

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Aterosklerosis merupakan kerusakan pada dinding pembuluh darah yang mempengaruhi dua lapisan membran, yaitu intima dan media. Kondisi ini terjadi akibat peningkatan kadar kolesterol yang abnormal, yang menyebabkan penumpukan kolesterol di dalam dinding pembuluh darah. Penumpukan kolesterol ini kemudian membentuk plak, yang secara perlahan dapat menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah. Kolesterol biasanya diproduksi oleh tubuh dalam jumlah yang seimbang. Namun, jumlahnya dapat meningkat akibat konsumsi makanan yang mengandung lemak (Listiyana *et al.*, 2013)

Obesitas adalah suatu kelainan yang ditandai dengan adanya penimbunan secara berlebihan jaringan lemak dalam tubuh. Hal ini dapat terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara asupan makanan dan penggunaan energi. Penelitian Triakoso dan Fauziah (2010) menunjukkan bahwa prevalensi obesitas pada anjing di Surabaya sebesar 10,53% dan meningkat pada tahun 2012 sebesar 13,54%. Data ini cukup menunjukkan bahwa obesitas pada hewan kesayangan khususnya anjing juga terjadi di Indonesia. Kadar lemak yang tidak normal lama kelamaan akan menumpuk di dinding arteri, sehingga menyebabkan aterosklerosis (Rinjani *et al.*, 2022)

Protokol pengobatan utama aterosklerosis adalah menurunkan lipid dan memperlebar pembuluh darah, bersamaan dengan terapi antikoagulan. Penelitian di bidang biomedis menemukan bahwa statin menunjukkan efek yang baik dalam menurunkan lipid darah dan memperbaiki endotel vaskular (Jia *et al.*, 2021). Penggunaan obat-obatan kimia dapat menimbulkan efek samping pada hewan. Adanya efek samping yang ditimbulkan dari penggunaan obat kimia membuat banyak yang beralih kembali menggunakan obat alami dengan memanfaatkan tumbuhan yang ada di sekitarnya. Penggunaan tumbuhan sebagai obat alami tidak mempunyai efek samping yang berbahaya (Kaunang *et al.*, 2019). Produk tumbuhan yang kaya polifenol seperti jus delima dan ekstrak kulit buah delima diketahui memiliki efek menguntungkan dalam menekan aterosklerosis. Semua komponen buah delima tampaknya memberikan efek vasculoprotektif. Kulit buah delima menunjukkan kapasitas antioksidan dan kandungan polifenol tertinggi (Manickam *et al.*, 2022)

Delima menjadi salah satu katalog “homologi obat dan makanan” di Tiongkok. Akar, bunga, buah, kulit, biji, dan bagian lain dari delima dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat. Ia memiliki berbagai aktivitas farmakologis, termasuk sebagai anti-inflamasi, antioksidan, antibakteri, dan antivirus, serta berperan dalam regulasi lipid dan imunomodulasi. Delima juga diteliti sebagai pengobatan aterosklerosis, diabetes, hipertensi, hiperlipidemia, beberapa jenis kanker dan untuk penyakit lambung dan penyakit mulut (Ge *et al.*, 2021). Senyawa polifenol delima terbukti melindungi tubuh dari stres oksidatif dengan mengaktifkan sistem pertahanan anti-oksidan endogen (Al-Jarallah *et al.*, 2013).

Penggunaan buah dan kulit buah delima dalam mengatasi aterosklerosis telah banyak dibahas. Namun, sedikit penelitian yang membahas peran daun delima terhadap aterosklerosis. Sebuah studi mengatakan kandungan ekstrak daun delima hampir mirip dengan buah dan bijinya, yang kaya akan flavonoid. Sehingga, peneliti tertarik untuk

meneliti lebih jauh terkait peran daun delima terhadap aterosklerosis dengan melihat gambaran histopatologi aorta dan melihat kadar profil lipid pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut.

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun delima (*Punica granatum*) terhadap profil lipid pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi pakan diet tinggi lemak?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun delima (*Punica granatum*) terhadap gambaran histopatologi aorta pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi pakan diet tinggi lemak?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun delima (*Punica granatum*) terhadap profil lipid dan gambaran histopatologi aorta pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi pakan diet tinggi lemak.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak daun delima terhadap profil lipid tikus wistar *Rattus norvegicus* yang diberi pakan diet tinggi lemak
- b. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak daun delima terhadap gambaran histopatologi aorta tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi pakan diet tinggi lemak

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 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 mencegah aterosklerosis

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi produk herbal yang aman dikonsumsi sebagai produk herbal pencegah aterosklerosis

1.5 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa adanya perubahan dari pemberian ekstrak daun delima pada tikus wistar yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui kadar profil lipid darah dan gambaran histopatologi aorta.

1.6 Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai “Pengaruh Ekstrak Daun Delima (*Punica Granatum* Linn.) Terhadap Aterosklerosis Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Yang Diberi Pakan Diet Tinggi Lemak” belum pernah dilakukan sebelumnya, tetapi penelitian serupa pernah dilakukan.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

Penulis	Judul
Budiarto <i>et al.</i> , 2017	Pengaruh Pemberian Ekstrak Rimpang Temulawak (<i>Curcuma Xanthorrhiza</i> Roxb.) dan Jintan Hitam (<i>Nigella Sativa</i>) terhadap Profil Lipid Tikus Sprague Dawley Dislipidemia
Agustina <i>et al.</i> , 2022	Respon Histologis Aorta dan Jantung Rattus Norvegicus Hiperlipidemia Setelah Pemberian Jus Buah Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) dan Ekstrak Daun Lakum (<i>Cayratia trifolia</i> L.)

1.7 Kajian Pustaka

1.7.1 Daun *Punica granatum* L



Gambar 1. Daun Delima (*Punica granatum* L.) (Balamurugan *et al.*, 2020)

Menurut Morton (1987), klasifikasi dari *Punica granatum* sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Order	: Myrtales
Family	: Punicaceae
Genus	: Punica L.
Species	: Punica granatum L.

Delima (*Punica granatum* L) adalah daun yang termasuk dalam famili *Punicaceae*, yang dikenal luas karena kegunaannya dalam budaya, tradisi, dan terapi, serta memiliki rasa yang lezat dan manfaat kesehatan yang signifikan. Sebagai tanaman pangan dan obat tradisional, delima kaya akan polifenol, termasuk flavonol, antosianin, dan tanin, dengan ellagitannin sebagai polifenol yang dominan (Benedetti *et al.*, 2023). Ekstrak etanol daun delima dan simplisia membuktikan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, saponin dan terpenoid di dalam tanaman tersebut (Pangesti *et al.*, 2021). Selain itu, ekstrak daun delima mengandung 33 jenis asam lemak, termasuk asam lemak tak jenuh seperti omega 3, omega 6, omega 7, dan omega 9. Asam lemak tak jenuh ganda yang ada dalam ekstrak daun delima terbukti sangat penting untuk kesehatan, karena dapat mencegah dan memperbaiki dampak buruk dari diet tinggi lemak, yang dapat menyebabkan inflamasi jaringan adiposa, resistensi insulin, peningkatan kadar kolesterol

darah, peningkatan risiko kematian akibat penyakit kardiovaskular, serta apoptosis dan neuroinflamasi (Amri *et al.*, 2020)

Lei *et al.* (2007) melakukan penelitian untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak daun delima pada tikus yang mengalami obesitas akibat diet tinggi lemak. Dalam penelitian ini, mereka memberikan ekstrak daun delima dengan dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB per hari melalui sonde selama 5 minggu. Hasilnya menunjukkan bahwa dosis 800 mg/kgBB dapat secara signifikan menurunkan berat badan, asupan makanan, dan kadar trigliserida serum pada tikus tersebut.

