

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolesterol tinggi sebagian besar dikaitkan dengan masalah jantung. Namun, penumpukan timbunan lemak ini tidak hanya mempengaruhi jantung. Apabila kolesterol terlalu tinggi dapat menumpuk di pembuluh darah yang memasok ginjal. Hal ini membuat ginjal lebih sulit untuk bekerja dengan baik. Peningkatan kadar lipid telah mempercepat perkembangan penyakit pada ginjal. Apabila kolesterol mengalami peningkatan atau penurunan kadar, maka dapat mempengaruhi penurunan fungsi ginjal. Fungsi ginjal bergantung pada tekanan darah yang cukup. Sehingga, setiap gangguan pada aliran darah ke ginjal (seperti yang disebabkan oleh penumpukan kolesterol) dapat mengakibatkan hilangnya fungsi dan kerusakan jaringan pada ginjal (Honzumi *et al.*, 2018)

Obesitas adalah keadaan pada tubuh yang tidak seimbang antara energi yang masuk dengan energi yang keluar dalam jangka waktu lama. Obesitas (kegemukan) dan *overweight* merupakan dua hal yang berbeda, namun demikian keduanya sama-sama menunjukkan adanya penumpukan lemak yang berlebihan dalam tubuh ditandai dengan peningkatan Indeks Massa Tubuh (IMT) diatas normal. Standar IMT, pada hewan kesayangan termasuk kucing dan anjing dilakukan cara sederhana biasanya diklarifikasikan sebagai kelebihan berat badan jika 10% hingga 20% lebih berat dari berat badan ideal dan obesitas jika lebih 20% lebih dari berat badan ideal dan terdapat metode lain seperti, *body condition score* (BCS) yang menggabungkan penilaian visual dan palpasi massa jaringan adiposa untuk membagi komposisi tubuh ke dalam beberapa kategori tertentu. Obesitas pada hewan kesayangan dapat mengakibatkan beberapa kerusakan pada organ ginjal seperti mekanisme inflamasi, stress oksidatif, dislipidemia, hipertensi, glomerulomegali, dan nefropati diabetik (Tarkosova *et al.*, 2016)

Obesitas sendiri dapat menyebabkan perubahan fungsi ginjal sehingga berdampak pada hipertensi. Perubahan fungsi ginjal dimulai dengan aktivasi sistem saraf simpatis, aktivasi sistem *reninangiotensi-aldosterone*, dan kompresi ginjal (Sudargo *et al.*, 2018). Pada umumnya, hubungan hipertensi dengan obesitas memiliki karakteristik dengan adanya ekspansi volume plasma dan meningkatnya curah jantung (*cardiac output*), hiperinsulinemia atau resistensi insulin, meningkatnya aktivitas sistem saraf simpatis, retensi natrium dan disregulasi *salt regulating hormone*. Dengan meningkatnya insulin dalam darah ini lah yang mengakibatkan retensi natrium pada ginjal dan tekanan darah akan naik (Tiara, 2020).

Penelitian kedokteran hewan mengenai sejauh mana masalah berat badan pada anjing dan kucing telah dilakukan terutama di Australia, Selandia baru, Amerika Utara dan Eropa untuk mengukur prevalensi kelebihan berat badan atau obesitas. Di rumah sakit hewan di Amerika menangani 2 juta anjing dan ½ juta kucing setiap tahunnya pada tahun 2012. Kejadian berat badan dan obesitas meningkat sebesar 37% pada anjing dan 90% pada kucing (Ryan, 2018). Menurut Triaksoo (2016), prevalensi obesitas khususnya pada hewan kesayangan di berbagai negara maju sekitar 23-44 %. Pada tahun 2013, kucing di Amerika Serikat sebesar 95,6 juta sedangkan data kucing penderita obesitas di Amerika Serikat meningkat dari waktu demi waktu. Pada tahun 2014, telah dilaporkan kucing yang mengalami obesitas adalah 81, 06 %.

