

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) kini menjadi salah satu tantangan kesehatan terbesar secara global. Menurut prediksi dari *World Health Organization* (WHO), jumlah penderita DM di Indonesia diperkirakan akan meningkat hingga 21,3 juta orang pada tahun 2030. Selain itu, *International Diabetes Federation* (FDI) juga menunjukkan terjadi kenaikan jumlah pasien DM pada tahun 2030 sebanyak 13,7 juta pasien (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021).

Prevalensi DM di Indonesia pada penduduk berusia di atas 20 tahun mencapai 14,7% di wilayah perkotaan dan 7,2% di wilayah pedesaan. Diproyeksikan bahwa pada tahun 2030, jumlah penderita DM berusia di atas 20 tahun akan meningkat menjadi 28 juta di daerah perkotaan dan 13,9 juta di daerah pedesaan. Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018 juga mencatat adanya peningkatan prevalensi DM hingga mencapai 8,5%. (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021).

Pankreas merupakan organ yang menjaga kadar glukosa darah melalui hormon glukagon dan insulin yang memiliki peran berlawanan dengan kadar yang seimbang. Homeostasis glukosa sistemik melibatkan berbagai organ, salah satunya adalah hepar. Secara fisiologis, glukosa plasma yang tinggi menyebabkan pensinyalan insulin agar dapat menurunkan glukosa darah dengan mengurangi glukosa hepatik (glukoneogenesis), meningkatkan penyimpanan glukosa sebagai glikogen di hepar (glikogenolisis) dan Mengurangi pelepasan asam lemak dari jaringan adiposa (lipolisis) dengan cara meningkatkan proses sintesis lemak (lipogenesis). Ketika sel beta pankreas menjadi resisten, insulin yang dilepas menjadi tidak efektif sehingga terjadi resistensi insulin yang dapat menyebabkan terjadinya diabetes mellitus. Selain resistensi insulin, disfungsi adiposit dapat berkontribusi terhadap perkembangan diabetes mellitus. (Nakitto, Aisha., 2021).

Diabetes mellitus merupakan kondisi yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah secara kronis, yang dapat mengakibatkan gangguan fungsi pada berbagai organ, termasuk mata, ginjal, sistem saraf, dan hepar. Patogenesis diabetes meliputi interaksi kompleks antara berbagai faktor seperti genetika, lingkungan, gangguan metabolisme, dan mediator inflamasi. Secara umum, proses inflamasi berkontribusi besar dan terjadi peningkatan signifikan kadar interleukin (IL)-1, IL-16, IL-18, dan *tumor necrosis factor* (TNF)- α pada individu diabetes. Di antara sitokin pro-inflamasi berbeda yang dilepaskan selama hiperglikemia, TNF- α memiliki potensi untuk mempromosikan aktivasi NF κ B, sehingga menyebabkan apoptosis atau kematian sel terprogram (Tauil et al, 2024).

Hepar mengendalikan keseimbangan glukosa dalam tubuh dengan mengatur ekspresi berbagai gen yang menghasilkan protein sekretori yang dikenal sebagai hepatokin. Terdapat tiga hepatokin dominan: fetuin-A, *betatrophin/angiopoietin-like protein 8* (ANGPTL8) dan *fibroblast growth factor 21*

(FGF21). Fetuin-A menghasilkan peningkatan peradangan dan resistensi insulin dengan menghambat reseptor insulin tirosin kinase dalam jaringan otot rangka dan hepatosit. Sebaliknya, ANGPTL8 memiliki proliferasi pada sel beta pankreas sementara FGF21 sebagai hormon sensitivitas insulin (Mohamed, Jamaludin.,2016).

Defisiensi insulin meningkatkan regulasi lipase hormon-sensitif dalam jaringan adiposa, kemudian menyebabkan peningkatan lipolisis dan sirkulasi asam lemak bebas, yang kemudian menumpuk di hepar. Proses ini meningkatkan penyerapan hepar lipoprotein densitas sangat rendah dan sintesis trigliserida. Penumpukan sel lemak di hepar dapat mengakibatkan gangguan sensitivitas insulin pada organ tersebut. (Mohamed, Jamaludin.,2016).

Kadar insulin yang berlebih dalam tubuh dapat menghambat regulasi adiponektin, sehingga memicu peningkatan lipogenesis di hepar dan menurunkan proses oksidasi asam lemak bebas. Hepatosit dan adipositokin yang meradang dan nekrotik akan melepaskan beberapa jenis mediator kimia yang akan mengaktifkan sel-sel stelata untuk menghasilkan faktor pertumbuhan jaringan ikat dan kolagen yang menyebabkan akumulasi di dalam matriks ekstraseluler sehingga mendukung fibrosis (Mohamed, Jamaludin.,2016).

Sebagai jaringan yang sensitif terhadap insulin, hepar merupakan organ utama yang rentan terhadap dampak stres oksidatif akibat hiperglikemia yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan hepar. Kondisi ini berlanjut dengan terganggunya metabolisme protein, karbohidrat, dan lipid, yang pada akhirnya meningkatkan stres oksidatif dan memicu rangkaian peradangan. Stres oksidatif dan respons inflamasi berperan sebagai faktor yang memperburuk kondisi patologis pada DM (Mohamed, Jamaludin.,2016).

Penyakit hepar dapat dideteksi secara biokimia dengan memantau kadar enzim dan produk jalur metabolisme yang terjadi di hepar. Penyakit hepar dapat dinilai dari bentuk kerusakan hepar, nekrosis, dan apoptosis. Aspartate aminotransferase (AST) dan alanine aminotransferase (ALT) adalah enzim metabolik yang digunakan sebagai indikator adanya nekrosis dan peradangan hepatosit melalui peningkatan AST dan ALT. Secara klinis, AST dan ALT dapat mendeteksi kerusakan hepar akut (Thakur, Simran., 2024).

Saffron (*Crocus sativus* L.) adalah tanaman yang memiliki kandungan berupa karotenoid (crocin), glikosida (picrocrocin), crocetin dan zat lemak volatil (safranal). Crocin adalah salah satu zat aktif biologis utama yang memiliki sifat antioksidan. Crocin menunjukkan efek antihiperglikemik, antioksidan, dan antihiperlipidemik pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin (STZ). Crocin memiliki efek antidiabetes pada tikus jantan. Selain itu, crocetin mengurangi supresi ekspresi adiponektin, resistensi insulin, dan menghambat peningkatan ekspresi leptin pada jaringan adiposa (Shirali et al, 2013).

Penelitian terdahulu didapatkan hasil yaitu saffron yang mengandung crocin dan sitagliptin (obat hipoglikemik oral standar) pada tikus diabetes yang diinduksi STZ menunjukkan hasil bahwa crocin memiliki efek yang lebih besar dibandingkan dengan sitagliptin pada kadar glukosa serum, reaktivitas imun insulin, dan diameter pulau β (Samaha et al, 2019).