1.7.2 Tikus Putih



Gambar 2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Rosidah *et al.*, 2020)

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

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathia
Famili	: Muridae
Sub-famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: Rattus norvegicus

Tikus merupakan hewan nokturnal yang aktif pada malam hari. Salah satu strain tikus yang paling sering digunakan dalam penelitian laboratorium adalah Tikus Wistar. Tikus ini memiliki ciri khas berupa kepala lebar, telinga panjang, dan ekor yang lebih pendek dibandingkan panjang tubuhnya. Tikus galur *Sprague Dawley* dan *Long-Evans* dikembangkan dari strain Wistar. Dibandingkan dengan tikus *Sprague Dawley*, Tikus Wistar cenderung lebih aktif atau agresif (Liwandouw *et al.*, 2017). Tikus menjadi salah satu hewan model penelitian yang paling umum digunakan untuk mempelajari fisiologi, farmakologi, dan metabolisme, khususnya dalam penelitian medis dasar. Tikus sering dimanfaatkan untuk analisis biomedis, termasuk penelitian terkait penyakit kardiovaskular, metabolik, neurologis, perilaku, kanker, dan ginjal (Udomkasemsab dan Prangthip, 2019).

Obesitas pada tikus lebih mudah diperkirakan dengan BMI. BMI tikus wistar jantan yang normal berkisar antara 0,45 g/cm² hingga 0,68 g/cm². Tikus wistar jantan dengan BMI di atas 0,68 g/cm² dikategorikan sebagai obesitas. BMI pada tikus dihitung dengan cara berat badan (g) dibagi dengan panjang² (cm²). Indeks Lee biasa digunakan

sebagai pengukuran obesitas pada ekperimental tikus (Rabiu *et al.*, 2017). Apabila nilai indeks Lee > 300, maka tikus tersebut dinyatakan obesitas (Kosnayani *et al.*, 2021).

1.7.3 Aterosklerosis

1.7.3.1 Definisi Aterosklerosis

Aterosklerosis berasal dari bahasa Yunani, yang terdiri dari kata '*athero*' yang berarti bubur dan '*sclerosis*' yang berarti pengerasan. Secara harfiah, aterosklerosis dapat diartikan sebagai pembentukan plak ateroma (bercak seperti bubur) yang terbentuk akibat penumpukan lemak dan kolesterol di lapisan intima pembuluh darah. Kondisi ini dapat menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah serta hilangnya elastisitasnya (Kopaei *et al.*, 2014). Pembentukan plak ini diiringi dengan disfungsi sel endotel pada dinding pembuluh darah, yang meningkatkan regulasi molekul adhesi leukosit, diikuti oleh infiltrasi kolesterol dan sel busa proinflamasi, yang akhirnya membentuk plak aterosklerotik (Benslaiman *et al.*, 2022).

Salah satu faktor resiko dari aterosklerosis adalah hiperkolesterolemia yang terjadi dikarenakan kandungan lemak kaya akan kolesterol dan ester kolesterol dalam bercak perlemakan. Penyakit aterosklerosis paling umum mengenai arteri yang mendarahi jantung, otak, ginjal dan ekstremitas bawah, sehingga konsekuensi utama yang umum terjadi yaitu infark miokardium (serangan jantung), infark serebri (stroke), aneurisma aorta, dan penyakit vaskular perifer (gangren tungkai) (Lisabilla, 2018).

1.7.3.2 Patomekanisme Terjadiya Aterosklerosis

Proses aterosklerosis dimulai dengan kerusakan pada endotel pembuluh darah. Kerusakan lapisan endotel aorta diinisiasi oleh paparan radikal bebas terhadap Low Density Lipoprotein (LDL). Stress oksidatif menyebabkan terjadinya disfungsi endotel dan produksi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang berlebihan akan mengoksidasi LDL ekstraseluler. Kerusakan ini mengurangi kemampuan molekul adhesi pada endotel untuk melepaskan oksida nitrat dan zat lain yang seharusnya mencegah perlekatan makromolekul, trombosit, dan monosit pada dinding pembuluh darah. Setelah kerusakan terjadi, monosit dan lipid yang beredar mulai terkumpul di area cedera. Monosit kemudian melintasi endotelium, masuk ke dalam intima dinding pembuluh darah, dan berubah menjadi makrofag. Makrofag ini lalu memakan dan mengoksidasi akumulasi lipoprotein, yang memberi penampilan seperti busa. Makrofag yang telah berubah ini, bersama dengan sel otot polos yang mengandung ester kolesteril, membentuk sel busa (foam cells), yang merupakan komponen utama dalam plak aterosklerotik. Sel-sel busa ini kemudian berkumpul di pembuluh darah dan membentuk garis lemak (fatty streak). Seiring waktu, garis-garis lemak ini berkembang lebih besar dan bergabung, sementara jaringan otot polos dan serat di sekitarnya berkembang, membentuk plak yang lebih besar (Rahmawati, 2015).

