

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Allium sativum*)
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HIPPOCAMPUS PADA
AREA CA2-3 TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus novergicus*) YANG
DIINDUKSI ALKOHOL MODEL *BINGE DRINKING***

(Skripsi)

Oleh:

M. Farhan Rozak



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Allium sativum*)
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HIPPOCAMPUS PADA
AREA CA2-3 TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus novergicus*) YANG
DIINDUKSI ALKOHOL MODEL *BINGE DRINKING***

Oleh:

M. Farhan Rozak

Skripsi

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

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Allium sativum*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HIPPOCAMPUS PADA AREA CA2-3 TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus novergicus*) YANG DIINDUKSI ALKOHOL MODEL BINGE DRINKING**

Nama Mahasiswa : **M. Farhan Rozak**

No. Pokok Mahasiswa : 1918011014

Program Studi : PENDIDIKAN DOKTER

Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN



Pembimbing 1

dr. Anggraeni Janar Wulan, S.Ked., M.Sc.

NIP. 198201302008122001

Pembimbing 2

dr. Mukhlis Imanto, M.Kes, Sp.THT-KL.

NIP. 197802272003121001

2. Dekan Fakultas Kedokteran



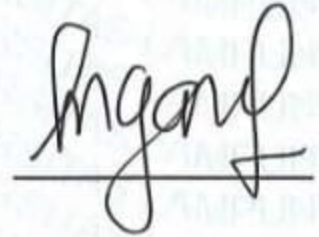
Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar R. W., SKM., M. Kes.

NIP. 197206281997022001

MENGESAHKAN

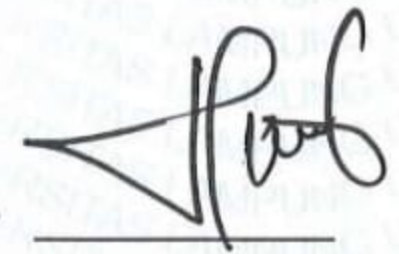
1. Tim Penguji
Ketua

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



Sekretaris

: **dr. Mukhlis Imanto, M.Kes, Sp.THT-KL.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **Dr. dr. Indri Windarti, S.Ked., Sp.PA.**



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar R. W., SKM., M. Kes.
NIP. 197206281997022001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **30 Januari 2023**

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Allium sativum*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HIPPOCAMPUS PADA AREA CA2-3 TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus novergicus*) YANG DIINDUKSI ALKOHOL MODEL *BINGE DRINKING*”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut 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, 9 Februari 2023

Penulis,



M. Farhan Rozak
NPM. 1918011014

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 17 Juli 2001 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara dari Bapak Sukijo dan Ibu Endang Sulistiowati.

Penulis menyelesaikan Taman Kanak-Kanak (TK) di TK Al-azhar 7 Bandar Lampung pada tahun 2007, Sekolah Dasar (SD) di SDS Al-kautsar Bandar Lampung pada tahun 2013, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMPS Al-kautsar Bandar Lampung pada tahun 2016, Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAS Al-kautsar Bandar Lampung pada tahun 2019. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter (PSPD) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2019.

Selama menjadi pelajar, penulis pernah mengikuti Al-kautsar *Computer Innovation Club* (ACIC) serta berpartisipasi dalam beberapa lomba seperti Lomba Cerdas Cermat Kebumihan Tingkat Provinsi Lampung dan Olimpiade Sains Kota Kebumihan SMA Tingkat Kota Bandar Lampung. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi intra kampus yaitu, Forum Studi Islam (FSI) Ibnu Sina FK Unila sebagai Anggota Departemen BBQ periode tahun 2020-2021, serta aktif dalam UFO Basket FK Unila.

فَاذْكُرُونِي أَذْكُرْكُمْ وَاشْكُرُوا لِي وَلَا تَكْفُرُونِ

“Maka ingatlah kepada-Ku, Aku pun akan ingat kepadamu. Bersyukurlah kepada-Ku, dan janganlah kamu ingkar kepada-Ku.”

[2:152]

Dengan memohon izin dan menyampaikan pujian kepada Allah SWT. , kupersembahkan karya ini untuk keluarga tercinta, guru, teman-teman, serta semua pihak yang terlibat untuk setiap doa dan dukungan yang telah diberikan.

SANWACANA

Alhamdulillahirrabbilamin, puji syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat, nikmat, serta kasih sayang-Nya juga salawat yang senantiasa tercurah kepada Rasulullah Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi penulis dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Bawang Hitam (*Allium sativum*) Terhadap Gambaran Histopatologi Hippocampus Pada Area CA2-3 Tikus Putih Jantan (*Rattus novergicus*) Yang Diinduksi Alkohol Model *Binge Drinking*” merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan doa, masukan, bantuan, bimbingan, dan kritik dari berbagai pihak. Dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar R.W., SKM., M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. dr. Anggraeni Janar Wulan, S.Ked., M.Sc., selaku pembimbing pertama atas kesediaan dalam meluangkan waktu, kesabaran dalam membimbing, memberikan ilmu, saran, kritik, nasihat, dan motivasi yang sangat bermanfaat selama proses penyelesaian skripsi ini.
4. dr. Mukhlis Imanto, M.Kes, Sp.THT-KL., selaku pembimbing kedua atas kesediaan dalam meluangkan waktu, kesabaran dalam membimbing,

memberikan ilmu, saran, kritik, nasihat, dan motivasi yang sangat bermanfaat selama proses penyelesaian skripsi ini.

5. Dr. dr. Indri Windarti, S.Ked., Sp.PA., selaku pembahas atas kesediaan dalam meluangkan waktu dan tenaga, memberikan ilmu, saran, kritik, nasihat, dan motivasi yang sangat bermanfaat selama proses penyelesaian skripsi ini.
6. dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, M.Farm., selaku pembimbing akademik yang senantiasa memotivasi dan memberikan arahan serta bimbingan selama menempuh proses pendidikan di Fakultas Kedokteran.
7. Seluruh dosen dan staf Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu yang bermanfaat serta waktu, tenaga, dan bantuan yang diberikan selama proses pendidikan di Fakultas Kedokteran dan proses penyelesaian skripsi ini.
8. Terimakasih kepada Pak Yadi selaku pengurus animal house atas ilmu yang bermanfaat serta waktu, tenaga, dan bantuan yang diberikan selama proses penelitian di Fakultas Kedokteran.
9. Kedua orangtuaku tersayang, Bapak Sukijo dan Ibu Endang, yang telah melahirkan dan membesarkan penulis dengan cinta dan kasih sayang. Terimakasih atas doa, perjuangan, motivasi, dukungan, pembelajaran, dan banyak hal lainnya yang selalu diberikan sehingga menguatkan penulis selama proses pendidikan ini. Terimakasih atas segalanya.
10. Saudara kandungku tersayang, M. Rifqi Rafif dan Kanita Nabila. Terimakasih atas doa dan dukungan yang selalu diberikan kepada penulis.
11. Seluruh keluarga besar penulis yang turut memberikan doa, dukungan, bantuan, dan kasih sayang selama penulis menyelesaikan proses pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
12. Sahabat “Lapak Stadion” (Deandra Athaayaa, Sema Gigaramadan, Fadhlurrahman, Naufal Rasyid, Nayarani Humaira), sahabat sejak semester awal yang telah membantu, bekerja sama, dan menemani penulis dari awal perkuliahan hingga sekarang. Terimakasih telah menjadi tempat untuk bertukar pikiran, saling mendukung satu sama lain, serta saling menghibur dalam menghadapi *up and down* selama perkuliahan. Semoga kebersamaan kita akan terus terjalin hingga seterusnya.

13. Terimakasih untuk seluruh teman-teman FSIIS FK Unila yang telah menjadi salah satu support system selama berjuang baik di organisasi ataupun di urusan akademik.
14. Teman satu bimbingan skripsi: Sayyidina Umar dan Ni Made Karenina, terimakasih atas bantuan yang diberikan, serta telah bekerjasama dan kebersamaian perjuangan selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.
15. DPA 6, terimakasih sudah menjadi keluarga pertamaku sejak masuk FK. Terimakasih atas dukungan yang diberikan serta kebersamaan yang telah dilalui hingga saat ini.
16. Seluruh teman-teman L19AMENTUM L19AND. Terimakasih atas segala pembelajaran dan pengalaman berharga yang diberikan, atas rasa kebersamaan dan kekeluargaan yang terukir menjadi memori indah. Doa baik dan dukungan kusampaikan kepada kalian, semoga usaha kita saat ini menjadi hasil yang baik dan membentuk kita menjadi dokter-dokter yang profesional dan berkompeten.
17. Seluruh pihak yang telah membantu selama proses perkuliahan dan penyelesaian skripsi yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu. Terimakasih atas doa, dukungan, saran, dan kritik yang diberikan..

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan memiliki ruang untuk perbaikan. Akan tetapi penulis berharap skripsi ini memberikan manfaat dan ilmu baik kepada pembaca maupun penulis.

Bandar Lampung, 9 Februari 2023

Penulis,

M. Farhan Rozak

ABSTRACT

The Effect of Giving Black Garlic Extract (*Allium sativum*) on Histopathological Picture of Hippocampus CA2-3 Area of Male White Rats (*Rattus novergicus*) Induced by Alcohol Binge Drinking Model

By

M. Farhan Rozak

Background: Black garlic (*Allium sativum*) is a herbal medicine high in antioxidants. Black garlic contains the antioxidants S-allylcysteine (SAC) and S-allylmercaptocysteine (SAMC), allyl sulphides and diallyl polysulphides, and flavonoids. Black garlic has been shown to have a protective effect on the liver with an effective dose of 800 mg/kgBW. This study aims to determine the effect of giving black garlic extract at a dose of 800 g/kgBW on the histopathological appearance of the hippocampus in alcohol-induced male white rats (*Rattus novergicus*) with the binge drinking model.

Method: This research is a true experimental study using a posttest-only control group design. There were 30 rats divided into 3 groups: negative control (K1) with formula milk induction, positive control (K2) with alcohol induction by binge drinking method, treatment (P) with alcohol induction by binge drinking method together with 800g/kgBB of black garlic extract. Histopathological findings of the hippocampus were taken from the number of pyramidal cells in CA2-3. Data were tested statistically with One-Way ANOVA and Post Hoc LSD.

Results: Based on the results of the One-Way ANOVA statistical test, the p-value is 0,000. The statistical test was then continued with LSD Post Hoc test, there was a significant difference between K2 and K1, and P.

Conclusion: There is an influence of alcohol-induced binge drinking method on neurodegeneration of the hippocampus and there is an effect of giving black garlic extract at a dose of 800g/kgBW on histopathological findings of hippocampus area CA2-3 of alcohol-induced male white rats (*Rattus novergicus*) with the binge drinking model.

