



**EFEKTIVITAS EKSTRAK METANOL ALGA COKELAT
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID DAN KREATININ
SERUM SEBAGAI PREVENSI GANGGUAN FUNGSI GINJAL**

SKRIPSI

Oleh

**Ni Nyoman Yuniasih
NIM 132010101024**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**EFEKTIVITAS EKSTRAK METANOL ALGA COKELAT
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID DAN KREATININ
SERUM SEBAGAI PREVENSI GANGGUAN FUNGSI GINJAL**

SKRIPSI

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

oleh

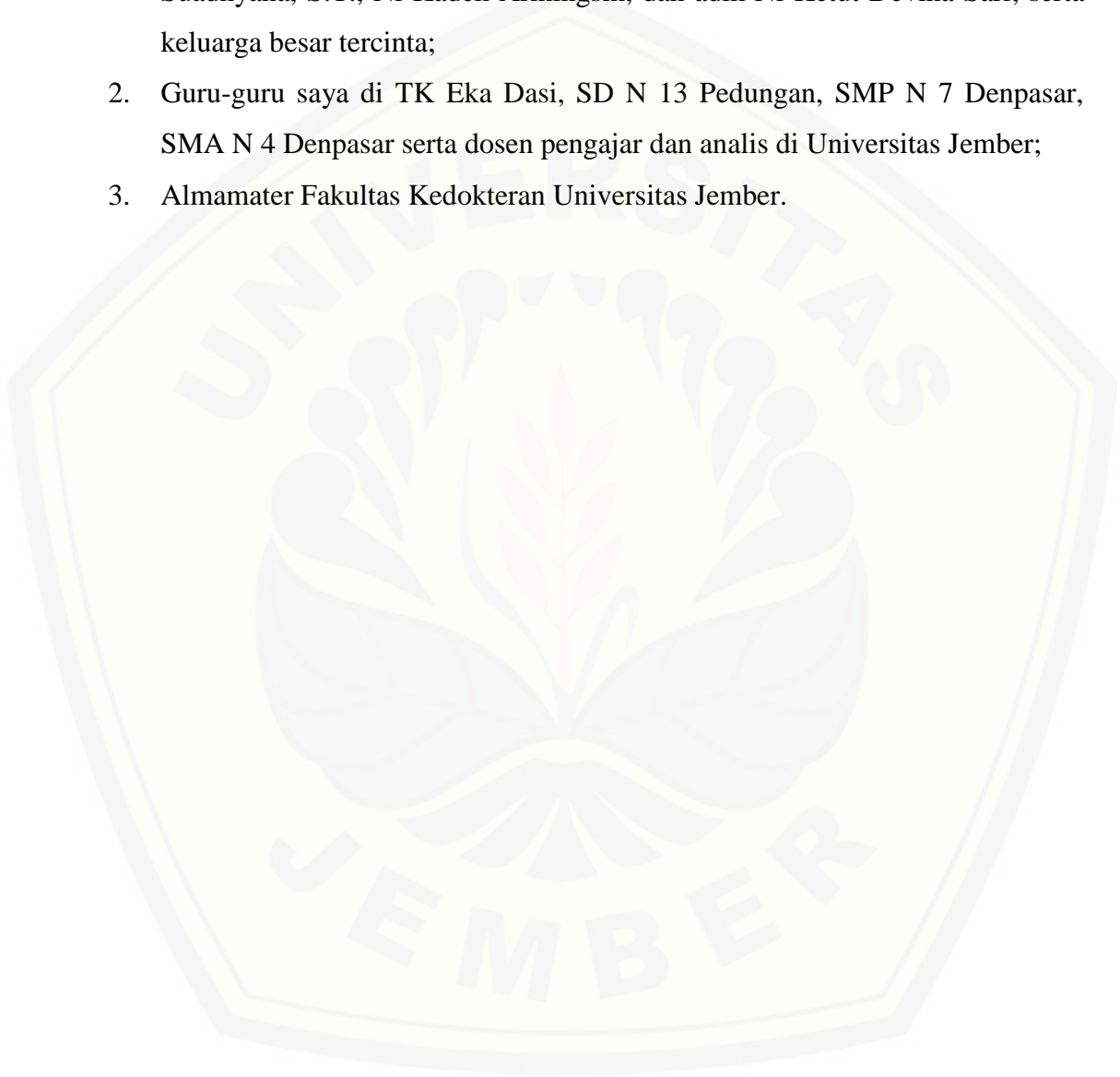
**Ni Nyoman Yuniasih
NIM 132010101024**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Ni Nyoman Kerti dan ayahanda I Nyoman Nasib, kakak I Gede Suadnyana, S.T., Ni Kadek Ariningsih, dan adik Ni Ketut Devina Sari, serta keluarga besar tercinta;
2. Guru-guru saya di TK Eka Dasi, SD N 13 Pedungan, SMP N 7 Denpasar, SMA N 4 Denpasar serta dosen pengajar dan analis di Universitas Jember;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Lakukanlah tugas kewajibanmu yang telah ditetapkan, sebab melakukan hal demikian lebih baik daripada tidak bekerja. Seseorang bahkan tidak dapat memelihara badan jasmaninya tanpa bekerja.
(terjemahan Bhagavad-gita Sloka 3.8)*)



*) Prabhupada, Sri Srimad A.C Bhaktivedanta Swami. 2006. *Bhagavad-gita Menurut Aslinya*. Indonesia: Hanuman Sakti.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Ni Nyoman Yuniasih

NIM : 132010101024

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Metanol Alga Cokelat terhadap Kadar Malondialdehid dan Kreatinin Serum sebagai Prevensi Gangguan Fungsi Ginjal” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan di institusi manapun dan bukan hasil jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 1 Desember 2016

Yang menyatakan,

Ni Nyoman Yuniasih

NIM 132010101024

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS EKSTRAK METANOL ALGA COKELAT
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID DAN KREATININ
SERUM SEBAGAI PREVENSI GANGGUAN FUNGSI GINJAL**

Oleh

Ni Nyoman Yuniasih
NIM 132010101024

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Muhammad Afiful Jauhani

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektivitas Ekstrak Metanol Alga Cokelat terhadap Kadar Malondialdehid dan Kreatinin Serum sebagai Prevensi Gangguan Fungsi Ginjal” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin, 19 Desember 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Anggota I,

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

dr. Cicih Komariah, Sp.M
NIP 197409282005012001

Anggota II,

Anggota III,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.
NIP. 198409162008012003

dr. Muhammad Afiful Jauhani
NIP. 198902162015041001

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes.
NIP. 197002141999032001

RINGKASAN

“Efektivitas Ekstrak Metanol Alga Cokelat terhadap Kadar Malondialdehid dan Kreatinin Serum sebagai Prevensi Gangguan Fungsi Ginjal”; Ni Nyoman Yuniasih, 132010101024, 2016: 78 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Nefropati diabetik merupakan komplikasi mikroangiopati Diabetes Melitus (DM) yang ditandai dengan penurunan fungsi ginjal. Hiperglikemia kronik pada penderita DM dapat menyebabkan terjadinya glikasi nonezimatis asam amino, lipid, dan protein (reaksi *Mallard* dan *Browning*) yang mengarah ke pembentukan *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) dan *Advanced Lipid Peroxidation End-Products* (ALEs). Salah satu marker untuk mengetahui tingginya peroksidasi lipid yang mengarah ke pembentukan ALEs dapat melalui pemeriksaan kadar MDA serum. Pembentukan AGEs dan ALEs mengakibatkan terjadinya ekspansi mesangium, kerusakan glomerulus, dan atau atau fibrosis tubulointerstitial. Kerusakan glomerulus ginjal menyebabkan penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) yang mengarah kepada terjadinya peningkatan kreatinin serum. Antioksidan dapat digunakan untuk mencegah nefropati diabetik. Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) memiliki beberapa kandungan antioksidan, antara lain *sargachromenol* (derivat *tocotrienol* vitamin E), *phlorotannins*, dan vitamin C. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dosis efektif maksimum dari ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) dalam menghambat peningkatan kadar malondialdehid serta kreatinin serum sebagai prevensi gangguan fungsi ginjal pada tikus putih (*Rattus novvergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik.

Jenis penelitian ini menggunakan *quasi experimental* secara *in vivo* dengan rancangan *posttest only control group design*. Sampel penelitian yaitu tikus putih jantan (*Rattus novvergicus strain Wistar*), berumur 2-3 bulan, berat badan 150-200 gram. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol normal yang diberikan larutan Na-CMC 0,5% (K1), kelompok kontrol negatif yaitu tikus diabetes dan diberikan larutan Na-CMC 0,5% (K2), kelompok tikus diabetes dengan diberi ekstrak dosis 150 mg/kgBB (K3), kelompok tikus diabetes yang diberi ekstrak ekstrak dosis 300 mg/kgBB (K4), kelompok tikus diabetes yang diberi ekstrak dosis 450 mg/kgBB (K5). Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus diadaptasi selama satu minggu, kemudian tikus dipuasakan selama delapan jam dan diperiksa kadar Glukosa Darah Puasa (GDP) selanjutnya tikus diinduksi STZ secara intraperitoneal sebanyak 55 mg/kgBB. Tujuh hari kemudian, tikus dipuasakan dan diperiksa kembali kadar GDP, untuk menilai terjadinya hiperglikemia. Nefropati diabetik terjadi tiga minggu setelah diinduksi STZ. Ekstrak diberikan dalam 14 hari setelah tikus dinyatakan hiperglikemia, karena tujuan penelitian adalah mencegah gangguan fungsi ginjal. Pemberian ekstrak beserta pelarutnya dilakukan peroral. Pada hari ke-21 setelah induksi STZ, dilakukan terminasi. Data kontrol normal dan kontrol negatif kemudian di uji menggunakan analisis statistik parametrik *One Way Annova*, sedangkan untuk mencari dosis efektif maksimum dari ekstrak metanol alga cokelat terhadap kadar

malondialdehid serta kadar kreatinin serum digunakan uji regresi model *quadratic* dengan berdasarkan pada hasil *curve estimation*.

Hasil pengukuran kadar MDA serum yakni pada kelompok kontrol normal didapatkan hasil $6,820 \pm 0,261$ nmol/mL, sedangkan dosis ekstrak 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 450 mg/kgBB didapatkan hasil berturut-turut $7,783 \pm 0,456$ nmol/mL; $6,904 \pm 0,475$ nmol/mL dan $7,176 \pm 0,429$ nmol/mL, lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu $7,957 \pm 0,345$ nmol/mL. Hasil pengukuran kadar kreatinin serum yakni pada kelompok kontrol normal didapatkan hasil $0,4072 \pm 0,0994$ mg/dL, sedangkan kelompok dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 450 mg/kgBB didapatkan hasil berturut-turut $0,4314 \pm 0,2313$ mg/dL; $0,7167 \pm 0,0605$ mg/dL dan $0,8613 \pm 0,0904$ mg/dL, lebih rendah dibanding kelompok kontrol negatif yaitu $2,322 \pm 0,2338$ mg/dL. Hasil pengukuran kadar MDA serum serta kadar kreatinin serum menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol normal dibandingkan kelompok kontrol negatif yang tidak diberikan ekstrak, hal tersebut menunjukkan tikus model nefropati diabetik telah mengalami gangguan fungsi ginjal. Hasil uji regresi menggunakan kurva *quadratic* didapatkan dosis efektif maksimum untuk menghambat peningkatan kadar MDA serum yakni 433 mg/kgBB, sehingga penggunaan ekstrak metanol alga cokelat yang melebihi dosis tersebut telah menunjukkan penurunan efek penghambatan peroksidasi lipid. Hasil uji regresi menggunakan kurva *quadratic* didapatkan dosis efektif maksimum untuk menurunkan kadar kreatinin serum yakni 238 mg/kgBB, sehingga penggunaan ekstrak metanol alga cokelat yang melebihi dosis tersebut telah menunjukkan penurunan efek penghambatan gangguan fungsi ginjal.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas terselesainya skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Metanol Alga Cokelat terhadap Kadar Malondialdehid dan Kreatinin Serum sebagai Prevensi Gangguan Fungsi Ginjal”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

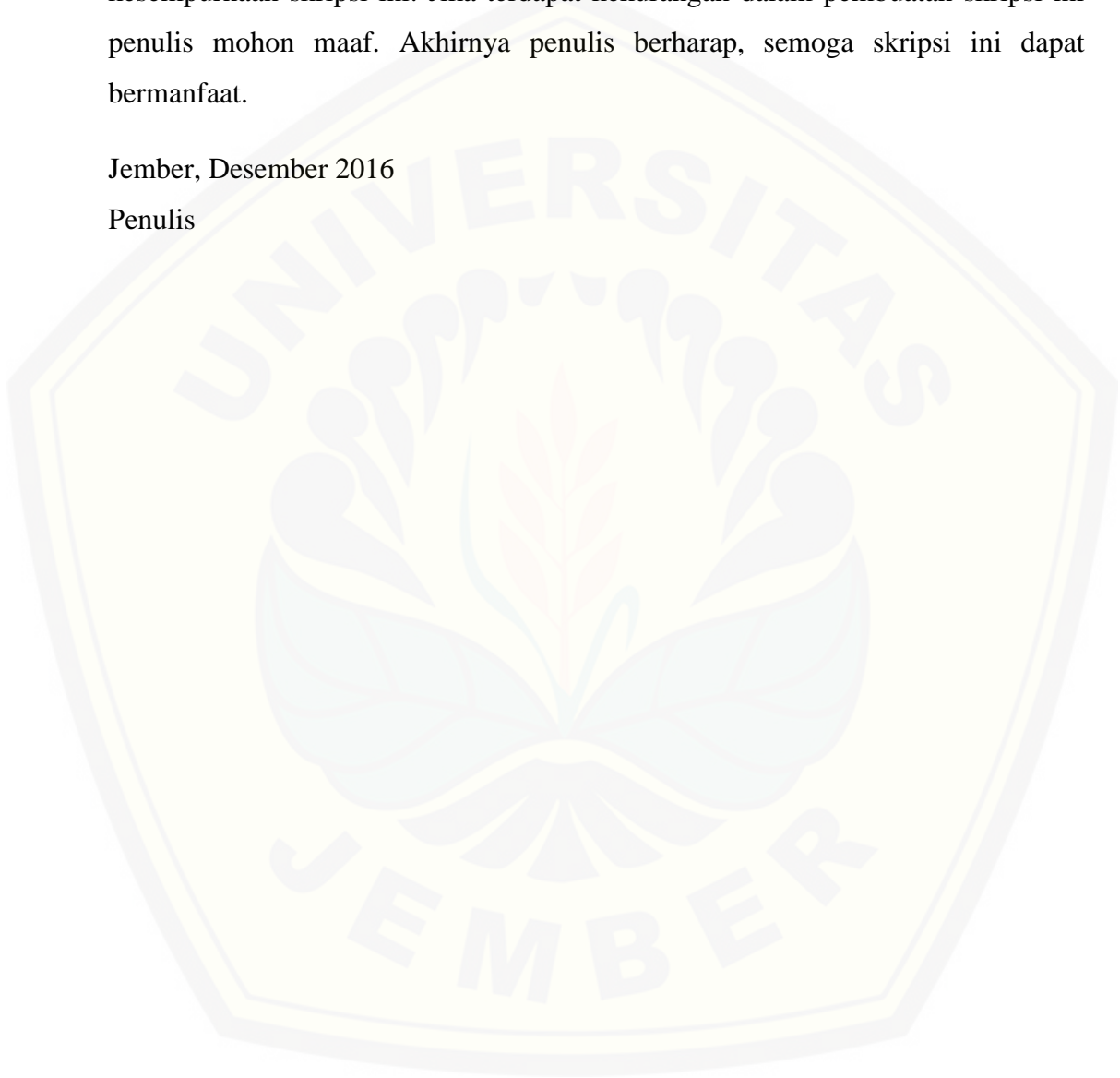
1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Muhammad Afiful Jauhani selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya untuk membimbing skripsi ini;
3. dr. Ancah Caesarina, Ph.D., selaku Koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
4. dr. Cholis Abrori, M.Kes, M.Pd.Ked. selaku Dosen Penguji I dan dr. Cicih Komariah, Sp.M selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji skripsi ini;
5. Ibunda Ni Nyoman Kerti dan ayahanda I Nyoman Nasib tercinta atas dukungan moril, materi, doa dan kasih sayang yang tak akan pernah putus;
6. Kakak I Gede Suadnyana, S.T., Ni Kadek Ariningsih, dan adik Ni Ketut Devina Sari atas dukungan doa dan semangat;
7. Tim penelitian “ARMI AGes” yakni Faizah Giftari Fitriana, Putri Maura Widyaratri, Laras Prasasti, dan Adi Wahyu Darmawan yang telah banyak berkontribusi dalam penelitian ini.
8. Teman-teman angkatan 2013 (Vesalius) yang telah menemani perjuangan, saling mendukung dan mendoakan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;