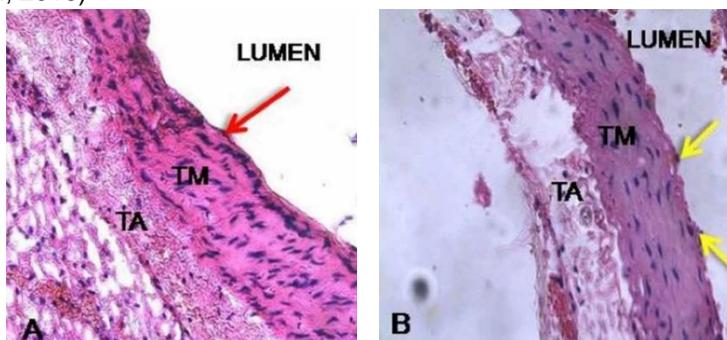
Fatty streak merupakan tahap awal pembentukan bercak ateroma. Pembentukan bercak ateroma, yang juga dikenal sebagai ateromatosa atau bercak fibrolipid (fibrous atau *fibrofatty*), adalah proses utama dalam aterosklerosis yang ditandai secara morfologis dengan penebalan tunika intima dan penumpukan lemak. Bercak ini menonjol ke dalam dan menyumbat lumen pembuluh darah, serta dapat melemahkan tunika media di bawahnya. Bercak ateroma berupa lesi fokal berwarna kekuningan, dengan bagian tengah yang mengandung lemak (terutama kolesterol dan ester kolesterol), yang tertutup oleh lapisan keras berwarna putih yang disebut fibrous

cap. Secara umum, bercak ateroma berkembang secara bertahap menjadi lebih besar, dengan proses kematian sel, degenerasi, sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler (remodeling), serta pembentukan trombus. Manifestasi klinis aterosklerosis biasanya disebabkan oleh penyempitan arteri, dan bila penyempitan melebihi 70%, dapat mengarah pada iskemia pada organ yang disuplai oleh arteri tersebut. Pada tahap lanjut, bercak ateroma dapat mengalami komplikasi klinis yang signifikan, seperti ruptur fokal, ulserasi, atau erosi fokal pada permukaan lumen bercak, perdarahan ke dalam bercak, serta trombosis yang sangat berbahaya karena dapat menyebabkan penyumbatan arteri sebagian atau total, kalsifikasi, dan dilatasi aneurisma (Erizon dan Karani, 2020).

1.7.3.3 Histopatologi Aterosklerosis

Pembuluh darah aorta memiliki tiga lapisan utama, yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia. Tunika intima terletak di antara dinding pembuluh darah dan lumen, terdiri dari satu lapisan sel endotel pipih yang terus-menerus dan secara histologis serupa dengan yang ada di subendokardium, serta sejumlah kecil jaringan ikat longgar. Tunika media terletak di tengah pembuluh darah dan mengandung sel otot polos serta jaringan ikat. Sementara itu, tunika adventisia terdiri dari jaringan ikat yang terhubung dengan jaringan lunak di sekitarnya (Treuting *et al*, 2015).

Kerusakan pada endotel vaskular mengurangi kemampuan untuk mengekspresikan molekul adhesi yang berfungsi melepaskan oksida nitrat dan zat lainnya, yang seharusnya mencegah penumpukan makromolekul, trombosit, dan monosit di area cedera. Ketika monosit melewati endotelium dan memasuki intima dinding pembuluh darah, monosit akan berkembang menjadi makrofag. Makrofag ini kemudian memakan dan mengoksidasi lipoprotein yang terakumulasi, menghasilkan penampilan makrofag seperti busa. Sel-sel busa makrofag ini kemudian berkumpul di pembuluh darah dan membentuk garis lemak (*fatty streak*). Seiring berjalannya waktu, garis-garis lemak ini berkembang lebih besar dan bergabung, sementara jaringan otot polos dan berserat di sekitarnya berkembang biak, membentuk plak yang lebih besar. Makrofag juga melepaskan zat-zat yang memicu peradangan dan mendorong proliferasi lebih lanjut dari otot polos serta jaringan berserat pada permukaan dinding aorta (Rahmawati, 2015)