Keywords : Black garlic, binge drinking, hippocampus, neurodegeneration

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAWANG HITAM (*Allium sativum*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HIPPOCAMPUS PADA AREA CA2-3 TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus novergicus*) YANG DIINDUKSI ALKOHOL MODEL *BINGE DRINKING*

Oleh

M. Farhan Rozak

Latar Belakang : Bawang hitam (*Allium sativum*) merupakan salah satu obat-obatan herbal yang tinggi antioksidan. Bawang hitam mengandung antioksidan *S-allylcysteine* (SAC) dan *S-allylmercaptocysteine* (SAMC), *allyl sulphides* dan *diallyl polisulphides*, serta flavonoid. Bawang hitam telah terbukti memiliki efek hepatoprotektif dengan dosis efektif 800mg/kgBB. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam dengan dosis 800g/kgBB terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian true eksperimental menggunakan *posttest only control group design*. Terdapat 30 tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok: kontrol negatif (K1) dengan induksi susu formula, kontrol positif (K2) dengan induksi alkohol metode *binge drinking*, perlakuan (P) dengan induksi alkohol metode *binge drinking* bersamaan bawang hitam 800g/kgBB. Gambaran histopatologi *hippocampus* diambil data jumlah sel piramidal pada CA2-3. Data dilakukan uji statistik dengan *One-Way ANOVA* dan *Post Hoc LSD*.

Hasil: Berdasarkan hasil uji statistik *One-Way ANOVA* didapatkan nilai $p=0,000$ kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc LSD* terdapat perbedaan signifikan K2 dengan K1 dan P.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian induksi alkohol metode *binge drinking* dengan neurodegenerasi *hippocampus* dan terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam dengan dosis 800g/kgBB terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

Kata kunci: Bawang hitam, *binge drinking*, *hippocampus*, neurodegenerasi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Bagi Peneliti	4
1.4.2. Manfaat Bagi Peneliti Lain	4
1.4.3. Manfaat Bagi Masyarakat	4
1.4.4. Manfaat Bagi Institusi.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Alkohol.....	5
2.1.1. Definisi.....	5
2.1.2. Metabolisme.....	6
2.1.3. <i>Binge Drinking</i>	7
2.2. <i>Hippocampus</i>	9
2.2.1. Anatomi dan Fisiologi	9
2.2.2. Histologi.....	10
2.2.3. Histopatologi.....	12
2.3. Mekanisme Kerusakan <i>Hippocampus</i> Oleh Alkohol	13
2.4. Bawang Hitam.....	16

2.5. Kerangka Teori.....	17
2.6. Kerangka Konsep	19
2.7. Hipotesis.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1. Rancangan Penelitian	21
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.3. Subjek Penelitian.....	22
3.3.1. Populasi Penelitian.....	22
3.3.2. Sampel Penelitian	22
3.3.3. Kelompok Perlakuan.....	23
3.3.4. Kriteria Penelitian	23
3.4. Identifikasi Variabel.....	24
3.5. Definisi Operasional Variabel.....	24
3.6. Alat dan Bahan Penelitian.....	25
3.6.1. Alat Penelitian.....	25
3.6.2. Bahan Penelitian	26
3.7. Prosedur Penelitian.....	27
3.7.1. Aklimatisasi Hewan Uji.....	27
3.7.2. Pemilihan dan Penentuan Larutan Susu Formula	27
3.7.3. Pemilihan dan Penentuan Dosis Etanol	28
3.7.4. Pemilihan Bawang Hitam dan Penentuan Dosis.....	30
3.7.5. Prosedur Pemberian Intervensi	32
3.7.6. Prosedur Terminasi	32
3.7.7. Prosedur Pembuatan Preparat	32
3.8. Alur Penelitian	36
3.9. Analisis Data	37
3.10. Etika Penelitian	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1. Hasil Penelitian	40
4.1.1. Gambaran Umum Penelitian.....	40
4.1.2. Penyesuaian Dosis Berdasarkan Skor Perilaku Intoksikasi	40

4.1.3. Pembacaan Gambaran Histopatologi.....	41
4.1.4. Penghitungan Sel Yang Mengalami Neurodegenerasi Pada CA2-3 <i>Hippocampus</i>	43
4.1.5. Analisis Bivariat Hasil Penghitungan	44
4.2. Pembahasan.....	46
4.3. Keterbatasan Penelitian	48
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Kesimpulan	49
5.2. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Definisi Operasional.....	25
2. Skala Perilaku Intoksikasi Majchrowicz	29
3. Rata-Rata Skor Intoksikasi Alkohol Dan Penyesuaian Dosis	41
4. Penghitungan Jumlah Sel Neurodegenerasi CA2-3	44
5. Analisis Bivariat	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Jalur Alkohol Dehidrogenase	6
2. Reaksi Jalur Katalase	6
3. Reaksi Jalur MEOS	7
4. Metabolisme Alkohol Pada Otak	7
5. Anatomi Hippocampus	9
6. Sistem Limbik	10
7. Area Hippocampus.....	11
8. Gambaran Histologi Hippocampus. A)Lapisan Polimorfik, B) Lapisan Neuron Piramidalis, C) Lapisan Molekular, D) lapisan Sel Granula Pada Girus Dentatus	12
9. Gambaran Histologi Hippocampus Perbesaran Empat Ratus Kali	12
10. Gambaran Histopatologi Hippocampus	13
11. Metabolisme Alkohol.....	15
12. Kerangka Teori	19
13. Kerangka Konsep	20
14. Susu formula	27
15. Bawang Hitam Cair.....	31
16. Alur Penelitian	36
17. Gambaran Histopatologi Hippocampus Area CA2-3 Pada Kelompok Kontrol Negatif (K1)	42
18. Gambaran Histopatologi Hippocampus Area CA2-3 Pada Kelompok Kontrol Positif (K2).....	42
19. Gambaran Histopatologi Hippocampus Area CA2-3 Pada Kelompok Perlakuan (P).....	43

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

World Health Organization (WHO) melaporkan 43% dari penduduk di seluruh dunia berusia diatas 15 tahun pernah mengonsumsi alkohol dalam 12 bulan terakhir. WHO melaporkan Indonesia memiliki prevalensi pada pelaku konsumsi alkohol berlebihan dalam jangka pendek sebesar 2,6% dari total populasi di Indonesia pada tahun 2010, sedangkan pada tahun 2016 Indonesia memiliki prevalensi sebesar 6,5% dari total populasi di Indonesia (WHO, 2014, 2018). Berlandaskan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2019 melaporkan bahwa proporsi perilaku konsumsi minuman beralkohol dalam 1 bulan terakhir pada penduduk umur ≥ 10 tahun di Indonesia mencapai 27.010 penduduk. Kelompok tertinggi pada kelompok umur 20-24 tahun dengan angka 5.167 penduduk. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) melaporkan sebanyak 537 penduduk Provinsi Lampung yang mengonsumsi minuman beralkohol dalam 1 bulan terakhir pada penduduk umur ≥ 10 tahun (Riskesdas, 2019).

Alkohol sendiri adalah zat psikoaktif yang bersifat adiktif. Sifat adiktif alkohol adalah sifat kecanduan atau ketergantungan seseorang terhadap zat ini. Seseorang pengguna alkohol mempunyai rentang respon yang berfluktuasi dari kondisi ringan sampai berat. Psikoaktif karena alkohol bekerja secara selektif terutama pada otak, yang dapat menimbulkan perubahan pada perilaku, emosi, kognitif, persepsi, kesadaran, dan gangguan (Zuhri & Dona, 2021). Gangguan memori yang terjadi pada pengguna alkohol dapat berupa gangguan memori kerja dan memori spasial. Gangguan ini disebabkan neurodegeneratif seperti

penyusutan korteks frontal, penyusutan *hippocampus*, dan kehilangan sel serebral (Guo *et al.*, 2022).

Area CA2-3 merupakan area yang rentan terhadap pengaruh stresor fisik dan paparan stres oksidatif yang dipaparkan oleh alkohol. Penelitian Zahr *et al.* (2019) menunjukkan bahwa terdapat hubungan signifikan antara penurunan volume *hippocampus* pada area CA2-3 yang terlihat pada *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) dengan konsumsi alkohol dan lama durasi konsumsi (Zahr *et al.*, 2019).

Konsumsi alkohol berlebihan dalam jangka pendek disebut *binge drinking*. WHO membuat kategori sebagai *binge drinking* dengan konsumsi alkohol murni 60 gram atau lebih paling sedikit satu kali dalam 30 hari terakhir (WHO, 2018). *Binge drinking* dapat menyebabkan intoksikasi akut. Pada hewan tikus putih (*Rattus norvegicus*) dosis *binge drinking* 5g/kgBB yang dipaparkan selama 4 hari terbukti dapat menyebabkan gangguan pada *hippocampus* (Marshall *et al.*, 2013).

Metabolisme alkohol menjadi senyawa *acetaldehyde* dalam tubuh dibagi menjadi tiga jalur, yaitu melalui jalur alkohol dehidrogenase, katalase, dan melalui jalur *Microsomal Ethanol-Oxidizing System* (MEOS). *Microsomal Ethanol-Oxidizing System* (MEOS) disebut juga *mixed function oxidizing system*, menggunakan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) sebagai kofaktor dalam metabolisme etanol dan terdiri dari *Cytochrome P450 2E1* (CYP2E1). Metabolisme etanol melalui jalur CYP2E1 menyebabkan peningkatan NADP. Hal ini membatasi ketersediaan NADPH untuk regenerasi antioksidan *glutathione* (GSH) sehingga meningkatkan stress oksidatif. *Glutathione* (GSH) merupakan suatu antioksidan endogen dalam tubuh yang dapat menangkal spesies reaktif (Tritama, 2015). Terdapat beragam macam spesies reaktif salah satunya *reactive oxygen species* (ROS). Pada saat ROS ataupun radikal bebas masuk ke tubuh dengan konsentrasi tinggi, antioksidan endogen tidak akan cukup untuk melawan radikal bebas yang masuk. Oleh

karena itu, diperlukannya antioksidan eksogen tambahan yang dapat berasal dari makanan, obat-obatan dan suplemen (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Bawang hitam merupakan salah satu obat-obatan tradisional yang saat ini banyak dikembangkan sebagai antioksidan. Bawang hitam diolah dari bawang putih mentah yang dipanaskan pada suhu 70-80°C. Proses pemanasan ini menginduksi banyak reaksi kimia pada bawang putih, seperti browning enzimatis dan reaksi Maillard yang menyebabkan warnanya berubah dari putih dan kuning menjadi coklat gelap (Kang, 2016). Ekstrak bawang hitam mengandung antioksidan tinggi seperti *S-allylcysteine* (SAC) dan *S-allylmercaptocysteine* (SAMC), *allyl sulphides* dan *diallyl polysulphides*, serta flavonoid. Flavonoid diduga bersinergi dan meningkatkan aktivitas antioksidan dengan meningkatkan enzim antioksidan seluler seperti *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* dan *glutathione peroxidase* (Pambelo, 2021).

Dimas (2022) dan Astari (2021) melakukan penelitian dengan menggunakan bawang hitam terhadap tikus putih yang diberi minyak jelantah. Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat efek proteksi terhadap ginjal dan hepar tikus yang dipaparkan dengan minyak jelantah dengan dosis paling efektif yaitu 800mg/kgBB (Dimas, 2022; Astari 2021). Hazzaa *et al.* (2020) menggunakan bawang putih terhadap tikus yang dipapari oleh *Monosodium Glutamate* (MSG) didapati hasil neuroprotektif pada *hippocampus* (Hazzaa *et al.*, 2020).