Diabetes yang diinduksi secara eksperimental, tikus adalah pilihan yang lebih disukai untuk diterapkan karena ukuran tubuh, memiliki perilaku yang tenang sehingga memungkinkan penanganan yang mudah, serta biaya makanan dan kandang yang jauh lebih rendah. (Ali, M A., 2023). Untuk menginduksi diabetes, tikus harus mengonsumsi diet tinggi lemak dalam jangka waktu tertentu agar menimbulkan resistensi insulin.

Model tikus yang diinduksi dengan diet tinggi lemak dapat mengembangkan model resistensi insulin yang dikombinasikan diet tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah. Diet tinggi lemak dapat menginduksi resisten insulin perifer yang diikuti dengan pemberian streptozotocin dosis rendah yang menargetkan sel beta pankreas sehingga dapat menggambarkan patogenesis penyakit diabetes pada manusia (Gheibi, Sevda., 2017).

Pemberian diet tinggi lemak memiliki komposisi beragam, seperti pada penelitian Atanasovka (2014) membuat model tikus diabetes menggunakan komposisi 45% lemak, 20% protein dan 35% karbohidrat. Perbedaan dari diet tinggi lemak disetiap penelitian tergantung dari presentase lemak yang diberikan. Pada umumnya, pemberian 40 – 60% kalori dari lemak pada diet dapat menyebabkan penyakit metabolik, hipertensi, obesitas dan produksi sitokin pro inflamasi. Terdapat tingkatan berdasarkan kadar lemak didalam diet; diet dengan 10% kalori dari lemak dianggap sebagai diet rendah lemak, 30-50% kalori dari lemak dianggap sebagai diet tinggi lemak, dan > 50% kalori dari lemak dianggap sebagai diet sangat tinggi lemak. Kelompok diet tinggi lemak dan sangat tinggi lemak yang dianggap mampu untuk menginduksi obesitas dan diabetes (Gheibi, Sevda., 2017). Penambahan diet tinggi glukosa dapat membantu meningkatkan glukosa darah. Walaupun glukosa kurang reaktif terhadap pembentukan lemak di hepar, namun glukosa dapat menyebabkan hiperglikemia yang dapat merangsang insulin (Tan, Hongpin., 2018).

STZ memiliki sifat sitotoksik yang dapat dilihat setelah 72 jam pemberian. Efek toksik STZ dimulai ketika senyawa ini masuk ke dalam sel melalui transporter glukosa-2 (GLUT2) yang memiliki afinitas rendah. Transporter ini terdapat pada membran plasma sel β pankreas, hepatosit, serta sel tubulus ginjal. STZ akan menumpuk dalam sel beta pankreas melalui transporter glukosa (GLUT2). STZ kemudian terbagi menjadi glukosa dan methylnitrosourea menimbulkan sifat alkilasi yang menyebabkan kerusakan makromolekul *irreversibel*, terutama DNA mitokondria (mtDNA). Hal ini menyebabkan kerusakan pada berbagai jalur pensinyalan metabolik dan sel beta menjadi rentan terhadap kematian sel dan menyebabkan depresi dalam produksi insulin (Ali, M A., 2023).

Peningkatan glukosa dapat terjadi 3 – 7 hari setelah dilakukan injeksi streptozotocin dosis rendah dan sebelumnya telah dilakukan manipulasi diet selama 2 minggu. Walaupun tidak ada standarisasi kadar glukosa untuk mendefinisikan model hewan diabetes, namun beberapa kepustakaan menyebutkan bahwa kadar glukosa puasa > 150 mg/dl dan glukosa sewaktu > 200 mg/dl dapat direkomendasikan menjadi hewan diabetes (Gheibi, Sevda., 2017).

1.2 Rumusan Masalah

Dengan mempertimbangkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimanakah efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap gambaran histologi hepar pada tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap gambaran histologi hepar pada tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Menguji efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap berat hepar tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- b. Menguji efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap fungsi hepar melalui pemeriksaan kadar serum ALT dan AST tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- c. Mengetahui efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap kadar total kolesterol tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- d. Menguji efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap gambaran histopatologi hepar tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- a. Memberi informasi ilmiah mengenai efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap perubahan berat hepar, kadar ALT dan AST, total kolesterol serta gambaran histopatologi hepar tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.
- b. Menambah pengetahuan dan referensi terhadap penelitian selanjutnya mengenai kerusakan hepar akibat resistensi insulin.

1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Bagi masyarakat: memberi informasi mengenai efektifitas Saffron (*Crocus sativus*) terhadap kerusakan hepar akibat resistensi insulin.
- b. Bagi peneliti: sebagai salah satu bentuk kreatifitas dalam pengembangan ilmu pengetahuan.
- c. Bagi perguruan tinggi: sebagai sumbangsih pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK).

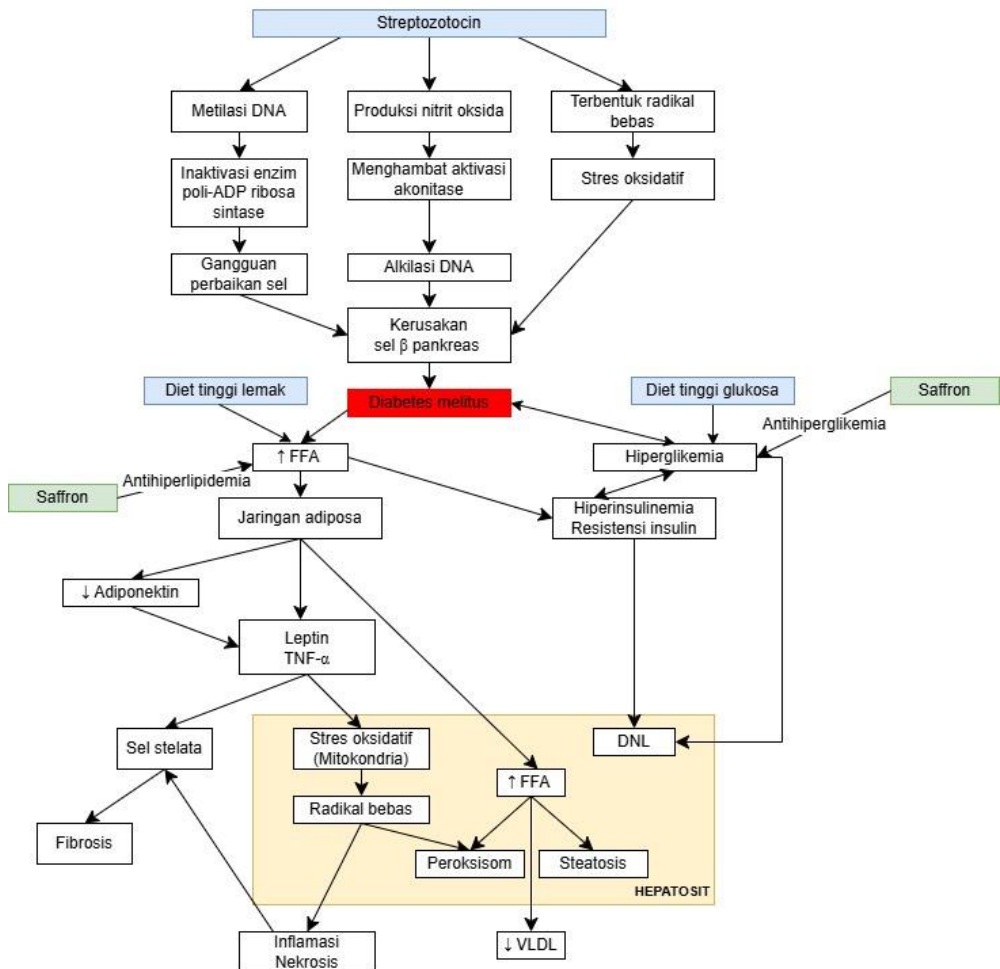
1.5 Orisinalitas Penelitian

Penelitian yang telah menggunakan saffron pada kerusakan hepar pada tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin sebagai berikut:

Peneliti (Tahun)	Judul	Variabel	Hasil
Rahbani Mohammad, et al (2011)	Attenuation of oxidative stress of hepatic tissue by ethanolic extract of saffron (dried stigmas of <i>Crocus sativus</i> L.) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats	Hepar tikus Wistar jantan usia 8 minggu (180 – 200 gram) yang diinduksi streptozotocin (65 mg/kgbb) dengan pemberian saffron (40 mg/kgbb /intraperitoneal) selama 8 minggu	Kelompok DM dengan pemberian saffron dapat mencegah perubahan histopatologi hepar dan tidak ada perubahan lemak
Eyup Altinoz, et al (2014)	Protective effect of saffron (its active constituent, crocin) on oxidative stress and hepatic injury in streptozotocin induced diabetic rats	Hepar tikus Wistar albino betina usia 6 bulan (150 – 200 gram) yang diinduksi streptozotocin (50 mg/kgbb) dengan pemberian saffron (20 mg/kgbb) selama 21 hari	Kelompok DM dengan pemberian saffron dapat menurunkan kadar ALT dan AST serta berkurangnya perubahan histopatologi pada hepar tikus
Ali Doaa A, et al (2016)	Efficacy of saffron extract and fenugreek seeds supplementation on liver of streptozotocin induced diabetic rats	Hepar tikus Wistar albino jantan (120 – 140 gram) yang diinduksi streptozotocin (50 mg/kgbb) dengan pemberian saffron (100 mg/kgbb/oral) dan biji fenugreek (20 mg/kgbb/oral) selama 6 minggu	Kelompok DM dengan pemberian saffron dapat mengurangi perubahan histopatologi pada hepar tikus
Pangiotis Konstantopoulos, et al (2017)	Metabolic effects of <i>Crocus sativus</i> and protective action against non-alcoholic fatty liver disease in diabetic rats	Hepar tikus Sprague-Dawley jantan usia 12 minggu yang diinduksi streptozotocin (40 mg/kgbb) dengan pemberian saffron (100 mg/kgbb/oral) selama 8 minggu	Kelompok DM dengan pemberian saffron didapatkan gambaran agregasi inflamasi mononuclear yang ringan dibandingkan

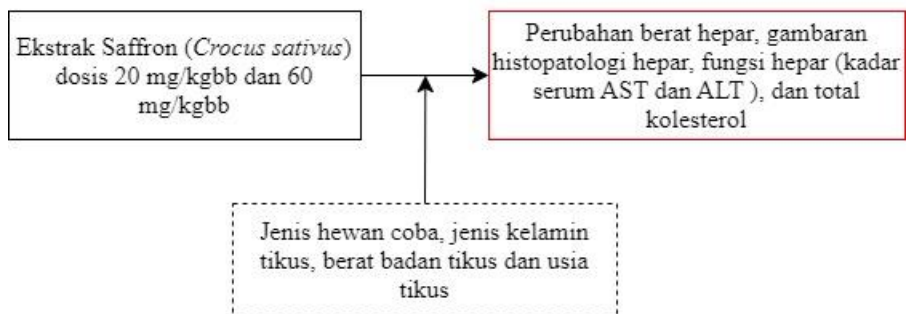
Tabel 1. Penelitian Terdahulu Saffron Terhadap Kerusakan Hepar Tikus Diabetes Diinduksi Streptozotocin

1.6 Kerangka Teori



Bagan 1. Kerangka Teori (Mohamed, Jamaludin.,2016; Husna, Fauzal., 2019; Aryaeian, Naheed., 2024). Keterangan: FFA=free fatty acid; TNF=tumour necrosis factor; DNL=de novo lipogenesis; VLDL=very-low-density lipoprotein

1.7 Kerangka Konsep



Keterangan:

- : Variabel bebas (*Independent variable*)
- : Variabel terikat (*Dependent variable*)
- : Variabel kontrol
- : Hubungan antar variabel

Bagan 2. Kerangka Konsep Penelitian

1.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah: terdapat efek pemberian saffron (*Crocus sativus*) terhadap berat hepar, kadar serum ALT dan AST, total kolestrol dan gambaran histopatologi hepar tikus diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak tinggi glukosa dan streptozotocin dosis rendah.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain penelitian *post-test only control group*. Penelitian ini terdiri atas dua tahap, tahap pertama yaitu *preliminary test* guna melihat apakah telah terjadi kerusakan histologi hepar setelah diinduksi oleh diet tinggi lemak tinggi glukosa (HFHGD) dan streptozotocin (STZ) dosis rendah. Kemudian dilakukan penelitian utama, yaitu pemberian bahan uji berupa ekstrak saffron dengan dosis rendah (20 mg/kgbb/hari) dan dosis tinggi (60 mg/kgbb/hari) selama 28 hari untuk melihat efektivitasnya terhadap gambaran histopatologi hepar tikus model diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 – Maret 2025.

2.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

- a. Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin: tempat pemeliharaan hewan coba;
- b. Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin: tempat uji proksimat pakan diet tinggi lemak;
- c. Laboratorium Fitofarmaka dan Faramsetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin: tempat pembuatan dan uji kualitatif fitokimia ekstrak saffron;
- d. Laboratorium Hewan Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin: tempat memeriksa kimia darah hewan coba; dan
- e. Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri (RSPTN) Universitas Hasanuddin: tempat pembuatan dan pemeriksaan histopatologi hepar hewan coba.

2.3 Populasi dan Sampel

2.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) galur *Wistar*.

2.3.2 Sampel

- a. Kriteria Inklusi
 - Sehat (tampak bergerak aktif, tidak terlihat rambut kusam, sakit, luka pada kulit, dan cacat)
 - Berjenis kelamin jantan
 - Berusia 8-12 minggu
 - Berat badan 150-200 gram
 - Kadar glukosa darah puasa $\geq$ 250 mg/dl pada kelompok diabetes (Mohammad, R., 2011)
- b. Kriteria Eksklusi

- Tikus sakit, cacat, atau luka
- Kadar glukosa darah puasa < 250 mg/dl pada kelompok diabetes (Mohammad, R., 2011)

2.3.3 Teknik Perhitungan Jumlah Sampel

Alokasi sampel dengan menggunakan metode *Simple Random Sampling*. *Simple Random Sampling* (SRS) adalah metode pengambilan sampel di mana setiap hewan coba dalam populasi memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai sampel agar menghindari bias dalam pemilihan hewan, sehingga hasil penelitian menjadi valid dan dapat digeneralisasi (Kerlinger, 2006). Metode ini dilakukan sebelum aklimatisasi, yaitu proses fisiologis, perilaku, dan psikologis yang dialami oleh hewan dalam menyesuaikan diri terhadap lingkungan baru, seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan jenis pakan yang berbeda dari habitat sebelumnya (CACC, 2020).

Penentuan besar sampel sesuai dengan *group comparison - one way ANOVA*, dimana sample minimal menggunakan $DF = 10$, sedangkan sampel maksimal menggunakan $DF = 20$ (Zahiruddin, et al., 2017).

Sampel minimal :

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 10/4 + 1$$

$$n = 2,5 + 1$$

$$n = 3,5$$

Sampel maksimal

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 20/4 + 1$$

$$n = 5 + 1$$

$$n = 6$$

Keterangan:

n : jumlah sampel per kelompok

DF : *degrees of freedom* (derajat kebebasan)

K : jumlah kelompok

Sehingga di dapatkan hasil $3,5 \leq n \leq 6$, yang artinya sampel minimal tiap kelompok adalah 4 ekor tikus putih dan jumlah sampel maksimal adalah 6 ekor tikus putih. Sehingga ditetapkan bahwa besar sampel pada penelitian ini adalah 19 ekor tikus, dengan pembagian sampel sebagai berikut :

Kelompok non-diabetes (K-)	4 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah (Kd)	5 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah dan ekstrak saffron dosis 20 mg/kgbb (P1)	5 ekor
Kelompok diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah dan ekstrak saffron dosis 60 mg/kgbb (P2)	5 ekor
Total	19 ekor

Tabel 2. Besar Sampel Penelitian

2.4 Klasifikasi Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas (*independent variabel*)
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak saffron (*Crocus sativus*).
- 2) Variabel terikat (*dependent variabel*)
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah :
 - Berat hepar tikus diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah
 - Kadar *Alanine Aminotransferase* (ALT) serum dan *Aspartate Aminotransferase* (AST) serum tikus diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah
 - Kadar total kolesterol tikus diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah
 - Gambaran histopatologi hepar tikus diabetes yang diinduksi HFHGD dan STZ dosis rendah
- 3) Variabel kontrol
Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah galur hewan coba, jenis kelamin tikus, berat badan tikus, usia tikus dan standarisasi pemberian diet.

2.5 Definisi Operasional

Variabel Bebas				
Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Unit	Skala	
Saffron	Tanaman yang memiliki kandungan berupa karotenoid (crocin), glikosida (picrocrocin), crocetin, dan zat lemak volatile (safranal). Saffron yang digunakan Herat saffron Afghanistan (KEMTAN RE PL 36.03-B.III.00-02-000057-03/21). Dosis yang digunakan adalah 20 dan 60 mg/kgBB dan diberikan dalam bentuk ekstrak melalui sonde (Dehghan, Firouzeh., 2016)	mg/kgBB	Nominal	
Diet tinggi lemak (HFD)	Pemberian HFD merujuk pada penelitian Soetikno et al (2023) dalam bentuk pellet dengan komposisi minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan dan tepung kedelai.	gram	Nominal	

	Dengan nilai makronutrien meliputi: - Lemak: 45.88% - Karbohidrat: 32.6% - Protein: 11.24% Pakan diberikan dengan formula 10% dari berat badan setiap hari selama 12 minggu.			
Diet tinggi glukosa (HGD)	Pemberian glukosa 20% merujuk pada penelitian Soetikno et al (2023) dengan melarutkan dekstrosa bubuk (Glukosa Monohidrat, ROFA Laboratorium Centre) sebanyak 300 gram ke dalam 1.200 ml air yang dituang ke dalam tempat minum tikus yang berisi 50 ml kemudian diberikan selama 12 minggu.	gr/ml	Nominal	
Streptozotocin (STZ)	Senyawa alami yang ditemukan dalam bakteri Streptomyces achromogenes memiliki sifat diatogenik. STZ masuk ke dalam sel melalui transporter glukosa-2 (GLUT2) yang terdapat pada membran plasma sel β, hepatosit, serta sel tubulus ginjal. STZ diinjeksi intraperitoneal dengan dosis 35 mg/kgbb menggunakan merk Santa Cruz (CA, USA, #sc-200719), (Husna, Fauzal., 2019).	mg/kgBB	Nominal	
Variabel Terikat				
Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Unit	Skala	
Histologi hepar	Kerusakan jaringan dinilai dari adanya	Skoring	Ordinal	

	steatosis, inflamasi lobular dan balonisasi hepatosit yang disebabkan oleh akumulasi lemak pada hepar. Derajat kerusakan dianalisis secara semi kuantitatif dengan pengelompokan sebagai berikut: - Steatosis: 0 – 3 - Inflamasi lobular: 0 – 3 - Balonisasi hepatosit: 0 – 2 Diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x pada 10-20 lapang pandang (Gabriel, 2008).		
Aspartate Aminotransferase	Pemeriksaan fungsi hepar dilakukan dengan menguji Aspartate Aminotransferase (AST) serum. Nilai normal AST pada tikus adalah 50-150 U/L (K. Md. M. Hasan et al., 2018).	Unit/Liter (U/L)	Rasio
Alanine Aminotransferase	Pemeriksaan fungsi hepar dilakukan dengan menguji Alanine Aminotransferase (ALT). Nilai normal ALT adalah 43,9 – 83,2 U/L (Djabir et al., 2017).	Unit/Liter (U/L)	Rasio
Total kolesterol	Pemeriksaan dilakukan untuk menguji total kolesterol pada tikus. Nilai normal kolesterol adalah 37 – 85 mg/dl (Charles River Lab, 2008).	mg/dl	Rasio

Tabel 3. Definisi Operasional

2.6 Alat dan Bahan Penelitian

2.6.1 Alat Penelitian

- Alat Pembuatan Ekstrak Saffron (*Crocus sativus*)
 - Kertas saring Whatman No. 1
 - Gelas ukur

- b. Alat Pemeliharaan Tikus
 - Kandang plastik dengan ukuran 40 cm x 20 cm x 20 cm dilengkapi botol minum
 - Sonde lambung ukuran 18 ga dan spuit 3 cc
 - Timbangan tikus (Mettler PE 3600/DeltaRange) dengan wadah plastik (dalam gram).
- c. Alat Perlakuan Tikus
 - Sarung tangan
 - Spuit 1 ml
- d. Alat Pemeriksaan Glukosa Tikus
 - Glucometer *Accu-chek Instant* (Altek Biotechnology Corporation, China)
 - Strip glucometer *Accu-chek Instant* (Altek Biotechnology Corporation, China)
- e. Alat Pembuatan Preparat Histologi Hepar
 - Sarung tangan
 - Wadah fiksasi
 - Water bath
 - Mikrotome rotary
 - Mikroskop cahaya
 - Object glass, cover glass, bak lilin.
 - Tissue
 - Alat bedah minor : scalpel, gunting bedah, pinset surgis, kassa, jarum pentul.
- f. Alat Pemeriksaan Fungsi Hepar (ALT – AST)
 - Tabung vacuum tube plain 3 ml
 - Tabung pipa kapiler (Nesco)
 - Mesin *Thermo Scientific Indiko*.
- g. Alat Pemeriksaan Total Kolesterol
 - Tabung EDTA
 - Tabung pipa kapiler
 - Mesin *Thermo Scientific Indiko*.

2.6.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan Pembuatan Ekstrak Saffron (*Crocus sativus*)
 - Benang saffron ekstra super negin dari Herat saffron Afghanistan (KEMTAN RE PL 36.03-B.III.00-02-000057-03/21) kering 26 gram
 - Etanol 96%
- b. Bahan Pemeliharaan Tikus
 - Tikus *Wistar* usia 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 23 ekor
 - Pakan standar (Rat Bio, Indonesia)
 - Pakan tikus diet tinggi lemak: minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan, tepung kedelai
 - Dekstrosa bubuk (Glukosa Monohidrat, ROFA Laboratorium Centre, 50-99-7)

- Sekam
- Air matang
- Aquades
- c. Bahan Perlakuan Tikus
 - Streptozotocin *Santa Cruz* (CA, USA, #sc-200719) 350 mg
 - Sitrat buffer 0,01 M (pH 4,5)
 - Cairan NaCl 0,9%
- d. Bahan Pemeriksaan Glukosa Tikus
 - Serum darah 2-3 cc
- e. Bahan Pembuatan Preparat Histologi Hepar
 - Netral buffer formalin 10%
 - Parafin 58
 - Etanol absolut I, II, dan III
 - Alkohol 95%, 90%, 80%, 70%, alkohol asam
 - Xylol I, II, dan III
 - Larutan *Mayer Hematoxylin*
 - Larutan *Eosin*
 - Kertas label
 - Entelan
- f. Bahan Pemeriksaan Fungsi Hepar (ALT – AST)
 - Serum darah 2-3 cc
- g. Bahan Pemeriksaan Total kolesterol
 - Serum darah 2-3 cc
- h. Bahan Anestesi
 - Ketamin Hcl 100 mg/ml
 - Xylazine Xyla 50 ml

2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Wistar* jantan, berusia 8 hingga 12 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 23 ekor. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin di Makassar, Sulawesi Selatan. Tikus dipelihara pada suhu ruangan yang berkisar 18-26°C, dengan cukup ventilasi, dan kelembaban udara 5-6%, disertai siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam.

Pada 1 kandang terisi 1 ekor tikus agar lebih mudah mengontrol dan mengamati asupan harian tikus. Kandang dibersihkan 3 hari sekali dengan cara mengganti sekam, adapun pakan dan minuman diberikan setiap hari. Setelah memperoleh izin etik dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, tikus menjalani proses adaptasi selama 7 hari dengan diberikan pakan standar serta akses bebas terhadap air minum.

2.7.2 Pemberian Diet

Pada saat proses adaptasi selama 1 minggu, semua hewan coba diberikan diet standar berupa pakan standar dan air matang secara *ad libitum*. Pada hari ke-8 dilakukan randomisasi dan membagi hewan menjadi 3

kelompok, hewan coba kemudian diberi diet sesuai dengan kelompoknya masing-masing, sebagai berikut :

- K- : Kelompok K- merupakan kelompok non-diabetes yang diberi diet standar. Pakan standar menggunakan pakan komersil (RatBio, Indonesia), dengan komposisi nutrisi adalah 20% protein, 60% karbohidrat, 4% lemak, 4% serat kasar, 0.7% fosforus, dan 12% kalsium. Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan tikus perhari (gr) (Yustisia et al., 2022). Minuman pada kelompok K- diberikan air matang secara *ad libitum*.
- Kd, P1 dan P2: Kelompok Kd, P1 dan P2 diberi HFHGD. Pakan tinggi lemak diberikan dalam bentuk pellet dengan komposisi minyak ikan, minyak kelapa, tepung jagung, tepung gandum, tepung ikan dan tepung kedelai dengan kandungan makronutrien adalah sebagai berikut : lemak (45.88%), karbohidrat (32.6%), protein (11.24%) yang telah diuji melalui uji proksimat dari Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin (018/LKP/I/2025). Pakan tinggi lemak dalam penelitian ini merupakan pakan non-komersial yang diformulasikan sendiri sesuai kandungan makronutrien yang diinginkan dan diproduksi oleh UD Bancar Jaya Jawa Jawa Timur dengan menggunakan metode pengeringan vakum untuk mempertahankan kestabilan kandungan lemak dan nutrisi. Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan tikus perhari (gr). Adapun asupan tinggi glukosa didapatkan dari dekstrosa bubuk sebanyak 300 gram ke dalam 1.200 ml air yang dituang ke dalam tempat minum tikus yang berisi 50 ml sehingga didapatkan glukosa dengan kadar 20%.

2.7.3 Induksi Streptozotocin

Pada hari ke-22 setelah pemberian HFHGD, kelompok Kd, P1, dan P2 dilakukan induksi STZ dosis rendah. Streptozotocin dilarutkan dalam 0,01 M Sodium sitrat buffer (pH 4,5) kemudian disuntikkan sebagai dosis tunggal ke peritoneum (35 mg/kgbb). Pada kelompok K- diinjeksikan sodium sitrat buffer sebanyak 10 µl. Setelah 3 hari, tikus dipuasakan selama 8 jam kemudian dilakukan pengambilan darah di lateral ekor tikus. Setelah darah terkumpul, dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah puasa menggunakan *glucometer Accu Check Instant*. Tikus dengan kadar glukosa darah puasa lebih dari sama dengan 250 mg/dl dianggap diabetes dan dimasukkan menjadi sampel penelitian. Jika tikus tidak mencapai kadar glukosa puasa lebih dari sama dengan 250 mg/dl, maka tikus tersebut diinduksi kembali dengan dosis setengah dari dosis awal, setelah 3 hari penyuntikan dilakukan pengukuran glukosa darah puasa kepada tikus.

Prosedur penyuntikan streptozotocin pada tikus melalui intraperitoneal sebagai berikut (UBC Animal Care Guidelines, 2014) :

- a. Identifikasi penanda anatomi untuk menyuntikkan ke area yang sesuai di abdomen. Tempat penyuntikan berada di kuadran kanan bawah abdomen tikus.

- b. Masukkan jarum dengan bevel menghadap atas ke kuadran kanan bawah abdomen dengan kepala membentuk sudut 30° - 40° terhadap horizontal. Seluruh bevel harus berada di dalam rongga abdomen.
- c. Tarik kembali pendorong untuk memastikan tekanan negatif sebelum penyuntikan setelah itu dorong pendorong hingga larutan masuk ke dalam rongga abdomen.
- d. Tarik lurus jarum keluar dan masukkan spuit/jarum langsung ke dalam wadah benda tajam tanpa menutupnya kembali. Gunakan jarum suntik baru untuk setiap hewan.



Gambar 1. Prosedur Injeksi Peritoneal

Sebagai *preliminary test* untuk melihat apakah telah terbentuk kerusakan hepar yang diinduksi oleh HFHGD dan STZ dosis rendah, sejumlah 1 ekor dari masing-masing kelompok (Kd, P1 dan P2) dan memastikan apakah kelompok non-diabetes (K-) tidak mengalami kerusakan hepar yang diterminasi setelah 7 hari setelah pemberian STZ kemudian hepar diperiksa secara mikroskopis. Apabila telah terbentuk kerusakan hepar, maka 1 hari setelah dinyatakan terjadi kerusakan hepar maka dapat dilakukan pemberian ekstrak saffron. Setelah dilihat hasil *preeliminary testnya* tidak terjadi kerusakan hepar pada kelompok Kd, P1 dan P2, maka pemberian ekstrak saffron dilakukan setelah 4 minggu pasca induksi STZ dengan memantau berat badan dan glukosa darah puasa tikus pada kelompok Kd, P1 dan P2.

2.7.4 Pengukuran Berat Badan Tikus

Pengukuran berat badan tikus dilakukan pada minggu aklimatisasi (minggu 0) dan dilakukan setiap minggu hingga minggu terminasi. Prosedur pengukurannya adalah tikus ditempatkan dalam toples plastik pada timbangan digital khusus tikus kemudian berat badan dicatat dalam gram (gr).

2.7.5 Pembuatan Ekstrak Saffron

Dua puluh enam gram benang saffron kering ditambahkan 500 ml pelarut etanol 96%, lalu dimaserasi selama 3 hari di dalam wadah toples kaca yang tertutup rapat di suhu ruangan. Campuran tersebut disaring untuk memperoleh ekstrak saffron, selanjutnya dilakukan evaporasi pada suhu 40°C dengan alat rotary evaporator vakum selama kurang lebih 6 jam. Setelah dilakukan evaporasi, didapatkan ekstrak kental yang telah diletakkan di atas *waterbath* selama 1 hari. Pembuatan ekstrak saffron pada penelitian merujuk pada penelitian Mohammad (2011) dengan modifikasi.

Ekstrak saffron dilakukan uji kualitatif fitokimia di Laboratorium Fitofarmaka dan Faramsetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Uji kualitatif fitokimia dilakukan untuk mendeteksi adanya kelompok senyawa menggunakan reagen Sitroborat untuk mendeteksi flavonoid, reagen FeCl_3 untuk mendeteksi tannin, reagen Dragendorff untuk mendeteksi alkaloid, dan reagen Liebermann-Burchard untuk mendeteksi triterpenoid dengan melihat perubahan warna. Deteksi kelompok senyawa saponin dilihat dengan melihat ada tidaknya buih.

2.7.6 Pemberian Ekstrak Saffron

Kelompok P1 dan P2 diberikan ekstrak saffron setelah 4 minggu pasca induksi STZ. Ekstrak saffron diberikan dengan dosis 20 mg/kgbb (P1) dan 60 mg/kgbb (P2) serta kelompok K- dan Kd diberikan air suling melalui sonde setiap pagi hari antara jam 10.00 – 12.00 selama 28 hari. Pemberian dosis ini mengacu pada beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin yang menunjukkan adanya perubahan pada kerusakan hepar tikus diabetes dengan rentang dosis 20 mg/kgbb hingga 60 mg/kgbb dalam rentang waktu 3 – 8 minggu.

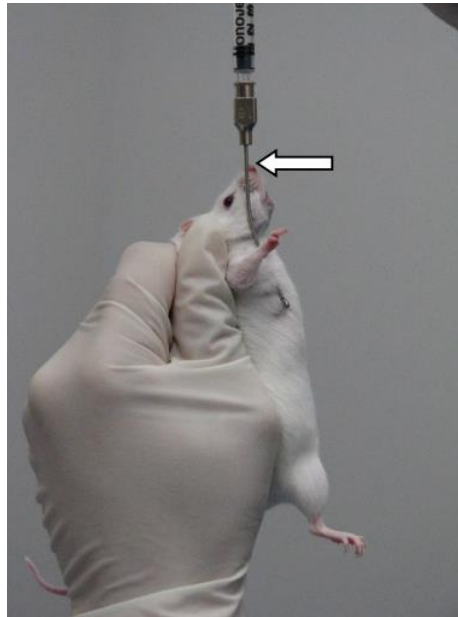
Prosedur pemberian saffron adalah sebagai berikut (*International Animal Care and Use Committee*, 2023):

- Jika sonde digunakan kembali, dilakukan disinfeksi terlebih dahulu.
- Sebelumnya telah disiapkan ekstrak saffron yang diberikan : 20 mg/kgbb dan 60 mg/kgbb.
- Gunakan sonde dengan ukuran 18 ga, seperti berikut :



Gambar 2. Ukuran sonde untuk tikus

- Periksa panjang sonde dengan mengukur dari ujung kepala ke bagian bawah sternum. Tandai sonde di bagian hidung dan jangan masukkan tabung melewati titik tersebut agar tidak terjadi perforasi lambung, seperti pada gambar berikut :



Gambar 3. Prosedur mengukur panjang sonde

- Cara memegang hewan coba: pegang bagian tengkuk tikus, kemudian pegang kulit dibagian pundak dengan ibu jari dan jari tengah. Lalu, pegang kulit di atas pundak sehingga kaki depan direntangkan ke samping, jaga agar kaki depan tidak mendorong sonde menjauh. Cara agar menahan tikus : tahan tikus di dekat area dada dan topang tubuh bagian bawah.
- Pegang kepala tikus dengan memanjangkan kepala ke belakang secara perlahan, sehingga membentuk garis lurus melalui leher dan kerongkongan.
- Tempatkan sonde di dalam diastema mulut, tabung dimajukan dengan lembut disepanjang langit-langit atas hingga mencapai esofagus. Seperti pada gambar berikut :
- Masukkan sonde dengan lembut dalam satu gerakan, jika ada hambatan, jangan paksakan sonde untuk masuk, tarik perlahan dan dicoba kembali.
- Setelah penempatan yang tepat, probiotik diberikan melalui spuit yang ada di ujung sonde. Jangan memutar sonde, karena ujungnya bisa merusak esofagus.
- Setelah pemberian, lepaskan sonde dengan lembut mengikuti sudut yang sama seperti pada saat pemasangan.
- Kembalikan tikus ke kandang, selama 5-10 menit pantau tanda-tanda pernafasan.

2.7.7 Prosedur Terminasi Hewan Coba

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 24 jam. Setelah itu, tikus di euthanasia menggunakan injeksi ketamin/xylazine 50 mg per kgBB/5 mg per kgBB. Kemudian, setelah tikus tampak tidak sadarkan diri, berdasar pada *International Animal Care and Use Committee*, untuk memastikan tikus telah mati dilakukan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk peneliti ditempatkan pada kedua sisi leher dibagian dasar tengkorak atau tepat dibelakang telinga. Sambil menjaga bagian kepala tetap diam dan stabil, tangan lainnya kemudian menarik pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat dan dengan gerakan yang mantap dan stabil, sehingga terjadi pemisahan antara tengkorak dengan *cervicalis* atau tulang leher (AVMA, 2013).

2.7.8 Prosedur Pengambilan Darah Sinus Orbita

Setelah dilakukan pembiusan dengan ketamin/xylazine, dilakukan pengambilan darah melalui bagian sinus orbita mata, prosedurnya adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan mikrohematokrit dan tabung *vacuum tube plain*
- Menggoreskan mikrohematokrit ke bagian sinus orbita melalui kantung medial dibawah bola mata ke arah foramen opticus. Sisi lainnya mengarah pada tabung *vacuum tube plain* untuk menampung darah.
- Mikrohematokrit diputar sebanyak 3-4 kali hingga melukai pleksus, kemudian kembalikan putaran sebanyak putaran sebelumnya.
- Pengambilan darah sebanyak 4 cc.
- Darah yang telah didapatkan kemudian disentrifugasi selama 10-20 menit pada kecepatan 3000 rpm. Kemudian, serum dipisahkan dengan menggunakan pipet dan disimpan dalam suhu -20 derajat celcius hingga akan digunakan.

2.7.9 Prosedur Pembedahan

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus terlebih dahulu di euthanasia yang telah dijelaskan sebelumnya. Teknik pembedahan dilakukan dengan prosedur pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Tikus yang telah dieuthanasia ditempatkan pada papan bedah dan difiksasi dengan menggunakan jarum pentul.
- b. Tikus kemudian dibedah dimulai dari bagian abdomen menggunakan gunting bengkok.
- c. Organ hepar diambil dengan menggunakan gunting lurus.
- d. Organ hepar kemudian dibersihkan dengan cara mencuci dengan aquades kemudian dicuci kembali dengan NaCl 0.9% hingga bersih dari darah.
- e. Setelah dicuci, organ dikeringkan.
- f. Setelah kandungan air telah berkurang, organ hepar kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam pot berisi larutan buffer formalin 10%.

2.7.10 Pengukuran Berat Hepar

Hepar ditimbang dalam kondisi segar dan setelah bersih dari darah. Hepar ditimbang dengan menggunakan timbangan digital dengan akurasi 0.001 dan dicatat dalam gram (g).

2.7.11 Pemeriksaan Fungsi Hepar (ALT dan AST)

Pemeriksaan fungsi hepar dilakukan dengan cara mengukur ALT dan AST serum. Sampel darah yang telah diambil sebanyak 2-3 ml kemudian dimasukkan kedalam tabung *vacuum tube plain*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah serum terpisah dari plasma, serum kemudian dipisahkan dan dimasukkan kedalam *cup serum* dan kemudian diberi label kode hewan coba. Masing-masing cup kemudian dimasukkan kedalam Mesin *Thermo Scientific* Indiko. Nilai normal AST pada tikus adalah 50-150 U/L dan ALT adalah 43,9 – 83,2 U/L (K. Md. M. Hasan et al., 2018; Djabir et al., 2017).

2.7.12 Pemeriksaan Total Kolesterol

Pemeriksaan total kolesterol dilakukan dengan cara sampel darah yang telah diambil sebanyak 2-3 ml kemudian dimasukkan kedalam tabung *vacuum tube plain*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah serum terpisah dari plasma, serum kemudian dipisahkan dan dimasukkan kedalam *cup serum* dan kemudian diberi label kode hewan coba. Masing-masing cup kemudian dimasukkan kedalam ke dalam Mesin *Thermo Scientific* Indiko. Nilai normal total kolesterol pada tikus adalah 37 – 85 mg/dl (Charles River Lab, 2008).

2.7.13 Persiapan Preparat Histologi Hepar

Prosedur persiapan preparat dilakukan dengan metode sebagai berikut (Parkinson & Mortimer, 2019)

- Fiksasi organ hepar dilakukan dengan merendamnya dalam larutan buffer formalin selama kurang lebih 24 jam, memastikan seluruh jaringan terendam sepenuhnya dalam larutan fiksatif.
- Setelah itu, jaringan mengalami proses dehidrasi menggunakan serangkaian alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 70%, 80%, 90%, hingga alkohol absolut (dua kali), masing-masing selama satu jam.
- Proses clearing dilakukan dengan merendam jaringan dalam xylol, pertama dalam xylol I selama satu jam, lalu dipindahkan ke xylol II selama satu jam.
- Impregnasi dilakukan dengan merendam jaringan dalam parafin cair pada suhu 56-60°C agar jaringan tersaturasi dengan parafin.
- *Embedding* kemudian dilakukan dengan membenamkan jaringan dalam parafin I, II, dan III selama 30 menit masing-masing, lalu didinginkan hingga parafin membeku.
- Trimming dilakukan dengan merapikan blok parafin agar siap untuk pemotongan menggunakan mikrotom.
- Pemotongan jaringan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan sekitar 5 µm.
- Potongan jaringan berbentuk pita parafin dipindahkan ke dalam water bath bersuhu 37-40°C menggunakan kuas, lalu dibiarkan sejenak hingga pita mengembang sempurna.
- Setelah pita mengembang, jaringan ditempelkan pada kaca objek yang telah dilapisi albumin. Proses ini dilakukan dengan memasukkan kaca

objek ke dalam water bath, mengarahkan ke pita parafin, lalu menempelkannya dengan bantuan kuas agar tidak terlipat saat diangkat secara perlahan.

- Kaca objek yang sudah berisi jaringan dipanaskan menggunakan hot plate untuk melelehkan sisa parafin yang masih menempel.
- Langkah terakhir adalah melakukan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) sesuai prosedur standar.

2.7.14 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Prosedur pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dilakukan dengan mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Bancroft et al. (2019). Prinsip dasar dari teknik ini adalah bahwa inti sel (nukleus), yang bersifat asam, memiliki kecenderungan untuk mengikat zat atau larutan bersifat basa, menghasilkan warna biru. Sementara itu, sitoplasma yang bersifat basa akan berinteraksi dengan zat atau larutan bersifat asam, sehingga tampak berwarna merah. Berikut adalah tahapan pada pewarnaan dengan menggunakan Hematoksilin-Eosin :

- Deparafinisasi bertujuan untuk melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Proses ini dilakukan dengan merendam preparat secara bertahap dalam larutan xylol I, II, dan III, masing-masing selama 15 menit.
- Rehidrasi bertujuan untuk mengembalikan kandungan air dalam jaringan. Langkah ini dilakukan dengan merendam preparat dalam larutan alkohol bertingkat, dimulai dari alkohol absolut, kemudian 90%, dan 80%, masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, preparat dibilas menggunakan air mengalir hingga sisa alkohol benar-benar hilang.
- Pewarnaan tahap pertama dilakukan untuk mewarnai inti sel (nukleus) dan sitoplasma. Preparat direndam dalam larutan hematoksilin selama 15 menit, lalu dicuci dengan air mengalir hingga warna hematoksilin yang berlebih tidak tampak lagi.
- Diferensiasi bertujuan untuk mengurangi intensitas warna biru pada nukleus serta menghilangkan warna biru pada sitoplasma yang seharusnya berwarna merah. Caranya, preparat dicelupkan dua kali dalam larutan alkohol asam, kemudian dibilas menggunakan air mengalir. Setelah itu, preparat direndam dalam aquades selama sekitar 15 menit hingga larutan tampak berwarna biru.
- Pewarnaan tahap kedua dilakukan untuk memberikan warna merah pada sitoplasma sel dengan cara merendam preparat dalam eosin selama 5 menit.
- Dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan kandungan air dari jaringan. Proses ini dilakukan dengan merendam preparat dalam larutan alkohol bertingkat, yaitu 70%, 80%, 90%, dan absolut, masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, preparat dibilas dengan air mengalir.
- Selanjutnya, preparat direndam kembali dalam larutan xylol I dan II selama 3 menit masing-masing.

- Mounting dilakukan untuk mengawetkan jaringan dengan meneteskan 1 hingga 2 tetes entellan pada preparat. Setelah itu, kaca penutup ditempatkan dengan hati-hati untuk menghindari terbentuknya gelembung udara. Preparat kemudian dibiarkan mengering.
- Pelabelan mencakup nomor dan kelompok tikus putih, nama organ yang diamati, serta tanggal pembuatan preparat.

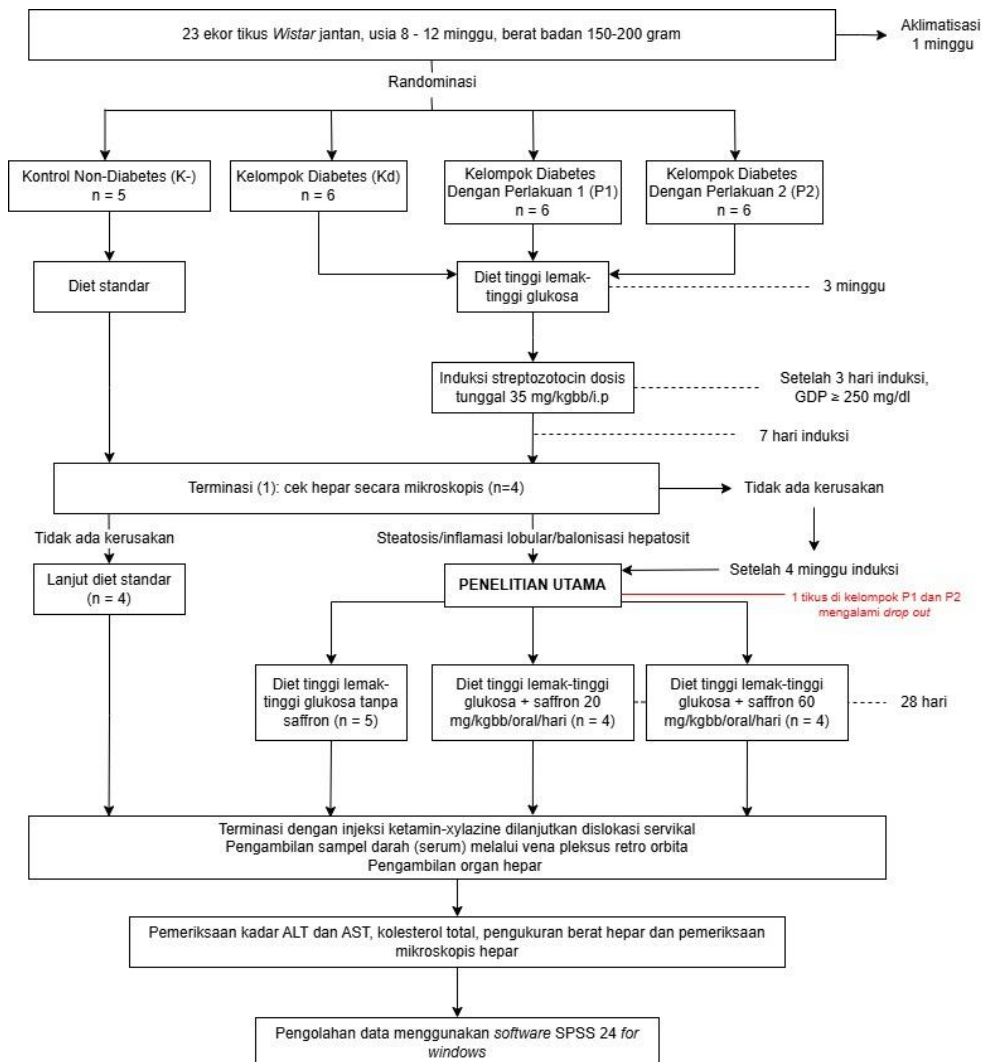
2.7.15 Penilaian Histopatologi Hepar

Penilaian histopatologi jaringan hepar dilakukan oleh ahli dibidang patologi anatomi, yaitu dokter spesialis patologi anatomi yang dilakukan secara *blinded*. Penilaian ini dianalisis secara semikuantitatif dengan pengelompokkan sebagai berikut (Gabriel, 2008; Franca et al, 2020):

Penilaian	Skor
Steatosis	0 : < 5% 1 : 5 – 33% 2 : > 33 – 66% 3 : > 66%
Inflamasi Lobular	0: Tidak ada 1: < 2 fokus inflamasi 2: 2 – 4 fokus inflamasi 3: > 4 fokus inflamasi
Balonisasi Hepatosit	0: Tidak ada 1: Beberapa sel ballooned 2: Banyak sel atau <i>prominen ballooning</i>

Tabel 4. Penilaian Semikuantitatif Histopatologi Hepar

2.8 Skema Penelitian



Bagan 3. Skema Penelitian

2.9 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Pemberian izin penelitian dilakukan pada Komisi Etik Penelitian Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Setelah mendapatkan izin, penelitian ini dilaksanakan dengan memenuhi persyaratan-persyaratan etik yang telah diberikan. Nomor rekomendasi persetujuan etik: 932/UN.4.6.4.5.31/PP36/2024.

2.10 Jenis Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yang diperoleh dari variabel penelitian, yaitu : data berat hepar tikus, tampilan

mikroskopis hepar yang dinilai berdasarkan skor kerusakan histologi hepar, kadar ALT serum dan kadar AST serum serta kadar total kolesterol.

2.11 Teknik Analisis Data

Data hasil pemeriksaan dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS versi 24 *for windows*. Seluruh data yang didapatkan dari keempat kelompok diuji normalitas dengan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Setelah dilakukan uji normalitas, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene's Test*. Data kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One Way Anova* jika data terdistribusi normal atau uji *Kruskal-Wallis* jika tidak terdistribusi normal, dengan signifikansi ditentukan berdasarkan nilai $\alpha = 0,05$. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey Test* untuk mengetahui beda antar perlakuan.

Data kadar total kolesterol dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*, sedangkan data data berat hepar tikus, kadar ALT serum dan kadar AST serum dan skor kerusakan histologi hepar dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.