Gambar 3. Gambaran mikroskopik aorta normal dan tidak normal, (A) Pada bagian tunika intima, tunika media, tunika adventisia tampak normal. (B) Terdapat endapan lipid (Panah kuning) yang terbentuk dalam tunika intima (Komolafe *et al.*, 2013)

1.7.3.4 Profil Lipid Pada Aterosklerosis

Profil lipid adalah suatu gambaran kadar lipid di dalam darah. Keadaan profil lipid yang tidak normal ditunjukkan dengan peningkatan kolesterol total, trigliserida, kolesterol

LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan penurunan kolesterol HDL (*High Density Lipoprotein*) merupakan faktor risiko kuat penyakit jantung koroner. Penyakit jantung koroner disebabkan oleh penyempitan pembuluh arteri yang mengalirkan darah ke otot jantung yang dikenal sebagai arterosklerosis.

Trigliserida adalah bentuk utama lemak yang disimpan oleh tubuh. Fungsi utama trigliserida adalah sebagai sumber energi. Trigliserida terdiri dari tiga molekul asam lemak yang terikat pada satu molekul gliserol alkohol. Trigliserida berasal dari makanan yang dimakan dan diproduksi oleh tubuh. Tingkat trigliserida dipengaruhi oleh jumlah lemak. Kadar trigliserida yang tinggi dianggap sebagai faktor risiko aterosklerosis (pengerasan pembuluh darah) karena banyak lipoprotein yang mengandung trigliserida yang mengangkut lemak dalam darah juga mengangkut kolesterol. Kolesterol total merupakan keseluruhan perhitungan jumlah kolesterol dalam darah berupa bahan lemak yang dibuat oleh sel-sel hati dan dibutuhkan oleh tubuh. Keberadaan kolesterol total yang berlebih dalam tubuh akan terjadinya penumpukan lemak atau plak dalam pembuluh darah yang dapat mengakibatkan penyempitan saluran pembuluh darah. Proses ini biasanya disebut dengan atherosclerosis (Ganggini *et al.*, 2022). Kolesterol HDL (*high density lipoprotein*) disebut juga kolesterol baik. Fungsi utama dari HDL (*high density lipoprotein*) adalah bekerja mengangkut kolesterol jahat dari endotel pembuluh darah sehingga tidak terjadi akumulasi kolesterol dalam endotel pembuluh darah kemudian diangkut ke hepar dan kemudian dibuang melalui saluran pencernaan. Fungsi dari HDL (*high density lipoprotein*) selain mengangkut kolesterol jahat juga menyebabkan pembuluh darah bisa berdilatasi karena produksi *Nitric oxide* (NO) yang meningkat, *Nitric oxide* (NO) merupakan molekul yang diproduksi oleh sel-sel endotelium pembuluh darah dan berfungsi sebagai vasodilator yang dapat melebarkan pembuluh darah, meningkatkan aliran darah, dan menurunkan tekanan darah (Erizon dan Karani, 2020).

1.7.4 Hubungan Ekstrak Daun Delima Terhadap Aterosklerosis

Delima (*Punica granatum*) kaya akan polifenol, zat yang ditandai dengan adanya lebih dari satu unit fenol per molekul, dan telah terbukti memiliki banyak efek menguntungkan pada sistem kardiovaskular. Senyawa polifenol mampu mengurangi dan mencegah oksidasi biomolekul esensial secara langsung dengan memadamkan spesies oksigen reaktif dimana gugus fenol menerima elektron bebas untuk membentuk radikal fenoksil yang relatif stabil sehingga menghentikan reaksi berantai oksidatif. Selain itu, senyawa polifenol delima terbukti melindungi terhadap stres oksidatif dengan mengaktifkan sistem pertahanan anti-oksidan endogen (Al - Jarallah *et al.*, 2013)

