BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian minyak kelapa sawit baik dalam bentuk mikrosfer kitosan ataupun tidak terhadap kadar CSF-1 pada kondisi gagal ginjal akut secara *in vivo* menggunakan hewan coba *Mus musculus* dengan kriteria yang telah dicantumkan pada kriteria inklusi dan eksklusi. Berdasarkan hasil perhitungan maka besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor yang dibagi ke dalam 6 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit. Pemberian mikrosfer dan minyak kelapa sawit dilakukan selama 14 hari.

5.1. Uji Separasi Komponen Minyak Kelapa Sawit

Uji separasi komponen minyak kelapa sawit dilakukan dengan metode KLT (Kolom Lapis Tipis) menggunakan plat silika sebagai fase diam dan eluen yaitu campuran n-heksan dan isopropanol dengan perbandingan 98:2 sebanyak 20 mL sebagai fase gerak. Noda yang diperoleh kemudian diamati secara visual atau dibawah sinar UV λ =254 nm untuk mempermudah pengamatan noda (Chandrasekaram, 2009). Noda yang diperoleh diukur jaraknya dengan batas bawah plat dan dihitung nilai Rf nya dengan persamaan (Bele dan Anubha, 2011):

Rf= Jarak noda dengan batas bawah

Jarak batas atas dan batas bawah

sehingga diperoleh nilai rata-rata Rf sebesar 0,3125 ± 0,0141 dengan rincian perhitungan yang tertera di Lampiran 1. Nilai Rf yang dihasilkan mendekati dengan nilai Rf kelompok senyawa tokols dalam minyak kelapa sawit yaitu 0,34

(Chandrasekaram, 2009). Berdasarkan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa minyak kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian mengandung kelompok senyawa tocols yang umumnya terkandung dalam minyak kelapa sawit.

5.2. Pembuatan Kitosan Berat Molekul Rendah

Pembuatan kitosan Berat Molekul Rendah (BMR) dilakukan dengan metode deasetilasi dimana kitosan direaksikan dengan HCl 1M. Kitosan yang digunakan sebanyak 8 gram dalam HCl sebanyak 800 mL dengan nilai rata-rata bobot akhir kitosan BMR sebesar 3,1550 ± 0,0980 gram dan dengan rincian perhitungan yang tertera di Lampiran 2.

5.2.1. Pengukuran Berat Molekul

Kitosan BMR dilarutkan dalam asam asetat 1% sebanyak 100 mL hingga diperoleh konsentrasi 0,00%; 0,02%; 0,04%; 0,06%; dan 0,08% untuk diukur viskositasnya menggunakan viskometer sehingga diperoleh data viskositas yang dapat diolah menjadi data nilai berat molekul melalui persamaan *Mark-Houwink* (Paramita dkk., 2012). Melalui pengukuran tersebut, diperoleh data viskositas spesifik yang kemudian dikonversi menjadi nilai berat molekul. Rata-rata berat molekul yang diperoleh adalah sebesar 34,837 ± 3,849 kDa dengan rincian perhitungan terdapat di Lampiran 3.

Berat molekul kitosan BMR yang diperoleh dari penelitian ini tidak memenuhi kriteria berat molekul kitosan yang optimal untuk sistem penghantaran ke ginjal karena tidak di dalam rentang 19-31 kDa (Zhou *et al.*, 2013). Namun terdapat penelitian menunjukkan bahwa kitosan dengan berat molekul <70 kDa lebih mudah menuju ke ginjal melalui sistem filtrasi glomelurus (Yuan *et al.*, 2010). Hal tersebut juga didukung dengan hasil penelitian lain yang menunjukkan bahwa berat molekul kitosan 40 kDa

memiliki akumulasi yang paling signifikan di ginjal apabila dibandingkan dengan berat molekul kitosan sebesar 190; 250; dan 270 kDa (Gao *et al.*, 2014). Berdasarkan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa berat molekul kitosan BMR tetap dapat digunakan untuk membantu sistem penghantaran ke ginjal.

5.3. Pembuatan Mikrosfer dan Evaluasi Bentuk Mikrosfer

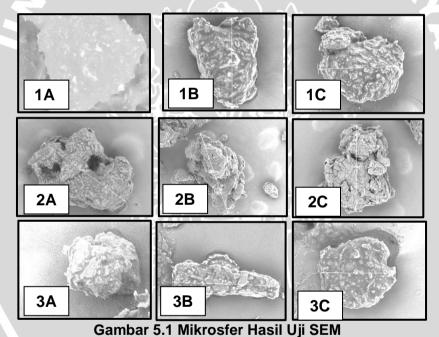
Minyak kelapa sawit dalam mikrosfer kitosan dibuat melalui metode cross linking menggunakan S-TPP sebagai cross-linking agent. Minyak kelapa sawit yang digunakan adalah sebanyak 10 mL atau setara dengan 9,13 gram untuk tiap formulasi. Dalam proses pembuatan mikrosfer digunakan formaldehid agar terbentuk partikel mikrosfer dan digunakan aseton sebagai agen pembilas. Hasil dari pembuatan mikrosfer dikeringkan dengan kertas saring. Mikrosfer yang telah kering kemudian dilakukan penimbangan sehingga diperoleh bobot rata-rata sebesar 4,1860 ± 0,1432 gram dengan rincian perhitungan yang tertera di Lampiran 4.

5.3.1. Evaluasi Bentuk Mikrosfer Minyak Kelapa Sawit

Mikrosfer yang telah kering kemudian ditempatkan di gelas objek dan kemudian dimasukkan ke alat untuk dilapisi dengan Au (Aurum) sebelum dilakukan pengamatan dengan SEM. Prosedur pelapisan mikrosfer dengan Au dilakukan selama ±15 menit. Setelah selesai, mikrosfer dimasukkan ke dalam alat untuk diamati bentuknya. Diameter yang diperoleh dari hasil uji SEM dilakukan untuk 3 batch dimana untuk hasil uji SEM mikrosfer batch 1 hanya diperoleh dua data diameter yaitu sebesar 263 dan 289 μm. Hasil uji SEM mikrosfer batch 2 diperoleh diameter rata-rata sebesar 562,3 ± 109 μm dan batch 3 sebesar 196,0 ± 35 μm. Melalui data tersebut maka dapat terlihat bahwa rata-rata diameter yang dihasilkan masih sesuai dengan karakter ukuran

mikrosfer yaitu dengan rentang diameter sebesar 1-1000 µm (Sahil *et al.*, 2011). Diameter mikrosfer telah dilakukan uji normalitas dan homogenitas dengan hasil distribusi data yang normal dan memiliki variasi data yang homogen yang ditandai dengan nilai p<0,05 sehingga data diameter mikrosfer dapat dianalisis menggunakan uji parametrik *independent t-test* sehingga diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa diameter mikrosfer batch 2 dan 3 memiliki perbedaan yang signifikan, ditandai dengan nilai signifikansi (p < 0,05) (Stang, 2014). Rincian perhitungan dari data diameter mikrosfer tersebut telah tertera di Lampiran 5.

Bentuk yang dihasilkan dari mikrosfer masing-masing batch adalah sebagai berikut,



Keterangan: (1A) (200x), **(1B)** (400x), dan **(1C)** (400x) merupakan mikrosfer hasil batch 1; **(2A)** (200x), **(2B)** (150x), dan **(2C)** (250x) merupakan mikrosfer hasil batch 2; dan **(3A)** (600x), **(3B)** (500x), dan **(3C)** (400x) merupakan mikrosfer hasil batch 3.

Melalui uji SEM dapat terlihat bahwa mikrosfer yang dihasilkan dari formulasi ini memiliki bentuk yang bervariasi. Mikrosfer 1A merupakan mikrosfer batch 1 yang belum melalui proses pengeringan dengan kertas saring sehingga mikrosfer masih lembab dan menggumpal. Hal ini menyebabkan mikrosfer 1A sulit untuk

ditentukan bentuknya maupun ukurannya. Mikrosfer 3B memiiliki bentuk yang lonjong. Mikrosfer 3C dan 3A memiliki bentuk yang *spheric* sedangkan mikrosfer lainnya memiliki bentuk yang hampir *spheric*.

Baik dari segi ukuran maupun bentuk, mikrosfer hasil formulasi ini sebagian besar telah memenuhi kriteria mikrosfer yaitu dengan diameter rata-rata 1-1000 µm dan dengan bentuk yang *spheric*. Karakteristik mikrosfer yang seperti ini yang dapat membantu sistem penghantaran obat (Sahil *et al.*, 2011). Ukuran mikrosfer yang optimal sebagai sistem penghantaran ke ginjal adalah sebesar 180-700 µm (Manjula *et al.*, 2011 dan Stein, 2013). Berdasarkan pernyataan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit yang dihasilkan memiliki ukuran yang optimal untuk membantu sistem penghantaran obat menuju ke ginjal.

5.3.2. Evaluasi Toksisitas Aseton

Aseton yang digunakan dalam formulasi adalah sebanyak 30 mL dimana 10 mL digunakan untuk membilas saat penyaringan dan 20mL digunakan untuk pembilasan terakhir sebelum dilakukan pengeringan (Kumar *et al.*, 2012). Setelah dilakukan formulasi mikrosfer, dapat dihitung perkiraan konsentrasi aseton yang kemungkinan dikonsumsi mencit yaitu sebesar 0,749 mg/gBB/hari untuk KP1 dan 1,124 mg/gBB/hari untuk KP2 dimana kedua kelompok diberikan selama 2 minggu dengan rincian perhitungan yang tertera di Lampiran 6.

Pemberian aseton dapat menyebabkan mencit kehilangan kesadarannya setelah 35 menit kemudian dengan pemberian sebanyak 100-200 mg/L. Dosis toksisitas akut dari aseton yang dinyatakan dalam dosis Ld₅₀ dari aseton untuk mencit dengan pemberian secara oral adalah sebesar 5.200 mg/KgBB atau setara dengan 5,2 mg/gBB. Selain itu, diketahui pula dosis yang aman untuk toksisitas sistemik pada mencit adalah sebesar 2.300 mg/KgBB/hari atau setara

dengan 2,3 mg/gBB/hari untuk mencit jantan dalam pemberian selama 13 minggu. Dosis ini dinyatakan sebagai dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan (*American Chemistry Council Acetone Panel*, 2003).

Berdasarkan data yang ada maka dapat diketahui bahwa kadar aseton yang dikonsumsi oleh hewan coba masih berada dalam dosis yang aman atau dibawah dosis toksik ataupun dosis yang dapat menimbulkan efek merugikan. Karakteristik aseton yang mudah menguap dapat menyebabkan semakin berkurangnya kadar aseton dalam mikrosfer ketika proses pengeringan selama 18 jam dan proses penyimpanan sediaan. Selama perlakuan, tidak ditemukan gejala toksisitas aseton yang muncul akibat paparan aseton dosis tinggi yaitu mengantuk dan iritasi.

5.3.3. Evaluasi Toksisitas Formaldehid

Minyak kelapa sawit yang diformulasi dalam bentuk mikrosfer membutuhkan senyawa formaldehid dengan konsentrasi 1,3% sebagai pembentuk partikel. Kadar yang digunakan dalam formulasi adalah sebanyak 3 mL (Kumar *et al.*, 2012). Setelah dilakukan perhitungan, kadar formaldehid yang kemungkinan dikonsumsi hewan coba adalah sebesar 0,0013 mg/gBB/hari untuk KP1 dan 0,00196 mg/gBB/hari untuk KP dimana masing-masing diberikan selama 2 minggu dengan rincian perhitungan yang tertera di Lampiran 6.

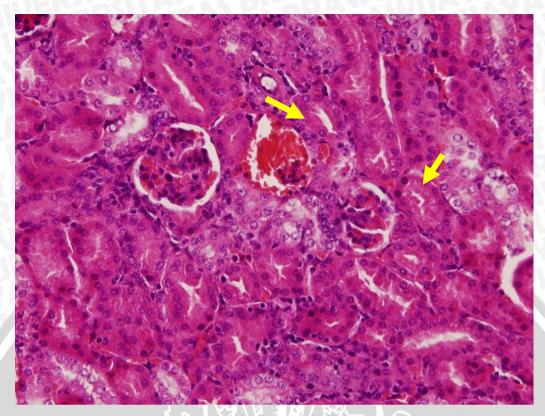
Dosis toksik formaldehid untuk paparan akut dengan pemberian secara oral pada tikus dinyatakan dalam bentuk dosis Ld₅₀ yaitu sebesar 800 mg/KgBB atau setara dengan 1,12 mg/gBB pada mencit. Ketika formaldehid dipaparkan pada tikus dalam jangka waktu singkat, maka telah ditentukan satuan dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan adalah sebesar 25mg/KgBB/hari atau setara dengan 0,035 mg/gBB/hari pada mencit dimana pada studi ini paparan dilakukan selama 4 minggu. Studi lain menjelaskan pula bahwa paparan jangka

panjang formaldehid yaitu selama 2 tahun dengan dosis sebesar 15 mg/KgBB pada tikus atau setara dengan 0,021 mg/gBB/hari pada mencit tidak menunjukkan adanya efek merugikan (WHO, 2005).

Berdasarkan data yang ada maka dapat terlihat bahwa kadar mikrosfer yang dikonsumsi hewan coba masih berada dalam dosis aman atau di bawah dosis toksik untuk penggunaan formaldehid baik secara akut maupun kronis. Formaldehid juga memiliki titik didih rendah dan bersifat mudah menguap sehingga memungkinkan terjadinya penurunan kadar formaldehid dalam sediaan mikrosfer selama proses penyimpanan sediaan. Hasil pengamatan gejala klinis dari toksisitas formaldehid pada mencit selama prosedur perlakuan tidak menunjukkan adanya gejala toksisitas yang mungkin muncul yaitu seperti muntah, pendarahan saluran pencernaan, dan diare.

5.4. Evalusai Hasil Induksi

Berdasarkan literatur, induksi GGA pada tikus menggunakan gentamicin dapat dilakukan selama 4-10 hari dengan rentang dosis gentamicin sebesar 40-200 mg/KgBB. Durasi induksi yang umumnya digunakan untuk induksi GGA dengan gentamicin adalah selama 5 hari menggunakan dosis gentamicin sebesar 100 mg/KgBB atau setara dengan 0,14 mg/gBB pada mencit secara intraperitonial (ip) (Singh *et* al., 2012). Berdasarkan data literatur tersebut maka dilakukan induksi GGA pada mencit dengan gentamicin 0,14 mg/gBB secara ip selama 5 hari sehingga diperoleh salah satu hasil histologi sebagai berikut,

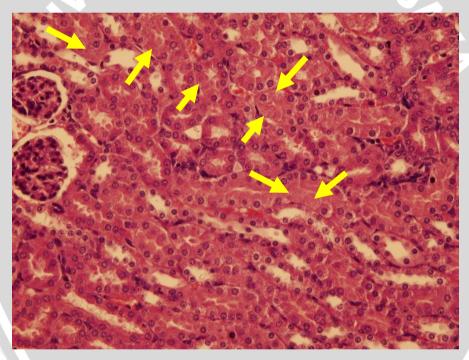


Gambar 5.2 Hasil Histologi Ginjal Induksi 5 Hari Keterangan: Hasil histologi diamati dengan menggunakan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosi (HE) dan dengan perbesaran 400 kali.

Efek nefrotoksik yang ditimbulkan oleh gentamicin umumnya terjadi di tubulus proksimal sehingga pengamatan histologi untuk evaluasi hasil induksi difokuskan pada sel tubulus proksimal (Leung et al., 2004). Berdasarkan Gambar 5.2, terlihat bahwa beberapa sel tubulus proksimal telah mengalami nekrosis yang ditandai dengan panah berwarna kuning dimana sel tersebut telah kehilangan inti sel nya, namun sebagian besar sel tubulus lainnya masih memiliki ini sel yang utuh. Bagian tubulus proksimal terdiri dari beberapa sel yang kemudian membentuk lumen yang berbentuk lingkaran. Masing-masing sel tubulus memiliki inti sel yang terlihat berwarna biru dengan epitel sel yang berwarna merah muda. Ketika mengalami nekrosis, akan terlihat epitel yang sudah kehilangan inti. Pada preparat histologi sampel yang diinduksi selama 5 hari, jumlah sel tubulus proksimal yang nekrosis cukup minimal.

Kegagalan induksi tersebut dilanjutkan dengan pengulangan induksi menggunakan gentamicin dengan dosis yang sama secara ip selama 7 hari dimana pada hari ke-7 terdapat 1 mencit yang mati dari 4 mencit yang diinduksi. Hal ini menjadi salah satu pertimbangan penggunaan durasi induksi dengan gentamicin 0,14 mg/gBB selama 7 hari.

Mencit yang telah diinduksi GGA dengan gentamicin dilakukan pembedahan setelah 4 hari injeksi gentamicin terakhir untuk diambil ginjalnya dan dilakukan pengamatan secara histologi. Hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut,



Gambar 5.3 Hasil Histologi Ginjal Induksi 7 Hari Keterangan: Hasil histologi diamati dengan menggunakan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosi (HE) dan dengan perbesaran 400 kali.

Pengamatan histologi ini juga menggunaan pewarnaan dan perbesaran yang sama dengan induksi 5 hari dimana hasil menunjukkan terdapat lebih banyak sel tubulus proksimal yang mengalami nekrosis pada **Gambar 5.3** apabila dibandingkan dengan **Gambar 5.2**. Kondisi yang menunjukkan adanya nekrosis sel tubulus dapat disebut juga dengan NTA dimana NTA atau

Nekrosis Tubular Akut merupakan gangguan pada sel-sel yang ada di ginjal, khususnya sel tubulus, yang terjadi baik akibat iskemi maupun paparan nefrotoksik (Rinawati dan Aulia, 2011). Berdasarkan pernyataan tersebut maa dapat disimpulkan bahwa hewan coba telah mengalami NTA setelah induksi dengan gentamicin 0,14 mg/gBB selama 7 hari.

5.5. Uji Efektivitas Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit baik dalam bentuk mikrosfer maupun yang tidak diberikan ke mencit yang telah diinduksi gentamicin. Pemberian dilakukan secara oral selama 14 hari. Mikrosfer maupun minyak kelapa sawit didispersikan dalam CMC Na 1% b/v untuk mempermudah proses pemberian.

5.5.1. Pengukuran CSF-1

Setelah diberikan perlakuan dengan mikrosfer maupun minyak kelapa sawit, dilakukan pembedahan terhadap mencit untuk dilakukan pengambilan organ ginjal. Ginjal yang telah diambil kemudian dicuci dengan laruan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) untuk menghilangkan darah dari organ. Ginjal kemudian dihancurkan untuk membentuk lisat jaringan dan kemudian dilakukan preparasi uji elisa CSF-1. Setelah dilakukan pengukuran kadar CSF-1 menggunakan spektrofotometri, diperoleh nilai rata-rata kadar CSF-1 tiap satu milligram ginjal mencit untuk KP, P1, P2, P3, dan P4 yang disajikan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Kadar Rata-Rata CSF-1 Ginial

raboron mada mata mata oo i onja	
Kelompok	Kadar CSF-1 tiap 1 mg Ginjal Mencit (ng/L)
KP	0.080 ± 0.033
P1	$0,220 \pm 0,076$
P2	$0,180 \pm 0,104$
P3	$0,300 \pm 0,103$
P4	0,120 ±0,090

Untuk KN memiliki kadar CSF-1 dengan nilai minimal sebesar 0,099 ng/L dengan nilai maksimum sebesar 0,270 ng/L dan nilai median sebesar 0,255 ng/L. Rincian data dan perhitungan telah terlampir di Lampiran 7.

Hasil analisis uji normalitas menunjukkan kadar CSF-1 kelompok KN memiliki distribusi yang tidak normal sedangkan kelompok lainnya normal. Melalui nilai rata-rata, dapat terlihat bahwa kadar CSF-1 KP adalah paling rendah yang kemudian diikuti dengan P4, P2, P1, dan P3 dimana P1 dan P3 memiliki kadar CSF-1 yang cenderung mendekati KN.

5.6. Analisis Hasil

Rincian hasil analisis data pengukuran kadar CSF-1 telah tertera di Lampiran 7. Data kadar CSF-1 yang didapatkan kemudian dilakukan uji normalitas setiap kelompoknya sehingga diperoleh nilai signfikansi KN, KP, P1, P2, P3, dan P4 berturut-turut 0,033; 0,187; 0,221; 0,227; 0,743; 0832; dan 0,061. Hasil uji normalitas menyatakan bahwa distribusi data KN tidak normal yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi sebesar 0,033 atau p < 0,05 sedangkan kelompok lainnya memiliki distribusi yang normal yang ditandai dengan nilai signifikansi p > 0,05. Untuk menganalisis hasil perlakuan diperlukan perbandingan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol sehingga untuk mengatasi distribusi KN yang tidak normal, dilakukan transformasi data menjadi bentuk cosinus. Hasil uji normalitas transformasi data CSF-1 menjadi bentuk cosinus menunjukkan distribusi data P4 yang tidak normal dengan nilai signifikansi sebesar 0,012 (p < 0,05), sehingga diputuskan untuk melakukan analisis secara terpisah antara kelompok perlakuan minyak kelapa sawit dengan kelompok kontrol dan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan kelompok kontrol dimana terdapat pertimbangan lain yang mendukung hal ini yaitu perbedaan kadar minyak kelapa sawit yang diberikan ke mencit antara kelompok

perlakuan minyak kelapa sawit dengan kelompok perlakuan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit. Kelompok perlakuan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan kelompok kontrol dilakukan analisis parametrik sedangkan kelompok perlakuan minyak kelapa sawit dengan kelompok kontrol dilakukan analisis non parametrik.

Data kadar CSF-1 untuk KN, KP, P1, dan P2 hasil transformasi kemudian dilanjutkan dengan uji variasi dengan hasil yang menunjukkan bahwa data memiliki variasi yang homogen, dibuktingan dengan nilai signifikansi (p > 0.05) vaitu sebesar 0,207. Data yang memiliki distribusi normal dan homogen dapat dilanjutkan untuk dilakukan analisis parametrik one way ANOVA. Jenis analisis parametrik yang dipilih adalah one way ANOVA karena desain penelitian yang digunakan adalah posttest only, dimana paired ANOVA dipilih ketika desain penelitian yang digunakan adalah pretest dan posttest. Hasil uji one way ANOVA dari kadar CSF-1 ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok yang ditandai dengan nilai signifikansi sebesar 0,008 (p < 0,05). Untuk membandingkan perbedaan kadar CSF-1 tiap kelompok, dilakukan analisis post-hoc dengan metode LSD sehingga diperoleh hasil yang menunjukkan beberapa kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini ditandai dengan nilai signifikansi (p < 0,05), yaitu pada kelompok KN terhadap KP dengan nilai p sebesar 0,025; KP terhadap P1 dan P3 dengan nilai p berturut-turut 0.03 dan 0.01; dan P4 terhadap P1 dan P3 dengan nilai p berturutturut 0,014 dan 0,006.

Data kadar CSF-1 untuk KN, KP, P3, dan P4 kemudian dilakukan analisis non parametrik *krusal wallis*. Metode analisis non parametrik *kruskal wallis* merupakan metode analisis non parametrik yang dapat menggantikan analisis parametrik *one way ANOVA*. Hasil analisis ini menunjukkan nilai signifikansi

sebesar 0,049 (p < 0,05). Hasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan antar kelompok.

Sekalipun tidak dapat ditarik kesimpulan dari perbandingan hasil perlakuan minyak kelapa sawit dengan hasil perlakuan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit, namun perlu dilakukan perbandingan untuk mengetahui perbedaan kadar CSF-1 yang dihasilkan dari kondisi perlakuan pada penelitian ini. Untuk mengetahui perbandingan antara kelompok perlakuan minyak kelapa sawit dengan kelompok perlakuan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit, kadar CSF-1 tanpa hasil transformasi dilakukan analisis parametrik menggunakan *one way ANOVA* antara KP, P1, P2, P3, dan P4. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat beberapa kelompok yang memiliki perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan yang ditandai dengan nilai signifikansi (p < 0,05), diantaranya adalah KP dengan P1 dan P3 dengan nilai signifikansi 0,016 dan 0,007.