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan, saya tertarik untuk mengetahui efek neuroprotektif pada bawang hitam terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, rumusan masalah yang diajukan peneliti yaitu “Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam terhadap

gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*?”.

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam dosis 800mg/kgBB terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Bagi Peneliti

Meningkatkan pengetahuan peneliti mengenai pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi dengan model *binge drinking*.

1.4.2. Manfaat Bagi Peneliti Lain

Menyediakan sumber pustaka dalam pengambilan data untuk penelitian selanjutnya mengenai pengaruh bawang hitam terhadap organ lainnya.

1.4.3. Manfaat Bagi Masyarakat

Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam menjadi obat-obatan herbal yang sudah teruji.

1.4.4. Manfaat Bagi Institusi

Untuk Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dapat digunakan sebagai referensi penelitian lebih lanjut tentang ekstrak bawang hitam sebagai obat-obatan herbal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alkohol

2.1.1. Definisi

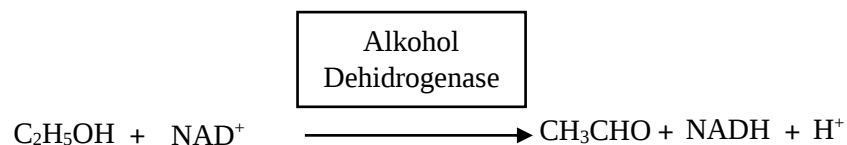
Alkohol ialah senyawa organik dengan gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon, terikat pada atom hydrogen dan atau atom karbon lain. Alkohol memiliki rumus umum R-OH, R adalah alkil atau substitusi kelompok alkil, dan dicirikan oleh hadirnya gugus hidroksil (hydroxyl group) -OH. Strukturnya mirip dengan air, tetapi dengan satu hydrogen digantikan dengan gugus alkil (Zuhri & Dona, 2021).

Alkohol dibuat menggunakan metode fermentasi atau biasa juga disebut dengan peragian, yaitu proses perubahan kimia dalam suatu substrat organik yang dapat berlangsung karena aksi katalisator biokimia, yaitu enzim yang dihasilkan oleh mikroba-mikroba hidup tertentu, terjadi karena aktifitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik sesuai. Fermentasi berlangsung dalam keadaan anaerob. Pada tahap ini khamir dan enzim yang dihasilkan sudah cukup banyak, sehingga akan berlangsung fermentasi, sampai sebagian atau seluruh gula dirubah menjadi etanol dengan reaksi: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$ (Widyanti & Moehadi, 2016).

2.1.2. Metabolisme

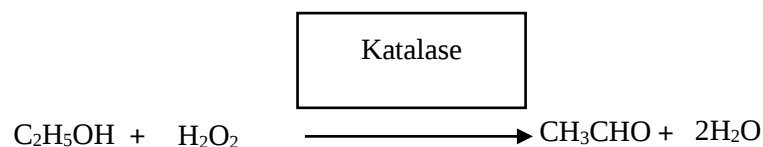
Alkohol yang masuk ke dalam tubuh manusia akan mengalami proses biokimia. Alkohol akan dimetabolisme dengan tiga jalan, yaitu jalur alkohol dehidrogenase, katalase, dan *Microsomal Ethanol-Oxidizing System* (MEOS) (Tritama, 2015).

Jalur utama untuk metabolisme alkohol melibatkan alkohol dehidrogenase (ADH), golongan *cytosolic enzyme* yang mengkatalisis konversi alkohol menjadi *acetaldehyde*. Enzim ini terletak terutama di hepar, namun sejumlah kecil ditemukan di organ lain seperti otak dan lambung. Selama konversi etanol oleh ADH menjadi *acetaldehyde*, ion hidrogen ditransfer dari etanol ke kofaktor *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) untuk membentuk NADH (Tritama, 2015).



Gambar 1. Reaksi Jalur Alkohol Dehidrogenase

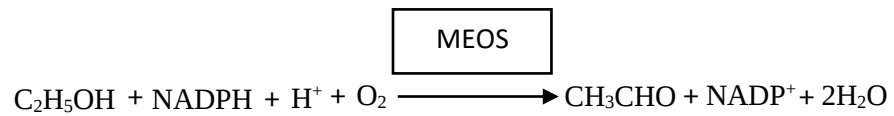
Pada jalur katalase etanol dibantu dengan hidrogen peroksida akan diubah menjadi *acetaldehyde* dan air (H_2O) (Wilson & Matschinsky, 2020).



Gambar 2. Reaksi Jalur Katalase

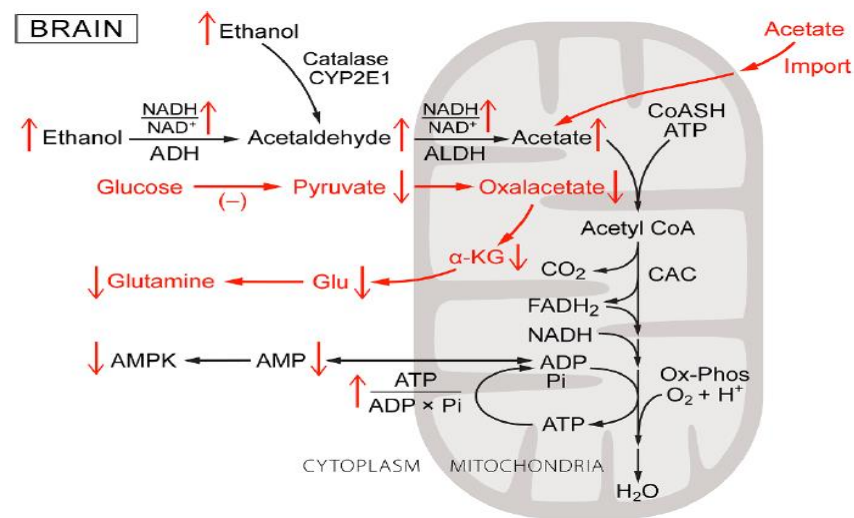
Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS) disebut juga *mixed function oxidizing system*, menggunakan NADPH sebagai kofaktor ditambah ion hidrogen (H^+) serta oksigen (O_2) dalam metabolisme etanol dan terdiri dari *Cytochrome P450* atau disebut juga sebagai CYP dengan turunan CYP2E1, CYP1A2 dan CYP3A4. Pada jalur ini menghasilkan

acetaldehyde, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP^+), dan dua molekul air (H_2O) (Tritama, 2015).



Gambar 3. Reaksi Jalur MEOS

Asetat (CH_3CHO) yang dihasilkan pada seluruh jalur dari metabolisme alkohol menuju mitokondria akan diubah menjadi asetil CoA. Asetil CoA selanjutnya memasuki siklus asam sitrat dan mengalami oksidasi. Asetat yang telah diproduksi di hepar akan disalurkan ke darah. Pada saat alkohol dikonsumsi dalam jumlah yang besar, konsentrasi asetat darah akan meningkat tinggi dengan cepat dan oksidasi dari alkohol di otak akan dilakukan bersamaan dengan oksidasi dari asetat yang didapat dari darah. Oksidasi asetat ini menyebabkan etanol sebagai sumber asetil CoA dalam memproduksi Adenosin Trifosfat (ATP) untuk sel otak (Wilson & Matschinsky, 2020).



Sumber: Wilson & Matschinsky, 2020

Gambar 4. Metabolisme Alkohol Pada Otak

2.1.3. Binge Drinking

Konsumsi alkohol berlebihan dalam jangka pendek disebut *binge drinking*. WHO membuat kategori sebagai *binge drinking* dengan

konsumsi alkohol murni diatas 60 gram dengan paling sedikit satu kali dalam 30 hari terakhir (WHO, 2018). *Binge drinking* juga dapat dikategorikan pada pria yang mengonsumsi lebih dari lima gelas minuman alkohol atau lebih dari 4 gelas minuman alkohol untuk wanita (White *et al.*, 2018). *Binge drinking* dapat menyebabkan defisit memori kerja dan fungsi eksekutif. Gangguan fungsi eksekutif seperti kesulitan visuo-persepsi, gangguan memori yang mendalam, dan gangguan memori spasial pada peminum alkohol dewasa muda, yang memiliki daerah otak yang rusak misalnya, penyusutan korteks frontal, penyusutan *hippocampus* dan kehilangan sel serebelar (Guo *et al.*, 2022).

Efek etanol prasinaps ialah pelepasan neuromodulator yang merupakan mediator peningkatan fusi vesikel, yang mengeksperikan sejumlah neuropeptida seperti faktor pelepas kortikotropin. Neuropeptida ini mengimplikasi afersi stimulus dan emosi. Dengan demikian, keadaan ini dapat menyebabkan kecanduan terhadap alkohol yang dikonsumsi (Abrahao *et al.*, 2017).

Walter & Crews (2017) menunjukkan *Binge drinking* dapat mengubah ekspresi gen mikroglia (Iba1 dan CD68). *Binge drinking* ini meningkatkan ekspresi gen neuroimun (misalnya, TNF α , Ccl2, IL-1ra, IL-4) yang dimulai pada dosis tinggi. Sel BV2 menunjukkan perubahan bifasik dalam ekspresi gen pro-inflamasi (misalnya, TNF α , Ccl2) setelah pemberian etanol (Walter & Crews, 2017).

Edema otak dapat terjadi pada *binge drinking*, dikarenakan induksi dari kanal air aquaporin-4 (AQP4). AQP4 dapat ditemukan pada glia dan ekspresi dari AQP4 berbanding lurus dengan peningkatan oksigen reaktif dan faktor pro inflamasi (Yang *et al.*, 2014).

Pada paparan etanol empat hari dosis 5g/kgBB pada tikus terjadi peningkatan imunoreaktivitas OX-42 sebagai penanda aktivasi

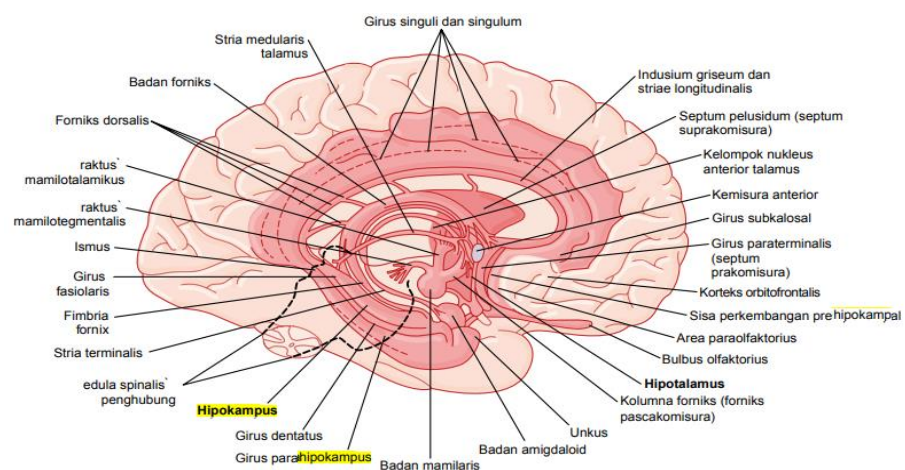
mikroglia, namun tidak sepenuhnya aktif karena mikroglia imunoreaktif OX-6 dan ED-1 tidak ada. Selain itu, neurodegenerasi di daerah kortiko limbik ditemukan (Marshall *et al.*, 2013).

Marshall *et al.* (2013) melakukan pemeriksaan untuk mengecek kerusakan pada sawar darah otak yang dimana lapisan pelindung otak yang sangat selektif. Hasil pemeriksaan analisis kualitatif imunoreaktivitas IgG antara Bregma -2.30mm dan -4.50mm menunjukkan bahwa tidak adanya IgG positif yang menandakan tidak terjadi gangguan pada sawar darah otak pada model *binge drinking* (Marshall *et al.*, 2013).

2.2. Hippocampus

2.2.1. Anatomi dan Fisiologi

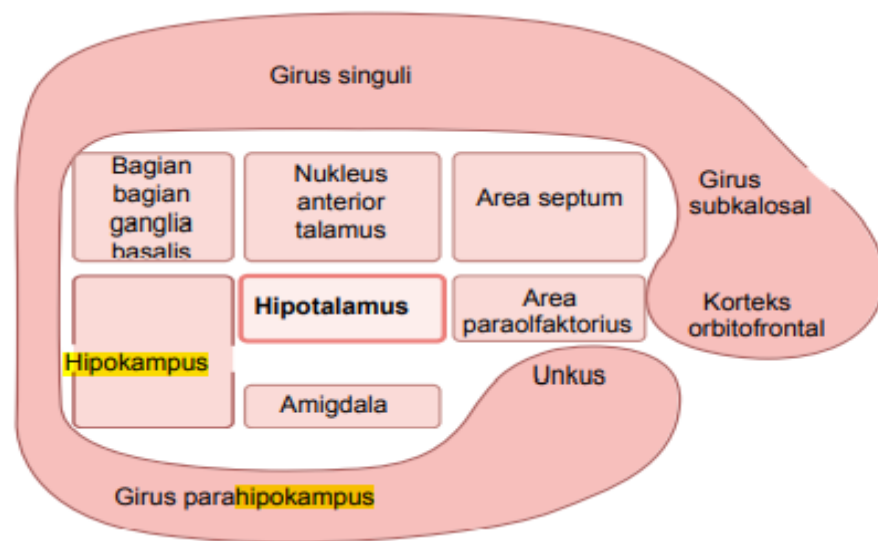
Hippocampus merupakan bagian korteks serebri yang memanjang, melipat ke dalam untuk membentuk lebih banyak bagian dalam ventrikel lateralis. Salah satu ujung *hippocampus* berbatasan dengan nuklei amigdaloid, serta sepanjang perbatasan lateralnya bersatu dengan *parahippocampus gyrus*, yang merupakan korteks serebri pada permukaan luar ventromedial lobus temporalis (Hall, 2014).



Sumber: Hall, 2014

Gambar 5. Anatomi Hippocampus

Hippocampus mempunyai hubungan tidak langsung, dengan sebagian besar korteks serebri seperti halnya dengan struktur-struktur basalis sistem limbik (amigdala, hipotalamus septum, dan korpus mamilaria). Hampir setiap jenis rangsangan sensorik menyebabkan aktivasi di beberapa bagian *hippocampus*, kemudian sinyal-sinyal menyebar keluar menuju talamus anterior, hipotalamus, dan bagian lain sistem limbik, terutama forniks, yaitu jaras penghubung utama. Oleh karena itu, *hippocampus* merupakan saluran tambahan yang dilewati oleh sinyal sensorik yang masuk untuk memulai reaksi perilaku dengan tujuan yang berbeda. Seperti halnya pada struktur-struktur limbik lain, perangsangan pada berbagai area dalam *hippocampus* hampir selalu dapat menyebabkan salah satu dari berbagai pola perilaku, misalnya kepuasan, rasa marah, ketidakpedulian, atau dorongan seks yang berlebihan (Hall, 2014).



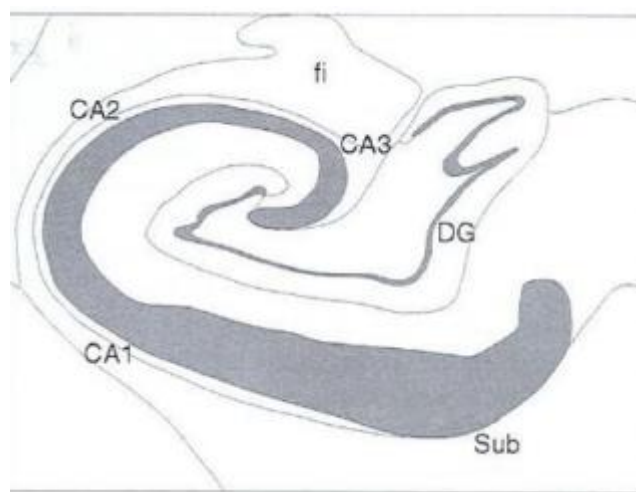
Sumber: Hall, 2014

Gambar 6. Sistem Limbik

2.2.2. Histologi

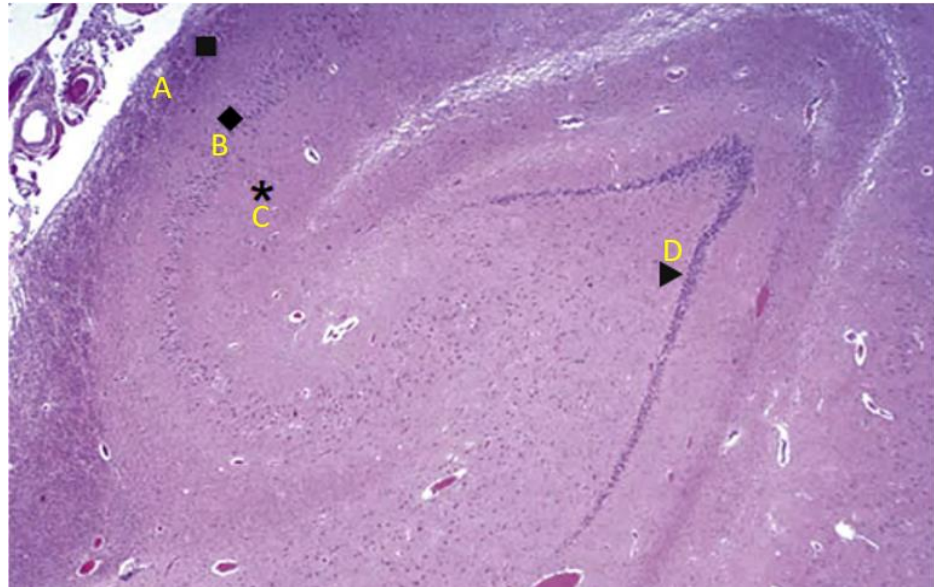
Hippocampus terdiri dari 2 lapisan, yaitu *hippocampus* yang sebenarnya dan girus dentatus. Secara histologi, *hippocampus* dibagi menjadi 4 area berbeda: Corpus Ammonis (CA)1, CA2, CA3 dan CA4. Area-area ini dibagi berdasarkan komposisi dan bentuk dari badan sel saraf yang terletak di dalamnya. CA3 mempunyai sel piramidal yang besar. Bagian

proksimal CA3 menempati banyak regio yang tertutupi cabang dari girus dentatus. Bagian distal dari CA3 terlihat lebih padat dan gelap daripada bagian proksimal bila diwarnai dengan Nissl. CA2 dapat dibedakan dari CA3 dari lebih sedikitnya masukan dari serabut mossy. CA1 memiliki sel piramidal yang lebih kecil dan lebih bulat pada lapisan sel utamanya, yang secara substansinya lebih tebal tetapi lebih tidak padat dibandingkan CA2 dan CA3. Pelebaran dari sel piramidal di sel CA1 menandai perbatasan oleh CA2 dan CA1 (Fernando, 2016).



Sumber: Fernando, 2016
Gambar 7. Area Hippocampus

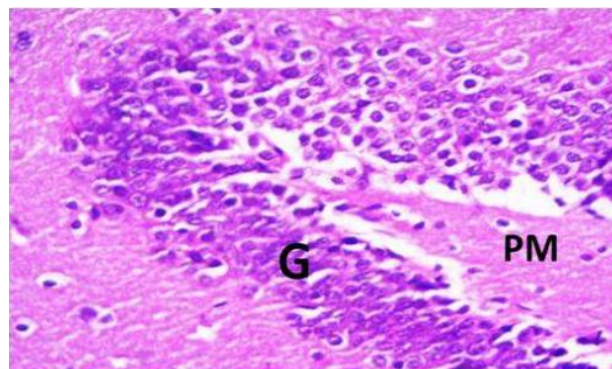
Struktur *hippocampus* memiliki 3 lapisan yaitu : 1) lapisan polimorfik yang berhubungan dengan asosiasi-asosiasi di dalam girus dentatus; 2) lapisan granular yang merupakan kumpulan dari neuron-neuron berbentuk oval atau bulat dan merupakan tempat asal mossy fibers yang berakhir pada dendrit dari sel piramidal *hippocampus*; 3) lapisan molekuler yang merupakan daerah terminasi perforant pathway (Jamilah, 2015).



Sumber: Klatt, 2015

Gambar 8. Gambaran Histologi Hippocampus. A) Lapisan Polimorfik, B) Lapisan Neuron Piramidalis, C) Lapisan Molekular, D) lapisan Sel Granula Pada Girus Dentatus

Terdapat perbedaan letak hipokampus pada manusia dan tikus. Pada tikus, hipokampus terletak lebih superior, tepatnya terletak di atas thalamus dan nucleus lentiformis. Hipokampus pada tikus berbentuk seperti pisang. Meski terdapat perbedaan struktur, secara fungsional hipokampus manusia dan tikus memiliki cara kerja dan fungsi yang sama (Fernando, 2016).



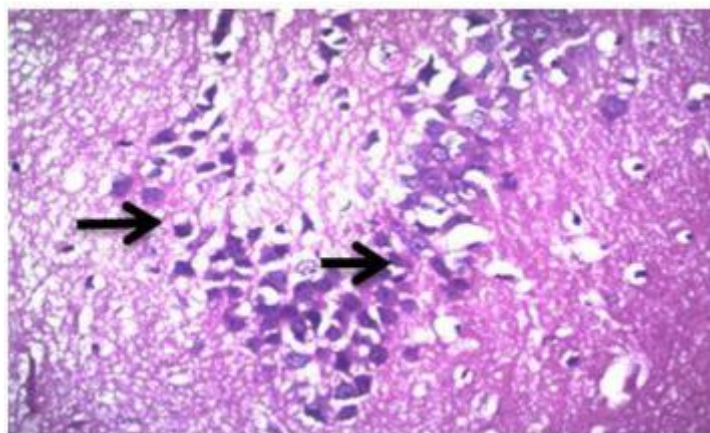
Sumber: Hazzaa *et al.*, 2020

Gambar 9. Gambaran Histologi *Hippocampus* Perbesaran Empat Ratus Kali

2.2.3. Histopatologi

Neurodegenerasi *hippocampus* merupakan salah satu manifestasi klinis dari intoksikasi akut alkohol. *Hippocampus* berisiko tinggi terjadi

neurodegenerasi karena kebutuhan metabolisme yang tinggi, dan juga merupakan satu-satunya bagian yang menghasilkan glutamine (Hazzaa *et al.*, 2020). Sebagai bagian dari otak, *hippocampus* juga terbentuk dari sel-sel saraf / neuron yang merupakan sel utama pada otak. *Hippocampus* sebagian besar terdiri dari neuron yang berbentuk piramid yang disebut dengan sel piramidal. Sifat dari neuron adalah tidak pernah membelah, semua sel berstatus post mitotik, dan jumlahnya tidak bertambah yang berarti neuron tidak dapat memperbaiki dirinya / mengalami regenerasi jika terjadi kerusakan. Pada proses neurodegenerasi, neuron akan mengalami gangguan akut yang menunjukkan pembengkakan neuron akibat dari pembengkakan struktur mikro di dalamnya seperti mitokondria, aparat golgi, diikuti struktur seluler lainnya. Pembengkakan yang berlebihan ini dapat menyebabkan lisis sel yang kemudian menjadi neurodegenerasi. Neurodegenerasi akan tampak pada pemeriksaan mikroskop dengan inti yang piknotik dan sitoplasma berwarna lebih eosinofilik pada sel piramidal (Yang *et al.*, 2014).



Sumber: Hazzaa *et al.*, 2020

Gambar 10. Gambaran Histpatologi *Hippocampus*

2.3.Mekanisme Kerusakan *Hippocampus* Oleh Alkohol

Pada saat alkohol dikonsumsi, etanol yang berada di hepar akan disalurkan ke darah kemudian dialirkan ke otak. Etanol akan mempotensiasi Ligand Gate Ion Channels (LGICs) seperti reseptor *Gamma Aminobutyric Acid* (GABA) dan reseptor glisin tetapi menghambat reseptor glutamat ionotropik pada

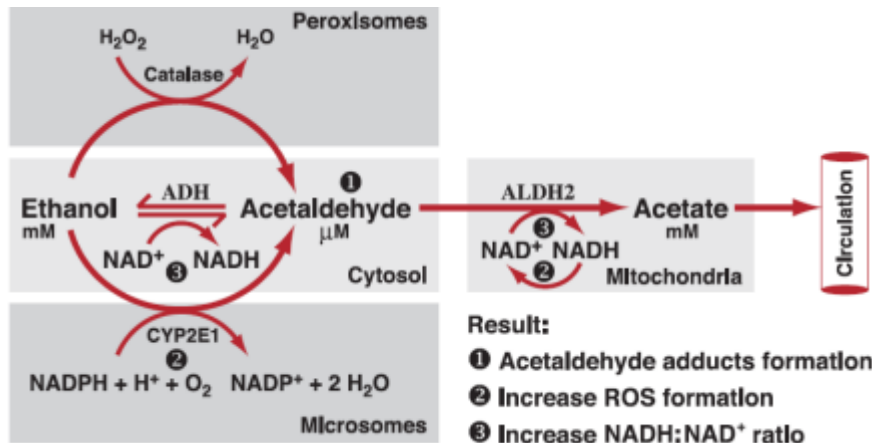
hippocampus. Etanol dapat berinteraksi dengan obat mimetik GABA karena bekerja pada reseptor GABA_A yang berarti dapat menjadi obat penenang. (Abrahao *et al.*, 2017).

Etanol akut dapat meningkatkan transmisi GABAergik pada sinapsis di beberapa daerah otak, efek ini melibatkan potensiasi prasinaptik. Etanol mempotensiasi efek ini pada kadar konsentrasi intoksikasi. Selain itu, peningkatan neuron dopamin dapat terjadi pada konsumsi secara akut (Abrahao *et al.*, 2017).

Etanol mempengaruhi pada faktor transkripsi, seperti *cAMP responsive element binding* (CREB) protein yang berfungsi pada kelangsungan hidup neuron serta melindungi dari eksitoksisitas dan *nuclear factor* κ B (NF- κ B) yang berfungsi pada respon inflamasi dan imun. Etanol mengaktivasi NF- κ B dan menurunkan aktivasi CREB sehingga membuat kondisi proinflamasi (Crews & Nixon, 2009).

Walter & Crews (2017) menunjukkan *Binge drinking* dapat mengubah ekspresi gen mikroglia (Iba1 dan CD68). *Binge drinking* ini meningkatkan ekspresi gen neuroimun (misalnya, TNF α , Ccl2, IL-1ra, IL-4) yang dimulai pada dosis tinggi. Sel BV2 menunjukkan perubahan bifasik dalam ekspresi gen pro-inflamasi (misalnya, TNF α , Ccl2) pada *hippocampus* setelah pemberian etanol dosis tinggi (Walter & Crews, 2017).

Dosis etanol yang tinggi menyebabkan peningkatan dari metabolisme etanol yang berada di otak menjadi sumber utama untuk pembentukan ATP, sehingga pada saat metabolisme melalui tiga jalur metabolisme alkohol dapat meningkatkan stress oksidatif (Wilson & Matschinsky, 2020).



Sumber: Zakhari, 2006

Gambar 11. Metabolisme Alkohol

Pada metabolisme alkohol tampak pada jalur alkohol dehidrogenase memakai kofaktor NAD^+ untuk membentuk $NADH$. Kelebihan produksi $NADH$ berkontribusi pada gangguan metabolisme pada alkoholisme kronis, dan merupakan penyebab dari asidosis laktat maupun hipoglikemia pada keracunan alkohol akut. Pada jalur MEOS menghasilkan produk sampingan berupa toksin, radikal bebas, dan H_2O_2 . Pada metabolisme *acetaldehyde* untuk diubah ke asetat yang menggunakan katalisator *Aldehyde Dehydrogenase 2 Family Member* (ALDH2) menggunakan kofaktor NAD^+ menghasilkan produk sampingan berupa radikal bebas. Kombinasi $NADH$ yang meningkat dan asetil KoA yang lebih tinggi mendukung sintesis asam lemak serta penyimpanan dan akumulasi triasilgliserida. Jumlah badan keton dalam tubuh yang meningkat kemudian memperparah kondisi asidosis laktat pada tubuh. Selain itu, metabolisme etanol melalui jalur CYP2E1 menyebabkan peningkatan $NADP^+$. Hal ini membatasi ketersediaan $NADPH$ untuk regenerasi antioksidan *glutathione* (GSH) yang tereduksi sehingga meningkatkan stres oksidatif (Tritama, 2015).

Radikal bebas dapat menyebabkan neurodegeneratif dengan berikatan dengan O_2 di dalam tubuh membentuk peroksil (peroksi radikal), peroksil mengabsorpsi atom hidrogen dari molekul lipid tak jenuh, sehingga terjadi reaksi berkepanjangan yang menghasilkan peroksida-peroksida yang lain yaitu peroksinitrit. Peroksinitrit ini bersifat lipofilik yang menyebabkan peroksida

lipid dalam membran dan mitokondria, kemudian melepaskan ribosa dan retikulum endoplasmik, sehingga pemasokan energi yang diperlukan untuk memelihara fungsi dan struktur retikulum endoplasmik terlambat dan sintesis protein menurun sekali sehingga sel kehilangan daya untuk mengeluarkan trigliserida dan terjadilah kerusakan sel neuron yang menyebabkan nekrosis sel neuron (Astari, 2021).

2.4.Bawang Hitam

Bawang hitam (black garlic) merupakan bawang putih segar (*Allium sativum* L.) yang telah dipanaskan dalam beberapa waktu dengan suhu tinggi pada kadar kelembapan yang tinggi (Kimura *et al.*, 2017). Bawang hitam merupakan salah satu suplemen herbal yang saat ini banyak dikembangkan sebagai antioksidan. Bawang hitam diolah dari bawang putih mentah yang dipanaskan pada suhu 70-80°C. Proses ini memakan waktu 1-3 bulan dengan cara dimasukkan ke mangkok stainless steel dan dibungkus alumunium foil. Proses pemanasan ini menginduksi banyak reaksi kimia pada bawang putih, seperti browning enzimatis dan reaksi Maillard yang menyebabkan warnanya berubah dari putih dan kuning menjadi coklat gelap (Kang, 2016).

Perubahan kandungan senyawa aktif pada bawang hitam antara lain *S-allylcysteine* (SAC), vitamin, asam fenolik, dan senyawa flavanoid terjadi pada saat proses pemanasan terjadi. Pada proses pemanasan senyawa antioksidan alicin diubah menjadi komponen bioaktif lebih stabil yaitu *S-allylcysteine* (SAC). Jumlah SAC yang termasuk pada senyawa sulfur bawang hitam sebanyak lima sampai tujuh kali lebih tinggi dari pada bawang putih (Yudhayanti *et al.*, 2020). Bawang hitam memiliki kandungan tinggi pada polisakarida, protein, senyawa fenolik dan senyawa sulfur. Akibat proses pemanasan polifenol meningkat enam kali lipat dibandingkan dengan kandungan polifenol yang ada di bawang putih, serta adanya peningkatan secara signifikan dalam jumlah flavonoid (Lu *et al.*, 2017).

Flavonoid memiliki peran untuk menangkap radikal bebas, seperti anion superoksida, radikal peroksil, hidroksil, serta radikal alkohoksil yang efektif. Flavonoid juga memiliki kemampuan untuk berikatan dengan ion logam, seperti besi dan tembaga yang dapat mengkatalisis produksi radikal bebas dan juga mengkatalisis peroksidasi lipid. Flavonoid memiliki kemampuan memodulasi jalur sinyal sel yang dapat mengatur berbagai proses sel, misalnya pada pertumbuhan, proliferasi, dan apoptosis. Mekanisme lain yang berperan di dalam aktivitas antioksidan flavonoid adalah inhibisi enzim-enzim oksidan atau produksi radikal bebas oleh sel, regenerasi α -tokoferol dari radikal α -tokoferoksil, dan dapat mengurangi peroksidasi lemak dan nitrit (Astari, 2021).

Dimas (2022) dengan menggunakan bawang hitam terhadap tikus putih yang diberi minyak jelantah. Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat efek proteksi terhadap ginjal tikus yang dipaparkan dengan minyak jelantah dengan dosis paling efektif yaitu 800mg/kgBB (Dimas, 2022). Astari (2021) menggunakan bawang hitam pada hepar tikus yang diinduksi minyak jelantah didapatkan hasil bahwa bawang hitam memiliki efek hepatoprotektif dengan dosis paling efektif ialah 800mg/kgBB (Astari, 2021).

2.5. Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian ini terdiri dari etiologi kerusakan sel piramidal oleh alkohol dengan model *binge drinking* dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas dan NADP^+ . Hal tersebut dapat memicu inflamasi melalui beberapa mekanisme.

Etanol mengaktivasi dari stres oksidatif dengan mengaktivasi *nuclear factor* κB (NF- κB) sehingga meningkatkan sitokin proinflamasi (Mattson & Camandola, 2001). Kaskade proinflamasi termasuk peningkatan induksi enzim stres oksidatif yang digerakkan oleh NF- κB sebagai faktor kunci dalam kerusakan otak akibat alkohol. NADPH oksidase adalah enzim multimer yang terdiri dari beberapa subunit yang dalam enzim aktif mengkatalisis transfer satu elektron dari NADPH ke oksigen, sehingga menimbulkan superoksida. Dengan

demikian, etanol mempromosikan lingkungan proinflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi proinflamasi (Crews & Nixon, 2009).

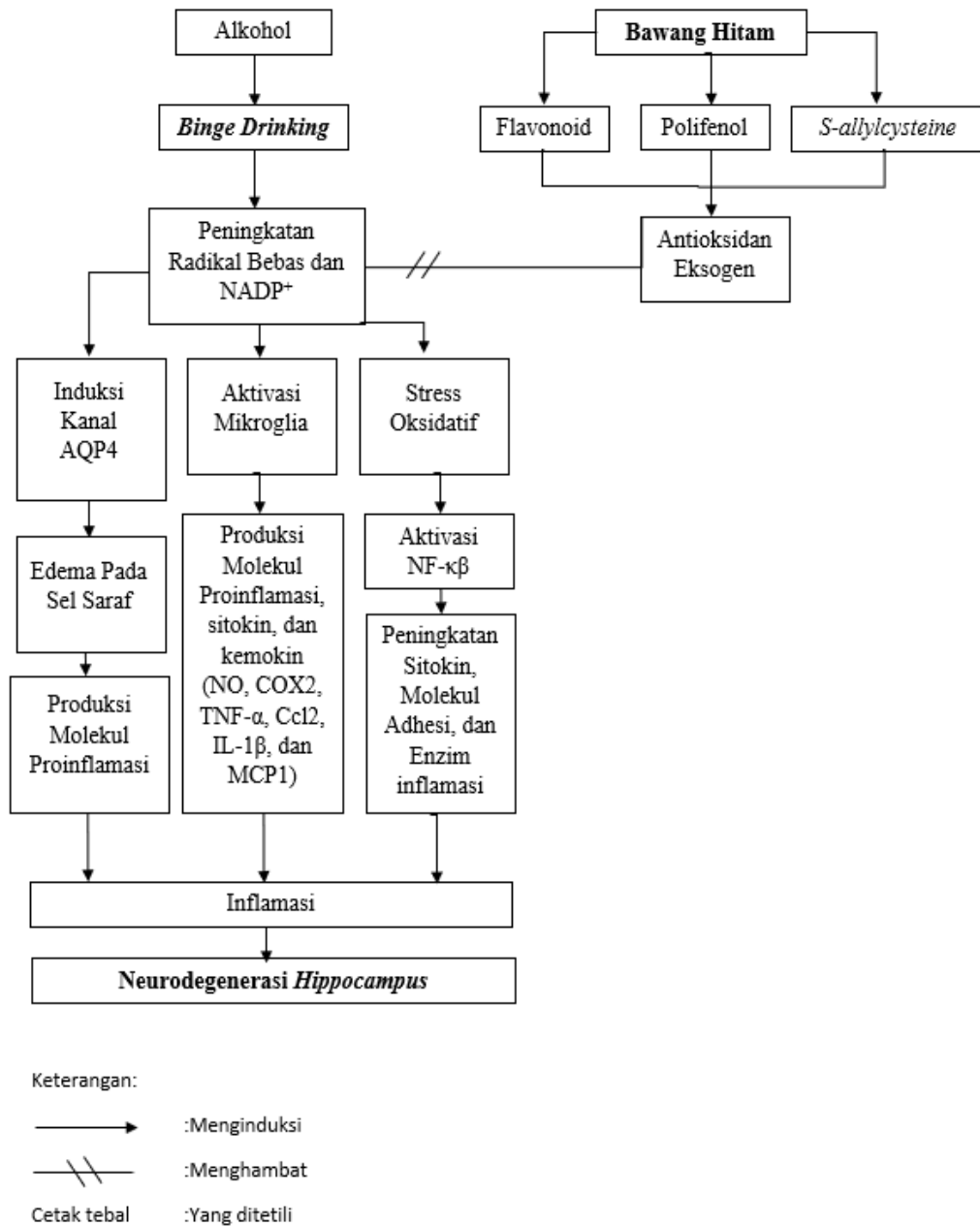
Binge drinking etanol menyebabkan induksi dari kanal air *aquaporin-4* (AQP4). AQP4 dapat ditemukan pada glia dan ekspresi dari AQP4 berbanding lurus dengan peningkatan oksigen reaktif dan faktor pro inflamasi sehingga memicu inflamasi yang menimbulkan kerusakan pada *hippocampus* (Yang *et al.*, 2014).

Binge drinking dapat mengubah ekspresi gen mikroglia dan meningkatkan ekspresi gen neuroimun (TNF α , Ccl2) yang dimulai pada dosis tinggi sehingga memicu terjadinya inflamasi yang dapat menyebabkan neurodegenerasi *hippocampus* (Walter & Crews, 2017).

Perubahan kandungan senyawa aktif pada bawang hitam antara lain *S-allylcysteine* (SAC), vitamin, asam fenolik, dan senyawa flavanoid terjadi pada saat proses pemanasan terjadi. Jumlah SAC yang termasuk pada senyawa sulfur bawang hitam sebanyak lima sampai tujuh kali lebih tinggi dari pada bawang putih (Iskandar *et al.*, 2018). Bawang hitam memiliki kandungan tinggi pada polisakarida, protein, senyawa fenolik dan senyawa sulfur. Akibat proses pemanasan polifenol meningkat enam kali lipat dibandingkan dengan kandungan polifenol yang ada di bawang putih, serta adanya peningkatan secara signifikan dalam jumlah flavonoid (Lu *et al.*, 2017).

Flavonoid memiliki peran untuk menangkap radikal bebas, seperti anion superoksida, radikal peroksil, hidroksil, serta radikal alkohoksil yang efektif. Flavonoid juga memiliki kemampuan untuk berikatan dengan ion logam, seperti besi dan tembaga yang dapat mengkatalisis produksi radikal bebas dan juga mengkatalisis peroksidasi lipid. Mekanisme lain yang berperan di dalam aktivitas antioksidan flavonoid adalah inhibisi enzim-enzim oksidan atau produksi radikal bebas oleh sel, regenerasi α -tokoferol dari radikal α -

tokoferoksil, dan dapat mengurangi peroksidasi lemak dan nitrit oksida (Astari, 2021).

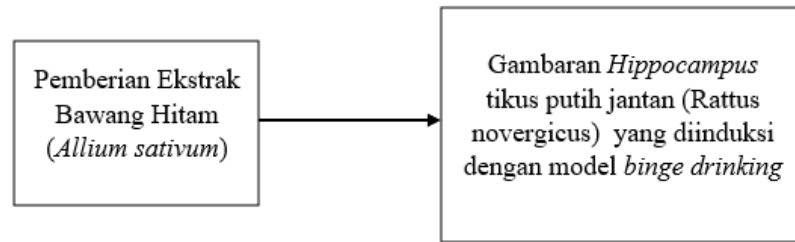


Gambar 12. Kerangka Teori

2.6. Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah Bawang hitam, sedangkan variabel terikatnya

adalah Gambaran *Hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi dengan model *binge drinking*.



Gambar 13. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

Hipotesis yang dirumuskan dalam penelitian ini adalah:

H0 = Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam terhadap gambaran histopatologis *hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

H1= Terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam terhadap gambaran histopatologis *hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan desain *true experimental* dengan pola penelitian *post-test control only group design*. Pengambilan data diambil setelah perlakuan yang diberikan sudah berakhir untuk mengukur pengaruh perlakuan pada eksperimen. Penelitian dilakukan dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimental dan kontrol.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2022 dan dilakukan di beberapa tempat, yaitu sebagai berikut:

- a. *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang digunakan sebagai tempat pemeliharaan hewan coba dari masa adaptasi hingga mendapat perlakuan.
- b. Laboratorium Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang digunakan sebagai tempat pembedahan tikus dan pengambilan organ *hippocampus*.
- c. Laboratorium Patologi Anatomi yang digunakan sebagai tempat analisis dan pembacaan preparat histologi organ *hippocampus*.

3.3. Subjek Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur Sprague-Dawley berusia sekitar 8-12 minggu, dengan berat badan 175-250 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus Center (PTC) Sumatera Selatan.

3.3.2. Sampel Penelitian

Jumlah sampel yang akan digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus *Frederer*.

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

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

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

$$n-1 \geq 7,5$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \geq 9 \text{ (pembulatan)}$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok

Pada penghitungan tersebut didapatkan sampel pada percobaan ini sebesar 9 ekor tiap kelompok. Untuk mencegah *dropout* jumlah sampel 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 penelitian ini terdapat 3 kelompok. Jadi jumlah total sampel ialah 30 ekor tikus dan sampel akan 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 intragastrik menggunakan sonde lambung.
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 dengan dosis awal 5 g/kgBB dan untuk dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol. Alkohol akan diberikan per 8 jam selama 4 hari secara intragastrik menggunakan sonde lambung.
3. Kelompok perlakuan 1 (P), kelompok tikus putih jantan yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*. Alkohol dengan konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula diberikan dengan dosis awal 5 g/kgBB dan untuk dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol. Alkohol akan diberikan per 8 jam. Bawang hitam juga akan diberikan dengan dosis 800 mg/kgBB per hari selama 4 hari secara intragastrik menggunakan sonde lambung.

3.3.4. Kriteria Penelitian

1. Kriteria inklusi : Tikus putih galur Sprague-Dawley jenis kelamin jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan 175-250gram, sehat ditandai dengan rambut tidak kusam, rontok, atau botak, serta bergerak aktif.

2. Kriteria eksklusi : Terdapat kelainan anatomi, penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium dan atau mati selama masa pemberian perlakuan.

3.4. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian asupan bawang hitam (*Allium sativum*) dengan dosis 800 mg/kgBB.

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran histopatologis *hippocampus* tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

3.5. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dari penelitian ini bertujuan untuk memberikan keterangan yang tepat terhadap variabel-variabel yang ada di dalam penelitian. Oleh karena itu, definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Bawang Hitam (<i>Allium sativum</i>)	Bawang hitam merupakan bawang putih yang proses dengan cara dipanaskan pada suhu 70-80°C (Kang, 2016).	Gelas Ukur	Pemberian bawang hitam ke tikus putih jantan Sprague-Dawley dengan dosis 800mg/kgBB (Astari, 2021; Dimas, 2022).	Ordinal
Histopatologi <i>Hippocampus</i> Tikus Putih galur Sprague-Dawley	Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Hematoxilin Eosin. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada lima lapang pandang (Theodorus, <i>et al.</i> , 2019).	Mikroskop Cahaya	Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami neurodegenerasi (Jamilah, 2015). Neurodegenerasi akan tampak pada pemeriksaan mikroskop dengan inti yang piknotik dan sitoplasma berwarna lebih eosinofilik pada sel piramidal (Yang <i>et al.</i> , 2014).	Numerik
Alkohol model <i>binge drinking</i>	Model <i>binge drinking</i> selama empat hari yang dapat mensimulasikan alkoholisme yang diinduksi <i>binge drinking</i> jangka pendek dapat melihat kerusakan dari sistem saraf pusat (Marshall <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2014).	Gelas Ukur	Tikus diberikan etanol (25% m/v) dalam susu formula dosis awal 5g/kgBB dengan dosis berikutnya dititrasi berdasarkan skala perilaku intoksikasi Majchrowicz (Yang <i>et al.</i> , 2014).	Ordinal

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari:

- Kandang hewan
- Tempat pakan hewan
- Tempat minum hewan
- Timbangan untuk mengukur berat badan tikus (dalam satuan gram)
- Penutup kandang dari anyaman kawat
- Sarung tangan
- Spuir 3 ml dan 1ml
- Pipet tetes
- Pipet mikro
- Tabung reaksi
- Gelas ukur

- l. Pipet ukur
- m. Sonde lambung
- n. Alat pemeriksaan mikroskopis: mikroskop cahaya, gelas objek, cairan emersi
- o. Alat untuk pembuatan preparat histologi: *tissue cassette*, kertas tisu, oven, kapas, spritus, *rotary microtome*, *disposable knife*, inkubator, kaca objek.

3.6.2. Bahan Penelitian

- 1. Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur Sprague-Dawley.
- 2. Bahan perlakuan :
 - a. Ekstrak bawang hitam (*Allium sativum*)
 - b. Air minum tikus
 - c. Pakan tikus
 - d. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur Sprague-Dawley
 - e. Etanol 96%
 - f. Susu formula
- 3. Bahan tindakan terminasi :
 - a. Ketamine 0,2 ml
 - b. Xylazine 0,02 ml
- 4. Bahan pembuatan preparat histologi :
 - a. Larutan formalin 10%
 - b. Alkohol 70%
 - c. Alkohol 96%
 - d. Alkohol absolut
 - e. Etanol
 - f. Xylol

- g. Pewarna Hematoksisilin Eosin (H&E)
- h. Entelan.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Aklimatisasi Hewan Uji

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 akan ditempatkan secara acak ke dalam 3 kandang sesuai jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian ini.

3.7.2. Pemilihan dan Penentuan Larutan Susu Formula

1. Pemilihan Larutan Susu Formula

Morris *et al.* (2010) menggunakan larutan susu formula sebagai diet isokalorik dengan nutrisi yang komplit. Larutan ini dapat mempertahankan intoksikasi kadar etanol darah dan memberikan nutrisi dengan baik sehingga tikus dalam keadaan sehat dan juga tidak mati pada saat tikus diberi intervensi (Morris *et al.*, 2010).



Sumber: Morris *et al.*, 2010

Gambar 14. Susu formula

2. Penentuan Dosis Larutan Susu Formula

Pada penelitian ini larutan susu formula dibuat dengan mencampurkan 2 sendok takar (~17,9g) dengan air sebanyak 65 ml. Pemberian pada larutan susu formula diberikan dengan jumlah rata-rata pada kelompok perlakuan (Morris *et al.*, 2010).

3.7.3. Pemilihan dan Penentuan Dosis Etanol

1. Pemilihan Etanol

Etanol yang digunakan pada penelitian ini ialah etanol 25% m/v dengan dosis 5g/kgBB yang dipaparkan selama 4 hari dengan interval waktu pemberian setiap 8 jam. Marshall *et al.* (2013) membuktikan paparan etanol dosis 5g/kgBB dapat menyebabkan neurodegeneratif pada daerah kortikolimbik (Marshall *et al.*, 2013).

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

2. Penentuan Dosis

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

kemudian dosis dititrasi berdasarkan dengan skala perilaku intoksikasi Majchrowicz (Morris *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

Tabel 2. Skala Perilaku Intoksikasi Majchrowicz

Skor Intoksikasi	Indikasi	Dosis (g/kgBB)
0	Normal	5
1	Hipoaktif, ataksia ringan	4
2	Ataksia, elevasi abdomen	3
3	Penurunan refleks membalikkan badan, ataksia tanpa elevasi abdominal	2
4	Kehilangan refleks membalikkan badan, terdapat refleks kedipan mata	1
5	Kehilangan refleks membalikkan badan, kehilangan refleks kedipan mata	0

Berdasarkan tabel 2, maka pemberian dosis akan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Jumlah larutan yang diperlukan untuk setiap skor intoksikasi, yaitu:

a. Dosis awal/skor intoksikasi 0,

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

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

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

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

b. Skor intoksikasi 1,

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

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

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

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

c. Skor intoksikasi 2,

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

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

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

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

d. Skor intoksikasi 3,

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

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

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

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

e. Skor intoksikasi 4,

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

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

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

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

f. Skor intoksikasi 5 tidak akan diberikan larutan alkohol. Skor intoksikasi 5 akan diberikan susu formula dan dextrose dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan.

3.7.4. Pemilihan Bawang Hitam dan Penentuan Dosis

1. Pemilihan bawang hitam

Bawang hitam yang digunakan penelitian ini ialah bawang hitam cair dengan sediaan 33ml yang diperoleh dari Serambi Botani Intitut Pertanian Bogor dengan kandungan ekstrak bawang hitam 50% dan air 50% (Astari, 2021; Dimas, 2022). Pada sediaan ekstrak bawang

hitam mengandung 50% ekstrak bawang hitam dan 50% air, maka dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

$$50\% = \frac{massa (g \text{ bawang hitam})}{33} \times 100\%$$

$$massa (g \text{ bawang hitam}) = \frac{33}{100\%} \times 50\%$$

$$massa (g \text{ bawang hitam}) = 16,5 \text{ g}$$

Pada sediaan mengandung ekstrak bawang hitam sebesar 16,5 gram.



Sumber: Astari, 2021
Gambar 15. Bawang Hitam Cair

2. Penentuan dosis

Dosis yang digunakan peneliti ialah 800mg/kgBB, alasannya ialah pada penelitian sebelumnya dosis 800mg/kgBB didapati efek protektif pada organ hepar dan ginjal yang paling efektif (Astari, 2021; Dimas, 2022). Pada sediaan ekstrak bawang hitam mengandung 50% ekstrak bawang hitam dan 50% air, maka dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

$$50\% = \frac{0,8}{\text{volume (ml larutan)}} \times 100\%$$

$$\text{volume (ml larutan)} = \frac{0,8}{50\%} \times 100\%$$

$$\text{volume (ml larutan)} = 1,6 \text{ ml}$$

Setelah dilakukan perhitungan, didapati hasil 1,6ml/kgBB.

3.7.5. Prosedur Pemberian Intervensi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 30 ekor, dikelompokkan dalam 3 kelompok. Kelompok 1 (K1), sebagai kontrol negatif hanya diberi diet isokalorik susu formula dan dextrose dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan. Kelompok 2 (K2), sebagai kontrol positif, diberikan etanol 25% m/v dengan dosis 5g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol. Kelompok 3, sebagai kelompok perlakuan (P), diberikan etanol 25% m/v dengan dosis 5g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol bersamaan dengan pemberian bawang hitam (*Allium sativum*) dengan dosis 800mg/kgBB.

3.7.6. Prosedur Terminasi

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 akan dilakukan pembedaan dan pengambilan *hippocampus* tikus yang akan dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk dibuat preparat histologi.

3.7.7. Prosedur Pembuatan Preparat

1. Fixation

- a. Spesimen berupa potongan organ *hippocampus* 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 *hippocampus* tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3. Dehidrasi

Keringkan *tissue cassette* dengan diletakkan pada kertas tisu.

Dehidrasi dengan:

- a. Alkohol 70% selama 0,5 jam
- b. Alkohol 96% selama 0,5 jam
- c. Alkohol 96% selama 0,5 jam
- d. Alkohol 96% selama 0,5 jam
- e. Alkohol absolut selama 1 jam
- f. Alkohol absolut selama 1 jam
- g. Alkohol absolut selama 1 jam
- h. Alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam

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 masukkan paraffin ke dalam cangkir logam 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 *hippocampus* 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-Hematoksilin 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.

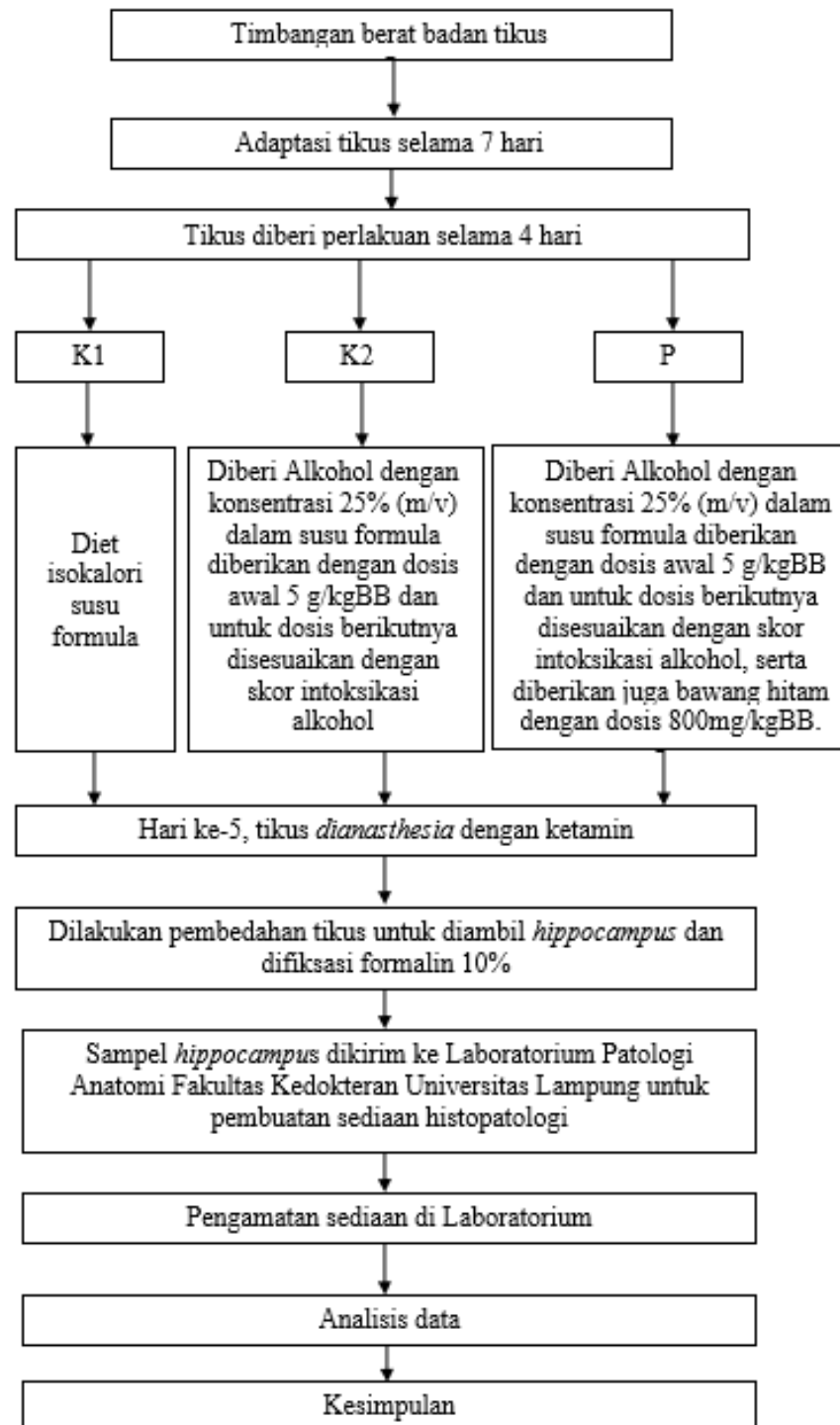
9. *Mounting*

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 dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali dan dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi.

3.8. Alur Penelitian



Gambar 16. Alur Penelitian

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley, Berusia 8-12 minggu diberikan waktu adaptasi selama 7 hari dengan diberikan pakan standar biasa, kemudian ditimbang ulang setelah masa inkubasi selesai, memastikan berat 175-250 gram. Tikus dibagi dalam 3 kelompok yaitu Kelompok kontrol negatif (K1) diberikan diet isokalorik susu formula dan dextrose dengan dosis yang sama dengan rata-rata dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan; Kelompok kontrol positif (K2) diberikan alkohol konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula dengan dosis awal 5 g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol; Kelompok perlakuan (P) diberi alkohol konsentrasi 25% (m/v) dalam susu formula dengan dosis awal 5 g/kgBB dan dosis berikutnya disesuaikan dengan skor intoksikasi alkohol, serta diberikan juga bawang hitam dengan dosis 800 mg/kgBB. Selama 4 hari perlakuan diberikan pada setiap kelompok. Pada hari ke-5 dilakukan pembedahan untuk diambil organ *hippocampus* kemudian difiksasi dengan formalin 10%. Organ *hippocampus* dikirim ke laboratorium patologi anatomi fakultas kedokteran universitas lampung untuk dilakukan pengamatan. Setelah dilakukan pengamatan, melakukan analisis data dengan menggunakan perangkat lunak pengolah statistik, dan menarik kesimpulan.

3.9. Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pengamatan preparat histologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik dengan menggunakan program *Statistical Package for the Social Science* (SPSS). Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dikarenakan penelitian ini memiliki besar sampel < 50 . Data yang didapatkan juga dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Data didapatkan berdistribusi normal dan homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way ANOVA*. H_0 dinyatakan ditolak apabila nilai $p > 0,05$ yang menandakan tidak adanya perbedaan antar kelompok. Jika nilai $p < 0,05$ maka H_0 dinyatakan gagal ditolak yang menandakan terdapat perbedaan antar kelompok dan uji lanjut *Post-Hoc LSD* perlu dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan.

3.10. Etika Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 4310/UN.26.18/PP.05.02.00/2022. Penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R data protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.

1. *Replacement*, prinsip yang digunakan adalah *replacement* relatif, yaitu tetap memanfaatkan hewan coba sebagai donor organ. Dibutuhkan hewan uji coba tikus sebagai sampel penelitian untuk menguji efektivitas efek protektif asupan bawang hitam (*Allium sativum*) pada kerusakan *hippocampus* yang di induksi alkohol model *binge drinking*.
2. *Reduction*, telah dilakukan pertimbangan dan perhitungan sampel untuk menggunakan hewan coba seminimal mungkin agar mendapatkan hasil perbandingan yang signifikan antar kelompok percobaan. Pada penelitian ini menggunakan 30 sampel.
3. *Refinement*, metode yang digunakan penelitian ini seminimal mungkin menimbulkan rasa tidak nyaman pada hewan coba.

Dalam penelitian ini hewan coba akan diperlakukan dengan baik dan dihindari dari stres dengan tetap mengikuti 5 prinsip kebebasan hewan coba, yaitu:

- a. *Freedom from hungry and thirsty*: bebaskan hewan coba dengan memperhatikan makanan dan minuman untuk hewan coba selama penelitian berlangsung.
- b. *Freedom from discomfort*: pada penelitian ini, hewan coba akan diletakkan pada lingkungan yang bersih dan memadai serta diberikan kandang khusus sebagai tempat tinggal.
- c. *Freedom from pain, injury, and disease*: penelitian ini akan menggunakan prosedur yang paling kecil menghasilkan nyeri pada hewan coba. Selain

itu, pada akhir penelitian, hewan coba akan diberikan anesthesia terlebih dahulu sebelum dilakukan terminasi.

- d. *Freedom from fear and distress*: pada penelitian ini, hewan coba akan diperlakukan sebaik mungkin serta adaptasi lingkungan sebelum melakukan penelitian agar terhindar dari rasa takut dan stress berkepanjangan.
- e. *Freedom to express natural behavior*: hewan coba diberikan kebebasan untuk tetap berekspresi seperti bermain dan berlari (tetap di dalam kandang) selama penelitian berlangsung

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dituntaskan kesimpulan penelitian ini ialah:

1. Terdapat pengaruh induksi alkohol dengan model *binge drinking* terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*)
2. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang hitam dosis 800mg/kgBB terhadap gambaran histopatologi *hippocampus* pada area CA2-3 tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.

5.2. Saran

Adapun saran untuk penelitian berikutnya adalah:

1. Pada peneliti selanjutnya dapat mengembangkan organ lain yang berpengaruh pada pemberian ekstrak bawang hitam (*Allium sativum*) pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi alkohol dengan model *binge drinking*.
2. Pada peneliti selanjutnya diharapkan dapat melakukan analisis fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak bawang hitam (*Allium sativum*).
3. Pada peneliti selanjutnya diharapkan dapat melakukan uji aktivitas antioksidan supaya dapat membedakan secara spesifik antioksidan pada

ekstrak bawang hitam (*Allium sativum*) yang paling berpengaruh terhadap induksi alkohol dengan model *binge drinking*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. 2017. Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits hhs. *Neuron*.96(6):1223–38.
- Astari PDS. 2021. Pengaruh asupan black garlic terhadap gambaran hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur sprague-dawley yang diinduksi minyak jelantah [skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung: Bandar Lampung.
- Bison S & Crews F. 2003. Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. 27(7):1173-83.
- Crews F & Nixon K. 2009. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. 44(2):115–27.
- Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, & Zou J. 2006. BHT block NF- κ B activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. 30(11):1938-49.
- Dayono B, Fajar H, Ilmiawan MI. 2015. Histologi sel piramidal hipokampus tikus putih pasca penghentian pajanan monosodium glutamat peroral. *Jurnal Vokasi Kesehatan*. 1(4):124–30.
- Dimas. 2022. Hubungan asupan black garlic terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus putih (*rattus norvegicus*) galur sprague-dawley yang diinduksi minyak jelantah [skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung: Bandar Lampung.
- Fernando. 2016. Pengaruh pemberian ranitidine terhadap histopatologi hipokampus tikus wistar dengan intoksikasi metanol akut [skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro: Semarang.
- Guo X, Yan T, Chen M, Ma X, Li R, Li B, *et al*. 2022. Differential effects of alcohol-drinking patterns on the structure and function of the brain and cognitive performance in young adult drinkers: A pilot study. *Brain and Behavior*. 12(1):1-14.

- Hall JE. 2014. Guyton and hall textbook of medical physiology. Edisi 12. Saunders Elsevier: Philadelphia.
- Hazzaa SM., Abdelaziz SAM, Eldaim MAA, Abdel-Daim MM, Elgarawany GE. 2020. Neuroprotective potential of allium sativum against monosodium glutamate-induced excitotoxicity: Impact on short-term memory, gliosis, and oxidative stress. *Nutrients*.12(4):1-17.
- Iskandar Y, Halimah E, Rumaseuw ES. 2018. Review: pemberian ekstrak bawang putih (*allium sativum*l) pada proses pemanasan terhadap penurunan kadar ldl dan hdl pada tikus putih jantan galur winstar. *Jurnal Kesehatan*.9(1):70–76.
- Jamilah U. 2015. Pengaruh infusa daun murbei (*Morus alba l.*) Terhadap gambaran histologi hipokampus tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus kronis yang diinduksi aloksan [skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim: Malang.
- Kadir MBA, Yuniarto PF, Kasimo ER. 2021. Pengaruh fraksi bawang dayak (*Eleutherine americana* (L) Merr) terhadap memori spasial mencit jantan galur BalB/C yang diinduksi alkohol 10%. *Journal of Current Pharmaceutical Sciences*. 4(2):308:13.
- Kang OJ. 2016. Physicochemical characteristics of black garlic after different thermal processing steps. *Preventive Nutrition and Food Science*. 21(4):348–54.
- Kimura S, Tung YC, Pan MH, Su NW, Lai Y J, Cheng KC. 2017. Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25(1):62–70.
- Klatt EC. 2015. Robbins and cotran atlas of pathology. Edisi 3. Elsevier Saunders: Philadelphia.
- Lu X, Li N, Qiao X, Qiu Z, Liu P. 2017. Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25(2): 340–9.
- 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. *Neurobiology of Disease*. 54(1):239–51.
- Mattson MP & Camandola S. 2001. NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Clinical Investigation*. 107(3):247-54.
- 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.
- Pambelo, A. S. (2021). Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap kadar glukosa darah dan gambaran histopatologi ginjal

- pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin. Jurnal Medika Utama. 3(1):1728–33.
- Riskesdas. 2019. Laporan provinsi lampung riskesdas 2018. Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Litbang Kesehatan.
- Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. Antioxidants. IntechOpen:1-28.
- Theodorus E, Muhartono, Putri GT. 2019. Pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia 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.
- Walter TJ, Crews FT. 2017. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. Journal of Neuroinflammation. 14(1):1-19.
- White AM, Tapert S, Shukla SD. 2018. Binge Drinking: Predictors, Patterns, and Consequences. 39(1):1-3.
- WHO. 2014. Global status report on alcohol and health 2014. World Health Organization (WHO).
- WHO. 2018. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization (WHO).
- Widyanti EM, Moehadi BI. 2016. Proses pembuatan etanol dari gula menggunakan *saccharomyces cerevisiae* amobil. Metana. 12(2):31–8.
- Wilson DF, Matschinsky FM. 2020. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. Medical Hypotheses. 140:1-11.
- Yang JY, Xue X, Tian H, Wang XX, Dong YX, Wang F, *et al.* 2014. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. Pharmacology and Therapeutics. 144(3):321–337.
- Yudhayanti PE, Permana IDGM, Nocianitri KA. 2020. Stability of black garlic extract on various ph and temperature. Media Ilmiah Teknologi Pangan. 7(1):17–26.
- Zakhari S. 2006. Overview: How is alcohol metabolized by the body?. Alcohol, Research and Health. 29(4):245-54.
- Zuhri MA, Dona F. 2021. Penggunaan alkohol untuk kepentingan medis tinjauan istihsan. Journal of Law, Society, and Islamic Civilization. 9(1):40–9.

Zahr NM, Pohl KM, Saranathan M, Sullivan EV, Pfefferbaum A. 2019. Hippocampal subfield CA2+3 exhibits accelerated aging in Alcohol Use Disorder: A preliminary study. *Neuroimage Clin.* 22(1):1-8.