ini menjadi dasar untuk melanjutkan uji *main test* pada tingkat dosis 2000 mg/kgBB.

Main test pada tingkat dosis 2000 mg/kgBB dilakukan pada 2 ekor tikus baru selain tikus yang digunakan untuk *limit test* tepat di hari berikutnya setelah *limit test* dilakukan, sehingga total menggunakan tiga ekor tikus. Pada tahap ini, langkah yang dilakukan sama seperti pada *limit test*. Ketiga tikus tersebut kemudian diobservasi selama 14 hari. Hasil observasi setelah 14 hari ialah tidak ditemukan adanya tanda-tanda toksisitas dan ketiga tikus tersebut tidak mengalami kematian, sehingga uji dapat dilakukan pada dosis yang lebih tinggi.

4.1.2 Hasil Uji pada Tingkat Dosis 5000 mg/kgBB

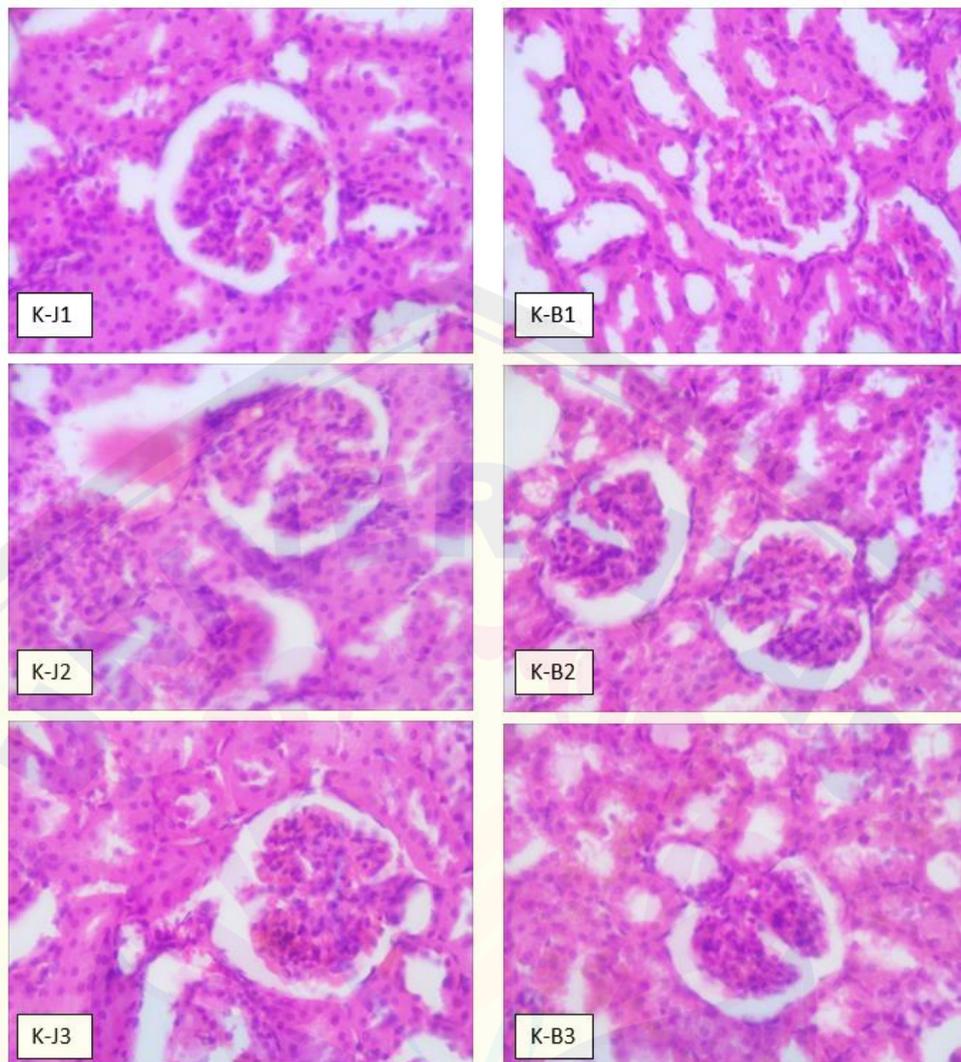
Uji dilanjutkan pada tingkat dosis 5000 mg/kgBB setelah uji pada tingkat dosis 2000 mg/kgBB telah selesai dilakukan. Pada tingkat dosis ini, uji dilakukan pada dua belas ekor tikus, dengan rincian 6 ekor tikus sebagai kelompok perlakuan dan 6 ekor tikus sebagai kelompok kontrol. Masing-masing kelompok terdiri atas tiga ekor tikus Jantan dan tiga ekor tikus betina. Keenam tikus pada kelompok perlakuan diberikan sediaan uji rutinosiside 5000 mg/kgBB yang telah

dilarutkan menggunakan normal salin dan 5% DMSO (*single dose*) menggunakan sonde lambung dan dilakukan observasi khusus pada 30 menit pertama, 4 jam pertama, hingga 24 jam pertama. Pada kelompok kontrol, keenam tikus hanya diberikan normal salin dan 5% DMSO (*single dose*) menggunakan sonde lambung. Setelah itu, observasi dilanjutkan pada kedua kelompok hingga 14 hari. Hasil observasi setelah 14 hari ialah tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas seperti perubahan pola perilaku, perubahan fisik seperti perubahan pada bulu, mata, atau selaput lendir. Tidak ditemukan pula penurunan berat badan yang terus menerus, gangguan pernapasan, tremor atau kejang serta tidak ditemukan kematian baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