Terdapat dua jenis pengobatan secara farmakologi yaitu dengan obat sintetik (kimia) atau obat tradisional (herbal). Namun, sering kali obat sintetik yang

digunakan menimbulkan efek samping (Sumihran dan Proietto, 2014). Tanaman mangga merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat. Tanaman mangga ini berpotensi karena mengandung senyawa metabolit sekunder. Selain mengandung flavonoid, tanaman mangga juga mengandung saponin, tanin galat, tanin katekat, kuinon dan steroid (Ningsih *et al.*, 2017). Salah satu kandungan daun mangga yaitu flavonoid, berperan sebagai diuretik yang akan mengeluarkan zat nefrotoksik dengan cara meningkatkan laju filtrasi glomerulus, sehingga zat nefrotoksik yang ada pada ginjal akan keluar bersama urin. Selain itu, flavonoid juga akan menghambat reabsorpsi Na^+ dan Cl^- sehingga air dalam tubulus mengalami peningkatan. Saponin mampu memperbaiki fungsi ginjal dengan menurunkan kadar ureum dan kreatinin melalui peningkatan ekskresi ureum dan kreatinin. Tanin mampu menghambat progresifitas kerusakan yang ditimbulkan paparan akut senyawa nefrotoksik (Dewi, 2020)

Untuk menentukan keaslian penelitian berdasarkan pengetahuan peneliti sebagai penulis dengan judul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mangga (*Mangifera indica* L.) Terhadap Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak" belum pernah dilakukan sebelumnya, tetapi penelitian serupa dilakukan oleh Suhita *et al.* (2013), dengan judul "Histopatologi Ginjal Tikus Putih Akibat Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Peroral" Berdasarkan latar belakang tersebut, maka untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun mangga (*Mangifera indica* L.) pada kasus diet tinggi lemak terhadap sistem ekskresi maka dilakukan penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap histopatologi ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1.2.1 Tujuan Penelitian

- a. Untuk melihat patologi anatomi ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.).
- b. Untuk melihat apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.2.2 Manfaat Penelitian

- a. Manfaat Pengembangan Ilmu
Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah untuk mengetahui histopatologi ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.).
- b. Manfaat Aplikasi
Manfaat aplikasi pada penelitian ini agar dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya

1.3 Kajian Pustaka

1.3.1 Tikus Wistar

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 Rodentia seperti tikus dalam sistem faal (Fitria dan Sarto, 2014). Tikus sebagai hewan model telah banyak digunakan pada penelitian dikarenakan siklus hidupnya pendek, biaya perawatan lebih murah dan realtif mudah perawatannya (Rosidah *et al.*, 2020).



Gambar 1. Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) (Rosidah *et al.*, 2020)

Source: Rosidah *et al.* (2020) *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 7(1): 136-146. <https://DOI:10.30972/vet.3416606>

Tikus berukuran lebih besar dan lebih cerdas daripada mencit. Tikus yang sering digunakan adalah tikus putih, yang bersifat lebih tenang dan mudah dikerjakan beberapa intervensi, tidak takut terhadap cahaya dan tidak cenderung berkumpul sesama jenis. Tikus akan menjadi galak dan sering menyerang manusia jika diperlakukan kasar atau kekurangan makanan. Tingkah laku tikus umumnya menyukai tanah dengan menggali, mengunyah dan peka terhadap aroma (Rejeki *et al.*, 2018)

1.3.2 Obesitas

Obesitas adalah salah satu masalah kesehatan yang paling serius di abad ke-21 yang mempengaruhi 300 juta orang diseluruh dunia. Obesitas mempunyai sifat multifaktorial yang diakibatkannya mulai dari genetik, fisiologis, perilaku, dan faktor lingkungan yang menyebabkan ketidakseimbangan antara asupan dan pengeluaran energi (Chaithanya *et al.*, 2020). Obesitas dapat didefinisikan peningkatan dan penimbunan sel-sel lemak secara berlebihan di dalam tubuh dan merupakan suatu keadaan yang menimbulkan komplikasi seperti tekanan darah tinggi, aterosklerosis, penyakit jantung, diabetes, kolesterol tinggi, kanker dan gangguan tidur (Kok *et al.*, 2023). Ada tiga jenis obesitas genetik *monogenic*, *poligenic* dan *sindromic* (Masood dan Myuri, 2023). Obesitas sendiri dapat menyebabkan perubahan fungsi ginjal sehingga berdampak pada hipertensi. Perubahan fungsi ginjal dimulai dengan aktivasi sistem saraf simpatis, aktivasi sistem *reninangiotensi-aldosterone*, dan kompresi ginjal (Sudargo *et al.*, 2018).

1.3.3 Daun Mangga (*Mangifera indica* L)

Menurut Mahdiyah dan Husni (2019), tanaman mangga menyebar ke wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Mangga merupakan tanaman berbuah musiman yang berupa pohon dan berasal dari India. Mangga memiliki potensi untuk dikembangkan karena tingkat keragaman genetiknya yang tinggi. Variasi pada bentuk, ukuran dan warna buah mangga menunjukkan keragaman genetik yang tinggi. Bentuk daun arum manis lebih kecil, tipis dan agak melengkung dengan ujungnya yang meruncing sedangkan daun mangga golek daun lenih besar, lebar dan tebal dengan ujung yang cenderung tumpul. Salah satu kandungan daun mangga yaitu flavonoid. Pada daun mangga arummanis mengandung flavonoid yang

lebih tinggi seperti mangiferin bersifat antioksidan dan anti inflamasi sedangkan daun mangga golek kandungan flavonoidnya lebih rendah.

Morfologi Mangga (*Mangifera indica* L.) merupakan pohon yang sepanjang tahun terus memiliki daun hijau dan dapat tumbuh hingga 10-45 m. Tanaman ini berbentuk kubah dengan dedaunan lebat, dan biasanya memiliki percabangan berat yang berasal dari batang yang kokoh. Daunnya tersusun secara spiral di percabangan dengan panjang helai daun sekitar 25 cm dan lebar 8 cm. terkadang daunnya memiliki warna merah dan lebih tipis ketika masih muda dan mengeluarkan aroma ketika diremas. Taksonomi *Mangifera indica* L. sebagai berikut (Mahdiyah dan Husni, 2019):

Kingdom : Plantae
 Divisi : Tracheophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Sapindales
 Famili : Anacardiaceae
 Genus : *Mangifera*
 Spesies : *Mangifera indica* L.

1.3.4 Lemak

Lemak Lemak didefinisikan secara kimiawi sebagai trigliserida dari gliserol dan beberapa asam lemak. Berdasarkan struktur dan komposisinya, lemak dapat berbentuk padat dan cair pada suhu kamar. Sumber utama lemak berasal dari makanan seperti daging, kuning telur, susu, kacang-kacangan, mentega, keju, dan berbagai jenis minyak sayuran (Banik dan Hossain, 2014).

Lemak adalah energi utama tubuh yang menjadi sumber energi vital selama kelaparan atau dalam kondisi pekerjaan berat yang membutuhkan banyak energi. Adapun fungsi lemak yaitu membantu penyerapan vitamin A, D, E, dan K yang larut dalam lemak. Selain itu lemak juga bertindak sebagai bantalan dan pengatur panas untuk melindungi jantung, hati, dan organ vital lainnya (Banik dan Hossain, 2014).

Klasifikasi lemak terdiri atas lemak jenuh dan lemak tak jenuh. Lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap pada rantai hidrokarbon dan berbentuk padatan pada suhu kamar. Mentega adalah contoh lemak jenuh yang sudah tidak asing lagi. Asupan lemak jenuh yang tinggi dapat meningkatkan kadar kolesterol darah terutama kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) yang dapat menyebabkan gangguan koroner dan tekanan darah tinggi. Lemak tak jenuh dapat berupa lemak tak jenuh tunggal dan lemak tak jenuh ganda (lebih dari satu ikatan rangkap). Asupan tinggi jenis lemak ini membantu menurunkan kolesterol LDL dan membantu meningkatkan *high density lipoprotein* (HDL). Lemak ini memiliki satu atau lebih ikatan rangkap pada rantai hidrokarbon dan berbentuk cair pada suhu kamar. Minyak adalah lemak tak jenuh. Lemak tak jenuh dapat berupa lemak tak jenuh tunggal dan lemak tak jenuh ganda atau lebih dari satu ikatan rangkap. Asupan tinggi jenis lemak ini membantu menurunkan kolesterol LDL jahat dan membantu meningkatkan HDL (Banik dan Hossain, 2014).

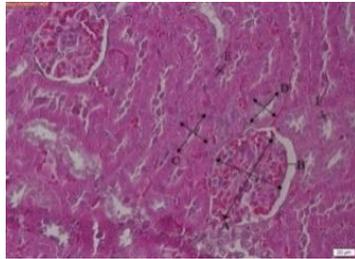
1.3.5 Ginjal (*Ren*)

Ginjal adalah organ mempunyai peranan penting dalam tubuh. Organ ini berfungsi untuk mengeluarkan cairan sisa metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin/air kencing. Selain itu, ginjal juga berperan menjaga keseimbangan udara, garam dan elektrolit, tidak kurang pentingnya ginjal adalah kelenjar endokrin setidaknya mengeluarkannya tiga hormon. Ginjal adalah organ tubuh rentan terhadap pengaruh bahan kimia, karena organ ini menerimanya 25-30% peredaran darah untuk dibersihkan, sehingga menjadi organ filtrasi mungkin terjadi perubahan patologis sangat tinggi (Suhita *et al.*, 2013). Ginjal merupakan organ berpembuluh darah yang sangat banyak dan memiliki fungsi untuk menyaring atau membersihkan darah dengan mengeluarkan zat sisa organik seperti urea, asam urat, kreatinin dan produk kerusakan pada ginjal (Almunawati *et al.*, 2017)

Ginjal tikus merupakan organ berukuran sedang yang terletak di bagian atas dinding abdomen, di belakang peritoneum. Kedua ginjal tikus terletak di kiri dan kanan *vertebra lumbalis* 2-3. Ginjal kanan terletak lebih kranial (ke atas) daripada ginjal kiri karena besarnya lobus hati kanan. Ginjal tikus dikelilingi oleh jaringan adiposa, yaitu jaringan lemak yang berfungsi untuk melindungi ginjal dari benturan. Jaringan adiposa ini berwarna putih di bagian luar dan berwarna coklat di bagian dalam. Pada bagian panggul, ginjal tikus juga dikelilingi oleh kantong jaringan adiposa berwarna coklat. Ginjal tikus berbentuk seperti kacang dan berwarna coklat kemerahan. Tikus jantan memiliki ginjal yang lebih besar daripada tikus betina (Treuting *et al.*, 2015).

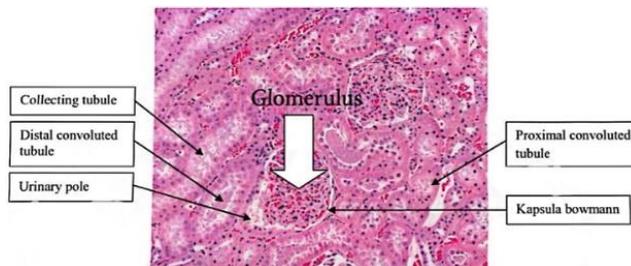
Ginjal dilapisi oleh suatu kapsul jaringan ikat yang padat tidak teratur, kemudian ginjal memiliki irisan sagittal dan menunjukkan sebuah korteks yang gelap pada bagian luar dan medula yang terang di bagian dalam dan terdiri dari beberapa banyak piramida renalis yang berbentuk kerucut. Pada bagian korteks ginjal didominasi oleh *corpusculum renalis* dan tubulus ginjal. *Corpusculum* terdiri atas kapsula bowman dan disusun oleh selapis pipih dan mengelilingi glomerulus. Tubulus ginjal yang terdapat pada bagian korteks ginjal yaitu tubulus kontortus proksimal dan kontortus distal. Perbedaan antara keduanya yaitu tubulus kontortus proksimal bagian basisnya sedikit lebar dari *apex*-nya dengan batas yang tidak jelas, intinya sedikit dan banyak *brush border* dibandingkan dengan tubulus distal yang lebih pucat, batas yang jelas dan terdapat inti yang lebih banyak (Eroshenko, 2010)

Menurut Lee *et al.* (2013), gambaran histologi ginjal tikus wistar normal sebagai berikut :



Gambar 2. Histologi ginjal tikus normal (Lee *et al.*, 2013)

Source: Lee *et al.* (2013) *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1(1): 1-9. <https://doi:10.1155/2013/590181>



Gambar 3. Histologi ginjal tikus normal. A) glomerulus, B) kapsula bowman, C) tubulus proksimalis, D) tubulus distal (Saraswati *et al.*, 2022)

Source: Saraswati *et al.* (2022) *Biogenesis Journal Ilmiah Biologis*. 10(1): 23-36. <https://DOI:10.24252/bio.v10i1.26187>

Kerusakan nefron dapat terjadi pada setiap bagiannya termasuk glomerulus, tubulus, jaringan interstitial atau pembuluh darah yang akan mengakibatkan kerusakan *irreversible* dan hilangnya fungsi nefron. Berdasarkan proses perjalanan penyakit dari berbagai penyebab pada akhirnya akan terjadi kerusakan nefron. Apabila nefron rusak, maka akan terjadi penurunan laju filtrasi glomerulus dan terjadilah penyakit ginjal kronik, dimana ginjal mengalami gangguan dalam fungsi ekskresi dan non ekskresi. Jika laju filtrasi glomerulus menurun, maka mengakibatkan turunnya klirens kreatinin dan peningkatan kade kreatinin serum. Hal ini menimbulkan gangguan metabolisme dalam usus yang mengakibatkan munculnya gejala klinis seperti anoreksia, nausea maupun vomitus (Yanuartono *et al.*, 2017)

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus hingga November 2024. Penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berkelamin jantan. Tikus yang digunakan memiliki bobot 200-300 gram yang diperoleh dari Kabupaten Maros. Kemudian akan diaklimasi dan diberikan perlakuan di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Tempat pengambilan sampel serta pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin.

2.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu berupa penelitian eksperimental laboratpris untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap histopatologi ginjal tikus wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ayakan (ukuran 40 Mesh), *blade*, blender, batang pengaduk, botol minum, *cassette*, *cover glass*, gelas ukur, gunting, *handscoon*, *incubator* (Mammert, Jerman), kandang ukuran 45 cm x 35 cm, kompor *portable* (Phillips, Indonesia), mikroskop olympus CX22 (ICEN, Cina), optilab 22, mikrotom, nampan, *object glass*, pemanas, penggaris, pinset, pipet tetes, sendok, sonde *needle*, *sputit* 3 ml, tabung reaksi, tempat spesimen, timbangan elektrik (Ohaus), *vacuum rotary evaporator* (Rotavapor, Swiss).

2.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus *wistar* (*Rattus norvegicus*) jantan umur 2-3 bulan dengan berat 200-300 gram, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), air, alkohol absolut I, alkohol absolut II, anhidrat asetat, asam sulfat, *aquades*, daun mangga arumanis dan mangga golek, etanol 70%, FeCl (III) 1%, Hematoksilin-Eosin (HE), HCl, HCl 2N, kloroform, mentega, minyak kelapa, *neutral buffered formalin*, pakan standar, pakan tinggi lemak komersil, *paraffin*, reagen *Dragendroff*, reagen *Mayor*, serbuk magnesium, telur bebek, *tissue embedding*, *xylol*.

2.4 Penelitian

2.4.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang tikus terlebih dahulu disterilkan dengan cara dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian diberi serbuk kayu sebagai alas kandang. Setelah kandang steril, tikus langsung ditempatkan dan diberi pakan *pellet* serta minum secara *ad libitum* secukupnya. Kandang juga diberi anyaman kawat sebagai penutup dan kemudian tikus diaklimatisasi selama 7 hari dan bersamaan dengan pembuatan ekstrak.

2.4.2 Pembuatan Pakan Formulasi Diet Tinggi Lemak

Pakan formulasi yang akan diberikan kepada masing-masing kelompok perlakuan dibuat dengan kombinasi beberapa bahan yang mengandung kadar

lemak. Bahan yang digunakan untuk membuat pakan formulasi diet tinggi lemak terdiri dari campuran mentega, minyak kelapa, dan telur bebek. Perbandingan ketiga bahan yang mengandung lemak tersebut yaitu 1:1:1 (gram). Mentega dan minyak terlebih dahulu dipanaskan kemudian dicampur dengan kuning telur. Campuran pakan ini diberikan kepada tikus sebanyak 2% dari total berat badan.

2.4.3 Ekstraksi Daun Mangga (*Mangifera Indica L.*)

Ekstrak berupa sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut sesuai seperti pelarut etanol. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan. Proses penguapan dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pekat (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Daun mangga arum manis dan mangga golek yang telah dikumpulkan, dicuci dan dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir kemudian ditiriskan. Daun selanjutnya dirajang dan dikering anginkan pada suhu ruangan. Daun yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk simplisia. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% hingga pelarut menjadi bening. Hasil maserasi disaring kemudian maseratnya dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Robiyanto *et al.*, 2018).

2.4.4 Skrining Fitokimia

1. Identifikasi senyawa flavonoid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika *gel*, fase gerak n-hexane:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2), dengan penampak bercak sitroborat. Uji positif jika bercak berwarna kuning-hijau berpendar di bawah sinar UV-366nm setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

2. Identifikasi senyawa tanin

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika *gel*, fase gerak metanol:air (6:4) dengan penampak bercak FeCl₃ 5%. Uji positif jika bercak berwarna biru di bawah sinar UV-366nm setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

3. Identifikasi senyawa alkaloid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika *gel*, fase gerak butanol:asam asetat:air (4:1:5) dengan penampak bercak *Dragendorf*. Uji positif jika bercak berwarna merah coklat di bawah sinar tampak setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

4. Identifikasi senyawa saponin

Sejumlah sampel ekstrak daun mangga dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL akuades panas, biarkan dingin lalu kocok secara kuat selama 30 detik. Kemudian tetesi asam klorida (HCl) 2N ke dalam tabung dan amati perubahan yang terjadi. Busa yang tidak hilang selama 10 menit setinggi 1-10 cm menunjukkan adanya senyawa saponin (Yuliawati *et al.*, 2022).

2.4.5 Perlakuan Sampel

Penentuan besar sampel yang digunakan dalam satu kelompok serta jumlah pengelompokan yang akan dilakukan dihitung dengan menggunakan rumus *Federer*.

Rumus *Federer*:

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

n= jumlah sampel perkelompok

t= jumlah pengelompokan

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Besar sampel pada penelitian ini yaitu 24 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan terdapat 6 ekor tikus wistar.

K- : Kelompok kontrol negatif diberikan pakan standar selama 30 hari

K+ : Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan diet tinggi lemak selama 30 hari

KP1 : Kelompok yang diberikan pakan diet tinggi lemak dan pakan formulasi kemudian pemberian ekstrak etanol daun mangga arum manis dosis 150 mg/kg BB selama 30 hari

KP2 : Kelompok yang diberikan pakan diet tinggi lemak dan pakan formulasi kemudian pemberian ekstrak etanol daun mangga golek dosis 150 mg/kg BB selama 30 hari

Mekanisme pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) dimulai dengan pemberian pakan diet tinggi lemak komersil berupa pakan *pellet* di pagi hari jam 08.00 WITA. Kemudian diikuti dengan pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) pada jam 10.00 WITA secara oral. Pemberian ekstrak diberikan sebanyak 0,9 ml dengan sediaan 44 mg ekstrak etanol daun mangga. Selanjutnya pada jam 16.00 WITA tikus kembali diberi pakan diet tinggi lemak dan pakan formulasi. Pemberian perlakuan dilakukan 30 hari.

2.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Tahapan pembuatan preparat histopatologi meliputi fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *cutting*, *staining*, *mounting*, dan *skoring*.

1. Preparat histopatologi ginjal dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang digunakan adalah larutan 10% *neutral buffered formalin*. Tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi adalah melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm. Pisau yang digunakan untuk *trimming* adalah pisau *scalpel* No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ.
2. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau *iso propyl* alkohol. Etanol yang digunakan yaitu konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan cara dimasukkan dalam larutan parafin cair. Parafin yang digunakan

- mempunyai titik cair 56-58°C.
3. *Embedding* dilakukan setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan parafin cair dan dilekatkan pada *embedding cassette* yang disebut blok.
 4. *Cutting* dilakukan saat jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 3 µm dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada gelas objek kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar.
 5. *Staining*, dilakukan setelah preparat mikroanatomi kering. Pewarnaan dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.
 6. *Mounting*, dilakukan dengan meneteskan entelan secukupnya dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis ginjal antar kelompok perlakuan.
 7. *Skoring* Histopatologi, preparat histologi diperiksa di bawah mikroskop dengan memperhatikan kondisi nekrosis, *brush border*, *cast formation* dan dilatasi tubulus organ ginjal. Adapun jenis *skoring* yang digunakan (tabel 2) sebagai berikut:

Tabel 1. Sistem penilaian untuk histopatologi ginjal pada bagian tubulus

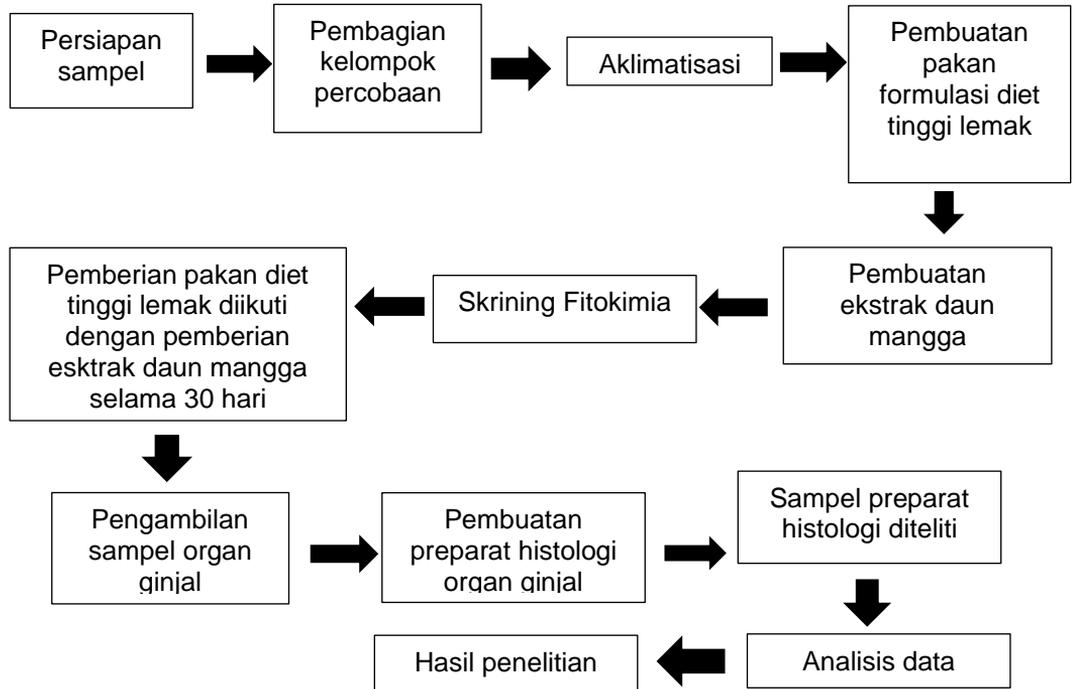
Skor/ Kerusakan	0	1	2	3	4	5
Nekrosis sel	Tidak ada perubahan	10%	11%- 25%	26%- 45%	46%- 75%	76%
Hilangnya <i>brush border</i>	Tidak ada perubahan	10%	11%- 25%	26%- 45%	46%- 75%	76%
<i>Cast formation</i>	Tidak ada perubahan	10%	11%- 25%	26%- 45%	46%- 75%	76%
Dilatasi tubulus	Tidak ada perubahan	10%	11%- 25%	26%- 45%	46%- 75%	76%

Source: Terada *et al.*, 2013. *Plos One*. 8(12): 1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0080850

2.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini secara deskriptif kualitatif yaitu dengan memberikan skor untuk kelima lapang pandang. Perubahan histologis akibat tubuluar mengalami nekrosis ditandai dengan menentukan persentase tubulus dengan nekrosis sel yang jelas, hilangnya *brush border*, *cast formation* (pembentukan gips) dan dilatasi tubulus. Skor 0 tidak adanya kerusakan, skor 1 kerusakan 10%, skor 2 kerusakan 11%-25%, skor 3 kerusakan 26%-45%, skor 4 kerusakan 46%-75% dan skor 5 kerusakan 76%.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian