

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas telah menjadi masalah kesehatan global dan menyebabkan berbagai komplikasi. Data tentang jumlah kasus obesitas pada hewan kesayangan bervariasi tergantung pada lokasi, populasi hewan, dan metode survei yang digunakan. Obesitas pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing menjadi masalah kesehatan yang semakin umum di banyak negara. Studi-studi telah menunjukkan bahwa prevalensi obesitas pada hewan kesayangan dapat mencapai tingkat yang cukup tinggi, dengan beberapa survei menunjukkan bahwa lebih dari 50% dari populasi hewan kesayangan menderita obesitas atau kelebihan berat badan. Kejadian obesitas meningkat sebesar 37% pada anjing dan 90% pada kucing (Ryan, 2018). Hasil dari berbagai penelitian yang diterbitkan dalam 15 tahun terakhir menunjukkan bahwa, di negara-negara barat, antara 11,5% hingga 63% hewan kesayangan yang mengalami obesitas. Data tersebut cukup menunjukkan bahwa obesitas pada hewan kesayangan juga terjadi di negara Indonesia (Tarkosova *dkk.*, 2016).

Jumlah kejadian obesitas pada hewan kesayangan dikombinasikan dengan efek samping yang signifikan berarti bahwa pencegahan dan manajemen sangat penting untuk menjaga kesehatan dan kesejahteraan hewan kesayangan yang optimal. Pencegahan dan pengelolaan obesitas yang efektif membutuhkan identifikasi obesitas yang akurat, serta apresiasi terhadap prevalensi dan pengetahuannya tentang faktor risiko, yang telah diselidiki oleh beberapa studi terbaru. Faktor-faktor seperti pola makan yang tidak sehat, kurangnya aktivitas fisik, dan kurangnya kesadaran pemilik hewan terhadap kebutuhan gizi hewan peliharaan mereka dapat berkontribusi pada masalah obesitas ini. Berbagai metode untuk menilai komposisi tubuh dan mengkategorikan tingkat obesitas telah dikembangkan. Individu biasanya diklasifikasikan sebagai obesitas jika lebih dari 20% lebih berat dari berat badan ideal. Studi pada hewan kesayangan menunjukkan bahwa obesitas dapat berkontribusi terhadap perubahan struktural dan fungsional organ pankreas yang ditandai dengan adanya peningkatan lemak di organ pankreas yang dapat menyebabkan peradangan dan stres oksidatif (Pottathil *dkk.*, 2020). Peradangan dan stres oksidatif di dalam organ pankreas dapat mempengaruhi fungsi sel beta yang bertanggung jawab untuk memproduksi insulin menyebabkan ketidakseimbangan dalam regulasi glukosa darah pada hewan yang mengalami obesitas.

Hiperglikemia adalah kondisi di mana kadar glukosa darah melebihi batas normal. Kondisi ini merupakan salah satu faktor resiko utama pada keadaan obesitas. Pada sebagian besar model hewan, diet tinggi lemak sering kali menyebabkan obesitas dapat menyebabkan hiperglikemia. Obesitas memengaruhi terutama di jaringan perifer, sehingga meningkatkan resiko (*dkk.*, 2015). Ketika hiperglikemia terjadi secara terus-menerus, akan pembentukan radikal bebas. Jika radikal bebas ini tidak dapat merusak makromolekul sel dan memicu penyakit degeneratif hiperglikemia yang tidak terkontrol



juga dapat menyebabkan komplikasi serius seperti hiperosmolaritas, ketoasidosis diabetik, dan asidosis laktat (Jin *dkk.*, 2023).

Penelitian telah menganalisis alternatif pengobatan pada kasus hiperglikemia pada hewan kesayangan yang memiliki kemanjuran terapeutik tanpa menyebabkan efek samping yang signifikan (Pottathil *dkk.*, 2020). Dalam konteks ini, pengobatan alternatif seperti penggunaan herbal telah menjadi fokus penelitian. Beberapa herbal, seperti ekstrak daun delima (*Punica granatum Linn.*) telah menunjukkan potensi dalam mengurangi peradangan dan stres oksidatif, serta meningkatkan sensitivitas insulin tanpa efek samping yang signifikan. Beberapa kandungan potensial dalam daun delima diantaranya *punicalagins*, *ellagic acid*, *polifenol*, *flavonoids*, *antosianin* dan *tannins* yang telah terbukti memiliki sifat antiinflamasi dan antioksidan. Kandungan dari daun delima tersebut bekerja dengan cara meredam dampak negatif dari radikal bebas sehingga menjadi stabil, serta memberikan efek menguntungkan terhadap penurunan stres oksidatif, regulasi glukosa darah dan struktur histopatologi organ-organ terkait (Yuniarto *dkk.*, 2018).

Flavonoid yang mengandung antioksidan dapat secara efektif mencegah kerusakan sel β pankreas secara berkelanjutan. Hal ini memungkinkan sel β di pulau *Langerhans* pankreas untuk mengalami regenerasi dan kembali menghasilkan insulin yang dilepaskan ke dalam darah, sehingga bermanfaat pada kondisi hiperglikemia. Penelitian lebih lanjut tentang potensi daun delima sebagai obat untuk mengatasi hiperglikemia pada hewan kesayangan perlu dikembangkan agar dapat meningkatkan nilai terapinya dan memberikan manfaat yang lebih luas. (Savitri *dkk.*, 2022). Oleh karena itu, penulis mengajukan proposal penelitian tentang “**Pengaruh Ekstrak Daun Delima (*Punica Granatum Linn.*) Terhadap Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Pakan Diet Tinggi Lemak**” agar dapat mengetahui secara lebih mendalam terkait potensi dari ekstrak daun delima terhadap hiperglikemia dan histopatologi organ pankreas tikus putih yang mengalami obesitas.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Bagaimana efek pemberian ekstrak daun delima terhadap kadar glukosa darah tikus obesitas yang diberi pakan diet tinggi lemak?
- b. Bagaimana efek pemberian ekstrak daun delima terhadap gambaran histopatologi organ pankreas tikus yang diberi pakan diet tinggi lemak?

1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

1.3.1.1 Tujuan Umum Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak daun delima memiliki idap organ pankreas pada tikus yang diberi pakan diet tinggi



s Penelitian

penelitian ini adalah sebagai berikut.

mengetahui apakah ekstrak daun delima dapat mempengaruhi kosa darah tikus obesitas yang diberi pakan diet tinggi lemak.

- b. Untuk mengetahui apakah ekstrak daun delima dapat mempengaruhi gambaran histopatologi organ pankreas tikus obesitas yang diberi pakan diet tinggi lemak.

1.3.2 Manfaat Penelitian

1.3.2.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pengembangan ilmu, serta sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya yang ingin meneliti lebih lanjut dan mengembangkan produk herbal yang dapat memperbaiki kadar glukosa darah pada kondisi hiperglikemia dan memperbaiki kerusakan pankreas.

1.3.2.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi produk herbal yang aman dikonsumsi sebagai produk herbal yang dapat memperbaiki kadar glukosa darah dan memperbaiki kerusakan pankreas.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dirumuskan berdasarkan tinjauan pustaka, teori yang relevan, serta temuan penelitian sebelumnya, dan akan diuji kebenarannya melalui analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini. Hipotesis dalam penelitian ini bahwa terdapat perubahan yang positif terhadap gambaran histopatologi pada organ pankreas tikus yang diberi pakan diet tinggi lemak dan atau tidak terdapat perubahan terhadap gambaran histopatologi pada organ pankreas tikus yang diberi pakan diet tinggi lemak.

1.5 Keaslian penelitian

Sejauh penelusuran pustaka penulis, publikasi penelitian mengenai “Pengaruh ekstrak daun delima (*Punica granatum L.*) terhadap pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi lemak” belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian yang pernah dilakukan berkaitan dengan penelitian ini adalah penelitian oleh Lei dkk., (2007) dengan judul “Evidance of anti-obesity effects of the pomegranate leaf exact in hight-fat diet induced obese mice”.

1.6 Tinjauan pustaka

1.6.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*), yang sering disebut sebagai tikus norwegia, merupakan salah satu hewan yang sering digunakan dalam eksperimen laboratorium (Rosidah dkk., 2020). Salah satu perbedaan utama dari tikus dengan hewan percobaan lainnya adalah bahwa tikus tidak memiliki kemampuan untuk muntah. Ini disebabkan oleh struktur anatomi yang tidak lazim. Esofagus langsung bermuara ke dalam lambung dan tidak terdapat kantong empedu. Selain itu, tikus putih memiliki keunggulan sebagai model yang mencerminkan karakteristik fungsional dari sistem tubuh mamalia.



Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) (Al-Hajj dkk., 2016)

Menurut Myres dan Armitage (2004), tikus putih dapat diklasifikasikan sebagai berikut.

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathia
Famili	: Muridae
Sub-famili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus juga menjadi salah satu hewan percobaan yang populer dalam penelitian tentang fungsi reproduksi karena memiliki siklus reproduksi yang singkat. Beberapa keunggulan lainnya adalah perkembangbiakan yang cepat, ukuran yang lebih besar daripada mencit, dan kemampuan untuk dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis khas seperti albino, kepala kecil, ekor yang lebih panjang dari tubuhnya, pertumbuhan yang cepat, sifat yang baik, tingkat laktasi yang tinggi, dan toleransi yang cukup baik terhadap perlakuan. Pada umumnya, tikus putih mencapai berat antara 35-40 gram pada usia empat minggu, dan berat badannya mencapai rata-rata 200-250 gram saat dewasa (Rosidah *dkk.*, 2020).

1.6.2 Daun delima (*Punica granatum Linn*)

1.6.2.1 Deskripsi tanaman delima (*Punica granatum Linn*)

Daun delima (*Punica granatum*) adalah daun yang berasal dari tanaman delima, sebuah tumbuhan yang dikenal karena buahnya yang berwarna merah cerah dan kaya akan nutrisi. Tanaman delima (*Punica granatum Linn.*) tumbuh sebagai pohon kecil atau semak yang berasal dari wilayah Persia (Iran), Afghanistan, dan pegunungan Himalaya. Tanaman ini kemudian menyebar ke kawasan Mediterania, Afrika, dan Eropa. Saat ini, delima juga dapat tumbuh di wilayah tropis dan subtropis. Daunnya berwarna hijau tua, oval, dan sedikit mengkilap. Memiliki ujung daun yang runcing dan pinggiran daun yang halus. Pohon delima sering ditemukan di pekarangan rumah dan dimanfaatkan sebagai tanaman hias maupun bahan obat-obatan. Buahnya yang memiliki rasa asam dan manis dapat dikonsumsi secara langsung. Daun delima, yang termasuk dalam famili *Punicaceae* dan termasuk dalam keluarga pohon dan semak, berwarna hijau mengkilap dan berbentuk bulat telur, dapat tumbuh hingga 3 cm (Kandylis dan Kokkinomagoulos, 2020).

1.6.2.2 Klasifikasi delima (*Punica granatum Linn*)



Delima merupakan tanaman dikotil dari famili *Punicaceae* yang berasal dari Timur Tengah dipercaya sebagai tanaman obat alami sejak 1550 SM (Kandyliis dan Kokkinomagoulos, 2020).

Kerajaan : Plantae
Sub kerajaan : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliopsida
Sub kelas : Rosidae
Ordo : Myrtales
Famili : Punicaceae
Genus : *Punica L.*
Spesies : *Punica granatum L.*

1.6.2.3 Kandungan senyawa daun delima (*punica granatum L.*)

Menurut Morton (1987), klasifikasi dari *Punica granatum* sebagai berikut. Menurut (Pangesti dkk., 2021), tanaman delima mengandung senyawa bioaktif yang digunakan sebagai bahan obat. Daun delima mengandung senyawa flavonoid, tanin, terpenoid, saponin, dan polifenol yang menunjukkan aktivitas antioksidan dan antimikoba.

1. *Flavonoid*

Flavonoid adalah salah satu kelompok metabolit sekunder yang sering ditemukan pada jaringan tanaman. Senyawa ini termasuk golongan fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. *Flavonoid* yang terkandung dalam daun delima memiliki kemampuan untuk mengontrol kadar glukosa darah. Senyawa *flavonoid* pada daun delima, seperti 2,4-dihidroksi-3-metoksidihidrokalon dan 8-hidroksi-6-metoksiflavin, berfungsi sebagai agen hipoglikemik dengan mekanisme menghambat penyerapan glukosa, meningkatkan sensitivitas insulin, mempercepat pengambilan glukosa oleh jaringan perifer, dan mengatur enzim metabolisme. Selain itu, *flavonoid* juga dapat menghambat aktivitas *Glucose Transporter-2 (GLUT-2)* yang berperan dalam pengangkutan glukosa di saluran pencernaan (Pangesti dkk., 2021).

2. *Tanin*

Tanin adalah senyawa *polifenol (C₆-C₃-C₆)* yang mampu mengendapkan protein dan membentuk kompleks dengan *polisakarida*. Tanin terdiri dari kelompok *oligomer* dan *polimer*. Senyawa ini dapat mengikat protein sehingga protein nabati menjadi lebih tahan terhadap degradasi oleh enzim *protease* di dalam *silo* atau *rumen*. Tanin juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi *protoplasma* bakteri (Pangesti dkk., 2021).



lah turunan dari senyawa terpena yang mengalami proses genasi. *Terpen (C₅H₈)* merupakan kelompok hidrokarbon yang tumbuh dan beberapa hewan tertentu. *Terpenoid* termasuk yang memiliki aroma khas dan dapat diekstraksi melalui minyak atsiri (Heni dkk., 2015). Sebagai agen antibakteri, dapat berinteraksi dengan porin (protein transmembran) pada

membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga porin mengalami kerusakan.

4. Saponin

Saponin adalah glikosida alami yang terikat pada senyawa *steroid* atau *triterpen* dan dikenal sebagai agen antibakteri. *Saponin* memiliki kemampuan menghasilkan busa saat dilarutkan dalam air karena kandungan senyawa aktifnya. Mekanisme kerja *saponin* adalah meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri, menyebabkan membran menjadi tidak stabil sehingga dinding sel mengalami kerusakan atau lisis. Dengan mengganggu tegangan permukaan dinding sel, saponin memungkinkan zat antibakteri menembus sel dan mengganggu metabolisme bakteri sehingga menyebabkan kematian sel (Isnarianti, 2016).

5. Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang berasal dari struktur dasar fenol, yaitu cincin benzena yang tersubstitusi dengan gugus *-OH*. *Polifenol* dikenal sebagai senyawa kimia dengan aktivitas antioksidan yang kuat dan memiliki ciri khas berupa banyaknya gugus *fenolik* dalam molekulnya. Menurut Rosidah *dkk.* (2016), *polifenol* berperan dalam memberikan warna pada tanaman, misalnya warna daun saat musim gugur. Sebagai agen antibakteri, *polifenol* bekerja dengan merusak dan menembus dinding sel bakteri, mengendapkan protein, dan bertindak sebagai racun pada protoplasma. *Polifenol* dengan molekul besar dapat menonaktifkan enzim esensial dalam bakteri meskipun dalam konsentrasi rendah, sehingga menyebabkan kerusakan sel, denaturasi protein, dan hilangnya fungsi sel.

1.6.2.4 Manfaat daun delima (*Punica granatum Linn.*) sebagai antihiperqlikemia

Daun delima bermanfaat sebagai antihiperqlikemia karena kandungan *flavonoid* glikosida yaitu asam *punicic*, asam *ellagic*, *ellagitanins* (*punicafolin*, *pumicalin*, dan *punicalagins*), *flavonol*, *antosianidin*, *antosianin*, *glikosida* dan *flavon* yang memiliki aktifitas antioksidan. *Flavonoid* dapat menyebabkan pemecahan poligosakarida menjadi terhambat karena menghasilkan efek inhibisi atau penghambatan aktivitas enzim *α-glukosidase* (enzim yang dapat memecah karbohidrat menjadi glukosa pada usus halus) yang memberikan pengaruh pada penyerapan glukosa darah sehingga terjadi pengurangan hiperglemik (Pangesti *dkk.*, 2021). Menurut penelitian Kang *dkk.*, (2015), daun delima memiliki aktifitas antioksidan yang tinggi yang dapat membantu melindungi sel-sel pankreas dari kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif. Sejumlah *flavonoid* dalam daun delima telah dikaitkan dengan efek antiinflamasi yang dapat meredakan peradangan yang terkait dengan hiperglikemia.

Selain *flavonoid*, senyawa *alkaloid* dapat memblokir absorpsi glukosa di usus untuk menurunkan kadar glukosa darah, penghambatan enzim yang memiliki peran *αogenesis* serta peningkatan oksidasi dari glukosa *6-fosfat* merupakan cara meningkatkan transportasi glukosa. Proses ini akan berperan dalam pembentukan glukosa dari substrat lain selain *saponin* pada daun delima juga menghasilkan efek penurunan dengan cara menghambat aktivitas protein *alfa glikosidase* yaitu yang jawab terhadap perubahan karbohidrat menjadi glukosa (Pangesti *dkk.*, 2021).



Pemberian antioksidan mampu meningkatkan massa sel β pankreas dan menjaga kandungan insulin di dalamnya. *Polifenol* yang terkandung dalam ekstrak daun delima mampu mengurangi stres oksidatif dengan cara mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksil (OH) *polifenol* untuk mengikat radikal bebas dan membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi. Hal ini mencegah terjadinya reaksi berantai perubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida. Peran *polifenol* sebagai antioksidan diduga mampu melindungi sel β pankreas dari efek toksik radikal bebas (Mansur dkk., 2022).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun delima dapat memiliki efek antiinflamasi, yang dapat bermanfaat untuk mengurangi peradangan pada pankreas. Beberapa penelitian praklinis juga menunjukkan bahwa senyawa-senyawa dalam daun delima dapat berpotensi mempengaruhi kadar glukosa darah dan mengobati resistensi insulin, yang dapat bermanfaat pada kondisi seperti diabetes (Putri dkk., 2016). Hasil penelitian sebelumnya yang terkait menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima merah 200 miligram per kilogram berat badan per hari (mg/kgBB/hari) selama 14 hari terbukti menurunkan kadar glukosa dan SOD (*Superoxide Dismutase*) darah secara bermakna pada tikus putih diabetes akibat diinduksi aloksan.

Enzim SOD (*Superoxide Dismutase*) sebagai antioksidan endogen garis pertahanan pertama, segera bereaksi dengan ROS (*Reactive oxygen spesies*) untuk menghambat terjadinya stres oksidatif. Pada kondisi jumlah ROS (*Reactive oxygen spesies*) yang tinggi, diperlukan antioksidan tubuh yang tinggi untuk menetralsirkannya. Kehadiran senyawa-senyawa ini menyebabkan terpenuhinya kebutuhan senyawa antioksidan untuk melawan stres oksidatif dan memutus reaksi berantai radikal bebas sehingga melindungi sel-sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. Akibatnya SOD (*Superoxide Dismutase*) dapat disintesis dalam jumlah mencukupi dan kemudian aktif bekerja meredam radikal bebas (Mirontoneng dkk., 2019).

1.6.3 Obesitas

1.6.3.1 Istilah obesitas

Obesitas adalah gangguan nutrisi yang terjadi akibat ketidakseimbangan energi, ditandai dengan akumulasi jaringan adiposa secara berlebihan di dalam tubuh organisme. Penentuan derajat obesitas terutama tergantung pada *Body Condition Score* (BCS) yang diperkirakan dengan palpasi tulang rusuk, pangkal ekor dll. Berbagai kelainan metabolisme, sterilisasi, usia dan jenis kelamin, pola makan yang tidak sehat, dll dapat menjadi penyebab utama obesitas. Obesitas merupakan faktor risiko yang signifikan sebagai faktor predisposisi terjadinya sindrom metabolik, termasuk intoleransi glukosa, hipertensi, dislipidemia, obesitas sentral, *fatty liver* dan resistensi insulin.



meningkatkan beban ekonomi yang signifikan dalam biaya perawatan berat badan lebih dari 10% dari berat normal dianggap obesitas dan berat badan lebih dari 20% dianggap obesitas (Artha dkk.,

Obesitas

adalah kondisi yang ditandai dengan akumulasi lemak tubuh yang berlebihan akibat ketidakseimbangan antara asupan kalori dan pengeluaran energi. Secara patofisiologis,

obesitas melibatkan berbagai mekanisme yang saling berinteraksi, termasuk peningkatan jumlah dan ukuran sel-sel lemak (adiposit), serta perubahan dalam fungsi adiposit. Peningkatan lemak *visceral*, yang terakumulasi di sekitar organ internal, dapat menyebabkan gangguan metabolik seperti resistensi insulin, peradangan kronis, dan disfungsi hormonal. Adiposit yang membesar melepaskan berbagai sitokin pro-inflamasi, seperti *TNF- α* dan *interleukin-6*, yang memicu peradangan sistemik. Selain itu, kelebihan lemak tubuh juga mengganggu fungsi normal jaringan tubuh, meningkatkan produksi hormon-hormon yang berperan dalam metabolisme energi, seperti leptin dan adiponektin. Leptin, yang seharusnya mengatur rasa kenyang dan metabolisme energi, justru menjadi tidak efektif pada individu obesitas karena resistensi terhadap leptin. (Jin dkk., 2023).

Adipokin, atau adipositokin, adalah zat bioaktif yang dapat menyebabkan peradangan kronis tingkat rendah saat jaringan adiposa diperluas. Apabila jaringan adiposa meningkat, sekresi adipokin pro-inflamasi yang tidak teratur meningkat dan pelepasan asam lemak bebas meningkat. Kemudian mengubah respons inflamasi dan metabolisme glukosa dan lemak, menyebabkan sindrom metabolik. Selain itu, obesitas menyebabkan *fenotipe* jaringan adiposa berubah dari *makrofag anti-inflamasi (M2)* ke pro-inflamasi (*M1*). Produksi adipokin dari jaringan adiposa sebagai anti-inflamasi, termasuk *adiponektin* dan *IL-10 (Interleukin-10)* juga menurun. Obesitas juga dapat beresiko menyebabkan gangguan seperti inflamasi dan resistensi insulin (Artha dkk., 2019).

1.6.3.3 Hubungan obesitas dengan organ pankreas

Obesitas adalah penumpukan lemak yang berlebih karena surplus kalori, memicu proses inflamasi yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Kerusakan akibat stres oksidatif pada pankreas dapat mengakibatkan fungsi organ pankreas terganggu sehingga tidak mampu memproduksi hormon insulin yang diperlukan pada proses masuknya glukosa dari sirkulasi ke dalam sel sehingga kadar gula darah meningkat. Jaringan adiposa mengalami inflamasi pada keadaan obesitas, sehingga menghasilkan adipokines untuk merangsang produksi *Reactive Oxygen Species (ROS)*, *Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α)* dan *Interleukin-6 (IL-6)* (Pasupuleti dkk., 2020).

Obesitas memicu proses inflamasi yang dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif dan peningkatan kadar IL-6 yang dapat menyebabkan berbagai penyakit metabolik dan degeneratif. Peningkatan massa jaringan adiposa meningkatkan sekresi asam lemak yang memicu tingginya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang tinggi memicu terjadinya inflamasi yang diawali dengan peningkatan kadar *Nuclear Factor kappa B (NFkB)* sehingga kadar *TNF α* (*Tumor Necrosis Factor alfa*) dan *IL-6 (Interleukin-6)* ikut naik. Sitokin inflamasi bekerja melalui penghambatan sinyal reseptor insulin dengan mengaktifkan faktor *inhibitor kinase NFkB (Nuclear Factor kappa B)* yang asi substrat reseptor insulin dan bekerja secara sinergis an kerusakan sel B pankreas (Beandrade dkk., 2022).

ng sama, sel berusaha memenuhi kebutuhan akan glukosa asam lemak dan juga senyawa yang *non*-karbohidrat melalui is. Penggunaan asam lemak dan protein ini menyebabkan dan benda keton, produk samping yang menyebabkan cairan tubuh (asidosis metabolik). Kondisi ini menyebabkan



terjadinya peningkatan stres oksidatif yang kemudian mengganggu pembentukan protein, termasuk SOD (*Superoxide Dismutase*) sehingga aktivitasnya menurun (Amelia dan Luhulima, 2020).

Tikus yang mengalami obesitas akan mengalami kerusakan sel β pankreas, yang mana sel β sendiri mempunyai fungsi meningkatkan masuknya glukosa ke dalam sel sehingga jika terjadi kerusakan, produksi insulin akan menurun dan tidak mampu mengarahkan pemasukan glukosa ke dalam sel-sel jaringan, dan terjadilah hiperglikemia. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan aktivitas enzim *xantin oksidase* yang bekerja merubah *xantin* menjadi asam urat, senyawa oksidan alami endogen. Obesitas dapat memicu resistensi insulin melalui peningkatan massa jaringan adiposa. Peningkatan massa jaringan adiposa menyebabkan perubahan patologis pada adipokin yaitu hormon yang dihasilkan oleh sel lemak (adiposit).

Salah satu perubahan penting adalah peningkatan pelepasan adipokin yang bersifat proinflamasi, seperti leptin dan adiponektin. Dua adipokin ini memiliki peran kunci dalam mengatur sensitivitas insulin dan metabolisme glukosa yang mengatur sensitivitas insulin. Jika terjadi resistensi insulin akibat perubahan pada adipokin dan disertai obesitas, pankreas mungkin merespons dengan peningkatan produksi insulin. Peningkatan ini bertujuan untuk mengatasi resistensi insulin dan menjaga kadar glukosa darah dalam batas normal. Namun, jika resistensi insulin terus berlanjut, pankreas dapat mengalami kelelahan dan akhirnya tidak dapat memproduksi insulin yang cukup. Perubahan pada organ pankreas terkait dengan peningkatan massa jaringan adiposa melibatkan penyesuaian produksi insulin untuk mengatasi resistensi insulin yang muncul akibat obesitas (Beandrade *dkk.*, 2022).

1.6.5 Glukosa darah

Karbohidrat yang masuk ke saluran pencernaan akan diuraikan menjadi monosakarida yang dihasilkan menjadi sumber energi untuk sel-sel tubuh. Glukosa adalah monosakarida utama yang bertindak sebagai sumber energi utama bagi sel-sel tubuh. Glukosa yang dihasilkan dari pemecahan karbohidrat kemudian masuk ke dalam aliran darah. Untuk digunakan sebagai sumber energi, glukosa dalam aliran darah perlu masuk ke dalam sel-sel tubuh. Kadar glukosa dalam darah dijaga tetap konstan dalam tubuh, dengan peningkatan yang minimal jika terjadi. Keseimbangan antara masuk dan keluarnya glukosa dalam aliran darah melibatkan mekanisme katabolisme dan anabolisme glukosa itu sendiri. Jika glukosa tidak dibutuhkan untuk kebutuhan segera, glukosa akan disimpan sebagai glikogen di hati. Proses penguraian glikogen, yang disebut glikogenolisis, terjadi ketika pasokan glukosa rendah. Jika cadangan glikogen hati tidak mencukupi, proses selanjutnya adalah glukoneogenesis, yaitu sintesis glukosa dari bahan baku non-karbohidrat (Nurmawati, 2017).



Joseph *dkk.*, (2015), kadar glukosa darah normal tikus berkisar pada 72-105 mg/dL, dan untuk tikus betina 69-102 mg/dL (Joseph *dkk.*, 2015). Jumlah kenaikan kadar yang berbeda-beda antara hewan pada kondisi fisiologis yang berbeda dan jumlah penurunan kadar glukosa setelah perlakuan dapat disebabkan oleh faktor endogen

masing-masing tikus putih yang bersifat individual dan banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor non fisik dan lingkungan (Jiwintarum *dkk.*, 2017).

Konsentrasi glukosa darah dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk asupan makanan, metabolisme karbohidrat, dan regulasi hormon seperti insulin dan glukagon. Hormon insulin diproduksi oleh sel-sel beta dalam pankreas dan membantu menurunkan kadar glukosa darah dengan mempromosikan penyerapan glukosa oleh sel-sel tubuh. Di sisi lain, hormon glukagon meningkatkan kadar glukosa darah dengan merangsang pemecahan glikogen menjadi glukosa dalam hati. Peningkatan kadar glukosa darah dapat terjadi sebagai akibat dari obesitas, karena jaringan adiposa yang berlebihan dapat menyebabkan resistensi insulin. Jumlah kenaikan kadar glukosa darah yang berbeda-beda antara hewan coba disebabkan karena kondisi fisiologis yang berbeda dan jumlah penurunan kadar gula darah yang bervariasi setelah perlakuan dapat disebabkan oleh faktor endogen masing-masing tikus putih yang bersifat individual dan banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor *non* fisik dan lingkungan (Nurmawati, 2017).

Glukosa darah tinggi (hiperglikemia) adalah kondisi meningkatnya kadar glukosa darah di atas nilai normal yang disebabkan oleh gangguan metabolisme yang terjadi pada pankreas, ditandai dengan peningkatan glukosa atau hiperglikemia karena menurunnya jumlah insulin dari pankreas. Hiperglikemia terbagi menjadi dua jenis, yaitu akut dan kronis. Hiperglikemia akut terjadi ketika kadar glukosa darah meningkat atau menurun drastis dalam waktu singkat, dengan komplikasi yang sering terjadi berupa hipoglikemia, yaitu kondisi kadar glukosa darah di bawah batas normal. Sementara itu, hiperglikemia kronis dapat memicu produksi radikal bebas yang berlebihan akibat proses auto-oksidasi glukosa, modifikasi protein, dan gangguan keseimbangan antioksidan tubuh. Komplikasi dari gula darah yang tinggi (hiperglikemia) yang tidak terkontrol dapat menyebabkan diabetes dan sejumlah penyakit metabolik lainnya (Jiwintarum *dkk.*, 2017). Adapun diagnosis hiperglikemia pada hewan model seperti tikus didasarkan pada *Fasting Blood Glucose Levels (FBGL)*.

1.6.6 Pankreas Tikus Putih

1.6.6.1 Anatomi Pankreas Tikus Putih

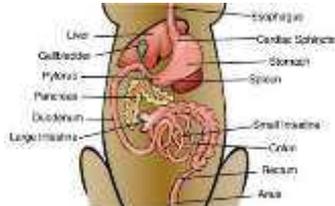
Secara anatomi, pankreas adalah kelenjar yang terletak di kuadran kiri atas perut, dengan bagian kepalanya melekat pada duodenum. Pankreas terdiri dari jaringan eksokrin, yang menghasilkan enzim-enzim seperti *amilase*, *peptidase*, dan *lipase*, serta jaringan endokrin, yang memproduksi hormon insulin, glukagon, dan somatostatin (Haligur, 2018). Pankreas merupakan kelenjar pencernaan aksesoris *retroperitoneal* yang terletak pada tubuh vertebra di dinding perut bagian belakang. Kelenjar ini terbagi menjadi empat bagian: kepala, leher, badan, dan ekor.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

as memiliki bentuk seperti huruf "C" dan memanjang dari berada di atas pembuluh *mesenterika superior* di bawah bidang melekat kuat pada sisi medial bagian *descendens* dan horizontal bawah kepala pankreas terdapat penonjolan yang disebut ng memanjang ke arah *medial* kiri di belakang *arteri mesenterika* as berukuran pendek, sekitar 1,5-2 cm panjangnya, dan berada *erika superior*, yang membentuk celah ke arah belakang. Bagian

depan leher ini dilapisi oleh *peritoneum* dan berdekatan dengan bagian *pilorus* lambung. Badan pankreas terletak di sebelah kiri *vena mesenterika superior*, melintasi *aorta* dan vertebra *L2*, serta berada di belakang *bursa omentalis* pada bidang *transpilorik*. Permukaan depan badan pankreas dilapisi oleh *peritoneum*, yang menjadi dasar *bursa omentalis* dan termasuk dalam rongga perut. Ekor pankreas terletak di depan ginjal kiri, dekat *hilus* limpa, dan sudut *kolik* kiri. Bagian ekor ini umumnya bersifat lebih fleksibel dan berada di antara lapisan ligamen splenorenal serta pembuluh darah limpa.

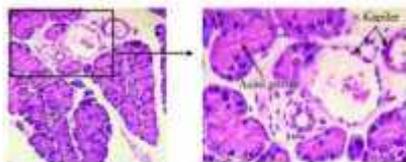


Gambar 3. Anatomi kelenjar pankreas pada tikus (Haligur *dkk.*, 2018)

Pankreas juga memiliki saluran utama yang dikenal sebagai "*ductus pancreaticus*" yang dimulai dari ekor pankreas dan berjalan melalui parenkim kelenjar menuju kepala pankreas. Saluran ini kemudian bergabung dengan *ductus biliaris*, membentuk *ampulla hepatopankreatik*, yang bermuara pada *papila duodenum mayor* di bagian *descendens duodenum*. Fungsi eksokrin pankreas melibatkan produksi dan sekresi enzim pencernaan ke dalam saluran pencernaan, sedangkan fungsi endokrin pankreas melibatkan produksi dan pelepasan hormon ke dalam peredaran darah. Sel-sel eksokrin di kelenjar pankreas menghasilkan enzim pencernaan, termasuk *lipase* (untuk pemecahan lemak), *amilase* (untuk pemecahan karbohidrat), dan *tripsin* (untuk pemecahan protein). Enzim-enzim pencernaan ini dikirim melalui saluran pankreas ke *duodenum* (bagian pertama usus halus) sebagai respon terhadap makanan yang masuk. Beberapa enzim yang dihasilkan dalam bentuk *zimogen* dan diaktivasi setelah mencapai *duodenum*, untuk mencegah pencernaan berlebihan di dalam pankreas sendiri (Longnecker, 2014).

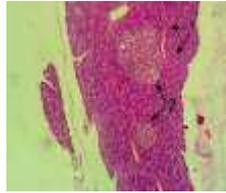
1.6.6.2 Histologi Pankreas

Bagian eksokrin pankreas terdiri dari kelenjar asinar yang strukturnya menyerupai kelenjar parotis. Bagian ini menghasilkan enzim yang disertai dengan cairan alkali dalam jumlah besar, yang dialirkan melalui saluran pankreas menuju *duodenum*. Sementara itu, bagian endokrin pankreas terdiri dari pulau-pulau *Langerhans*, yang merupakan kumpulan sel sekretori (sekitar 3000 sel) yang ditopang oleh serat *retikulin* dan memiliki banyak kapiler fenestrasi. Sekresi dari kelenjar *asinar* mengalir ke saluran dengan *epitel kuboid* sederhana yang rendah, yang berubah menjadi *epitel kuboid* pada saluran yang lebih besar.



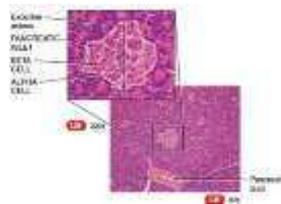
struktur histologi pankreas tikus normal (Rosiana *dkk.*, 2019)

Pulau-pulau *Langerhans* dikelilingi oleh jaringan ikat halus dan tampak lebih pucat dibandingkan dengan sel-sel eksokrin di sekitarnya. Hal ini disebabkan oleh *retikulum endoplasma kasar (rER)* yang lebih sedikit pada sel-sel di dalamnya (Setiadi dkk.,2020).



Gambar 5. Gambaran mikroskopik pankreas tikus putih (Kierszenbaum, 2016)

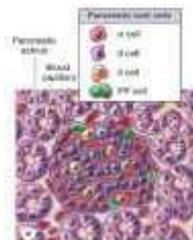
Di antara sel-sel asinar pada pankreas terdapat sel-sel endokrin yang membentuk pulau *Langerhans* (Gambar 3.). Pulau *Langerhans* paling sering ditemukan di bagian *cauda* pankreas, memiliki bentuk *ovoid*, batas yang jelas (dikelilingi oleh serat retikular), dan ukuran sekitar $\pm 50 \mu\text{m}$. Setiap pulau *Langerhans* terdiri dari 2000-3000 sel.



Gambar 6. Histologi pankreas (Kierszenbaum, 2016)

Sel endokrin pankreas yang paling dominan adalah sel β , yang bertanggung jawab untuk sintesis dan sekresi insulin. Sel α menghasilkan hormon glukagon, sel δ mensintesis somatostatin, sementara sel F/PP, yang jumlahnya paling sedikit, mengeluarkan *polipeptida* pankreas. Setiap jenis sel endokrin ini menempati pulau *Langerhans* dengan jumlah yang bervariasi. Secara histopatologi, sel-sel ini memiliki bentuk poligonal hingga bulat, dengan inti yang bulat. Namun, sulit untuk membedakan jenis-jenis sel yang ada di dalam pulau *Langerhans*. Sel endokrin tersusun rapi dan tersebar merata, dipisahkan oleh kapiler fenestrasi (Mescher, 2016).

Sel β umumnya berada di tengah atau inti pulau *Langerhans*, sel α terletak di bagian perifer, sedangkan sel-sel lainnya tersebar di antaranya. Sel endokrin pankreas termasuk dalam kategori sel stabil, yang memiliki kemampuan regenerasi ketika mengalami kerusakan atau cedera melalui proses proliferasi. Kemampuan ini memungkinkan pemulihan jaringan berlangsung dengan sempurna (Kierszenbaum, 2016).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Gambar 7. Histologi pulau *Langerhans* (Mescher, 2016)

Sel-sel beta di pulau *Langerhans* area endokrin pankreas menghasilkan hormon insulin sebagai respon terhadap peningkatan kadar glukosa dalam darah. Insulin dilepaskan ke dalam peredaran darah dan berperan dalam mengatur metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Insulin merangsang sel-sel tubuh untuk menyerap glukosa dari darah, mengubahnya menjadi glikogen untuk penyimpanan, dan menghambat pelepasan glukosa dari hati. Sel-sel α di pulau *Langerhans* menghasilkan hormon glukagon yang meningkatkan kadar glukosa darah dengan merangsang pelepasan glikogen dari hati dan glukoneogenesis. Saat kadar glukosa meningkat, insulin membantu penyerapan dan penyimpanan glukosa. Saat kadar glukosa menurun, glukagon merangsang pelepasan glukosa. Kerja bersama insulin dan glukagon membantu menjaga homeostasis gula darah dan memberikan respon terhadap fluktuasi dalam kadar glukosa darah (Sartika *dkk.*, 2016).

1.6.6.3 Histopatologi Pankreas

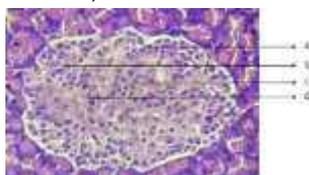
Pada individu dengan hiperglikemia, ditemukan perubahan pada pankreas, termasuk pengecilan ukuran pankreas, atrofi pada bagian eksokrin, serta degenerasi dan atrofi sel asinar di sekitar pulau *Langerhans* (Goldstein *dkk.*, 2016).

a. Degenerasi

Degenerasi sel, atau kemunduran sel, merupakan kelainan pada sel yang terjadi akibat cedera ringan, di mana struktur internal sel, seperti *mitokondria* dan *sitoplasma*, terganggu sehingga memengaruhi proses metabolisme sel. Kerusakan ini bersifat reversibel, yang berarti dapat diperbaiki jika penyebabnya segera diatasi. Namun, jika penyebab tidak dihilangkan, kerusakan menjadi ireversibel, dan sel akan mengalami kematian (Setiadi *dkk.*, 2020).

b. Nekrosis

Nekrosis adalah salah satu pola dasar kematian sel yang terjadi akibat hilangnya suplai darah atau paparan toksin. Nekrosis ditandai oleh pembengkakan sel, denaturasi protein, dan kerusakan organel, yang dapat menyebabkan disfungsi serius pada jaringan. Perubahan utama pada nekrosis terletak pada inti sel. Ada tiga pola perubahan pada inti: *piknosis* atau pengerutan inti, *homogenisasi sitoplasma*, dan peningkatan *eosinofilia*, DNA mengondensasi menjadi massa kecil dan padat. Nekrosis terbagi menjadi beberapa jenis: nekrosis koagulatif, nekrosis likuefaktif (*colliquativa*), nekrosis kaseosa (*central*), nekrosis lemak, dan nekrosis *fibrinoid* (Setiadi *dkk.*, 2020).



istopatologi pankreas tikus dengan perbesaran 40x Pewarnaan *ilin Eosin* (Susanti *dkk.*, 2019). a. Sel β pankreas mengalami b. Berkurangnya *cluster* sel dan peningkatan jaringan ikat, c. i sel mengalami *piknosis* (pengerutan inti). d. Nekrosis inti sel mengalami *kariopleksis* (fragmentasi inti)



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan maret-juni 2024. Pengambilan sampel dan pemeriksaan histopatologi pankreas dan glukosa darah tikus dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Kedokteran Hewan.

2.2 Populasi dan Sampel Penelitian

2.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*).

2.2.2 Sampel Penelitian

Tikus putih galur wistar jantan dengan berat 200-250 gram, berumur \pm 3 bulan yang bergerak aktif, kondisi fisik sehat, dan tidak cacat secara anatomis. Adapun sampel diambil dari populasi tikus wistar jantan dan besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer (Indratama dan Yenita, 2020).

$$(t - 1)(n - 1) > 15$$

Keterangan:

t = Jumlah kelompok

n = Jumlah subjek kelompok

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

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

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

$$n - 1 \geq 15/3$$

$$n - 1 \geq 5$$

$$n \geq 5 + 1$$

$$n \geq 6$$

Sampel dalam penelitian berjumlah 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan terdiri atas 6 ekor tikus wistar jantan.

Menurut Arifin dan Zahiruddin (2017), Peneliti studi hewan mungkin menghadapi masalah dalam menentukan berapa banyak hewan yang harus mereka gunakan, ukuran sampel yang terlalu kecil dapat melewatkan efek nyata dalam percobaan, sedangkan ukuran sampel yang lebih besar dari yang diperlukan akan menyebabkan pemborosan sumber daya dan masalah etika pada hewan yang dikorbankan. Dengan mempertimbangkan *animal welfare* dari sampel tersebut, maka digunakan rumus "*Resource Equation Method (RE)*", rumus ini biasanya digunakan untuk hewan lab atau hewan model. Jumlah sampel diharapkan antara 10 - 20 sampel.

RE = Jumlah sampel total - Jumlah kelompok

$$24 - 4 = 20$$

$$t = 16$$

$$t = 12$$



Perhitungan RE yang dilakukan, jumlah sampel diambil dari nilai RE yang dapat dibagi 4 yaitu 12 sehingga jumlah sampel yang diambil yaitu 4 ekor pada masing-masing kelompok, dengan jumlah sampel yang dipakai berjumlah 16 ekor.

Tabel 1. Kelompok Perlakuan

Kelompok	Deskripsi	Perlakuan
K-	Kelompok tikus normal	Pakan standar dan air minum secara <i>ad libitum</i> selama 16 minggu.
K+	Kelompok tikus hiperglikemia	Diet tinggi lemak dan air minum secara <i>ad libitum</i> selama 16 minggu.
K1	Kelompok tikus hiperglikemia dengan ekstrak daun delima	Diet tinggi lemak dan air minum secara <i>ad libitum</i> selama 16 minggu, ekstrak daun delima dengan dosis 500 mg/kgBB via <i>sonde</i> pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.
K2	Kelompok tikus hiperglikemia dengan ekstrak daun delima	Diet tinggi lemak dan air minum secara <i>ad libitum</i> selama 16 minggu, serta diberikan ekstrak daun delima dengan dosis 800 mg/kgBB via <i>sonde</i> pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.

2.3 Alat dan bahan

2.3.1 Alat

Timbangan digital, timbangan analitik, kandang dan label kandang, tempat pakan dan botol minum, mistar, tabung ukur 50 ml, gelas *beaker* 50 mL, gelas *beaker* 500 mL, gelas beaker 1000 mL, labu ukur, mikropipet dan tip, klip plastik, *spoit* 3 cc, *canula*, batang pengaduk, *hotplate* (pemanas), *sonde oral*, wadah pembiusan, alat bedah minor, *objec glass* dan *cover glass*, mikroskop cahaya, *glucometer*, *blade*.

2.3.2 Bahan

Tikus wistar jantan, ekstrak daun delima, pakan standar, pakan tinggi lemak, minum tikus, sekam, *aquades*, etanol 96%, *gloves*, masker bedah, kapas, *tissue*, *ether*, larutan untuk pembuatan preparat (*Hematoksilin-Eosin*), larutan *xylol*, *alcohol*, *buffer neutral formalin* (BNF) 10% dan *paraffin*.

2.4 Prosedur penelitian

2.4.1 Pembuatan ekstraksi daun delima (*Punica granatum L.*)

1) Preparasi sampel

Daun delima disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang. Daun selanjutnya dirajang menjadi bagian-bagian yang kecil kemudian dikeringkan dan disortasi kering kemudian sampel daun diserbukkan dan siap diekstraksi.



Daun delima 1 kg diekstraksi dilakukan dengan metode menggunakan pelarut etanol 96% hingga daun delima terendam 24 jam. Diaduk setiap 1 x 24 jam dan didiamkan lalu disaring dan dituangkan ke dalam bejana. Remaserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dengan cara yang sama, kemudian filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan *evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (K2).

2.4.2 Pemeliharaan hewan coba

Sebelum memulai percobaan, tikus diaklimatisasi di dalam kandang selama 7 hari untuk penyeragaman cara hidup dan makannya. Setiap tikus dipisah dan ditempatkan di kandangnya sendiri. Kesehatan tikus dipantau setiap harinya. Tikus masing-masing diberikan pakan diet standar serta air minum secara *ad libitum*. Selain itu, kandang dibersihkan tiap 3 hari sekali dan lingkungan kandang diatur dengan sirkulasi udara yang cukup.

2.4.3 Pemberian pakan tikus

Pemberian pakan untuk kelompok negatif sebanyak 20 gram pakan standar serta air minum secara *ad libitum* setiap hari selama 16 minggu. Kelompok positif, kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2, diet tinggi lemak yang diberikan berupa 50% lemak sapi, 25% minyak kelapa, 10% kuning telur bebek dan 15% pakan standar. Semua bahan dicampur hingga menjadi adonan padat, kemudian dibagi menjadi bulatan-bulatan kecil agar memudahkan tikus untuk memakannya. Tiap tikus yang mendapat perlakuan diet tinggi lemak akan menerima 30 gram diet per hari serta air minum secara *ad libitum* selama 16 minggu.

2.4.4 Penimbangan berat badan tikus

Berat badan tikus diukur menggunakan timbangan digital dalam satuan gram, sedangkan panjang tubuhnya (dari ujung hidung hingga anus) diukur dengan penggaris atau meteran dalam satuan cm (*centimeter*). Pengukuran ini dihitung menggunakan rumus indeks Lee (Lee *dkk.*, 2011).

$$\text{Indeks obesitas Lee} = \frac{\sqrt{\text{berat badan (gram)} \times 10}}{\text{panjang nasoanal (mm)}}$$

Kelebihan berat badan lebih dari 10% dari berat tubuh normal dianggap sebagai *overweight*, sementara jika lebih dari 20%, kondisi tersebut dikategorikan sebagai obesitas (Artha *dkk.*, 2019). Tikus dewasa, obesitas ditandai dengan berat badan lebih dari 250 gram (Lee *dkk.*, 2011). Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap satu minggu sekali untuk memantau progres kenaikan berat badan akibat pemberian diet tinggi lemak, dilakukan pada pagi hari sebelum pemberian pakan.

2.4.5 Pemeriksaan glukosa darah puasa tikus

GDP (Gula Darah Puasa) mencerminkan kemampuan basal pankreas untuk menghasilkan insulin tanpa adanya rangsangan dari makanan. GDP (Gula Darah Puasa) diukur setelah tikus berpuasa (biasanya 8-12 jam), sehingga kadar glukosa darah tidak dipengaruhi oleh makanan atau aktivitas sebelumnya. Hal ini memungkinkan hasil yang lebih konsisten dan dapat dibandingkan antar kelompok (Maiyah *dkk.*, 2016)).

Pemeriksaan glukosa darah puasa selama 8 jam dilakukan sebelum perlakuan setelah perlakuan (*post*-perlakuan). Tahapan pemeriksaan glukosa menyiapkan alat *glucometer* beserta dengan wadah untuk tikus alui *vena coccigeal* tikus yang sebelumnya dibersihkan dengan diurut perlahan-lahan setelah itu lalu dilanjutkan dengan ujung pakan gunting. Darah yang keluar kemudian disentuhkan pada glukosa darah akan terbaca di layar *glucometer* setelah 5 detik dan dinyatakan dalam mg/dl (Setiadi *dkk.*, 2020).



2.4.6 Pemberian ekstrak daun delima

Ekstrak daun delima (*punica granatum linn.*) diberikan dengan dosis 500 mg/kg/bb dan 800 mg/kg/bb selama 3 minggu terakhir, yakni awal minggu ke 14-16 dengan metode sonde. Pemberian ekstrak daun delima dilakukan pada pagi hari sebelum pemberian pakan. Pemberian dosis ekstrak daun delima disesuaikan dengan berat badan tikus yang ditimbang sebelum pemberian ekstrak. Pemberian ekstrak daun delima diberikan setiap hari.

2.4.7 Pembuatan preparat histopatologi organ pankreas

1) Pengambilan organ pankreas

Semua tikus dianestesi general dengan *kloroform*. Selanjutnya tikus dibedah dan diambil organ pankreas. Organ pankreas kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% dan difiksasi dengan *buffer neutral formalin* (BNF) 10% untuk dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi (Putri, 2018).

2) Pembuatan preparat histopatologi

Fiksasi adalah langkah untuk menjaga komponen sel tetap utuh, mencegah kerusakan, dan mempertahankan struktur aslinya. Tujuan dari fiksasi adalah menguatkan jaringan, terutama jaringan lunak, sehingga mempermudah proses pemotongan blok *paraffin* dengan cara merendam dalam *formalin buffer fosfat* 10% selama 24 jam, kemudian diiris (*trimming*) dengan ketebalan \pm 3 mm agar dapat dimasukkan dalam kaset untuk diproses dalam *tissue processor* (Suryono, 2016). Jaringan yang berada di dalam kaset dimasukkan ke dalam *tissue processor* untuk dilakukan dehidrasi. Proses dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat yang terdiri dari alkohol 70%, 80% dan 96% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dijernihkan (*clearing*) dengan memasukkan kaset ke dalam *xylol I*, *xylol II* dan *xylol III*. Setelah melalui proses dehidrasi, jaringan dimasukkan ke dalam *paraffin* cair dengan suhu 70°C selama 1 jam sebanyak 2 kali. Jaringan kemudian diambil dengan pinset, dilanjutkan dengan pemblokkan menggunakan *paraffin blok*. Pemotongan (*cutting*) dilakukan dengan menggunakan *mikrotom* dengan ketebalan 4-5 μ m. Jaringan yang terpotong dikembangkan di atas air *waterbath* dan ditangkap dengan gelas objek. Kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan preparat siap diwarnai dengan *Hematoxylin Eosin* (HE). Pewarnaan dilakukan dengan cara preparat di atas gelas objek direndam dalam *xylol I*, II dan III masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam alkohol 96%, 80% dan 70% masing-masing 5 menit, selanjutnya dicuci dengan *aquades* dan kemudian direndam dalam *Hematoxylin meyer* selama 7 menit. Dicuci menggunakan air mengalir selama 5 menit. Preparat kemudian dicelupkan ke dalam *Eosin* selama 10 detik. Selanjutnya preparat direndam dalam alkohol bertingkat alkohol 70%, 80%, 96% masing-masing 5 menit, dan I, II, dan III masing-masing 5 menit. Preparat dikeringkan dengan menggunakan entelan. Preparat diperiksa di bawah iksaan terhadap perubahan histopatologi.

jat kerusakan pankreas (Scoring)

anjutnya adalah melakukan perhitungan skor kerusakan an skor kerusakan dijabarkan dalam tabel berikut:



Tabel 2. Skoring kerusakan pankreas

Skor	Objek Penilaian	Persentase Kerusakan
0	Tidak ada kerusakan pada sel, bentuk, ukuran dan struktur dari pulau langerhans normal	0%
1	$\frac{1}{4}$ total nekrosis sel pankreas, adanya degenerasi sel berupa vakuola sitoplasma	$\leq 25\%$
2	$\frac{1}{2}$ total nekrosis sel pankreas, sel mengalami karioleksis (fragmentasi inti)	26-50%
3	$\frac{3}{4}$ total nekrosis sel pankreas, adanya infiltrasi sel radang	51-75%
4	Nekrosis seluruh sel pankreas	$> 75\%$

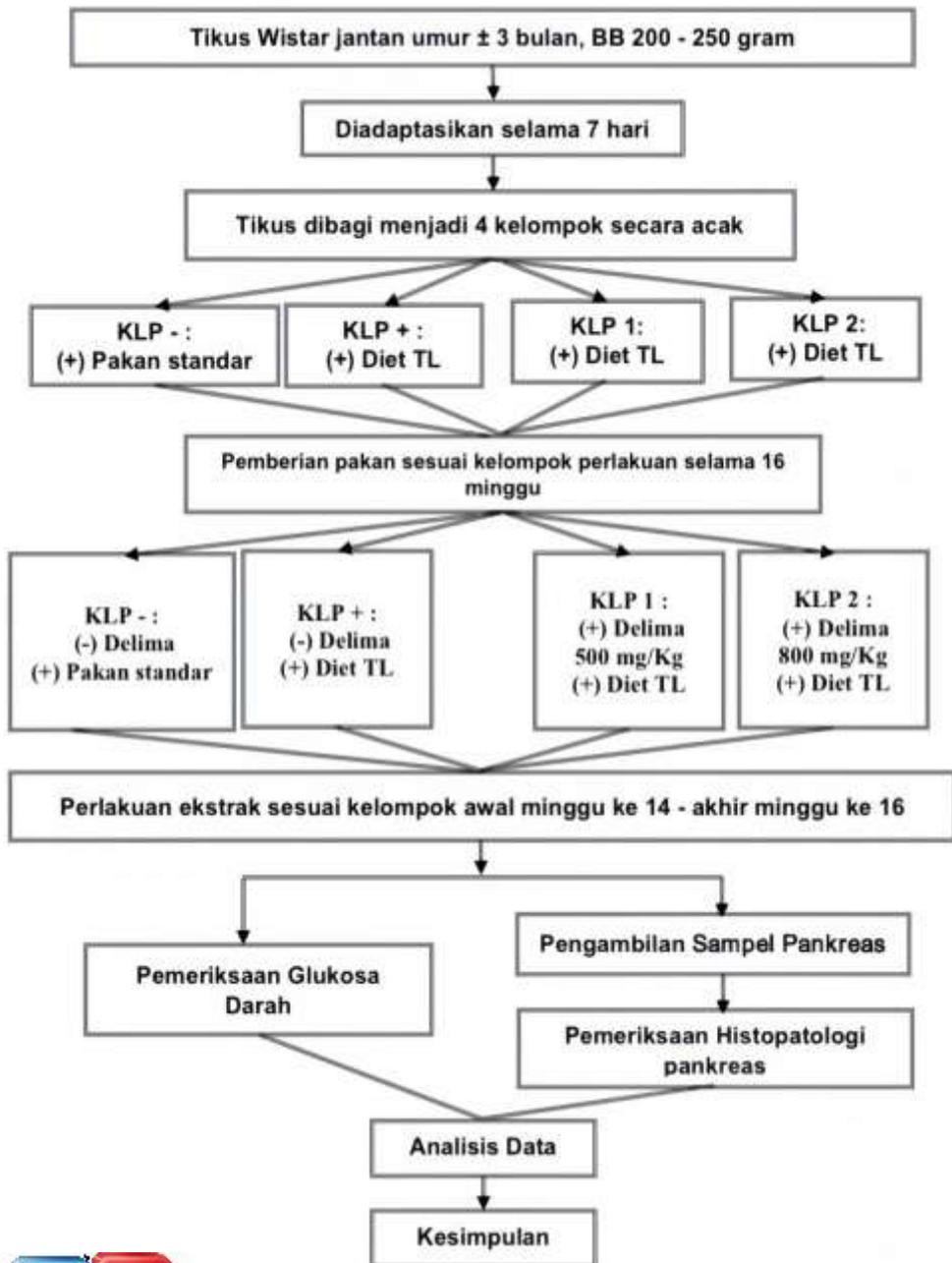
Dharma (2015)

2.5 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 25.0. Tahap awal analisis melibatkan Uji Distribusi Normal untuk mengevaluasi normalitas data. Jika data menunjukkan distribusi normal, analisis statistik parametrik dilakukan dengan menggunakan *Paired Simple T-Test* untuk menilai perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Namun, jika data tidak memiliki distribusi normal, Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antar kelompok. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, Uji *Mann-Whitney* dilanjutkan untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan yang signifikan (Wirjatmadja dkk, 2021). Selain itu, dilakukan analisis deskriptif kualitatif untuk menjelaskan profil gula darah dan gambaran histopatologi pankreas tikus Wistar setelah diberikan ekstrak daun delima.



2.6 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