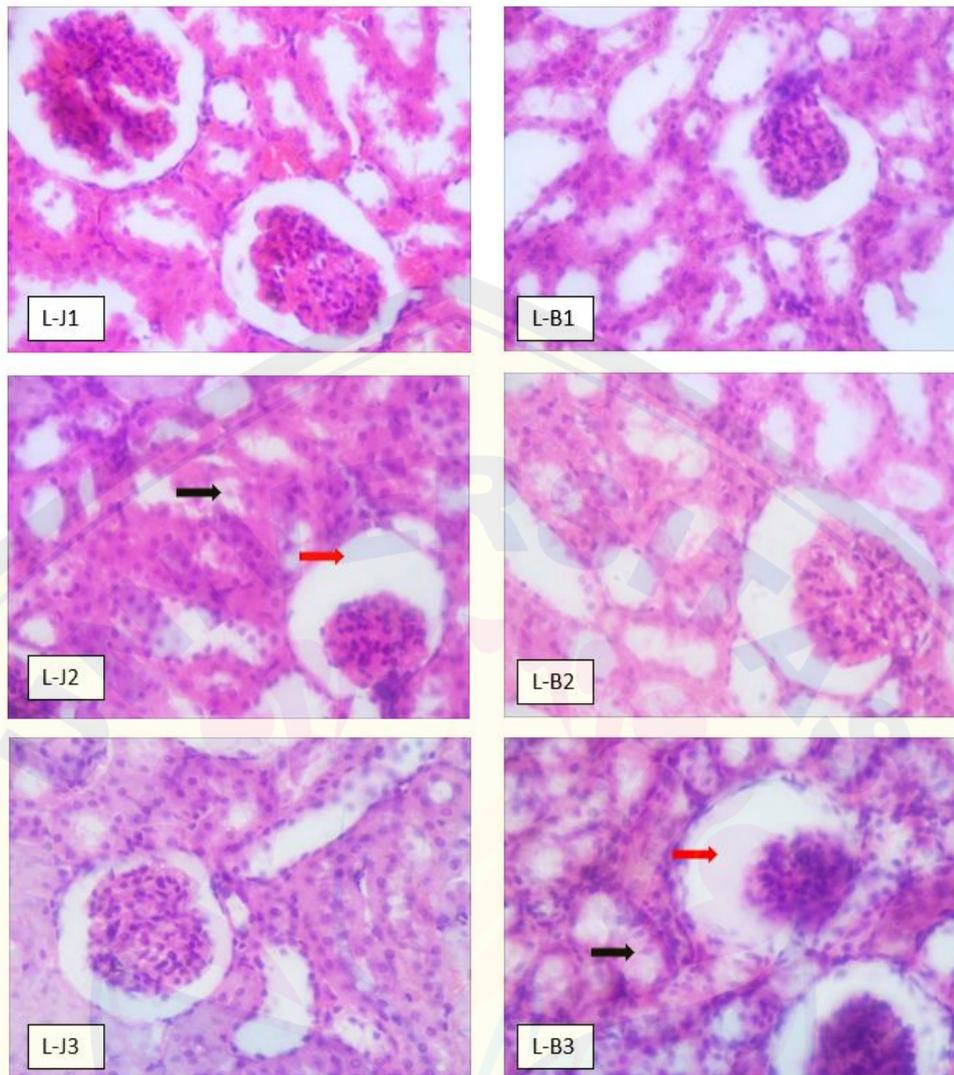
Berdasarkan hasil uji pada tingkat dosis 5000 mg/kgBB, yaitu dengan tidak adanya kematian atau tanda-tanda toksisitas pada hewan coba serta mengacu pada guideline OECD 423, didapatkan kisaran nilai LD₅₀ dari flavonoid rutinoid ialah >5000 mg/kgBB yang termasuk dalam kategori GHS 5 atau *unclassified*.

4.1.3 Hasil Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal

Preparat ginjal tikus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tingkat dosis 5000 mg/kgBB yang telah dilakukan pewarnaan hematoxililn dan eosin kemudian diamati dibawah mikroskop. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 400x. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.



Gambar 4.1 Gambaran histopatologi ginjal tikus wistar dengan perbesaran 400x pewarnaan H&E kelompok kontrol (K).



Gambar 4. 2 Gambaran histopatologi ginjal tikus wistar dengan perbesaran 400x pewarnaan H&E kelompok perlakuan (L). Panah merah menunjukkan pelebaran ruang bowman, dan panah hitam menunjukkan sel dengan degenerasi.

Semua kerusakan pada organ ginjal tikus diamati dan dilakukan skoring berdasarkan sistem skoring Anggraini yang tertera pada tabel 2.1. Seluruh data hasil skoring tersebut dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji *Saphiro Wilk* serta melakukan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene*. Pada uji *Saphiro Wilk*, nilai signifikansi didapatkan $p=0$ ($p<0,05$) dan pada uji *Lavene* nilai signifikansi menunjukkan $p=0,234$ ($p>0,05$). Berdasarkan kedua uji tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa data tidak berdistribusi normal namun homogen.

Analisis data kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil yang didapat dari uji tersebut ialah nilai signifikansi sebesar $p=0,523$.

4.2 Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pemberian flavonoid rutinoid baik pada dosis 2000 mg/kgBB atau 5000 mg/kgBB tidak menimbulkan tanda toksisitas ataupun kematian pada tikus wistar normal. Hasil uji komparasi *Mann-Whitney* pada penelitian ini adalah $p=0,523$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara uji pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian rutinoid dalam dosis 5000 mg/kgBB tidak memberikan efek yang signifikan terhadap perubahan mikroskopis ginjal pada tikus wistar dan merujuk pada tidak adanya perubahan fungsi antioksidan yang berubah menjadi prooksidan pada rutinoid.

Kemungkinan pertama yang terjadi ialah dosis 5000 mg/kgBB bukanlah dosis toksik dari flavonoid rutinoid. Hal ini dapat diketahui berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan. Pada pemberian dosis 5000 mg/kgBB, tidak terdapat tikus yang mengalami kematian. Berdasarkan guideline OECD 423, hal tersebut dapat diartikan bahwa kisaran nilai LD_{50} dari flavonoid rutinoid ialah >5000 mg/kgBB yang termasuk dalam kategori GHS 5 atau *unclassified*.

Tidak adanya hubungan yang signifikan antara pemberian flavonoid rutinoid dan perubahan mikroskopis ginjal tikus wistar dapat terjadi karena rutinoid memiliki berbagai aktivitas biologis seperti anti-inflamasi, antimikroba, anti-tumor, dan anti-asma. Rutinoid juga memiliki sifat sebagai antioksidan yang kuat, khususnya sebagai *free radical scavenger* (Chua, 2013). Telah dibuktikan pula bahwa rutinoid memiliki kapasitas antioksidan yang kuat terhadap berbagai sistem antioksidan secara *in vitro* dan telah ditemukan bahwa kapasitas ini bergantung pada konsentrasi (Yang, Guo, & Yuan, 2008). Kapasitas antioksidan rutin yang kuat telah ditunjukkan oleh pengujian antioksidan yang berbeda-beda. Kapasitas untuk menetralkan atau menyerap radikal bebas telah dibuktikan dalam pengujian seperti *hydroxyl radical-scavenging assay* dan

superoxide radical-scavenging assay (Gullón dkk., 2017). Efek antioksidan dari rutinoides melibatkan peningkatan aktivitas enzim seperti SOD, GST, GGT, CAT, dan GPx GR, dan menginduksi jalur Nrf2/HO-1. Efek anti-inflamasi dari rutin dimediasi oleh penghambatan mediator dan molekul proinflamasi yang terkenal seperti IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, COX-2, iNOS, TLR4, dan XO.

Peradangan dan stres oksidatif merupakan proses yang menyebabkan kerusakan jaringan dan dapat berakhir dengan rusaknya jaringan target, sehingga pengurangan peradangan dan pengurangan stres oksidatif merupakan mekanisme intervensi utama dalam mengurangi efek toksik tersebut. Jumlah ROS dapat diturunkan melalui mekanisme pertahanan antioksidan (*mechanisms of small-molecule antioxidants*) dan enzim antioksidan. O₂ akan direduksi oleh superoksida dismutase (SOD) menjadi bentuk H₂O₂ yang lebih stabil. H₂O₂ dapat menghasilkan radikal hidroksil OH yang sangat reaktif dan dapat direduksi menjadi H₂O dan O₂ oleh katalase (CAT), glutathione peroksidase (GPx), dan peroksidase lainnya. Antioksidan seluler glutathione (GSH) terlibat dalam dua jenis reaksi. Pertama-tama, dalam bentuk tereduksinya, GSH bereaksi secara nonenzimatis dengan O₂ dan OH untuk menghilangkan ROS. Selanjutnya, GSH berfungsi sebagai kontributor elektron untuk reduksi peroksida dalam reaksi GPx. Ketika GSH bereaksi dengan ROS, GSH akan teroksidasi dan menghasilkan glutathione disulfide (produk terakhir dari reaksi GPx). GSH selanjutnya dapat direduksi dari glutathione disulfida melalui reaksi dengan glutathione reduktase melalui transfer elektron dari NADPH ke glutathione disulfida. Sejumlah penelitian telah menyatakan bahwa GSH terlibat dalam menghambat kematian sel apoptosis dan kerusakan DNA dalam sel setelah stres oksidatif. Diketahui, rutinoides dapat meningkatkan produksi GSH dan sistem pertahanan oksidatif seluler. Mekanisme ini merupakan salah satu mekanisme yang melatarbelakangi aktivitas rutinoides sebagai antioksidan diluar mekanisme lainnya seperti mekanisme mengais ROS melalui struktur kimiawi Rutinoides (Enogieru dkk., 2018).

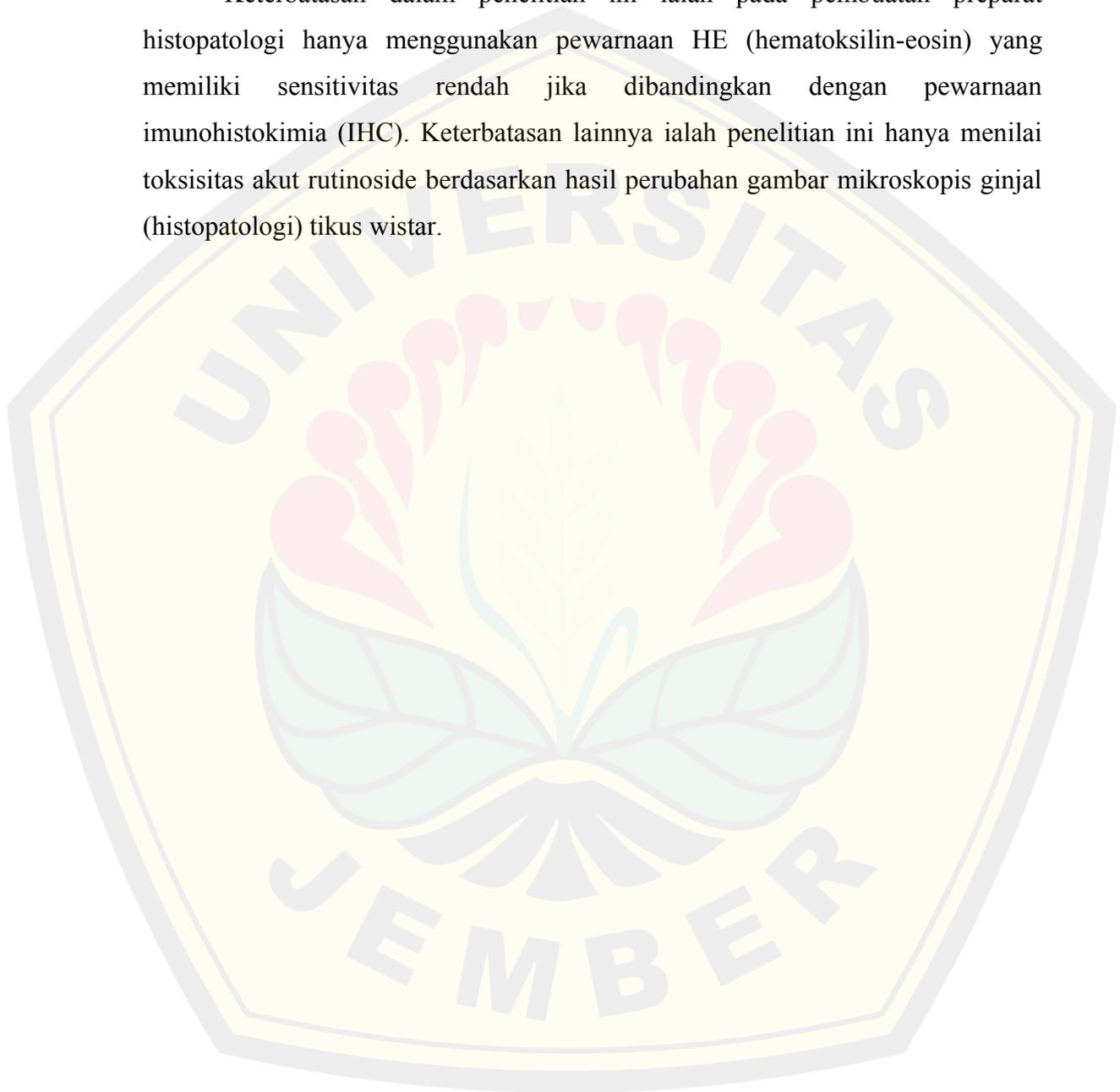
Rutinoside juga telah dilaporkan memberikan efek antiapoptosis dengan menghambat molekul apoptosis seperti caspase-3/-7/-9, dan peningkatan protein antiapoptosis termasuk HMGB1 dan Bcl-2. Hal ini memberikan efek menguntungkan dari rutinoside pada jantung, hati, dan ginjal serta telah dikonfirmasi oleh pemeriksaan histopatologi dalam berbagai penelitian. Berdasarkan hal tersebut, rutinoside memiliki efek kardioprotektif, nefroprotektif, dan hepatoprotektif yang signifikan yang terutama dimediasi oleh sifat antioksidan dan anti-inflamasinya.

Dalam sebuah penelitian, rutin menunjukkan aktivitas perlindungan terhadap hiperurisemia dan disfungsi ginjal pada tikus yang diinduksi oksonat. Pemberian rutin menghasilkan penurunan kadar urat serum, kreatinin dan nitrogen urea darah, kadar uromodulin serum dan ginjal, dan peningkatan ekskresi uromodulin, urate dan kreatinin urin pada tikus hiperurisemia. Terdapat penurunan regulasi mRNA dan kadar protein yang signifikan dari transporter glukosa-9 dan transporter urate-1, bersama dengan peningkatan regulasi mRNA dan kadar protein transporter anion organik 1 dan transporter kation/karnitin organik di ginjal tikus hiperurisemia. Dalam model tikus yang diberi makan fruktosa untuk hiperurisemia, rutin memblokir aktivasi tiga inflammasom seperti reseptor NOD dan membantu dalam peningkatan pensinyalan dan mengurangi akumulasi lipid di ginjal tikus (Hu dkk., 2012) bersama dengan pembalikan disregulasi transporter ginjal (Hu dkk., 2009).

Rutin juga memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, dan antiapoptosis terhadap vankomisin, gentamisin, cisplatin, dan siklofosfamid (Qu dkk., 2019). Pada tikus wistar yang diberi cisplatin, pretreatment rutin menyebabkan pemulihan fungsi ginjal dan biomarker stres oksidatif (Kamel dkk., 2014). Rutin menghambat sebagian efek pada peradangan yang dimediasi jalur NF κ B dan TNF- α , apoptosis sel tubular yang dimediasi caspase-3, bersama dengan pembentukan kembali perubahan histopatologis karena pemberian cisplatin (Arjumand dkk., 2011). Rutin juga menunjukkan efek perlindungan terhadap nefrotoksisitas yang diinduksi kalium bromat pada tikus. Penurunan fragmentasi DNA, upregulasi

dalam aktivitas enzim antioksidan yaitu. katalase, superoksida dismutase, glutathione peroksidase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, dan glutathione tereduksi bersama dengan pengurangan peroksidasi lipid telah diamati (Khan dkk., 2012).

Keterbatasan dalam penelitian ini ialah pada pembuatan preparat histopatologi hanya menggunakan pewarnaan HE (hematoksilin-eosin) yang memiliki sensitivitas rendah jika dibandingkan dengan pewarnaan imunohistokimia (IHC). Keterbatasan lainnya ialah penelitian ini hanya menilai toksisitas akut rutinocide berdasarkan hasil perubahan gambar mikroskopis ginjal (histopatologi) tikus wistar.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini ialah:

- a. Pemberian flavonoid rutinoid tidak memberikan efek yang signifikan terhadap perubahan mikroskopis ginjal pada tikus wistar.
- b. Flavonoid rutinoid memiliki kisaran nilai toksisitas akut (LD_{50}) yang tidak dapat diketahui (*unclassified*).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti dalam penelitian ini ialah dapat dilakukan penelitian lebih lanjut seperti uji toksisitas subakut oral, uji toksisitas subkronis oral, dan uji toksisitas kronis oral terhadap flavonoid rutinoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, D. R. 2008. Gambaran Makroskopis dan Mikroskopis Hati dan Ginjal Mencit Akibat Pemberian Plumbum Asetat. *Tesis*. Medan: Program Pasca Sarjana Universitas Sumatra Utara.
- Arifin, B. and Ibrahim, S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), pp. 21-29.
- Arjumand, W., Seth, A., & Sultana, S. 2011. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food and chemical toxicology*, 49(9), 2013-2021.
- Burcham, P.C., 2014. Target-Organ Toxicity: Liver and Kidney, in: An Introduction to Toxicology. Springer London, London, pp. 151-187.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. 2013. *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Chinedu, E., Arome, D., Ameh, FS. 2013. New recommended method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*. 20(3):224-6.
- Chua, L. S. 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 150(3):805-817.
- Drake, R. L., A. W. Vogl, dan A. W. M. Mitchell. 2013. *Gray's Anatomy for Student*. 3rd ed. Philadelphia:Elsevier.
- Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. 2018. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Eroschenko, V. P. 2013. *Atlas Histologi diFiore dengan Korelasi Fungsional*. 12th ed. Jakarta: EGC.
- Farhan, Z., Budi, M. S., & Syamsir, E. 2017. Efek Pemberian Vitamin C terhadap Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar yang Terpapar Plumbum Asetat. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(2), 417-422.

- Ganeshpurkar A, Saluja AK. 2017. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*. Feb;25(2):149-164.
- Gani, J. O., Wardhani, F. M., & Tandanu, E. 2021. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria*) pada Ginjal Tikus Wistar Jantan. *Majalah Kesehatan FKUB*, 8(4), 192-198.
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. 2013. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary pathology*, 50(6), 1007-1015.
- Gu, S. Y., Yeh, T. Y., Lin, S. Y., & Peng, F. C. 2016. Unfractionated bone marrow cells attenuate paraquat-induced glomerular injury and acute renal failure by modulating the inflammatory response. *Scientific reports*, 6(1), 23287.
- Gullón, B., T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, dan G. Eibes. 2017. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*. 67:220–235.
- Hu, Q. H., Wang, C., Li, J. M., Zhang, D. M., & Kong, L. D. 2009. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(4), F1080-F1091.
- Hu, Q. H., Zhang, X., Pan, Y., Li, Y. C., & Kong, L. D. 2012. Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats. *Biochemical pharmacology*, 84(1), 113-125.
- Jelita, S. F., Setyowati, G. W., & Ferdinand, M. 2020. Uji Toksisitas Infusa *Acalypha siamensis* Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Farmaka*, 18(1), 14-22.
- Julisawaty, E. A. 2020. Aplikasi Augmented Reality Tentang Fungsi Organ Ginjal Manusia dan Cara Menjaga Kesehatannya. In *Prosiding Seminar SeNTIK* (Vol. 4, No. 1, pp. 159-166).
- Kamel, K. M., Abd El-Raouf, O. M., Metwally, S. A., Abd El-Latif, H. A., & El-sayed, M. E. 2014. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(7), 312-319.

- Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S. 2012. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-6.
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12824.
- Makiyah, A., dan Sumirat T. 2017. Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) pada Tikus Putih Strain Wistar. MKB, Volume 49 No. 3, hlm.145- 155.
- Malahina, E. A. U. 2018. Sistem Pakar Deteksi Penyakit Ginjal Berbasis Mobile Android. HOAQ (High Education of Organization Archive Quality): Jurnal Teknologi Informasi, 10(1), 6–13.
- M. Munoz, M. N., Alvarado, U. G., Reyes, L. I. J., Watanabe, K. 2021. Acute oral toxicity assessment of ethanolic extracts of *Antidesma bunius* (L.) Spreng fruits in mice. *Toxicology reports*. Volume 8: 1289-1299.
- Negahdari, R., Bohlouli, S., Sharifi, S., Maleki Dizaj, S., Rahbar Saadat, Y., Khezri, K., & Raeesi, S. 2020. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1719-1738.
- Nouri, Z., Fakhri, S., Nouri, K., Wallace, C. E., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. 2020. Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach. *Cancers*, 12(8), 2276.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- Parasuraman, S. 2011. Toxicological screening. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2(2), 74.
- Patel, K., & Patel, D. K. 2019. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 457–479.
- Purnamasari, P., Purnawati, R. D., & Susilaningih, N. 2018. Pengaruh Ekstrak Daun Sukun Dan Madu Terhadap Gambaran Mikroskopik Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Dietilnitrosamin. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 7(2), 1391-1405.

- Qinghu, Q., Jinmei, J., Nayintai, D., Narenchaoketu, H., Jingjing, H., Baiyinmuqier, B. 2016. Anti-Inflammatory Effects, Nuclear Magnetic Resonance Identification and High-Performance Liquid Chromatography Isolation of The Total Flavonoids from *Artemisia Frigida*. *Journal Of Food and Drug Analysis*:24: 385-391.
- Qu, S., Dai, C., Lang, F., Hu, L., Tang, Q., Wang, H., & Hao, Z. 2019. Rutin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity by ameliorating oxidative stress, apoptosis, and inflammation in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), 10-1128.
- Riskiana, N. 2021. Studi Literature Etnofarmasi, Uji Toksisitas Akut *Hydnopytum* sp. pada Histologi Hati Mencit dan Pembuatan Nanostructured Lipid Carrier (NLC). *Bencoolen Journal of Pharmacy*, 1(1), 1-10.
- Rosaliano, M. N., Silveira Nadiege D, and Cavalini Daniela CU. 2012. A Potencial Improves The lipid Profile of Diabetic Rats. Brazil: *Lipid and Health Disease*; 2(1):114-115
- Sahib, H. B., & Hamid, Z. M. 2021. The Acute Toxicity of Rutin in Mice. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683-3597 E-ISSN 2521-3512)*, 30(2), 231-240.
- Seely, J. C. dan A. Brix. 2014. NTP Nonneoplastic Lesion Atlas.
- Sotler, R., Poljšak, B., Dahmane, R., Jukić, T., Pavan Jukić, D., Rotim, C., & Starc, A. 2019. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clinica Croatica*, 58(4.), 726-736.
- Suhita, N. L. P. R., Sudira, I. W., & Winaya, I. B. O. 2013. Histopatologi ginjal tikus putih akibat pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) peroral. *Buletin Veteriner Udayana*, 5(1), 63-69.
- Tian-yang., Wang., Qing Li., Kaishun Bi. 2018. Bioactive flavonoids In Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fateasian. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 13, 12–23.
- Yang, J., J. Guo, dan J. Yuan. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6):1060–1066.
- Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y., & Nakabayashi, R. 2019. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers in plant science*, 10, 943.

Yulianto, Y., & Nurul, A. 2017. Toksikologi Lingkungan. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan; Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia.



LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Surat Keterangan Persetujuan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121. E-mail: keci@tejkampus.jember.ac.id

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL
Nomor : 1782/H25.1.11/KE/2023

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

UJI TOKSISITAS AKUT FLAVONOID RUTINOSIDE ORAL TERHADAP PERUBAHAN MIKROSKOPIS GINJAL TIKUS WISTAR

Peneliti Utama : Yulia Mega Pratiwi
Name of the principal investigator

NIM : 192010101004

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Masa berlaku persetujuan etik ini 1 tahun

Jember, 7 Agustus 2023
Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan




dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed
NIP. 198903132014042002

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

Judul Penelitian : UJI TOKSISITAS AKUT FLAVONOID RUTINOSIDE ORAL
TERHADAP PERUBAHAN MIKROSKOPIS GINJAL TIKUS
WISTAR

Peneliti : Yulia Mega Pratiwi

Review protokol etik :

Penelitian bisa dilakukan dengan syarat :

1. 3R & 5 F
2. Alat alat terkalibrasi
3. Dilakukan oleh ahli
4. Hasil penelitian didesiminasikan

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan



dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed
NIP. 198903132014042002

Jember, 7 Agustus 2023
Reviewer

dr. Kristianningrum Dian Sofiana, M.Biomed
NIP. 198609062012122001

Lampiran 3.2 Standar Operasional Prosedur Pemberian flavonoid Rutinoside terhadap Hewan Coba

1. Tujuan : Menjelaskan prosedur pembuatan dan pemberian flavonoid rutinoside terhadap hewan coba.
2. Ruang Lingkup : Laboratorium Farmakologi
3. Penanggung Jawab : Ketua Laboratorium Farmakologi
4. Definisi : Pemberian flavonoid rutinoside dengan dosis 5000 mg/kgBB secara peroral, yaitu dengan menggunakan sonde lambung.
5. Referensi :
M. Muñoz, M. N., Urdujah G. Alvarado, Jerica Isabel L. Reyes, Kozo Watanabe. 2021. Acute oral toxicity assessment of ethanolic extracts of *Antidesma bunius* (L.) Spreng fruits in mice. *Toxicology reports*. Vol. 8: 1289-1299.
6. Prosedur :
 1. Perhitungan dosis
 - i. Menghitung dosis rutinoside untuk setiap tikus. Sebagai contoh, berat tikus ialah 200 gram, maka penghitungannya ialah:

$$\text{Dosis rutinoside: } \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} = \frac{x}{200 \text{ gram}}$$

$$x : \frac{5000}{5} \text{ gram}$$

$$x = 1 \text{ gram}$$
 - j. Menghitung dosis untuk membuat DMSO 5%. Jika jumlah tikus adalah 6 ekor dan setiap ekornya akan diberikan sebanyak 5 mL larutan stok rutinoside, maka penghitungannya ialah:

$$\text{DMSO : } \frac{5 \text{ mL}}{100 \text{ mL aquadest}} = \frac{x}{30 \text{ mL aquadest}}$$

$$x : \frac{150}{100}$$

$$x = 1,5 \text{ mL}$$
 2. Penyiapan bahan

Untuk 6 ekor tikus, maka diperlukan bahan:

- a. Rutinoside 6 gram
- b. Aquadest 30 mL
- c. DMSO 1,5 mL

3. Penyiapan alat

- a. Timbangan 1 buah
- b. Gelas ukur 1 buah
- c. *Beaker glass* 50 mL 1 buah
- d. Pengaduk 1 buah
- e. Vortex 1 buah
- f. Spuit 5 cc 1 buah
- g. Sonde lambung 1 buah

4. Prosedur kerja

- a. Disiapkan alat dan bahan.
- b. Ditimbang isolat rutinosiside sebanyak 6 gram dalam satu beaker glass.
- c. Dalam beaker glass yang sama, ditambahkan DMSO sebanyak 1,5 mL. Aduk hingga tercampur.
- d. Kemudian campuran tersebut ditambahkan aquadest hingga 30 mL. Aduk kembali.
- e. Setelahnya diaduk menggunakan vortex agar tercampur merata.
- f. Kemudian diambil menggunakan spuit 5 cc. Jumlah yang diambil disesuaikan kembali dengan berat badan tikus, menggunakan perbandingan perhitungan:

$$\text{Dosis yang diberikan: } \frac{x}{200 \text{ gram}} \times 5 \text{ mL}$$

- g. Diberikan kepada hewan coba secara peroral menggunakan sonde lambung.

7. Dokumen terkait :

OECD. 2002. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 423. Paris: OECD Publishing.

Lampiran 3.3 Tabel Pemberian dosis Rutinoside

Kelompok	Jenis Kelamin	Nomor perlakuan	Berat Badan tikus (gram)	Dosis Rutinoside 5000 mg/kgBB (gram)	Volume yang diberikan peroral dengan DMSO 5% (mL)
Kontrol	Jantan	1	188	0,94	4,70
		2	190	0,95	4,75
		3	199	0,99	4,95
	Betina	1	160	0,80	4,00
		2	193	0,96	4,80
		3	150	0,75	3,75
Perlakuan	Jantan	1	190	0,95	4,75
		2	164	0,82	4,10
		3	163	0,81	4,05
	Betina	1	156	0,78	3,90
		2	150	0,75	3,75
		3	152	0,76	3,80

Lampiran 3.4 Tabel Hasil Observasi Berat Badan Hewan Coba Pasca Uji

Pengamatan pada hari ke-	Berat badan tikus (gram)					
	Jantan 1	Jantan 2	Jantan 3	Betina 1	Betina 2	Betina 3
0 (saat uji diberikan)	190	164	163	156	150	152
1	193	170	169	158	150	151
2	197	173	175	159	150	151
3	202	174	180	162	150	152
4	205	179	188	162	151	151
5	205	179	190	162	151	152
6	207	179	194	163	151	151
7	208	180	196	163	151	151
8	209	181	196	164	151	151
9	209	183	198	165	151	151
10	213	185	199	165	152	151
11	215	186	201	166	152	151
12	219	188	203	167	152	152
13	223	192	207	169	153	151
14	228	197	210	170	156	151

Lampiran 3.5 Tabel Hasil Observasi Tanda-Tanda Toksisitas pada Hewan Coba Pasca Uji

Waktu pengamatan	Hasil Observasi					
	Jantan 1	Jantan 2	Jantan 3	Betina 1	Betina 2	Betina 3
30 menit pasca uji	-	-	-	-	-	-
24 jam pasca uji	-	-	-	-	-	-
Hari ke-1	-	-	-	-	-	-
Hari ke-2	-	-	-	-	-	-
Hari ke-3	-	-	-	-	-	-
Hari ke-4	-	-	-	-	-	-
Hari ke-5	-	-	-	-	-	-
Hari ke-6	-	-	-	-	-	-
Hari ke-7	-	-	-	-	-	-
Hari ke-8	-	-	-	-	-	-
Hari ke-9	-	-	-	-	-	-
Hari ke-10	-	-	-	-	-	-
Hari ke-11	-	-	-	-	-	-
Hari ke-12	-	-	-	-	-	-
Hari ke-13	-	-	-	-	-	-
Hari ke-14	-	-	-	-	-	-

Clinical symptoms that need to be monitored: aggression, somnolence, tremor, paralysis, convulsion, changes in skin/eyes/mucosal membranes, asphyxia, salivation, diarrhea.

*tuliskan gejala bila ada, bila tidak ada tuliskan (-)

Lampiran 3.6 Tabel data Skoring Histopatologi Ginjal Tikus

Pengamat 1		Pengamat 2	
Keterangan	Skor	Keterangan	Skor
Kontrol J1	1	Kontrol J1	1
Kontrol J2	1	Kontrol J2	1
Kontrol J3	2	Kontrol J3	2
Kontrol B1	1	Kontrol B1	1
Kontrol B2	1	Kontrol B2	1
Kontrol B3	1	Kontrol B3	1
Perlakuan J1	1	Perlakuan J1	1
Perlakuan J2	2	Perlakuan J2	2
Perlakuan J3	1	Perlakuan J3	1
Perlakuan B1	1	Perlakuan B1	2
Perlakuan B2	1	Perlakuan B2	1
Perlakuan B3	2	Perlakuan B3	2

Pengamatan histopatologi ginjal tikus dilakukan dibawah pengawasan dosen ahli.

Mengetahui dosen ahli,

dr. Rena Normasari, M.Biomed

Lampiran 4.1 Tabel Konversi Data Hasil Skoring Histopatologi Ginjal Tikus dengan MSI

No.	Tikus	Skor	Successive Interval
1	LJ1	1	1.000
2	LJ2	2	2.695
3	LJ3	1	1.000
4	LB1	1	1.000
5	LB2	1	1.000
6	LB3	2	2.695
7	KJ1	1	1.000
8	KJ2	1	1.000
9	KJ3	2	2.695
10	KB1	1	1.000
11	KB2	1	1.000
12	KB3	1	1.000

Lampiran 4.2 Tabel hasil Uji Normalitas Data dengan uji *Shapiro-Wilk*

Output	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Output	.460	12	.000	.552	12	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 4.3 Tabel hasil Uji Homogenitas Data dengan uji *Lavene*

Test of Homogeneity of Variances				
Output	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Output	1.607	1	10	.234

Lampiran 4.4 Tabel hasil Uji Komparasi Data dengan uji *Mann-Whitney***Mann-Whitney Test**

		Ranks		
	Kategori	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Output	Perlakuan	6	7.00	42.00
	Kontrol	6	6.00	36.00
Total		12		

Test Statistics^a

	Output
Mann-Whitney U	15.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-.638
Asymp. Sig. (2-tailed)	.523
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699 ^b

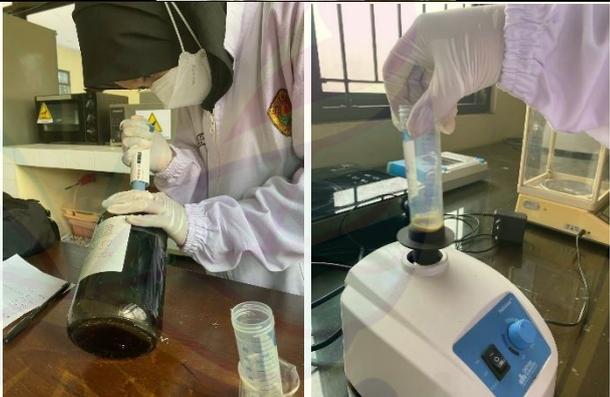
a. Grouping Variable: Kategori

b. Not corrected for ties.

Lampiran 4.5 Tabel hasil Uji Reliabilitas dengan uji *Cornbach Alpha***Reliability Statistics**

Cronbach's	
Alpha	N of Items
.897	2

Lampiran 4.6 Dokumentasi Penelitian

No.	Keterangan	Gambar
1.	Isolat rutinocide	
2.	Menimbang berat rutinocide	
3.	Melarutkan rutinocide dengan DMSO	
4.	Aklimatisasi hewan coba	

<p>5.</p>	<p>Pemberian kepada hewan coba secara peroral menggunakan sonde lambung.</p>	
<p>6.</p>	<p>Pemberian obat bius pada hewan coba sebelum dilakukan terminasi.</p>	
<p>7.</p>	<p>Terminasi hewan coba.</p>	
<p>8.</p>	<p>Pembuatan preparat ginjal tikus</p>	

9.	Pembacaan preparat ginjal tikus menggunakan Optilab			
----	---	--	--	--