9. Para laboran yang telah memberikan bantuan dalam penelitian ini;
10. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Jika terdapat kekurangan dalam pembuatan skripsi ini penulis mohon maaf. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Desember 2016

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Praktis	5
1.4.2 Manfaat teoritis	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ginjal	6
2.1.1 Anatomi Ginjal	6
2.1.2 Fisiologi Ginjal	7
2.2 Nefropati Diabetik	9
2.2.1 Patogenesis	9
2.2.2 Klasifikasi dan Gejala Klinis	11

2.2.3 Pengobatan	11
2.3 Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>)	12
2.3.1 Klasifikasi Alga Coklat (<i>Sargassum sp.</i>)	12
2.3.2 Morfologi Alga Coklat (<i>Sargassum sp.</i>)	13
2.3.4 Antioksidan dalam Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>).....	14
2.4 Malondialdehid	17
2.5 Kreatinin serum	17
2.6 Model Hewan Coba Nefropati Diabetik	18
2.6.1 Streptozotocin.....	18
2.6.2 Alloxan	19
2.7 Kerangka Teori	21
2.8 Hipotesis	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Rancangan Penelitian	24
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	25
3.3.1 Populasi	25
3.3.2 Sampel penelitian	25
3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel.....	25
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.5 Variabel Penelitian	26
3.5.1 Variabel Bebas	26
3.5.2 Variabel terikat	27
3.5.3 Variabel terkontrol	27
3.6 Definisi Operasional	27
3.6.1 Ekstrak Metanol Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>)	27
3.6.2 Malondialdehid (MDA) Serum Tikus	28
3.6.3 Kreatinin Serum Tikus.....	28
3.7 Alat dan Bahan	28
3.7.1 Alat	28
3.7.2 Bahan.....	29
3.8 Prosedur Penelitian	30
3.8.1 Persiapan Hewan Coba.....	30

3.8.2 Pembuatan Ekstrak Alga Cokelat (<i>Sargassum sp</i>).....	30
3.8.3 Penginduksian Streptozotocin	30
3.8.4 Pengukuran Glukosa Darah Puasa	31
3.8.5 Dosis Ekstrak Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>)	31
3.8.6 Pemberian Ekstrak Alga Cokelat	31
3.8.7 Perlakuan Hewan Coba	32
3.8.8 Pengambilan Serum Darah.....	32
3.8.9 Pemeriksaan MDA Serum Tikus Wistar	32
3.8.10 Pemeriksaan Serum Kreatinin	33
3.9 Analisis Data	33
3.10 Uji Kelayakan Etik Penelitian	34
3.11 Alur Penelitian	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil Penelitian	36
4.1.1 Berat Badan Tikus	36
4.1.2 Dampak Induksi Streptozotocin Terhadap GDP	36
4.1.3 Kadar MDA Serum Tikus.....	38
4.1.4 Kadar Kreatinin Serum Tikus	39
4.2 Analisis Data	39
4.2.1 Analisis Data Berat Badan Tikus.....	39
4.2.2 Analisis Data MDA serum.....	40
4.2.3 Analisis Data Kreatinin Serum	42
4.3 Pembahasan	43
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Daftar kandungan Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>) kering.....	15
Tabel 3.1 Pembagian kelompok perlakuan	32



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Posisi ginjal pada tubuh	6
Gambar 2.2 Potongan longitudinal ginjal	7
Gambar 2.3 Morfologi alga cokelat (<i>Sargassum sp.</i>)	13
Gambar 2.4 Struktur kimia <i>Sargacromenol</i>	16
Gambar 2.5 Struktur kimia Streptozotocin	19
Gambar 2.6 Struktur kimia Aloksan	19
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian	24
Gambar 3.2 Alur penelitian	35
Gambar 4.1 Diagram rata-rata berat badan tikus	37
Gambar 4.2 Diagram rata-rata GDP sebelum dan setelah induksi STZ	37
Gambar 4.3 Diagram rata-rata kadar MDA serum tikus	38
Gambar 4.4 Diagram rata-rata kadar kreatinin serum	39
Gambar 4.4 Grafik <i>quadratic</i> dosis ekstrak terhadap kadar MDA serum	41
Gambar 4.4 Grafik <i>quadratic</i> dosis ekstrak terhadap kadar kreatinin serum	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Morfologi Alga Cokelat.....	55
Lampiran 3.2 Perhitungan dan Pemberian Dosis Streptozotocin (STZ).....	56
Lampiran 3.3 Perhitungan Dosis Ekstrak Alga Cokelat (<i>Sargassum sp.</i>).....	57
Lampiran 3.3 Tabel Dosis Konversi Ekstrak dari Tikus ke Manusia	58
Lampiran 3.5 Keterangan Persetujuan Etik	60
Lampiran 4.1 Data Berat Badan Tikus.....	64
Lampiran 4.2 Analisis Data Berat Badan Tikus.....	65
Lampiran 4.3 Data Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP).....	66
Lampiran 4.4 Analisis Glukosa Darah Puasa.....	67
Lampiran 4.5 Kurva Standar MDA.....	68
Lampiran 4.6 Data Kadar MDA Serum	69
Lampiran 4.7 Analisis Data MDA Serum.....	70
Lampiran 4.8 Data Kadar Kreatinin Serum	72
Lampiran 4.9 Analisis Data Kreatinin Serum.....	73
Lampiran 4.10 Dokumentasi Penelitian.....	75

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nefropati diabetik adalah salah satu komplikasi mikroangiopati pada penyakit Diabetes Melitus (DM) yang ditandai dengan adanya penurunan fungsi ginjal (Pardede, 2008). Diperkirakan 45% pasien DM tipe satu akan berkembang mengalami makroalbuminuria (Andersen *et al* dalam De Boer, 2014). Studi terbaru menyebutkan 35% pasien DM yang mengalami gejala nefropati diabetik akan berlanjut menjadi penyakit gagal ginjal terminal (Krolewski *et al* dalam De Boer, 2014). Menurut data Perkumpulan Nefrologi Indonesia (2014) dalam Indonesia *Renal Registry* (IRR), nefropati diabetik merupakan penyebab kedua kasus pasien gagal ginjal yang menjalani hemodialisis di total sebelas provinsi di Indonesia yakni sebanyak 3401 kasus dan Jawa timur berada di peringkat pertama yakni 784 pasien.

Mekanisme terjadinya nefropati diabetik salah satunya melalui pembentukan *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) dan *Advanced Lipid Peroxidation End-Products* (ALEs). AGEs dan ALEs adalah modifikasi dari protein dan lipid yang secara non-enzimatik terglikasi dan teroksidasi setelah kontak dengan gula aldose. AGEs menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas dan penipisan sistem antioksidan seluler (Goldin *et al.*, 2006). ALEs menyebabkan disfungsi protein dan mengubah respon seluler (Negre-Salvayre *et al.*, 2008). Proses ini selanjutnya mengarah ke ekspansi mesangium, hiperfiltrasi glomerulus, ketebalan membran basal, glomerulosklerosis dan atau fibrosis tubulointerstitial (Sudoyo *et al.*, 2009).

Berdasarkan patogenesis komplikasi DM, disimpulkan bahwa AGEs dan ALEs dapat mengubah struktur dan fungsi ginjal (Fukami *et al.*, 2008; Negre-Salvayre *et al.*, 2008). Akibat dari kerusakan glomerulus ginjal adalah penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG). Pemeriksaan nefropati diabetik yang biasa dilakukan adalah pemeriksaan mikroalbuminuria dan serum kreatinin (Feldt-Rasmussen, 2003). Klirens kreatinin dan kreatinin serum merupakan pemeriksaan

yang dapat digunakan untuk mengetahui LFG sebagai *screening* terhadap fungsi ginjal dan atau progresivitas penyakit. Kreatinin adalah produk protein otot yang merupakan hasil akhir metabolisme otot yang dilepaskan dengan kecepatan hampir konstan. Pemeriksaan kadar kreatinin dalam darah merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk menilai fungsi ginjal pada penderita DM, karena konsentrasi dalam plasma dan ekskresinya di urin dalam 24 jam relatif konstan (Alfarisi *et al.*, 2013).

MDA merupakan salah satu marker dari ALEs (Negre-Salvayre *et al.*, 2008). MDA terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Kshitiz *et al.*, 2015). Peningkatan produksi dari MDA didapatkan pada membran eritrosit dari pasien DM yang merupakan penyebab kerusakan sel membran eritrosit yang penting dalam perkembangan penyakit diabetes dan komplikasinya (Ahmed *et al.*, 2006). Pada permukaan eritrosit, AGEs dapat mengikat *Reseptor for Advanced Glycation End-Products* (RAGE) dan mengaktifkan *Nuclear Factor-Kappa B* (NF-Kb) yang mengarah ke pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Fukami *et al.*, 2008). Pemeriksaan marker biologis sebagai prediktor awal pembentukan lipid peroksidasi yakni MDA dibutuhkan agar penderita lebih waspada terhadap kemungkinan komplikasi yang ditimbulkan serta untuk mengetahui efektivitas terapi.

Pengobatan yang selama ini dilakukan untuk mencegah nefropati diabetik yakni mengendalikan hiperglikemi, padahal gejala kerusakan pada ginjal bersifat samar dan biasanya terdeteksi ketika hampir 75% jaringannya rusak, karena besarnya cadangan fungsi ginjal yakni sebesar 25% sudah cukup untuk menjalankan semua fungsi regulatorik dan ekskretorik ginjal yang esensial (Sherwood, 2013). Terapi penderita nefropati diabetik umumnya menggunakan obat anti hipertensi golongan *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors* (ACE-I) atau *Angiotensin Receptor Blockers* (ARB) untuk mencegah penurunan fungsi ginjal, walaupun tekanan darah penderita normal (Sudoyo *et al.*, 2009). Kelemahan golongan obat tersebut ialah hanya diberikan setelah muncul gejala kerusakan ginjal seperti proteinuria. Penelitian yang dilakukan oleh Afshari *et al.*,

(2005) menunjukkan bahwa kandungan antioksidan yang terkandung dalam jahe dapat menurunkan pembentukan lipid peroksidasi melalui perhitungan MDA serum pada tikus model nefropati diabetik. Hal ini menunjukkan bahwa pencegahan nefropati diabetik salah satunya dengan menggunakan antioksidan.

Alga cokelat (*Sargassum sp.*) merupakan tanaman yang dalam kehidupan sehari-hari dikonsumsi dalam bentuk salad, jeli, atau sup. Alga cokelat (*Sargassum sp.*) memiliki beberapa kandungan antioksidan, antara lain *sargachromenol* (derivat *tocotrienol* vitamin E), *phlorotannins*, dan vitamin C (Yende, 2014). Derivat *chromene* sintetik disebutkan mampu menghambat pembentukan AGEs dengan mekanisme penambahan nukleofilik prekursor AGEs oleh gugus *chromene* (Ishii *et al.*, 2000). *Chromenes* berkaitan dengan *tocotrienol* dan banyak ditemukan di dalam alga cokelat. *Sargachromenol* merupakan salah satu derivat *chromene* (Youngwan, 2007). Menurut Bast *et al.*, (2002) menyebutkan adanya potensi dari beberapa antioksidan seperti vitamin E, β *carotene* serta *lipoic acid*, yang dapat menjadi toksik, sehingga penggunaannya harus disesuaikan dengan perhitungan dosis yang tepat.

Beberapa penelitian mengenai pengaruh alga cokelat telah dilakukan. Pada penelitian pengaruh *Sargassum echinocarpum* terhadap efek perbaikan stress oksidatif dan disfungsi endotel aorta (Firdaus *et al.*, 2010), menunjukkan perbaikan antioksidan endogen pada dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 450 mg/kgBB, namun pada penelitian pengaruh *Sargassum polycystum* terhadap gambaran histopatologi ginjal, hati, dan pankreas (Motshakeri *et al.*, 2014) disebutkan pada dosis 300 mg/kgBB telah terjadi perburukan gambaran histologi ginjal dan hati, sehingga peneliti tertarik untuk mencari dosis efektif maksimum ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap kadar MDA serum dan kreatinin serum dalam upaya pencegahan gangguan fungsi ginjal pada tikus model nefropati diabetik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut :

- a. Berapakah dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) untuk menghambat peningkatan kadar MDA serum tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik?
- b. Berapakah dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) untuk menghambat peningkatan kadar kreatinin serum tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah di atas, penelitian ini memiliki beberapa tujuan yakni sebagai berikut.

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) terhadap prevensi gangguan fungsi ginjal pada tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik.

1.3.2 Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) yang dapat menghambat peningkatan kadar MDA serum tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik.
- b. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) yang dapat menghambat peningkatan kadar kreatinin serum tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik.

1.4 Manfaat Penelitian

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah, dan tujuan di atas, manfaat karya tulis ilmiah ini adalah sebagai berikut.

1.4.1 Manfaat Praktis

- a. Memberi informasi mengenai efektivitas ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) terhadap pencegahan komplikasi DM dan diharapkan dapat meningkatkan nilai guna dari alga cokelat yang belum banyak dimanfaatkan.
- b. Mendukung pencapaian visi, misi, dan tujuan dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember terutama dalam bidang pemanfaatan bahan alam sebagai langkah preventif sesuai fokus Universitas Jember dalam bidang agromedis.

1.4.2 Manfaat teoritis

- a. Penelitian dapat menjawab hipotesis yang diajukan penulis dan penulis dapat mengaplikasikan ilmu yang telah dipelajari sehingga dapat mengembangkan wawasan keilmuannya.
- b. Menjadi rujukan dalam pencegahan komplikasi yang disebabkan diabetes melitus serta dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

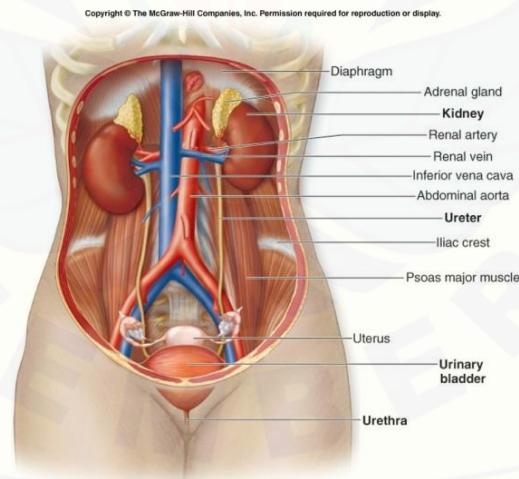
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ginjal

2.1.1 Anatomi Ginjal

Ginjal merupakan organ berbentuk seperti kacang yang terletak di kedua sisi kolumna vertebralis. Ginjal terletak di belakang peritoneum, di depan iga terakhir dan tiga otot besar –traversus abdominis, kuadratus lumborus, dan psoas mayor. Ginjal kanan lebih rendah dibandingkan ginjal kiri kerana tertekan hati. Kutub atas ginjal kanan terletak setinggi iga kedua belas, sedangkan kutub atas ginjal kiri terletak setinggi iga sebelas (Price dan Wilson, 2006).

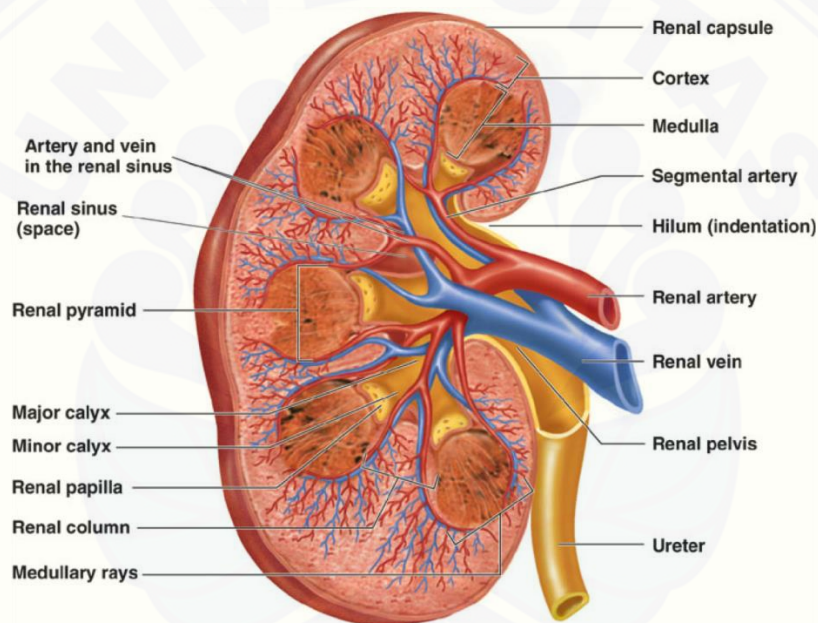
Permukaan anterior dan posterior kutub atas dan bawah serta tepi lateral ginjal berbentuk cembung sedangkan tepi medialnya berbentuk cekung karena adanya hilus. Beberapa struktur yang masuk atau keluar dari ginjal melalui hilus adalah arteria dan vena renalis, saraf, pembuluh limfatik, dan ureter. Ginjal diliputi kapsula fibrosa tipis mengkilat, yang berikatan longgar dengan mudah dari permukaan ginjal (Price dan Wilson, 2006).



Gambar 2.1 Posisi ginjal pada tubuh (sumber: The McGraw-Hill Companies)

Potongan longitudinal ginjal memperlihatkan dua daerah yang berbeda, korteks di bagian luar dan medula di bagian dalam. Medula terbagi-bagi menjadi baji segitiga yang disebut piramid. Piramid-piramid tersebut diselingi oleh bagian korteks yang disebut *kolumna Bertini*. Piramid-piramid tersebut tampak bercorak

karena tersusun segmen-segmen tubulus dan duktus pengumpul nefron. Papila (afeks) dari tiap piramid membentuk duktus papilaris *Bellini* yang terbentuk dari persatuan bagian terminal dari banyak duktus pengumpul. Setiap duktus papilaris masuk ke dalam suatu perluasan ujung pelvis ginjal berbentuk seperti cawan yang disebut kaliks minor. Beberapa kaliks mayor, yang selanjutnya bersatu sehingga membentuk pelvis ginjal. Pelvis ginjal merupakan *reservoir* utama sistem pengumpul ginjal. Ureter menghubungkan pelvis ginjal dengan vesika urinaria (Price dan Wilson, 2006).



Gambar 2.2 Potongan longitudinal ginjal (sumber: The McGraw-Hill Companies)

2.1.2 Fisiologi Ginjal

Ginjal menjalankan fungsi yang vital sebagai pengatur volume dan komposisi kimia darah dan lingkungan dalam tubuh dengan mengekskresikan zat terlarut dan air secara selektif. Fungsi vital ginjal dicapai dengan filtrasi plasma darah melalui glomerulus dengan reabsorpsi sejumlah zat terlarut dan air dalam jumlah yang sesuai di sepanjang tubulus ginjal. Kelebihan zat terlarut dan air diekskresikan keluar tubuh dalam urin melalui sistem pengumpulan urin (Price dan Wilson, 2006).

Menurut Sherwood (2013) ginjal memiliki fungsi yaitu:

- a. Mempertahankan keseimbangan H₂O dalam tubuh.
- b. Memelihara volume plasma yang sesuai sehingga sangat berperan dalam pengaturan jangka panjang tekanan darah arteri.
- c. Membantu memelihara keseimbangan asam basa pada tubuh.
- d. Mengekskresikan produk-produk sisa metabolisme tubuh.
- e. Mengekskresikan senyawa asing seperti obat-obatan.

Proses yang terjadi di nefron dalam pembentukan urin sebagai berikut.

a. Filtrasi Glomerulus

Sewaktu darah mengalir melalui glomerulus, plasma bebas protein tersaring melalui kapiler glomerulus ke dalam kapsul Bowman. Dalam keadaan normal, 20% plasma yang masuk ke glomerulus tersaring. Proses ini, dikenal sebagai filtrasi glomerulus, adalah langkah pertama dalam pembentukan urin. Secara rerata, 125 mL filtrat glomerulus (cairan yang difiltrasi) terbentuk secara kolektif dari seluruh glomerulus setiap menit (Sherwood, 2013). Sel-sel darah dan molekul-molekul protein yang besar atau protein bermuatan negatif (seperti albumin) secara efektif tertahan oleh seleksi ukuran dan seleksi muatan yang merupakan ciri khas dari sawar membran filtrasi glomerular, sedangkan molekul berukuran lebih kecil atau dengan beban yang netral atau positif (seperti air dan kristaloid) sudah langsung tersaring (Price dan Wilson, 2006).

Tekanan-tekanan yang berperan dalam proses filtrasi glomerulus yang cepat dan seluruhnya bersifat pasif, dan tidak dibutuhkan energi metabolik untuk proses filtrasi tersebut. Tekanan filtrasi berasal dari perbedaan tekanan yang terdapat antara kapiler glomerulus dan kapsula bowman. Tekanan hidrostatik darah dalam kapiler glomerulus mempermudah filtrasi dan kekuatan ini dilawan oleh tekanan hidrostatik filtrat dalam kapsula bowman serta tekanan onkotik darah. Tekanan onkotik dalam kapsula bowman pada hakekatnya adalah nol, karena filtrasi secara normal sama sekali tidak ada protein. Filtrasi glomerulus tidak hanya dipengaruhi oleh tekanan-tekanan fisik diatas, namun juga oleh permeabilitas membran filtrasi (Price dan Wilson, 2006). Penurunan permeabilitas

membran filtrasi akan menyebabkan penurunan laju filtrasi glomerulus dan juga sebaliknya.

b. Reabsorpsi Tubulus

Setelah plasma bebas protein difiltrasi melalui glomerulus, tubulus kemudian menangani setiap bahan secara sendiri, sehingga meskipun konsentrasi semua konstituen di filtrat glomerulus awal identik dengan konsentrasinya di plasma (kecuali protein plasma) namun konsentrasi berbagai konstituen mengalami perubahan bervariasi sewaktu cairan filtrat mengalir melalui sistem tubulus. Produk yang tidak direabsorpsi tetap berada di urin dengan konsentrasi tinggi (Sherwood, 2013).

c. Sekresi Tubulus

Sekresi tubulus juga melibatkan transpor transepitel, dari plasma kapiler peritubulus ke dalam lumen tubulus. Dengan sekresi tubulus, tubulus ginjal dapat secara selektif menambahkan bahan-bahan tertentu ke dalam cairan tubulus. Sekresi suatu bahan mempercepat ekskresinya di urin (Sherwood, 2013).

d. Ekskresi

Ekskresi urin adalah pengeluaran bahan-bahan dari tubuh ke dalam urin yang merupakan hasil dari tiga proses di atas. Semua konstituen plasma yang terfiltrasi atau disekresikan tetapi tidak direabsorpsi akan tetap di tubulus dan mengalir ke pelvis ginjal untuk diekskresikan sebagai urin dan dikeluarkan dari tubuh. Semua yang difiltrasi dan kemudian direabsorpsi, atau tidak difiltrasi sama sekali, masuk ke darah vena dari kapiler (Sherwood, 2013).

2.2 Nefropati Diabetik

2.2.1 Patogenesis

Hiperfiltrasi masih dianggap sebagai awal dari mekanisme patogenik dalam laju kerusakan ginjal. Penelitian pada hewan menunjukkan bahwa saat jumlah nefron mengalami pengurangan yang berkelanjutan, filtrasi glomerulus dari nefron yang masih sehat akan meningkat sebagai bentuk kompensasi. Hiperfiltrasi yang terjadi pada sisa nefron yang sehat lambat laun akan menyebabkan sklerosis dari nefron tersebut (Sudoyo *et al.*, 2009).

Mekanisme terjadinya peningkatan laju filtrasi glomerulus pada nefropati diabetik kemungkinan disebabkan oleh dilatasi arteriol aferen oleh efek yang tergantung glukosa, yang diperantarai hormon vasoaktif, *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), *Nitric Oxide*, prostaglandin dan glukagon. Hiperglikemia kronik dapat menyebabkan terjadinya glikasi non-enzimatik asam amino, lipid dan protein (reaksi Mallard dan Browning). Pada proses awal glikasi dan oksidasinya menghasilkan pembentukan *basis Schiff* dan produk Amadori. Glikasi lanjut dari protein dan lipid menyebabkan penyusunan ulang molekul yang mengarah pada *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) dan *Advanced Lipid Peroxidation End-Products* (ALEs). *Reactive Carbonyl Compounds* (RCCs) terbentuk secara endogen selama peroksidasi lipid dan *glycooxidation* dari karbohidrat sebagai prekursor AGEs dan ALEs yang selanjutnya *cross-links* dalam protein membentuk *carbonyl stress* (Negre-Salvayre *et al.*, 2008).

AGEs berperan dalam penarikan sel-sel mononuklear, juga pada terjadinya hipertrofi sel, sintesa matriks ekstraseluler serta inhibisi sintesis *Nitric Oxide*. AGEs menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas secara langsung melalui stimulasi membran terikat NAD(P)H *oksidase* pada RAGE dan penipisan sistem antioksidan seluler seperti *glutation peroksidase* (Goldin *et al.*, 2006). Hal tersebut selanjutnya menimbulkan peradangan pembuluh darah, trombogenesis dan merangsang produksi faktor pertumbuhan prosklerotik seperti *Transforming Growth Factor β* - (TGF- β) dan *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) melalui *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), NF- κ B dan / atau jalur protein kinase C (PKC) di kedua mesangial dan sel tubulointerstisial ginjal (Fukami *et al.*, 2008). ALEs menyebabkan disfungsi protein seperti modifikasi LDL yang menyebabkan lesi aterosklerosis dan mengubah respon seluler seperti modifikasi reseptor tyrosine kinase dan siklus sel (Negre-Salvayre *et al.*, 2008). Proses ini terus berlanjut sampai terjadi ekspansi mesangium dan pembentukan nodul serta fibrosis tubulointerstisial (Sudoyo *et al.*, 2009).

2.2.2 Klasifikasi dan Gejala Klinis

Perjalanan penyakit serta kelainan ginjal pada DM lebih banyak dipelajari pada DM tipe 1 dibandingkan tipe 2, dan oleh Mogensen dibagi menjadi 5 tahapan yakni :

Tahap 1. Terjadi hipertrofi dan hiperfiltrasi pada saat diagnosis ditegakkan. Laju filtrasi glomerulus dan laju ekskresi albumin dalam urin meningkat.

Tahap 2. Secara klinis belum nampak kelainan yang berarti, laju filtrasi glomerulus tetap meningkat, ekskresi albumin dalam urin dan tekanan darah normal. Terdapat perubahan histologis berupa penebalan membrana basalis yang tidak spesifik. Terdapat pula peningkatan volume mesangium fraksional (dengan peningkatan matriks mesangium).

Tahap 3. Pada tahap ini ditemukan mikroalbuminuria atau nefropati insipien. Laju filtrasi glomerulus meningkat atau dapat menurun sampai derajat normal. Laju ekskresi albumin dalam urin adalah 20-200 ig/menit (30-300 mg/24 jam). Tekanan darah mulai meningkat. Secara histologis, didapatkan peningkatan ketebalan membrana basalis dan volume mesangium fraksional dalam glomerulus.

Tahap 4. Tahap nefropati yang sudah lanjut. Perubahan histologis lebih jelas, juga timbul hipertensi pada sebagian besar pasien. Sindroma nefrotik sering ditemukan pada tahap ini. Laju filtrasi glomerulus menurun, sekitar 10 mL/menit/tahun dan kecepatan penurunan ini berhubungan dengan tingginya tekanan darah.

Tahap 5. Timbulnya gagal ginjal terminal (Sudoyo *et al.*, 2009).

2.2.3 Pengobatan

Tatalaksana nefropati diabetik tergantung pada tahapan-tahapan apakah masih normoalbuminuria, sudah sampai mikroalbuminuria atau makroalbuminuria, Tetapi prinsipnya pendekatan utama tatalaksana nefropati diabetik adalah melalui:

- a. Pengendalian kadar glukosa darah (olahraga, diet, dan obat anti diabetes)
- b. Pengendalian tekanan darah (diet rendah garam, obat antihipertensi)
- c. Perbaikan fungsi ginjal (diet rendah protein, pemberian *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor* (ACE-I) dan atau *Angiotensin Receptor Blocker*

(ARB) sedangkan pilihan lain adalah diuretika, kemudian beta-bloker atau calcium-channel bloker.

- d. Pengendalian faktor-faktor ko-morbiditas lain (pengendalian lemak, mengurangi obesitas dll) (Sudoyo *et al.*, 2009).

Pada pasien-pasien yang mengalami penurunan fungsi ginjal secara terus-menerus sampai laju filtrasi glomerulus mencapai 10-12 mL/menit (setara dengan klirens kreatinin < 15 mL/menit atau serum kreatinin > 6 mg/dL) dianjurkan untuk memulai dialisis. Pilihan pengobatan gagal ginjal terminal adalah cangkok ginjal (Sudoyo *et al.*, 2009).

2.3 Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

2.3.1 Klasifikasi Alga Coklat (*Sargassum sp.*)

Alga cokelat merupakan multiseluler alga. Karakteristik dari alga cokelat adalah warna dari hijau zaitun sampai warna coklat gelap akibat melimpahnya pigmen fukosantin. Contoh genus dari kelompok ini adalah *Laminaria* dan *Sargassum*. Tubuhnya sudah dapat dibedakan antara helaian (lamina), tangkai, dan pangkal yang menyerupai bentuknya akar (*hapreta*). Pigmentasi yang dimiliki alga coklat adalah klorofil a dan c, beta karoten, dan xantofilnya adalah *fukoxantin*, *violaxantin*, dan *flavoxantin* (Nawaly *et al.*, 2013).

Klasifikasi *Sargassum sp.* menurut Blankehorn (2007) adalah:

Kingdom	: <i>Chromista</i>
Filum	: <i>Ochrophyta</i>
Kelas	: <i>Phaeophyceae</i>
Ordo	: <i>Fucales</i>
Famili	: <i>Sargassaceae</i>
Genus	: <i>Sargassum</i>
Spesies	: <i>Sargassum sp.</i>

2.3.2 Morfologi Alga Coklat (*Sargassum sp.*)

Sargassum sp. merupakan alga yang termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. *Sargassum sp.* memiliki bentuk talus silindris. *Sargassum sp.* memiliki banyak percabangan dan tiap cabang memiliki gelembung udara (*bladder*) yang mempunyai fungsi menopang cabang-cabang talus terapung ke arah permukaan air untuk mendapatkan intensitas cahaya. Warna talus umumnya coklat dan memiliki panjang tiga meter. *Sargassum sp.* tersebar luas di perairan Indonesia, dapat tumbuh di perairan terlindung maupun berombak besar pada habitat berkarang (Kadi dan Atmadja, 1988).



Gambar 2.3 Morfologi alga coklat (*Sargassum sp.*)

(sumber: www.biodiversidadvirtual.org)

2.3.3 Habitat dan Penyebaran

Menurut Romimohtarto dan Juwana (2009), alga coklat berukuran besar, alga ini sangat berkembang di perairan yang dingin karena alga ini adalah khas tumbuh-tumbuhan pantai berbatu. Terdapat beberapa kelompok alga coklat yang hidupnya bersifat epifit yakni menempel pada makroalga lainnya. Terdapat delapan marga alga coklat yang sering ditemukan di Indonesia salah satunya yakni *Sargassum sp.* Di perairan Indonesia tercatat tujuh jenis, yakni: *S. polycystum*, *S. plagiophyllum*, *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, *S. binderi*, *S. echinocarpum*, dan *S. cinereum*.

2.3.4 Antioksidan dalam Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Tubuh memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif melebihi jumlah antioksidan di dalam tubuh, maka kelebihan oksigen reaktif dapat menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan stress oksidatif. Reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui 3 cara sebagai berikut (Winarsi, 2007).

- a. Mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru.
- b. Menginaktivasi atau menangkap radikal bebas dan memotong propagasi (pemutus rantai).
- c. Memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas.

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen, yaitu enzim-enzim yang bersifat antioksidan, seperti: *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase (Cat), dan *glutathione peroksidase* (Gpx), serta antioksidan eksogen yaitu yang didapat dari luar tubuh/makanan (Werdhasari, 2014). Antioksidan eksogen dapat berupa antioksidan sintetik dan antioksidan alami dari tumbuh-tumbuhan.

Rumput laut terutama alga merupakan tanaman yang memiliki berbagai manfaat karena mengandung lemak, mineral dan berbagai vitamin, dan juga beberapa bahan aktifnya memiliki potensi kesehatan untuk melawan kanker, stress oksidatif, inflamasi, alergi, diabetes, trombosis, obesitas, lipidemia, hipertensi dan berbagai penyakit degeneratif (Namvar *et al.*, 2013).

Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) memiliki beberapa kandungan antioksidan, antara lain *sargachromenol* (derivat *tocotrienol* vitamin E), *phlorotannins* (golongan tannin pada metabolisme sekunder senyawa fenolat), dan vitamin C. Selain itu terdapat beberapa zat kimia lain yang terkandung di dalamnya yaitu protein, mangan (Mn), Zinc (Zn), tembaga (Cu). Pada spesies lain, juga dapat ditemukan senyawa flavonoid, sterol, polifenol, dan *sargaquinoic acids* (Yende, 2014; Balboa *et al.*, 2016).

Tabel 2.1 menunjukkan kandungan 148,97 mg *Phlorotannins* dalam 100 gram alga kering, 133,33 mg *Sargachromenol* dalam 100 gram alga kering, dan 33,8-43,8% vitamin C dalam 100 gram alga kering.

Tabel 2.1 Daftar kandungan Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) kering

Kandungan Zat Kimia	Total Kadar (mg/100gr)
<i>Phloroglucinol</i>	5,12
<i>Phlorotannins</i>	148,97
<i>Sargachromenol</i>	133,33
Zat Besi (Fe II)	63,96-86,68
Gallic Acid	74,62-83,28
Total Protein	7-11 (%)
Vitamin C	33,8-43,8 (%)
Mangan (Mn)	47,9-1,21
Zinc (Zn)	1,27- 4,08
Tembaga (Cu)	0,8- 2,3
Total Lemak	1,60-3,20
Total Asam Lemak Tidak Jenuh	42,60-67,90

Sumber: (Balboa *et al.*, 2016, Montero *et al.*, 2016, Namvar *et al.*, 2013).

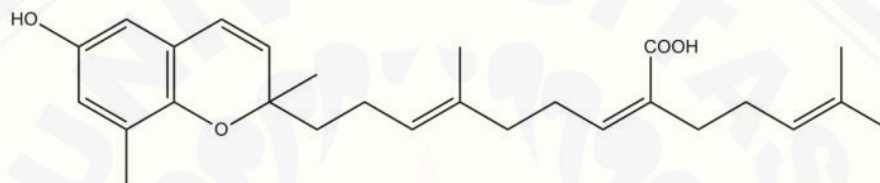
Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif (Werdhasari, 2014). Mekanisme kerja antioksidan yang terdapat pada alga cokelat (*Sargassum sp.*) adalah sebagai berikut.

a. *Sargacromenol* (derivat *tocotrienol* vitamin E)

Chromene (*Benzopyran*) adalah suatu antioksidan yang merupakan sebuah cincin heterosiklik yang terdiri dari cincin benzena yang bergabung dengan cincin *pyran*. Pencegahan pembentukan AGEs melalui reaksi penambahan nukleofilik antara gugus *chromene* dengan gugus aldose atau ketose dalam *3-deoksiglukoson*, Dosis *chromene* sintetik 30 µg/mL mampu menghambat pembentukan AGEs sebesar 50% (Ishii *et al.*, 2000). Salah satu senyawa *chromene* adalah *sargachromenol* yang merupakan derivat *tocotrienol* vitamin E.

Vitamin E berfungsi sebagai antioksidan larut lipid di membran sel, berfungsi dalam mempertahankan fluiditas membran sel. Senyawa ini juga memiliki peran dalam pembentukan sinyal sel. Fungsi utama vitamin E adalah

sebagai antioksidan pemutus rantai yang merangkap radikal-bebas di membran sel dan lipoprotein plasma dengan cara bereaksi dengan radikal peroksida lipid yang dibentuk oleh peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda (Murray *et al.*, 2009). Vitamin E bertindak sebagai donor ion hidrogen dan dapat mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal tokoferil yang kurang reaktif sehingga tidak mampu menyerang rantai asam lemak. Prinsip kerjanya adalah mampu memberikan ion hidrogen, sehingga radikal bebas menjadi molekul yang stabil (Alioes dan Elmatris., 2009).



Gambar 2.4 Struktur kimia *Sargacromenol*

b. Vitamin C

Vitamin C (asam askorbat) adalah agen pereduksi yang dapat mendonorkan dua elektron dari ikatan ganda antara karbon kedua dan ketiga dari molekul 6 karbon. Sebagai donor elektron, vitamin C adalah antioksidan yang larut dalam air. Efek antioksidan vitamin C telah dibuktikan dalam banyak percobaan *in vitro* (Padayatty *et al.*, 2003). Asam askorbat memiliki peran khusus dalam *hidroksilase* yang mengandung tembaga dan *hidroksilase* yang mengandung besi terkait- α -ketoglutarat. Asam ini juga meningkatkan aktivitas beberapa enzim lain secara *in vitro*, walaupun hal ini merupakan aktivitas pengurangan yang tidak spesifik. Selain itu, asam ini memiliki beberapa efek non-enzim akibat aktivitasnya sebagai agen pereduksi dan pemadam radikal oksigen (Murray *et al.*, 2009).

c. *Phlorotannins*

Phlorotannins adalah sekelompok senyawa fenolik dibatasi untuk polimer dari *phloroglucinol*, telah diidentifikasi dari beberapa keluarga alga coklat seperti *Alariaceae*, *Fucaceae* dan *Sargassaceae* (Wang *et al.*, 2009). Banyak penelitian

telah menunjukkan bahwa *phlorotannins* adalah satu-satunya kelompok fenolik terdeteksi di ganggang coklat (Jormalainen dan Honkanen 2004 dan Koivikko *et al.*, 2007). Aktivitas antioksidan multifungsi polifenol sangat terkait dengan cincin fenol yang bertindak sebagai elektron *traps* untuk menangkap peroksi, anion superoksida dan radikal hidroksil. *Phlorotannins* dari ganggang coklat memiliki hingga delapan cincin yang saling berhubungan dan karena itu lebih ampuh pembersih radikal bebas dari polifenol yang berasal dari tanaman terestrial, termasuk katekin teh hijau, yang hanya memiliki tiga ke empat cincin (Sathya *et al.*, 2013).

2.4 Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid yang telah digunakan secara luas sebagai indikator kerusakan oksidatif, terutama dari asam lemak tidak jenuh. MDA adalah senyawa organik dengan rumus kimia $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ (Kshitiz *et al.*, 2015). MDA ditemukan hampir di seluruh cairan biologis termasuk di serum, urin, cairan sendi, cairan empedu, cairan getah bening, cairan amnion, humor akuos, cairan perikardial, dan cairan seminal, namun serum dan urin merupakan sampel yang paling mudah didapat dan paling tidak invasif (Wati, 2013).

MDA merupakan salah satu marker dari ALEs (Negre-Salvayre *et al.*, 2008). MDA sangat cocok sebagai biomarker stres oksidatif karena beberapa alasan yaitu: pembentukan MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang telah tersedia, bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, pengukurannya tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan tidak dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet, merupakan produk spesifik dari peroksidasi lipid (Dalle- Donne *et al* dalam Wati, 2013).

2.5 Kreatinin serum

Kreatinin merupakan metabolisme endogen yakni kreatin dan fosfokreatin. Kreatinin diproduksi dalam jumlah yang sama dan diekskresi melalui urin setiap

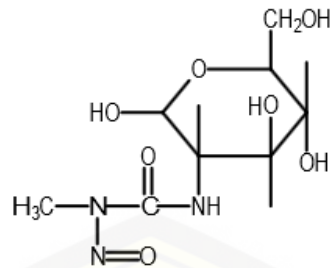
hari. Kreatinin memiliki berat molekul 113-Da (Dalton). Kreatinin difiltrasi di glomerulus dan direabsorpsi di tubular. Kreatinin plasma disintesis di otot skelet sehingga kadarnya bergantung pada massa otot dan berat badan. Nilai normal kadar kreatinin serum pada pria adalah 0,7-1,3 mg/dL sedangkan pada wanita 0,6-1,1 mg/dL. Proses awal biosintesis kreatin berlangsung di ginjal yang melibatkan asam amino arginin dan glisin. Jika terjadi disfungsi renal maka kemampuan filtrasi kreatinin akan berkurang dan kreatinin serum akan meningkat (Alfonso, 2016).

Peningkatan kadar kreatinin serum dua kali lipat mengindikasikan adanya penurunan fungsi ginjal sebesar 50%, demikian juga peningkatan kadar kreatinin serum tiga kali lipat merefleksikan penurunan fungsi ginjal sebesar 75%. Ada beberapa penyebab peningkatan kadar kreatinin dalam darah, yaitu dehidrasi, kelelahan yang berlebihan, penggunaan obat yang bersifat toksik pada ginjal, disfungsi ginjal disertai infeksi, hipertensi yang tidak terkontrol, dan penyakit ginjal (Alfonso, 2016).

2.6 Model Hewan Coba Nefropati Diabetik

2.6.1 Streptozotocin

Bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi DM pada tikus eksperimental yaitu streptozotocin (STZ) aktif (2-deoksi-2[(metilnitrosoamino)-karbonil]amino]-D-glucopyranose) dan buffer sitrat (0,1 M dan pH 4,5). Efek nefropati diabetik ditimbulkan pada 21 hari setelah diinjeksikan (Tesch *et al.*, 2007). Streptozotocin (STZ) merupakan analog dari N-asetilglukosamin (GlcNAc) bersifat toxic spesifik untuk sel beta pankreas. STZ merusak sel islet β pankreas dengan menghambat O-GlcNacase (OGA) sehingga terjadi hyper-O-GlcNacylation dan mengaktifkan jalur stress yang mengarah ke apoptosis (Pathak, *et al.*, 2008).

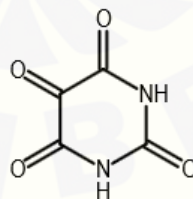


Gambar 2.5 Struktur kimia Streptozotocin (Sumber: Nugroho, 2006)

STZ masuk kedalam sel β pankreas melalui reseptor yang sama dengan glukosa yaitu GLUT-2, hal ini menjelaskan bahwa respon awal STZ adalah menghilangkan respon sel β terhadap glukosa, yang dengan adanya STZ kemungkinan menyebabkan terhalangnya ikatan glukosa dengan GLUT-2. Kemudian terjadi respon umpan balik temporer diikuti oleh kerusakan dan hilangnya respon sel β secara permanen.

2.6.2 Aloksan

Aloksan (*2,4,5,6-tetraoksipirimidin; 5,6-dioksiurasil*) merupakan senyawa hidrofilik dan tidak stabil. Sebagai diabetogenik, aloksan dapat digunakan secara intravena, intraperitoneal dan subkutan. Dosis intravena yang digunakan biasanya 65 mg/kgBB, sedangkan intraperitoneal dan subkutan adalah 2-3 kalinya (Szkudelski, 2001; Rees dan Alcolado, 2005).



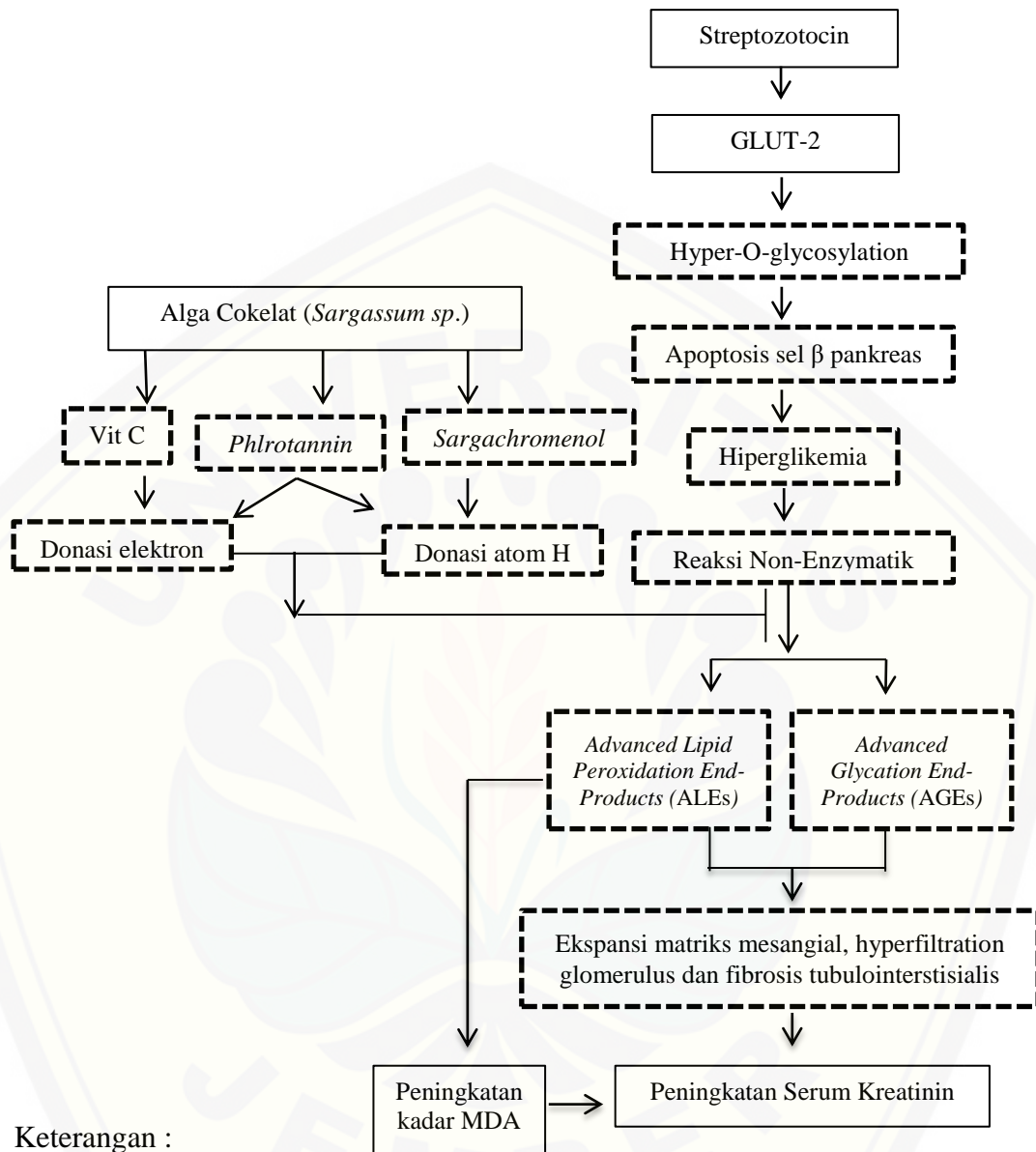
Gambar 2.6 Struktur kimia Alloxan (Sumber: Nugroho, 2006)

Pembentukan oksigen reaktif merupakan faktor utama pada kerusakan sel yang ditimbulkan aloksan. Pembentukan oksigen reaktif diawali dengan proses reduksi aloksan dalam sel β Langerhans. Hasil dari proses reduksi aloksan adalah asam dialurat, yang kemudian mengalami reoksidasi, menentukan siklus redoks

untuk membangkitkan radikal superoksida. Radikal superoksida dapat membebaskan ion ferri dari ferinitin, dan mereduksi menjadi ion ferro. Radikal superoksida mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida, berjalan spontan dan kemungkinan dikatalisis oleh superoksida dismutase. Salah satu target dari oksigen reaktif adalah DNA pulau Langerhans pankreas. Kerusakan DNA tersebut menstimulasi *poly ADP-ribosylation*, proses yang terlibat pada DNA repair. Adanya ion ferro dan hidrogen peroksida membentuk radikal hidroksi yang sangat reaktif melalui reaksi fenton (Nugroho, 2006).

Faktor lain selain pembentukan oksigen reaktif adalah gangguan pada homeostatis kalsium intraseluler. Aloksan dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium bebas sitosolik pada sel β Langerhans pankreas. Efek tersebut diikuti oleh beberapa kejadian seperti influks kalsium dari cairan ekstraseluler, mobilisasi kalsium dari simpanannya secara berlebihan, dan eliminasinya yang terbatas dari sitoplasma. Influks kalsium akibat aloksan tersebut mengkaibatkan depolarisasi sel β Langerhans, lebih lanjut membuka kanal kalsium tergantung voltase dan semakin menambah (Nugroho, 2006).

2.7 Kerangka Teori



Keterangan :

- : Memicu
- | : Menghambat
- : Diteliti
- (dashed) : Tidak Diteliti

Kerangka teori memaparkan injeksi streptozotocin (STZ) pada tikus secara intraperitoneal, STZ mengalir di darah dan masuk sel melalui GLUT-2. Terjadi penghambatan *O-GlcNacase* (OGA) yang menyebabkan *hyper-O-GlcNacylation* dan mengaktifkan jalur stress yang mengarah ke apoptosis. Kerusakan sel β pankreas menyebabkan tidak terproduksinya insulin yang selanjutnya mengarah pada keadaan hiperglikemia, sehingga tikus dapat dikatakan mengalami DM.

Hiperglikemia kronik dapat menyebabkan terjadinya glikasi nonezimatis asam amino dan protein (reaksi *Mallard* dan *Browning*) yang mengarah ke pembentukan *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) dan *Advanced Lipid Peroxidation End-Products* (ALEs). Salah satu marker untuk mengetahui tingginya peroksidasi lipid yang mengarah ke pembentukan ALEs dapat melalui kadar MDA serum darah. Pembentukan AGEs dan ALEs mengakibatkan terjadinya ekspansi mesangium, hiperfiltrasi glomerulus, dan atau fibrosis tubulointerstitial. Salah satu akibat dari kerusakan glomerulus ginjal adalah penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG). Akibat dari penurunan LFG adalah terjadinya peningkatan kreatinin serum.

Alga cokelat *Sargassum sp.* memiliki beberapa kandungan antioksidan, antara lain *sargachromenol* (derivat *tocotrienol* vitamin E), *phlorotannins* (golongan tannin pada metabolisme sekunder senyawa fenolat), dan vitamin C. *Sargachromenol* berfungsi sebagai antioksidan dengan mendonorkan atom H sehingga menghambat pembentukan AGEs. Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan dengan mendonorkan elektron, *phlorotannins* berfungsi sebagai donor elektron dan atom H sehingga mencegah senyawa lain untuk dioksidasi.

2.8 Hipotesis

Pada penelitian efektivitas ekstrak metanol alga cokelat terhadap malondialdehid dan kreatinin serum sebagai prevensi nefropati diabetik, peneliti memiliki hipotesis sebagai berikut.

- a. Ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) efektif menghambat peningkatan kadar Malondialdehid (MDA) serum tikus wistar (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik yang dapat dilihat dari dosis efektif maksimum.
- b. Ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) efektif menghambat peningkatan kadar kreatinin serum tikus wistar (*Rattus novergicus strain Wistar*) model nefropati diabetik yang dapat dilihat dari dosis efektif maksimum.

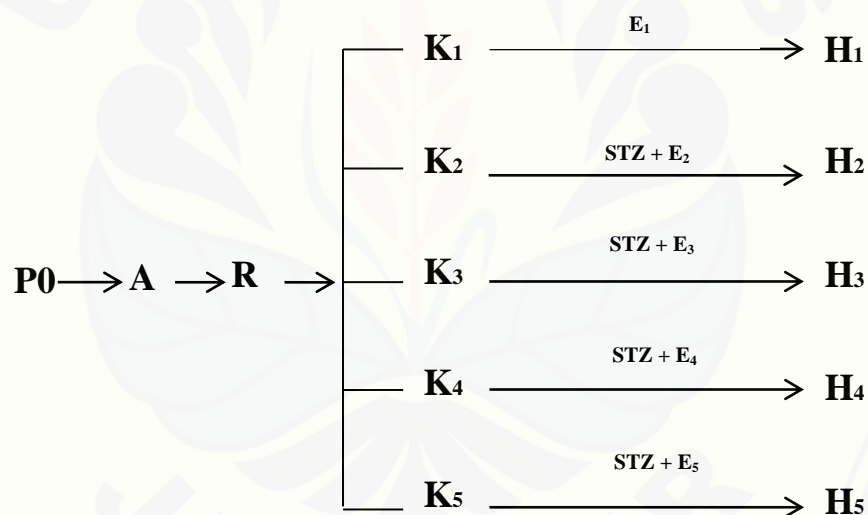
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *quasi experimental* secara *in vivo* dengan rancangan *posttest only control group design* yang merupakan penelitian tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*), namun hanya dilakukan pengukuran akhir (*posttest*).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *posttest only control group design*. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1



- P0 : populasi dari hewan coba
- A : Adaptasi hewan coba selama 7 hari
- R : proses randomisasi
- K₁ : Kelompok kontrol
- K₂ : Kelompok kontrol negatif
- K₃ : Kelompok perlakuan 1
- K₄ : Kelompok perlakuan 2
- K₅ : Kelompok perlakuan 3
- STZ : Induksi Streptozotocin dosis 55 mg/kgBB intraperitoneal pada hari ke-7
- E₁ : Pemberian Na-CMC 0,5% pada hari ke-14 selama 14 hari
- E₂ : Pemberian Na-CMC 0,5% pada hari ke-14 selama 14 hari

- E₃ : Pemberian ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) 150 mg/kgBB dalam pelarut Na-CMC 0,5% pada hari ke-14 selama 14 hari
- E₄ : Pemberian ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum sp.*) 300 mg/kgBB dalam pelarut Na-CMC 0,5% pada hari ke-14 selama 14 hari
- E₅ : Pemberian ekstrak alga cokelat (*Sargassum sp.*) 450 mg/kgBB dalam pelarut Na-CMC 0,5% pada hari ke-14 selama 14 hari
- H₁ : Kadar MDA serum dan kreatinin serum K1
- H₂ : Kadar MDA serum dan kreatinin serum K2
- H₃ : Kadar MDA serum dan kreatinin serum K3
- H₄ : Kadar MDA serum dan kreatinin serum K4
- H₅ : Kadar MDA serum dan kreatinin serum K5

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) yang diperoleh dari peternak tikus di Malang.

3.3.2 Sampel penelitian

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan membuat homogen sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah sebagai berikut.

- Tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain Wistar*)
- Berumur 2-3 bulan
- Berat badan 150-200 gram
- Sehat, bergerak aktif dan tidak ada kelainan anatomi.

Kriteria eksklusi ialah tikus putih yang selama penelitian tidak mau makan, diare yang ditandai feses tidak terbentuk dan mati.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Jumlah perlakuan pada penelitian ini ialah sebanyak dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan berdasarkan dosis pemberian ekstrak alga cokelat (*Sargassum sp.*). Pengulangan dilakukan pada tiap kelompok untuk mencegah

adanya bias. Penghitungan besarnya pengulangan menggunakan rumus sebagai berikut.

$(n-1)(p-1) \geq 15$ (p = jumlah kelompok uji, n = jumlah sampel, $p=5$), sehingga :

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

p : jumlah kelompok

n : jumlah sampel dalam kelompok

Menurut perhitungan dengan menggunakan rumus *Federer*, besar sampel yang dibutuhkan minimal adalah 6 untuk masing-masing kelompok. Dalam 5 kelompok dalam penelitian ini akan ada 6 ekor tikus sehingga jumlah sampel yang diambil sebanyak 30 ekor.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk perawatan tikus, induksi Streptozotocin, penyondean ekstrak Alga Cokelat dan pembedahan tikus. Pembuatan ekstrak dilakukan di *Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)* Universitas Jember. Pemeriksaan MDA serum dan Kreatinin Serum dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2016.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak alga cokelat. Pemberian dosis dibedakan menjadi tiga yakni 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 450 mg/kgBB.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA serum dan kadar kreatinin serum tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*).

3.5.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Jenis kelamin jantan dan galur hewan coba yaitu *Rattus novergicus strain Wistar*.
- b. Berat badan tikus 150-200 gram.
- c. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
- d. Dosis dan frekuensi Streptozotocin.
- e. Frekuensi pemberian ekstrak alga cokelat.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Ekstrak Metanol Alga Cokelat (*Sargassum* sp.)

Alga cokelat yang digunakan didapatkan dari pantai Pulau Merah, Banyuwangi, Jawa Timur yang diidentifikasi sebagai *Sargassum* sp. dengan mencocokkan morfologi sampel dengan *American Journal of Botany* (Fensholt., 1955) dapat dilihat pada lampiran 3.1. Ekstrak metanol alga cokelat (*Sargassum* sp.) adalah hasil ekstraksi alga cokelat dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 80%, untuk mendapatkan isolat *sargachromenol* (Seo *et al.*, 2007) dan *phlorotannin* (Sathya *et al.*, 2013). Metanol juga dipilih berdasarkan penelitian Sujatha *et al.*, (2015) yang meneliti antioksidan *phlorotannin* dalam ekstrak metanol *Sargassum wighhtii* terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus dan manusia. Metode maserasi merupakan metode sederhana yang dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam pelarut sehingga zat aktif yang terkandung dalam tumbuhan tersebut akan larut hingga didapatkan reaksi keseimbangan. Dosis ekstrak alga cokelat yang diberikan kepada hewan coba adalah 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, 450 mg/kgBB tikus.

3.6.2 Malondialdehid (MDA) Serum Tikus

MDA serum adalah produk akhir peroksidasi lipid yang telah digunakan secara luas sebagai indikator kerusakan oksidatif, terutama dari asam lemak tidak jenuh. MDA diukur dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) yakni melalui dengan dasar reaksi MDA dengan *tiobarbituric acid* (TBA) atau asam *tiobarbiturat* yang membentuk senyawa berwarna MDA-TBA dan mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 532- 535 nm. Senyawa berwarna tersebut dapat diukur konsentrasinya berdasarkan absorbansi warna yang terbentuk, dengan membandingkannya pada absorbansi warna larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. MDA dinyatakan dalam nmol/mL.

3.6.3 Kreatinin Serum Tikus

Serum Kreatinin adalah hasil dehidrasi kreatin otot dan merupakan produk sisa kreatin. Kreatinin difiltrasi oleh glomerulus ginjal dan tidak direabsorpsi oleh tubulus pada kondisi normal. Kreatinin serum memberikan gambaran filtrasi glomerulus pada tikus model diabetes yang diinduksi STZ dengan dosis 55 mg/KgBB. Pengukuran serum kreatinin dilakukan dengan metode *Jaffe Reaction*. Kadar normal kreatinin serum tikus adalah 0,2-0,8 mg/dL (Wientarsih *et al* (2012).

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus wistar adalah bak plastik, kawat penutup, botol minum, tempat makan, label, dan timbangan.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak alga cokelat adalah ayakan, blender, penyaring, kertas saring *whatman* no 40, metanol 80%, *rotatory evaporator* dan neraca ohaus.
- c. Alat untuk menyonde ekstrak alga cokelat adalah spuit sonde.

- d. Alat untuk menginduksi STZ adalah spuit 1 cc, *stirrer plate*, *beaker glass*, neraca ohaus.
- e. Alat untuk pengambilan serum tikus yakni spuit 3 cc, eppendorf, sentrifuge, mikropipet.
- f. Alat untuk mengukur kadar gula darah yaitu *glucotest* merk *easy touch* dan scapel.
- g. Alat untuk pemeriksaan MDA serum tikus yakni kulkas, mikropipet, *waterbath*, vortex dan spektrofotometer.
- h. Alat untuk pemeriksaan kreatinin serum yakni spektrofotometer, tabung reaksi, eppendorf, mikropipet, mikrotip.

3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut.

- a. Bahan penelitian adalah tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) jantan dengan berat 150-200 gram.
- b. Bahan untuk pemeliharaan tikus putih adalah pakan standar turbo 521, minuman dan sekam.
- c. Bahan untuk pembuatan ekstrak alga cokelat adalah alga yang dikeringkan dalam suhu ruangan dan metanol 80%.
- d. Bahan yang digunakan untuk induksi diabetes adalah streptozotocin (STZ) dan *buffer citrate* 0,1 M pH 4,5.
- e. Bahan untuk induksi adalah Na-CMC 0,5% dan ekstrak alga cokelat.
- f. Bahan untuk pemeriksaan MDA serum tikus adalah serum darah tikus, *tiobarbituric acid* (TBA) dan asam *trichloroethanoic* (TCA) 10%.
- g. Bahan untuk pemeriksaan serum kreatinin adalah serum darah tikus, sodium hidroksida 0,16 mol/L, asam pikrat 4,0 mol/L dan kreatinin standar.
- h. Bahan untuk terminasi tikus adalah kloroform.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Hewan Coba

Jumlah hewan coba adalah 25 ekor tikus wistar jantan dibagi menjadi 5 kelompok. Pemilihan hewan coba yang dijadikan sampel tiap kelompok perlakuan harus sesuai kriteria inklusi dari penelitian. Hewan coba diadaptasikan dalam kandang selama satu minggu untuk menghindari stres. Alas kandang, tempat pakan dan minum, sisa pakan dan kotoran tikus setiap hari dibersihkan untuk menghindari timbulnya penyakit. Tikus diberi makanan standar turbo 521 dan air *ad libitum*.

3.8.2 Pembuatan Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

Bahan yang digunakan adalah alga cokelat yang didapatkan dari Pantai Pulau Merah, Banyuwangi, Jawa Timur. Alga cokelat basah seberat 11 kg dicuci sampai bersih, lalu dikeringkan di tempat teduh (tidak terpapar sinar matahari langsung). Alga cokelat kering dipotong kecil-kecil kemudian dihancurkan hingga menjadi serbuk. Serbuk Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) dimaserasi menggunakan metanol 80% dengan perbandingan 1:5, kemudian didiamkan selama 3 hari namun tetap diaduk setiap hari. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas *whatman* no 40. Maserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Hasil saringan kemudian dievaporasi menggunakan *rotatory vacuum evaporator* di CDAST Universitas Jember sampai diperoleh ekstrak kental yang memiliki tekstur seperti pasta.

3.8.3 Penginduksian Streptozotocin

Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam, kemudian diinjeksi Streptozotocin (STZ) yang telah dilarutkan kedalam *buffer* sitrat 0,1M pH 4,5, dalam waktu kurang dari 20 menit larutan harus segera diinjeksikan. STZ diinduksi dengan dosis 55 mg/kgBB (Awad *et al.*, 2007) secara intraperitoneal. Setelah diinduksi tikus segera diberi dextrose 5% melalui sonde sebanyak 1 cc dan botol diberikan larutan D5 selama 48 jam dan setelahnya dapat diganti dengan air minum biasa, hal tersebut untuk mencegah hipoglikemia pada tikus yang

disebabkan oleh peningkatan drastis pengeluaran insulin. Waktu yang dibutuhkan STZ untuk menimbulkan nefropati diabetik pada tikus adalah 3 minggu (Tesch and Allen, 2007). Perhitungan dosis STZ dapat dilihat pada lampiran 3.2

3.8.4 Pengukuran Glukosa Darah Puasa

Pengukuran glukosa darah puasa (GDP) dilaksanakan dengan menggunakan *glucose test* merek *Easy Touch* kepada tikus yang sebelumnya telah dipuasakan selama 8 jam dengan cara mengambil sekam, makanan serta botol minum. Darah diambil melalui vena ekor. Pengukuran dilakukan sebelum induksi STZ dan tujuh hari setelah induksi STZ. Tikus yang memiliki gula darah puasa diatas 140 mg/dL dapat dikategorikan diabetes dan selanjutnya dapat diberikan ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) untuk menilai efeknya terhadap nefropati diabetik yang akan ditimbulkan.

3.8.5 Dosis Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

Mengacu pada hasil penelitian *Firdaus et al.* (2010) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak *Sargassum echinocarpum* pada dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 450 mg/kgBB pada tikus wistar yang diinduksi STZ menunjukkan efek perbaikan stress oksidatif dan perbaikan pada disfungsi endotel dan ditunjang dengan mengacu pada dosis metformin yaitu 250 mg/kgBB (Motshakeri *et al.*, 2014), sehingga dipilih rentang dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 450mg/kgBB. Perhitungan dosis ekstrak dan dosis konversi pada manusia dapat dilihat pada lampiran 3.3 dan lampiran 3.4

3.8.6 Pemberian Ekstrak Alga Cokelat

Ekstrak diberikan tujuh hari setelah tikus diinduksi STZ dan dinyatakan hiperglikemia dengan GDP \geq 140 mg/dL (Zulkarnain., 2013). Ekstrak diberikan selama 14 hari per-oral menggunakan Na-CMC 0,5%. Dalam waktu 21 hari setelah induksi STZ, baru akan terjadi efek kerusakan pada ginjal (Tesch *et al.*, 2007), sehingga untuk mengetahui efek pencegahan diberikan sebelum komplikasi tersebut terjadi yakni selama 14 hari setelah terjadi hiperglikemia.

3.8.7 Perlakuan Hewan Coba

Sejumlah 25 ekor tikus ditempatkan di dalam kandang diberi makanan standar dan minuman. Tikus diadaptasikan 1 minggu, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri atas 5 tikus yang dipilih secara acak. Pada hari perlakuan, seluruh hewan coba ditimbang berat badannya dan diberi tanda pengenal pada ekor. Tikus-tikus dibuat hiperglikemia lalu diberi perlakuan selama 14 hari dengan pembagian pada tabel 3.1 sebagai berikut.

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok	Bentuk Perlakuan
K1	Pemberian Na-CMC 0,5%
K2	Pemberian STZ + Na-CMC 0,5%
K3	Pemberian STZ + ekstrak dosis 150 mg/kgBB
K4	Pemberian STZ + ekstrak dosis 300 mg/kgBB
K5	Pemberian STZ + ekstrak dosis 450 mg/kgBB

3.8.8 Pengambilan Serum Darah

Pengambilan darah tikus dilakukan melalui jantung sebanyak 3 mL, kemudian ditampung pada tabung eppendorf. Darah dalam tabung didiamkan selama 15 menit kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga didapatkan serum darah.

3.8.9 Pemeriksaan MDA Serum Tikus Wistar

Pemeriksaan MDA menggunakan metode TBARS. Serum diambil sebanyak 100 uL, kemudian ditambahkan reagen TCA dingin sebanyak 200 uL. Serum dan TCA yang telah tercampur diinkubasi dalam kulkas selama 5 menit kemudian disentrifuse selama 5 menit pada 14000 rpm. Diambil bagian supernatan sebanyak 200 uL, kemudian ditambahkan 200 uL TBA dan selanjutnya reagent lalu divortex. Serum dan TBA yang sudah berubah warna menjadi merah muda kemudian diinkubasi selama 60 menit dengan suhu 100 °C.

Dinginkan dalam suhu ruangan kemudian vortex kembali. Baca dalam intensitas *fluorescence* dengan gelombang 532 nm.

3.8.10 Pemeriksaan Serum Kreatinin

Pengukuran dilakukan menggunakan metode *Jaffe Reaction*. Reagen yang digunakan adalah larutan pereaksi kreatinin Dissays yang terdiri atas :

Reagen 1 : Natrium Hidroksida 0,16 mol/L

Reagen 2 : Asam pikrat 4,0 mol/L

Serum dipipet sebanyak 25 uL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampurkan dengan 500 uL larutan *working reagen* yaitu campuran 4 bagian reagen 1 (natrium hidroksida 0,16 mol/L) dan 1 bagian reagen 2 (asam pikrat 4,0 mol/L) lalu dihomogenkan. Pengukuran dilakukan menggunakan alat photometer pada panjang gelombang 500 nm sehingga didapatkan kadar kreatinin serum dalam mg/dL.

3.9 Analisis Data

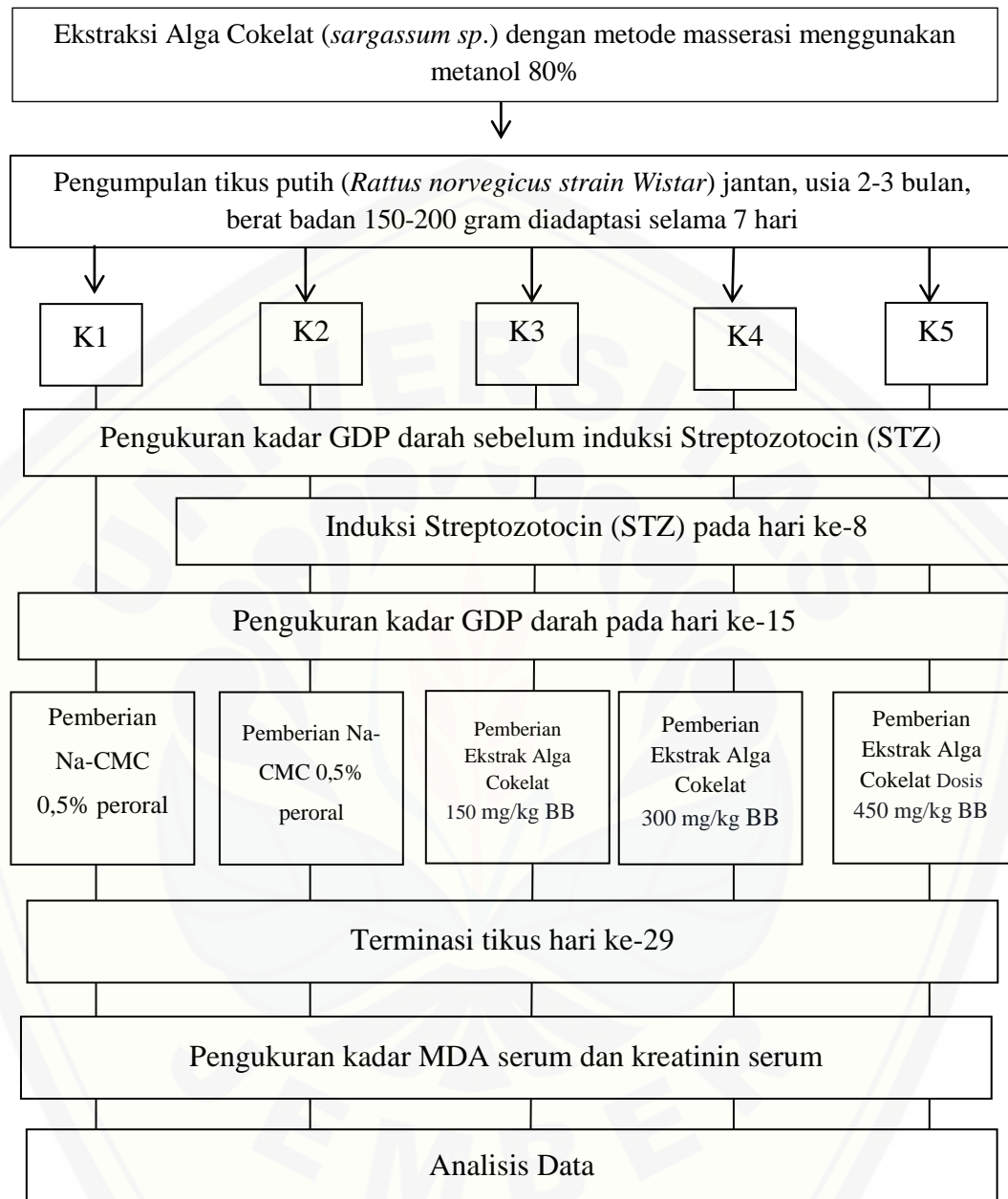
Analisis data secara statistik pada penelitian ini menggunakan statistik parametrik. Statistik parametrik dipilih karena data yang diperoleh berupa data numerik yaitu kadar MDA serum dan kadar kreatinin serum. Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas varian dengan $p > 0,05$. Data yang didapatkan terdistribusi normal dan varian datanya homogen, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ($p < 0,5$) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol normal dengan kontrol negatif. Uji *Paired-Sample T-test* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara glukosa darah puasa pada tikus sebelum diinduksi STZ dan setelah diinduksi STZ. Uji regresi digunakan untuk mencari dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat terhadap kadar MDA dan kreatinin serum, pada *curve estimation* didapatkan grafik *quadratic* memiliki nilai R^2 tertinggi, sehingga dalam mencari dosis efektif maksimum menggunakan grafik *quadratic*.

