

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI BULBUS OLFAKTORIUS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN YANG DIINDUKSI
ALKOHOL DENGAN METODE *BINGE DRINKING* PASCA
PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Black Garlic*)**

(Skripsi)

Oleh

**Sayidina Umar Achfisti
1918011077**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI BULBUS OLFAKTORIUS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN YANG DIINDUKSI
ALKOHOL DENGAN METODE *BINGE DRINKING* PASCA
PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Black Garlic*)**

Oleh

SAYIDINA UMAR ACHFISTI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN**

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

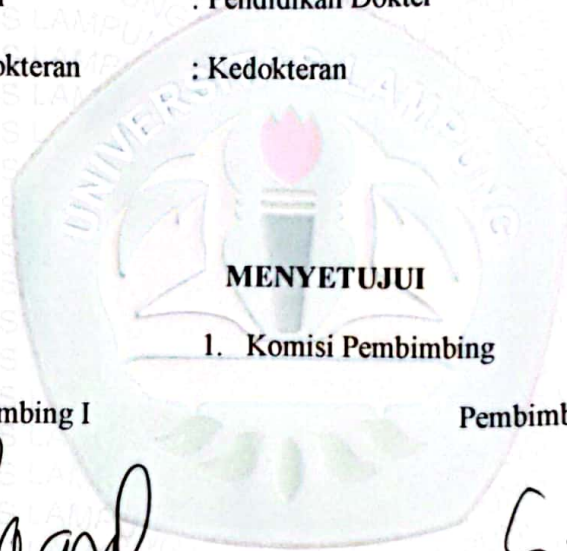
Judul Skripsi : **GAMBARAN HISTOPATOLOGI BULBUS OLFAKTORIUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN YANG DIINDUKSI ALKOHOL DENGAN MODEL *BINGE DRINKING* PASCA PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*BLACK GARLIC*)**

Nama Mahasiswa : Sayidina Umar Achfisti

Nomor Pokok Mahasiswa : 1918011077

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran : Kedokteran



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

dr. Anggraeni Janar Wulan, M.Sc.

NIP. 198201302008122001

Pembimbing II

Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc.

NIP. 197601202003122001

Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Dyah Wulan Sanjekar RW, SKM., M.Kes

NIP. 197206281999702001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

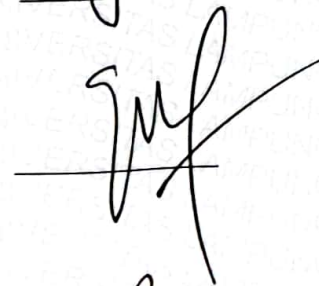
Ketua

: **dr. Anggraeni Janar Wulan, M.Sc.**



Sekretaris

: **Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc.**



Penguji

Bukan

Pembimbing

: **dr. Waluyo Rudiyanto, M.Kes., Sp.KKLP**



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Dyan Wulan Sumekar RW, S.K.M., M.Kes

NIP. 197206281999702001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Januari 2023

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Skripsi dengan judul “**GAMBARAN HISTOPATOLOGI BULBUS OLFAKTORIUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN YANG DIINDUKSI ALKOHOL DENGAN METODE *BINGE DRINKING* PASCA PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Black Garlic*)**” adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam akademik atau yang dimaksud dengan plagiarisme.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 2 Februari 2023

Pembuat pernyataan,



Sayidina Umar Achfisti

NPM. 1918011077

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Palembang tanggal 1 Desember 2001, sebagai anak pertama dari tiga besaudara dari Achmad Fikri dan Sisti Nufarina. Penulis menyelesaikan Sekolah Dasar (SD) di SD Islam Terpadu Kayu Agung dan SD Islam Az-Zahrah Palembang pada tahun 2013, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 1 Palembang pada tahun 2016, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Plus Negeri 17 Palembang pada tahun 2019.

Pada tahun 2019, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Program Studi Pendidikan Dokter. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi kemahasiswaan Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) sebagai Executive Apprentice (EA) tahun 2019-2020, Kepala Biro Media dan Design Dinas Informasi dan Komunikasi tahun 2020-2021, serta menjadi Kepala Dinas Informasi dan Komunikasi tahun 2021-2022. Selain BEM, penulis juga aktif di organisasi Ikatan Senat Mahasiswa Kedokteran Indonesia (ISMKI) sebagai Pengurus Harian Wilayah 1 Bidang *Information, Communication, and Technology* tahun 2020. Selain organisasi, penulis aktif mengikuti dan berhasil memenangkan beberapa perlombaan seperti juara 1 lomba poster publik RECOMEP 2020 tingkat regional dan juara 2 lomba video edukasi INTERMEDISCO 2021 tingkat nasional.

SANWACANA

Puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Gambaran Histopatologi Bulbus Olfaktorius Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Diinduksi dengan Metode *Binge Drinking* Pasca Pemberian Ekstrak Bawang Hitam (*Black Garlic*)” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Universitas Lampung. Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan masukan, bantuan, dorongan, saran, bimbingan, dan kritik dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Prof. Dr. Dyah Wulan SRW S.K.M., M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. dr. Anggraeni Janar Wulan, M.Sc., selaku Pembimbing 1 yang telah memberikan tambahan ilmu, memberi kritik, saran, membimbing, memberi masukan, dan motivasi kepada penulis selama menyelesaikan skripsi.
4. Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc., selaku Pembimbing 2 yang telah bersedia membimbing dan mengarahkan penulis selama menyusun skripsi, serta membantu, memberi kritik dan saran dalam penyelesaian skripsi ini.
5. dr. Waluyo Rudiyanto, M.Kes., selaku pembahas yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan saran, nasihat dan evaluasi yang diberikan kepada penulis selama menyelesaikan skripsi.
6. Dr. dr. Indri Windarti, S.Ked., Sp.PA., yang telah bersedia membantu dan membimbing dalam pembacaan preparat histopatologi.

7. Mas Bayu, Pak Karyadi, dan Bu Nur, yang telah memberikan izin dalam penggunaan *Animal House* dan membantu dalam pelaksanaan penelitian hingga pembacaan preparat histopatologi.
8. Semua Dosen Pengajar dan Karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang membantu dalam proses pembelajaran semua kuliah dan penyelesaian skripsi ini.
9. Kedua orang tuaku, Achmad Fikri dan Sisti Nufarina serta ketiga adikku, Mulki Sulaiman Achfisti, Arrafi Fadhil Achfisti, dan Faruq Albert Ramadhan, atas segala doa, kasih sayang, pembelajaran yang diberikan, pengorbanan, segala jerih payah dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis.
10. Sahabat-sahabatku “Tahu”, Sultan, Nabil, Yazid, Adit, Faisal, dan Rakha, dan juga untuk Pute, yang selalu bersama mendukung, menemani, mendengarkan keluh kesah, dan berjuang selama di FK Unila. Terima kasih telah membantu hingga sejauh ini.
11. Keluarga BPH BEM Kabinet Mozaik Asa “Cumi” dan juga teman-teman Infokom, yang telah bersama-sama berjuang dan saling membantu dalam pengerjaan skripsi.
12. Teman-teman satu angkatan FK Unila 2019, L19AMNETUM L19AND yang menjadi teman berjuang dan melangkah bersama dalam meniti cita-cita ini serta selalumengisi hari-hari menjadi sangat menyenangkan.
13. Semua pihak yang telah berjasa membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kita semua.

Bandar Lampung, Januari 2023

Penulis

Sayidina Umar Achfisti

ABSTRAK

GAMBARAN HISTOPATOLOGI BULBUS OLFAKTORIUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN YANG DIINDUKSI ALKOHOL DENGAN METODE *BINGE DRINKING* PASCA PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Black Garlic*)

Oleh

SAYIDINA UMAR ACHFISTI

Latar Belakang: *Binge drinking* merupakan konsumsi 60 gram atau lebih etanol minimal satu kali dalam 30 hari terakhir. *Binge drinking* dapat menyebabkan neurodegenerasi pada bulbus olfaktorius. Bawang hitam mengandung antioksidan yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologi bulbus olfaktorius yang diinduksi alkohol model *binge drinking* apakah dapat dipengaruhi pemberian ekstrak bawang hitam.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test-only control group design*. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang dibagi menjadi 3 kelompok dan diberi intervensi selama 4 hari. Penilaian gambaran histopatologi dilakukan dengan menghitung persentase sel neurodegenerasi terhadap sel saraf normal pada lima lapang pandang.

Hasil: Persentase sel neurodegenerasi per kelompok, K1: 0,73% \pm 0,12%, K2: 5,68% \pm 0,37%, P: 2,83% \pm 0,31%. Analisis data menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* $p > 0,05$, uji homogenitas *Levene* $p = 0,031$, uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* $p = 0,000$. Pemberian ekstrak bawang hitam memiliki pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel neurodegenerasi akibat induksi alkohol dengan model *binge drinking* dengan $p = 0,000$ pada uji *Mann-Whitney*.

Kesimpulan: Gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam dengan dosis 800 mg/kgBB.

Kata Kunci: alkohol, bawang hitam, bulbus olfaktorius

ABSTRACT

HISTOPATOLOGICAL STUDY OF MALE WHITE RAT (*Rattus norvegicus*) OLFACTORY BULB INDUCED WITH ALCOHOL WITH BINGE DRINKING MODEL POST BLACK GARLIC ADMINISTRATION

By

SAYIDINA UMAR ACHFISTI

Background: Binge drinking is the consumption of 60 grams or more of ethanol at least once in the past 30 days. Binge drinking can cause neurodegeneration to the olfactory bulb. Black garlic contains high levels of antioxidant. This study aims to determine can olfactory bulb histopathology induced with alcohol with binge drinking model be affected by black garlic administration.

Methods: This study is an experimental study with posttest-only control group design. This study uses 30 male white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley strain that is divided into 3 groups and is given intervention for 4 days. Quantitative measurement of this histopathological study uses percentage of cells that undergo neurodegeneration in five fields of view.

Results: Percentage of cells that undergo necrotic neurodegeneration, K1: 0,73% ± 0,12%, K2: 5,68% ± 0,37%, P: 2,83% ± 0,31%. Data analysis using Shapiro-Wilk normality test $p > 0,05$, Levene homogeneity test $p = 0,031$, Kruskal-Wallis nonparametric test $p = 0,000$. Administration of black garlic have a significant effect on the number of cells that undergo neurodegeneration because of alcohol induction with binge drinking model with $p = 0,000$ in Mann-Whitney test.

Conclusion: Black garlic extract at a dose of 800 mg/kg BW can prevent damage to the olfactory bulbs of male white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley strain which are induced by alcohol with binge drinking model.

