

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Komposisi tubuh merupakan salah satu komponen penting yang berpengaruh terhadap kesehatan individu. Meskipun perubahan jumlah pada semua komponen tubuh akan berpengaruh pada kesehatan, namun lemak tubuh menjadi komponen yang paling berpengaruh terhadap kesehatan individu baik jangka pendek maupun jangka panjang (Teresa *et al.*, 2018). Lemak memiliki fungsi sebagai cadangan energi tubuh. Konsumsi lemak yang terlalu tinggi menyebabkan peningkatan berat badan serta penumpukan lemak. Kenaikan berat badan disebabkan oleh ketidakseimbangan antara penyerapan energi dan pengeluaran yang menyebabkan akumulasi lemak dalam jaringan adiposa (Moreno *et al.*, 2018).

Salah satu permasalahan yang diakibatkan karena peningkatan lemak tubuh adalah obesitas (Teresa *et al.*, 2018). Obesitas dapat mengakibatkan berbagai komplikasi penyakit kronis, seperti diabetes tipe-2, kanker, *stroke*, kesulitan bernafas, gangguan ginjal, muskuloskeletal kronis, gangguan metabolisme dan infertilitas. Menurut *World Health Organization* tahun 2014, prevalensi obesitas di seluruh dunia meningkat dua kali lipat sejak tahun 1980 (Putri *et al.*, 2017). Tingkat obesitas pada anjing dan kucing telah mencapai proporsi pandemi dan serupa dengan yang terjadi pada manusia, dengan sekitar 30%–40% anjing dan kucing kelebihan berat badan hingga mengalami obesitas. Obesitas telah dikaitkan dengan masalah kesehatan lainnya, termasuk osteoarthritis, penyakit ginjal, penyakit kulit, resistensi insulin, dan neoplasia pada anjing, sedangkan pada kucing obesitas dikaitkan dengan masalah dermatologis, diabetes mellitus, neoplasia, dan urolitiasis (Loftus dan Wakshlag, 2014).

Jika ditinjau dari farmakologi, terdapat 2 jenis pengobatan secara farmakologi yaitu dengan obat sintetik (kimia) atau obat tradisional (herbal). Golongan obat yang biasa digunakan yaitu golongan *gastrointestinal lipase inhibitor* contohnya adalah orlistat. Orlistat diakui dapat digunakan jangka panjang membantu menghambat penyerapan lemak yang dikonsumsi. Namun seringkali obat sintetik yang digunakan menimbulkan efek samping (Sumithran dan Proietto, 2014).

Tanaman mangga merupakan tanaman yang berpotensi sebagai obat herbal. Ekstrak daun mangga dilaporkan memiliki kandungan alkaloid, fenol, saponin, kumarin, tanin, flavonoid, triterponoid, steroid, dan glikosida (Nugraha *et al.*, 2017). Efektivitas antioksidan yang terkandung pada flavonoid efektif menghambat proses oksidasi lemak dan mengurangi stres. Senyawa flavonoid, saponin, dan tanin telah diketahui mempunyai khasiat untuk menurunkan akumulasi lemak. Flavonoid mampu menghambat enzim HMG-CoA *reductase*, sehingga mampu menurunkan kolesterol darah (Sulaeman *et al.*, 2022). Flavonoid memiliki efek yang sangat berpengaruh terhadap pencernaan, penyerapan, dan metabolisme makronutrien. Flavonoid mampu mengendalikan enzim lipase,  $\alpha$ -amilase, dan  $\alpha$ -glukosidase adalah enzim pencernaan utama yang penghambatannya dapat digunakan sebagai target pengobatan antidiabetes dan antiobesitas. Flavonoid sangat berpengaruh terhadap penghambatan lipase pankreas secara *in vitro*. Lipase pankreas adalah target enzim lipolitik utama untuk pengobatan anti-obesitas. Penghambatannya dapat mengurangi kadar lemak dalam darah, karena

enzim ini bertanggung jawab atas hidrolisis sekitar 70% lemak makanan (Mahboob *et al.*, 2023). Saponin bekerja dengan menghambat daya serap kolesterol di bagian usus melalui proses ikatan kompleks yang tidak larut terhadap kolesterol. Sedangkan tanin mampu menghambat daya serap lemak di bagian usus, mekanisme kerjanya mampu menimbulkan reaksi dengan protein mukosa dan sel epitel (Sulaeman *et al.*, 2022).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap histopatologi lambung tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

## 1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 1.2.1 Tujuan Penelitian

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

Tikus Wistar adalah salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian biomedik. Kelompok rodensia seperti tikus (*R. norvegicus*) sering dijadikan hewan model karena memiliki sistem faal yang mirip dengan manusia. Alasan menggunakan kedua hewan coba ini karena dapat bereproduksi dengan cepat, mempunyai respons yang cepat, memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia dan harganya relatif murah (Wuri *et al.*, 2021).



**Gambar 1.** Tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

Source: Dominguez *et al.*, 2014. *Animals*. 13(20): 1-16.  
<https://doi.org/10.3390/ani13203161>.

Menurut Fox *et al.* (2015), data fisiologis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) berdasarkan beberapa parameter (tabel 1) yaitu:

**Tabel 1.** Data fisiologi normal tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

Parameter	Nilai Normal
Temperatur tubuh	37,5°C
<i>Heart Rate</i>	300-500 <i>beats/min</i>
<i>Respiration Rate</i>	85/menit
Berat	Jantan dewasa: 300-500 gram Betina dewasa: 250-300 gram
Masa hidup	2,5-3 tahun

Source: Fox *et al.*, 2015. Laboratory Animal Medicine.

Tikus memiliki nilai-nilai fisiologi normal yang sangat penting dalam suatu penelitian. Nilai fisiologis normal dapat dijadikan acuan dalam menentukan kriteria inklusi penelitian. Selain itu, nilai fisiologis normal tikus diperlukan untuk pemberian intervensi perlakuan penelitian.

### 1.3.2 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 yang 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 dan membantu meningkatkan HDL (Banik dan Hossain, 2014).

### 1.3.3 Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)

Menurut Luqyana dan Husni (2019), mangga merupakan tanaman berbuah musiman yang berupa pohon dan berasal dari India. Tanaman ini kemudian menyebar ke wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Mangga memiliki potensi untuk dikembangkan dengan keragaman genetik tinggi. Variasi genetik terletak pada bentuk, ukuran dan warna buah mangga.

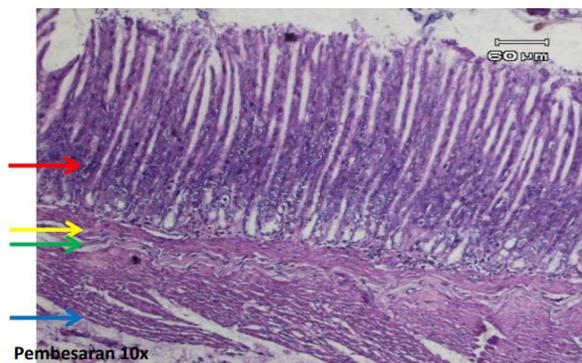
*Mangifera indica* L. merupakan pohon yang sepanjang tahun terus memiliki daun hijau dan dapat tumbuh hingga 10-45 m. Tanaman ini berbentuk kubah dengan dedaunan lebat, dan biasanya memiliki percabangan berat yang berasal dari batang yang kokoh. Daunnya tersusun secara spiral di percabangan dengan panjang helai daun sekitar 25 cm dan lebar 8 cm. Taksonomi *Mangifera indica* L. sebagai berikut (Luqyana dan Husni, 2019):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Famili	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Mangifera</i>
Spesies	: <i>Mangifera indica</i> L.

Tanaman mangga (*Mangifera indica* L.) memiliki banyak khasiat yang sering digunakan untuk pengobatan dan hampir seluruh bagian tanaman mangga dapat digunakan. *Mangifera indica* L. mengandung beberapa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid dan tanin. Kandungan beberapa senyawa metabolit sekunder tersebut dapat digunakan sebagai bahan baku obat (Anggraeni *et al.*, 2020).

#### 1.3.4 Lambung

Lambung adalah salah satu organ dalam sistem pencernaan yang berfungsi untuk mencerna makanan dan menyerap beberapa sari-sari makanan (Riong, 2022). Menurut Kololu *et al.* (2014), gambaran histologi lambung tikus wistar normal dari 4 lapisan. Lapisan lambung terdiri atas lapisan mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Adapun histologi organ lambung (Gambar 2) sebagai berikut:



**Gambar 2.** Histologi lambung tikus wistar normal tampak lapisan mukosa merah), submukosa (panah kuning), muskularis (panah hijau) dan serosa (panah biru)

Source: Kololu *et al.*, 2014. eBiomedik. 2(2): 442-451. <https://doi.org/10.35790/ebm.v2i2.4997>.

Lapisan mukosa merupakan lapisan yang tersusun oleh sel yang berfungsi untuk sekresi dan mengeluarkan berbagai jenis cairan, enzim, asam lambung, dan hormon. Pada lapisan mukosa terdapat 3 jenis sel yaitu sel goblet yang berfungsi menghasilkan lendir sebagai pelindung lapisan lambung, sel parietal yang berfungsi menghasilkan asam lambung untuk mengaktifkan enzim pepsin dan sel *chief* berfungsi untuk memproduksi pepsinogen. Lapisan submukosa terdiri atas jaringan penyambung

jarang, pembuluh darah dan limfe serta diinfiltrasi oleh sel-sel limfoid dan *mast cells*. Lapisan ini terdapat pembuluh darah arteri dan vena yang berfungsi untuk menyalurkan nutrisi dan oksigen ke sel-sel perut. Lapisan muskularis disebut juga dengan lapisan muskularis eksterna yang terdiri atas serabut-serabut spiral yang terletak dalam 3 arah utama yaitu lapisan eksterna tampak longitudinal, lapisan tengah tampak sirkular, dan lapisan interna tampak miring yang menyebabkan adanya gerak peristaltik pada lambung. Lapisan serosa merupakan lapisan tipis dan diliputi oleh mesotel dan berfungsi sebagai pelindung perut. Sel pada lapisan ini memproduksi cairan yang mengurangi gesekan antar lambung dengan organ lainnya (Sari dan Anitasari, 2018).

Secara farmakokinetik, banyak bahan yang berpotensi toksik dapat masuk ke dalam tubuh melalui lambung. Sebagaimana diketahui, secara histologi lambung terdiri atas empat lapisan, salah satunya lapisan mukosa yang merupakan lapisan barrier antara tubuh dengan berbagai bahan, termasuk makanan, toksin dan mikroorganisme yang masuk melalui saluran pencernaan. Salah satu komponen pertahanan mukosa lambung adalah sel goblet yang mensekresikan mukus. Mukus mempunyai kemampuan mempermudah meluncurnya makanan di sepanjang saluran pencernaan dan mencegah eksarasi atau kerusakan kimiawi epitel. Sekresi mukus juga dapat melindungi mukosa lambung dari agen asing, seperti mikroorganisme, cacing, bahan yang bersifat asam dan lain-lain. Degenerasi hidrofik biasanya banyak terjadi pada sel-sel epitel. Penyebabnya antara lain akibat diet atau zat toksik sehingga tidak terbentuk lipoprotein. Degenerasi dapat terjadi secara fisiologis tergantung dari pakan dan aktivitas metabolik lambung. Dari berbagai penyebab, adanya toksin yang masuk ke dalam tubuh dalam jumlah yang besar, merupakan penyebab utama terjadinya degenerasi organ. Selain degenerasi hidrofik, abnormalitas lambung juga ditandai dengan adanya inflamasi dan nekrosis pada jaringan atau sel. Inflamasi atau reaksi peradangan merupakan mekanisme penting yang diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari berbagai bahaya dan juga memperbaiki struktur serta gangguan fungsi jaringan. Sedangkan nekrosis merupakan proses kematian sel atau kematian kelompok sel yang masih merupakan bagian dari organisme hidup dengan penyebab yang bervariasi. Nekrosis dapat terjadi akibat bahan beracun, aktivitas mikroorganisme, defisiensi pakan, dan kadang-kadang gangguan metabolisme (Wiralaga *et al.*, 2015).

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Desember 2024. Penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berjenis kelamin jantan. Tikus yang digunakan memiliki bobot 200 gram yang diperoleh dari Kabupaten Maros. Aklimatisasi dilakukan 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 penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap gambaran histopatologi lambung tikus wistar (*Rattus norvegicus*) 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, cawan porselin, *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 HM 325 (Thermo Scientific, China), mikropipet, nampan, *object glass*, pemanas, penggaris, pinset, pipet tetes, sendok, sonde *needle*, *sputit* (1 ml dan 3 ml), tabung reaksi, tempat spesimen, timbangan elektrik (Ohaus, USA), *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, anestesi eter, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), air, alkohol absolut I, alkohol absolut II, *aquades*, daun mangga arumanis dan mangga golek, *entellan*, etanol 70%, FeCl (III) 5%, *Hematoksilin-Eosin* (HE), HCl 2N, *handscoon*, kapas, masker, mentega, minyak kelapa, *neutral buffered formalin*, pakan standar, pakan tinggi lemak komersil, *paraffin*, reagen *dragendrof*, reagen *sitroborat*, *silica gel*, telur bebek, *tissue embedding*, *xylo*.

### 2.4 Penelitian

#### 2.4.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang tikus terlebih dahulu disterilkan dengan cara dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian diberi sekam 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. Selanjutnya tikus diaklimatisasi selama 7 hari.

#### 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 1,2 kg dan mangga golek 1,5 kg 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 dipekatan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Robiyanto *et al.*, 2018). Setelah diperoleh ekstrak kental, dilakukan perhitungan rendemen. Menurut Syamsul *et al.* (2020), rumus perhitungan rendemen sebagai berikut:

$$\%Rendemen = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan rendemen daun mangga arum manis sebanyak 6,65% sedangkan rendemen daun mangga golek sebanyak 4,87%.

### 2.4.4 Skrining Fitokimia

#### a. Alkaloid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub>, 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).

#### b. Flavonoid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub>, fase gerak n-hexane:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2), dengan penampak bercak sitroborat. Uji positif jika bercak berwarna biru berpendar di bawah sinar UV<sub>366nm</sub> setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

#### c. Tanin

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub>, fase gerak metanol:air (6:4) dengan penampak bercak FeCl<sub>3</sub> 5%. Uji positif jika bercak berwarna hitam di bawah sinar UV<sub>366nm</sub> setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

#### d. Saponin

Ekstrak 1 gram dilarutkan dengan *aquades* 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, Selanjutnya menambahkan 1ml *aquades* 1:1 dan mengocok larutan 1 menit. Apabila terdapat busa diambahkan HCl 2N, apabila busa dapat bertahan selama 10 menit sehingga ketinggian 1-10 cm, maka positif mengandung saponin (Pratiwi *et al.*, 2023).

### 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 dan pakan formulasi selama 30 hari

KP1 : Kelompok yang diberikan pakan diet tinggi lemak komersil 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 komersil 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 ekstrak etanol daun mangga 44 mg. Selanjutnya pada jam 16.00 WITA tikus kembali diberi pakan diet tinggi lemak komersil dan pakan formulasi. Pemberian perlakuan dilakukan selama 30 hari.

#### 2.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung

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

1. Preparat histopatologi lambung 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  $\mu\text{m}$  dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada gelas objek kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar.
  5. *Staining* dilakukan setelah preparat mikrotomi kering. Pewarnaan dengan metode pewarnaan *Hematoksilin Eosin*.
  6. *Mounting* dilakukan dengan meneteskan *entellan* secukupnya dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis lambung antar kelompok perlakuan.
  7. *Scoring* Histopatologi, preparat histologi diperiksa di bawah mikroskop dengan memperhatikan kondisi hemoragi, inflamasi, dan nekrosis pada preparat organ lambung. Adapun jenis *scoring* yang digunakan (tabel 2) sebagai berikut:

**Tabel 2.** Skoring preparat histopatologi lambung

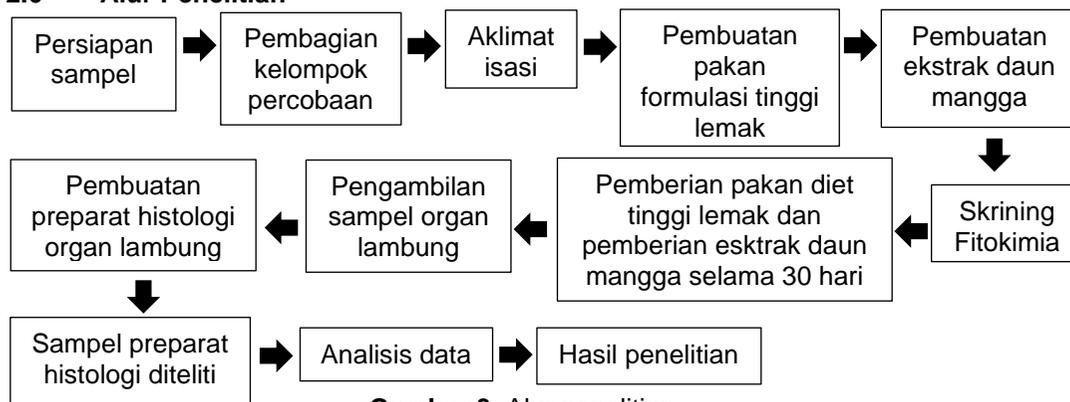
Mikroskopis	Skor 1	Skor 2	Skor 3
Hemoragi	Fokal	Multifokal	Difusa
Inflamasi	Fokal	Multifokal	Difusa
Nekrosis	Fokal	Multifokal	Difusa

Source: Simoes *et al.*, 2019. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2(2): 121-126. <https://doi.org/10.1002/ame2.12060>.

## 2.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini yaitu secara deskriptif kualitatif yaitu dengan memberikan skor untuk kelima lapang pandang. Skor 0 menunjukkan tidak ada hemoragi, dan inflamasi. Skor 1 bila didapatkan hemoragi, inflamasi, dan nekrosis pada satu fokus pengamatan (perubahan fokal). Skor 2 bila didapatkan hemoragi, inflamasi, dan nekrosis pada beberapa fokus pengamatan (perubahan multifokal). Skor 3 bila didapatkan hemoragi, inflamasi, dan nekrosis secara menyeluruh (difusa). Kemudian hasil skoring diuji statistika menggunakan SPSS versi 22.

## 2.6 Alur Penelitian



**Gambar 3.** Alur penelitian