

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METHANOL MIKROALGA (*Dunaliella*
sp.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA) GINJAL TIKUS
WISTAR MODEL SINDROM METABOLIK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh :

Adwin Setyanagara

NIM : 165070100111035

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan keaslian.....	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel	xiii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
 BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sindrom Metabolik	

2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Epidemiologi.....	5
2.1.3 Patofisiologi.....	6
2.1.4 Diabetik Nefropati Pada Resistensi Insulin.....	8
2.2 Peroksidasi Lipid pada Sindrom Metabolik	
2.2.1 Definisi.....	12
2.2.2 <i>Malondialdehyde</i> (MDA) sebagai Hasil Akhir Peroksidasi Lipid.....	14
2.2.3 <i>Malondialdehyde</i> (MDA) pada Diabetik Nefropati.....	14
2.2.4 Antioksidan sebagai penghambat Peroksidasi Lipid.....	15
2.3 <i>Dunaliella</i> sp.	
2.3.1 Spesifikasi.....	16
2.3.2 Taksonomi <i>Dunaliella</i> sp.....	17
2.3.3 Kandungan <i>Dunaliella</i> sp.....	17
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian.....	21
4.2 Populasi dan Sampel	
4.2.1 Populasi Penelitian.....	23
4.2.2 Sampel Penelitian	
4.2.2.1 Kriteria Inklusi.....	23
4.2.2.2 Kriteria Eksklusi.....	23
4.2.2.3 Perhitungan Sampel.....	23



4.3 Variabel Penelitian	
4.3.1 Variabel Independen.....	24
4.3.2 Variabel Dependen.....	24
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.5 Definisi Operasional.....	24
4.6 Alat dan Bahan	
4.6.1 Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi.....	25
4.6.2 Alat dan Bahan Pemeliharaan dan Perawatan Hewan Coba.....	26
4.6.3 Alat dan Bahan Pemberian Diet Tinggi Lemak Hewan Coba.....	26
4.6.4 Alat dan Bahan Pemberian Diet Tinggi Gula Hewan Coba.....	26
4.6.5 Alat dan Bahan Kultur <i>Dunaliella</i> sp.....	26
4.6.6 Alat dan Bahan Pemberian Ekstrak <i>Dunaliella</i> sp.....	26
4.6.7 Alat dan Bahan Pembedahan dan Pengambilan Organ Ginjal Tikus	27
4.6.8 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat untuk Pengukuran Kadar MDA.....	27
4.6.9 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar MDA Ginjal Tikus.....	27
4.7 Prosedur Penelitian	
4.7.1 Prosedur Pemeliharaan Tikus	27
4.7.2 Prosedur Kultur dan Ekstraksi <i>Dunaliella</i> sp.....	28
4.7.3 Prosedur Induksi Sindrom Metabolik pada Hewan Coba.....	28
4.7.4 Prosedur Pemberian Ekstrak <i>Dunaliella</i> sp.....	29
4.7.5 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Organ Ginjal Tikus.....	29
4.7.6 Prosedur Pengukuran Kadar MDA Ginjal Tikus.....	30
4.7.7 Prosedur Pengolahan Data.....	31

BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian..... 32

5.2 Hasil Uji *One-way ANOVA*..... 33

5.3 Hasil Uji Post-Hoc Tuckey 33

5.4 Korelasi Dosis *Dunaliella* sp. dan Kadar MDA Ginjal 36

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Kadar MDA Ginjal 39

6.2 Keterbatasan Penelitian 46

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan..... 47

7.2 Saran..... 47

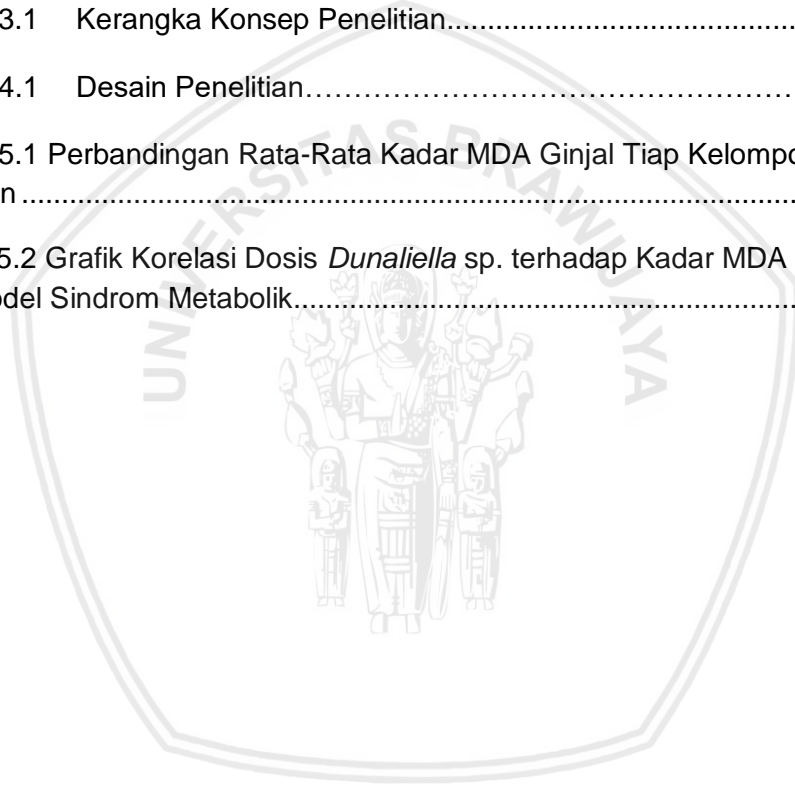
DAFTAR PUSTAKA 48

LAMPIRAN..... 53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Ikatan Karbon Rangkap.....	13
Gambar 2.2	Tahapan Proses Peroksidasi Lipid.....	13
Gambar 2.3	<i>Malondialdehyde</i> (MDA) sebagai Hasil Akhir Peroksidasi Lipis...	14
Gambar 2.4	<i>Dunaliella</i> sp.....	17
Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	19
Gambar 4.1	Desain Penelitian.....	21
Gambar 5.1	Perbandingan Rata-Rata Kadar MDA Ginjal Tiap Kelompok Perlakuan	35
Gambar 5.2	Grafik Korelasi Dosis <i>Dunaliella</i> sp. terhadap Kadar MDA Ginjal Tikus Model Sindrom Metabolik.....	37



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Profil Lipid dan Gula Darah Induksi Sindrom Metabolik.....	29
Tabel 4.1 Profil Lipid dan Gula Darah Tikus Normal.....	29
Tabel 5.1 Signifikansi Hasil Uji Normalitas <i>One-Sample Shapiro-Wilk</i>	33
Tabel 5.2 Signifikansi Hasil Uji Post-Hoc Antar Tiap Kelompok Perlakuan	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	53
Lampiran 2 Data Hasil Pengukuran MDA.....	54
Lampiran 3 Hasil Analisis Data Statistik menggunakan SPSS	55
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	62



DAFTAR SINGKATAN

HDL	: High Density Lipoprotein
LDL	: Low Density Lipoprotein
IDL	: Intermediate Density Lipoprotein
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
FFA	: Free Fatty Acid
LPL	: Lipoprotein Lipase
MDA	: Malondialdehyde
TG	: Triglycerida
TC	: Total Cholesterol
PAI	: Plasminogen Activator inhibitor
CRP	: C – Reactive Protein
GLUT	: Glucose Transporter
AGE	: Advanced Glycation End-Products
PKC	: Protein Kinase-C
LFG	: Laju Filtrasi Glomerulus
GSFS	: Glomeruloskelrosis Fokal dan Segmental
ROS	: Reactive Oxygen Species

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METHANOL MIKROALGA
(*Dunaliella sp.*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA)
GINJAL TIKUS WISTAR MODEL SINDROM METABOLIK**

Oleh :
Adwin Setyanagara
NIM: 165070100111035


Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 1 Agustus 2019

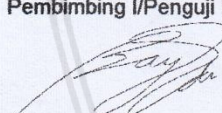
Dan dinyatakan lulus oleh .:

Penguji I




dr. Rivo Yudhinata Brian Nugraha, M.Biomed
NIP. 199008142019031015

Pembimbing I/Penguji II,



dr. Bayu Lestari, M.Biomed
NIP. 198602012010121004

Pembimbing II/Penguji III,



dr. Iriana Maharani, Sp.THT-KL (K)
NIP. 198004062014042001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001



ABSTRAK

Setyanagara, Adwin. 2019. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Methanol Mikroalga *Dunaliella* sp. terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Ginjal Tikus Wistar Model Sindrom Metabolik.** Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Bayu Lestari, M.Biomed, (2) dr. Iriana Maharani, Sp.THT-KL (K).

Perkembangan dunia teknologi yang demikian pesatnya telah mengubah hampir seluruh aktivitas manusia. Namun kemajuan teknologi ini berdampak pada pola hidup manusia seperti konsumsi tinggi kolestrol dan gula yang hal ini juga berhubungan dengan meningkatnya angka obesitas dimana secara tidak langsung meningkatkan prevalensi sindrom metabolik. Manifestasi sindrom metabolik di ginjal adalah diabetik nefropati yang berujung pada pembentukan sclerosis sehingga mengakibatkan glomerulosclerosis akibat dari peningkatan peroksidasi lemak dan produknya yaitu malondialdehida (MDA) yang memicu terjadinya reaksi inflamasi lebih lanjut pada sel tubulus ginjal. *Dunaliella* sp. merupakan mikroalga hijau yang banyak ditemukan di laut Indonesia dan tinggi akan kandungan karotenoid. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. terhadap penurunan kadar MDA ginjal tikus model sindrom metabolik. Tikus wistar jantan yang diinduksi diet aterogenik dan minum fruktosa 20% menunjukkan peningkatan kadar MDA ginjal secara signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan kontrol negatif. Pemberian ekstrak methanol *Dunaliella* sp. dengan dosis sebesar 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB secara signifikan menurunkan kadar MDA ginjal ($p < 0,05$). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa dosis ekstrak memiliki korelasi negatif dengan kadar MDA ginjal dan tingkat keeratan hubungannya sangat kuat ($r = -0,803$). Kesimpulan yang diperoleh adalah ekstrak metanol *Dunaliella* sp. dapat menurunkan kadar MDA ginjal tikus model sindrom metabolik secara signifikan.

Kata kunci: *Dunaliella* sp., MDA, sindrom metabolik

ABSTRACT

Setyanagara, Adwin. 2019. **Effect of Giving Methanol Extract *Dunaliella* sp. on the Malondialdehyde (MDA) Level of the Kidney Wistar Mouse Model of the Metabolic Syndrome.** Final Assignment Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Bayu Lestari, M.Biomed, (2) dr. Iriana Maharani, Sp.THT-KL (K).

The rapid development of the technological world has changed almost all human activities. But this technological progress has an impact on human life patterns such as high consumption of cholesterol and sugar, which is also related to the increasing rate of obesity which indirectly increases the prevalence of metabolic syndrome. The manifestation of metabolic syndrome in the kidney is diabetic nephropathy which leads to the formation of sclerosis resulting in glomerulosclerosis due to an increase in fat peroxidation and its product, malondialdehyde (MDA) which triggers further inflammatory reactions in renal tubular cells. *Dunaliella* sp. is a green microalgae found in many Indonesian seas and high in carotenoid content. This study aims to prove the effect of giving *Dunaliella* sp. Extract. to decrease MDA levels in rat kidneys metabolic syndrome models. Male wistar rats induced by atherogenic diets and drank 20% fructose showed significantly increased kidney MDA levels ($p < 0.05$) compared to negative controls. Provision of methanol extract *Dunaliella* sp. with doses of 500 mg / kg body weight, 1000 mg / kg body weight, and 1500 mg / kg body weight significantly reduced kidney MDA levels ($p < 0.05$). The results of this study prove that the dose of extract has a negative correlation with kidney MDA levels and the degree of closeness of the relationship is very strong ($r = -0.803$). The conclusion obtained was methanol extract of *Dunaliella* sp. can significantly reduce MDA levels in rat kidneys metabolic syndrome models.

Keywords: *Dunaliella* sp., MDA, metabolic syndrome

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sindrom metabolik ditandai dengan tanda mayor, seperti obesitas sentral (penumpukan lemak di daerah tertentu pada tubuh), hipertrigliseridemia, tingginya kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) kolesterol, hiperglikemia, dan hipertensi. Hal ini dapat disebabkan karena perubahan pola konsumsi masyarakat modern ke arah diet tinggi lemak dan tinggi gula. Pola konsumsi diet tinggi lemak dapat menyebabkan akumulasi lemak yang berlebihan dalam tubuh sehingga dapat terjadi obesitas dan dislipidemia. Sedangkan pola konsumsi diet tinggi gula dapat menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Dan pada kondisi obesitas yang disertai terjadinya hiperglikemia dapat mengakibatkan kondisi yang lebih buruk yang akan berdampak pada resistensi insulin (Fauci *et al.*, 2015). Hal ini juga telah dibuktikan oleh *World Health Organization* (WHO) yang menyatakan bahwa obesitas merupakan 10 besar kondisi berisiko di dunia.

Prevalensi tertinggi pada sindrom metabolik pernah tercatat pada orang Amerika, dengan 60% terjadi pada wanita usia 45-49 dan 45% laki-laki pada usia yang sama 45-49, sesuai kriteria dari *National Cholesterol Education Program and Adult Treatment Panel III* (NCEP: ATP III) (Fauci *et al.*, 2015). Menurut laporan riset kesehatan dasar Indonesia, sebanyak 7% penduduk Indonesia menderita hipertensi dan 0,7% penduduk Indonesia menderita diabetes serta sebanyak 0,2% mengalami penyakit ginjal, bahkan menurut WHO *Country Health Profiles 2012*: penyakit ginjal menempati peringkat ke-10 penyebab kematian di Indonesia (3%) (Prodjosudjadi W, 2009).

Resistensi insulin bersama komponen lain sindrom metabolik tidak hanya meningkatkan risiko kardiovaskular, akan tetapi juga menyebabkan progresifitas penyakit ginjal. Resistensi Insulin berkaitan dengan Peningkatan Aktivitas *Renin-Angiotensin Aldosterone system* (RAAS) dan *Sympathic Nervous System* (SNS) yang dimana akan mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi ginjal secara bersamaan (Hall JE *et al.*, 2002) pada keadaan obesitas bisa memicu timbulnya keadaan stres oksidatif karena ketidakseimbangan prooksidan dan antioksidan di dalam tubuh. Obesitas erat kaitannya dengan stres oksidatif, dikarenakan adanya peranan dari cAMP (*cyclic Adenosin Mono Phospat*) dalam pengaturan keseimbangan energi. Jaringan adiposa selain berperan sebagai tempat penyimpanan energi juga memiliki fungsi sebagai organ endokrin, yang bertanggung jawab terhadap patofisiologi dari stres oksidatif (Alrasyid, 2009). Stres oksidatif ini akan mendukung terjadinya peroksidasi lipid. Sebagai penanda dari stress oksidatif ini bisa dihitung menggunakan senyawa reaktif yang terbentuk secara alami yang disebut *Malondialdehyde* (MDA) (Bender *et al.*, 2015). Malondialdehid terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) (Marjani, 2010). Peningkatan MDA yang dihasilkan oleh peroksidasi lipid pada ginjal merupakan tanda awal dari kerusakan yang progresif pada sel-sel tubulus dan glomerulus sehingga terjadi glomerulosklerosis sehingga menyebabkan penurunan fungsi ginjal yang berkorelasi secara linier dengan resistensi insulin (Krishan dan Chakkarwar, 2011).

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan kekayaan sumber daya alam yang sangat melimpah, termasuk di dalamnya adalah mikroalga. *Dunaliella* sp. merupakan mikroalga yang diketahui memiliki banyak manfaat, seperti dapat

berperan sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan anti-kanker (Chandran *et al.*, 2014). *Dunaliella sp* memiliki kandungan antioksidan yang kaya, seperti β -karoten (60,4% dari karotenoid total), astaxantin (17,7%), zeaxantin (13,4%), lutein (4,6%) dan asam lemak omega-3 (Abd El-Baky *et al.*, 2007). Beta karoten dan flavonoid merupakan antioksidan yang dapat mengontrol dan mengurangi proses peroksidasi lipid sehingga dapat mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut secara *in vivo* (Bender *et al.*, 2015). Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui potensi antioksidan karotenoid yang dimiliki mikroalga *Dunaliella sp.* sebagai terapi dan sekaligus pencegahan resistensi insulin pada sindroma metabolit dengan melihat kadar MDA ginjal tikus wistar sindrom metabolik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini diajukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak methanol mikroalga *Dunaliella sp.* dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik?
2. Apakah dosis ekstrak methanol mikroalga *Dunaliella sp.* berkorelasi terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak methanol mikroalga

Dunaliella sp. berpengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak methanol mikroalga *Dunaliella* sp. terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik bila dibandingkan dengan pemberian statin.
2. Untuk mengetahui korelasi dosis *Dunaliella* sp. dengan kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat dari ekstrak methanol mikroalga *Dunaliella* sp. terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model sindrom metabolik.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian tentang potensi pemanfaatan mikroalga *Dunaliella* sp.
2. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian tentang terapi dan pencegahan resistensi insulin

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sindrom Metabolik

2.1.1 Definisi

Sindrom metabolik (sindrom X, sindrom resistensi insulin) merupakan pengelompokan dari suatu faktor risiko yang meliputi obesitas abdominal, hipertrigliseridemia, kadar *High-Density Lipoprotein* (HDL) kolesterol yang rendah, peningkatan tekanan darah dan kadar glukosa puasa yang tinggi, dimana semua faktor tersebut merupakan faktor risiko dari penyakit penyakit seperti diabetes mellitus, perlemakan hati yang dapat mengakibatkan sirosis hati, kerusakan ginjal, demensia, dan penyakit kardiovaskuler (Fauci *et al.*, 2015). Tanda-tanda mayor dari sindrom metabolik adalah obesitas sentral, hipertrigliseridemia, rendahnya kadar HDL kolesterol, hiperglikemia, dan hipertensi (Fauci *et al.*, 2015).

2.1.2 Epidemiologi

Prevalensi sindrom metabolik cukup beragam di seluruh dunia, tergantung pada kriteria diagnosis yang dipakai dalam merefleksikan usia dan etnis pada populasi. Secara umum, prevalensi sindrom metabolik meningkat seiring dengan usia. Di Amerika, sindrom metabolik mempengaruhi kurang lebih 50% dari populasi orang dengan usia di atas 50 tahun. Sedangkan pada usia lebih dari 60 tahun, wanita lebih berisiko dibanding laki-laki. Selain usia, faktor risiko lain dari sindrom metabolik adalah obesitas, jarang melakukan aktivitas fisik atau *sedentary lifestyle*, dan diabetes mellitus (Fauci *et al.*, 2015). Hal ini juga telah dibuktikan oleh *World Health Organization* (WHO) yang menyatakan bahwa obesitas merupakan 10 besar kondisi berisiko di dunia. Prevalensi tertinggi pada sindrom metabolik

pernah tercatat pada orang Amerika, dengan 60% terjadi pada wanita usia 45-49 dan 45% laki-laki pada usia yang sama 45-49, sesuai kriteria dari *National Cholesterol Education Program and Adult Treatment Panel III* (NCEP: ATP III) (Fauci *et al.*, 2015).

2.1.3 Patofisiologi

Hipotesis yang paling diterima untuk mendeskripsikan patofisiologi sindrom metabolik adalah resistensi insulin, yang mana disebabkan oleh defek tertentu pada aksi insulin yang belum diketahui secara lengkap. Onset resistensi insulin dapat terlihat dengan kondisi hiperinsulinemia postprandial, yang kemudian diikuti oleh *fasting hyperinsulinemia* dan tentunya kondisi hiperglikemia.

Kontributor awal yang utama terhadap perkembangan resistensi insulin adalah banyaknya asam lemak yang bersirkulasi. *Free fatty acids* yang berikatan dengan albumin plasma adalah utamanya berasal dari simpanan trigliserida jaringan adiposa yang dilepaskan oleh enzim lipolitik intraselular. Asam lemak juga berasal dari hasil lipolisis lipoprotein yang kaya trigliserida di jaringan oleh enzim lipoprotein lipase. Insulin berperan sebagai anti-lipolisis dan dalam proses stimulasi lipoprotein lipase di jaringan adiposa. Sebagai catatan, penghambatan lipolisis di jaringan adiposa merupakan jalur paling sensitif dalam aksi insulin. Oleh karena itu, ketika resistensi insulin berkembang, peningkatan lipolisis menyebabkan peningkatan asam lemak, yang kemudian lebih jauh menurunkan efek anti-lipolisis dari insulin. Jumlah asam lemak yang berlebihan mendorong ketersediaan substrat dan menyebabkan resistensi insulin dengan memodifikasi *down-stream signaling*. Asam lemak mengganggu *uptake* glukosa yang diperantarai oleh insulin dan menyebabkan akumulasi trigliserida pada otot rangka

dan jantung, sedangkan peningkatan produksi glukosa dan akumulasi trigliserida terjadi di liver. (Fauci *et al.*, 2015).

Resistensi leptin juga dikatakan sebagai patofisiologi yang memungkinkan dalam menjelaskan mekanisme sindrom metabolik. Secara fisiologis, leptin menurunkan nafsu makan, pengeluaran energi, dan merangsang sensitivitas insulin. Selain itu, leptin juga mengatur fungsi jantung dan vaskular melalui mekanisme yang tergantung *nitric oxide*. Meskipun demikian, ketika obesitas berkembang, terjadi hiperleptinemia, dengan bukti resistensi leptin di otak dan jaringan lain yang menyebabkan terjadinya inflamasi, resistensi insulin, hiperlipidemia, dan gangguan kardiovaskular, seperti hipertensi, aterosklerosis, penyakit jantung kongestif, dan gagal jantung. Hipotesis stres oksidatif memberikan teori tentang usia dan predisposisi sindrom metabolik. Penelitian pada individu yang mengalami resistensi insulin dengan obesitas atau diabetes mellitus tipe 2, keturunan dari pasien diabetes mellitus tipe 2, dan usia lanjut, memberikan hasil identifikasi adanya defek pada fosforilasi oksidatif mitokondria yang menyebabkan akumulasi trigliserida dan molekul lipid yang berhubungan di otot. Akhir-akhir ini, mikrobiota usus sudah dikaitkan menjadi contributor penting dalam terjadinya obesitas dan gangguan metabolik yang berhubungan, termasuk sindrom metabolik. Meskipun mekanismenya masih belum diketahui secara pasti (Fauci *et al.*, 2015).

Free fatty acids (FFAs) atau asam lemak bebas dilepaskan secara berlimpah dari massa jaringan adiposa yang luas, seperti pada kondisi obesitas. Di liver, FFAs menyebabkan peningkatan produksi glukosa dan trigliserida serta sekresi *very low density lipoproteins* (VLDLs). Abnormalitas lipid/lipoprotein yang berhubungan dengan hal tersebut adalah termasuk penurunan *high-density*

lipoprotein (HDL) *cholesterol* dan peningkatan jumlah partikel *low-density lipoprotein* (LDL). FFAs juga menurunkan sensitivitas insulin di otot dengan menghambat uptake glukosa yang diperantarai insulin. Defek yang terjadi sehubungan dengan hal tersebut adalah penurunan partisi glukosa menjadi glikogen dan peningkatan akumulasi lipid dalam trigliserida. Meningkatkan glukosa di sirkulasi, dan juga FFAs, meningkatkan sekresi insulin pankreas yang menyebabkan hiperinsulinemia. Hiperinsulinemia mendorong reabsorpsi natrium dan meningkatkan aktivitas sistem saraf simpatis dan berkontribusi terhadap terjadinya hipertensi dan juga kadar FFAs yang bersirkulasi. Status proinflamasi terjadi bersamaan dan juga berkontribusi terhadap resistensi insulin yang dihasilkan dari berlebihan FFAs. Peningkatan sekresi interleukin 6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor α* (TNF- α) yang diproduksi oleh adiposit dan makrofag menyebabkan peningkatan resistensi insulin. Lipolisis simpanan trigliserida jaringan adiposa menjadi FFAs, IL-6, dan sitokin yang lain juga meningkatkan produksi glukosa hepar, produksi VLDL oleh hepar, hipertensi, dan resistensi insulin di otot. Sitokin-sitokin dan FFA juga meningkatkan produksi fibrinogen hepar dan produksi *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) oleh adiposit yang menyebabkan keadaan *prothrombotic*. Tingginya kadar sitokin yang bersirkulasi menstimulasi hepar untuk memproduksi *C-reactive protein* (CRP). Penurunan produksi anti-inflamasi dan adiponektin (*insulin-sensitizing cytokine*) juga berpengaruh terhadap sindrom metabolik (Fauci *et al.*, 2015).

2.1.4 Diabetik Nefropati Pada Resistensi Insulin

Nefropati diabetik atau penyakit ginjal diabetik adalah komplikasi diabetes yang ditandai dengan hiperglikemi dan ekskresi albumin urin yang meningkat atau

penurunan laju filtrasi glomerulus (LFG) atau keduanya. (Gheith dkk, 2015) Nefropati Diabetik merupakan komplikasi kronis DM tipe 1 (kerusakan sel beta-kekurangan insulin absolut) dan DM tipe 2 (Resistensi insulin dan atau penurunan sekresi insulin).(Vujičić dkk, 2012). Pada umumnya, nefropati diabetik didefinisikan sebagai sindrom klinis pada pasien diabetes melitus yang ditandai dengan albuminuria menetap (>300mg/24 jam atau >200mg/menit) pada minimal dua kali pemeriksaan dalam kurun waktu 3 sampai 6 bulan (Hendromartono, 2009). Angka kejadian nefropati diabetik pada diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2 sebanding, tetapi insiden pada tipe 2 lebih besar daripada tipe 1 karena jumlah pasien diabetes melitus tipe 2 lebih banyak daripada tipe 1. Secara epidemiologis, ditemukan perbedaan terhadap kerentanan untuk timbulnya nefropati diabetik, yang antara lain dipengaruhi oleh etnis, jenis kelamin serta umur saat diabetes muncul. Pada pasien DM, berbagai gangguan pada ginjal dapat terjadi, seperti terjadinya batu saluran kemih infeksi saluran kemih, pielonefritis akut maupun kronik, dan juga berbagai bentuk glomerulonefritis, yang selalu disebut sebagai penyakit ginjal non diabetik pada pasien diabetes. Akan tetapi yang terbanyak dan terkait secara klasifikasi patologinya diuraikan oleh Kimmelstiehl-Wilson pada tahun 1936, berupa glomerulosklerosis yang noduler dan difus (Hendromartono, 2009).

Mekanisme yang mendasari pathogenesis dan progresi diabetik nefropati adalah karena kelebihan gula darah yang memasuki sel glomerulus melalui fasilitas glucose transporter (GLUT), terutama GLUT 1, yang mengakibatkan aktivasi beberapa mekanisme seperti *poly pathway*, *hexoamine pathway*, *Protein Kinase C pathway*, dan penumpukan zat yang disebut sebagai *advanced glycation end-products* (AGEs) (Harun, 2009). Dan sampai saat ini, hiperfiltrasi masih dianggap sebagai awal dari mekanisme patogenik dalam laju kerusakan ginjal.

Penelitian Brenner dkk pada hewan menunjukkan bahwa saat jumlah nefron mengalami pengurangan terus menerus, filtrasi dari nefron yang masih sehat akan meningkat sebagai bentuk kompensasi. Hiperfiltrasi yang terjadi pada sisa nefron yang sehat lambat laun akan menyebabkan sclerosis dari nefron tersebut. Mekanisme terjadinya peningkatan laju filtrasi glomerulus pada nefropati diabetik ini masih belum jelas benar, tetapi kemungkinan disebabkan oleh dilatasi arteriol aferen oleh efek yang tergantung glukosa, yang diperantarai oleh hormon vasoaktif, IGF-1, Nitric Oxide, Prostaglandin dan glukagon. Efek langsung dari hiperglikemia adalah rangsangan hipertrofi sel, sintesis matriks ekstraseluler, serta produksi TGF- β yang diperantarai oleh aktivasi protein kinase-C (PKC) yang termasuk dalam serine-threonin kinase yang memiliki fungsi pada vaskular seperti kontraktilitas, aliran darah, proliferasi sel dan permeabilitas kapiler. Peningkatan TGF- β yang tidak normal dapat menjadi faktor penting kemunculan glomerulosklerosis melalui peningkatan jumlah dan distribusi kolagen I, III dan IV yang abnormal. TGF- β bersamaan dengan Smad 2 dalam deposisi ECM yang berlebihan juga dapat menyebabkan glomerulosklerosis. TGF- β mempengaruhi akumulasi matrik mesangial dengan merangsang sisteis komponens ECM dan menurunkan produksi kolagenase. Deposisi komponen ECM, termasuk fibronektin dan tipe kolagen I, III dan IV, merupakan komponen penting dari jaringan parut yang diamati selama perkembangan glomerulosklerosis (Bob *et al*, 2011). Hiperglikemia kronik dapat menyebabkan terjadinya glikasi nonenzimatik asam amino dan protein (reaksi Mallard dan Browning) pada awalnya, glukosa akan mengikat residu amino secara non enzimatik menjadi basa schiff glikasi, lalu terjadi penyusunan ulang untuk mencapai bentuk yang lebih stabil tetapi masih reversibel dan disebut sebagai produk amadori. Jika proses ini berlanjut terus, akan

terbentuk *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) yang irreversibel. AGEs sendiri diperkirakan sebagai perantara beberapa kegiatan seluler seperti ekspresi *adhesion molecules* yang berperan dalam penarikan sel-sel mononuclear, hipertrofi sel, sintesa matriks ekstraseluler serta inhibisi *Nitric Oxide*. Proses ini akan terus berlanjut sampai terjadi ekspansi mesangium dan pembentukan nodul serta fibrosis tuberointerstisial. Hipertensi yang timbul bersama dengan bertambahnya kerusakan ginjal, juga akan mendorong *sclerosis* pada ginjal pasien diabetes (Hendromartono, 2009).

Sebelum timbul gejala klinik dari Nefropati Diabetik, ginjal penderita DM mengalami perubahan fungsional maupun morfologis. Kelainan morfologi ginjal timbul sesudah 2-5 tahun sejak diagnosis DM ditegakkan. Perubahan fungsional awalnya meliputi peningkatan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) dan ekskresi albumin dalam urine. Kerusakan pada pembuluh darah kecil di ginjal menyebabkan terjadinya kebocoran protein lewat urine. LFG pada mulanya meningkat di atas 20–30% dari normal, dan ekskresi protein yang intermitten makin lama menetap dan bertambah berat. LFG akhirnya akan turun dan penderita jatuh dalam gagal ginjal tahap akhir. Ginjal kehilangan kemampuannya untuk membersihkan dan menyaring darah sehingga akhirnya pasien seringkali harus menjalani dialisis untuk membuang produk buangan toksik dari darah. Gagal ginjal timbul sekitar lebih dari 5 tahun sejak timbulnya proteinuria (mikroalbuminuria) (Tjokroprawiro dkk, 2007).

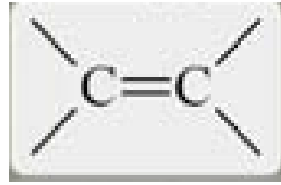
Dari beberapa mekanisme yang telah dijabarkan tadi, hal ini dapat menyebabkan kerusakan yang progresif pada sel-sel tubulus dan glomerulus yang akan mengakibatkan *sclerosis* pada ginjal sehingga terjadi glomerulosklerosis (Krishan dan Chakkarwar, 2011). Glomerulosklerosis merupakan luka yang

disebabkan oleh kerusakan glomerulus (unit penyaring darah pada ginjal). Glomeruloskelrosis fokal dan segmental (GSFS) secara klinis memberikan gambaran sindrom nefrotik dengan gejala proteinuria masif, hipertensi, hematuria, dan sering disertai gangguan fungsi ginjal. Pemeriksaan mikroskop cahaya menunjukkan sklerosis glomerulus yang mengenai bagian atau segmen tertentu. Obliterasi kapiler glomerulus terjadi pada segmen glomerulus dan dinding kapiler mengalami kolaps. Kelainan ini disebut hialinosis yang terdiri dari IgM dan komponen C3. Glomerulus yang lain dapat normal atau membesar dan pada sebagian kasus ditemukan penambahan sel (Wiguno Prodjosudjadi, 2009). Pada Penelitian yang ditulis pada *Europian Journal of Clinical Investigation* kadar MDA plasma meningkat secara signifikan pada pasien dengan FSGS. Tingkat MDA urin juga meningkat secara signifikan dan secara signifikan berkorelasi dengan tingkat MDA plasma pada pasien dengan FSGS. Immunostaining untuk glomerular MDA dan SOD secara signifikan lebih tinggi pada pasien dengan FSGS daripada pada pasien dengan *Minimal change disease* atau *normal control*, dan juga secara signifikan lebih tinggi pada tikus dengan puromycin aminonucleoside (PAN) yang diinduksi FSGS daripada pada tikus dengan *Minimal change disease*. Tingkat MDA ginjal secara signifikan berkorelasi dengan tingkat glomerulosklerosis pada pasien dengan FSGS (Chen *et al.*, 2005).

2.2 Peroksidasi Lipid Pada Sindroma Metabolik

2.2.1 Definisi

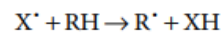
Peroksidasi lipid adalah kerusakan oksidatif dari minyak dan lemak yang mengandung ikatan karbon-karbon rangkap (Gambar 2.1) (Krishna, 2008)



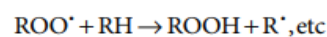
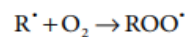
Gambar 2.1 Ikatan Karbon Rangkap

Peroksidasi atau auto-oksidasi dari lipid yang terpapar oksigen bertanggung jawab tidak hanya terhadap pembusukan makanan, tetapi juga terhadap kerusakan jaringan secara *in vivo* yang dapat menyebabkan kanker, penyakit inflamasi, aterosklerosis, dan penuaan degenerative. Efek buruk ini disebabkan oleh radikal bebas, yaitu molekul yang memiliki electron valensi bebas yang tidak berpasangan sehingga membuatnya sangat reaktif. Radikal bebas yang mengandung oksigen disebut *reactive oxygen species* (ROS). ROS ini diproduksi selama pembentukan peroksida dari asam lemak yang mengandung ikatan rangkap methylene yang terinterupsi, yang mana dapat ditemukan secara natural pada *polyunsaturated fatty acids*. Peroksidasi lipid adalah rangkaian reaksi yang menyediakan suplai ROS secara berkelanjutan yang menginisiasi proses peroksidasi lebih lanjut dan berpotensi memiliki efek yang merusak. Seluruh tahapan proses peroksidasi lipid adalah sebagai berikut (Krishna, 2008).

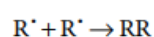
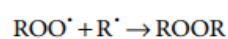
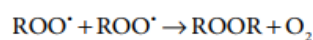
1. Initiation:



2. Propagation:



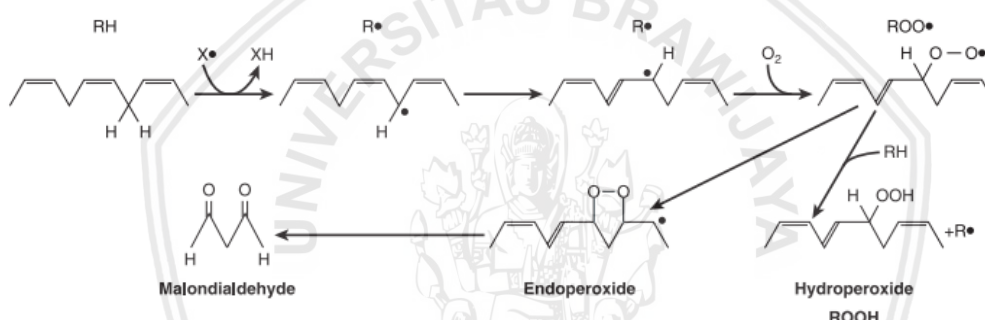
3. Termination:



Gambar 2.2 Tahapan Proses Peroksidasi Lipid

2.2.2 Malondialdehyde (MDA) sebagai Hasil Akhir Peroksidasi Lipid

Reaksi peroksidasi lipid diawali dengan adanya radikal bebas ($X\cdot$) oleh cahaya, atau oleh ion metal. Malondialdehyde hanya dibentuk oleh asam lemak dengan tiga atau lebih ikatan rangkap. MDA digunakan sebagai ukuran dari peroksidasi lipid bersama dengan etana dari karbon dua terminal asam lemak omega 3 dan metana dari karbon lima terminal dari asam lemak omega 6 (Gambar 2.3) (Bender *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Malondialdehyde (MDA) sebagai Hasil Akhir Peroksidasi Lipid

2.2.3 Malondialdehyde (MDA) pada Diabetik Nefropati

Komplikasi dari penyakit diabetes di ginjal biasa dikenal dengan sebutan diabetik nefropati. Berdasarkan *Microalbuminuria Prevalence Study* (MAPS), hampir 60% pasien dengan hipertensi dan diabetes di asia terkena diabetik nefropati. Persentasenya terdiri dari 18.8% macroalbuminuria dan 39.8% microalbuminuria (American Diabetes Association, 2004). Kerusakan pada glomerulus ginjal terjadi pada pasien dengan diabetik nefropati. Kerusakan glomerulus akan menyebabkan beberapa protein darah dikeluarkan secara tidak normal dalam urin. Situasi ini disebut sebagai *glomerulus hyperfiltration* (Pardede, 2008).

Glomerulus hyperfiltration terjadi karena adanya kerusakan pada endotel sel ginjal. Salah satu penyebab kerusakan sel endotel adalah stres oksidatif yang terjadi pada penderita diabetes karena hiperglikemia (Yulianti, 2009). Hiperglikemia menstimulasi pelepasan dari superoksida di mitokondria, dan memicu awal dari stres oksidatif pada pasien DM. Sumber dari stres oksidatif pada pasien diabetes dapat berjalan dari non-enzymatic pathway, enzymatic and mitochondrial pathways. Sumber stres oksidatif enzimatik berasal dari glukosa enzimatik. Glukosa dapat mengalami autooksidasi dan menghasilkan radikal OH. Selain itu, glukosa bereaksi dengan protein non-enzimatik yang menghasilkan produk-produk Amadori diikuti oleh pembentukan Advanced Glycation End Products (AGEs) yang meningkatkan stres oksidatif. Jalur polyol di hiperglikemia juga menghasilkan radikal $\cdot O_2^-$. Proses autooksidasi pada hiperglikemia dan reaksi glikasi akan memicu pembentukan radikal bebas, terutama Superoksida (O_2^-) dan Hidrogen peroksida (H_2O_2), maka reaksi *Haber-Weis* dan *Fenton* akan mengubah radikal-radikal sebelumnya menjadi radikal hidroksil ($OH\cdot$). Radikal hidroksil menyerang *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) dalam membran sel, dan menghasilkan pembentukan lipid hidroperoksida dan MDA. Senyawa terakhir akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel-sel ginjal (Wiyono, 2003).

2.2.4 Antioksidan sebagai Penghambat Peroksidasi Lipid

Antioksidan berperan untuk mengontrol dan menurunkan peroksidasi lipid. *Propyl gallate*, *butylated hydroxyanisole* (BHA), dan *butylated hydroxytoluene* (BHT) adalah antioksidan yang sering digunakan sebagai aditif makanan. Antioksidan yang terbentuk secara alami adalah vitamin E (*tocopherol*) yang larut lemak serta urat dan vitamin C yang larut air. Beta karoten juga merupakan

antioksidan. Antioksidan dibagi menjadi 2 kelas, yaitu: (1) antioksidan preventif yang berperan dalam menurunkan kecepatan inisiasi reaksi dan (2) *chain-breaking antioxidants* yang mengganggu reaksi pada proses propagasi. Contoh antioksidan preventif adalah enzim katalase dan peroksidase lain, seperti glutathion peroksidase yang bereaksi dengan ROOH; selenium yang merupakan komponen esensial dari glutathion peroksidase dan mengatur aktivitasnya, serta *chelators of metal ion* yaitu EDTA (*ethylenediaminetetraacetate*) dan DTPA (*diethylenetriaminepentaacetate*). Secara *in vivo*, yang utama dari *chain-breaking antioxidants* adalah superoksida dismutase yang bekerja pada fase aqueous untuk menjebak radikal bebas superoksida, urat dan vitamin E yang bekerja pada fase lipid untuk menjebak radikal bebas ROO•. Peroksidasi lipid juga dikatalisa secara *in vivo* oleh senyawa heme dan oleh enzim lipoksigenase yang terdapat pada trombosit dan leukosit. Produk lain dari auto-oksidasi atau oksidasi enzymatic dari signifikansi fisiologis adalah *oxysterols* (terbentuk dari kolesterol) dan *isoprostanes* (terbentuk dari peroksidasi *polyunsaturated fatty acids* seperti asam arakidonat) (Bender *et al.*, 2015).

2.3 *Dunaliella sp.*

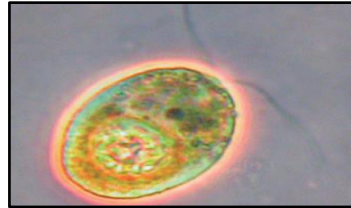
2.3.1 Spesifikasi

Dunaliella sp. (Gambar 2.3) merupakan fitoplankton yang mempunyai sepasang flagel yang sama panjang dan kloroplasnya berbentuk cangkir. Bentuk selnya tidak stabil dan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, dapat berbentuk lonjong, bulat, silindris, dan oval. Pada umumnya, sel mikroalga ini berbentuk bulat telur dengan lebar 4 - 5 μm dan panjang 6 - 25 μm , tetapi juga tergantung pertumbuhannya. Media kultur *Dunaliella sp.* yang digunakan sebagai pupuk teknis skala laboratorium adalah pupuk Walne (Ramos *et al.*, 2015).

2.3.2 Taksonomi *Dunaliella* sp.

Berikut adalah klasifikasi dari *Dunaliella* sp. (Teodoresco, 1905) :

Phylum	: <i>Chlorophyta</i>
Subphylum	: <i>Chlorophytina</i>
Class	: <i>Chlorophyceae</i>
Ordo	: <i>Chlamydomonadales</i>
Family	: <i>Dunaliellaceae</i>
Genus	: <i>Dunaliella</i>
Spesies	: <i>Dunaliella</i> sp.



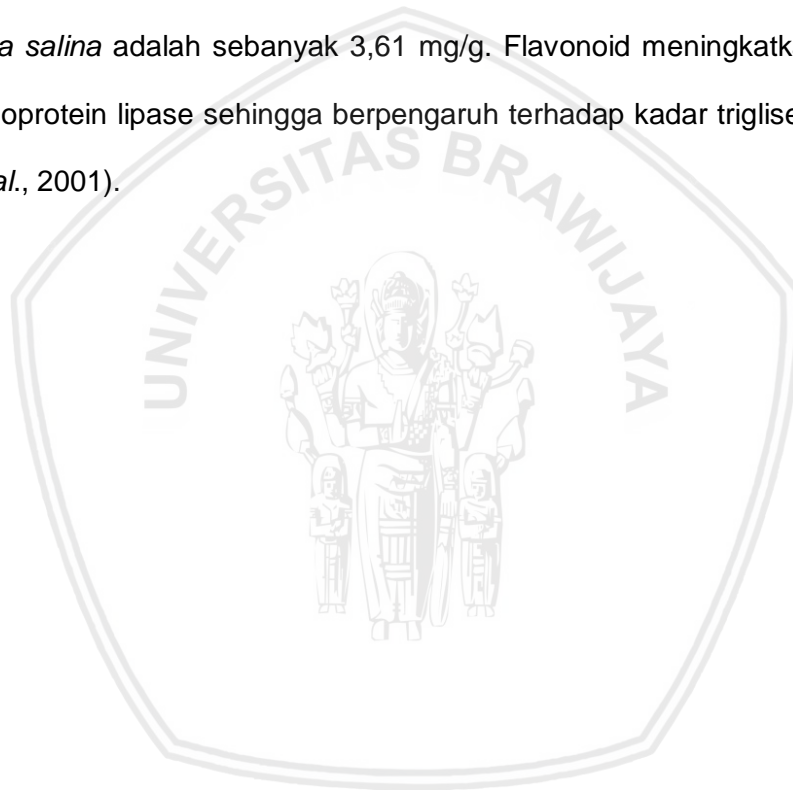
Gambar 2.4 *Dunaliella* sp.

2.3.3 Kandungan *Dunaliella* sp.

Dunaliella sp. mengandung akumulasi jumlah karotenoid yang tinggi (12,6% berat kering), antara lain seperti beta karoten (60,4% dari karotenoid total), astaxantin (17,7%), zeaxantin (13,4%), lutein (4,6%), dan kriptoxantin (3,9%) (Abd El-Baky *et al.*, 2007). Kandungan astaxantin pada *Dunaliella* sp. telah terbukti dapat menetralkan radikal bebas yang selanjutnya mencegah dan menghentikan reaksi oksidasi. Aktivitas astaxantin dipercaya merupakan mekanisme yang utama dari antiinflamasi, antikanker, fungsi hati dan jantung (Guerin *et al.*, 2003). Sebagai antioksidan, kandungan karotenoid dalam mikroalga berperan dalam penurunan *reactive oxygen species* (ROS). Selain sebagai antioksidan, karotenoid mikroalga juga digunakan sebagai sumber pewarna. Mikroalga juga memiliki kandungan EPA (*eicosapentaenoic acid*) dan DHA (*docosaheanoic acid*) (Li *et al.*, 2009). EPA dan DHA merupakan asam lemak omega 3 tidak jenuh rantai ganda panjang yang efektif dalam penurunan kadar triasilgliserol dalam darah (Micallef dan Garg, 2008). Menurut Boberg (1992), suplementasi asam lemak omega 3 sebanyak 3 gram per hari dapat meningkatkan kadar HDL sebanyak 8% dan menurunkan

kadar trigliserida sebanyak 27%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Astryanti *et al.* (2017), *Dunaliella* sp. mengandung DHA sebanyak 3,27% dan EPA sebanyak 10,93%.

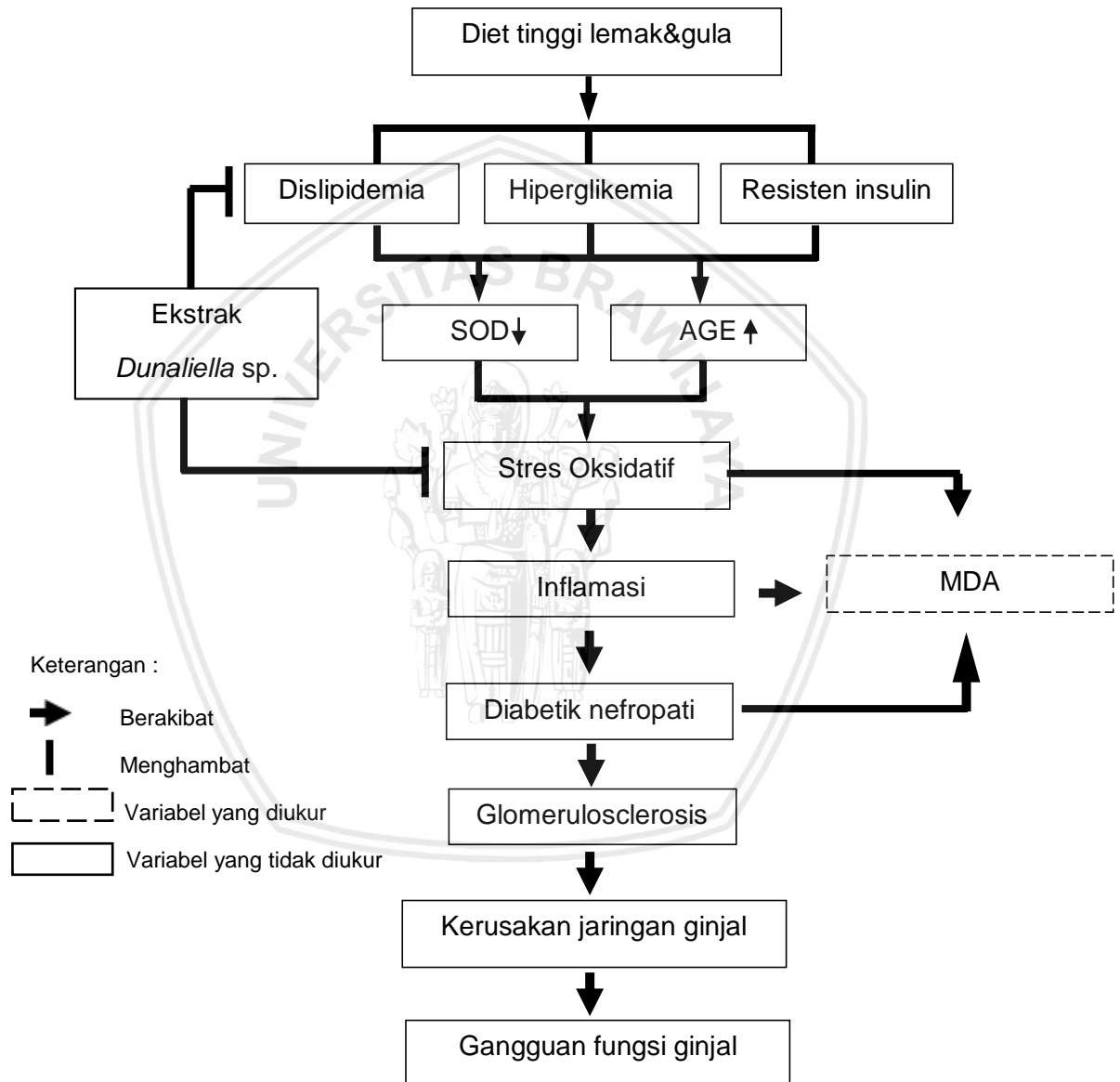
Zat aktif polifenol dan flavonoid tersebut memiliki berbagai manfaat, seperti antioksidan, antimutagenik, antiinflamasi, dan antikarsinogenik (Shahidul, 2007). Berdasarkan penelitian oleh Valcheva *et al.*, kandungan total flavonoid dalam *Dunaliella salina* adalah sebanyak 3,61 mg/g. Flavonoid meningkatkan aktivitas enzim lipoprotein lipase sehingga berpengaruh terhadap kadar trigliserida serum (Ling *et al.*, 2001).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Diet tinggi lemak dan gula akan menyebabkan resistensi insulin di jaringan perifer, hiperglikemia dan dislipidemia. Ketiga proses tersebut memicu menurunnya fungsi antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD) sedangkan hiperglikemia meningkatkan produksi *Advance Glicemic End products* (AGE) (Harun, 2009). Kondisi dimana terjadinya peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan endogen tersebut bisa menyebabkan stres oksidatif yang akan memicu proses inflamasi dan pembentukan ROS. ROS sendiri akan menyebabkan peroksidasi lipid pada ginjal sehingga menghasilkan produknya yaitu *malondialdehyde* (MDA) (Bender *et al.*, 2015).. Pada keadaan stres oksidatif ini sangat berperan terhadap terjadinya diabetik nefropati yang mengakibatkan kerusakan secara progresif dari sel-sel tubulus dan sel glomerulus sehingga terjadi glomerulosklerosis yang akan menyebabkan kerusakan jaringan ginjal, dan gangguan fungsi ginjal (Krishan dan Chakkarwar, 2011). Kandungan dalam ekstrak *Dunaliella sp.* seperti Astaxanthin dapat menurunkan konsentrasi trigliserida, kolesterol total, asam lemak nonesterifikasi, ALT, dan AST (Astryanti *et al.*, 2017). Ekstrak *Dunaliella sp.* dalam kaitan penyakit glomerulosklerosis yaitu untuk memperbaiki dislipidemia dan menurunkan MDA pada organ ginjal.

3.2 Hipotesis Penelitian

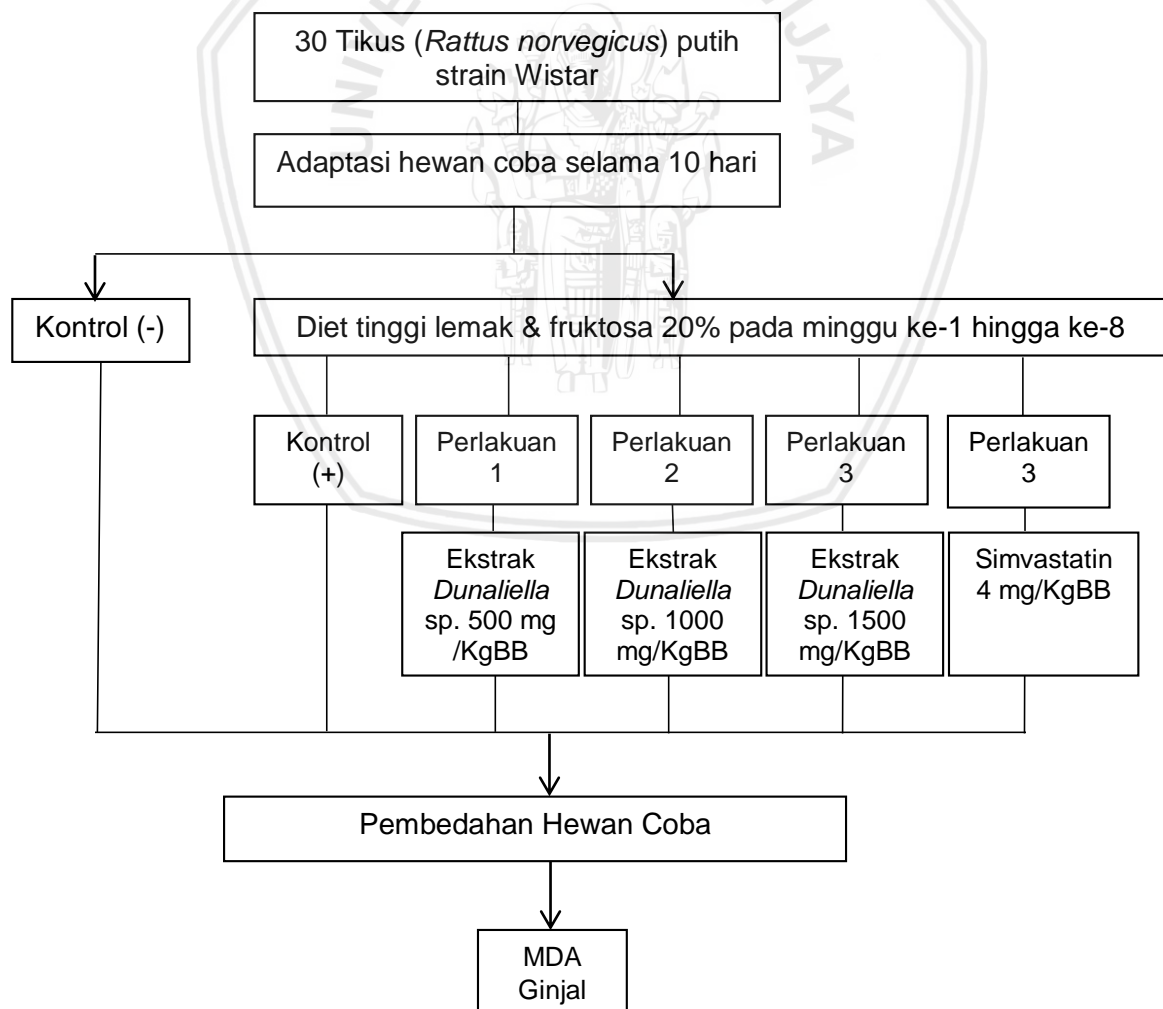
1. Ekstrak mikroalga *Dunaliella sp.* menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar model sindrom metabolik.
2. Dosis ekstrak mikroalga *Dunaliella sp.* berkorelasi negatif terhadap *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar model sindrom metabolik.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan *randomized post-test only controlled group design* menggunakan hewan coba berupa tikus yang dibagi dalam 6 kelompok. Pada penelitian ini, tikus diinduksi menjadi sindrom metabolik dengan cara diet tinggi lemak dan minum fruktosa selama 8 minggu (Gancheva *et al.*, 2015).



Gambar 4.1 Desain Penelitian

Setelah dilakukan perlakuan, pembedahan dilakukan untuk mengambil organ ginjal tikus dan kemudian dilakukan pengecekan kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal menggunakan metode spektrofotometer.

Keterangan:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20%)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20% selama 8 minggu mulai minggu ke-2 hingga minggu ke-10)
3. Kelompok 3: tikus yang telah diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20% selama 8 minggu, pada minggu ke-5 diberikan terapi *Dunaliella* sp. 500 mg/kg BB selama 4 minggu
4. Kelompok 4: tikus yang telah diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20% selama 8 minggu, pada minggu ke-5 diberikan terapi *Dunaliella* sp. 1000 mg/kg BB selama 4 minggu
5. Kelompok 5: tikus yang telah diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20% selama 8 minggu, pada minggu ke-5 diberikan terapi *Dunaliella* sp. 1500 mg/kg BB selama 4 minggu
6. Kelompok 6 : tikus yang telah diberi diet tinggi lemak & fruktosa 20% selama 8 minggu, pada minggu ke-5 diberikan terapi Simvastatin 4 mg/kg BB selama 4 minggu

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dengan usia 2-3 bulan dan berat 150-200 gram.

4.2.2 Sampel Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

Tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan, berbulu putih dan halus, sehat ditandai dengan bergerak aktif dan tingkah laku normal, umur 2-3 bulan (dewasa) dan berat badan $\pm 150-200$ gram.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

Penampakan bulu tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang kusam, rontok, botak, aktivitas kurang/tidak aktif, terdapat penurunan berat badan $>10\%$ setelah masa adaptasi selama 10 hari dan tikus wistar cacat, sakit dan/atau mati.

4.2.2.3 Perhitungan Sampel

Teknik randomisasi digunakan untuk pemilihan sampel dari populasi, karena teknik ini dapat meminimalisasi bias. Jumlah minimal sampel yang diperlukan dihitung menggunakan rumus dari Federrer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, dengan t merupakan jumlah kelompok perlakuan dan r adalah jumlah replikasi (sampel). Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan adalah 6, sehingga didapatkan nilai r sebagai berikut:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15 ; (6 - 1)(r - 1) \geq 15 ; (5)(r - 1) \geq 15 ; r - 1 \geq 3$$

$$r \geq 4$$

jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 4 tikus per kelompok perlakuan. Akan tetapi diperkirakan akan terjadi *drop out* pada hewan coba sehingga diberi jumlah lebih satu ekor pada tiap perlakuan. Pada penelitian ini, jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 30 tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Independen

Variabel independen dari penelitian ini adalah diet tinggi lemak, fruktosa, dan ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. dalam berbagai dosis yang diberikan pada tikus.

4.3.2 Variabel Dependen

Variabel dependen dari penelitian ini adalah kadar *malondialdehyde* (MDA) pada organ ginjal tikus wistar model sindrom metabolik.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret hingga Agustus tahun 2018.

4.5 Definisi Operasional

1. *Rattus norvegicus* strain Wistar yang digunakan berbulu putih, memiliki jenis kelamin jantan dengan usia 2-3 bulan dan berat badan 150-200 gram.
2. Mikroalga *Dunaliella* sp. diperoleh dari hasil kultur yang dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur. Hasil kultur tersebut kemudian dipanen

sehingga diperoleh serbuk *Dunaliella* sp. seberat 1 kg dan selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan methanol 70% yang dilakukan di Laboratorium Kultur Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

3. Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar model sindrom metabolik adalah tikus yang setelah berhasil melewati masa adaptasi selama 10 hari lalu diinduksi diet tinggi lemak & fruktosa selama 8 minggu. Diet tinggi lemak yang diberikan adalah berupa terigu 19,2%, minyak babi 8%, minyak kambing 10%, asam kolat 0,5%, dan kuning telur bebek rebus 5%, yang mana kesemuanya itu dicampurkan dalam makanan tikus PAR-S 57,6%. Diet fruktosa 20% diberikan dalam bentuk minuman untuk tikus (Dupas *et al.*, 2017).
4. Kadar *malondialdehyde* (MDA) yang diukur adalah kadar MDA dari organ ginjal tikus yang diukur dengan menggunakan metode kalorimetri pada panjang gelombang 532 nm dan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi

Alat dan bahan yang digunakan adalah tempat cuci tangan, jas laboratorium, masker, handscoen, alkohol 70%, kapas, dan sabun antiseptik.

4.6.2 Alat dan Bahan Pemeliharaan dan Perawatan Hewan Coba

Pada pemeliharaan tikus diperlukan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

4.6.3 Alat dan Bahan Pemberian Diet Tinggi Lemak Hewan Coba

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pemberian diet tinggi lemak hewan coba setiap 1 kali makan pertikus adalah minyak babi 8% , asam kolat 0.5%, dan kuning telur bebek rebus 5%, minyak kambing 10%, pars 57,6%, terigu 19,2%, dan semua bahan dicampur untuk diberikan diet tiap tikus.

4.6.4 Alat dan Bahan Pemberian Diet Tinggi Gula Hewan Coba

Alat dan bahan yang diperlukan untuk induksi hiperglikemi adalah fruktosa, aquades murni, gelas ukur, pipet dan diberikan dengan cara diminum

4.6.5 Alat dan Bahan Kultur *Dunaliella* sp.

Alat dan bahan yang diperlukan untuk kultur *Dunaliella* sp. adalah toples kaca, lampu TL, blower, refraktometer, selang aerator, pupuk walne, vitamin B12, media air laut 20 ppt.

4.6.6 Alat dan Bahan Pemberian Ekstrak *Dunaliella* sp.

Pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. dilakukan dengan cara per oral sehingga diperlukan sonde yang dihubungkan dengan spuit 3 cc, kapas alkohol, dan ekstrak *Dunaliella* sp.

4.6.7 Alat dan Bahan Pembedahan dan Pengambilan Organ Ginjal Tikus

Alat dan bahan yang digunakan untuk prosedur pengambilan ginjal tikus adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, kapas, kloroform 20 ml, alkohol, wadah plastik dan tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml.

4.6.8 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat untuk Pengukuran Kadar MDA

Alat yang digunakan adalah freezer dengan suhu -20°C , wadah untuk organ, mortar, timbangan, gunting, dan pinset. Bahan yang digunakan adalah ginjal tikus yang telah diambil.

4.6.9 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar MDA Ginjal Tikus

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet, sentrifus, kompor, spektrofotometer. Bahan yang digunakan adalah buffer fosfat, TCA, HCl, Na Thiobarbiturat.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Pemeliharaan Tikus

Setiap tikus ditimbang lalu dimasukkan ke dalam kandang yang telah diberi label. Tikus kemudian dipelihara selama 8 minggu 10 hari (10 hari adaptasi dan 8 minggu perlakuan) dalam kandang plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan alas sekam yang diganti setiap tiga hari dan diberi penutup anyaman kawat. Satu kandang berisi 1 tikus. Tikus diberi siklus terang-gelap masing-masing 12 jam, diberi makan dan minum yang cukup serta situasi yang minimal dari stresor lain.

4.7.2 Prosedur Kultur dan Ekstraksi *Dunaliella* sp.

Kultur *Dunaliella* sp. dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur. Hasil kultur yang diperoleh adalah berupa serbuk seberat 1 kg. Ekstraksi *Dunaliella* sp. dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dan evaporasi yang dilakukan di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya. Serbuk *Dunaliella* sp. kering dilarutkan dalam metanol dengan perbandingan 1:20 yaitu, 100 gram serbuk *Dunaliella* sp. dibanding 2 liter metanol. Larutan ini kemudian dibiarkan selama 24 jam. Hasil rendaman setelah 24 jam kemudian disaring lalu dipisahkan filtratnya untuk dievaporasi sehingga kandungan metanol di dalamnya teruapkan (Fedekar *et al.*, 2013).

4.7.3 Prosedur Induksi Sindrom Metabolik pada Hewan Coba

Induksi Sindrom metabolik pada hewan coba dilakukan di lab. Farmakologi FKUB. Pemberian diet tinggi lemak setiap 1 kali makan pertikus adalah minyak babi 8% , asam kolat 0.5%, dan kuning telur bebek rebus 5%, minyak kambing 10%, pars 57,6%, terigu 19,2%, dan semua bahan dicampur untuk diberikan diet tiap tikus. Komposisi ini diinduksikan pada tikus kelompok perlakuan 2, 3, 4, 5, 5. Diet aterogenik diberikan selama 8 minggu untuk mencapai sindrom metabolik pada semua kelompok perlakuan (Gani *et al.*, 2013). Diet hiperglikemik dibuat dengan menggunakan konsentrasi fruktosa 20%. Fruktosa sebanyak 545 mL dilarutkan dengan aquades murni 955 mL. Total minum fruktosa 1,5 L untuk 1 hari minum. Tiap tikus kelompok perlakuan 2, 3, 4, 5, 5 diberi minum sejumlah 60 ml pada wadah tempat minum tikus.

Kemudian setelah diinduksi sindrom metabolik rata-rata profil lipid dan gula darah kelompok tikus perlakuan dan kelompok tikus normal melalui uji beda *Paired Sample T Test* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ((2-tailed) $p < 0,05$).

Tikus Perlakuan	Rata-rata Profil Lipid dan Gula Darah
Kolestrol Total	60.4
Trigliserida	39.6
HDL	49.32
LDL	11.88
Gula darah	176.4

Tabel 4.1 Profil Lipid dan Gula Darah Induksi Sindrom Metabolik (Nabilah *et al.*, 2018).

Tikus Normal	Rata-rata Profil Lipid dan Gula Darah
Kolestrol Total	52.6
Trigliserida	19
HDL	41.94
LDL	7.78
Gula darah	152.6

Tabel 4.2 Profil Lipid dan Gula Darah Tikus Normal (Nabilah *et al.*, 2018).

4.7.4 Prosedur Pemberian Ekstrak *Dunaliella* sp.

Pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. dilakukan dengan metode sonde menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit. Perlakuan dosis yang diberikan hasil modifikasi penelitian Fedekar *et al.* (2013) yaitu, 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB. Diberikan pada kelompok hewan coba 3, 4, 5 mulai minggu ke-6 hingga minggu ke-10 sebanyak 1 cc/tikus/hari dan tetap di induksi aterogenik selama 4 minggu perlakuan dosis.

4.7.5 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Organ Ginjal Tikus

Pembedahan tikus dan pengambilan organ dilakukan oleh pihak yang berkompeten di Laboratorium Farmakologi FKUB. Sebelum prosedur pembedahan, tikus dianestesi terlebih dahulu dengan injeksi ketamin lalu difiksasi

untuk siap dibedah. Tikus diletakkan pada penjepit (*block holder*) sebelum diambil organ ginjalnya (Sirois, 2005).

4.7.6 Prosedur Pengukuran Kadar MDA Ginjal Tikus

Prinsip pengukuran: MDA yang merupakan produk sekunder dari peroksidase lipid akan bereaksi dengan asam thiobarbiturat (TBA) pada suasana asam (pH 2-3) dan suhu 97-100°C memberikan warna merah muda (Rukmini et al., 2004). Organ ginjal yang telah dibedah tersebut disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C. Organ ginjal ditimbang seberat 100 mg kemudian ditumbuk menggunakan mortar hingga halus. Sampel yang telah dihaluskan seberat 100 mg dihomogenasi dengan buffer fosfat dan EDTA sebanyak 2 cc (Shivarajashankara et al., 2001). Kemudian sampel diambil sebanyak 200 uL dan ditambahkan dengan aquabidest 500 cc, HCl 200 uL, 250 uL TCA 40%, dan 250 uL NaThio 1.34%. Campuran larutan ini kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 25 menit (Abubakar et al., 2004). Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit lalu diambil supernatannya dan ditambahkan aquabidest hingga 3 cc. Sampel siap diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Penentuan kadar dilakukan dengan menggunakan kurva baku.

Contoh perhitungan:

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y: absorbansi sampel

a: intersep

b: kemiringan

x: konsentrasisampel

$$\text{Konsentrasi MDA } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{(\text{absorbansi sampel} - \text{intersep})}{\text{kemiringan}} \times FP$$

4.7.7 Prosedur Pengolahan Data

Data yang didapat berupa konsentrasi kadar MDA (mg/g) pada organ ginjal tikus dari semua perlakuan dan akan diasumsikan normalitas distribusi data dan homogenitas ragam datanya. Apabila data normal dan homogen maka akan dianalisis menggunakan uji hipotesis *one-way ANOVA*. Bila tidak normal atau tidak homogen, maka menggunakan uji hipotesis *Kruskall-Wallis*. Perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) akan dilanjutkan dengan *Post-hoc (LSD)* dan penghitungan nilai korelasi *Pearson*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan *randomized post-test only controlled group design* secara *in vivo* menggunakan hewan coba berupa tikus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. terhadap kadar MDA Ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi sindrom metabolik. Analisis data penelitian dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS versi 25 dengan metode *one-way ANOVA*. Syarat untuk dapat dilakukan uji parametrik *one-way ANOVA* adalah bahwa data harus normal dan homogen. Oleh karena itu, sebelum melakukan uji *one-way ANOVA* perlu dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene Statistic*. Jika syarat normalitas dan homogenitas data telah terpenuhi, maka dilanjutkan dengan analisis *one-way ANOVA*. Berdasarkan hasil analisis menggunakan *one-way ANOVA*, jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka dapat dilanjutkan dengan uji Post-hoc untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

5.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan *One-Sample Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui normalitas sebaran data rata-rata kadar MDA Ginjal. Hasil uji normalitas dari kadar MDA Ginjal didapatkan nilai signifikansi ($p > 0,05$).

Tabel 5.1 Signifikansi Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Shapiro-Wilk			
Kelompok	Statistic	Df	Sig.
K (-)	0.823	4	0.150
K (+)	0.869	5	0.261
D500	0.914	5	0.492
D1000	0.910	5	0.466
D1500	0.951	5	0.742
S4	0.874	5	0.282

Dengan melihat signifikansi uji *Shapiro-Wilk* dari table diatas, hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Sedangkan uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji *Levene Statistic* dan didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,074 ($p > 0,05$) yang berarti data homogen. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa data normal dan homogen sehingga dapat dilanjutkan untuk uji *one-way ANOVA*.

5.2 Hasil Uji *One-way ANOVA*

Hasil analisis *one-way ANOVA* pada penelitian ini didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini menandakan bahwa ada perbedaan kadar MDA Ginjal yang bermakna pada minimal 2 kelompok perlakuan. Secara deskriptif, rata-rata kadar MDA Ginjal terendah didapatkan pada kelompok tikus model sindrom metabolik dengan pemberian ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. dosis 1000 mg/kgBB. Sedangkan rata-rata kadar MDA Ginjal tertinggi didapatkan pada kelompok tikus yang diinduksi sindrom metabolik saja tanpa diberi perlakuan pemberian ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp.

5.3 Hasil Uji Post-Hoc Tuckey

Setelah didapatkan kesimpulan bahwa ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan melalui uji *one-way ANOVA*, kemudian uji *post-hoc* dilakukan untuk melihat perbedaan tersebut antar tiap kelompok perlakuan dan

membandingkannya. Hasil uji *post-hoc* (Tabel 5.2) didapatkan bahwa rata-rata kadar MDA Ginjal tikus kelompok normal (K-) berbeda signifikan terhadap kelompok tikus yang diinduksi sindrom metabolik tanpa diberi ekstrak *Dunaliella* sp. (K+), namun tidak berbeda signifikan terhadap kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberi ekstrak *Dunaliella* sp. dosis 500 mg/kgBB (D500), 1000 mg/kgBB (D1000), 1500 mg/kgBB (D1500), dan juga kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberi Simvastatin 4 mg/kgBB (S4). Kadar MDA Ginjal kelompok tikus yang diinduksi sindrom metabolik tanpa diberi ekstrak *Dunaliella* sp. (K+) berbeda signifikan terhadap kelompok tikus normal (K-), kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberi ekstrak *Dunaliella* sp. dosis 500 mg/kgBB (D500), 1000 mg/kgBB (D1000), 1500 mg/kgBB (D1500), dan juga kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberi Simvastatin 4 mg/kgBB (S4).

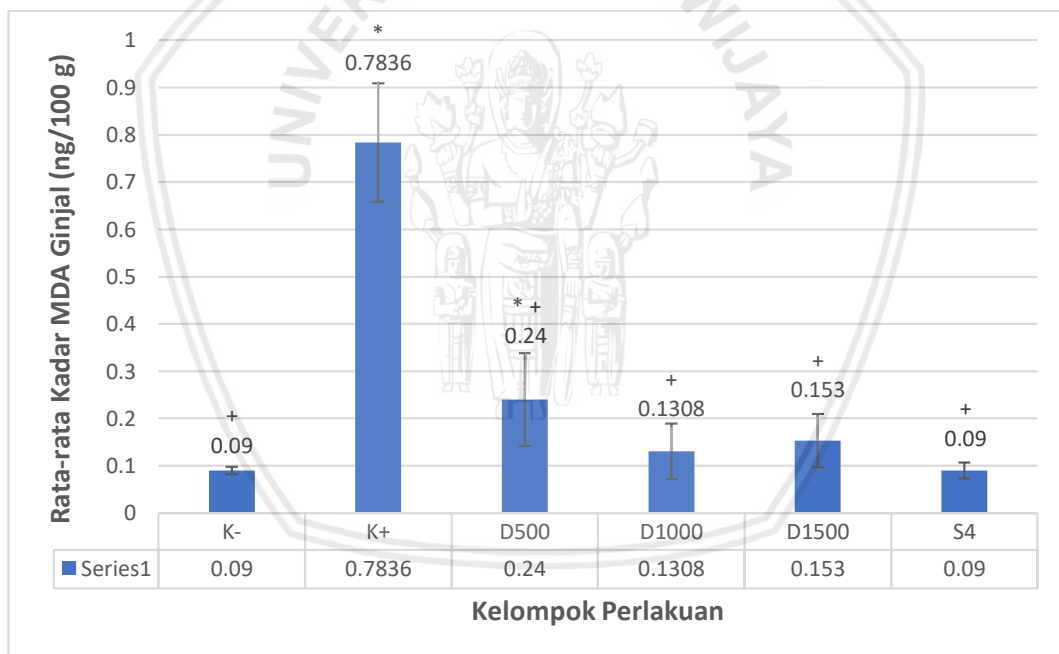
Tabel 5.2 Signifikansi Hasil Uji Post-Hoc Antar Tiap Kelompok Perlakuan

	K-	K+	D500	D1000	D1500	S4
K-		0,000*	0,036	0,948	0,749	1,000
K+	0,000*		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
D500	0,036	0,000*		0,211	0,439	0,036
D1000	0,948	0,000*	0,211		0,996	0,948
D1500	0,749	0,000*	0,439	0,996		0,749
S4	1,000	0,000*	0,036	0,948	0,749	

Keterangan: K- (diet normal tanpa induksi sindrom metabolik); K+ (model sindrom metabolik - diet atherogenik dan diet minum fruktosa 20%); D500 (model sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 500 mg/kgBB); D1000 (induksi sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 1000 mg/kgBB); D1500 (induksi sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 1500 mg/kgBB); S4 (induksi sindrom metabolik dan pemberian Simvastatin 4 mg/kgBB).

Pada gambar 5.1 menunjukkan adanya peningkatan signifikan kadar MDA Ginjal tikus kelompok kontrol positif (K+) setelah diinduksi sindrom metabolik bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif atau diet normal tanpa induksi sindrom metabolik (K-). Pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. dosis 500 mg/kgBB pada

tikus model sindrom metabolik (D500) menunjukkan penurunan kadar MDA Ginjal yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok model sindrom metabolik yang tidak diberikan ekstrak *Dunaliella* sp. (K+) dan bahkan bisa dikatakan tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok diet normal (K-). Kadar MDA Ginjal kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberikan ekstrak *Dunaliella* sp. dosis 1000 mg/kgBB (D1000) dan dosis 1500 mg/kgBB (D1500) menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberikan terapi simvastatin 4 mg/kgBB (S4).



Gambar 5.1 Perbandingan Rata-Rata Kadar MDA Ginjal Tiap Kelompok Perlakuan

Keterangan: K- (diet normal tanpa induksi sindrom metabolik); K+ (model sindrom metabolik - diet aterogenik dan diet minum fruktosa 20%); D500 (model sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 500 mg/kgBB); D1000 (induksi sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 1000 mg/kgBB); D1500 (induksi sindrom metabolik dan pemberian *Dunaliella* 1500 mg/kgBB); S4 (induksi sindrom metabolik dan pemberian Simvastatin 4 mg/kgBB).

* : $P < 0,05$ dibandingkan kontrol negatif , + : $P < 0,05$ dibandingkan kontrol positif

5.4 Korelasi Dosis *Dunaliella* sp. dan Kadar MDA Ginjal

Uji korelasi bertujuan untuk mengetahui bentuk hubungan antara besarnya pemberian dosis *Dunaliella* sp dan kadar MDA Ginjal tikus dan tingkat keeratan hubungan tersebut. Bentuk hubungan antara dua variabel dapat berupa korelasi positif yaitu berbanding lurus atau korelasi negatif yaitu berbanding terbalik. Menurut Sugiyono (2007), tingkat keeratan nilai korelasi Pearson (r) dapat diklasifikasikan sebagai berikut.

Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah

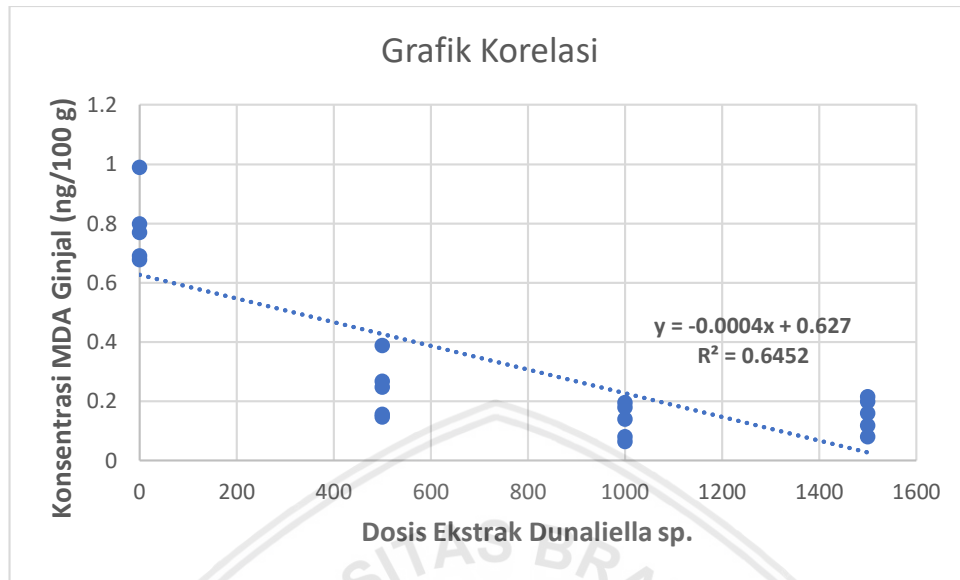
Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah

Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang

Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat

Nilai Korelasi 0,800 – 1,000 = sangat kuat

Berdasarkan uji korelasi Pearson yang telah dilakukan, didapatkan hasil nilai signifikansi $p=0,000$ ($p<0,05$) dan nilai korelasi (r) sebesar -0,803. Tanda korelasi negatif menunjukkan bahwa bentuk hubungan dua variabel tersebut adalah berbanding terbalik. Hal ini bermakna bahwa semakin tinggi dosis ekstrak *Dunaliella* sp., semakin turun kadar MDA Ginjal. Oleh karena itu, dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan atau korelasi dengan tingkat keeratan sangat kuat antara dosis ekstrak *Dunaliella* sp. dengan kadar MDA Ginjal, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak *Dunaliella* sp. maka semakin turun kadar MDA Ginjal.



Gambar 5.2 Grafik Korelasi Dosis *Dunaliella* sp. terhadap Kadar MDA Ginjal Tikus Model Sindrom Metabolik



BAB 6

PEMBAHASAN

Meskipun *Glomerulosclerosis* bukan merupakan salah satu kriteria yang dapat menggambarkan sindrom metabolik, *Glomerulosclerosis* merupakan manifestasi nefrotik yang sering terjadi bermula pada diabetik nefropati. Pada penelitian ini, tikus diinduksi menjadi sindrom metabolik dengan cara memberikan diet tinggi lemak dan minum fruktosa selama 8 minggu (Gancheva *et al.*, 2015). Hal ini akan menyebabkan terjadinya kondisi obesitas, hiperglikemia, dan dislipidemia pada tikus (Wong *et al.*, 2016). Sindrom metabolik memiliki karakteristik yaitu adanya minimal tiga kondisi medis yang terjadi secara simultan, yaitu obesitas, hiperglikemia, hipertensi, atau dislipidemia (Alberti *et al.*, 2009). Dengan demikian, induksi diet tinggi lemak dan fruktosa dapat menginduksi terjadinya sindrom metabolik karena memenuhi kriteria keadaan obesitas, hiperglikemia, dan dislipidemia.

Diabetik nefropati dapat mencakup banyak terjadinya *kidney disease* pada penderita sindrom metabolik, seperti terjadinya batu saluran kemih, infeksi saluran kemih, pielonefritis akut maupun kronik, hingga kerusakan yang progresif pada sel-sel tubulus dan glomerulus yang akan mengakibatkan *sclerosis* pada ginjal sehingga terjadi *glomerulosclerosis* (Krishan dan Chakkarwar, 2011). Patogenesisnya berhubungan dengan diet tinggi lemak, diet tinggi gula, penurunan oksidasi asam lemak bebas dan lipolisis dari jaringan lemak. Secara bersamaan, proses tersebut juga menstimulasi terjadinya stress oksidatif dan inflamasi. Hal inilah yang berperan

penting dalam terjadinya kerusakan sel-sel di ginjal. Oleh karena itu, agen antioksidan dan anti-inflamasi bisa memiliki peran dalam mencegah penyakit ini. Karotenoid merupakan antioksidan yang poten dan juga sebagai mikronutrien anti-inflamasi yang sudah diteliti perannya dalam pencegahan dan terapi *Glumerulosclerosis*. *Dunaliella* sp. merupakan salah satu mikroalga dengan kandungan karotenoid yang sangat tinggi (Abd El-Baky *et al.*, 2007).

6.1 Kadar MDA Ginjal

Manifestasi yang dapat dijumpai pada sindrom metabolik di ginjal adalah diabetik nefropati yang pada akhirnya akan berujung pada pembentukan *sclerosis* pada sel sel ginjal sehingga menyebabkan *glumerulosclerosis*. Akumulasi lemak dan hiperglikemi kronis pada penderita sindrom metabolik ini dapat secara potensial menyebabkan peroksidasi lipid dan toksisitas *reactive oxygen species* (ROS) serta penurunan fungsi antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD). Peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan endogen tersebut menyebabkan stres oksidatif (Shafi *et al.*, 2012). Peran stress oksidatif dan respon inflamasi dalam pathogenesis *glumerulosclerosis* telah diteliti sebelumnya dan menunjukkan asosiasi yang baik antara hubungan kadar MDA ginjal sebagai hasil peroksidasi lipid dalam kondisi sindrom metabolik (Jawi *et al.*, 2012).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar MDA ginjal kelompok tikus yang diinduksi sindrom metabolik dan tanpa diberikan pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. (kontrol positif) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok normal (kontrol negatif) dengan nilai signifikansi $p=0.00$ ($p<0.05$). Hal ini sesuai dengan penelitian biokimia yang dilakukan oleh Jawi *et al.* pada tahun 2012 tentang marker stres

oksidatif pada ginjal tikus yang diinduksi diabetes, yang mana hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa diet tinggi gula dan lemak meningkatkan kadar MDA ginjal dengan signifikan bila dibandingkan kelompok kontrol. Mekanisme yang dapat mendasari terjadinya peningkatan kadar MDA pada induksi sindrom metabolik adalah melalui peran stress oksidatif dan respon inflamasi.

Secara spesifik, diet tinggi lemak banyak digunakan untuk menginduksi kondisi obesitas pada hewan coba (Halade *et al.*, 2010). Metabolisme lemak dimulai dari proses lipolisis yang memecah trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol yang kemudian dilepas ke peredaran darah menjadi asam lemak bebas / *Free fatty acids* (FFAs). *Free fatty acids* (FFAs) di plasma merupakan substrat mayor produksi VLDL-trigliserida (Nielsen *et al.*, 2012). Kurang lebih 70% dari *Free fatty acids* (FFAs) yang dilepaskan dari proses lipolisis akan mengalami re-esterifikasi (lipogenesis) untuk membentuk trigliserida (Wolfe *et al.*, 1990). Laju proses re-esterifikasi tergantung pada laju produksi *glycerol-3-phosphate* dari proses glikolisis dan laju pelepasan asam lemak bebas dari adiposit (Chen, 2012). Aksi ganda dari asam lemak bebas dan asam lemak ter-esterifikasi (trigliserida) membentuk VLDL yang mengangkut lemak di sirkulasi darah yang larut air. Penelitian yang dilakukan oleh Zivkovic *et al.* (2007) menyatakan bahwa pemberian diet tinggi lemak memiliki efek yang efektif dalam menyebabkan kondisi hiperglikemia, resistensi insulin, dislipidemia, dan peningkatan asam lemak bebas di darah. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa konsumsi diet tinggi lemak yang berlebihan menyebabkan peningkatan sintesis trigliserida yang diikuti dengan peningkatan pembentukan VLDL yang berperan dalam distribusi trigliserida.

Selain itu, hasil penelitian ini juga bersesuaian dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya tahun 2012 pada tikus coba yang diberi perlakuan diet tinggi fruktosa. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya peningkatan signifikan kadar substansi yang bereaksi dengan asam thiobarbiturat yaitu MDA (Botezelli *et al.*, 2012). Diet tinggi lemak dan fruktosa dapat menyebabkan penurunan sensitivitas insulin, resistensi insulin, dan intoleransi glukosa. Pada penelitian ini hewan coba diberi diet tinggi lemak selama 8 minggu, dengan diet lemak ini sudah dinyatakan kronik dan akan menyebabkan penumpukan massa lemak visceral, dimana peningkatan massa lemak visceral ini menyebabkan peningkatan FFA (*Free fatty acids*), meningkatnya sirkulasi trigliserida dan kecepatan produksi glukosa. Peningkatan FFA plasma mempengaruhi kerja insulin, menurunkan pengambilan glukosa, glikolisis, dan sintesis glikogen. Stimulasi resistensi insulin melalui pemberian diet tinggi lemak diduga melalui mekanisme aktivasi jalur ROS (*reactive oxygen species*) dan PKC (*protein kinase c*). Supresi ekspresi *glucose transporter 4* (GLUT 4), yaitu adanya aktivasi ROS karena adanya peningkatan asam lemak bebas (FFA). Diet tinggi lemak menyebabkan hiperinsulinemia yang akan menyebabkan peningkatan kerja SREBP-1 adiposit sehingga terjadi hipertropi di adiposit, kemudian terbentuk adiposit baru oleh *Insulin growth factor- 1* (IGF-1) dan produksi dari adiposit baru meningkatkan pembentukan sel adiposit baru itu sendiri sehingga terjadi hiperplasia adiposa, dan juga FFA semakin meningkat. Hal ini juga yang menunjukkan peranan dari SREBP-1 sebagai lipogenik, adipogenik dan sintesa asam lemak (Kim JB *et al.*, 1998). Begitupun juga dengan diet tinggi fruktosa, diet tinggi fruktosa jangka panjang dapat meningkatkan kadar trigliserida dalam plasma dikarenakan fruktosa sendiri berbeda

dengan glukosa, diet tinggi fruktosa tidak menstimulasi insulin atau leptin (dua faktor penting yang berperan dalam mengatur asupan energi dan penimbunan lemak tubuh). Yang dimana insulin sendiri merupakan mediator pelepasan nitrit oksida (NO) endotelial sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke otot skeletal dan peningkatan serapan glukosa oleh sel. Sedangkan leptin berfungsi untuk menurunkan asupan makanan dan pengeluaran kelebihan energi. Oleh karena itu, terjadilah penimbunan kalori yang berakhir pada terbentuknya asam lemak itu sendiri dan mengakibatkan hiperglikemia serta resistensi insulin akibat dari tinggi fruktosa (Sanchez *et al.*, 2007). Kondisi obesitas dan resistensi insulin pada sindrom metabolik ini merupakan faktor yang berkontribusi dalam peningkatan produksi ROS, peningkatan peroksidasi lipid, dan penurunan kapasitas antioksidan di plasma. Terlalu banyaknya produksi ROS akibat stress oksidatif memicu terjadinya peroksidasi akumulasi lipid yang kemudian diikuti oleh pembentukan hasil metabolit reaktifnya, yaitu *malondialdehyde* (MDA) (Uncar *et al.*, 2013). Peroksidasi lipid ini yang akan menyebabkan meningkatnya ROS (*reactive oxygen species*) yang akan mengakibatkan stres oksidatif serta aktivasi dari NO (*nitrit oxide*) dan adhesi dari leukosit serta terjadinya nekrosis sel epitel tubulus proksimal ginjal yang dimana akan mengakibatkan rusak sel sel ginjal, hal ini yang berperan dalam terjadinya *glomerulosclerosis*. (Krishan dan Chakkarwar, 2011; Bender *et al.*, 2015) pasien dengan resistensi insulin, seperti pada keadaan sindrom metabolik, memiliki korelasi peningkatan kadar MDA plasma dan jaringan yang signifikan ($p=0.000$) artinya MDA plasma meningkat, maka akan diikuti dengan kenaikan kadar MDA jaringan (Novidiyanto, 2016). Maka dari itu, disimpulkan bahwa tikus dengan obesitas akan meningkatkan peroksidasi lipid pada jaringan ginjal yang

akan ditandai oleh peningkatan kadar MDA pada jaringan ginjal. Peningkatan kadar MDA ginjal pada tikus yang diinduksi sindrom metabolik menandakan adanya peroksidasi lipid yang menyebabkan kerusakan jaringan dan terjadinya kegagalan mekanisme pertahanan antioksidan untuk mencegah berlebihannya pembentukan radikal bebas. Pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. secara signifikan dapat memutarbalikkan keadaan tersebut dengan kandungan karotenoid di dalam ekstraknya sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

Kadar MDA Ginjal kelompok tikus model sindrom metabolik dengan pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, 1500 mg/kgBB, dan Simvastatin 4 mg/kg tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok tikus normal (kontrol negatif). Hal ini bermakna bahwa dengan pemberian ekstrak *Dunaliella* sp. dapat menurunkan kadar MDA ginjal dari yang awalnya berada pada kondisi sindrom metabolik menjadi kembali sama seperti kelompok normal (kontrol negatif) yang tidak diberi perlakuan apapun.

Kadar MDA ginjal terendah didapatkan pada kelompok tikus model sindrom metabolik yang diberikan ekstrak *Dunaliella* sp. dengan dosis 1000 mg/kgBB. Akan tetapi, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) antara kadar MDA ginjal pada pemberian *Dunaliella* sp. dosis 1000 mg/kgBB dengan pemberian dosis 500 mg/kgBB, dosis 1500 mg/kgBB, dan pemberian simvastatin 4 mg/kgBB. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Moussa *et al.* (2016) tentang renoprotektif dan pemulihan aktivitas enzim antioksidan (superoksida dismutase, katalase dan glutathione peroxidase) dari *Dunaliella* sp pada toksisitas ginjal akibat induksi logam pada tikus. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya penurunan

signifikan kadar MDA ginjal tikus dengan pemberian ekstrak lipid *Dunaliella* sp pada dosis 5 mg / kg BB / hari selama 30 hari bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif tikus intoksikasi logam. Hal tersebut bermakna bahwa ekstrak *Dunaliella* sp. memiliki efek renoprotektif yang poten yang mungkin dapat diperantarai melalui mekanisme peningkatan aktivitas antioksidan dan penghambatan peroksidasi lipid (Moussa *et al.*, 2016).

Efek renoprotektif dari *Dunaliella* sp. mungkin diperankan oleh adanya kandungan karotenoid di dalam ekstraknya. Mekanisme pasti efek protektif dari karotenoid memang masih belum jelas, tetapi ada bukti dari beberapa penelitian eksperimental yang menyatakan bahwa karotenoid mungkin berperan dalam mekanisme multipel, seperti sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan bahkan sebagai antidiabetes yang telah diteliti sebelumnya pada terapi dan pencegahan resistensi insulin yang berakibat pada diabetik nefropati. (Moussa *et al.*, 2016; Hosseini *et al.*, 2010; Yulianti, 2009; Schoenhals, 2005).

Pada kelompok pemberian simvastatin didapatkan penurunan kadar MDA secara signifikan dibanding kelompok positif karena simvastatin merupakan obat komersial yang berguna dalam penurunan total kolesterol, khususnya LDL. Selain menurunkan kadar kolesterol, simvastatin dapat menurunkan kadar MDA plasma darah tikus secara signifikan, yaitu sebesar 39% hal ini karena obat dari kelompok statin dapat berpotensi sebagai pelindung dari stres oksidatif dengan melawan kerja beberapa ROS, seperti oksigen singlet, anion superoksida, radikal hidroksil, ion hipokorit, dan asam linoleat peroksida. Hal tersebut mendukung fungsi dari simvastatin sebagai antioksidan yang dapat menurunkan kadar MDA dalam tubuh

(Loveric *et al.* 2008). Begitu juga dengan penelitian Iseri *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa simvastatin dapat berfungsi sebagai terapi untuk disfungsi hati dan kerusakan pada organ tikus yang memberikan efek antiinflamasi dengan mengurangi peroksidasi lipid dan fibrosis pada jaringan. Macan *et al.* (2015) menyatakan bahwa pemberian simvastatin dapat menurunkan kadar MDA serum pada tikus wistar normal sebanyak 24% selama 21 hari perlakuan dengan dosis 10 mg/kg BB dengan menghambat enzim HMG KoA reduktase.

Pada penelitian tentang potensi antioksidan sebagai antidiabetes disebutkan bahwa antioksidan sendiri dapat mengurangi stress oksidatif pada penderita diabetes mellitus (Wahyu, 2008). Beberapa dari karotenoid dapat diubah menjadi vitamin esensial seperti misalnya vitamin E, penelitian di Shiga-Jepang pemberian antioksidan vitamin E dapat memperbaiki komplikasi diabetes, memperbaiki fungsi renal, menormalkan hipertensi pada hewan coba yang menderita DM tipe 2 hal ini menunjukkan bahwa stres oksidatif berperan dalam perkembangan diabetes nefropati dan antioksidan sebagai terapeutik DM tipe 2 (Steelsmith, 2001). Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Hosseini *et al.*, (2010) pada hewan coba dengan *renal ischemia/reperfusion injury* menunjukkan adanya penurunan kadar MDA ginjal dengan pemberian β -karoten sehingga penelitian tersebut menyimpulkan bahwa β -karoten dapat bersifat protektif pada ginjal melalui efek antioksidan. Selain itu, kandungan karotenoid lain dalam ekstrak *Dunaliella* sp. seperti astaxanthin juga mungkin berperan dalam penurunan kadar MDA ginjal. Astaxanthin dapat menurunkan konsentrasi trigliserida, kolesterol total, asam lemak nonesterifikasi, ALT, dan AST. *Dunaliella* sp. juga mengandung DHA sebanyak 3,27% dan EPA sebanyak 10,93%

(Astryanti *et al.*, 2017). EPA dan DHA merupakan asam lemak omega 3 tidak jenuh rantai ganda panjang yang efektif dalam penurunan kadar triasilgliserol dalam darah (Micallef dan Garg, 2008). Penurunan kadar trigliserida ini juga dapat mencegah terjadinya akumulasi lemak di ginjal sehingga menurunkan tingkat stres oksidatif dan sekuens selanjutnya, yaitu penurunan proses peroksidasi lipid dan MDA sebagai produk metabolitnya. Sebagai kesimpulannya, *Dunaliella* sp. dapat dipertimbangkan sebagai sumber antioksidan alami yang memiliki efek renoprotektif yang potensial. Efek renoprotektif ini kemungkinan karena adanya kandungan karotenoid dalam ekstraknya yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian lebih lanjut mengenai mikroalga ini perlu dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi komponen renoprotektif pada ekstraknya sehingga dapat dipertimbangkan penggunaannya untuk terapi gangguan ginjal.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak diketahuinya secara spesifik kandungan apakah yang dapat secara signifikan menurunkan kadar MDA ginjal pada ekstrak *Dunaliella* sp.. Selain itu, rentang dosis yang efektif dalam pemberian ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. juga terbatas referensinya karena belum banyaknya penelitian tentang efek pemberian *Dunaliella* sp. terhadap model hewan coba sindrom metabolik.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

1. Ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar model sindrom metabolik.
2. Dosis ekstrak *Dunaliella* sp. memiliki korelasi negatif dengan tingkat keamatan sangat kuat terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) ginjal tikus wistar model sindrom metabolik.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dan pembahasan peneliti menyarankan beberapa hal sebagai berikut.

1. Penelitian lebih lanjut mengenai kandungan spesifik pada *Dunaliella* sp. yang memiliki efek terhadap kadar MDA ginjal hewan coba model sindrom metabolik.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis yang efektif *Dunaliella* sp. dalam menghambat proses peroksidasi lemak tanpa menimbulkan efek toksik yang bersifat berbahaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Baky, H.H., El-Baz, F.K., and El-Baroty, G.S. 2007. Production of Carotenoids From Marine Microalgae and Its Evaluation as Safe Food Colorant and Lowering Cholesterol Agent. *American– Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 2: 792-800.
- Abubakar, M.E., Taylor, A., Ferns, G.A. 2004. The Effect of Aluminium and Selenium Supplementation of Brain and Liver Antioxidant Status in the Rat. *African journal of Biotechnology*. 3(1):88-93.
- Aggarwal, H.K., Jain, D., Sindhu, S., Yadaf, R. 2011. Evaluation of Role of Low Molecular Weight Heparin and Vitamin E on Renal Finctions in Patients With Diabetic Nephropathy. *Dicle Medical Journal*. Vol. 38(2):129-133.
- Alberti, G., Zimmet, P., Shaw, J. 2006. *The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome*. Brussels: International Diabetes Federation.
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., *et al.* 2009. Harmonizing the Metabolic Syndrome: a Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120: 1640–5.
- Alrasyid, H. 2009. Potensi Tempe Kedelai Dalam Terapi Nutrisi Medik pada Obesitas Dewasa dengan Komorbid. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- American Diabetes Association. 1994. *Standards of Medical Care for Patients and Its Complications*, World Health Organization Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva.
- Barrios-Ramos, J., Garduño-Siciliano, L., Loredó-Mendoza, M., Chamorro-Cevallos, G., Jaramillo-Flores, M. 2014. A Quick Model for the Induction of Metabolic Syndrome Markers in Rats. *Internal Medicine*. 4:2.
- Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A. 2015. *Harper's Illustrated Biochemistry, 30th edition*. McGraw-Hill Education, New York.
- Botezelli, J.D., Cambri, L.T., Ghezzi, A.C., Dalia, R.A. 2012. Fructose-Rich Diet Leads to Reduced Aerobic Capacity and to Liver Injury in Rats. *Lipids in Health and Disease*. 11: 78.
- Chang, J.M., Kuo C.M., Chiu Y.W., Chen H.C. 2005. Increased Glomerular and Extracellular Malondialdehyde Levels in Patients and Rats with Diabetic

Nephropathy, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 146(4):210-215.

Chen, Y. 2012. *Metabolism: Carbohydrate*. In: Mooren FC, editor. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; p. 570–3.

Dahmen-Ben Moussa, I., Bellassoued, K., Athmouni, K., Naifar, M., Chtourou, H., Ayadi, H., *et al.* 2016. Protective Effect of *Dunaliella* sp., Lipid Extract Rich in Polyunsaturated Fatty Acids, on Hepatic and Renal Toxicity Induced by Nickel in Rats. *Toxicol Mech Methods*. 26(3), 221-230.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. 2006. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*. 52:601–23.

Dupas, J., Feray, A., Goanvec, C., Guernec, A., Samson, N., Bougaran, P., *et al.* 2017. Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. *Hindawi*. 2017(2494067) :1-10.

Fauci, A.S., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Kasper, D.L., Longo, D.L., Loscalzo, J. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th edition*. McGraw-Hill Education. New York.

Gancheva, S., Zhelyazkova-Savova, M., Galunska, B., Chervenkov, T. 2015. Experimental Models of Metabolic Syndrome in Rats. *Scripta Scientifica Medica*. 47:14–21.

Gani, N., IM Lidya, M.P. 2013. Mariska. Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). *Jurnal MIPA UNSRAT Online* 2 (1) 4449 Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Unsrat, Manado.

Gheith, Osama, *et al.* 2015. „Diabetic Kidney Disease : World Wide Difference of Prevalence and Risk Factors“. *Journal of Nephro pharmacology*. vol. 5, no.1, pp. 49-56.

Gotto, D., Maria L.S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C, *et al.* 2009. Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects for Malondialdehyde Quantification. *Quimica Nova*, Vol. 32(1): 169-174.

Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. 2003. Haematococcus Astaxanthin: Applications for Human Health and Nutrition. *Trends Biotechnology*. 21(5): 210-6.

Halade, G.V., Rahman, M.M., Williams, P.J., Fernandes, G. 2010. High Fat Diet-Induced Animal Model of Age-Associated Obesity and Osteoporosis. *Journal Nutrition Biochemistry*. 21:1162–9.

- Hall, J.E., Crook, E.D., Jones, D.W., *et al.* 2002. Mechanisms of Obesity-Associated Cardiovascular and Renal Disease. *American Journal Medicine Science*.127-137.
- Harun Rasyid Lubis. 2009. Nefropati Diabetik, dalam Sudoyo, Aru W Sudoyo *et al* (eds) *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Edisi Kelima, Jilid III*. Jakarta: Interna Publishing.
- Hendromartono. 2009. Nefropati Diabetik, dalam Sudoyo, Aru W Sudoyo *et al* (eds) *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Edisi Kelima, Jilid III*. Jakarta: Interna Publishing.
- Hosseini, F., Naseri, M.K., Badavi, M., Ghaffari, M.A., Shahbazian, H., Rashidi, I. 2010. Effect of Beta Carotene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status Following Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rat. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*. 70(4), 259-263.
- Iseri, S., Eecan, F., Gedik, N., Yuksel, M., Alican, I. 2007. Simvastatin Attenuates Cisplatin-Induced Kidney and Liver Damage in Rats. *Toxicology*. 230: 256-264.
- Jawi, I.M., Sutirta-Yasa, I.W.P., Mahendra, A.N. 2012. Hypoglycaemic and Antioxidant Activity of Balinese Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L) in Diabetes Induced Rats. *International Confrence of Traditional Chinese Medicine*. Solo 22-23 Juni 2012.
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., *et al.* 1998. Nutritional and Insulin Regulation of Fatty Acid Synthetase and Leptin Gene Ekspresi Throught ADD1/SREBP-1. *Journal of Clinical Investigation*. 101(1); 1-9.
- Krishan, P., Chakkarwar, V.A. 2011. Diabetic Nephropathy: Aggressive Involvement of Oxidative Stress. *Journal Pharmacology Education Research*. 2(1) : 35-41.
- Krisna, P. 2008. Kerusakan Oksidatif (Peroksidasi) Minyak dan Lemak. *11th Lecture of Fat and Oil Technology*. hal. 1-13.
- Landes, V.N. 2005. Vitamin E Elucidation of The Mechanism of Side Chain Degradation and Gene Regulatory Functions, Fakultat Mathematisch-Naturwissenschaftlichen, Postdam.
- Loveric, J., Mesic, M., Macan, M., Koprivanac, M., Kelava, M., Bradamante, V. 2008. Measurement of Malondialdehyde (MDA) Level in Rat Plasma After Simvastatin Treatment Using Two Different Analytical Methods. *Periodicum Biologorum*. 110(1): 63-67.
- Lukiati, B., Aulanni'am, and Darmanto, W. 2012. The Effects of Curcuma Heynena Ethanolic Extract on the Superoxide Dismutase Activity and Histological Pancreas of Type 1 Diabetes Mellitus Rats, *International Journal of Basic and Applied Sciences IJBAS-IJENS*. 12(02):22-30.

- Macan, M., Vukšić, A., Punec, S., Konjevoda, P., Lovrić, J., Kelava, M., *et al.* 2015. Effects of Simvastatin on Malondialdehyde Level and Esterase Activity in Plasma and Tissue of Normolipidemic Rats. *Pharmacological Report.* 67: 907-913.
- Marjani, A. 2010. Lipid Peroxidation Alterations In Type 2 Diabetic Patients. *Pakistan Journal Biological Science.* 13(15):723-730.
- Maulana, A.I. 2010. The Influence of Mungbean (*Phaseolus radiatus*) Sprouts Extract to Renal Cell Damaging of Mice (*Mus musculus*) that be Induced by Paracetamol, *Script*, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta (In Indonesian)
- Nielsen, S., Karpe, F. 2012. Determinants of VLDL-Triglycerides Production. *Current Opinion Lipidology.* 23:321–6. 54.
- Novidiyanto, Farmawati, A., Lestari, L.A. 2011. Pengaruh Pemberian Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* (L.)) Terhadap Kadar Malondealdehid (MDA) Plasma dan Jaringan Hati Tikus Sprague Dawley yang Diberi Pakan Lemak Tinggi. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia.* 13(2) :82-89
- Pardede, S.O. 2008, Nefropati Diabetik pada Anak, *Sari Pediatri Vol.* 10(1):8-17. (In Indonesian)
- Prodjosudjadi, W. 2006. Incidence, Prevalence, Treatment and Cost of End-Stage Renal Disease in Indonesia. *PublicMedicine.* 16(2): 14-16.
- Sanchez Lozada, LG., Tapia, E., Jimenez, A., Bautista, P., Ctistobal, M., Nipomuceno, P. 2007. Fructose Induced Metabolic Syndrome is Associated with Glomerular Hypertention and Renal Microvasculer Damage in Rat. *American Journal Physiology.* 292:F423-F29.
- Schoenhals, K. 2005. Prepared Foods. *Virgo Publishing. Health & Nutrition Division.*
- Setiawan, B., and Suhartono, E. 2005. Oxidative Stress and The Roles of Antioxidant in Diabetes Mellitus, *Majalah Kedokteran Indonesia.* 55(2):86-91. (In Indonesian)
- Shafi, S., Tabassum, N., Ahmad, F. 2012. Diabetic Nephropathy and Herbal Medicines. *International Journal of Phytopharmacology.* 3(1) : 10-17.
- Shivarajashankara, Y.M., Shivashankara, A.R., Gopalakrishna, B.P., Hannumanth, R.K. 2001. Effect of Fluoride Intoxication on Lipid Peroxidation and Antioxidant System in Rats. *Fluoride,* 34(2): 108-113.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures.* Elsevier Mosby, USA.

- Tjokroprawiro, Askandar., Boedi, Poernomo, S., Santoso, Djoko & Soegiarto, Gatot. 2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Ucar, F., Sezer, S., Erdogan, S., Akyol, S., Armutcu, F., Akyol, O. 2013. The Relationship Between Oxidative Stress and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Its Effects on the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Redox report*. 18:4, 127-133.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free Radicals, Metal and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer, *Chemico-Biological Interactions*, Vol.160:1-40.
- Vujičić, Božidar, et al. 2012. Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus : Diabetic Nephropathy. *Institution Technology*. pp. 71-96.
- Wiguno, Prodjosudjadi. 2009. Nefropati Diabetik, dalam Sudoyo, Aru W Sudoyo et al (eds) *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Edisi Kelima, Jilid III*. Jakarta: Interna Publishing.
- Wiyono, P. 2003. The Role of Hyperglycemia in the Development of Chronic Complication of Diabetes Mellitus, *Berkala Ilmu Kedokteran*. 35(1):55-60. (In Indonesian)
- Wong, S.K., Chin, K.Y., Suhaimi, F.H., Fairus, A., Ima-Nirwana, S. 2016. Animal Models of Metabolic Syndrome: a Review. *Nutrition & Metabolism*. 13: 65
- Yulianti, E. 2009. Mikroalbuminuria pada Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2 Hipertensif, *Jurnal Penelitian Saintek*. Vol. 14(1):77-96. (In Indonesian)
- Zivkovic, A.M., German, J.B., Sanyal, A.J. 2007. Comparative Review of Diets for the Metabolic Syndrome: Implications for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal Clinical Nutrition*. 86:285–300.

Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 213.214; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
 http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekret@ub.ac.id

01 OCT 2018

NOTA DINAS
 Nomor: 303 /UN10.F08.10/PN/2018

Yth : Nabilah Hanifah Mukti
 Dari : Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUB
 Derajat : Segera
 Sifat : Terbatas
 Hal : Penambahan Anggota Penelitian

Menanggapi surat Nabilah Hanifah Mukti tentang permohonan penambahan anggota penelitian tanggal 26 Oktober 2018 pada,

Judul : DURACYVER (*Dunaliella* sp. *Therapeutical Potency for Chronic Liver Disease*): Terapi Pengembangan *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* dari Ekstrak *Dunaliella* sp. sebagai Potensi Perbaikan Profil Lipid dan Penurunan TNF- α Hepar Berbasis Hepatoprotektif pada Tikus Wistar Diet Aterogenik.

Peneliti : 1. Nabilah Hanifah Mukti
 2. Shilvia Astryanti
 3. Khalid Amjad
 4. Dara Isnaini Fitriyah
 5. Afyiah Kiyasa Waafi
 6. Livia Lailita Sari

No. Kelaikan Etik : 149 / EC / KEPK - PKM / 06 / 2018

Pada prinsipnya kami menyetujui perubahan tersebut. Dengan demikian pada *ethical clearance* yang sudah kami terbitkan bisa dilampirkan tambahan nama anggota peneliti sebagaimana yang Saudara ajukan a.n. :


1. Olivia Devina Permatasari
2. Adwin Setyanagara
3. Marshal Harvy Wicaksono Pantjoro

Atas perhatian dan kerjasamanya kami sampaikan terima kasih.

Ketua KEPK FKUB.

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjud ES, SpS, SpBS(K) SH, M.Hum, Dr.Hk
 NIK. 160748883

Lampiran 2. Data Hasil Pengukuran MDA

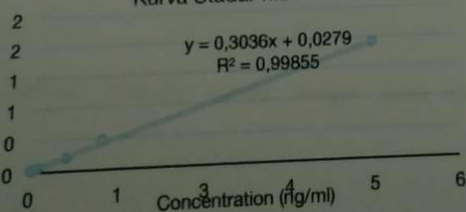


KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
LABORATORIUM FARMAKOLOGI
 Jalan Veteran, Malang 65145, Jawa Timur – Indonesia Telp. (021) (341) 569117,
 567192 Pes. 134, 135 – Fax. (021) (341) 564755
 E-mail: sekr_fk@ub.ac.id Website: http://fk.ub.ac.id

Kadar MDA pada Ginjal Tikus (a/n Adwin)

No	Kode/kel	Abs MDA	Kadar MDA (ng/100 mg)
1	R01	0,057	0,096
2	R02	0,052	0,079
3	R03	0,057	0,096
4	R04	0,057	0,096
5	R05	0,053	0,083
6	R1.1	0,237	0,689
7	R1.2	0,27	0,797
8	R1.3	0,233	0,676
9	R1.4	0,328	0,988
10	R1.5	0,261	0,768
11	R2.1	0,145	0,386
12	R2.2	0,103	0,247
13	R2.3	0,075	0,155
14	R2.4	0,072	0,145
15	R2.5	0,109	0,267
16	R3.1	0,047	0,063
17	R3.2	0,052	0,079
18	R3.3	0,07	0,139
19	R3.4	0,087	0,195
20	R3.5	0,082	0,178
21	R4.1	0,052	0,079
22	R4.2	0,088	0,198
23	R4.3	0,093	0,214
24	R4.4	0,076	0,158
25	R4.5	0,063	0,116
26	R5.1	0,055	0,089
27	R5.2	0,051	0,076
28	R5.3	0,056	0,093
29	R5.4	0,063	0,116
30	R5.5	0,051	0,076

Kurva Stadar MDA



$y = 0,3036x + 0,0279$
 $R^2 = 0,99855$

Malang, 2 November 2018
 a/n Kepala Lab. Farmakologi
 FKUB
 Ko Penelitian

Husnul

Dr. Husnul Khotimah SSI, MKes
 NIP. 197511252005012001

Lampiran 3. Hasil Analisis Data Statistik menggunakan SPSS

		Descriptives					
	Kelompok		Statistic	Std. Error			
MDA_Ginjal	Kelompok Negatif	Mean	.09000	.003728			
		95% Confidence Interval for	Lower Bound	.07965			
		Mean	Upper Bound	.10035			
		5% Trimmed Mean		.09028			
		Median		.09600			
		Variance		.000			
		Std. Deviation		.008337			
		Minimum		.079			
		Maximum		.096			
		Range		.017			
		Interquartile Range		.015			
		Skewness		-.738	.913		
		Kurtosis		-2.584	2.000		
		Dosis 500 mg	Kelompok Positif	Mean	.78360	.056004	
				95% Confidence Interval for	Lower Bound	.62811	
				Mean	Upper Bound	.93909	
				5% Trimmed Mean		.77822	
Median				.76800			
Variance				.016			
Std. Deviation				.125229			
Minimum				.676			
Maximum				.988			
Range				.312			
Interquartile Range				.210			
Skewness				1.368	.913		
Kurtosis				1.961	2.000		
Dosis 500 mg				Mean	.24000	.043786	
				95% Confidence Interval for	Lower Bound	.11843	
				Mean	Upper Bound	.36157	
				5% Trimmed Mean		.23717	

	Median	.24700	
	Variance	.010	
	Std. Deviation	.097908	
	Minimum	.145	
	Maximum	.386	
	Range	.241	
	Interquartile Range	.177	
	Skewness	.737	.913
	Kurtosis	.006	2.000
Dosis 1000 mg	Mean	.13080	.026169
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.05814
	Mean	Upper Bound	.20346
	5% Trimmed Mean	.13100	
	Median	.13900	
	Variance	.003	
	Std. Deviation	.058517	
	Minimum	.063	
	Maximum	.195	
	Range	.132	
	Interquartile Range	.115	
	Skewness	-.167	.913
	Kurtosis	-2.639	2.000
Dosis 1500 mg	Mean	.15300	.025116
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.08327
	Mean	Upper Bound	.22273
	5% Trimmed Mean	.15372	
	Median	.15800	
	Variance	.003	
	Std. Deviation	.056160	
	Minimum	.079	
	Maximum	.214	
	Range	.135	
	Interquartile Range	.109	
	Skewness	-.324	.913

	Kurtosis	-1.741	2.000
Simvastatin	Mean	.09000	.007342
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.06962
		Upper Bound	.11038
	5% Trimmed Mean	.08933	
	Median	.08900	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.016416	
	Minimum	.076	
	Maximum	.116	
	Range	.040	
	Interquartile Range	.029	
	Skewness	1.141	.913
	Kurtosis	1.188	2.000

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	KELOMPOK	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NILAI	A	.303	4	.	.823	4	.150

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA_Ginjal	Kelompok Negatif	.364	5	.029	.750	5	.030
	Kelompok Positif	.257	5	.200*	.869	5	.261
	Dosis 500 mg	.207	5	.200*	.914	5	.492
	Dosis 1000 mg	.212	5	.200*	.910	5	.466
	Dosis 1500 mg	.189	5	.200*	.951	5	.742
	Simvastatin	.227	5	.200*	.874	5	.282

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MDA_Ginjal	Based on Mean	2.846	5	24	.037
	Based on Median	2.326	5	24	.074
	Based on Median and with adjusted df	2.326	5	9.593	.123
	Based on trimmed mean	2.767	5	24	.041

ANOVA

MDA_Ginjal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.798	5	.360	67.040	.000
Within Groups	.129	24	.005		
Total	1.927	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA_Ginjal

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Kelompok Negatif	Kelompok Positif	-.693600*	.046322	.000	-.83682	-.55038
		Dosis 500 mg	-.150000*	.046322	.036	-.29322	-.00678
		Dosis 1000 mg	-.040800	.046322	.948	-.18402	.10242
		Dosis 1500 mg	-.063000	.046322	.749	-.20622	.08022
		Simvastatin	.000000	.046322	1.000	-.14322	.14322
	Kelompok Positif	Kelompok Negatif	.693600*	.046322	.000	.55038	.83682
		Dosis 500 mg	.543600*	.046322	.000	.40038	.68682
		Dosis 1000 mg	.652800*	.046322	.000	.50958	.79602
		Dosis 1500 mg	.630600*	.046322	.000	.48738	.77382
		Simvastatin	.693600*	.046322	.000	.55038	.83682

Dosis 500 mg	Kelompok Negatif		.150000*	.046322	.036	.00678	.29322
		Kelompok Positif	-.543600*	.046322	.000	-.68682	-.40038
	Dosis 1000 mg		.109200	.046322	.211	-.03402	.25242
	Dosis 1500 mg		.087000	.046322	.439	-.05622	.23022
	Simvastatin		.150000*	.046322	.036	.00678	.29322
	Dosis 1000 mg	Kelompok Negatif		.040800	.046322	.948	-.10242
Kelompok Positif			-.652800*	.046322	.000	-.79602	-.50958
Dosis 500 mg			-.109200	.046322	.211	-.25242	.03402
Dosis 1500 mg			-.022200	.046322	.996	-.16542	.12102
Simvastatin			.040800	.046322	.948	-.10242	.18402
Dosis 1500 mg		Kelompok Negatif		.063000	.046322	.749	-.08022
	Kelompok Positif		-.630600*	.046322	.000	-.77382	-.48738
	Dosis 500 mg		-.087000	.046322	.439	-.23022	.05622
	Dosis 1000 mg		.022200	.046322	.996	-.12102	.16542
	Simvastatin		.063000	.046322	.749	-.08022	.20622
	Simvastatin	Kelompok Negatif		.000000	.046322	1.000	-.14322
Kelompok Positif			-.693600*	.046322	.000	-.83682	-.55038
Dosis 500 mg			-.150000*	.046322	.036	-.29322	-.00678
Dosis 1000 mg			-.040800	.046322	.948	-.18402	.10242
Dosis 1500 mg			-.063000	.046322	.749	-.20622	.08022
LSD		Kelompok Negatif	Kelompok Positif	-.693600*	.046322	.000	-.78920
	Dosis 500 mg		-.150000*	.046322	.004	-.24560	-.05440
	Dosis 1000 mg		-.040800	.046322	.387	-.13640	.05480
	Dosis 1500 mg		-.063000	.046322	.186	-.15860	.03260
	Simvastatin		.000000	.046322	1.000	-.09560	.09560

Kelompok Positif	Kelompok Negatif	.693600*	.046322	.000	.59800	.78920
	Dosis 500 mg	.543600*	.046322	.000	.44800	.63920
	Dosis 1000 mg	.652800*	.046322	.000	.55720	.74840
	Dosis 1500 mg	.630600*	.046322	.000	.53500	.72620
	Simvastatin	.693600*	.046322	.000	.59800	.78920
Dosis 500 mg	Kelompok Negatif	.150000*	.046322	.004	.05440	.24560
	Kelompok Positif	-.543600*	.046322	.000	-.63920	-.44800
	Dosis 1000 mg	.109200*	.046322	.027	.01360	.20480
	Dosis 1500 mg	.087000	.046322	.073	-.00860	.18260
	Simvastatin	.150000*	.046322	.004	.05440	.24560
Dosis 1000 mg	Kelompok Negatif	.040800	.046322	.387	-.05480	.13640
	Kelompok Positif	-.652800*	.046322	.000	-.74840	-.55720
	Dosis 500 mg	-.109200*	.046322	.027	-.20480	-.01360
	Dosis 1500 mg	-.022200	.046322	.636	-.11780	.07340
	Simvastatin	.040800	.046322	.387	-.05480	.13640
Dosis 1500 mg	Kelompok Negatif	.063000	.046322	.186	-.03260	.15860
	Kelompok Positif	-.630600*	.046322	.000	-.72620	-.53500
	Dosis 500 mg	-.087000	.046322	.073	-.18260	.00860
	Dosis 1000 mg	.022200	.046322	.636	-.07340	.11780
	Simvastatin	.063000	.046322	.186	-.03260	.15860
Simvastatin	Kelompok Negatif	.000000	.046322	1.000	-.09560	.09560
	Kelompok Positif	-.693600*	.046322	.000	-.78920	-.59800
	Dosis 500 mg	-.150000*	.046322	.004	-.24560	-.05440
	Dosis 1000 mg	-.040800	.046322	.387	-.13640	.05480
	Dosis 1500 mg	-.063000	.046322	.186	-.15860	.03260

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

MDA_Ginjal

		Subset for alpha = 0.05			
	Kelompok	N	1	2	3
Tukey HSD ^a	Kelompok Negatif	5	.09000		
	Simvastatin	5	.09000		
	Dosis 1000 mg	5	.13080	.13080	
	Dosis 1500 mg	5	.15300	.15300	
	Dosis 500 mg	5		.24000	
	Kelompok Positif	5			.78360
	Sig.			.749	.211

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Correlations

		Kelompok_Korelasi	MDA_KorGinjal
Kelompok_Korelasi	Pearson Correlation	1	-.803**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	20	20
MDA_KorGinjal	Pearson Correlation	-.803**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian















