

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malnutrisi merupakan suatu keadaan kekurangan, kelebihan, atau ketidakseimbangan energi, protein, dan nutrisi lainnya yang berdampak buruk pada bentuk tubuh, fungsi tubuh, dan kondisi kesehatan (Ardianto dkk., 2023). Salah satu bentuk malnutrisi adalah obesitas, yang didefinisikan sebagai akumulasi jaringan adiposa dalam jumlah berlebihan di dalam tubuh. Obesitas adalah gangguan nutrisi yang paling umum pada hewan peliharaan (German, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Saavedra dkk. (2024), menunjukkan bahwa kondisi obesitas semakin sering ditemukan pada populasi kucing, dengan perkiraan prevalensi sekitar 40% di Amerika Serikat dan mencapai hingga 63% di beberapa negara lain, seperti Selandia Baru.

Obesitas terjadi ketika jumlah jaringan lemak dalam tubuh melebihi kadar normal dibandingkan dengan berat badan total, biasanya disebabkan oleh ketidakseimbangan antara energi yang masuk dari makanan dan energi yang digunakan oleh tubuh. Bahan pangan yang mengandung kadar lemak tinggi dapat mengendap pada dinding pembuluh darah, dan penumpukan lemak yang berlebihan di area perut dikenal sebagai obesitas (Septiyanti dan Seniwati, 2020). Obesitas berhubungan dengan risiko lebih tinggi mengalami gangguan kesehatan, terutama penyakit radang pada usus (Indriyani dkk., 2024).

Pencegahan dan penurunan risiko penyakit radang usus yang disebabkan oleh ketidakseimbangan mikroflora usus, penting untuk menghindari dan mengurangi konsumsi makanan yang mengandung lemak jenuh dan kolesterol (Indriyani dkk., 2024). Upaya yang dapat dilakukan untuk menurunkan kadar lemak dan kolesterol meliputi perubahan pola makan, peningkatan aktivitas fisik, serta pemberian bahan pakan yang dapat mengurangi kadar lemak dan kolesterol. Selain itu, penambahan probiotik pada pakan juga dapat menjadi alternatif yang efektif untuk menurunkan kadar lemak dan kolesterol.

Penambahan probiotik mempunyai dampak positif antara lain dapat menurunkan kandungan lemak dalam tubuh hewan karena probiotik dapat meningkatkan Metabolisme Energi (ME) dan *Total Digestible Nutrien* (TDN) (Ikasari, 2017). Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memodifikasi komposisi bakteri dalam saluran pencernaan hewan (Lusiastuti dkk., 2016). Probiotik mampu memberikan efek yang menguntungkan kesehatan apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal pada saat masuk dalam saluran pencernaan (Wardiana dkk., 2021).

Oleh karena itu, hal tersebut menjadi latar penelitian ini yakni untuk mencegah terjadinya berbagai kondisi yang disebabkan oleh tingginya kadar lemak dan kolesterol sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologi duodenum tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan melalui pemberian

probiotik berupa *Lactobacillus sp.* dan *Bacillus sp.* yang diberi pakan tinggi lemak yang dapat mempengaruhi gambaran histopatologi duodenum.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan maka dapat diambil rumusan masalah bagaimanakah pengaruh penambahan probiotik pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui gambaran histopatologi duodenum.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan probiotik pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui gambaran histopatologi duodenum.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengidentifikasi adanya pengaruh probiotik terhadap gambaran histopatologi duodenum tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan probiotik pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui gambaran histopatologi duodenum.

1.4.2 Manfaat Aplikasi

Manfaat aplikasi pada penelitian ini agar dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya.

1.5 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa adanya perubahan dari penambahan probiotik *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis* dan juga kombinasi *Lactobacillus sp.* dan *Bacillus subtilis* pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui gambaran histopatologi duodenum.

1.6 Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai “Pengaruh Pemberian Probiotik Terhadap Histopatologi Duodenum Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Pakan Tinggi Lemak” belum pernah dilakukan sebelumnya tetapi penelitian serupa pernah dilakukan.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

Penulis	Judul
Wresdiyati dkk. 2013	Probiotik Indigenus Meningkatkan Profil Kesehatan Usus Halus Tikus yang Diinfeksi <i>Enteropathogenic E. coli</i>
Prajawanti dkk. 2020	Efek <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dan <i>Bifidobacterium bifidum</i> Terhadap Kolesterol Tikus Putih yang diinduksi <i>High Fat Diet</i>

1.7 Tinjauan Pustaka

1.7.1 Hewan Model

Hewan model atau hewan laboratorium adalah hewan yang diperlakukan dan/atau dibuat dengan tujuan agar menyerupai atau mirip dengan objek pengamatan sesungguhnya sesuai yang dikehendaki. Hewan model biasanya dibuat agar dapat menjelaskan atau menggambarkan fenomena biologi dari hewan model tersebut yang mirip dengan suatu spesies tertentu yang akan diamati. Dengan kata lain, hewan model ini dapat menggambarkan kejadian mirip secara biologis dari objek sesungguhnya (manusia atau hewan yang lebih tinggi hierarkinya atau langka) kemiripan secara anatomi, fisiologi, atau morfologi dengan objek yang akan dikaji (Astuti, 2015).

Rodensia seperti tikus, merupakan hewan model yang banyak digunakan dalam penelitian (Nugroho dkk., 2018). Tikus digunakan untuk uji coba tentang makanan dan defisiensi zat makanan pada semua jenis hewan termasuk manusia. Tikus memiliki kesamaan dengan manusia dalam sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit dan sistem fisiologi (Rejeki dkk., 2018).

1.7.2 Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Tikus (*Rattus*) merupakan hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian ilmiah. Serangkaian percobaan harus dilakukan terlebih dahulu pada hewan coba sebelum diaplikasikan kepada manusia atau primata lainnya. Terdapat banyak kesamaan yang dimiliki manusia dengan Rodensia seperti tikus dalam sistem faal (Fitria dan Sarto, 2014). Menurut Robinson (1979), klasifikasi taksonomi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 1. Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) bermata merah, kepala lebar, dan ekor panjang (Robinson, 1979).

Rodensia seperti tikus, merupakan hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian. Tikus digunakan sebagai hewan model untuk analisis biomedis contohnya penyakit kardiovaskular, metabolik, neurologik, perilaku, kanker, dan ginjal (Nugroho dkk., 2018).

Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*). Tikus Wistar (Gambar 1), saat ini menjadi salah satu yang strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. Hal ini ditandai oleh kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang selalu kurang dari panjang tubuhnya. Galur tikus *Sprague dawley* dan *Long-Evans* dikembangkan dari Tikus galur wistar. Tikus wistar lebih aktif (agresif) dari pada jenis lain seperti tikus *Sprague dawley* (Liwandouw dkk., 2017).

Tabel 2. Data fisiologis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) (Rejeki dkk., 2018).

Parameter	Nilai normal
Masa hidup	2-3 tahun
Berat badan	
-Jantan	267-500 gram
-Betina	225-325 gram
Suhu tubuh	37.3°C
Laju pernapasan	70-150 kali/menit
Denyut jantung	300-500 bpm
Konsumsi air harian	22-33 ml/hari
Suhu lingkungan	18-26°C

1.7.3 Lemak

Lemak adalah molekul yang tersusun atas oksigen, hidrogen, dan karbon. Lemak memiliki sifat tidak mudah larut dalam air, sehingga memerlukan pelarut khusus, seperti kloroform, untuk melarutkannya. Molekul lemak terdiri atas empat bagian, yaitu satu molekul gliserol dan tiga molekul asam lemak. Berdasarkan asalnya, lemak dapat dibedakan menjadi dua jenis: lemak nabati yang berasal dari tumbuhan, dan lemak hewani yang berasal dari hewan (Santika, 2016).

Terdapat berbagai macam komponen dalam lemak yaitu seperti zat trigliserida, fosfolipid, asam lemak bebas, dan juga kolesterol. Secara umum,

kolesterol berfungsi untuk membangun dinding didalam sel (membran sel) dalam tubuh (Solikin dan Muradi, 2020). Fungsi lemak sangatlah penting untuk tubuh yaitu sebagai penjaga temperatur suhu tubuh, pelarut vitamin (A, E, K, dan D), cadangan makanan, dan salah satu bahan penyusun dalam membran sel (Santika, 2016).

Asupan makanan tinggi lemak dengan kandungan asam lemak jenuh yang tinggi dapat mengganggu keseimbangan mikroflora usus, sehingga berpotensi memicu dysbiosis, obesitas, dan peradangan kronis tingkat rendah (Indriyani dkk, 2024). Sedangkan asupan lemak yang rendah akan menyebabkan terjadinya penurunan massa tubuh dan gangguan pada penyerapan vitamin larut lemak. Ketidakseimbangan tingkat konsumsi zat gizi makro seperti energi, karbohidrat, lemak dan protein terhadap kebutuhan tubuh secara berkepanjangan dapat mempengaruhi terjadinya perubahan pada jaringan dan massa tubuh yang akan berdampak pada penurunan berat badan. Jika konsumsi lemak kurang dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan penurunan imunitas terhadap penyakit (Rahman dkk., 2021).

1.7.4 Probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang memberikan keuntungan dengan cara memperbaiki keseimbangan mikro-organisme usus dan aktivitasnya dapat mempertahankan keutuhan “membran mukosa usus”. Fungsi utama probiotik adalah untuk menyeimbangkan komposisi mikrobiota usus pada saluran pencernaan manusia. Selain itu, terdapat sejumlah sifat fungsional yang potensial antara lain menekan peradangan usus, meningkatkan kekebalan tubuh, mengurangi risiko hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes, dan obesitas, serta mengatasi autoimun (Dewi dkk., 2021).

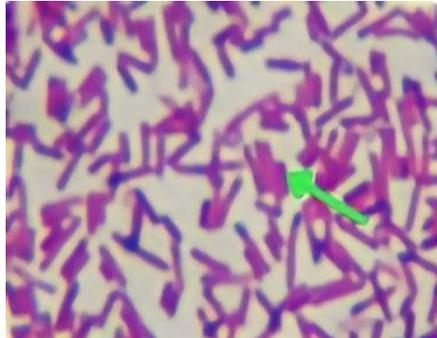
Penambahan probiotik penghasil enzim ke dalam pakan dapat meningkatkan efisiensi pakan sehingga lebih mudah dicerna dan enzim dapat bekerja lebih efektif dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan. Bakteri probiotik dalam pakan menyebabkan aktivitas bakteri probiotik dapat bekerja secara maksimal dalam pencernaan, sehingga daya cerna pun menjadi lebih tinggi dalam menyerap sari-sari makanan dan menghasilkan pertumbuhan yang baik (Kurniawan dkk., 2019).

Bakteri sebagian dapat dijadikan sebagai probiotik, salah satu bakteri yang berperan sebagai probiotik adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan kelompok bakteri yang telah banyak digunakan sebagai probiotik. BAL memproduksi asam organik yang mampu digunakan untuk mencegah koloni bakteri patogen dalam usus halus, menghasilkan bakteriosid untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Jenis BAL diantaranya adalah *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Andriani dkk., 2020).

1.7.4.1 *Bacillus sp.*

Bacillus sp. merupakan salah satu jenis bakteri yang banyak dimanfaatkan sebagai probiotik dalam akuakultur karena kemampuannya menghasilkan enzim dan komponen antimikroba yang dapat menghambat bakteri patogen (Lusiastuti dkk., 2016). Probiotik *B. Subtilis* mampu meningkatkan daya cerna dan mempunyai

kegunaan dapat mensekresikan enzim protease, lipase dan amilase, sehingga terdapat kemungkinan berperan dalam pencernaan pakan. Peranan enzim protease tersebut tentunya dapat meningkatkan penyerapan asam amino karena enzim protease dapat mengoptimalkan perombakan protein menjadi asam amino di dalam usus halus (Wardiana dkk., 2021).



Gambar 2. *Bacillus sp.* (panah hijau) berbentuk sel batang di bawah mikroskop dengan pewarnaan gram yang memberikan warna ungu (HE. 100x) (Ramirez dkk., 2014).

1.7.4.2 *Lactobacillus sp.*

Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus sp.* secara alami terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. *Lactobacillus sp.* berbentuk batang terdapat dalam bentuk tunggal maupun rantai pendek atau panjang, bersifat termofil, termodurik, memproduksi gas seperti CO₂, H₂S, H₂ selama metabolisme, termasuk dalam bakteri anaerob fakultatif. Bakteri jenis ini dapat memfermentasi beberapa golongan karbohidrat seperti arabinose, melibiosa, xylose, laktosa, glukosa, maltose, fruktosa, dan galaktosa untuk metabolisme dan memproduksi energi Adenosina Trifosfat (ATP) (Setyaningsih dkk., 2019).

Pemberian probiotik *Lactobacillus sp.* sudah optimal dalam meningkatkan penyerapan nutrisi dan memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolise* (BSH). Enzim BSH dapat menurunkan kadar kolesterol darah, enzim lipase, dan trigliserida darah tanpa meninggalkan residu yang mudah diserap oleh usus karena mempunyai kemampuan dalam memutuskan asam lemak rantai panjang menjadi asam lemak rantai sedang dan rantai pendek (Andriani dkk., 2020).



Gambar 3. *Lactobacillus sp.* (panah hijau) berbentuk sel batang di bawah mikroskop dengan pewarnaan gram yang memberikan warna ungu (HE. 100x) (Khagwal dkk., 2014).

1.7.5 Anatomi dan Fisiologi Usus Halus

Usus halus merupakan tempat terjadinya pencernaan karbohidrat, lemak, dan protein secara efektif (Dwijayanti dkk., 2021). Usus halus merupakan bagian terpanjang dari saluran pencernaan, dengan panjang sekitar 170 cm, yang berperan penting dalam penyerapan nutrisi (Treuting dkk., 2018). Bagian ini menjadi lokasi utama untuk pencernaan dan penyerapan yang dibantu oleh enzim. Saat makanan melewati usus halus, proses peristaltik dan segmentasi berirama mencampur makanan dengan cairan pencernaan (Aspinall dan Capello, 2020). Usus halus berperan menyerap sari-sari makanan yang telah di giling halus di dalam lambung. Kemudian sari-sari makanan yang telah diserap diedarkan ke seluruh tubuh dan menjadi energi (Handayani dan Endrakasih, 2018).

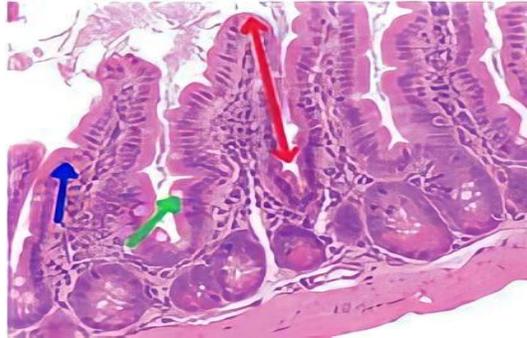
Struktur usus halus terbagi menjadi tiga bagian utama dengan fungsi spesifik, yaitu duodenum, jejunum, dan ileum (Aspinall dan Capello, 2020). Usus halus dimulai dari sfingter pilorus hingga sekum. Pada tikus, perbedaan antara jejunum dan ileum sulit diidentifikasi secara visual sehingga pengambilan sampel biasanya didasarkan pada pengukuran panjang usus (Maynard dan Downes, 2019).

Duodenum terletak di bagian awal usus halus (Treuting dkk., 2018). Sebagai bagian pertama dari usus halus yang melanjutkan lambung, sebagian besar duodenum berada dalam posisi retroperitoneal (Akers dan Denbow, 2013). Jejunum dan ileum sulit dibedakan secara visual karena memiliki struktur yang serupa. Pada dinding jejunum dan ileum terdapat kelenjar pencernaan yang disebut kriptas Lieberkuhn. Ileum berakhir di persimpangan *ileocaecal*, di mana bagian ini terhubung dengan sekum (Aspinall dan Capello, 2020).

Jejunum memiliki banyak lipatan dan gulungan yang meningkatkan luas permukaannya, sehingga menjadi tempat utama untuk pencernaan dan penyerapan zat makanan secara kimiawi. Sementara itu, ileum merupakan bagian usus halus yang paling pendek, tetapi tetap berperan penting dalam penyerapan sisa nutrisi. Pada ileum juga terdapat *sfingter ileocaecal*, yang berfungsi mengontrol aliran makanan dari ileum menuju sekum, sehingga memastikan proses pencernaan berjalan dengan teratur (Akers dan Denbow, 2013).

1.7.6 Histologi Duodenum Normal

Pada histopatologi duodenum normal, mukosa terlihat tersusun atas lipatan-lipatan yang beberapa berbentuk zig-zag dengan ujung yang berlobus. Mukosa ini menonjol ke dalam lumen duodenum membentuk vili berbentuk daun, yang tersebar di seluruh bagian usus halus. Di antara vili tersebut, terdapat kriptas Lieberkuhn yang merupakan kelanjutan mukosa berbentuk kelenjar (Maynard dan Downes, 2019). Seiring dengan bertambahnya berat badan dan usia, jumlah vili usus cenderung menurun, sementara jumlah kriptas mengalami peningkatan (Sharp dan Villano, 2012).



Gambar 4. Histologi duodenum normal tikus. Panjang vili usus (panah merah), sel goblet (panah hijau), dan sel epitel (panah biru) (Scudamore, 2014).

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari hingga April 2024. Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berkelamin jantan, tikus yang digunakan memiliki bobot rata – rata yaitu 200-300 gram, hewan coba ini di peroleh dari Kabupaten Maros yang mana akan aklimalisasi dan diberikan perlakuan di Laboratorium Terpadu Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Tempat Pengambilan sampel dilakukan di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Terpadu Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk penggunaan hewan model (tikus Wistar) dalam penelitian, dengan nomor surat No.0035/KKEH/RSHUH/EC/2023.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis* dan juga kombinasi dari *Lactobacillus Sp* dan *Bacillus subtilis* terhadap gambaran histopatologi duodenum.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan adalah *blade*, botol minum, *cassette*, *cover glass*, gunting, *handscoon*, inkubator, kandang ukuran 45 cm x 35 cm, kompor *portable*, mikroskop olympus CX22 beserta optilab 22, mikrotom, nampan, *object glass*, pemanas, pinset, sendok, *sonde needle*, spuit 3 ml, dan tempat spesimen.

2.3.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan antara lain 25 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan umur 2-3 bulan dengan berat 200-300 gram, air, alkohol bertingkat (75%, 80%, 90%), alkohol absolut I, alkohol absolut II, anastesi eter, *bacillus suptilitis*, bakteri *lactobacillus sp*, *basemold*, *Hematoxylin-Eosin* (HE), mentega, minyak kelapa, *neutral buffered formalin*, pakan konsentrat, *paraffin*, telur bebek, *tissue embedding* dan *xylol*.

2.4 Penelitian

2.4.1 Perlakuan Sampel

Rumus yang digunakan untuk menentukan besar sampel yaitu menggunakan rumus federer. Digunakannya rumus ini untuk mencari tahu berapa jumlah sampel yang dapat diberikan dalam satu kelompok dan berapa banyak jumlah pengelompokan yang dapat dilakukan.

Rumus Federer :

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

n = jumlah sampel perkelompok

t = jumlah pengelompokan

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

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 5$$

Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus wistar jantan yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan ada 5 ekor tikus wistar jantan:

- K- : Kelompok kontrol negatif diberikan pakan standar selama 60 hari.
- K+ : Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari dilanjutkan dengan pakan standar 30 hari.
- KP1 : Kelompok yang diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari dan di lanjutkan dengan pakan standar serta pemberian probiotik *Lactobaccillus sp.* selama 30 hari.
- KP2 : Kelompok yang diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari dan di lanjutkan dengan pakan standar serta pemberian probiotik *Bacillus subtilis* selama 30 hari
- KP3 : Kelompok yang diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari dan di lanjutkan dengan pakan standar serta pemberian campuran probiotik *Lactobacillus sp.* dan *Bacillus subtilis* selama 30 hari.

Pada kelompok tikus K- diberikan pakan standar konsentrat, sedangkan kelompok tikus K+, KP1, KP2 dan KP3 diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari, penelitian ini menggunakan pakan tinggi lemak berupa campuran dari mentega, minyak kelapa dan kuning telur ayam kampung dengan perbandingan 1:1:1 (gram). Mentega dan minyak kelapa tersebut terlebih dahulu dipanaskan kemudian dicampur dengan kuning telur ayam kampung. Campuran pakan ini diberi kepada tikus sebanyak 2% dari total berat badan. Pakan ini diberikan satu kali sehari pada sore hari selama 30 hari (Mutia dkk, 2018). Setelah itu, kelompok tikus KP1, KP2, dan KP3 diberikan probiotik selama 30 hari, untuk KP1 diberikan *Lactobaccillus sp.* 4 ml, KP2 diberikan *Bacillus subtilis* 4 ml, dan KP3 diberikan campuran *Lactobaccillus sp.* 2 ml, dan *Bacillus subtilis* 2 ml.

2.4.2 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Tahapan pembuatan preparat histopatologi terdiri dari beberapa tahap yaitu:

a. Fiksasi

Metode fiksasi dilakukan terhadap sampel dengan tujuan untuk mempertahankan kondisi sel-sel sama seperti dalam keadaan hewan masih hidup, mencegah rusaknya bentuk, struktur dan hubungan antar sel dan memperkeras jaringan agar terhindar dari traumatik atau akibat *handling*. Larutan fiksasi yang digunakan menggunakan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% selama 2x24 jam (Rahmawanti dkk., 2021).

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi meliputi perendaman di dalam alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I dan alkohol absolut II yang dilakukan secara bertahap dan dalam waktu yang berbeda-beda (Rahmawanti dkk., 2021).

c. Clearing

Metode *clearing* digunakan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantikannya dengan suatu larutan yang berikatan dengan *paraffin*. Agen *clearing* khas termasuk *xylene*, *chloroform*, *toluene*, *benzene*, *dioxane*, *carbon tetrachloride*, *cedarwood oil*, dan *isoamyl acetate* (Rai dkk., 2016).

d. Infiltasi

Peran agen infiltrasi adalah untuk menghilangkan agen *clearing* dari jaringan dan sehingga *paraffin* dapat sepenuhnya menembus jaringan. Tahapan ini akan membuat jaringan mengeras dan menghasilkan blok *paraffin wax* yang dapat dipotong tipis (Rai dkk., 2016).

e. Embedding

Embedding merupakan proses pengecoran sampel dengan *paraffin* menggunakan *mold/cetakan*. Fungsi dari proses *embedding* adalah mencetak sampel di dalam *paraffin* untuk memudahkan proses pemotongan (Rahmawanti dkk., 2021).

f. Cutting

Proses *cutting* dilakukan untuk memotong organ usus dengan menggunakan mikrotom, setelah proses *cutting*, kemudian organ usus ditempatkan di *waterbath* untuk pengembangan potongan organ usus, setelah mengembang diambil menggunakan *object glass* dan dikeringkan dan dimasukkan di dalam *incubator* selama 2-3 jam sebelum proses pewarnaan (Rahmawanti dkk., 2021).

g. Staining (Pewarnaan)

Staining merupakan proses pewarnaan jaringan. *Staining* bertujuan untuk memudahkan pengamatan menggunakan mikroskop dan membedakan bagian-bagian jaringan yang akan diamati seperti inti sel, sitoplasma, dan lain-lain. Proses pewarnaan sampel menggunakan pewarna HE (Rahmawanti dkk., 2021).

h. Mounting (Penempelan)

Penempelan (*Mounting*) merupakan proses penempelan *cover glass* pada kaca preparat dengan menggunakan cairan perekat yang disebut dengan *entellan*. Penggunaan *cover glass* bertujuan untuk melindungi kaca preparat sampel dari lensa mikroskop pada saat pengamatan (Novita dan Yuliana, 2023).

2.4.3 Pengamatan Mikroskopik dan Pembacaan Preparat

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan dan pengambilan gambar dilakukan dengan menggunakan program *oxptic lens*. Penilaian terhadap gambaran histopatologi usus dilakukan dengan semikuantitatif skor berdasar pada kriteria sebagai berikut:

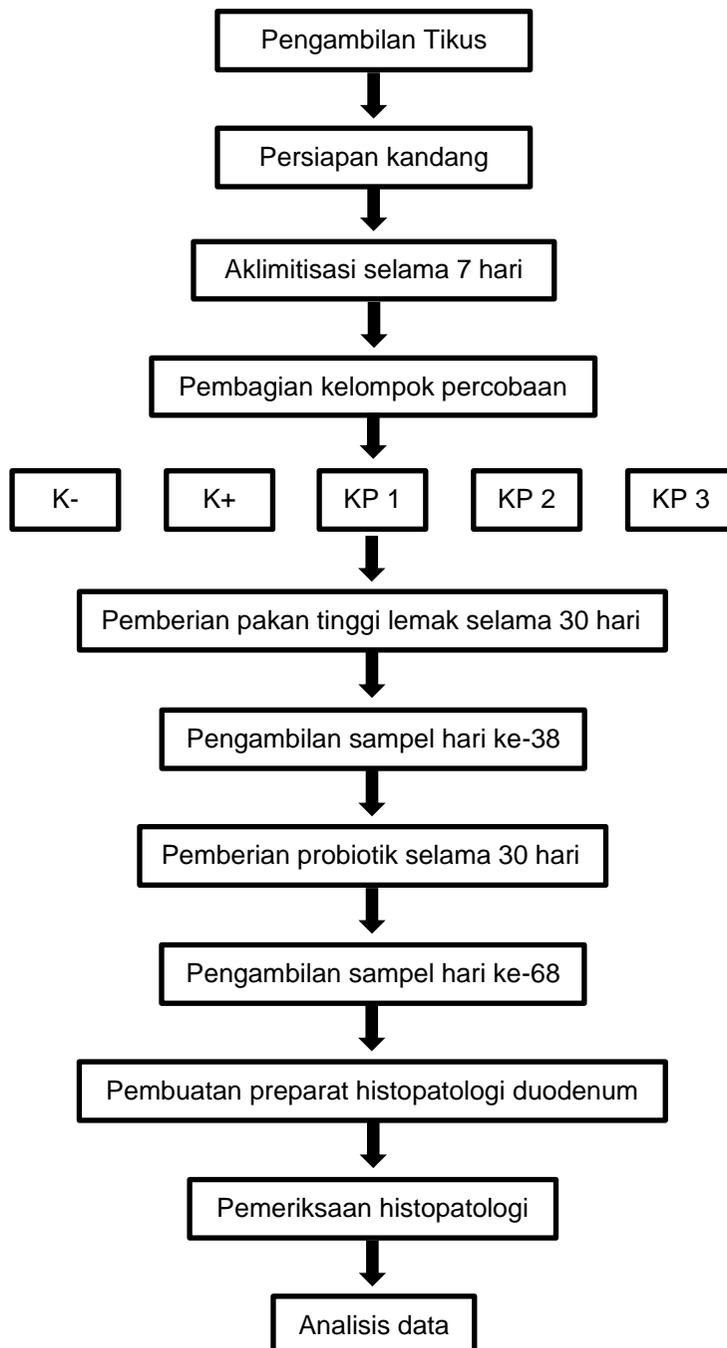
Tabel 3. Derajat kerusakan histopatologi usus halus (duodenum) (Pidi dkk., 2023).

Skor/ Kerusakan	0	1	2	3	4
Hemoragi	Tidak ada perubahan	Hemoragi yang ringan <25%	Hemoragi yang sedang antara 26-50%	Hemoragi yang berat antara 51-75%	Hemoragi yang sangat berat antara 76-100%
Infiltrasi sel radang	Tidak ada perubahan	Infiltrasi sel radang yang ringan <25%	Infiltrasi sel radang yang sedang antara 26-50%	Infiltrasi sel radang yang berat antara 51-75%	Infiltrasi sel radang yang sangat berat antara 76-100%
Atropi sel goblet	Tidak ada perubahan	Atropi sel goblet yang ringan <25%	Atropi sel goblet yang sedang antara 26-50%	Kehilangan sel goblet yang berat antara 51-75%	Kehilangan sel goblet yang sangat berat antara 76-100%
Nekrosis	Tidak ada perubahan	Jika jumlah sel nekrotik <25%	Jika jumlah sel nekrotik antara 26-50%	Jika jumlah sel nekrotik antara 51-75%	Jika jumlah sel nekrotik antara 76-100%

2.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini secara deskriptif kualitatif yaitu dengan memberikan skor untuk kelima lapang pandang.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian