

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Uji Separasi Senyawa dalam Minyak Kelapa Sawit

Dilakukan uji separasi senyawa pada minyak kelapa sawit dengan metode KLT untuk mengetahui adanya kandungan senyawa tocopherols. Noda yang didapatkan pada plat KLT kemudian dilakukan perhitungan nilai R_f sehingga didapatkan data pada Lampiran 1. Nilai R_f hasil penelitian adalah $0,3125 \pm 0,0125$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa tocopherols dalam minyak kelapa sawit, sesuai dengan penelitian Chandrasekaram (2009) yang menjelaskan bahwa nilai R_f standar senyawa tocopherols adalah 0,38.

5.2 Hasil Pengukuran Berat Molekul Kitosan

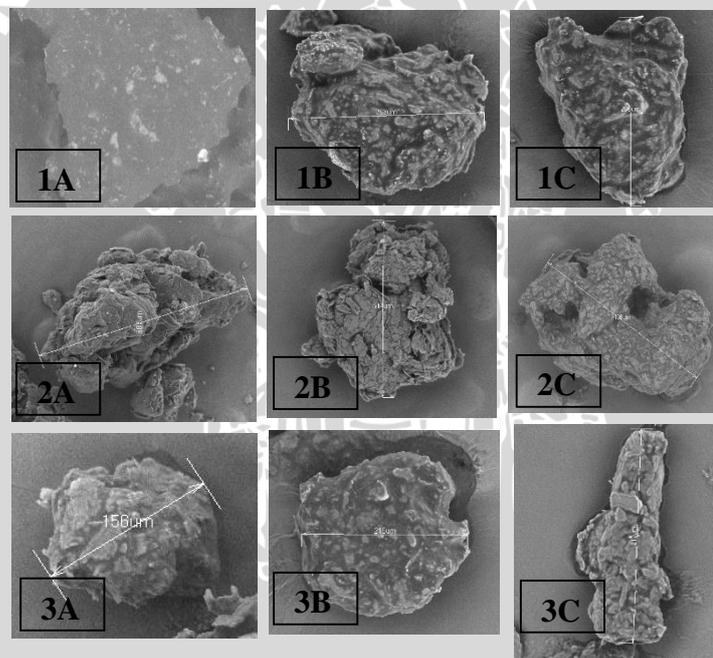
Kitosan berat molekul rendah dibuat dengan depolimerisasi menggunakan HCl 1M, kemudian diukur berat molekulnya dengan pengukuran viskositas intrinsik kitosan dan dilakukan perhitungan dengan persamaan Mark-Houwink. Nilai viskositas intrinsik kitosan dan hasil perhitungan dengan persamaan Mark-Houwink dapat dilihat pada Lampiran 2. Didapatkan hasil pengukuran berat molekul kitosan dari 3 batch yaitu $34,863 \pm 3,830$ kDa dengan massa kitosan berat molekul rendah yang didapatkan yaitu $3,155 \pm 0,098$ gram tiap batch.

Menurut Zhou *et al.* (2013), kitosan dengan berat molekul 19-31 kDa dapat meningkatkan distribusi obat 13 kali lebih banyak di ginjal. Penelitian lain yang dilakukan Gao *et al.* (2014) menunjukkan bahwa penghantaran nanopartikel dengan kitosan BM 40 kDa dapat terakumulasi secara signifikan di korteks ginjal, dibandingkan dengan BM kitosan 190, 250 dan 270 kDa. Penelitian yang dilakukan Yuan *et al.* (2011) menunjukkan bahwa kitosan dengan berat molekul <70 kDa memiliki sifat tertarget yang efisien ke ginjal. Berdasarkan literatur tersebut, hasil uji berat molekul menunjukkan bahwa kitosan berat molekul rendah/LMWC yang

dibuat dalam penelitian masih masuk dalam rentang kitosan yang baik sebagai pembawa ke ginjal.

5.3 Evaluasi Bentuk Mikrosfer

Formulasi mikrosfer antara kitosan berat molekul rendah dan minyak kelapa sawit dilakukan sebanyak 3 batch, dan didapatkan massa mikrosfer yaitu $4,1860 \pm 0,045$ gram tiap batch. Mikrosfer yang telah dibuat kemudian dilakukan evaluasi menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk mengetahui morfologi mikrosfer dari bentuk dan ukurannya. Berikut ini adalah hasil evaluasi mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit menggunakan SEM:



Gambar 5.1 Morfologi Mikrosfer

Keterangan: 1A, 1B dan 1 C adalah mikrosfer batch 1; 2A, 2B dan 2C adalah mikrosfer batch 2; 3A, 3B dan 3C adalah mikrosfer batch 3. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran mikroskop 400x dan 250x.

Berdasarkan gambar 5.1, dapat diketahui bahwa mikrosfer 1A tidak terlihat bentuk partikelnya karena sediaan belum kering dan banyak yang menggumpal sehingga sulit untuk dilakukan uji SEM. Mikrosfer 1B, 1C, 3A, 3B dan seluruh batch 2

berbentuk mendekati sferis. Dari hasil uji SEM, juga didapatkan diameter mikrosfer batch 1 yaitu 263 μm dan 286 μm , diameter mikrosfer batch 2 yaitu $562,33 \pm 108,87 \mu\text{m}$, dan diameter mikrosfer batch 3 yaitu $196,00 \pm 34,66 \mu\text{m}$. Diameter mikrosfer yang didapatkan memenuhi kriteria ukuran partikel mikrosfer yaitu memiliki diameter 1-1000 μm (Manjula *et al.*, 2011).

5.4 Pemantauan Toksisitas Formaldehida

Dalam proses formulasi mikrosfer terdapat penambahan larutan formaldehida, sedangkan paparan formaldehida yang melebihi batas dapat menyebabkan efek buruk bagi kesehatan, diantaranya luka pada saluran pencernaan, mual, muntah, pernafasan menjadi cepat. Pemantauan ini dilakukan untuk memastikan bahwa kadar formaldehida dalam sediaan mikrosfer masih dalam batas aman dan tidak menyebabkan efek buruk bagi kesehatan mencit.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa pemberian formaldehid dengan dosis 25mg/kgBB/hari pada tikus (setara dengan 0,035 mg/gBB mencit) selama 4 minggu tidak menimbulkan efek yang merugikan. Penelitian lain dengan jangka waktu yang lebih panjang, yaitu 2 tahun, menunjukkan bahwa pemberian formaldehid dengan dosis 15mg/kgBB/hari pada tikus tidak menimbulkan efek yang merugikan (WHO, 2005).

Hasil perhitungan pada lampiran 4 menunjukkan bahwa terdapat sekitar 0,0013 mg/gBB (kelompok P3) dan 0,00196 mg/gBB (kelompok P4) formaldehida dalam dosis mikrosfer yang masih dibawah dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan, sehingga masih aman. Selain itu, formaldehida juga memiliki sifat mudah menguap, sehingga kadar formaldehida sesungguhnya dalam mikrosfer masih dapat kurang dari hasil perhitungan. Selama pemberian terapi juga dilakukan pengamatan terhadap hewan coba, dan hewan coba tidak menunjukkan adanya tanda-tanda toksisitas formaldehida.

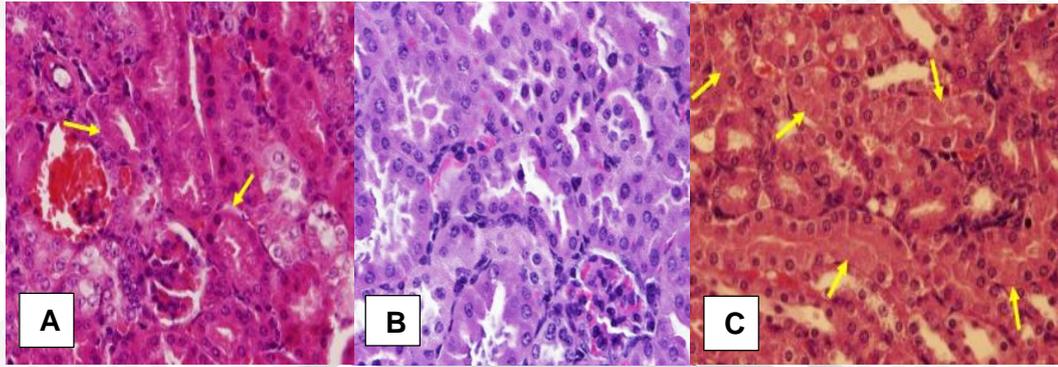
5.5 Pemantauan Toksisitas Aseton

Dalam proses formulasi mikrosfer terdapat penambahan larutan formaldehida, sedangkan paparan aseton yang melebihi batas dapat menyebabkan efek buruk bagi kesehatan, diantaranya iritasi tenggorokan, dada sesak, mengantuk, kehilangan koordinasi, pusing. Pemantauan ini dilakukan untuk memastikan bahwa kadar aseton dalam mikrosfer masih dalam batas aman dan tidak menyebabkan efek buruk bagi kesehatan mencit.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa dosis yang masih aman dan tidak menimbulkan efek yang merugikan pada mencit adalah 2,3 mg/gBB/hari selama 13 minggu (American Chemistry Council Acetone Panel, 2003). Hasil perhitungan pada lampiran 5 menunjukkan bahwa terdapat sekitar 0,75 mg/gBB (kelompok P3) dan 1,12 mg/gBB (kelompok P4) aseton dalam dosis mikrosfer yang masih dibawah dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan, sehingga masih aman. Selain itu, aseton juga memiliki sifat mudah menguap, sehingga kadar aseton sesungguhnya dalam mikrosfer masih dapat lebih sedikit dari hasil perhitungan. Selama pemberian terapi juga dilakukan pengamatan terhadap hewan coba, dan hewan coba tidak menunjukkan adanya tanda-tanda toksisitas aseton

5.6 Evaluasi Keberhasilan Induksi Nekrosis Tubular Akut

Induksi dilakukan pada 30 mencit, dengan 25 mencit diinduksi gentamisin dengan dosis 0,14 mg/gBB selama 5 hari dan 5 mencit sebagai kontrol negatif. Setelah induksi hari ke-5, dilakukan evaluasi histologi. Gambaran histopatologi ginjal ditunjukkan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Histopatologi ginjal setelah induksi

Keterangan: (A) Hasil induksi 5 hari (B) Kontrol normal (C) Hasil induksi 7 hari. Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami nekrosis, ditandai dengan hilangnya nukleus. Pengamatan dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x.

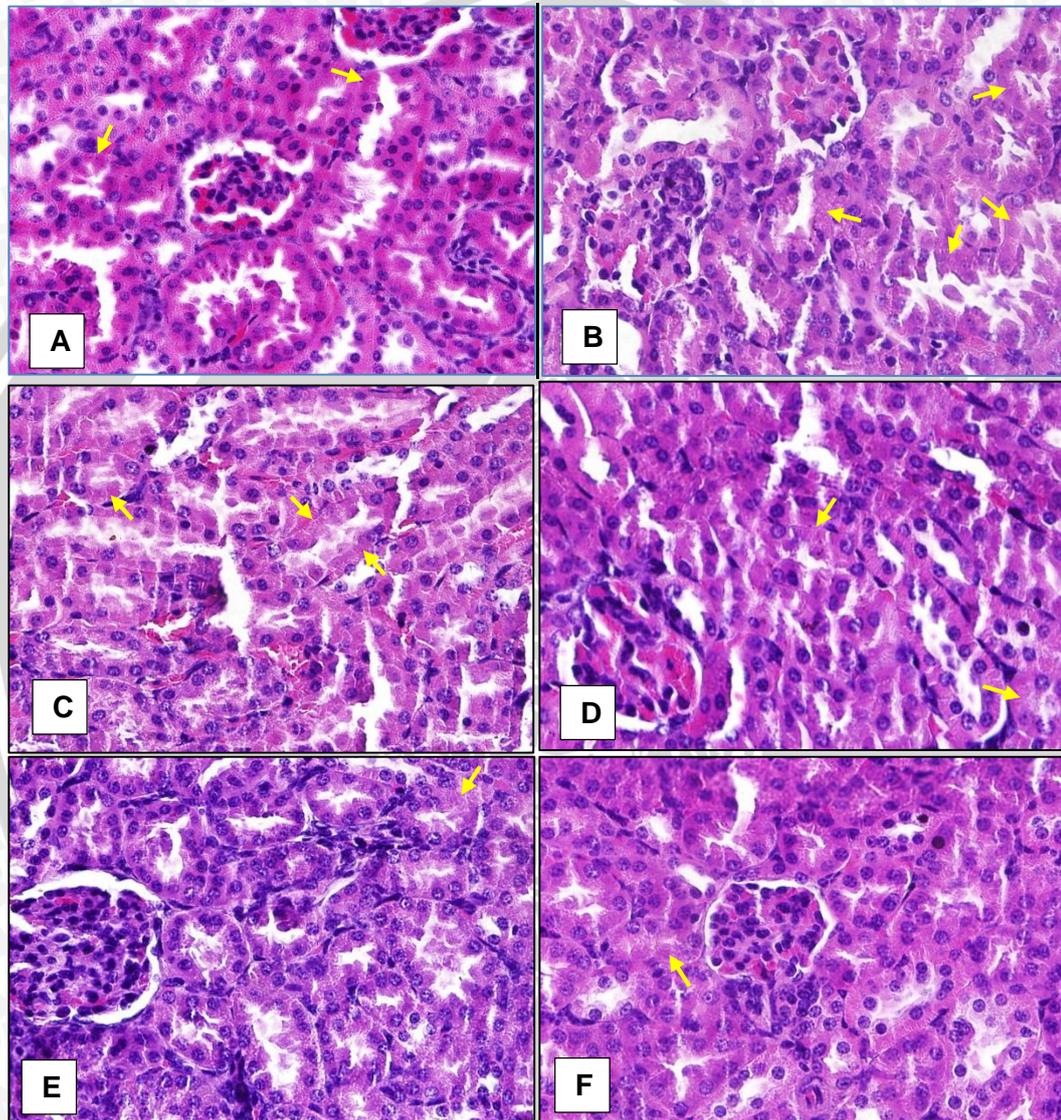
Dari gambaran histopatologi ginjal pada gambar 5.2, diketahui bahwa pada hasil induksi 5 hari sebagian besar sel masih dalam keadaan normal, inti sel sebagian besar masih utuh, hanya sedikit sel tubulus yang nukelusnya menghilang. Beberapa sel juga mengalami *swelling* yang merupakan tanda kerusakan sel yang masih *reversible* dan belum nekrosis. Sehingga diputuskan untuk menambah induksi hingga 7 hari dan dilakukan evaluasi histologi pada 3 mencit. Berdasarkan gambaran histopatologi hasil induksi 7 hari, diketahui bahwa terdapat lebih banyak sel yang mengalami nekrosis dan lebih mudah ditemukan dibandingkan hasil histologi induksi 5 hari. Sehingga hasil induksi 7 hari menunjukkan bahwa mencit telah mengalami NTA.

5.7 Evaluasi Pemberian Terapi

Terapi mikrosfer dan minyak kelapa sawit diberikan secara per oral (p.o) sesuai dosis tiap kelompok perlakuan setiap hari selama 14 hari. Mikrosfer dan minyak kelapa sawit didispersikan terlebih dahulu dalam larutan CMC-Na 1% untuk mempermudah proses pemberian terapi.

5.7.1 Hasil Uji Histopatologi

Pengujian histopatologi difokuskan pada sel tubulus proksimal ginjal, kemudian diamati 10 lapang pandang tiap preparat untuk mengamati adanya kerusakan sel berupa nekrosis. Gambaran histopatologi pada gambar 5.4.



Gambar 5.3. Histologi Ginjal Kelompok Perlakuan

Keterangan: A. Kontrol Negatif (KN); B. Kontrol Positif (KP); C. Perlakuan 1 (P1); D. Perlakuan 2 (P2); E. Perlakuan 3 (P3); F. Perlakuan 4 (P4). Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami nekrosis, ditandai dengan hilangnya nukleus. Pengamatan dengan pewarnaan HE, perbesaran 400x.

Selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah kerusakan sel berupa nekrosis pada sel epitel tubulus proksimal. Didapatkan jumlah sel nekrosis pada Kelompok Normal

(KN) yaitu $282,000 \pm 28,272$ dan Kelompok Positif (KP) yaitu $533,000 \pm 26,242$. Pada kelompok perlakuan yang diberikan terapi, didapatkan jumlah kerusakan sel jauh dari normal pada P1 dan P2 secara berturut-turut yaitu $436,500 \pm 40,353$ dan $318,500 \pm 36,272$. Jumlah kerusakan sel pada P3 dan P4 mendekati kondisi normal (KN) secara berturut-turut yaitu $265,750 \pm 23,128$ dan $289,500 \pm 18,520$.

5.8. Analisis Data

5.8.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Analisis statistik *One Way ANOVA* dapat dilakukan apabila data memiliki distribusi yang normal dan homogen. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui status distribusi data. Data yang memiliki distribusi normal menunjukkan nilai $p > 0,05$ dan sebaliknya. Pada penelitian ini, data yang didapatkan kurang dari 50 sehingga dilakukan Uji *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data. Hasil uji *Shapiro Wilk* didapatkan nilai $p > 0,05$, sehingga diketahui bahwa data memiliki distribusi yang normal. Uji homogenitas dilakukan dengan uji variasi *Levene test*. Berdasarkan hasil uji *Levene*, didapatkan nilai $p > 0,05$ sehingga diketahui bahwa data homogen.

5.8.2 Hasil Uji *One Way ANOVA*

Data jumlah sel nekrosis memiliki distribusi yang normal dan homogen, sehingga dapat dilakukan uji *One Way ANOVA*. Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok pada tiga kelompok atau lebih. Hasil uji ANOVA didapatkan nilai $p < 0,05$ sehingga diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok.

5.8.3 Hasil Uji Post-Hoc LSD

Uji post-hoc LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara signifikan. Hasil menunjukkan perbedaan yang signifikan apabila nilai

$p > 0,05$. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa kelompok Kontrol Positif memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,001$) dengan kelima kelompok lain. P1 dan P2 adalah kelompok dengan pemberian mikrosfer namun berbeda dosis. P1 berbeda signifikan dengan KN dan KP, sedangkan P2 berbeda signifikan dengan KP namun tidak berbeda signifikan dengan KN. P2 dapat memberikan efek yang lebih baik dibandingkan P1. P3 dan P4 berbeda signifikan dengan KP namun tidak berbeda signifikan dengan KN. P3 dapat memberikan efek yang lebih baik dibandingkan P4.