Keywords: alcohol, black garlic, olfactory bulb

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat bagi Peneliti	5
1.4.2. Manfaat bagi Masyarakat	6
1.4.3. Manfaat bagi Institusi.....	6
1.4.4. Manfaat bagi Peneliti Lain	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Bulbus Olfactorius	7
2.2. Alkohol.....	9
2.2.1. Metabolisme Alkohol.....	10
2.2.2. <i>Binge Drinking</i>	13
2.2.3. Stres Oksidatif Akibat Konsumsi Alkohol	15
2.3. Dampak dari <i>Binge Drinking</i> pada Bulbus Olfactorius	16
2.4. Bawang Hitam.....	19

2.5. Kerangka Teori.....	21
2.6. Kerangka Konsep.....	22
2.7. Hipotesis.....	22

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian.....	23
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.3. Subjek Penelitian.....	23
3.3.1. Populasi Penelitian.....	23
3.3.2. Sampel Penelitian.....	23
3.3.3. Kelompok Perlakuan.....	25
3.3.4. Kriteria Inklusi.....	26
3.3.5. Kriteria Eksklusi.....	26
3.4. Variabel Penelitian.....	26
3.4.1. Variabel Bebas.....	26
3.4.2. Variabel Terikat.....	26
3.5. Definisi Operasional.....	27
3.6. Alat dan Bahan Penelitian.....	27
3.6.1. Alat Penelitian.....	27
3.6.2. Bahan Penelitian.....	28
3.7. Prosedur Penelitian.....	28
3.7.1. Aklimatisasi Hewan Coba.....	28
3.7.2. Pemilihan Alkohol dan Penentuan.....	29
3.7.3. Pemilihan Bawang Hitam dan Penentuan Dosis.....	32
3.7.4. Prosedur Pemberian Intervensi.....	33
3.7.5. Terminasi Hewan Coba.....	34
3.7.6. Pembuatan Preparat Histologi.....	34
3.8. Analisis Data.....	37
3.9. Alur Penelitian.....	39
3.10. Etika Penelitian.....	40

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian	42
4.1.1. Gambaran Umum Penelitian	42
4.1.2. Penyesuaian Dosis Berdasarkan Skor Intoksikasi	43
4.1.2.1. Gambaran Skor Intoksikasi pada Hewan Coba.....	43
4.1.2.2. Penyesuaian Skor Intoksikasi.....	46
4.1.3. Pembacaan Gambaran Histopatologi	47
4.1.4. Perhitungan Sel Neurodegenerasi Bulbus Olfaktorius.....	49
4.1.5. Analisis Bivariat Hasil Penghitungan	50
4.2. Pembahasan.....	52
4.3. Keterbatasan Penelitian.....	56

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan	57
5.2. Saran.....	57

DAFTAR PUSTAKA	58
-----------------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Definisi Operasional.....	27
2. Skala Intoksikasi Majcrowicz	30
3. Rata-Rata Skor Intoksikasi Alkohol.....	46
4. Rata-Rata Dosis Alkohol per Hari	47
5. Perbandingan Jumlah Sel Neurodegenerasi Bulbus Olfactorius	50
6. Hasil Analisis Bivariat	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Vaskularisasi Bulbus Olfaktorius.....	7
2. Histologi Bulbus Olfaktorius	8
3. Jaringan Bulbus Olfaktorius.....	9
4. Metabolisme Alkohol di Otak.....	12
5. Histopatologi Bulbus Olfaktorius pada Perlakuan <i>Binge Drinking</i>	17
6. Bawang Hitam.....	19
7. Kerangka Teori.....	21
8. Kerangka Konsep.....	22
9. Ekstrak Bawang Hitam	32
10. Alur Penelitian	39
11. Skor Intoksikasi 0.....	43
12. Skor Intoksikasi 3.....	44
13. Skor Intoksikasi 4.....	44
14. Skor Intoksikasi 5.....	45
15. Gambaran Bulbus Olfaktorius K1.....	48
16. Gambaran Bulbus Olfaktorius K2.....	48
17. Gambaran Bulbus Olfaktorius P	49

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Surat Izin Peminjaman *Animal House*
- Lampiran 2. *Ethical Clearance*
- Lampiran 3. Skor Intoksikasi dan Penyesuaian Dosis Intervensi
- Lampiran 4. Hasil Perhitungan Sel Neurodegenerasi
- Lampiran 5. Hasil Analisis Data Penelitian
- Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alkohol sudah lama menjadi bagian dari peradaban manusia paling tidak selama 8000 tahun, dengan kebanyakan masyarakat yang mengonsumsi alkohol mengeluhkan gangguan kesehatan dan juga permasalahan sosial (Tritama, 2015). Berdasarkan laporan yang dikeluarkan oleh *World Health Organization* (WHO) dalam *Global Status Report on Alcohol and Health* pada tahun 2018, jumlah konsumsi alkohol per kapita untuk populasi berusia 15 tahun ke atas pada tahun 2016 di Indonesia adalah sebanyak 0.8 liter alkohol murni. Jumlah ini mengalami peningkatan dari tahun 2010 yang mengonsumsi sebanyak 0.7 liter alkohol murni per kapita (WHO, 2018).

Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS), prevalensi konsumsi alkohol dalam 1 bulan terakhir pada populasi berusia 10 tahun ke atas di provinsi Lampung mengalami peningkatan. Pada tahun 2007 prevalensi konsumsi alkohol di provinsi Lampung mencapai 1.4%, sedangkan pada tahun 2018 mengalami peningkatan hingga 1.83% (Kemenkes RI, 2009; Kemenkes RI, 2019).

Alkohol merupakan faktor risiko dari berbagai penyakit. Konsumsi alkohol dengan kadar yang tinggi maupun rendah dapat menimbulkan berbagai risiko gangguan kesehatan manusia seperti ketergantungan alkohol, tidak sadarkan diri, kehilangan kemampuan untuk mengendalikan fungsi tubuh (ataksia), sirosis hepar, penyakit pada lambung, dan luka-luka akibat intoksikasi alkohol secara langsung maupun tidak langsung (Pratama dan Muhartono, 2019; Tritama, 2015).

Menurut laporan yang dikeluarkan oleh WHO, prevalensi gangguan kesehatan di Indonesia yang diakibatkan oleh alkohol adalah 0,8% dan prevalensi ketergantungan alkohol adalah 0,7% pada laki-laki maupun perempuan. Persentase ini berdasarkan populasi Indonesia pada tahun 2016. Apabila persentase tersebut dikalikan dengan populasi Indonesia pada tahun 2016 maka akan didapatkan sebanyak 2.084.649 jiwa yang memiliki gangguan kesehatan akibat alkohol dan sebanyak 1.824.067 jiwa mengalami ketergantungan alkohol (WHO, 2018).

Efek samping dari konsumsi alkohol berlebihan jangka pendek dan jangka panjang mengalahkan efek yang menguntungkan. Konsumsi alkohol berlebihan dengan jangka waktu yang pendek dapat juga disebut *binge drinking* yang dapat menyebabkan intoksikasi akut. WHO mengategorikan *binge drinking* sebagai konsumsi setidaknya 60 gram atau lebih alkohol murni paling sedikit satu kali dalam 30 hari terakhir. Beberapa penelitian eksperimental dan juga klinis mengindikasikan bahwa intoksikasi alkohol akut memiliki efek samping pada berbagai organ (Jeanblanc *et al.*, 2019; WHO, 2018).

Berdasarkan laporan dari WHO, terdapat peningkatan dari prevalensi minum episodik berat atau *binge drinking* pada tahun 2016. Prevalensi *binge drinking* pada tahun 2010 adalah sebanyak 2.6% dari total populasi di Indonesia pada tahun 2010, sedangkan pada tahun 2016 adalah sebanyak 6.5% dari total populasi di Indonesia pada tahun 2016 (WHO, 2018; WHO, 2014).

Sistem saraf pusat juga merupakan salah satu target utama efek samping dari alkohol dan secara ekstensif mempromosikan perkembangan dari beberapa penyakit gangguan saraf seperti stroke, tumor otak, *multiple sclerosis* (MS), penyakit Alzheimer, dan sklerosis amyotropik lateral. Konsumsi alkohol yang berlebihan juga menyebabkan perubahan neuroimunologi berat pada organ interna termasuk kerusakan otak yang ireversibel. Konsumsi alkohol juga bereaksi dengan mekanisme pertahanan dari sawar darah otak yang mana akan

menyebabkan perubahan pada konfigurasi sel endotel dan ketebalan dari *white matter* otak (Pervin dan Stephen, 2021).

Penelitian pengaruh alkohol pada audiovisual sangat sering dilakukan. Hal ini dikarenakan penglihatan dan pendengaran merupakan sistem indra yang paling sering digunakan dan merupakan sistem indra yang paling mudah diterapkan pada penelitian eksperimental. Fokus eksklusif yang diberikan pada kedua indra tersebut menyebabkan pengabaian total pada penelitian dengan indra lain khususnya penciuman (Maurage *et al.*, 2014). Alkoholisme juga telah terbukti menyebabkan beberapa gangguan olfaktori seperti identifikasi bau, diskriminasi, serta sensitivitas dari penciuman (Rupp *et al.*, 2004).

Metabolisme alkohol telah dikaitkan dengan peningkatan dari stres oksidatif. Stres oksidatif dapat didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara produksi dari radikal bebas dan sistem antioksidan. Efek toksik dari alkohol dimediasi oleh stres oksidatif melalui beberapa mekanisme seperti induksi dari kerusakan oksidatif, peroksidasi lipid, *cross-linking*, aduksi DNA, dan putusya untaian DNA. Stres oksidatif yang berlebihan dapat merusak semua kelas makromolekul utama dan mempengaruhi beberapa fungsi sel yang penting. Konsekuensi yang merugikan pada fungsi otak seperti disfungsi mitokondria, perubahan sinyal saraf, dan inhibisi neurogenesis (Tsermpini *et al.*, 2022).

Konsumsi alkohol berlebihan yang kronik dapat menyebabkan inflamasi pada beberapa organ termasuk pada otak. Stres oksidatif yang berkepanjangan pada otak dikaitkan dengan neuroinflamasi dan neurodegenerasi. Neuroinflamasi berkontribusi pada disfungsi kognitif yang disebabkan oleh alkohol dan perubahan perilaku. Alkohol dapat menyebabkan inflamasi pada otak dan peningkatan sekresi sitokin pro-inflamatori seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , dan interferon γ . Alkohol dapat berdifusi dengan cepat melalui sawar darah otak, mengubah transmisi saraf, dan berkontribusi pada neurodegenerasi dan regenerasi yang terganggu dengan mengaktifkan mikroglia dan astrosit (Tsermpini *et al.*, 2022). Neurodegenerasi pada bulbus

olfaktorius sudah dapat terlihat pada hari kedua pemberian induksi alkohol dengan model *binge drinking* oleh Majchrowicz. Alkohol diberikan dengan dosis awal 5 g/kgBB dan dosis selanjutnya diberikan berdasarkan derajat intoksikasi dosis sebelumnya. Dosis alkohol rerata yang diberikan adalah 8,6 g/kgBB per hari selama 4 hari. Neurodegenerasi dapat terlihat pada glomerulus olfaktori yang bersifat argilofilik (Obernier *et al.*, 2002).

Bawang putih (*Allium sativum*) mengandung senyawa fitokimia yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamatori. Bawang hitam merupakan hasil pembusukan dan pemanasan dari bawang putih. Bawang hitam mengandung senyawa organosulfur yang tinggi dan memiliki efek antioksidan yang lebih kuat dari bawang putih biasa. Bawang hitam diproduksi melalui prosedur pembusukan bawang putih pada suhu dan kelembapan yang tinggi dalam waktu yang lama. Selama proses pembusukan, tingkat senyawa dengan aktivitas antioksidan seperti piruvat dan S-allylcysteine (SAC) meningkat (Jeong *et al.*, 2016).

Bawang hitam memiliki efek antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan bawang putih namun memiliki aktivitas antiinflamatori yang lebih rendah dibandingkan bawang putih. Hal ini mengindikasikan bahwa terdapat senyawa lain pada bawang hitam yang bekerja dengan piruvat untuk membantu aktivitas antioksidan. Konsentrasi dari fenolik total, flavonoid, dan thiosulfat meningkat saat proses pembuatan bawang hitam. Prosedur pemanasan yang dilakukan saat pembentukan bawang hitam mengurangi efek antiinflamatori pada bawang putih. Jika bawang hitam memiliki efek antiinflamatori dan antioksidan yang kuat bawang hitam dapat menjadi kandidat yang sempurna untuk mengobati penyakit inflamatori yang diinduksi stres oksidatif (Jeong *et al.*, 2016). Bawang hitam dengan konsentrasi 800 mg/kgBB telah terbukti efektif memiliki efek proteksi terhadap ginjal dan hepar pada tikus yang telah diinduksi dengan minyak jelantah (Astari, 2020; Dimas, 2021).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut adalah apakah gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* apakah dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* apakah dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam dengan dosis 800 mg/kgBB.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat bagi Peneliti

Manfaat penelitian ini bagi peneliti diharapkan dapat menambah pengetahuan penulis mengenai pengaruh ekstrak bawang hitam terhadap gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

1.4.2. Manfaat bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat diharapkan dapat menambah wawasan masyarakat mengenai penggunaan bawang hitam sebagai alternatif pengobatan yang sudah teruji secara klinis.

1.4.3. Manfaat bagi Institusi

Manfaat penelitian ini bagi institusi Pendidikan diharapkan dapat menjadi bahan pembelajaran dan referensi pembelajaran dengan topik yang berhubungan dengan judul penelitian di atas serta kekhususan pada keilmuan di bidang patologi anatomi.

1.4.4. Manfaat bagi Peneliti Lain

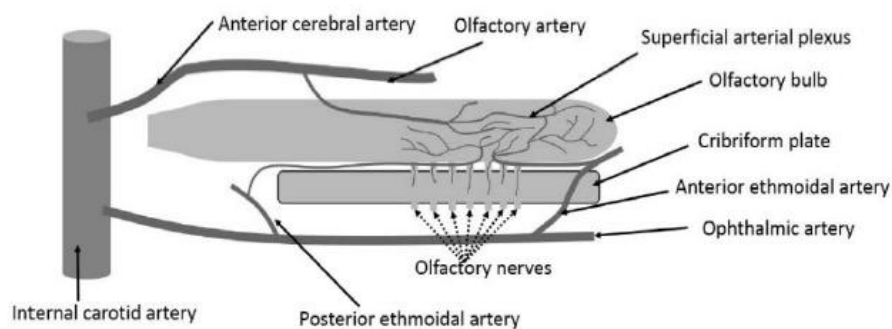
Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut yang berkaitan dengan materi dalam skripsi ini ataupun penelitian serupa yang bertujuan memastikan validitas dan reliabilitas hasil penelitian yang telah dilakukan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bulbus Olfaktorius

Bulbus olfaktorius merupakan sebuah struktur yang berbentuk seperti telur dan terletak pada permukaan inferior dari lobus frontalis. Bulbus olfaktorius memiliki panjang rata-rata 12 mm dan lebar 5 mm (Covantev *et al.*, 2020). Bulbus olfaktorius terletak di atas lamina cribosa dari tulang ethmoid. Bulbus olfaktorius terdiri dari sekumpulan sel saraf olfaktori yang berfungsi untuk menerima impuls dari saraf olfaktori pada mukosa hidung dan diteruskan pada traktus olfaktorius (Faizal dan Khan, 2017). Bulbus olfaktorius pada hewan pengerat terletak pada bagian frontal dari cavum cranii dan terhubung ke korteks frontalis (Olude *et al.*, 2014).

Sumber utama vaskularisasi dari bulbus olfaktorius dan traktus olfaktorius adalah arteri olfaktorius. Arteri olfaktorius pada umumnya berasal dari permukaan lateral arteri cerebrii anterior, namun arteri olfaktorius juga dapat berasal dari arteri orbitofrontal media yang merupakan percabangan dari arteri cerebrii anterior (Covantev *et al.*, 2020).



Gambar 1. Vaskularisasi bulbus olfaktorius (Covantev *et al.*, 2020).

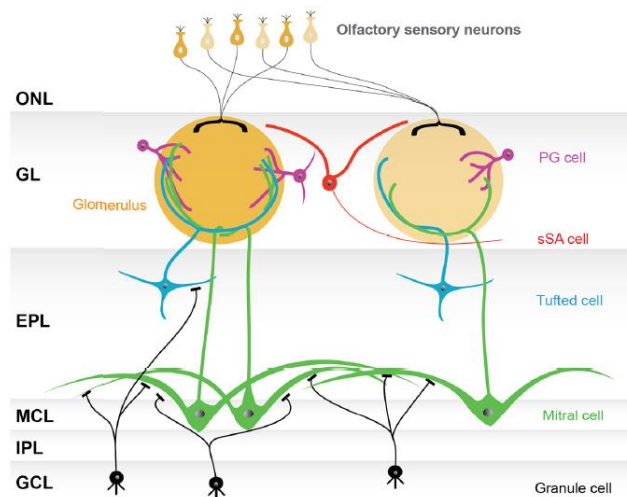
Sistem olfaktori terdiri dari dua sistem: sistem olfaktori utama yang mendeteksi raturan bau dan sistem vomeronasal yang mendeteksi senyawa kimia yang spesifik seperti feromon. Bulbus olfaktorius utama dan aksesorius merupakan pusat utama dari sistem olfaktori utama dan vomeronasal (Kondoh *et al.*, 2017; Olude *et al.*, 2014).

Pada mamalia seperti mencit dan tikus, bau akan dideteksi oleh epitel olfaktorius oleh sel saraf sensoris olfaktori melalui reseptor bau terhubung protein G (Low dan Mombaerts, 2017). Informasi dari saraf tersebut selanjutnya diteruskan ke bulbus olfaktorius. Di bulbus olfaktorius berbagai tipe sel saraf membentuk sebuah jaringan untuk memproses informasi sebelum diteruskan lagi ke korteks olfaktorius (Nagayama *et al.*, 2014). Oleh karena itu, kerusakan yang parah pada bulbus olfaktorius akan mengganggu transmisi saraf dan akan menyebabkan anosmia dan perubahan indra pengecap (Covantev *et al.*, 2020).



Gambar 2. Histologi bulbus olfaktorius. 1) Lapisan saraf olfaktori, 2) Lapisan Glomerular, 3) Lapisan pleksiform eksterna, 4) Lapisan sel mitral, 5) Lapisan pleksiform interna, 6) Lapisan sel granular (Faizal dan Khan, 2017).

Secara histologis, bulbus olfaktorius utama memiliki enam lapisan konsentris dari luar ke dalam: lapisan saraf olfaktori, lapisan glomerular, lapisan pleksiform eksterna, lapisan sel mitral, lapisan pleksiform interna, dan lapisan sel granular (Faizal dan Khan, 2017; Kondoh *et al.*, 2017). Sedangkan untuk bulbus olfaktorius aksesoris hanya terdiri dari saraf vomeronasal, glomerular, dan lapisan sel granular (Kondoh *et al.*, 2017).



Gambar 3. Jaringan bulbus olfaktorius (Nagayama *et al.*, 2014)

Axon dari sel reseptor olfaktorius akan membentuk sinapsis dengan saraf olfaktori sekunder untuk membentuk glomerulus pada bulbus olfaktorius. Sel saraf olfaktori sekunder pada bulbus olfaktorius utama pada umumnya terdiri dari sel mitral dan sel *tufted*, sedangkan pada bulbus olfaktorius aksesoris hanya terdiri dari salah satu sel saja (sel mitral/*tufted*) (Kondoh *et al.*, 2017).

2.2. Alkohol

Alkohol merupakan sekelompok senyawa kimia yang mengandung kelompok hidroksil, -OH, yang berikatan dengan atom karbon. Alkohol tidak dapat disimpan di tubuh sehingga alkohol harus dimetabolisme untuk disingkirkan. Alkohol dimetabolisme di tubuh sebagai sumber energi dan tidak mengandung mineral, vitamin, karbohidrat, lemak, atau protein sehingga alkohol dapat berkontribusi dalam malnutrisi. Alkohol bekerja sebagai depresan sistem saraf pusat dan sebagai diuretik dan mempengaruhi beberapa sistem

neurotransmitter pada otak seperti glutamat, *gamma-aminobutyric acid* (GABA), dopamin, dan serotonin (Onyekwelu, 2018; Tritama, 2015).

Paparan alkohol berlebihan dapat menyebabkan aktivasi imun pada sistem saraf pusat. Mikroglia merupakan sel imun dari sistem saraf pusat yang menjadi aktif apabila terdapat kerusakan. Mikroglia dapat dikarakterisasi menjadi dua fenotip yang teraktivasi; fenotip M1 yang bersifat pro inflamatori dan M2 yang bersifat anti inflamatori. Fenotip M1 dapat merugikan otak dengan menginduksi toksisitas sel saraf melalui sekresi sitokin dan kemokin pro inflamatori serta spesies oksigen reaktif (Peng *et al.*, 2017).

2.2.1. Metabolisme Alkohol

Alkohol merupakan molekul yang dapat larut dalam air dan akan diserap dengan cepat di saluran pencernaan dan disebarkan ke seluruh tubuh. Alkohol dapat ditemukan lebih banyak di darah dan otak dibandingkan pada otot atau jaringan lemak (Onyekwelu, 2018; Tritama, 2015).

Eliminasi dari alkohol oleh manusia berlangsung pada laju yang konstan yaitu, 0,016 g/dl/jam untuk laki-laki dan 0,018 g/dl/jam untuk perempuan. Alkohol bertanggungjawab atas lebih dari 50% energi metabolisme dari seorang individu hingga alkohol tereliminasi. Eliminasi dari alkohol berlangsung selama 5 jam dan sepanjang waktu itu, oksidasi alkohol adalah sumber karbon terbesar untuk metabolisme energi (Wilson dan Matschinsky, 2020).

Oksidasi dari alkohol terjadi melalui tiga enzim, alkohol dehidrogenase (ADH), katalase, dan sitokrom P450 2E1 (CYP2E1), dan semua enzim tersebut memproduksi asetaldehid. Alkohol dapat dengan mudah menembus kebanyakan membran biologis, oleh karena itu jaringan dan sel di seluruh tubuh hampir sama terpapar alkohol dan laju metabolisme dari alkohol tersebut bergantung pada kandungan enzim jaringan dan

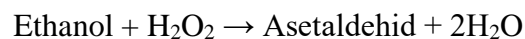
sel tersebut (Wilson dan Matschinsky, 2020; Onyekwelu, 2018; Contreras-Zentella *et al.*, 2022; Saputra GA *et al.*, 2021).

Reaksi dari katalase dan CYP2E1 bersifat ireversibel. Asetaldehid bersifat reaktif secara kimiawi dan dapat bereaksi secara nonenzimatik dengan komponen seluler lainnya untuk membentuk produk yang bersifat aktif secara metabolik dan sitotoksik. Konsentrasi dari asetaldehid selalu dijaga agar tetap rendah oleh aldehid dehidrogenase (ALDH) yang tersebar secara luas pada jaringan. ALDH mengoksidasi asetaldehid menjadi asetat bersama dengan NAD^+ (Wilson dan Matschinsky, 2020).

Alkohol dehidrogenase



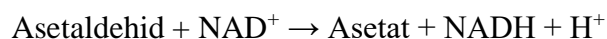
Katalase



Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1)

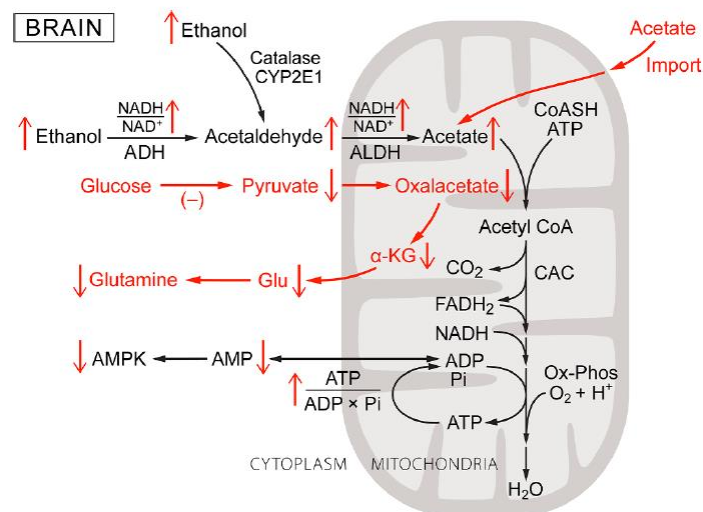


Asetat merupakan produk dari oksidasi alkohol yang memiliki peran dalam metabolisme energi dan regulasi dari metabolisme. Asetat selanjutnya diubah menjadi asetilCoA oleh asetilCoA sintase (Wilson dan Matschinsky, 2020).



Di mitokondria, asetilCoA memasuki siklus asam sitrat dan mengalami oksidasi, namun secara seluler asetilCoA juga berfungsi untuk asetilasi protein untuk mengubah aktivitas enzim individu melalui ekspresi gen (Wilson dan Matschinsky, 2020).

Pada otak, alkohol dapat menyebabkan gangguan metabolisme seperti berkurangnya penyerapan dan metabolisme glukosa, peningkatan penyerapan dan metabolisme monokarboksilat, stimulasi aktivitas dopamin pada saraf, penekanan aktivitas glutamat pada saraf, dan menyebabkan gangguan pada metabolisme dari glutamat (Wilson dan Matschinsky, 2020).



Gambar 4. Metabolisme alkohol di otak (Wilson dan Matschinsky, 2020).

Saat alkohol dikonsumsi, asetat diproduksi di hepar dan disalurkan ke darah. Konsentrasi asetat darah akan meningkat dengan cepat dan oksidasi dari alkohol di otak akan dilakukan bersamaan dengan oksidasi dari asetat yang didapat dari darah. Oleh karena itu, alkohol menjadi sumber utama dari asetilCoA untuk memproduksi adenosin trifosfat (ATP) pada sel otak (Wilson dan Matschinsky, 2020).

Asetaldehid bukan satu-satunya metabolit reaktif yang dihasilkan dari metabolisme alkohol. Spesies oksigen reaktif juga dapat di produksi, terutama sebagai hasil dari oksidasi melalui enzim CYP2E1. Produksi spesies oksigen reaktif berhubungan dengan metabolisme alkohol menjadi asetaldehid dan asetat dan berpotensi untuk mengganggu keseimbangan oksidatif sel dan meningkatkan risiko stres oksidatif (Tsermpini *et al.*, 2022; Azizah *et al.*, 2019).

2.2.2. *Binge Drinking*

Binge drinking dapat dikategorikan sebagai konsumsi setidaknya 60 gram atau lebih alkohol murni paling sedikit satu kali dalam 30 hari terakhir (WHO, 2018) Model yang paling umum digunakan untuk melihat kerusakan dari sistem saraf pusat dengan paparan alkohol subkronik adalah model *binge drinking* selama empat hari yang mana mensimulasikan alkoholisme yang diinduksi *binge drinking* jangka pendek. Nekrosis sel saraf dan kematian sel saraf sudah terbukti terjadi setelah dua hari paparan alkohol. Jumlah sel saraf yang mengalami nekrosis pada otak meningkat secara signifikan setelah empat hari perlakuan *binge drinking*. Namun, tiga hari setelah konsumsi terakhir alkohol, derajat kerusakan dari nekrosis sel saraf tidak meningkat lebih lanjut (Yang *et al.*, 2014).

Perubahan morfologis pada mikroglia dapat terlihat dua hari setelah paparan *binge drinking*. Aktivasi dari mikroglia dan ekspresi sitokin inflamatori akan diikuti oleh neurodegenerasi setelah pemberian alkohol. Paparan *binge drinking* selama empat hari menyebabkan perubahan morfologis pada mikroglia, namun tidak menyebabkan aktivasi sempurna dari mikroglia. Sedikitnya aktivasi dari mikroglia setelah paparan *binge drinking* tidak memenuhi kriteria untuk dianggap sebagai inflamasi. Hal ini mengindikasikan bahwa derajat aktivasi mikroglia bergantung pada prosedur dari paparan alkohol (Yang *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2017; Marshall *et al.*, 2013).

TNF- α merupakan salah satu sitokin pro inflamatori yang mana pada paparan *binge drinking* TNF- α menginduksi sekresi dari sitokin lain dan enzim yang dapat mempengaruhi kaskade sitokin inflamatori dan pro inflamatori (Yang *et al.*, 2014). Induksi dari kanal air aquaporin-4 (AQP4) merupakan penyebab utama dari edema otak yang diinduksi *binge drinking*. AQP4 dapat ditemukan pada glia dan ekspresi dari AQP4 meningkat berbanding lurus dengan peningkatan spesies oksigen reaktif dan faktor pro inflamatori (Yang *et al.*, 2014).

Sistem saraf pusat merupakan salah satu tempat *immune privilege* yang mana sawar darah otak membatasi pergerakan dari sel imun perifer ke sistem saraf pusat. Sawar darah otak memiliki peran yang penting untuk membedakan antara senyawa berbahaya dan tidak berbahaya pada aliran darah yang melewati parenkim otak. Sawar darah otak dapat dikarakterisasikan dengan adanya sel endotel, perisit, dan astrosit yang memiliki peran penting untuk menjaga fungsi dari sawar darah otak. Sel endotel dapat berikatan satu sama dengan bantuan protein sambungan celah sel untuk menghalangi jalan masuk molekul toksik yang dapat mempengaruhi fisiologi otak. Sel endotel pada sawar darah otak memiliki peran untuk menjaga homeostasis pada sistem saraf pusat, yang mana jika terjadi kerusakan akan menyebabkan neurodegenerasi (Peng *et al.*, 2017; Carrino *et al.*, 2021).

Konsumsi alkohol secara kronis dan berlebihan dapat meningkatkan kerusakan oksidatif dari sel saraf dengan cara meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif. Stres oksidatif juga telah dibuktikan dapat meningkatkan permeabilitas sawar darah otak setelah pemberian berbagai stimulasi toksik (Carrino *et al.*, 2021; Azizah *et al.*, 2019). Namun, tidak terdapat bukti bahwa terjadi kerusakan sawar darah otak pada model *binge drinking* selama 4 hari karena terdapat sedikit populasi dari sel CD11b dan CD45 pada hipokampus dan korteks

enthorinal, dan jumlah dari sel ini meningkat pada kelompok yang mengkonsumsi alkohol dibandingkan dengan kelompok kontrol (Peng *et al.*, 2017).

Paparan alkohol secara intermiten pada tikus mengaktifasi mikroglia dan menstimulasi produksi molekul proinflamatori dan neurotoksik seperti nitrogen oksida (NO) dan siklooksigenase 2 (COX2), sitokin seperti TNF- α dan IL-1 β , dan kemokin seperti monosit kemoatraktan protein-1 (MCP1) dan protein inflamatori makrofag 1 alpha dan beta (MIP-1 α dan β) (Peng *et al.*, 2017).

2.2.3. Stres Oksidatif Akibat Konsumsi Alkohol

Stres oksidatif dapat terjadi akibat ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan yang merupakan agen penstabil dari stres oksidatif dalam tubuh (Manisha *et al.*, 2017). Stres oksidatif telah terbukti dapat mengakibatkan disfungsi pada mitokondria dan dilanjutkan dengan apoptosis dari sel saraf (Faizal dan Khan, 2017).

Stres oksidatif yang disebabkan oleh alkohol menyebabkan disfungsi dari sawar darah otak melalui aktivasi *myosin light chain kinase* (MLCK) yang dilanjutkan dengan fosforilasi dari *myosin light chain* (MLC) dan protein sambungan celah sel, pelepasan Ca²⁺ intraseluler melalui aktivasi dari kanal dengan reseptor inositol 1,4,5-trifosfat, aktivasi dari matriks metalloproteinase oleh protein tirosin kinase. Oleh karena itu, stres oksidatif dapat menjadi penyebab dari kerusakan sawar darah otak, neuroinflamasi, dan penyakit neurologis (Haorah *et al.*, 2008).

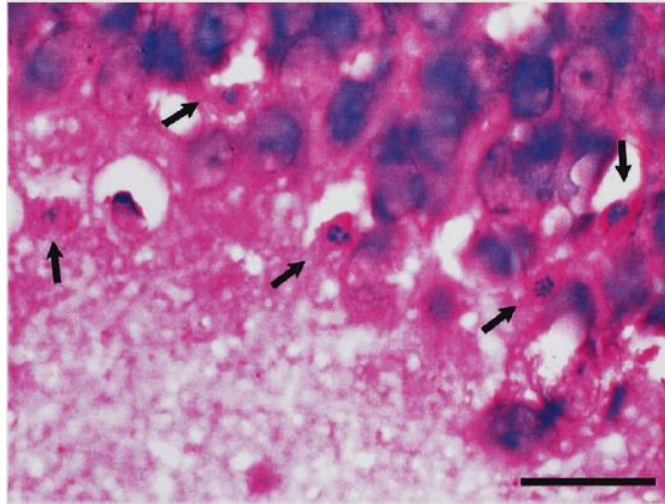
Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menstabilkan spesies oksigen reaktif dan dapat dengan mudah teroksidasi. Vitamin merupakan kelas antioksidan non enzimatis yang paling penting. Antioksidan dapat melepaskan elektron untuk menyeimbangkan radikal bebas dan membuatnya menjadi senyawa yang stabil untuk

meminimalisir efek berbahaya dari radikal bebas (Manisha *et al.*, 2017; Sukohar *et al.*, 2022). Antioksidan seperti glutathione peroksidase, katalase dan antioksidan non enzimatis seperti vitamin E, C dan antioksidan metabolik seperti bilirubin dan asam urat dapat mengurangi kadar dari radikal bebas di jaringan dengan mekanisme perbaikan pada sel (Manisha *et al.*, 2017).

2.3. Dampak dari *Binge Drinking* pada Bulbus Olfaktorius

Pada perlakuan model *binge drinking* selama empat hari terdapat neurodegenerasi dan argirofilia pada bulbus olfaktorius, girus dentatus, korteks insular agranular, korteks piriformis, korteks perirhinal, dan korteks enthorinal. Dengan pewarnaan *amino cupric silver* dapat terlihat argirofilia hingga tiga kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol pada bulbus olfaktorius setelah dua hari perlakuan *binge drinking*. Pada hari keempat tidak terjadi peningkatan yang signifikan dan jumlah argirofilia akan kembali ke kontrol tiga hari setelah perlakuan *binge drinking* terakhir (Obernier *et al.*, 2002; Crews *et al.*, 2004).

Pada pewarnaan *amino cupric silver* dapat terlihat banyak glomerulus pada bulbus olfaktorius menjadi argirofilik, hal ini membuktikan bahwa terjadi degenerasi pada akson sel saraf olfaktori. Sel granular dan juga dendrit apikal yang mempersarafi lapisan pleksiform eksterna untuk berhubungan dengan sel mitral juga menjadi argirofilik (Obernier *et al.*, 2002).



Gambar 5. Histopatologi bulbus olfaktorius pada perlakuan *binge drinking*. Tanda panah menunjukkan badan sel saraf yang mengecil, nukleus sel saraf piknotik, dan pepadatan kromatin (Obernier *et al.*, 2002).

Pada pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E) didapatkan nukleus sel saraf yang mengalami degenerasi menjadi piknotik yang disertai pepadatan kromatin. Nukleus dari sel saraf juga terpecah menjadi beberapa bentuk fragmen yang tidak teratur atau karioreksis. Badan sel juga mengecil dikarenakan sitoplasma yang menjadi homogen dan eosinofilik. Sel saraf yang mengalami degenerasi dapat terlihat dengan pewarnaan H&E mengalami penyusutan dengan nukleus piknotik dan kromatin agregat tidak teratur, yang konsisten dengan kematian sel saraf nekrotik (Obernier *et al.*, 2002).

Model alkohol lain yang mengekspresikan sitokin proinflamatori menunjukkan terdapat kerusakan pada sawar darah otak. Oleh karena itu, kerusakan dari sawar darah otak diperlukan untuk terjadinya inflamasi (Marshall *et al.*, 2013). Kerusakan yang disebabkan oleh *binge drinking* terjadi saat intoksikasi dan tidak melibatkan eksitotoksisitas NMDA. Reseptor NMDA diblok oleh transmisi rangsangan reduksi alkohol saat intoksikasi. Oleh karena itu, alkohol dapat merusak otak saat intoksikasi namun untuk mekanismenya tidak dipengaruhi neurotoksisitas glutamat (Crews *et al.*, 2004; Crews dan Nixon, 2008).

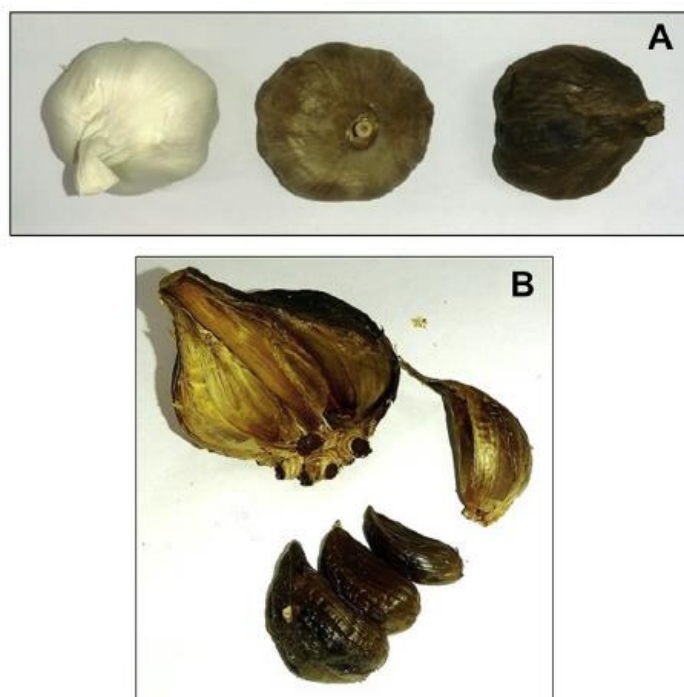
Terdapat dua hipotesis mengenai mekanisme kerusakan akibat *binge drinking*. Salah satu hipotesis menyatakan bahwa alkohol menginduksi perubahan pada tekanan intrakranial sehingga menyebabkan kerusakan pada otak. Hipotesis lain menyatakan bahwa stres oksidatif atau aktivasi dari *nuclear factor κ -B* (Nf κ B) akibat stres oksidatif dapat menjadi sebuah faktor. Namun, inhibisi dari NO sintase yang mana dapat menurunkan NO yang terinduksi spesies oksigen reaktif, atau inhibisi dari siklooksigenase 2 yang mana memproduksi spesies oksigen reaktif tidak melindungi kerusakan otak akibat *binge drinking*, namun antioksidan butil hidroksitoluena (BHT) dapat melindungi dari kerusakan tersebut (Crews *et al.*, 2004; Crews dan Nixon 2008). Antioksidan yang memblok induksi Nf- κ B dari transkripsi proinflamatori atau memblok reduksi alkohol pada transkripsi pCREB dapat menginhibisi neurodegenerasi akibat alkohol (Crews dan Nixon, 2008).

Konsumsi *binge drinking* jangka panjang dapat meningkatkan ekspresi dari reseptor glutamat, glukokortikoid, dan mengurangi absorpsi dari glutamat pada sistem saraf pusat yang menyebabkan eksitoksisitas glutamat, lalu kerusakan mitokondria, hingga kematian sel. Konsumsi *binge drinking* secara kronis dapat merusak homeostasis *lipid white matter* seperti sulfatide dan fosfolipid yang memiliki peran penting dalam menjaga integritas myelin (Kamal *et al.*, 2020). Kematian sel akibat *binge drinking* kemungkinan besar disebabkan oleh nekrosis, bukan apoptosis (Kamal *et al.*, 2020).

Konsumsi *binge drinking* pertama dapat menyebabkan aktivasi mikroglia tingkat rendah yang menyerupai fenotip M2, sedangkan konsumsi *binge drinking* yang berulang dapat menyebabkan kejadian pro inflamatori yang lebih banyak seperti peningkatan dari immunoreaktivitas OX-42, sel *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1+), dan TNF- α . Hal ini menunjukkan bahwa terdapat aktivasi yang berbeda dari mikroglia pada individu yang mengkonsumsi alkohol dengan pola *binge drinking* yang berulang (Kamal *et al.*, 2020).

2.4. Bawang Hitam

Bawang putih (*Allium sativum* L.) tidak hanya memiliki bau dan rasa yang istimewa, namun juga mengandung senyawa organosulfur yang bioaktif seperti allicin, S-aryl disulfide, diallyl trisulfide, S-aryl-cysteine, S-aryl-mercatocysteine. Bawang putih memiliki efek terapeutik seperti antikanker, antibakterial, antiviral, antidiabetik, antiinflamatori, antioksidan dan sifat meningkatkan kerja imun (Pratidina *et al.*, 2021).



Gambar 6. Bawang hitam. A) Bawang putih saat proses pembusukan, B) Bawang hitam (Kimura *et al.*, 2016).

Bawang hitam pada umumnya diproduksi di Jepang dengan cara menginkubasi bawang putih selama satu bulan dalam suhu 70°C dan kelembaban 75% tanpa ada bahan tambahan (Pratidina *et al.*, 2021; Kimura *et al.*, 2016). Bawang hitam memiliki warna hitam, dengan rasa sedikit manis, dan dapat dengan mudah dimakan saat sudah dikupas. Bawang hitam tidak memiliki rasa yang kuat dan tidak mengengakan seperti bawang putih. Bau yang tidak mengengakan dari bawang hitam berasal dari perubahan senyawa allicin menjadi senyawa antioksidan yang larut air. Bawang hitam juga memiliki rasa yang berbeda dibandingkan bawang putih dikarenakan berkurangnya kandungan dari allicin

yang diubah menjadi senyawa antioksidan seperti S-allyl cysteine (SAC), alkaloid bioaktif, dan senyawa flavonoid saat proses pembusukan (Pratidina *et al.*, 2021; Kimura *et al.*, 2016).

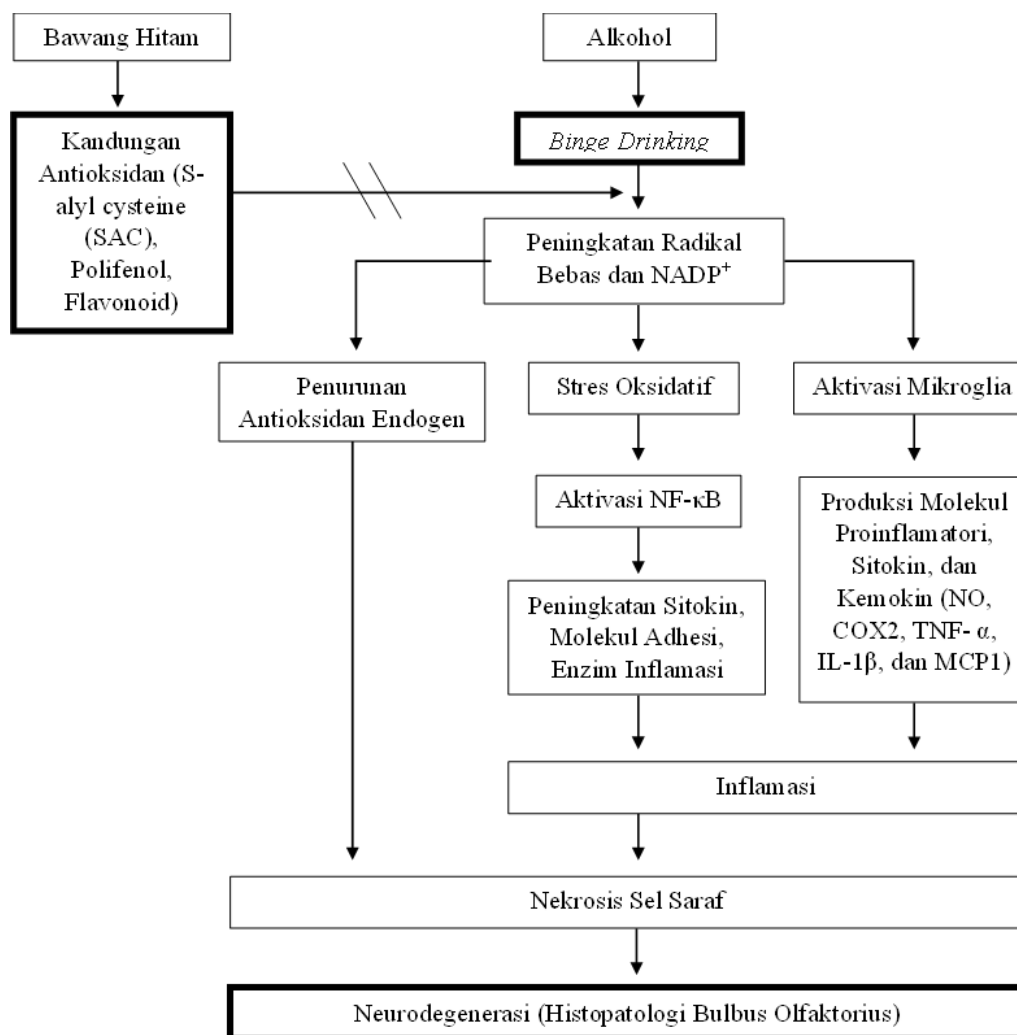
Bawang hitam juga memiliki efek antioksidan, antialergi, antidiabetik, dapat menurunkan kolesterol, dapat menurunkan lemak, antikanker, dan antiinflamatori (Pratidina *et al.*, 2021). Saat proses pemanasan, beberapa senyawa pada bawang putih diubah menjadi komponen Amadori dan Heyns yang merupakan senyawa perantara utama dari reaksi Maillard (Kimura *et al.*, 2016). Salah satu senyawa antioksidan yang paling banyak ditemui di bawang hitam adalah 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), yang juga merupakan senyawa perantara penting pada reaksi Maillard. Jumlah senyawa 5-HMF meningkat saat proses pembusukan (Kimura *et al.*, 2016).

Bawang hitam dapat menurunkan kadar mediator inflamatori seperti TNF- α dan PGE-2 serta nitrogen oksida (NO) pada lipopolisakarida (LPS) yang distimulasi makrofag RAW 264.7 (Pratidina *et al.*, 2021). Salah satu mekanisme antiinflamatori pada bawang hitam adalah menghambat kaskade dari aktivasi toll-like receptor (TLR-4) pada makrofag. Makrofag memiliki peran dalam penyakit inflamatori kronis karena makrofag mengekspresi TLR4 pada membran plasma. Saat TLR4 berikatan dengan LPS endotoxin binding protein kompleks. TLR4 mengaktifasi faktor diferensiasi myeloid 88 (MyD88) yang selanjutnya akan memproduksi mediator inflamatori seperti IL-6, TNF- α dan PGE2, yang memasuki nukleus melalui translokasi Nf- κ B akibat aktivasi dari mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Pratidina *et al.*, 2021).

Mekanisme lain berhubungan dengan aktivitas antioksidan dari bawang hitam. Makrofag yang teraktivasi oleh LPS dapat memproduksi NO dan spesies oksigen reaktif. Aktivitas antioksidan pada bawang hitam juga berhubungan dengan senyawa seperti fenolik, flavonoid, tanin, saponin, dan sterol (Pratidina *et al.*, 2021; Silvani *et al.*, 2019). Bawang hitam dapat menurunkan kadar senyawa reaktif *thiobarbitic acid* dan meningkatkan aktivitas superoksida

dismutase dan peroksidase glutation. Pada bawang hitam juga terdapat peningkatan aktivitas penguraian dari hidrogen peroksida dan penguraian dari radikal bebas (Kimura *et al.*, 2016). Bawang hitam dengan konsentrasi 800 mg/kgBB telah terbukti efektif memiliki efek proteksi terhadap ginjal dan hepar pada tikus yang telah diinduksi dengan minyak jelantah (Astari, 2020; Dimas, 2021).

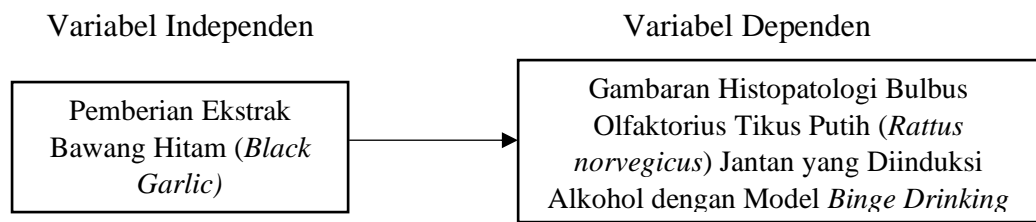
2.5. Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka Teori (Yang *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2017)



2.6. Kerangka Konsep



Gambar 8. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0 : Gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* tidak dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam (*Black garlic*).

H1 : Gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam (*Black garlic*).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan desain penelitian *post test-only control group design*. Penelitian ini menggunakan 30 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 3 kelompok.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan pemberian intervensi pada tikus dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan dan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022.

3.3. Subjek Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley berusia 8-12 minggu, dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus Center (PTC), Sumatera Selatan.

3.3.2. Sampel Penelitian

Banyaknya jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer.

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok percobaan

n = jumlah pengulangan atau jumlah sampel setiap kelompok

Penelitian ini menggunakan 3 kelompok perlakuan sehingga $t = 3$, maka didapatkan :

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

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

$$2(n - 1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut didapatkan jumlah sampel yang digunakan untuk tiap kelompok adalah 9 ekor tikus putih jantan. Untuk menghindari *drop out* maka ditambahkan tikus dengan rumus sebagai berikut :

$$N = \frac{n}{1 - F}$$

Keterangan:

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

F = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

Berdasarkan rumus di atas maka dapat diperoleh estimasi besar sampel sebanyak:

$$N = 10$$

Hasil perhitungan dengan rumus di atas didapatkan hasil sampel yang digunakan pada setiap kelompok adalah 10 ekor tikus dan pada penelitian ini terdapat 3 kelompok, sehingga total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley dan sampel dipilih menggunakan teknik *simple random sampling*.

3.3.3. Kelompok Perlakuan

1. Kelompok kontrol negatif (K1), kelompok tikus putih jantan yang tidak diberikan alkohol maupun ekstrak bawang hitam selama 4 hari, namun hanya diberikan diet isokalori susu formula dan dekstrosa secara intragastik dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan .
2. Kelompok kontrol positif (K2), kelompok tikus putih jantan yang hanya diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*. Alkohol dengan konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula diberikan secara intragastrik dengan dosis awal 5 g/kgBB dan untuk dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol. Alkohol diberikan per 8 jam selama 4 hari.
3. Kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok tikus putih jantan yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*. Alkohol dengan konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula diberikan secara intragastrik dengan dosis awal 5 g/kgBB dan untuk dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol. Alkohol diberikan per 8 jam. Bawang hitam juga diberikan dengan dosis 800 mg/kgBB per hari selama 4 hari.

3.3.4. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley.
- b. Usia 8-12 minggu
- c. Berat badan 150-200 gram
- d. Tikus sehat, ditandai dengan rambut tidak kusam dan tidak rontok, tingkah laku dan aktivitas normal, serta tidak ditemukan adanya kelainan anatomis.

3.3.5. Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat penurunan berat badan >10% setelah masa adaptasi
- b. Tikus yang mati selama masa pemberian perlakuan

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas atau variabel *independent* dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak bawang hitam.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat atau variabel *dependent* dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

3.5. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak bawang hitam (<i>Black garlic</i>)	Bawang hitam merupakan bawang putih (<i>Allium sativum L.</i>) yang telah mengalami pembusukan pada suhu dan kelembapan yang tinggi (Shin <i>et al.</i> , 2014).	Pemberian ekstrak bawang hitam ke tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) jantan galur Sprague-Dawley dengan dosis 800 mg/kgBB.	Ordinal
Histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) jantan galur Sprague-Dawley	Gambaran kerusakan bulbus olfaktorius tikus dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dalam lima lapang pandang lalu jumlah sel saraf yang mengalami neurodegenerasi dan yang normal dihitung (Theodorus <i>et al.</i> , 2019).	Jumlah saraf yang mengalami neurodegenerasi dan saraf normal akan dijadikan dalam bentuk persentase perbandingan.	Ordinal
Alkohol dengan model <i>binge drinking</i>	<i>Binge drinking</i> dapat dikategorikan sebagai konsumsi setidaknya 60 gram atau lebih alkohol murni paling sedikit satu kali dalam 30 hari terakhir (WHO, 2018). Model yang paling umum digunakan untuk melihat kerusakan dari sistem saraf pusat dengan paparan alkohol subkronik adalah model <i>binge drinking</i> selama empat hari yang mana mensimulasikan alkoholisme yang diinduksi <i>binge drinking</i> jangka pendek (Yang <i>et al.</i> , 2014).	Pemberian Alkohol 25%(m/v) dalam susu formula dengan dosis sesuai skor intoksikasi alkohol: Skor 0/dosis awal = 5 g/kgBB, diberikan diberikan larutan etanol diet nutrisi lengkap sebanyak 20 ml/kgBB. Skor 1 = 4 g/kgBB, diberikan larutan etanol diet nutrisi lengkap sebanyak 16 ml/kgBB. Skor 2 = 3 g/kgBB, diberikan larutan etanol diet nutrisi lengkap sebanyak 12 ml/kgBB. Skor 3 = 2 g/kgBB, diberikan larutan etanol diet nutrisi lengkap sebanyak 8 ml/kgBB. Skor 4 = 1 g/kgBB, diberikan larutan etanol diet nutrisi lengkap sebanyak 4 ml/kgBB. Skor 5 = 0 g/kgBB, diberikan diet isokalorik susu formula dan dekstrosa dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan (Leasure dan Nixon, 2010).	Ordinal

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat Penelitian

Peralatan yang diperlukan untuk penelitian yaitu:

1. Neraca analitik untuk menimbang berat tikus
2. Kandang tikus

3. Botol minum tikus
4. Tempat makan tikus
5. Sonde lambung tikus
6. Minor set, untuk membedah tikus
7. Spuit oral 1 cc dan 3 cc
8. Kapas alkohol
9. Gelas ukur
10. Alat pemeriksaan mikroskopis: mikroskop, gelas objek, cairan emersi.
11. Alat untuk pembuatan preparat histologi; *tissue cassette*, kertas tisu, oven, kapas, spiritus, *rotary microtome*, *disposable knife*, inkubator, kaca objek.

3.6.2. Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan untuk penelitian yaitu:

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley
2. Ekstrak bawang hitam
3. Pakan dan minum tikus
4. Etanol 96%
5. Susu formula
6. Bahan untuk pembuatan preparat histologi: formalin 10%, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna Hematoksilin dan Eosin (H&E) dan entelan.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Aklimatisasi Hewan Coba

Adaptasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley sebanyak 30 ekor dilakukan selama 7 hari di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebelum diberi perlakuan. Adaptasi diperlukan untuk menyeragamkan cara hidup dan makanan sebelum diberikan perlakuan. Tikus ditempatkan secara acak ke dalam 3 kelompok sesuai jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian ini.

Tikus ditempatkan di kandang pemeliharaan dengan penutup yang terbuat dari kawat dan diberi sekam pada dasar kandang. Pemberian makanan dan minuman melalui *ad libitum*. Makanan tikus berupa pakan standar berupa pelet yang diletakkan dalam wadah makan tikus dan minuman diberikan secukupnya pada wadah terpisah dan diganti setiap hari untuk menjaga kesehatan tikus (Meidina, 2022).

3.7.2. Pemilihan Alkohol dan Penentuan Dosis

a. Pemilihan Alkohol

Alkohol yang digunakan adalah etanol murni dengan konsentrasi 96%. Alkohol tersebut dicampurkan menjadi larutan alkohol dengan diet nutrisi komplit. Etanol 96% dicampurkan dengan larutan susu formula menjadi konsentrasi 25% (m/v) (Morris *et al.*, 2010). Pada larutan alkohol diet nutrisi komplit dengan konsentrasi 25% (m/v) terdapat 25 g (~31,25 ml) etanol 96% untuk setiap 100 ml larutan alkohol diet nutrisi komplit.

Larutan etanol 25% (m/v) dengan diet nutrisi komplit dapat dibuat dengan cara mencampurkan dua sendok takar (~17.9 g) susu formula dengan air sebanyak 65 ml. Larutan susu formula selanjutnya dicampurkan dengan 25 g (~31,25 ml) etanol 96%, lalu tambahkan air hingga volume larutan mencapai 100 ml.

b. Penentuan Dosis Alkohol

Penelitian ini menggunakan model *binge drinking* yang dimodifikasi dari model *binge drinking* oleh Majchrowicz pada tahun 1975. Model *binge drinking* ini telah terbukti dalam mereplikasi kerusakan akibat konsumsi alkohol berlebihan dan dengan jangka waktu yang pendek. Pada model *binge drinking* ini tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley diinduksi dengan alkohol konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula dengan interval 8 jam selama 4 hari. Sebanyak 5 g/kgBB

alkohol diberikan sebagai dosis pertama dan untuk dosis selanjutnya disesuaikan berdasarkan 6 poin skala intoksikasi dari Majchrowicz. (Yang *et al.*, 2014; Obernier *et al.*, 2002)

Tabel 2. Skor intoksikasi Majchrowicz

Skor Intoksikasi	Indikasi	Dosis (g/kgBB)
0	Tikus normal	5
1	Hipoaktif, ataksia ringan	4
2	Ataksia, elevasi abdomen	3
3	Refleks membalikkan badan terlambat, ataksia tanpa elevasi abdomen	2
4	Tidak ada refleks membalikkan badan, terdapat refleks mengedipkan mata	1
5	Tidak ada refleks membalikkan badan, tidak ada refleks mengedipkan mata	0

Sumber : (Leasure dan Nixon, 2010)

Untuk menghitung jumlah larutan alkohol diet nutrisi komplit yang digunakan dapat menggunakan rumus konsentrasi massa per volume dari konsentrasi etanol yang diperlukan.

$$25\% = \frac{\text{massa (g etanol)}}{\text{volume (ml larutan)}} \times 100\%$$

Jumlah larutan yang diperlukan untuk setiap skor intoksikasi, yaitu:

1. Dosis awal/skor intoksikasi 0,

$$25\% = \frac{5}{x} 100\%$$

$$x = \frac{5}{25\%} 100\%$$

$$x = 20 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan sebagai dosis utama dan skor intoksikasi 0 adalah 20 ml/kgBB.

2. Skor intoksikasi 1,

$$25\% = \frac{4}{x} 100\%$$

$$x = \frac{4}{25\%} 100\%$$

$$x = 16 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan untuk skor intoksikasi 1 adalah 16 ml/kgBB.

3. Skor intoksikasi 2,

$$25\% = \frac{3}{x} 100\%$$

$$x = \frac{3}{25\%} 100\%$$

$$x = 12 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan untuk skor intoksikasi 2 adalah 12 ml/kgBB

4. Skor intoksikasi 3,

$$25\% = \frac{2}{x} 100\%$$

$$x = \frac{2}{25\%} 100\%$$

$$x = 8 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan untuk skor intoksikasi 3 adalah 8 ml/kgBB

5. Skor intoksikasi 4,

$$25\% = \frac{1}{x} 100\%$$

$$x = \frac{1}{25\%} 100\%$$

$$x = 4 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan untuk skor intoksikasi 4 adalah 4 ml/kgBB

6. Skor intoksikasi 5 tidak akan diberikan larutan alkohol. Skor intoksikasi 5 akan diberikan diet isokalorik susu formula dan dekstrosa dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan.

3.7.3. Pemilihan Bawang Hitam dan Penentuan Dosis

a. Pemilihan Bawang Hitam



Gambar 9. Ekstrak bawang hitam (Dimas, 2021).

Bawang hitam yang digunakan pada penelitian ini adalah bawang hitam cair dengan sediaan 33 ml yang diproduksi dan didapat dari Serambi Botani Institut Pertanian Bogor. Bawang hitam ini memiliki kandungan ekstrak bawang hitam 50% dan air 50%. Dengan rumus konsentrasi massa per volume maka didapatkan sebanyak 16.5 gram bawang hitam dalam sediaan 33 ml (Dimas, 2022).

b. Penentuan Dosis Bawang Hitam

Dosis yang digunakan untuk penelitian ini adalah 800 mg/kgBB yang mana pada dosis ini terdapat efek perlindungan yang paling optimal terhadap ginjal dan juga hepar pada tikus yang telah

diinduksi dengan minyak jelantah (Astari 2020; Dimas, 2021). Untuk menghitung jumlah larutan ekstrak bawang hitam yang digunakan dapat menggunakan rumus konsentrasi massa per volume dari konsentrasi ekstrak bawang hitam pada kemasan.

$$50\% = \frac{\text{massa (g bawang hitam)}}{\text{volume (ml ekstrak bawang hitam)}} \times 100\%$$

Jumlah ekstrak yang diperlukan untuk memenuhi dosis optimal dari bawang hitam, yaitu:

$$50\% = \frac{0.8 \text{ g}}{x} \times 100\%$$

$$x = \frac{0.8 \text{ g}}{50\%} \times 100\%$$

$$x = 1.6 \text{ ml}$$

Maka jumlah larutan yang diperlukan untuk memenuhi dosis optimal dari bawang hitam adalah 1.6 ml/kgBB.

3.7.4. Prosedur Pemberian Intervensi

Setelah dilakukan aklimatisasi terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley, pemberian makanan dihentikan pada masa intervensi. Sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu:

1. Kontrol negatif, tidak diberikan intervensi namun diberikan diet isokalorik susu formula dan dekstrosa secara intragastrik dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan.
2. Kontrol positif, diberi alkohol konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula secara intragastik dengan dosis awal 5 g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol.

3. Perlakuan 1, diberi alkohol konsentrasi 25% (m/v) susu formula secara intragastrik dengan dosis awal 5 g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol, serta diberikan juga bawang hitam dengan dosis 800 mg/kgBB.

3.7.5. Terminasi Hewan Coba

Setelah 4 hari dilakukan perlakuan, semua hewan percobaan diterminasi. Tikus pertama-tama dianastesi menggunakan *ketamine-xylazine* dengan dosis 75-100 mg/kgBB dan ditambahkan 5-10 mg/kgBB secara intraperitoneal selama 10-30 menit. Setelah itu dilakukan pembedaan dan pengambilan bulbus olfaktorius tikus yang dimasukkan ke dalam formalin untuk dibuat preparat histologi.

3.7.6. Pembuatan Preparat Histologi

Preparat dibuat menggunakan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E) yang kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Proses pembuatan preparat histologi:

1. *Fixation*
 - a. Spesimen berupa potongan organ bulbus olfaktorius yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
 - b. Dicuci pada air mengalir sebanyak 3-5 kali.
2. *Trimming*
 - a. Organ dikecilkan hingga ukuran ± 3 mm.
 - b. Potongan bulbus olfaktorius tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3. Dehidrasi

Keringkan *tissue cassette* dengan diletakkan pada kertas tisu.

Dehidrasi dengan:

- a. Alkohol 70% selama 30 menit.
- b. Alkohol 96% selama 30 menit.
- c. Alkohol 96% selama 30 menit.
- d. Alkohol 96% selama 30 menit.
- e. Alkohol absolut selama 1 jam
- f. Alkohol absolut selama 1 jam
- g. Alkohol absolut selama 1 jam
- h. Alkohol xylol 1:1 selama 30 menit

4. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xylol I dan II, masing-masing selama 1 jam.

5. *Inpregnasi*

Inpregnasi dilakukan dengan menggunakan paraffin selama 1 jam di dalam oven dengan suhu 65°C.

6. *Embedding*

- a. Sisa paraffin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
- b. Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logan dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58°C.
- c. Paraffin cair dituangkan ke dalam pan.
- d. Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pin dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
- e. Pan dimasukkan ke dalam air.

- f. Paraffin yang berisi potongan bulbus olfaktorius dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4-6°C beberapa saat.
- g. Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel atau pisau hangat.
- h. Lalu diletakkan pada balok kayu, direkatkan pinggirnya, dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.
- i. Memblok paraffin, siap dipotong dengan mikrotom.

7. *Cutting*

- a. Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
- b. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.
- c. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.
- d. Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
- g. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8. Pewarnaan

- a. Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik.
- b. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit dan larutan xylol II selama 5 menit.
- c. Dehidrasi dalam etanol absolut selama 1 jam, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, dan air selama 10 menit.
- d. Dilakukan pulasan inti dengan Harris-Hematoksin selama 15 menit.
- e. Bilas dengan air mengalir.
- f. Diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit.
- g. Dehidrasi dengan alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, dan alkohol absolut selama 2 menit.
- h. Kemudian dilakukan penjernihan dengan xylol I selama 2 menit dan xylol II selama 2 menit.

9. *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting*, yaitu entelan, dan ditutup dengan *cover glass*. Cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10. Pembacaan preparat

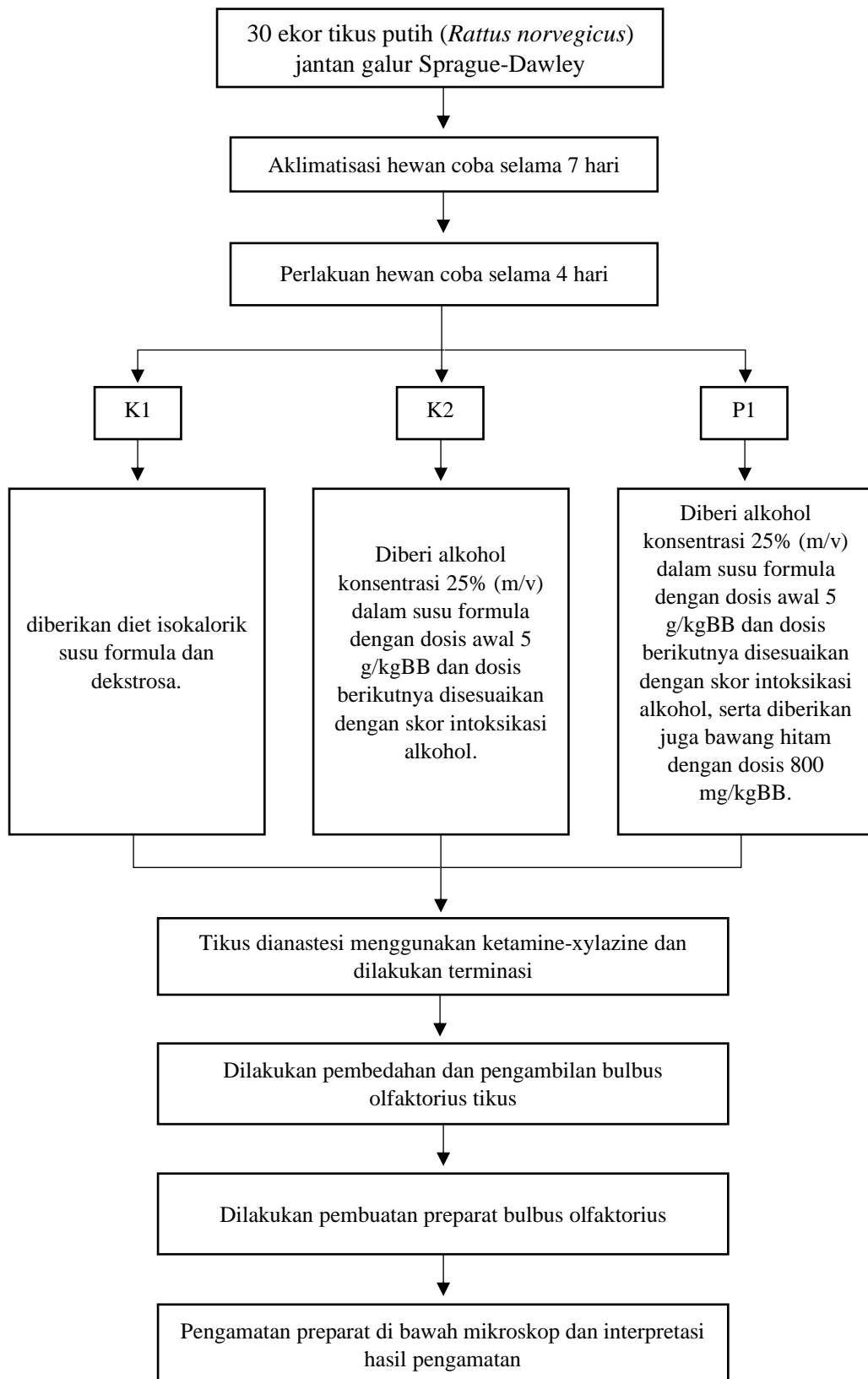
Slide diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.

3.8. Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pengamatan di bawah mikroskop diuji analisis statistik dengan menggunakan program (*Statistical Package for the Social Science*) SPSS. Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dikarenakan penelitian ini memiliki besar sampel <50 . Data yang didapatkan

juga dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Karena data yang didapatkan berdistribusi normal namun tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Karena nilai $p < 0,05$ maka H_0 dinyatakan ditolak yang menandakan terdapat perbedaan antar kelompok dan uji lanjut *Mann-Whitney* perlu dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan.

3.9. Alur Penelitian



Gambar 10. Alur penelitian

3.10. Etika Penelitian

Penelitian ini telah melalui kaji etik dan telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan surat *ethical clearance* bernomor 4178/UN26.18/PP.05.02.00/2022. Penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba harus diterapkan tiga prinsip dasar etik pelaksanaan penelitian penggunaan hewan coba:

1. Tiga pilar prinsip etik penelitian
 - a. *Respect for Animals*
Penelitian yang menggunakan hewan coba harus menghormati hewan coba yang digunakan.
 - b. *Beneficience*
Bermanfaat bagi manusia dan makhluk hidup lain.
 - c. *Justice*
Bersikap adil dalam memanfaatkan dan memperlakukan hewan coba.

2. Prinsip etik penggunaan hewan coba 3R, yaitu:
 - a. *Replacement*, merupakan prinsip untuk menghindari penggunaan hewan di dalam penelitian. Prinsip *replacement* terbagi menjadi relatif dan absolut.
 - b. *Reduction*, merupakan prinsip untuk memanfaatkan hewan coba dalam jumlah seminimal mungkin, namun tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah sampel hewan coba yang digunakan pada penelitian ini telah dihitung menggunakan rumus Frederer dan didapatkan sebanyak 30 ekor.
 - c. *Refinement*, merupakan prinsip memperhalus tindakan sebagai upaya untuk memperlakukan hewan percobaan dengan cara yang manusiawi dan dengan tindakan penelitian sedemikian rupa sehingga mengurangi rasa sakit dan stres pada hewan coba.

3. Prinsip etik pemeliharaan/perlakuan terhadap hewan coba
 - a. *Freedom from hunger and thirsty*
 - b. *Freedom from pain, injury, and disease*
 - c. *Freedom from discomfort*
 - d. *Freedom from fear and distress*
 - e. *Express natural behavior.*

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gambaran histopatologi bulbus olfaktorius tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking* dapat dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang hitam dengan dosis 800 mg/kgBB.

5.2. Saran

Saran dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian fitokimia untuk mengetahui senyawa di dalam bawang hitam yang memiliki peran antioksidan terhadap paparan alkohol dengan model *binge drinking*.
2. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut menggunakan dosis bawang hitam yang bervariasi untuk mengetahui dosis ekstrak bawang hitam yang memiliki efek neuroprotektif paling efektif terhadap kerusakan yang disebabkan oleh paparan alkohol di otak.

DAFTAR PUSTAKA

- Astari PDS, Hanriko R. 2020. *Black Garlic (Allium sativum)* Sebagai Terapi Adjuvan Potensial pada Kerusakan Hepar yang Diinduksi Minyak Jelantah. *Majority*. 9(1): 1-6.
- Azizah N, Sutyarso, Putri GT. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Batang Bakau Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) Terhadap Jumlah dan Kualitas Sperma Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague-Dawley* yang Diinduksi Alkohol. *Medula*. 9(2): 301-7.
- Carrino D, Branca JJV, Becatti M, Paternostro F, Morucci G, Gulisano M *et al.* 2021. Alcohol-Induced Blood-Brain Barrier Impairment: An In Vitro Study. *Int J Environ Res Public Health*. 18(2683): 1-14.
- Contreras-Zentella ML, Villalobos-Garcia D, Hernandez-Munoz R. 2022. Ethanol Metabolism in the Liver, the Induction of Oxidant Stress, and the Antioxidant Defense System. *Antioxidants*. 11(1258): 1-26.
- Covantev S, Belic O, Catereniuc I. 2020. Clinical Anatomy of the Olfactory Nerve, Bulb and Tract. Dalam: Yi TM. *Cranial Nerves: Anatomy, Function, Clinical Significance*. Nova Science Pub Inc.
- Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ *et al.* 2004. Alcohol-Induced Neurodegeneration: When, Where, and Why? *Alcohol Clin Exp Res*. 28(2): 350-64.
- Crews FT, Nixon K. 2008. Mechanism of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 44(2): 115-27.

- Dimas. 2021. Hubungan Asupan *Black Garlic* terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague-Dawley* yang Diinduksi Minyak Jelantah [skripsi]. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Faizal M, Khan AA. 2017. A Histomorphological Study on the Olfactory Bulb of Diabetic Albino Rats. *Int J Clin Exp*. 3(4): 47-56.
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morse B, Pesidsky Y. 2008. Mechanism of Alcohol-Induced Oxidative Stress and Neuronal Injury. *Free Radic Biol Med*. 45(11): 1542-50.
- Hazzaa SM, Abdelaziz SAM, Eldaim MAA, Abdel-Daim MM, Elgarawany G. 2020. Neuroprotective Potential of *Allium sativum* against Monosodium Glutamate-Induced Excitotoxicity: Impact on Short-Term Memory, Gliosis, and Oxidative Stress. *Nutrients*. 12(1028): 1-17.
- Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP, Naassila M. 2019. Animal Models of Binge Drinking, Current Challenges to Improve Face validity. *Neurosci Biobehav Rev*. 106(2019): 112-21.
- Jeong YY, Ryu JH, Shin J, Kang MJ, Kang JR, Han J *et al*. 2016. Comparison of Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects between Fresh and Aged Black Garlic Extracts. *Molecules*. 21(430): 1-15.
- Kamal H, Tan GC, Ibrahim SF, Shaikh MF, Mohamed IN, Mohamed RMP *et al*. 2020. Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity. *Front Cell Neurosci*. 14(282): 1-15.
- Kemenkes RI. 2009. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Provinsi Lampung Tahun 2007. Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kemenkes RI. 2019. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Provinsi Lampung Tahun 2018. Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

- Kimura S, Tung Y, Pan M, Su N, Lai Y, Cheng K. 2016. Black Garlic: A Critical Review of its Production, Bioactivity, and Application. *J Food Drug Anal.* 25(1): 62-70.
- Kondoh D, Watanabe K, Nishihara K, Ono YS, Nakamura KG, Yuhara K *et al.* 2017. Histological Properties of Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Common Hippopotamus. *Brain Behav Evol.* 2017(90): 224-31.
- Leasure JL, Nixon K. 2010. Exercise Neuroprotection in a Rat Model of Binge Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 34(3): 404-14.
- Low VF, Mombaerts P. 2017. Odorant Receptor Proteins in the Mouse Main Olfactory Epithelium and Olfactory Bulb. *Neuroscience.* 344(2017): 167-77.
- Maurage P, Rombaux P, De Timary P. 2014. Olfaction in Alcohol-Dependence: A Neglected yet Promising Research Field. *Front Psych.* 4(1007): 1-7.
- Manisha, Hasan W, Rajak R, Jat D. 2017. Oxidative Stress and Antioxidant: An Overview. *Int J Adv Res Rev.* 2(9): 110-19.
- Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. 2013. Microglial Activation Is Not Equivalent to Neuroinflammation in Alcohol-Induced Neurodegeneration: The Importance of Microglia Phenotype. *Neurobiol Dis.* 54(2013): 239-51.
- Meidina S. 2022. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* [L.] Urban) Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague-Dawley* yang Diinduksi Etanol [skripsi]. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K. 2010. Alcohol Inhibition of Neurogenesis: A Mechanism of Hippocampal Neurodegeneration in an Adolescent Alcohol Abuse Model. *Hippocampus.* 20(5): 596-607.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F. 2014. Neuronal Organization of Olfactory Bulb Circuits. *Front Neural Circuits.* 8(98): 1-19.
- Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. 2002. Binge Ethanol Exposure in Adult Rats Causes Necrotic Cell Death. *Alcohol Clin Exp Res.* 26(4): 547-57.

- Olude MA, Ogunbunmi TK, Olopade JO, dan Ihunwo AO. 2014. The Olfactory Bulb Structure of African Giant Rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse 1840) I: Cytoarchitecture. *Anat Sci Int.* 89(4): 224-31.
- Onyekwelu KC. 2018. Ethanol. Dalam: Taukeni SG, penyunting. *Psychology of Health – Biopsychosocial Approach.* United Kingdom: IntechOpen.
- Peng H, Nickell CRG, Chen KY, McClain JA, Nixon K. 2017. Increased Expression of M1 and M2 Phenotypic Markers in Isolated Microglia After Four-Day Binge Alcohol Exposure In Male Rats. *Alcohol.* 62(2017): 29-40.
- Pervin Z, Stephen JM. 2021. Effects of Alcohol on the Central Nervous System to Develop Neurological Disorder: Pathophysiological and Lifestyle Modulation Can Be Potential Therapeutic Options for Alcohol-Induced Neurotoxication. *AIMS Neurosci.* 8(3): 390-413.
- Pratama MR, Muhartono. 2019. Dampak Mengonsumsi Alkohol terhadap Kesehatan Lambung. *Majority.* 8(2): 254-58.
- Pratidina LA, Hwang SG, Nam IS, Wijayanti N. 2021. Anti-inflammatory Action of Indonesian Black Garlic (IBG) Ethanol Extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Indonesian J Pram.* 32(2): 193-200.
- Qin L, Crews FT. 2012. NADPH Oxidase and Reactive Oxygen Species Contribute to Alcohol-Induced Microglial Activation and Neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 9(5): 1-19.
- Rupp CI, Fleischhacker WW, Hausmann A, Mair D, Hinterhuber H, Kurz M. 2004. Olfactory Functioning In Patients with Alcohol Dependence: Impairments in Odor Judgements. *Alcohol Alcohol.* 39(6): 514-9.
- Saputra GA, Hanriko R, Busman H, Muhartono. 2021. Hubungan Riwayat Merokok, Konsumsi Alkohol dan Diabetes dengan Derajat Histopatologi Karsinoma Kolorektal di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung Periode 2017-2018. *Medula.* 10(4): 705-9.
- Shin JH, Lee CW, Oh SJ, Yun J, Kang MR, Han S *et al.* 2014. Hepatoprotective Effect of Aged Black Garlic Extract in Rodents. *Toxicol Res.* 30(1): 49-54.

- Silvani FN, Sukohar A, Rudiyanto W. 2019. Pengaruh Ekstrak Etanol Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) Sebagai Antioksidan Terhadap Histopatologi Hepar Tikus Galur *Sprague dawley* yang Diinduksi Parasetamol. *Majority*. 8(1): 95-101.
- Sukohar A, Suharyani, Sutyarso, Busman H, Nurcahyani N, Kurniawaty E. 2022. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Seed Fractions on HeLa Cell Line an In Vitro. *Pharmacogn J*. 14(3): 559-64.
- Theodorus E, Muhartono, Putri GT. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas (*Alpina galanga*) terhadap Gambaran Histopatologi Otak Mencit (*Mus musculus L*) yang Diinduksi *Monosodium Glutamate*. *JIMKI*. 7(2): 14-20
- Tritama TK. 2015. Konsumsi Alkohol dan Pengaruhnya terhadap Kesehatan. *Majority*. 4(8): 7-10.
- Tsermpini EE, Iljes AP, Dolzan V. 2022. Alcohol-induced Oxidative Stress and the Role of Antioxidants in Alcohol Use Disorder: A Systematic Review. *Antioxidants*. 11(1374): 1-33.
- Wilson DF, Matschinsky FM. 2020. Ethanol Metabolism: The Good, the Bad, and the Ugly. *Med Hypotheses*. 140(2020): 1-11.
- WHO. 2018. Global Status Report on Alcohol and Health 2018. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2014. Global Status Report on Alcohol and Health 2014. Geneva: World Health Organization.
- Yang J, Xue X, Tian H, Wang X, Dong Y, Wang F et al. 2014. Role of Microglia in Ethanol-Induced Neurodegenerative Disease: Pathological and Behavioral Dysfunction at Different Developmental Stages. *Pharmacol Ther*. 144(3): 321-37.