3.10 Uji Kelayakan Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada tanggal 5 April 2016 (Lampiran 3.5) dengan saran sebagai berikut.

- a. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- b. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak metanol alga cokelat agar didapatkan kadar yang sesuai.
- c. Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas pada pemeriksaan kreatinin dan MDA.
- d. Mohon diperhatikan pembuangan limbah biologis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

- a. Dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat terhadap kadar MDA serum sebagai prevensi gangguan fungsi ginjal pada tikus model nefropati diabetik yakni 433 mg/kgBB.
- b. Dosis efektif maksimum ekstrak metanol alga cokelat terhadap kadar kreatinin serum sebagai prevensi gangguan fungsi ginjal pada tikus model nefropati diabetik yakni 283 mg/kgBB.

5.2 Saran

Saran yang diberikan peneliti berdasarkan penelitian ini yakni sebagai berikut.

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah dosis yang lebih banyak dan dosis yang lebih rendah dari 150 mg/kgBB agar diketahui dosis yang paling efektif dari ekstrak alga cokelat (*Sargassum sp.*).
- b. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dari dosis efektif maksimum ekstrak alga cokelat dengan senyawa aktif yang sudah banyak digunakan.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolat aktif dari alga cokelat (*Sargassum sp.*) sehingga dapat diketahui efeknya secara lebih jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, Feroza N., Naqvi, Farzana N. dan Shafiq, Fakhra. 2006. *Lipid Peroxidation and Serum Antioxidant Enzymes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*. Department of Genetics, University of Karachi, Pakistan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151323> [Diakses pada tanggal 5 Oktober 2016].
- Alfarisi, S., Basuki, W. dan Susantiningsih, T. 2013. Perbedaan kadar kreatinin serum pasien diabetes melitus tipe-2 yang terkontrol dengan yang tidak terkontrol di RSUD dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung tahun 2012. *Majority*, 2(5): 129-36.
- Alfonso, Astrid A., Mongan, Arthur E. dan F, Maya. 2016. Gambaran kadar kreatinin serum pada pasien penyakit ginjal kronik stadium 5 non dialisis. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 4(1).
- Alioes, Yustini dan Elmatris Sy. 2009. Efek pemberian vitamin E terhadap jumlah erytrosit dan aktivitas enzim katalase tikus akibat paparan sinar ultraviolet. *Majalah Kedokteran Andalas*. 33(2): 127-133.
- Aulannia'am, Roosdiana, A. dan Rahmah, N.L. 2011. Potensi fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) terhadap penurunan kadar malondialdehid dan perbaikan gambaran histologis jejunum usus halus tikus IBD (Inflammatory Bowel Disease)". *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan*. 4 (1): 57-64.
- Awad, Allah R S., Dkhil, M A. dan Danfour, M A. 2007. Structural alterations of the glomerular wall and vessels in early stages of diabetes mellitus (light and transmission electron microscopic study). *Libyan J Med*. 2(3): 135-138.
- Balboa, E. M., C. Gallego-Fabrega, A., A. Moure, dan Dominguez. 2016. Study of seasonal variation on proximate composition of oven-dried *Sargassum muticum* biomass collected in Vigo Ria, Spain. *Journal of Applied Phycology*. 28(3): 1943-1953.
- Bast, Aalt., R.M.M, Guido., Haenen. 2002. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 11: 251-258.
- Blakehorn, S.U. 2007. *Seaweed Farming and Artisanal Fisheries in an Indonesian Seagrass Bed Complementary or Competitive Usages*. Bremen University.
- De Boer, Ian. 2014. Epidemiology of nephropathy. *Diapedia no. 19*. <http://dx.doi.org/10.14496/dia.71040851186.19>. [Diakses pada 3 Oktober 2016].

- Feldt-Rasmussen, Bo. 2003. Screening and diagnosis of diabetic nephropathy. *Diabetes Voice*. 48: 12-14.
- Fidianingsih, Ika. 2011. Pengaruh suspensi bubuk kedelai kuning terhadap struktur histologik ginjal tikus diabetik diinduksi Streptozotocin. *Mutiara Medika*.11(2): 79-87.
- Firdaus, Muhamad., Astawan, Made., Muchtadi, Deddy., Wresdiyati, Tutik., Waspadji, Sarwono. dan Karyono, Setyawati S. 2010. Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by *Sargassum echinocarpum* extract. *Medical Journal Indonesia*.. 19:32-5.
- Fukami, Kei., Yamagishi, Sho-ichi., Ueda, Seiji dan Okuda, Seiya.2008. Role of AGEs in Diabetic Nephropathy. *Current Pharmaceutical Design*.14: 946-952.
- Goldin, Alison., Beckman, Joshua A., Schmidt, Ann Marie., Creager. dan Mark A. 2006. *Advanced Glycation End Products sparking the development of diabetic vascular injury*. <http://circ.ahajournals.org/content/114/6/597.full> [Diakses pada 6 Desember 2015]
- Guyton, A.C. dan Hall, J.E. 2012. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 11*. Alih bahasa oleh Irawati. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Indranila KS, Murnah. 2014. Effect of ethanol noni (*Morinda citrifolia L*) extract on diabetic nepropathy spraque dawley rats induced streptozotocin (STZ). *JNH*. 2(1)
- Ishii, F., Haruyoshi, H., Fujiko, K., Tomomi, O., Terumitsu, K., Yoshihiro, N., Susumu, S. dan Hideaki, M. 2000. *The Pharmacologic Effect of Chromene and Thereof Salt*. <http://www.freepatentsonline.com/6124347.html> [Diakses pada tanggal 6 September 2015].
- Jormalainen, V dan Honkanen, T. 2004. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J. Evol. Biol.* 17 (4) pp. 807–820
- Kadi, A dan Atmadja WS. 1988. *Rumput Laut Jenis Algae. Reproduksi, Produksi, Budidaya dan Pasca Panen*. Proyek Studi Potensi Sumberdaya Alam Indonesia. Jakarta: Pusat penelitian dan Pengembangan Oseanologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 101 hlm
- Koivikko R., Lopenen, J., Pihlaja, K. dan Jormalainen, V. 2007. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*”. *Phytochem. Anal.* 18 (4): 326–332.

- Kshitiz, K. K., Varun, Sanjay K., Ranjan, A. dan Kesari, J.R. 2015. Study of serum malondialdehyde and vitamin C status in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 3(4) : 20-25.
- Liesivuori, Jyrki. dan Savolainen, Heikki. 1991. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *BCPT*. 69(3). 157-163.
- Motshakeri, Mahsa., Ebrahimi, Mahdi., Goh, Yong Meng., Othman, Hemn Hassan., Hair-Bejo, Mohd. dan Mohamed, Suhaila. 2014. Effects of brown seaweed (*Sargassum polycystum*) extracts on kidney, liver, and pancreas of type 2 diabetic rat model. *HINDAWI*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/379407/> [Diakses pada tanggal 5 Oktober 2016].
- Montero., A. P. Sanchez-Camargo., V. Garcia-Canas., A. Tanniou., V. Stiger-Pouvreau., M. Russo., L. Rastrelli., A. Cifuentes., M. Herrero. dan E. Ibanez. 2016. Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography*. 1428: 115-125.
- Muliartha, I Ketut Gede., Sriwahyuni, Endang. dan Yuliawati. 2009. Pemberian kombinasi vitamin C dan E peroral memperbaiki kerusakan hepar akibat paparan rokok kretek sub kronik". *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25(1): 23-27.
- Namvar, Farideh., Mohamad, Rosfarizan., Baharara, Javad., Zafar-Balanejad, Saeedeh., Fargahi, Fahimeh. dan Rahman, Heshu Sulaiman. 2013. Antioxidant, Antiproliferative, and Antiangiogenesis Effects of Polyphenol-Rich Seaweed (*Sargassum muticum*). *BioMed Research International*. 2013:1-9.
- Nawaly, Hermanus., Susanto, A.B. dan Uktolseja, Jacob L.A. 2013. *Aplikasi Antioksidan Rumput Laut*. Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sebelas Maret.
- Nerge-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau. dan Salvayre, R. 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153: 6-20.
- Nugroho, Agung Endro. 2006. Hewan percobaan diabetes mellitus : patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *BIODIVERSITAS*. 7(4) : 378-382.
- Padayatty, SJ., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, JH., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta SK. dan Levine, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant:

- evaluation of its role in disease prevention. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569111> [Diakses tanggal 11 Oktober 2016].
- Pathak, Shalini., Dorfmüller, Helge C., Borodkin, Vladimir S. dan Aalten, Daan M.F. 2008. "Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death" <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2568864/> [Diakses pada 5 Oktober 2016].
- Pardede, Sudung O. 2008. Nefropati diabetik pada anak. *Sari Pediatri*. 10(1): 8-11.
- Perkumpulan Nefrologi Indonesia (PERNEFRI). 2014. Indonesia Renal Registry (IRR). *7th Report Of Indonesian Renal Registry*.
- Price, Sylvia A. dan Wilson, Lorraine M. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit, Edisi 6*. Alih bahasa oleh Hartanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Prisyanto, Roni., Santoso, Didik R., Juswono, Unggul P. Dan Cahyati, Yeni. 2014. Pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap jumlah hemoglobin, leukosit dan trombosit pasca iradiasi sinar gamma. *NATURAL B*. 2 (3).
- Rees, D, A dan Alcolado, J. C. 2005. Animal Models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 22: 359-370.
- Romimohtarto, K. dan S. Juwana. 2009. *Biologi Laut: Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*. Djambatan. Jakarta.
- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P. Dan Jeeva, S.2013. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arabian Journal Of Chemistry*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213003377#b0050> diakses pada tanggal 11 Oktober 2016.
- Sujatha, D., Singh, Kiranpal., Vohra, Mursalin., Kumar, K. Vijay dan Sunitha, S. 2015. Antilithiatic Activity of phlorotannin rich extract of *Sargassum Wightii* on Calcium Oxalate Urolithiasis – In Vitro and In Vivo Evaluation. *Int Braz J Urol*. 41(3): 511-520.
- Seo, Youngwan., Park, Ki Eui., Nam, Taek Jeong. 2007. Isolation of a new chromene from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*. *Bull. Korean Chem. Soc*. 28(10): 1831-1833.

- Sherwood, Lauralee. 2013. *Fisiologi Manusia : dari Sel ke Sistem*, Edisi 6. Alih bahasa oleh Brahm U. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sudoyo, Aru W., Setiyohadi B., Alwi I., K, Marcellus S. dan Setiati S. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Interna Publishing.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiology Research*. 50: 536-54.
- Tesch, Greg H. dan Allen, Terri J. 2007. Methods in renal research : rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Journal compilation Asian Pacific Society of Nephrology*. 12: 261–26.
- Wang, L., Xu, Z. R., Jia, X. Y., Jiang, J. F. dan Han, X. Y. 2006. Effects of arsenic (As^{III}) on lipid peroxidation, glutathione content and antioxidant enzymes in growing pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(5) : 727-733.
- Wang, Tao., Jonsdottir, Rosa. dan Olafsdottir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116: 240-248.
- Wati, Ni Made Lienderi. 2013. Kadar Malondyaldehye Pasien dengan Diabetes Melitus Lebih Tinggi daripada Tanpa Diabetes Melitus pada Katarak Senilis Imatur. *Tesis*. Denpasar: Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Udayana.
- Werdhasari, Asri. 2014. Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biotek Medisian*. 3(2): 59-68.
- Winarsi, H. 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kasinus.
- Yang, Eun Jin., Ham, Young Min., Yang, Kyong-Wol., Lee, Nam Ho. dan Hyun, Chang-Gu. 2013. Sargachromenol from *Sargassum micracanthum* inhibits the lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *The Scientific World Journal*. 2013: 1-6
- Yende, S.R., U. N. Harle. dan B. B. Chaugule. 2014. Therapeutic potential and health benefit of sargassum species. *Phcog Rev*. 8(15): 1-7.
- Zaki, Ibnu., Johan, Andrew. dan W, Suci Nyoman. 2015. Pengaruh pemberian jus mangga terhadap profil lipid dan malondialdehyde pada tikus yang diberi minyak jelantah”. *Jurnal Gizi Indonesia*. 3 (2): 108-115.
- Zulkarnain. 2013. Perubahan kadar glukosa darah puasa pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi streptozotocin dosis rendah. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 13 (2): 71-76.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Morfologi Alga Cokelat



Morfologi alga cokelat (Fensholt, 1955)



Alga Cokelat di Pantai Pulau Merah, Banyuwangi

Lampiran 3.2 Perhitungan dan Pemberian Dosis Streptozotocin (STZ)

Dosis STZ untuk 1 ekor tikus dengan BB 180 gram

55 mg / kgBB x 180 gram

$$\text{Dosis STZ} = \frac{180 \text{ gram} \times 55 \text{ mg/kgBB}}{1000 \text{ gram/kg}} = 9,9 \text{ mg/ ekor, } 20 \text{ ekor} = 198 \text{ mg}$$

Konsentrasi STZ dalam sodium citrate buffer = 22,5 mg/mL

$$\text{Dosis STZ dalam sodium citrate buffer} = \frac{9,9 \text{ mg}}{22,5 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml buffer} = 0,44 \text{ ml/ekor}$$

Volume sodium citrate buffer untuk 20 ekor = 20 x 0,44 mL = 8,8 mL

Lampiran 3.3 Perhitungan dan Pemberian Dosis Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

Perhitungan Dosis Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

Berat Badan (BB) tikus rata-rata = 180 gram

1. Dosis Ekstrak 150mg/kgBB

$$\frac{150 \text{ mg/kgBB} \times 180 \text{ gram}}{1000 \text{ gram/kg}} \times 5 \text{ hari} \times 14 \text{ hari} = 1,89 \text{ gram}$$

2. Dosis Ekstrak 300 mg/kgBB

$$\frac{300 \text{ mg/kgBB} \times 180 \text{ gram}}{1000 \text{ gram/kg}} \times 5 \text{ hari} \times 14 \text{ hari} = 3,78 \text{ gram}$$

3. Dosis Ekstrak 450 mg/kgBB

$$\frac{450 \text{ mg/kgBB} \times 180 \text{ gram}}{1000 \text{ gram/kg}} \times 5 \text{ hari} \times 14 \text{ hari} = 5,67 \text{ gram}$$

Total kebutuhan ekstrak selama 14 hari yakni $1,89 + 3,78 + 5,67 = 11,34$ gram

4. Pembuatan Pelarut Na-CMC 0,5 %

Pelarut dibuat dengan mencampurkan 12,5 gram serbuk Na-CMC kedalam 100 mL larutan akuades panas. Dosis ekstrak setiap ekor tikus dilarutkan dalam 1 mL Na-CMC 0,5 % dan diberikan secara peroral selama 14 hari.

Lampiran 3.4 Tabel Dosis Konversi Ekstrak dari Tikus ke Manusia

Dicari Diketahui	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,76	0,16	0,32	1,0

Sumber : Laurence dan Bacharach (1964)

1. Dosis ekstrak 150 mg/kgBB

Faktor konversi tikus 200g ke manusia 70 kg = 56

Dosis ekstrak pada tikus 200g = 0,2 kg x 150 mg/kgBB = 30 mg

Dosis pada manusia 70 kg = dosis ekstrak pada tikus 200 g x faktor konversi

$30 \text{ mg} \times 56 = 1680 = 1,68 \text{ g}$

Rata-rata berat badan tikus = 180 g

$\frac{180 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 1,68 \text{ g} = 1,512 \text{ g per manusia 70 kg}$

200 g

2. Dosis ekstrak 300 mg/kgBB

Faktor konversi tikus 200g ke manusia 70 kg = 56

Dosis ekstrak pada tikus 200g = 0,2 kg x 300 mg/kgBB = 60 mg

Dosis pada manusia 70 kg = dosis ekstrak pada tikus 200 g x faktor konversi

$60 \text{ mg} \times 56 = 3360 = 3,36 \text{ g}$

Rata-rata berat badan tikus = 180 g

$\frac{180 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 3,36 \text{ g} = 3,024 \text{ g per manusia 70 kg}$

3. Dosis ekstrak 450 mg/kgBB

Faktor konversi tikus 200g ke manusia 70 kg = 56

Dosis ekstrak pada tikus 200g = 0,2 kg x 450 mg/kgBB = 90 mg

Dosis pada manusia 70 kg = dosis ekstrak pada tikus 200 g x faktor konversi

$90 \text{ mg} \times 56 = 5040 = 5,04 \text{ g}$

Rata-rata berat badan tikus = 180 g

$\frac{180 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 5,04 \text{ g} = 4,536 \text{ g per manusia 70 kg}$

Lampiran 3.5 Keterangan Persetujuan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 729 /H25.1.11/KE/2016

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 :

“ARMI AGEs” : PEMANFAATAN DERIVAT CHROMENE DALAM EKSTRAK ALGA COKLAT (*Sargassum micracanthum*) SEBAGAI INHIBITOR *Advanced Glycation End-Products (AGEs)* DALAM UPAYA PREVENSI NEFROPATI DIABETIKUM

Nama Peneliti Utama : Ni Nyoman Yuniasih (NIM.132010101024)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 5 April 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik

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

Saran Komisi Etik :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak *S. Micracanthum*.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas dan kalibrasi alat untuk pengukuran kadar glukosa, kadar serum kreatinin, kadar MDA dan proteinuria
- Mohon diperjelas di proposal tata cara penampungan sampel urin 24 jam pada tikus
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan sediaan histopatologi organ agar didapatkan sediaan histopatologi yang memenuhi syarat pembacaan
- Pembacaan sediaan histopatologi dilakukan oleh seseorang yang kompeten serta dilakukan minimal oleh 2 orang.
- Pemeriksaan dan pembacaan sediaan histopatologi menggunakan metode blinding.

Jember, 5 April 2016



(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1 012/H25.1.11/KE/2016

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 :

HUBUNGAN ANTARA KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA) SERUM DENGAN KREATININ SERUM PADA TIKUS WISTAR MODEL NEFROPATI DIABETIK (STUDI POTENSI EKSTRAK ALGA COKELAT (*Sargassum sp.*))

Nama Peneliti Utama : Ni Nyoman Yuniasih (NIM.132010101024)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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



Tanggapan Anggota Komisi Etik

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

Saran Komisi Etik :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak metanol alga cokelat agar di dapatkan kadar yang sesuai.
- Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas pada pemeriksaan kreatinin dan MDA.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah biologis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Jember, 24 Oktober 2016

Dr. Rini Riyanti, Sp.PK



Lampiran 4.1 Data Berat Badan Tikus

Kelompok	Berat Badan	Rata-rata berat badan tikus (gram \pm SD)
Kelompok Normal	162	178,8 \pm 12,153
	181	
	176	
	196	
	179	
Kelompok Kontrol Negatif	163	174 \pm 12,942
	191	
	162	
	184	
	170	
Kelompok STZ dan Ekstrak Dosis 150 mg/kgBB	182	175,4 \pm 12,219
	165	
	173	
	164	
	193	
Kelompok STZ dan Ekstrak Dosis 300 mg/kgBB	192	173,6 \pm 15,372
	154	
	163	
	175	
	184	
Kelompok STZ dan Ekstrak Dosis 450 mg/kgBB	185	174,2 \pm 16,239
	160	
	155	
	178	
	193	

Lampiran 4.2 Analisis Data Berat Badan Tikus

Uji Normalitas

Tests of Normality							
	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BB	1,00	,228	5	,200 [*]	,959	5	,802
	2,00	,221	5	,200 [*]	,884	5	,330
	3,00	,203	5	,200 [*]	,915	5	,499
	4,00	,155	5	,200 [*]	,973	5	,894
	5,00	,209	5	,200 [*]	,928	5	,584

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

bb

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,519	4	20	,723

Uji One Way Annova

ANOVA

bb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	90,000	4	22,500	,117	,975
Within Groups	3858,000	20	192,900		
Total	3948,000	24			

Lampiran 4.3 Data Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)

No	GDP Sebelum Induksi STZ (mg/dL)	GDP 2 Setelah Induksi STZ (mg/dL)
1	56	139
2	89	310
3	49	316
4	82	324
5	48	181
6	89	488
7	81	463
8	53	311
9	45	257
10	66	162
11	81	135
12	81	361
13	75	297
14	45	145
15	49	312
16	53	330
17	75	139
18	94	310
19	81	324
20	85	257
Total rata-rata kadar GDP	68 ± 17,138	278,05 ± 102,283

Kelompok	Kadar GDP Sebelum Induksi STZ (mg/dL ± SD)	Kadar GDP Setelah Induksi STZ (mg/dL ± SD)
Kelompok kontrol negatif (K2)	64,8 ± 19,305	254 ± 87,226
Kelompok yang akan diberikan ekstrak dosis 150 mg/kgBB (K3)	66,8 ± 18,445	336,2 ± 138,179
Kelompok yang akan diberikan ekstrak dosis 300 mg/kgBB (K4)	66,2 ± 17,754	250 ± 103,227
Kelompok yang akan diberikan ekstrak dosis 450 mg/kgBB (K5)	77,6 ± 17,260	272 ± 79,727

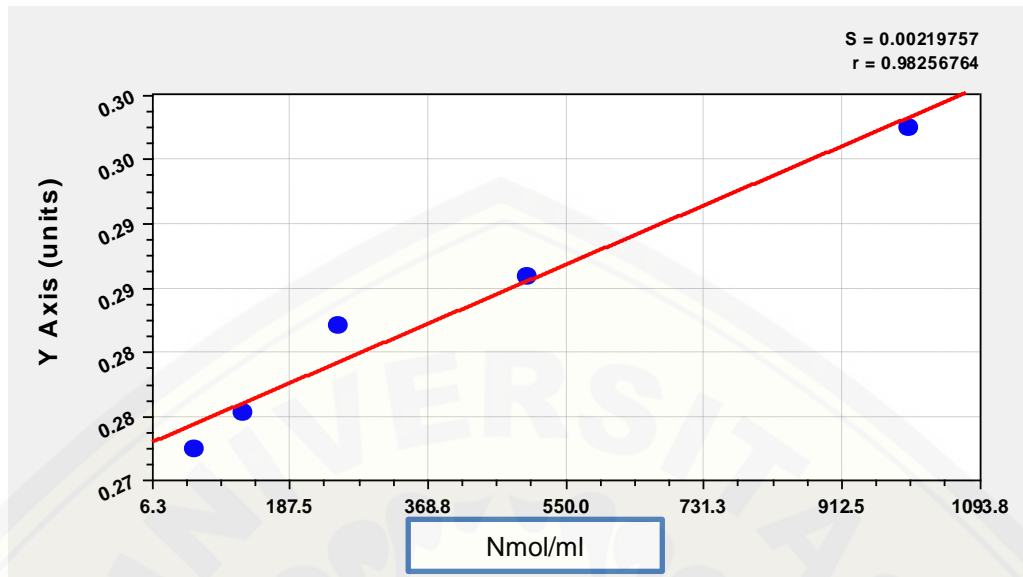
Lampiran 4.4 Analisis Data Glukosa Darah Puasa**Paired Samples Correlations**

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 GDP1 & GDP2	20	,370	,108

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	GDP1 - GDP2	-209,20000	97,25474	21,74682	-254,71662	-163,68338	-9,620	19	,000

Lampiran 4.5 Kurva Standar MDA



Persamaan Kurva :

$$x = a + by$$

$$y = (x - a) / b$$

Keterangan :

y = konsentrasi MDA serum (nmol/mL)

x = nilai absorbansi standart/sampel pada elisa reader (nm)

Koefisien a	0,027438
Koefisien b	0,026387

Lampiran 4.6 Data Kadar MDA Serum

Kelompok	Hasil Pembacaan Elisa	Hasil Perhitungan (nmol/mL)	Rata-rata (nmol/mL \pm SD)
Kelompok Kontrol (Na-CMC 0,5%)	0,2	6,54	6,8202 \pm 0,261
	0,203	6,653	
	0,218	7,222	
	0,207	6,805	
	0,209	6,881	
Kelompok Kontrol Negatif (STZ +Na-CMC 0,5%)	0,247	8,321	7,957 \pm 0,345
	0,247	8,321	
	0,233	7,79	
	0,233	7,79	
	0,227	7,563	
Kelompok Perlakuan Dosis 150 mg/kgBB	0,247	8,056	7,7828 \pm 0,456
	0,215	7,108	
	0,24	8,321	
	0,23	7,677	
	0,232	7,752	
Kelompok Perlakuan Dosis 300 mg/kgBB	0,202	6,615	6,9034 \pm 0,475
	0,21	6,919	
	0,205	6,729	
	0,231	7,714	
	0,2	6,54	
Kelompok Perlakuan Dosis 450 mg/kgBB	0,219	7,26	7,1764 \pm 0,429
	0,202	6,615	
	0,209	6,881	
	0,23	7,677	
	0,224	7,449	

Lampiran 4.7 Analisis Data MDA Serum

Uji Normalitas

Tests of Normality							
	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	1,00	,208	5	,200*	,951	5	,741
	2,00	,286	5	,200*	,839	5	,162
	3,00	,208	5	,200*	,969	5	,867
	4,00	,287	5	,200*	,807	5	,092
	5,00	,177	5	,200*	,968	5	,860

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,429	4	20	,786

Uji One Way Anova

ANOVA

mda

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,231	1	3,231	34,561	,000
Within Groups	,748	8	,093		
Total	3,979	9			

Hasil uji LSD kadar MDA pada kelompok kontrol normal dengan kontrol negatif

Uji Regresi

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: mda

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	,390	11,507	1	18	,003	7,938	-,002		
Logarithmic ^a
Inverse ^b
Quadratic	,428	6,349	2	17	,009	8,050	-,004	4,969E-006	
Cubic	,557	6,713	3	16	,004	7,957	,005	-5,695E-005	9,173E-008
Compound	,384	11,199	1	18	,004	7,930	1,000		
Power ^a
S ^b
Growth	,384	11,199	1	18	,004	2,071	,000		
Exponential	,384	11,199	1	18	,004	7,930	,000		
Logistic	,384	11,199	1	18	,004	,126	1,000		

The independent variable is dosis.

a. The independent variable (dosis) contains non-positive values. The minimum value is 0. The Logarithmic and Power models cannot be calculated.

b. The independent variable (dosis) contains values of zero. The Inverse and S models cannot be calculated.

Curve estimation model quadratic

Lampiran 4.8 Data Kadar Kreatinin Serum

Kelompok	Kadar Kreatinin (mg/dL)	Rata-rata (mg/dL \pm SD)
Kelompok Kontrol (Na-CMC 0,5%)	0,320	0,4072 \pm 0,0994
	0,337	
	0,571	
	0,387	
	0,421	
Kelompok Kontrol Negatif (STZ + Na-CMC 0,5%)	5,054	2,322 \pm 0,2338
	2,000	
	1,824	
	1,334	
	1,397	
Kelompok Perlakuan Dosis 150 mg/kgBB	0,200	0,4314 \pm 0,2313
	0,300	
	0,857	
	0,400	
	0,400	
Kelompok Perlakuan Dosis 300 mg/kgBB	0,675	0,7167 \pm 0,0605
	0,779	
	0,753	
	0,805	
	0,571	
Kelompok Perlakuan Dosis 400 mg/kgBB	0,695	0,8834 \pm 0,0904
	0,972	
	0,695	
	1,083	
	0,972	

Lampiran 4.9 Analisis Data Kreatinin Serum

Setelah dilakukan uji transformasi

Uji Normalitas

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	1,00	,205	5	,200*	,918	5	,519
	2,00	,311	5	,130	,815	5	,106
Trans	3,00	,267	5	,200*	,947	5	,718
	4,00	,259	5	,200*	,888	5	,347
	5,00	,306	5	,143	,814	5	,106

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

trans

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,276	4	20	,312

Uji One Way Anova

ANOVA

kreatinin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,249	1	1,249	38,706	,000
Within Groups	,258	8	,032		
Total	1,508	9			

Hasil uji LSD kadar kreatinin pada kelompok kontrol normal dengan kontrol negatif

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: kreatinin

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	,196	4,384	1	18	,051	1,693	-,003		
Logarithmic ^a		
Inverse ^b		
Quadratic	,451	6,984	2	17	,006	2,207	-,013	2,286E-005	
Cubic	,515	5,652	3	16	,008	2,322	-,025	9,933E-005	-1,133E-007
Compound	,096	1,910	1	18	,184	1,111	,999		
Power ^a		
S ^b		
Growth	,096	1,910	1	18	,184	,105	-,001		
Exponential	,096	1,910	1	18	,184	1,111	-,001		
Logistic	,096	1,910	1	18	,184	,900	1,001		

The independent variable is dosis.

- a. The independent variable (dosis) contains non-positive values. The minimum value is 0. The Logarithmic and Power models cannot be calculated.
- b. The independent variable (dosis) contains values of zero. The Inverse and S models cannot be calculated.

Lampiran 4.10 Dokumentasi Penelitian



Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)



Sargassum sp. kering dihaluskan kemudian ditimbang



Maserasi menggunakan metanol 80 %



Penyaringan menggunakan kertas whatman no 40.



Evaporasi



Ekstrak



Streptozotocin



Induksi STZ secara intraperitoneal



GDP sebelum induksi STZ



GDP setelah induksi STZ



Penimbangan ekstrak menggunakan neraca Ohaus



Induksi ekstrak peroral



Pengambilan darah secara intrakardiak



Sampel darah



Sentrifus darah untuk mendapatkan serum



Pembuatan reagen serum kreatinin



Inkubasi reagen TCL



Vortex hasil inkubasi



MDA serum ditaruh ke dalam white-plate



Hasil pembacaan di spektrofotometer