1.7.5 Hubungan Ekstrak Daun Delima Terhadap Profil lipid

Penelitian Amri *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak daun delima dengan dosis 250 mg/kgbb sekali sehari selama 12 minggu pada tikus wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak-tinggi fruktosa dapat menurunkan berat badan tikus sebanyak 10,44%, lebih baik dibanding ekstrak minyak biji delima (6%), jus delima (7%), dan ekstrak kulit delima (9,4%). Ekstrak daun delima pada dosis tersebut memiliki efek yang signifikan dalam memperbaiki kadar LDL (*low density lipoprotein*) dan trigliserida. Ekstrak daun delima juga menunjukkan efek signifikan dalam memperbaiki kadar HDL (*high density lipoprotein*) (44%) dibanding kelompok yang hanya diberi diet tinggi lemak-tinggi fruktosa. Hanya ekstrak daun delima yang memberi efek signifikan terhadap perbaikan kadar HDL (*high density lipoprotein*), sedangkan ekstrak minyak biji

delima dan jus delima tidak mempunyai efek protektif terhadap kadar HDL. Ekstrak daun delima juga memiliki efek menurunkan kadar kolesterol. Penelitian Das dan Barman (2012) melaporkan pemberian ekstrak daun delima dengan dosis 500 mg/kgBB sekali sehari via oral selama 1 minggu pada tikus wistar yang diinduksi diabetes menyebabkan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL (*low density lipoprotein*) serta peningkatan HDL (*high density lipoprotein*) (Das and Barman, 2012).

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Juni 2024. Pengambilan sampel dan pemeriksaan profil lipid darah dan histopatologi aorta tikus dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Kedokteran Hewan 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.001/UN4.1.RSHUH/B/PP36/2025.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 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 terukur, tabung tanpa *anticoagulant vacutainer*, penangas air, mikropipet dan tip, klip plastik, spuit 3 cc, kanula, batang pengaduk, *hotplate* (pemanas), sonde oral, wadah pembiusan, alat bedah minor, kaca objek dan *cover glass*, mikroskop Cahaya.

2.2.2 Bahan

Tikus wistar jantan, Ekstrak Daun Delima, pakan standar, pakan tinggi lemak, minum tikus, sekam, *aquades*, etanol 96%, sarung tangan lateks, masker bedah, kapas, *tissue*, *ether*, larutan untuk pembuatan *preparate (Hematoksilin-Eosin)*, larutan *bouin* (asam pikrat, formaldehid 4%, asam asetat) larutan *xylol*, *alcohol*, *paraffin* dan larutan *George*

2.3 Populasi Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus putih galur wistar jantan dengan berat 200-250 gram, berumur ± 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).

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok

n = Jumlah subjek kelompok

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq \frac{18}{3}$$

$$n \geq 6$$

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

RE 1 = 24 - 4 = 20

RE 2 = 20 - 4 = 16

RE 3 = 16 - 4 = 12

Berdasarkan perhitungan RE yang dilakukan, jumlah sampel diambil dari nilai minimum antara 10-20 yang dapat dibagi 4 yaitu 16 sehingga jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok yaitu 4 ekor pada masing-masing kelompok, dengan jumlah keseluruhan tikus yang dipakai berjumlah 16 ekor.

KLP - : (Kelompok Negatif): Kelompok tikus yang diberikan pakan standar dan air minum secara *ad libitum* selama 16 minggu.

KLP +: (Kelompok Kontrol Positif): Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum* selama 16 minggu.

KLP P1 : Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum*, serta diberikan ekstrak daun delima dengan dosis 500 mg/ kgBB via sonde pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.

KLP P2 : Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum*, serta diberikan ekstrak daun delima dengan dosis 800 mg/ kgBB via sonde pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.

2.4 Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Model

Sebelum memulai percobaan, tikus diadaptasi di dalam kandang selama 7 hari untuk penyeragaman cara hidup dan makanannya. Tiap tikus dipisah dan di tempatkan di kandangnya sendiri. Kesehatan tikus dipantau tiap harinya dan berat badan tikus ditimbang tiap 1 minggu. Tikus ditempatkan secara individual dalam kandangnya masing-masing dan diberikan pakan diet standar serta air minum secara *ad libitum*.

2. Penginduksian diet tinggi lemak (DTL), pemberian ekstrak daun delima (EDD) pada tikus dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari:

- Kelompok Kontrol (+) 4 ekor (+) DTL (-) EDD
- Kelompok Perlakuan 1 4 ekor (+) DTL (+) EDD 500 mg/kgBB
- Kelompok Perlakuan 2 4 ekor (+) DTL (+) EDD 800 mg/kgBB

Ekstrak daun delima diberikan secara oral melalui sonde selama 3 minggu.

$$\text{Dosis Pemberian} = \frac{\text{BB tikus (g)} \times \text{Dosis Sediaan Ekstrak (g)}}{1000}$$

3. Pembuatan Ekstraksi Daun Delima (*Punica granatum L.*)

Daun delima dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan ditiriskan, lalu dirajang kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang.

Setelah kering kemudian dibersihkan kembali dari kotoran yang mungkin tertinggal saat pengeringan lalu diolah dengan cara diblender hingga menjadi bubuk halus dan diperoleh daun delima kering. Pengekstraksian dilakukan dengan cara 1 kg daun delima kering di masukkan ke wadah maserasi dan ditambahkan etanol 96 % hingga daun delima terendam. Diaduk dan didiamkan selama 2 x 24 jam lalu disaring untuk mendapatkan filtrat. Lalu filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary (evaporator)* hingga didapatkan ekstrak kental dan ditimbang untuk menghitung rendemennya.

4. Diberikan Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak yang diberikan berupa pakan yang diberikan secara oral dengan komposisi pakan berupa 50% lemak sapi, 25% minyak kelapa, 10% kuning telur bebek dan 15% pakan standar. Tiap tikus yang mendapat perlakuan induksi diet tinggi lemak akan menerima 30 gr diet perhari serta air minum secara *ad libitum* selama 16 minggu.

5. Penimbangan Berat Badan Tikus

Kelebihan berat badan lebih dari 10% dari berat normal dianggap *overweight*, dan kelebihan berat badan lebih dari 20% dianggap obesitas (Artha *et al.*, 2019). Penentuan kategori obesitas pada tikus dengan indeks Lee dinyatakan jika nilai >0,3. Berat badan tikus diukur menggunakan timbangan digital dengan satuan gram dan panjang badannya (panjang naso-anal) diukur menggunakan penggaris atau meteran satuan cm (*centimeter*). Hasil pengukuran dihitung menggunakan rumus indeks Lee (Lee *et al.*, 2011):

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

6. Pemeriksaan Profil Lipid

Sampel darah untuk pemeriksaan profil lipid diambil setelah tikus wistar dipuasakan selama 12 jam. Sampel darah tersebut ditampung dalam tabung *vacutainer* tanpa *anticoagulant*. Jika darah sudah beku, selanjutnya sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan elemen darah dan serum. Kemudian, serum dipindahkan ke tabung mikro *ependorf* yang diberi label dan selanjutnya dianalisis untuk mengetahui konsentrasi kolesterol total, trigliserida, dan HDL (*high density lipoprotein*) menggunakan *spektrofotometer (Thermo Scientific λ=546nm)* (Hartono dan Simanjuntak, 2022).

7. Pembuatan Preparat Histopatologi Aorta

Preparat histopatologi aorta 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 skalpel No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* menggunakan *tissue processor (Leica, Germany)*, untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau *iso propyl* alkohol. 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. 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. Jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 4 µm dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada gelas objek yang sebelumnya diolesi *Mayer's egg albumin* dan ditetesi aquades kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar. Untuk selanjutnya setelah preparat mikroadotomi kering dilakukan pewarnaan dengan metode pewarnaan *Hematoxylin eosin*, kemudian dilakukan *mounting* dengan meneteskan entelan secukupnya dan ditutup dengan *coverglass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis aorta antar kelompok perlakuan. Setelah proses pengamatan selesai, dilakukan pemeriksaan ketebalan dinding aorta.

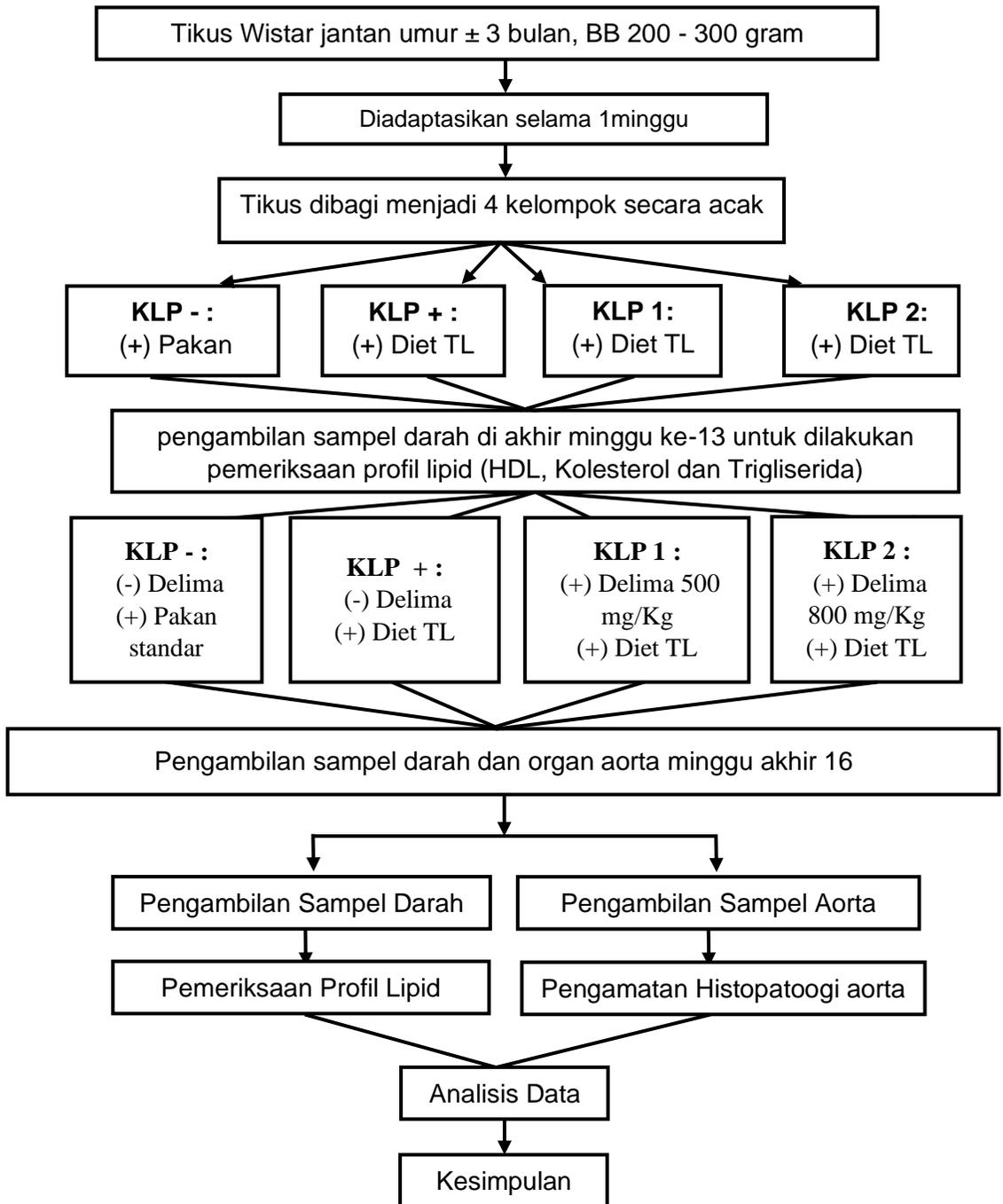
8. Pemeriksaan Ketebalan Dinding Aorta

Pemeriksaan ketebalan dinding aorta akan dilakukan dengan cara mengamati preparat aorta dengan perbesaran 400x menggunakan mikroskop, kemudian ketebalan aorta diukur dengan menarik garis tegak lurus dari tunika intima sampai tunika media pada 4 arah jarum jam (12:00, 03:00, 06:00 dan 09:00) menggunakan *software image* raster 3, kemudian hasil pengukuran dihitung dan dirata-ratakan ketebalannya (Manohara *et al.*, 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.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian