

TESIS

**AKTIVITAS VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) SEBAGAI
ANTIOKSIDAN PADA HISTOPATOLOGI DAN KADAR
MALONDIALDEHYDE (MDA) HATI MENCIT
GALUR BALB/C YANG DIPAPAR
2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN
(TCDD)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh :

AJENG ERIKA PRIHASTUTI HASKITO
NIM 061142004

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**AKTIVITAS VITAMIN E (*α*-*TOCOPHEROL*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN
PADA HISTOPATOLOGI DAN KADAR *MALONDIALDEHYDE* (MDA)
HATI MENCIT GALUR BALB/C YANG DIPAPAR
2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN
(TCDD)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

AJENG ERIKA PRIHASTUTI HASKITO

NIM 061142004

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2013

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**Aktivitas Vitamin E (*α -tocopherol*) Sebagai Antioksidan Pada Histopatologi
Dan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Hati Mencit Galur Balb/c
Yang Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 19 Agustus 2013



Ajeng Erika Prihastuti Haskito

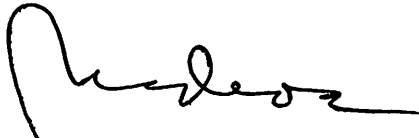
NIM 061142004

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 19 Agustus 2013

Oleh:

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, Drh., M.S.
NIP. 19541213197901002

Pembimbing



Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.
NIP. 195908081987011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., M.P.
NIP. 196208281989032001

Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 01 Agustus 2013

PANITIA PENGUJI HASIL PENELITIAN TESIS

Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, Drh., M.Si.

Anggota : 1. Prof. Sri Agus Sudjarwo, Drh., Ph.D.
2. Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, Drh.
3. Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, Drh., M.S.
4. Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.

Surabaya, 19 Agustus 2013

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D.

NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Aktivitas Vitamin E (*α-tocopherol*) Sebagai Antioksidan Terhadap Gambaran Histopatologi Dan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Hati Mencit Jantan Yang Dipapar *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D., dan Ketua Program Studi S2 IPKMV Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., M.P., atas kesempatan mengikuti pendidikan di Program Studi S2 IPKMV Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, Drh., M.S., selaku pembimbing pertama dan Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes., selaku pembimbing serta, atas saran dan bimbingannya.

Dr. Iwan Sahrial Hamid, Drh., M.Si., Prof. Sri Agus Sudjarwo, Drh., Ph.D., dan Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, Drh., selaku penguji.

Seluruh Staf pengajar S2 IPKMV Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Magister.

Ibunda Ambar Sulistyorini, M.M., S.H., yang telah memberikan bantuan materiil dan doa, dorongan serta semangat.

Teman-teman penelitian Drh. Waode Karmila Wati, Drh. Rosida Achlis, Nuril Lisa Rmania, Adiarsa Nur Akbar dan Lailia Wardani yang telah memberikan segala bentuk bantuan sehingga membantu kelancaran penulis selama melaksanakan penelitian.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.

Surabaya, Agustus 2013

Penulis

RINGKASAN

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan salah satu senyawa toksik yang berasal dari produk samping proses pembakaran bahan kimia yang mengandung organoklorin, produk samping pembuatan plastik *Polyvinyl Chloride* (PVC) serta pembakaran sampah terutama sampah plastik PVC tersebut. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) merupakan golongan *polychlorodibenzo-p-dioxin* (PCDD) yang memiliki taraf toksisitas paling tinggi. Efek toksisitas TCDD pada manusia dapat menyebabkan gangguan sistem saraf, sistem reproduksi, sistem endokrin, menurunkan imun tubuh., menyebabkan *chloracne*, gangguan organ tubuh seperti ginjal dan hati, menyebabkan anemia dan berpengaruh terhadap kejadian stres oksidasi.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin kini semakin luas mencemari lingkungan. Karena sifat TCDD dapat bertahan dalam waktu yang lama di alam dan terakumulasi dalam jaringan lemak, yang sulit diurai secara biologis maupun kimiawi, sehingga keberadaan TCDD dapat terus-menerus menumpuk untuk waktu yang lama. Keberadaan TCDD yang bersifat akumulatif tersebut, yang menyebabkan gejala klinis akibat efek toksisitas TCDD baru timbul setelah beberapa tahun.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kemampuan vitamin E (*α-tocopherol*), yang diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan, dalam memproteksi kerusakan yang terjadi pada tubuh akibat paparan TCDD. Terutama pada hati karena hati merupakan organ yang rentan mengalami kerusakan akibat paparan senyawa-senyawa toksik. Hal tersebut terjadi karena hati merupakan organ pertama setelah saluran pencernaan yang terpapar oleh senyawa-senyawa yang bersifat toksik. Vitamin E (*α-tocopherol*) merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan secara fisiologis berperan penting dalam tubuh, terutama sebagai penangkal radikal bebas, sehingga mampu melindungi tubuh dari kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut.

Penelitian ini menggunakan tiga puluh ekor mencit jantan galur Balb/c yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Kelompok Kontrol (-) tanpa diberi TCDD dan hanya diberi pelarut minyak jagung sebanyak 0,1 ml/hari/ekor, sebagai kontrol negatif. Kelompok Perlakuan 0 diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor dan diberi pelarut minyak jagung sebanyak 0,1 ml/hari/ekor. Kelompok Perlakuan 1 diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 11 mg/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor. Kelompok Perlakuan 2 diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor. Kelompok Perlakuan 3 diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 37 mg/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor. Pemberian TCDD dan vitamin E (*α-tocopherol*) dilakukan selama tiga puluh lima hari. Pada akhir perlakuan penelitian mencit dikorbankan kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil organ hati, dilanjutkan pembuatan preparat histopatologi dan pemeriksaan kadar MDA.

Hasil penelitian menunjukkan vitamin E (*α-tocopherol*) dapat memproteksi sel hati mencit dari kerusakan dan dapat menurunkan kadar MDA hati mencit akibat paparan TCDD. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan gambaran histopatologi hati mencit yang lebih baik pada kelompok Perlakuan 1, 2 dan 3 apabila dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 0. Pada perlakuan 0 banyak dijumpai sel-sel hepatosit yang mengalami nekrosis. Selain itu, juga dijumpai sel-sel hepatosit yang mengalami degenerasi melemak, degenerasi hidropik serta infiltrasi sel radang yang didominasi oleh sel-sel limfosit di ruang sinusoid, daerah porta dan daerah vena sentralis. Pada perlakuan 1, 2 dan 3 jarang dijumpai sel-sel hepatosit yang mengalami nekrosis walaupun masih terdapat sel-sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik. Selain itu, juga ditunjukkan dari infiltrasi sel radang yang semakin jarang dijumpai di ruang sinusoid, daerah porta dan daerah vena sentralis. Rata-rata kadar MDA hati

mencit pada kelompok Perlakuan 1, 2 dan 3 lebih rendah apabila dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 0. Hal tersebut menunjukkan ada mekanisme proteksi vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap pengaruh dari radikal bebas yang ditimbulkan oleh paparan TCDD.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka disarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui aktivitas vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas yang ditimbulkan oleh paparan TCDD pada organ atau sistem organ lain.

SUMMARY

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is one of the toxic compounds derived from products of combustion processes containing organochlorine chemicals, products of the manufacture of *Polyvinyl Chloride* (PVC) plastic. The TCDD is a class of *polychlorodibenzo-p-dioxin* (PCDD) which has the highest level of toxicity. TCDD toxicity effects in humans can causing nervous system disorders, reproductive system, endocrine system, immune lowered, causing *chloracne*, organ disorders such as kidney and liver, causing anemia and affect the incidence of oxidative stress.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin polluted the environment is increasingly widespread. Because of TCDD can survive for a long time in nature and accumulate in the fatty tissue, which is difficult to disentangle biologically and chemically, so the presence of TCDD can continuously accumulate for a long time. The existence of cumulative TCDD, which causes clinical symptoms due to the effects of TCDD toxicity emerging after a few years.

This study aims to demonstrate the ability of vitamin E (*α -tocopherol*), which is known well to have potential as an antioxidant, to protecting the damage to the body caused by exposure to TCDD. Mainly is the liver, because the liver is the organ which is prone to damage from exposure to toxic substances. This things happens because the liver is the first organ in the intestinal tract which is exposed the toxicly compounds. Vitamin E (*α -tocopherol*) is a fat-soluble vitamin and is an important physiological role in the body, especially as anti oxidant, so it can be protect the body from damage caused by free radicals.

This study uses 30 male mices strain Balb/c were divided into five treatment groups. Group Control (-) without any solvent TCDD and only given 0,1 ml corn oil/day/head, as a negative control. Group 0, were given TCDD at a dose of 100 ng/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head and given corn oil solvent as much as 0,1 ml/day/head. Group 1 was given TCDD at a dose of 100 ng/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head and given vitamin E (*α -tocopherol*) at a

dose of 11 mg/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/ head. Group 2 was given TCDD at a dose of 100 ng/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head and given vitamin E (*α-tocopherol*) at a dose of 20 mg/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head. Group 3 was given TCDD at a dose of 100 ng/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head and given vitamin E (*α-tocopherol*) at a dose of 37 mg/kg body weight/day/head as much as 0,1 ml/day/head. Provision of TCDD and vitamin E (*α-tocopherol*) is done for thirty-five days. At the end of the study treatment mice were killed and then performed necroption to take out the liver, and continued making preparations histopathological examination and analyzed *Malondialdehyde* (MDA).

Results showed vitamin E (*α-tocopherol*) may protect liver cells from damage and can reduce levels of MDA murine liver caused by exposure to TCDD. This is indicated by histopathological changes in the livers of mice which is the picture better than in treatment Groups 1, 2 and 3 when compared with the treatment Group 0. In the treatment of Group 0, found many cells necrosis of hepatocytes. It also found that hepatocyte cells has a swelling degeneration, hydropic degeneration and inflammatory cell infiltrate dominated by lymphocytes in the sinusoids, portal area and central vein area. On Group 1, 2 and 3 are found rare cells which are necrosis of hepatocytes, although there are still cells hepatocytes undergo hydropic degeneration. In addition, it is also evident from the infiltration of inflammatory cells were rarely found in the sinusoidal spaces, areas and regions central venous port. The average levels of MDA in mice liver treatment Groups 1, 2 and 3 is lower when compared with the treatment Group 0. It shows protective mechanisms of vitamin E (*α-tocopherol*) as an antioxidant against the side effects caused by exposure to TCDD.

Based on these results it is recommended that further research needs to be done to determine the activity of vitamin E (*α-tocopherol*) as an antioxidant against caused by exposure to TCDD on other organs or organ systems.

ABSTRACT

The aim of this research was to observe the activity of vitamin E (*α-tocopherol*), which is well known to have potential as an antioxidant, to protect the damage of the body post exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). A total of thirty male Balb/c mice of 10 weeks old were used in this research. The mice were divided into five groups: (1) as a negative control group was given corn oil, (2) Group 0 was given TCDD with dose 100 ng/kg body weight/day/head and corn oil, (3) Group 1 was given TCDD with dose 100 ng/kg body weight/day/head and vitamin E (*α-tocopherol*) with dose 11 mg/kg body weight/day/head., (4) Group 2 was given TCDD with dose 100 ng/kg body weight/day/head and given vitamin E (*α-tocopherol*) with dose 20 mg/kg body weight/day/head, (5) Group 3 was given TCDD with dose 100 ng/kg body weight/day/head and given vitamin E (*α-tocopherol*) with dose 37 mg/kg body weight/day/head. Provision of TCDD and vitamin E (*α-tocopherol*) is done for thirty-five days with per-oral. After thirty-five days of treatment, the liver sample were collected for histopathological examination and *Malondialdehyde* (MDA) analyzed. Experimental method was based on completely randomized design. The histopathological were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test to know the differences of the treatments, while the MDA data were analyzed by ANOVA test followed by Duncan test. The result of the research showed that the vitamin E (*α-tocopherol*) could protect the mice liver from damage post exposure to TCDD.

Key words: TCDD, vitamin E, liver, histopathological, MDA

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN.....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tentang TCDD.....	7
2.1.1 Sifat Fisika dan Kimia TCDD	7
2.1.2 Pembentukan TCDD	9
2.1.3 Siklus Pemasukan TCDD ke Dalam Tubuh	10
2.1.4 Toksisitas TCDD.....	12
2.1.5 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi TCDD	14
2.1.6 <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)</i> dan Stres Oksidasi	15
2.2 Tinjauan Tentang Sitokrom P450	17
2.3 Tinjauan Tentang Hati.....	19
2.4 Tinjauan Tentang Radikal Bebas	22
2.4.1 Definisi Radikal Bebas.....	22
2.4.2 Mekanisme Terbentuk Radikal Bebas.....	23
2.4.3 Akibat Radikal Bebas	26
2.5 Tinjauan Tentang Peroksidasi Lipid	28
2.6 Tinjauan Tentang MDA	29

2.7 Tinjauan Tentang Pengukuran Kadar MDA	30
2.8 Tinjauan Tentang Antioksidan	32
2.9 Tinjauan Tentang Vitamin E	34
2.10 Tinjauan Tentang Mencit (<i>Mus Musculus</i>)	37
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konseptual	41
3.2 Hipotesis.....	44
BAB 4 MATERI DAN METODE	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	45
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan teknik Pengambilan Sampel	46
4.2.1 Sampel Penelitian.....	46
4.2.2 Besar Sampel.....	46
4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel	47
4.3 Variabel Penelitian	47
4.3.1 Klasifikasi Variabel.....	47
4.3.2 Definisi Operasional Variabel.....	48
4.4 Bahan Penelitian.....	50
4.5 Instrumen Penelitian.....	50
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	51
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	52
4.7.1 Perhitungan Dosis TCDD.....	52
4.7.2 Perhitungan Dosis Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	52
4.7.3 Pembuatan Larutan Uji.....	54
4.7.4 Tahapan Perlakuan	55
4.7.5 Pengambilan Organ Hati Mencit.....	55
4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Hati Mencit.....	55
4.7.7 Pemeriksaan Preparat Histopatologi Hati Mencit	56
4.7.8 Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit	58
4.7.9 Penilaian Kadar MDA Hati Mencit.....	58
4.8 Bagan Kerangka Operasional.....	59
4.9 Cara Pengolahan dan Analisis Data	60
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Data Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit.....	61
5.2 Data Kadar MDA Hati Mencit	75
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit	77
6.2 Kadar MDA Hati Mencit.....	81

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan.....	85
7.2 Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN.....	93

DAFTAR TABEL

2.1 Data biologi mencit	39
4.1 Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit	57
5.1 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian	61
5.2 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Degenerasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian	63
5.3 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Inflamasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian	64
5.4 Modus Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis, Degenerasi dan Inflamasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian.....	73
5.4 Mean dan Standar Deviasi Kadar MDA Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian	75

DAFTAR GAMBAR

2.1 Struktur kimia TCDD.....	8
2.2 Reseptor AhR didalam sitoplasma sel.....	11
2.3 Bagan mekanisme terjadi radikal bebas di dalam tubuh.....	23
2.4 Struktur kimia <i>tocopherol</i>	34
2.5 Mencit galur Balb/c.....	37
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	41
5.1 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (nekrosis) hati mencit.....	62
5.2 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (degenerasi) hati mencit	63
5.3 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (inflamasi) hati mencit	65
5.4 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Kontrol (-) dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	66
5.5 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	67
5.6 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	68
5.7 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 1 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	69
5.8 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 2 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	70
5.9 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 3 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali	71

5.10 Gambaran mikroskopis hati mencit dengan bentuk lesi inflamasi pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 1000 kali	72
5.11 Diagram batang modus perubahan gambaran histopatologi hati mencit	73
5.12 Diagram batang mean kadar MDA hati mencit	76

DAFTAR LAMPIRAN

1. Rekam Data Berat Badan Selama Perlakuan Penelitian	93
2. Pembuatan Sediaan TCDD.....	94
3. Pembuatan Sediaan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>)	100
4. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Hati Mencit.....	106
5. Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit.....	112
6. Skor Pemeriksaan Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit	113
7. Hasil Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit.....	114
8. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis.....	115
9. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Degenerasi) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis.....	121
10. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Inflamasi) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis.....	123
11. Perhitungan Statistik Data Pengukuran Kadar MDA Hati Mencit Dengan Uji ANOVA	129
12. Sertifikat Etik Penelitian	132
13. Surat Keterangan Sehat Mencit Yang Digunakan Dalam Perlakuan Penelitian	133

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

TCDD	=	<i>tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i>
MDA	=	<i>Malondialdehyde</i>
AhR	=	<i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>
ARNT	=	<i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
DRE	=	<i>Dioxin-Responsive enhancer Elements</i>
PUFA	=	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
DNA	=	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
TBARs	=	<i>Thiobarbituric Acid-Reactive substances</i>
TBA	=	<i>Thiobarbituric Acid</i>
HPLC	=	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CYP1A1	=	<i>Cytochrome P450 1A1 (Sitokrom P450 1A1)</i>
CYP1B1	=	<i>Cytochrome P450 1B1 (Sitokrom P450 1B1)</i>
CYP	=	<i>Cytochrome</i>
SOD	=	<i>Superoksida Dismutase</i>
CAT	=	<i>Catalase</i>
GSH-PX	=	<i>Glutathione Peroxidase</i>
GR	=	<i>Glutathione Reductase</i>
POPs	=	<i>Persistent Organic Pollutants</i>
PCDD	=	<i>polychlorinateddibenzo-p-dioxin</i>
PCDF	=	<i>polychlorinateddibenzofuran</i>
UNEP	=	<i>United Nation Environmental Programme</i>
EPA	=	<i>Environmental Protection Agency</i>
PVC	=	<i>Polyvinyl Chloride</i>
PCB	=	<i>Polychlorinated Biphenils</i>
UV	=	<i>Ultraviolet</i>
Hb	=	<i>Hemoglobin</i>
MCHC	=	<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
AST	=	<i>Aspartate Transaminase</i>
NADPH	=	<i>Nicotinamide Adenin Dinucleotida Phosphate</i>
LDL	=	<i>Low Density Lipoprotein</i>
VLDL	=	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
HDL	=	<i>High Density Lipoprotein</i>
α -TPP	=	<i>α-tocopherol transfer protein</i>
CGS	=	<i>Crude Ginseng Saponin</i>
OH•	=	<i>radikal hidroksil</i>
CO ₂ •	=	<i>radikal peroksil</i>
CO ₂ H•	=	<i>radikal lipid hidroperoksida</i>
C•	=	<i>radikal alkoksil</i>
H•	=	<i>radikal hidrogen</i>
-C-	=	<i>carbon-centered-radical</i>

SH	=	gugus sulfhidril
$^{\circ}\text{C}$	=	derajat Celcius
%	=	persen
<	=	kurang dari
α	=	alfa
β	=	beta
γ	=	gamma
δ	=	delta
kg	=	kilogram
mg	=	miligram
μg	=	mikrogram
ng	=	nanogram
ml	=	milliliter
μl	=	mikroliter
cm	=	sentimeter
cm^2	=	sentimeter kuadrat
m^3	=	meter kubik
nm	=	nanomol
lux	=	satuan kekuatan cahaya
N	=	normalitas
rpm	=	<i>round</i> per menit
IU	=	<i>International Unit</i>
BB	=	berat badan
WIB	=	Waktu Indonesia Barat
PT	=	Perseroan Terbatas
Ig	=	Imunoglobulin

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dioksin adalah nama umum untuk sekelompok senyawa pencemar penting yang termasuk ke dalam golongan senyawa pencemar organik yang sulit teruraikan (*Persistent Organic Pollutants*, POPs). Dioksin mencakup 210 macam senyawa, yakni 75 macam *polychlorinateddibenzo-p-dioxin* (PCDD) dan 135 macam *polychlorinateddibenzofuran* (PCDF). Badan dunia di bawah Perserikatan Bangsa-Bangsa (PBB), *United Nation Environmental Programme* (UNEP), sejak tahun 1997 giat mengkampanyekan masalah pencemaran dioksin agar menjadi perhatian global. Hal tersebut dilakukan mengingat sifat dioksin yang toksik, persisten, bioakumulatif dan tersebar luas di lingkungan sekitar (Hutahaeen, 2010).

Dioksin adalah senyawa toksik yang memiliki cakupan toksisitas sangat luas, antara lain pada sistem reproduksi, sistem imun, syaraf dan hati. Dioksin juga memiliki sifat karsinogenik dan teratogenik (Saragih, 2005). Jenis dioksin yang paling tinggi aktivitas toksisitas adalah *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) (Karami *et al.*, 2001). Oleh karena itu, TCDD menjadi jenis dioksin yang paling banyak diteliti dibandingkan dengan senyawa dioksin lain (Hutahaeen, 2010).

Efek toksisitas TCDD pada manusia dapat menyebabkan gangguan sistem saraf, sistem reproduksi, sistem endokrin dan menurunkan imun tubuh (Susanti *et al.*, 2001). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) dapat menyebabkan *chloracne* (gangguan kulit yang ditandai hiperkeratosis dan bercak-bercak hitam atau komedo),

gangguan ginjal, gangguan hati dan anemia. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) juga diketahui berpengaruh terhadap kejadian stres oksidasi. Namun, karena efek toksisitas TCDD bersifat akumulatif, maka baru timbul gejala klinis setelah beberapa tahun (Susanti, 2000; Susanti *et al.*, 2001; Susanti *et al.*, 2002).

Dampak pencemaran TCDD tidak hanya pada manusia dan hewan, tetapi juga pada lingkungan. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) dapat bertahan dalam waktu yang lama di alam (Hutahaean, 2010; Winarti dkk., 2005). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) yang berada dalam jaringan lemak sulit diurai secara biologis maupun kimiawi, sehingga keberadaan TCDD dapat menumpuk untuk waktu yang lama. Keberadaan TCDD yang bersifat akumulatif tersebut akan mengakibatkan efek toksik pada manusia dan dapat melalui beberapa jalur seperti tumbuhan, hewan dan lingkungan sekitar (Schecter *et al.*, 2005).

Hati adalah organ tubuh yang berperan penting dalam proses metabolisme dan detoksifikasi. Pemaparan oleh senyawa-senyawa toksik akan mempertinggi kerusakan hati. Hati potensial mengalami kerusakan karena merupakan organ pertama setelah saluran pencernaan yang terpapar oleh senyawa-senyawa yang bersifat toksik. Proses metabolisme oleh hati akan mendetoksifikasi senyawa-senyawa tersebut, akan tetapi proses tersebut juga dapat menghasilkan metabolit-metabolit yang bersifat lebih toksik daripada senyawa-senyawa induk (Adikwu *and* Nelson, 2012).

Pemberian TCDD dengan dosis 10 sampai 100 ng/kg berat badan/hari selama tiga belas minggu pada tikus *Sparague Dawley* betina dapat menyebabkan perubahan

pada organ hati antara lain degenerasi hepatoseluler, peradangan, nekrosis, terdapat vakuolisasi pada sitoplasma, perubahan bentuk lobuler (Hassoun *et al.*, 2000). Penelitian yang dilakukan Saragih (2005), menunjukkan efek yang ditimbulkan oleh pemberian TCDD *per-oral* dengan dosis 0,1 µg/kg berat badan selama dua puluh tujuh hari pada gambaran histopatologi hati berupa vakuolisasi hepatosit, peradangan dan peningkatan sel Kupffer dan nekrosis.

Pemberian TCDD juga dapat menyebabkan stres oksidasi (Kim *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan Hassoun *et al.*, (2000), menunjukkan hasil pada pemberian TCDD terjadi peningkatan produksi anion superoksida, lipid peroksidasi, putusny rantai *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), penurunan glutathion pada jaringan otak dan hati. Penelitian yang dilakukan Saragih (2005) juga menunjukkan hasil pada pemberian TCDD terjadi peningkatan kadar *Malondialdehyde* (MDA) plasma darah.

Secara umum ketika tubuh berada pada kondisi stres oksidasi, keberadaan radikal bebas dapat memicu berbagai reaksi biokimia yang mengakibatkan perubahan komponen seluler. Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dalam orbit (Suryohudoyo, 2007). Radikal bebas dapat merusak beberapa komponen seluler yang penting, yaitu lemak, protein dan DNA (Prasetyastuti dan Sunarti, 2008). Kerusakan pada lemak menyebabkan terjadi peroksidasi lipid membran sel yang dapat diikuti dengan kerusakan sampai kematian sel. Kerusakan pada protein dapat mengganggu sistem enzimatik dan kerusakan pada DNA menyebabkan terjadi mutasi gen (Hilscherova *et al.*, 2003; Nazrun *et al.*, 2011). Stres oksidasi yang ditimbulkan oleh radikal bebas

dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter berupa MDA. Apabila kadar MDA tinggi, maka dapat dipastikan sel mengalami stres oksidasi (Simanjuntak, 2007).

Tubuh pada dasarnya telah memiliki sistem antioksidan untuk menangkal radikal bebas, tetapi dalam kondisi stres oksidasi yang berat persediaan antioksidan tubuh tidak mencukupi, sehingga kerusakan komponen seluler tubuh masih dapat terjadi. Oleh sebab itu diperlukan tambahan antioksidan dari luar tubuh yang dapat terpenuhi melalui konsumsi bahan makanan yang mengandung antioksidan maupun konsumsi vitamin-vitamin antioksidan (Maslachah dkk., 2008; Simanjuntak, 2007)).

Manfaat konsumsi vitamin-vitamin antioksidan sebagai penangkal radikal bebas telah banyak diteliti dewasa ini, terutama vitamin E (*α -tocopherol*). Vitamin E (*α -tocopherol*) merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan secara fisiologis berperan penting dalam tubuh, terutama sebagai penangkal radikal bebas (Sediaoetomo, 2012). Vitamin E (*α -tocopherol*) merupakan baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tidak jenuh.ganda (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA), yang terdapat dalam fosfolipid dan glikolipid membran sel. Vitamin E (*α -tocopherol*) bekerja sebagai antioksidan pemutus rantai (*chain breaking*), mempunyai kemampuan memindahkan atom hidrogen ke radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$) (Kumalaningsih, 2006; Simanjuntak, 2007).

Melalui pertahanan terhadap kerusakan seluler, efek pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) bersifat *multiple* untuk kesehatan segala jenis sel atau jaringan. Namun demikian, tidak ada sesuatu kerusakan seluler yang secara khusus dapat disembuhkan

oleh vitamin E (*α -tocopherol*). Karena sifat *multiple* dari efek pemberian vitamin E (*α -tocopherol*), vitamin E (*α -tocopherol*) dipergunakan dalam banyak kondisi klinik sebagai pengobatan suportif, meskipun hasil yang ditimbulkan sangat variabel (Sediaoetama, 2012).

Dari latar belakang tersebut diharapkan vitamin E (*α -tocopherol*) dapat memberikan efek pendekatan untuk mencegah atau mengurangi toksisitas yang disebabkan oleh paparan TCDD. Namun, apabila vitamin E (*α -tocopherol*) tidak cukup memberikan proteksi pada tubuh terhadap radikal bebas yang terbentuk akibat paparan TCDD, maka diperlukan terapi antidot TCDD.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat memproteksi sel hati mencit dari kerusakan akibat paparan TCDD berdasarkan gambaran histopatologi?
2. Apakah pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat menurunkan kadar MDA hati mencit akibat paparan TCDD?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan kemampuan vitamin E (*α -tocopherol*) dalam memproteksi sel hati mencit dari kerusakan dan menurunkan kadar MDA hati mencit akibat paparan TCDD.

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

Vitamin E (*α -tocopherol*) yang banyak dijumpai hampir di berbagai jenis makanan serta seiring perkembangan jaman, kini vitamin E (*α -tocopherol*) telah dibuat sintetik sebagai suplemen makanan sehingga lebih mudah dikonsumsi. Dengan hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat umum mengenai potensi vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan potensial untuk mencegah pembentukan radikal bebas yang berlebihan, terutama oleh TCDD, sebagai salah satu senyawa kimia toksik yang kini semakin luas mencemari lingkungan. Serta masyarakat yang memiliki resiko tinggi terpapar TCDD, seperti pekerja-pekerja industri kimia, pestisida, kertas, plastik dan industri lain yang menggunakan senyawa klor.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

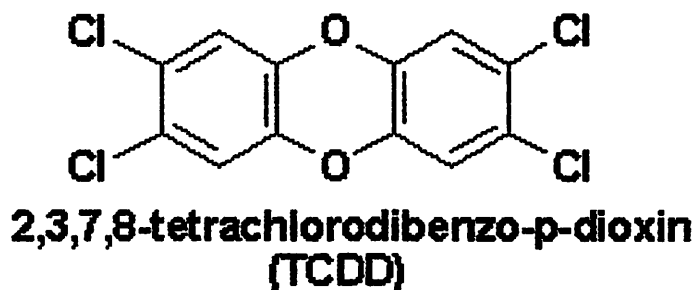
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang TCDD

2.1.1 Sifat Fisika dan Kimia TCDD

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan golongan *polychlorodibenzo-p-dioxin* (PCDD). *Polychlorodibenzo-p-dioxin* (PCDD) merupakan senyawa aromatik hidrokarbon terhalogenasi (*Halogenated Aromatic Hydrocarbon, HAH*). Golongan PCDD memiliki 75 jenis senyawa yang masing-masing senyawa tersebut memiliki taraf toksisitas yang berbeda-beda. Senyawa yang memiliki taraf toksisitas paling tinggi adalah TCDD (Warlina, 2008; Juniarti, 2005).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) adalah suatu padatan kristal tidak berwarna dan tidak berbau pada suhu ruang (Winarti dkk., 2005). Struktur TCDD kekurangan gugus reaktif sehingga menyebabkan senyawa TCDD memiliki kestabilan yang tinggi terhadap panas, asam dan basa. Titik lebur TCDD mencapai suhu 305°C dan suhu dekomposisi lebih dari 700°C (Juniarti, 2005). Dekomposisi terjadi dengan pelepasan klor secara cepat dari inti *dibenzo-p-dioxin* diganti dengan hidrogen, sehingga hanya bersisa *dibenzo-p-dioxin* yang rentan terhadap dekomposisi lebih lanjut (Susanti, 2000). Penghancuran sempurna TCDD terjadi pada suhu 1000 sampai 1500°C. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) dapat terbentuk pada suhu 200 sampai 1000°C. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) memiliki tekanan uap yang rendah, sehingga sulit terlepas dengan *volatilisasi* (Juniarti, 2005).



Gambar 2.1 Struktur kimia TCDD (Schechter *et al.*, 2005)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) lebih mudah larut dalam pelarut non polar daripada pelarut polar (Saragih, 2005). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) larut dalam *o*-diklorobenzen, kloroform, *n*-oktanol, metanol dan air dengan daya kelarutan berturut-turut sebesar 1,4 g/L; 0,37 g/L; 0,048 g/L; 0,01 g/L dan 2×10^{-7} g/L. Daya kelarutan TCDD dalam air sangat rendah (hidrofobik) sehingga TCDD yang berada dalam sistem perairan akan terikat pada bahan organik dan sedimen-sedimen dengan kekuatan yang berbeda (Susanti, 2000).

Sifat mudah larut dalam lemak (lipofilik) TCDD mengakibatkan TCDD terakumulasi dalam jaringan lemak dengan kadar yang tinggi dan dalam waktu yang lama. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) yang terdapat dalam jaringan lemak ikan dan ternak serta sekresi susu ternak, akan mengkontaminasi produk makanan dengan bahan baku ikan, daging dan susu tersebut. Waktu paruh TCDD dalam jaringan lemak manusia selama 7 sampai 8 tahun dan waktu paruh TCDD pada jaringan lemak ternak mencapai 16,5 minggu (Bintoro, 2009; Llobet *et al.*, 2003; Susanti, 2000).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) bersifat tidak reaktif, stabil dan tahan terhadap kerusakan secara alami untuk periode waktu yang lama. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) terikat kuat dengan kandungan bahan organik tanah dan waktu paruh dalam tanah berkisar 10 sampai 30 tahun (Juniarti, 2005). Sifat TCDD yang dapat terurai oleh radiasi sinar ultraviolet matahari, merupakan mekanisme alam utama yang dapat merusak TCDD. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) yang terlarut dalam metanol dapat terurai secara sempurna oleh sinar ultraviolet buatan (UV) dalam waktu 20 jam dan oleh sinar matahari dalam waktu 36 jam (Susanti, 2000).

2.1.2 Pembentukan TCDD

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) muncul sebagai produk samping proses pembakaran bahan kimia yang mengandung organoklorin, yaitu senyawa yang biasa digunakan sebagai pembasmi hama penyakit (Saragih, 2005). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) juga merupakan produk samping pembuatan plastik *Polyvinyl Chloride* (PVC) dan proses *Polychlorinated Biphenils* (PCB). Sesuai dengan ketentuan *Environmental Protection Agency* (EPA) pada tahun 1994, terdapat empat sumber utama TCDD, yaitu hasil pembakaran sampah, hasil samping proses produksi pestisida, hasil pembakaran pada proses produksi baja dan air buangan industri terutama industri kertas yang menggunakan klor sebagai pemutih (Schecter *et al.*, 2001; Schecter *et al.*, 2005; Winarti dkk, 2005).

Menurut Juniarti (2005) pembakaran sampah, baik sampah rumah tangga dan sampah medik dari rumah sakit diidentifikasi menjadi sumber terbesar TCDD. Pada pembakaran sampah rumah tangga saja dapat menghasilkan TCDD $0,1 \text{ ng/m}^3$ atau bahkan dapat 10 hingga 20 kali lebih besar. Selain itu, alam diketahui turut menyumbang terbentuk TCDD, melalui peristiwa kebakaran hutan dan aktifitas gunung berapi (Schechter *et al.*, 2001).

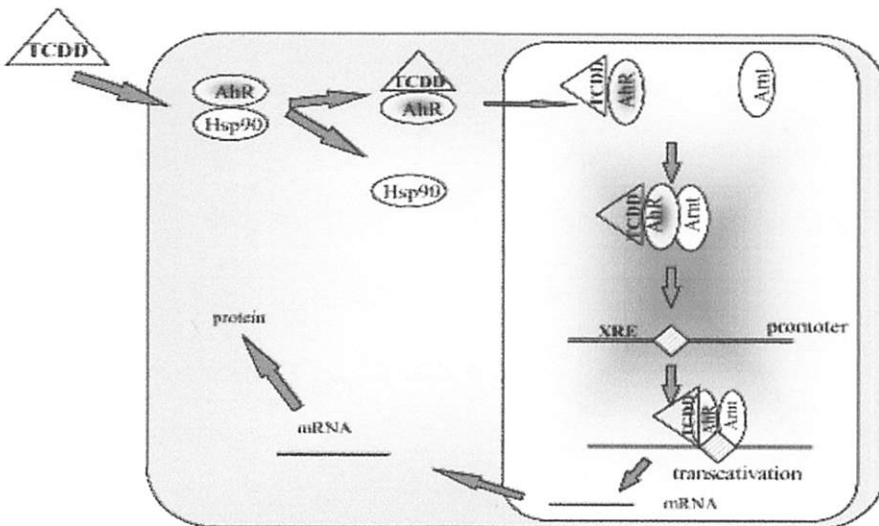
2.1.3 Siklus Pemasukan TCDD ke Dalam Tubuh

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) memasuki tubuh hewan maupun manusia melalui rantai makanan (gastrointestinal), kontak dermal dan inhalasi atau transpulmoner serta transplasenta. Rantai makanan merupakan rute utama pemasukan TCDD ke dalam tubuh baik secara langsung melalui TCDD yang terkandung di dalam makanan maupun secara sekunder oleh proses pengemasan. Bahan makanan yang berasal dari hewan lebih beresiko terkontaminasi oleh TCDD karena sifat alami TCDD yang mudah larut dalam lemak (lipofilik). Tumbuhan bukan merupakan sumber kontaminan TCDD bagi manusia karena kandungan lemak pada tumbuhan rendah. Namun, kontaminasi TCDD pada permukaan tumbuhan dan kontaminasi persisten pada tanah yang menjadi sumber utama kontaminan TCDD (Bintoro, 2009; Llobet *et al.*, 2003; Winarti, dkk., 2005).

Kontak dermal TCDD hanya terjadi pada lapisan luar kulit (*stratum corneum*) dan tidak mengalami penetrasi ke lapisan dermis. Presentase pemasukan TCDD melalui inhalasi atau transpulmoner relatif kecil apabila dibandingkan dengan

rute pemasukan yang lain. Hal ini dikarenakan TCDD memiliki tekanan uap yang rendah (Llobet *et al.*, 2003; Juniarti, 2005).

Setelah 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) masuk ke dalam tubuh dan menembus selaput sel tubuh, akan berikatan dengan AhR yang berada di sitosol kemudian berpindah ke dalam inti sel. Di inti sel, AhR yang telah berikatan dengan TCDD membentuk dimer dengan protein *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT). Dalam kompleks senyawa TCDD-AhR-ARNT, mengikat elemen DNA tertentu, yaitu *Dioxin-Responsive enhancer Elements* (DRE). Kompleks senyawa tersebut kemudian bekerja sebagai faktor transkripsi di DRE dan menginduksi ekspresi ratusan jenis gen. Juga dapat terjadi kompleks senyawa TCDD-AhR-ARNT terikat ke elemen DNA lain (*inhibitory DRE*), sehingga menimbulkan efek hambatan ekspresi pada gen-gen yang berbeda (Doi *et al.*, 2003).



Gambar 2.2 Reseptor AhR di dalam sitoplasma sel (Massaad *et al.*, 2002)

2.1.4 Toksisitas TCDD

Toksisitas TCDD dipengaruhi oleh dosis, rute pemberian, umur dan jenis kelamin spesies. Salah satu efek toksik TCDD adalah *wasting syndrome*, yaitu sindrom kelemahan yang ditandai dengan penurunan berat badan. Penurunan berat badan tersebut kemungkinan disebabkan karena TCDD dapat menurunkan nafsu makan dan menurunkan sekitar 30% absorpsi aktif glukosa pada usus kecil (Ebtakar, 2004).

Chloracne adalah efek klinis yang karakteristik akibat toksisitas TCDD pada manusia, kelinci dan monyet. *Chloracne* meliputi hiperkeratosis dan pembentukan komedo pada kulit yang sedikit ditumbuhi rambut. Pada kelinci dan monyet ditambah terdapat edema disekitar mata. Bencana toksisitas TCDD yang terjadi di Nitro, Virginia Barat; Vietnam; Yusho, Jepang; Cina; Beach, Missouri dan Seveso, Italia menunjukkan gejala keracunan berupa *chloracne* (Bertazzi *et al.*, 2001; Ebtakar, 2004).

Terdapat variasi dosis TCDD yang dapat menyebabkan kematian pada beberapa spesies hewan (dosis oral, LD₅₀ berkisar antara 0,6 sampai 5 µg/kg berat badan) (Saragih, 2005). Pemberian dosis letal menimbulkan perubahan awal antara lain penurunan berat badan secara mendadak serta diikuti dengan kematian pada beberapa minggu kemudian (Susanti, 2000). Hewan yang diberi TCDD dosis oral tunggal atau berulang dari 0,1 sampai 25 µg/kg berat badan menunjukkan peningkatan berat organ hati dan terdapat akumulasi lemak, atrofi timus dan perubahan histopatologi pada organ hati dan timus (Saragih, 2005). Penelitian yang

dilakukan Susanti *et al.* (2001) menunjukkan hasil TCDD yang diberikan secara oral dengan dosis 5 µg/kg berat badan pada hari pertama dan 1 µg/kg berat badan/hari pada hari kedua kemudian berlanjut sampai enam puluh hari pada tikus jantan *Sprague Dawley*, terjadi penurunan kadar Hemoglobin (Hb), nilai *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* (MCHC), jumlah neutrofil dan limfosit serta perubahan morfologi eritrosit berupa *central palor* dan akantosis.

Son *et al.* (2003) telah melakukan penelitian dengan memberikan TCDD pada 2 kelompok tikus *Sprague Dawley* dengan frekuensi pemberian yang berbeda. Kelompok 1 mendapatkan dosis tinggi 1, 10, 20 dan 50 µg/kg berat badan, sementara kelompok 2 mendapatkan dosis rendah 0,01; 0,1; 1 dan 2,5 µg/kg berat badan. Elektroforesis protein 2 dimensi serum diperoleh hasil 1 *novel* dan terdapat peningkatan jumlah *spot*. Protein *novel* tersebut diidentifikasi sebagai prekursor *glutathione peroxidase*, sementara jumlah *spot* yang meningkat diidentifikasi sebagai sitokeratin 8 polipeptida, Ig gamma-1 rantai C dan Ig gamma-2 rantai C. Protein tersebut dapat digunakan sebagai petunjuk untuk deteksi TCDD dan dapat untuk mengetahui efek toksik TCDD.

Pada marmut betina yang diberi *Crude Ginseng Saponin* (CGS) setelah diberi TCDD dengan dosis tunggal 3 µg/kg berat badan, menunjukkan hasil dapat menekan peningkatan kadar glukosa darah, amilase, lipase, total kolestrol, trigliserida, *Aspartate Transaminase* (AST) dan *Low Density Lipoprotein*-kolesterol (LDL-kolestrol) (Hwang *et al.*, 2001). Kematian fetus dan resorpsi fetus terjadi pada tikus yang diberi TCDD dengan dosis 0,125 sampai 2 µg/kg berat badan (Calkosinski *et*

al., 2003). Pemberian TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari selama empat puluh sembilan hari pada mencit jantan dapat menyebabkan penurunan fertilitas sebagai akibat organ testis mencit juga termasuk organ target TCDD (Yin *et al.*, 2012).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) juga bersifat karsinogenik. Penelitian yang dilakukan Ray *and* Prasad (1992) tentang efek kronis TCDD melalui makanan dengan dosis 0,01 µg/kg berat badan/hari selama dua tahun, dengan hewan coba tikus, menunjukkan hasil bahwa 38% tikus yang diteliti mengalami gejala tumor termasuk nodul neoplastik hati, kolangiokarsinoma, karsinoma saluran telinga, ginjal dan kandung kemih, serta menginduksi karsinoma hati, paru-paru, palatum dan lidah.

2.1.5 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi TCDD

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) diabsorpsi melalui gastrointestinal, dermal dan transpulmoner. Pemberian TCDD secara oral dalam diet, hampir 90% dari dosis yang diberikan akan diabsorpsi oleh gastrointestinal. Absorpsi TCDD oleh gastrointestinal bervariasi tergantung pada dosis, pelarut dan umur spesies. Absorpsi dermal TCDD tergantung dosis, formulasi dan durasi kontak. Efek sistemik yang timbul setelah terpapar TCDD pada paru-paru membuktikan bahwa TCDD juga diabsorpsi transpulmoner (EPA, 2012).

Setelah diabsorpsi, TCDD dibawa oleh darah dan limfe untuk didistribusikan ke seluruh organ tubuh. Di dalam darah dan limfe, TCDD bergabung dengan

lipoprotein dan kilomikron (EPA, 2012). Hati dan jaringan lemak merupakan deposit utama TCDD. Sifat TCDD yang mudah larut lemak (lipofilik) menyebabkan lemak sebagai deposit utama TCDD. Akumulasi TCDD pada hati kemungkinan berhubungan dengan induksi enzim spesifik hati. Mencit yang diberi TCDD yang dilabel dengan radioaktif, dengan dosis 2 µg/kg berat badan secara intraperitoneal, memperlihatkan distribusi TCDD pada hati, ginjal dan paru-paru (Susanti *et al.*, 2002).

Rute metabolisme utama TCDD adalah hidroksilasi dan berkonjugasi dengan asam glukoronat atau asam sulfat. Ekskresi TCDD terutama melalui urin dan feses serta empedu. Pada mamalia, air susu juga merupakan salah satu rute ekskresi TCDD. Unggas yang sedang bertelur, kurang lebih 1% TCDD ditranslokasi ke telur (Dobrzynski *et al.*, 2009). Urin terutama mengandung metabolit terkonjugasi, sedangkan feses mengandung metabolit non konjugasi. Beberapa penelitian juga menunjukkan terdapat biotransformasi TCDD menjadi metabolit polar dan tidak stabil untuk diidentifikasi dengan metode kromatografi (Susanti *et al.*, 2001).

2.1.6 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) dan Stres Oksidasi

Beberapa peneliti menyatakan bahwa efek merusak TCDD berhubungan dengan stres oksidasi. Sitokrom P450 (CYP1A1 dan CYP1B1) yang terinduksi oleh TCDD menunjukkan terdapat hubungan antara TCDD dengan kerusakan oksidasi DNA. Pemberian TCDD dengan dosis tinggi dapat mempengaruhi peroksidasi lipid, terjadi peningkatan putusnya untaian DNA dan penurunan fluiditas pada membran

sel di hati dan jaringan pada organ selain hati. Pemberian kronis TCDD dengan dosis rendah ($0,15 \mu\text{g TCDD/kg}$ berat badan/hari) dapat mengakibatkan kerusakan oksidasi pada sejumlah jaringan pada organ mencit (Saragih, 2005). Pemberian TCDD dengan dosis 25, 50, $100 \mu\text{g/kg}$ berat badan selama satu hari dapat menghasilkan peningkatan level peroksidasi lipid, kerusakan DNA pada hati tikus *Sparague Dawley* (Yoshida and Ogawa, 2000).

Beberapa parameter yang menunjukkan kejadian stres oksidasi akibat TCDD antara lain: 1) hasil degradasi seperti peroksidasi lipid (MDA); 2) antioksidan nonenzimatik, yaitu glutathion, vitamin C, vitamin E; 3) antioksidan enzimatik, yaitu *Superoksida Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), *Glutathione Peroxidase* (GSH-PX), *Glutathione Reductase* (GR); 4) sitokrom P450 (Yoshida and Ogawa, 2000).

Pada marmut yang diberikan ekstrak *panax* ginseng dan dipapar TCDD secara subkronis dengan dosis tunggal $1 \mu\text{g/kg}$ berat badan, dapat menekan peningkatan sitokrom P450 (CYP1A1 dan CYP1B1) dan aktivitas mikrosomal *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*-sitokrom P450 reduktase (NADPH-sitokrom P450 reduktase) pada jaringan hati (Lee *et al.*, 2002). Penelitian yang dilakukan Kern *et al.* (2002) menunjukkan hasil pemberian TCDD 30 ng/kg berat badan/minggu selama 2 bulan disertai dengan pemberian makanan berlemak tinggi dapat mengakibatkan perubahan enzim yang berkaitan dengan stres oksidasi pada jaringan adiposit dan hati tikus.

Stres oksidasi yang diinduksi oleh TCDD juga berhubungan dengan kejadian karsinogenesis pada hewan dan manusia. Stres oksidasi memiliki peran penting

dalam kejadian tersebut melalui tiga tahapan yang berbeda, yaitu inisiasi, promosi dan progresi. Modifikasi oksidasi DNA menyebabkan putusnya untai DNA yang memiliki peran penting terhadap mutasi. Mutasi ini akan mengubah fungsi gen seperti onkogen atau gen supresor tumor yang terlibat dalam evolusi berbagai macam jenis tumor (Yoshida *and* Ogawa, 2000).

2.2 Tinjauan Tentang Sitokrom P450

Sitokrom P450 adalah suatu enzim monooksigenase yang merupakan anggota dari kelompok enzim oksidoreduktase. Sitokrom P450 berperan penting sebagai katalisator hidroksilasi pada Fase 1 pada metabolisme xenobiotik (obat, karsinogen, pestisida, petroleum dan polutan) dan senyawa endogen (steroid, retinoid, eikosanoid dan asam lemak). Tujuan hidroksilasi adalah mengubah substrat lipofilik menjadi hidrofilik agar dapat dikonjugasi dengan molekul seperti asam glukoronat, glutation, asetilasi, metilasi, asam amino konjugasi atau sistein pada Fase 2 metabolisme xenobiotik (Kadri, 2012) .

Sitokrom P450 terdiri atas berbagai famili. Setiap famili terdiri atas beberapa subfamili. Setiap subfamili terdiri atas berbagai isozim (isoform). Pengelompokan sitokrom P450 menjadi berbagai famili, subfamili maupun isozim (isoform) tersebut berdasarkan pada kemiripan urutan asam amino penyusun apoprotein (homologi), spesifisitas substrat, spesifisitas elektroforesis dan sifat imunologi. Nomor pertama menunjukkan famili, huruf menunjukkan subfamili dan nomor terakhir menunjukkan isozim (isoform). Enzim-enzim yang termasuk dalam satu famili memiliki homologi

sampai 40% sedangkan enzim-enzim yang tergolong dalam subfamili memiliki kemiripan 55 sampai 60% (Suharjono, 2006).

Dinamakan sitokrom P450 karena *cyto* menunjukkan lokasi dan *chromes* berarti karakteristik spektrofotometrik. Enzim tersebut mengandung sebuah hem dengan spectrum absorbansi warna tertentu (P=Pigmen). Angka 450 bermula dari suatu pemeriksaan spektroskopi terhadap mikrosom sel-sel hepatosit hati tikus pada tahun 1958. Fraksi mikrosom tersebut direduksi dengan *dithionite* yang dilanjutkan dengan CO (CO akan terikat pada hem fero), sehingga menghasilkan absorbansi paling jelas pada panjang gelombang 450 nm (Amalia, 2011; Kadri, 2012).

Tiga puluh famili sitokrom P450 telah ditemukan, termasuk 10 famili pada manusia, 2 famili pada insekta, 1 famili pada siput, 1 famili pada tanaman dan 6 famili pada bakteri. Sampai dengan tahun 1998, dari berbagai spesies yang telah diteliti berhasil dikarakterisasi lebih dari 750 isozim (isoform), 37 isozim (isoform) terdapat pada manusia dan 47 isozim (isoform) terdapat pada tikus. Sitokrom P450 pada mamalia diklasifikasikan ke dalam dua golongan utama, yaitu yang terlibat dalam sintesis steroid dan asam empedu dan yang terlibat dalam metabolisme xenobiotik (Sugiyanto, 2006; Suharjono, 2006).

Sitokrom P450 famili 1 (CYP1), famili 2 (CYP2), famili 3 (CYP3) dan famili 4 (CYP4) berperan dalam metabolisme xenobiotik yang umum terdapat pada hati mamalia. Sitokrom P450 yang dijumpai pada lalat rumah dikelompokkan ke dalam famili 6 (CYP6). Sitokrom P450 ekstrahepatik yang terlibat biosintesis steroid dikelompokkan dalam famili 17 (CYP17), famili 19 (CYP19) dan famili 21

(CYP21). Sitokrom P450 mitokondrial, yang terdapat pada ragi dan dijumpai pada bakteri, masing-masing dikelompokkan ke dalam famili 11 (CYP11), 51 (CYP51) atau 52 (CYP52) dan 101 (CYP101) atau 102 (CYP102) (Sugiyanto, 2006).

Peran utama sitokrom P450 dalam metabolisme obat telah diketahui sejak lama. Akan tetapi peran isozim (isoform) individual baru mulai diungkap pada awal tahun 1990. Seperti misal CYP1A1 diketahui lebih spesifik terhadap substrat aromatik hidrokarbon terhalogenasi, sedangkan CYP1A2 disamping mengkatalisis metabolisme aromatik hidrokarbon terhalogenasi juga mengkatalisis obat-obat lain seperti parasetamol. Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) disamping terlibat di dalam metabolisme parasetamol juga substrat lain seperti etanol, aseton dan kloroform. Sitokrom P450 1B1 (CYP1B1) berperan dalam aktivasi metabolik karsinogen. Dengan demikian isozim (isoform) tersebut disamping memiliki sifat spesifik terhadap suatu substrat tertentu juga menunjukkan reaktivitas silang dengan beberapa substrat lain. Demikian pula distribusi relatif isozim (isoform) tersebut menunjukkan perbedaan antar spesies maupun antar organ. Pada manusia juga dikenal terdapat variasi antar individu (Sugiyanto, 2006).

2.3 Tinjauan Tentang Hati

Hati merupakan organ kelenjar terbesar dalam tubuh. Hati memiliki konsistensi yang lunak dan terletak di bawah diafragma, di dalam rongga abdomen. Hati menerima sebagian besar darah (sekitar 70%) yang berasal dari vena porta dan sebagian kecil disuplai oleh arteri hepatica. Semua senyawa yang diserap usus

diangkut melalui vena porta menuju ke hati, kecuali lemak diangkut dari tempat penyerapan di usus melalui pembuluh-pembuluh limfe. Hati memiliki fungsi yang kompleks, antara lain detoksifikasi senyawa-senyawa toksik, fagositosis benda asing dan ekskresi metabolit (Simanjuntak, 2007). Unsur utama struktur hati adalah sel-sel hati atau biasa disebut sel-sel hepatosit. Sel-sel hepatosit berkelompok dalam susunan yang saling berhubungan sedemikian rupa, sehingga membentuk suatu unit struktural yang dinamakan lobulus hati. Struktur lobulus dikelompokkan dalam tiga golongan yang berbeda. Pertama, lobulus klasik merupakan suatu bangun berbentuk heksagonal dengan vena sentralis sebagai pusat. Kedua, saluran porta merupakan bangunan berbentuk segitiga dengan vena sentralis sebagai sudut dan segitia Kiernan atau saluran porta sebagai pusat. Ketiga, asinus hati merupakan unit terkecil hati. Sel-sel pada asinus hati berdasarkan sistem aliran darah di dalam lobulus dibagi menjadi tiga zona. Sel-sel pada zona I adalah sel yang terdekat dengan pembuluh-pembuluh, sehingga sel-sel tersebut kaya akan nutrisi, O_2 dan sedikit mengandung metabolit. Sel-sel pada zona II menerima darah dengan kandungan nutrisi dan O_2 yang tidak sebanyak pada zona I. Sel-sel pada zona III adalah sel-sel yang paling dekat dengan vena sentralis, sehingga sel-sel tersebut mengandung sedikit nutrisi dan O_2 , tetapi banyak mengandung metabolit. Oleh sebab itu daerah sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan dibandingkan dengan daerah perifer (Guyton *and* Hall, 1997; Guyton *and* Hall, 2007).

Sel-sel hepatosit tersusun radial dalam lobulus hati, saling bertumpukkan, membentuk lapisan sel, memiliki satu atau dua inti yang bulat dengan satu atau lebih

nukleolus. Sel-sel hepatosit tersusun dari bagian tengah dan berakhir di vena sentralis. Diantara susunan sel-sel hepatosit tersebut terdapat sinusoid-sinusoid kapiler yang dinamakan sinusoid hati. Sinusoid hati mengandung sel-sel endotel dan sel-sel fagosit dari sel retikuloendotel yang dikenal sebagai sel-sel Kupffer (Guyton *and* Hall, 1997; Guyton *and* Hall, 2007)..

Fungsi utama hati adalah dalam proses proteksi tubuh terhadap senyawa-senyawa toksik yang masuk ke dalam tubuh (fungsi detoksifikasi). Hati berperan dalam mengubah senyawa-senyawa toksik tersebut. Senyawa-senyawa toksik tersebut berupa makanan, obat-obatan maupun bahan-bahan lain. Kemampuan detoksifikasi hati bersifat terbatas, sehingga tidak semua senyawa-senyawa toksik yang masuk ke dalam tubuh dapat didetoksifikasi dengan sempurna. Akan tetapi ditimbun dalam darah, sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada sel-sel hati. Dalam fungsi detoksifikasi, senyawa-senyawa yang memiliki sifat toksik terhadap sel-sel tubuh, diubah oleh hati menjadi senyawa-senyawa yang tidak lagi bersifat toksik. Setelah itu, senyawa-senyawa tersebut dibawa oleh darah menuju ke ginjal untuk diekskresikan (Alvernita, 2011; Katzung, 2001).

Meski secara patologis sebagian besar hati menderita gangguan atau kerusakan yang parah, namun gejala-gejala klinis tidak selalu nampak. Hal tersebut dikarenakan hati memiliki kemampuan regenerasi yang besar. Hati memiliki cadangan fungsional yang sangat besar, oleh karena itu kegagalan fungsi hati kemungkinan baru terjadi setelah sebagian besar (sekitar 70%) sel-sel hepatosit mengalami kerusakan (Alvernita, 2011; Kmeic, 2001).

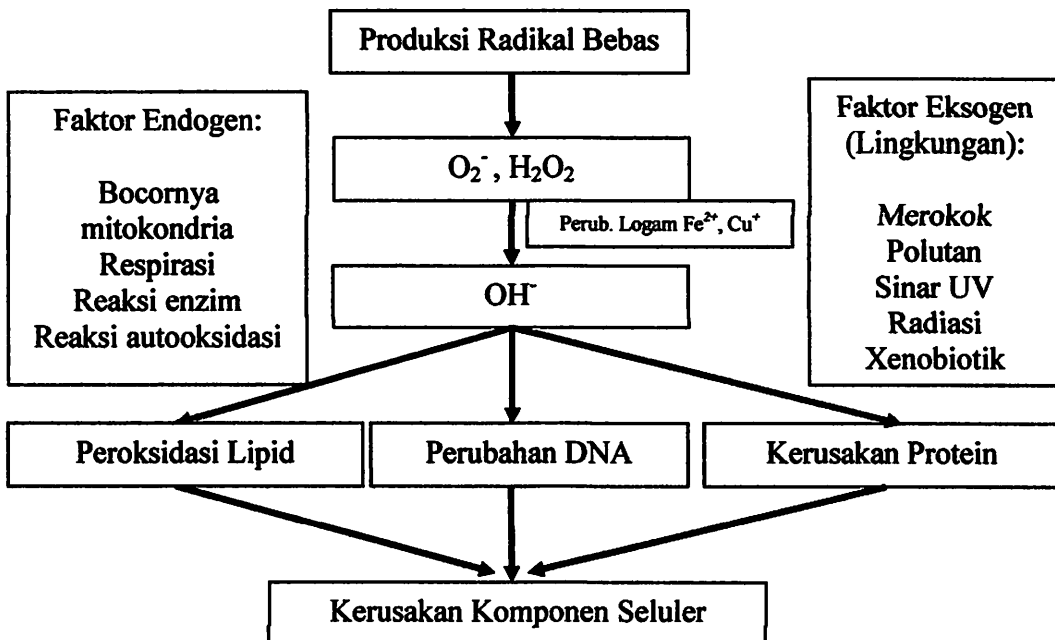
2.4 Tinjauan Tentang Radikal Bebas

2.4.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas diproduksi secara terus menerus di semua sel sebagai bagian dari fungsi seluler yang normal. Namun, produksi radikal bebas yang berlebihan akan menimbulkan gangguan dan kerusakan sel, yang menjadi awal berbagai macam penyakit (Young *and* Woodside., 2000).

Radikal bebas diidentifikasi sebagai suatu molekul yang dapat bertahan hidup sendiri, terdiri dari elektron tidak berpasangan pada orbit atom. Radikal bebas juga diidentifikasikan sebagai suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Dengan terdapat elektron yang tidak berpasangan tersebut, menyebabkan radikal bebas secara kimiawi bersifat sangat reaktif, yaitu berusaha mengisi elektron yang hilang dengan mengambil elektron dari atom atau molekul lain. Radikal bebas juga bersifat tidak stabil dan akan bereaksi dengan molekul lain melalui beberapa cara (Young *and* Woodside., 2000; Priscilla *and* Thompson., 2000).

Banyak radikal bebas yang bersifat sangat reaktif dapat mendonorkan sebuah elektron atau menarik sebuah elektron dari molekul lain, sehingga dikatakan bersifat sebagai oksidan atau reduktan. Pembentukan radikal di dalam tubuh terjadi melalui beberapa mekanisme yang dipengaruhi faktor endogen maupun faktor eksogen (Young *and* Woodside., 2000).



Gambar 2.3 Bagan mekanisme terjadi radikal bebas di dalam tubuh (Young and Woodside., 2000).

2.4.2 Mekanisme Terbentuk Radikal Bebas

Secara umum, mekanisme terbentuk radikal bebas melalui salah satu cara sebagai berikut:

1. Melalui absorpsi radiasi (radiasi ionisasi, radiasi sinar UV, radiasi sinar tampak, radiasi panas).
2. Melalui reaksi redoks, dengan mekanisme reaksi fusi ikatan homolitik atau pemindahan elektron.

Pengaruh radiasi ionisasi terhadap materi biologis akan menghasilkan berbagai macam radikal bebas yang kompleks, terutama radikal hidrogen ($H\cdot$), radikal

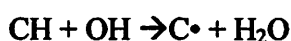
hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dan elektron yang siap berinteraksi dengan biomolekul lain yang berdekatan. Energi panas juga dapat menghasilkan radikal bebas. Secara umum, suhu tinggi dibutuhkan untuk memecah ikatan kovalen, tetapi beberapa ikatan yang relatif tidak stabil dapat dipecahkan secara homolitik pada suhu 30 sampai 50°C . Senyawa-senyawa tersebut sebagian besar merupakan pencetus (inisiator) reaksi pembentukan radikal bebas. Senyawa-senyawa organik maupun senyawa-senyawa xenobiotik yang terpapar suhu tinggi, misal polutan, sampah organik yang terbakar dan rokok yang terbakar, akan menghasilkan campuran berbagai radikal bebas yang kompleks. Beberapa reaksi redoks penghasil radikal bebas membutuhkan katalisator, misal logam transisi atau suatu enzim (metaloenzim, mieloperoksidase atau flavoprotein) (Suryohudoyo, 2007).

Radikal bebas dapat bereaksi dengan molekul lain melalui beberapa cara. Jika dua radikal bebas bertemu, akan saling menggabungkan elektron yang tidak berpasangan dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Pada molekul non-radikal, radikal bebas akan bereaksi melalui tiga jalan sebagai berikut:

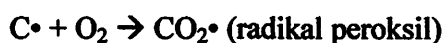
1. Radikal bebas memberikan elektron yang tidak berpasangan (sebagai reduktor).
2. Radikal bebas menerima elektron dari non-radikal (sebagai oksidan).
3. Radikal bebas bergabung dengan non-radikal.

Reaksi-reaksi tersebut akan mengubah non-radikal menjadi suatu radikal bebas. Akibat kecenderungan radikal bebas untuk menerima elektron dari molekul disekitar (sebagai oksidan), maka radikal bebas dapat mengubah struktur dan atau fungsi molekul tersebut (Suryohudoyo, 2007).

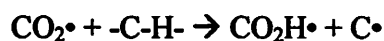
Radikal hidroksil (OH•) dapat menyerang membran fosfolipid dan glikolipid pada rantai *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) dan terjadi peroksidasi lipid. Mula-mula terbentuk suatu *carbon-centered-radical* (-C•) di membran fosfolipid dan glikolipid, karena OH bereaksi dengan atom hidrogen dari rantai karbon membentuk air.



Kemudian *carbon-centered-radical* (-C•) akan bereaksi dengan oksigen, membentuk radikal bebas baru yang disebut radikal peroksil.



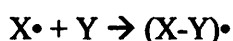
Radikal peroksil (CO₂•) tersebut cukup reaktif untuk menyerang rantai asam lemak disekitar dan membentuk radikal lipid hidroperoksida (CO₂H•) dan *carbon-centered-radical* (-C•) yang baru.



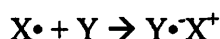
Komponen terpenting dari membran sel adalah fosfolipid, glikolipid, kolesterol dan protein. Dua komponen pertama mengandung PUFA. *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) tersebut, antara lain asam linoleat, asam linolenat dan asam arakhidonat. *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) tersebut sangat rawan terhadap serangan radikal bebas. Radikal bebas dapat menimbulkan reaksi rantai yang dinamakan peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai adalah putusya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain aldehida-aldehida seperti MDA, -hidroksi-nonenal dan berbagai hidrokarbon seperti etana dan pentane (Young *and* Woodside., 2000; Fang *et al.*, 2002).

Fang *et al.* (2002) menyatakan radikal bebas dapat menyebabkan reaksi berantai yang akan terus berlanjut sampai radikal bebas tersebut dihilangkan oleh reaksi dengan radikal bebas lain atau sistem antioksidan tubuh. Cara radikal bebas bereaksi dengan senyawa lain adalah sebagai berikut:

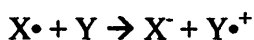
1. Penambahan



2. Donasi elektron



3. Penghilangan elektron



Reaksi rantai tersebut dapat dihentikan hanya jika dua radikal bebas bertemu.



2.4.3 Akibat Radikal Bebas

Berbagai proses metabolisme normal di dalam tubuh dapat menghasilkan radikal bebas dalam jumlah kecil sebagai produk antara. Di dalam sel, radikal bebas terbentuk pada membran plasma dan organel-organel seperti mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasma dan sitosol, melalui reaksi-reaksi enzimatik fisiologis yang berlangsung (Tuminah, 2000).

Radikal hidroksil (OH•) merupakan senyawa yang paling berbahaya karena memiliki reaktivitas yang tinggi dan berdampak negatif terhadap senyawa-senyawa

penting yang digunakan untuk mempertahankan integritas sel. Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) tersebut berdampak negatif terhadap:

1. Membran sel

Membran sel disusun oleh fosfolipid, glikolipid, kolesterol dan protein. *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) sebagai penyusun fosfolipid dan glikolipid, terutama asam arakhidonat akan mengalami oksidasi melalui tiga tahap reaksi, yaitu pembentukan senyawa radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) lemak; dekomposisi radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) lemak menjadi radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$) dan alkoksil ($\text{C}\cdot$); dan pada akhir radikal alkoksil menjadi aldehid (MDA), yang bersifat toksik dan membahayakan kehidupan sel.

2. *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)

Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dapat menimbulkan perubahan pada DNA, misal hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan purin dan pirimidin serta putusnya fosfodiester DNA. Kerusakan DNA yang terlalu parah sulit untuk diperbaiki sehingga menimbulkan mutasi gen yang dapat menyebabkan terbentuk sel-sel kanker.

3. Protein

Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang bereaksi dengan asam amino yang menyusun protein terutama asam amino sistein yang mengandung gugus sulfhidril (SH). Serangan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) terhadap gugus SH akan mengakibatkan protein mengalami penurunan fungsi biologis, misal kerusakan enzim akan

mengakibatkan aktivitas enzim terganggu (Suryohudoyo, 2007; Fang *et al.*, 2002).

Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel seperti, lemak, protein, DNA serta karbohidrat dan gugus thiol. Perusakan sel oleh radikal bebas reaktif didahului oleh kerusakan membran sel dengan mekanisme sebagai berikut:

1. Terjadi ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen-komponen membran sel (enzim-enzim membran, komponen karbohidrat membran plasma) sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi reseptor).
2. Oksidasi gugus thiol pada komponen membran sel oleh radikal bebas yang menyebabkan proses lintas membran sel terganggu.
3. Reaksi peroksidasi lipid membran sel yang mengandung PUFA. Hasil peroksidasi lipid membran sel oleh radikal bebas berefek langsung terhadap kerusakan membran sel, antara lain dengan mengubah fluiditas, *cross linking*, struktur dan fungsi membran sel serta jika berlanjut akan menyebabkan kematian sel (Liu *et al.*, 2000; Sediaoetomo, 2012; Suryohudoyo, 2007).

2.5 Tinjauan Tentang Peroksidasi Lipid

Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi antara PUFA sebagai penyusun fosfolipid dan glikolipid membran sel dengan radikal bebas yang membentuk radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$). *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) rentan terhadap serangan radikal bebas. Konsentrasi tinggi PUFA

dalam fosfolipid dan glikolipid disetiap membran sel tidak hanya membuat PUFA menjadi sasaran utama untuk reaksi dengan agen oksidasi, tetapi juga memungkinkan PUFA untuk berpartisipasi dalam rantai panjang reaksi radikal bebas (Setiawan dan Suhartono, 2007). Peroksidasi lipid secara umum terbentuk melalui beberapa tahapan proses, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi (Prasetyastuti dan Sunarti, 2008).

Pada tahap awal reaksi terjadi pelepasan hidrogen dari PUFA sehingga terbentuk radikal alkoksil ($C\bullet$). Pada keadaan normal radikal alkoksil ($C\bullet$) cepat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil ($CO_2\bullet$). Radikal peroksil ($CO_2\bullet$) tersebut bereaksi lebih lanjut dengan PUFA yang lain membentuk radikal lipid hidroperoksida ($CO_2H\bullet$). Reaksi tersebut merupakan otooksidasi, yaitu reaksi berantai radikal bebas (Liu *et al.*, 2000).

Malondialdehyde (MDA) secara umum sering digunakan sebagai salah satu indikator peroksidasi lipid, yang dapat ditentukan dalam suatu pengukuran dengan menggunakan *Thiobarbituric Acid* (TBA) (Ratnayanti, 2011). Metode pengukuran tersebut disebut *Thiobarbituric Acid-Reactive substances* (TBARs) (Arkhaesi, 2008).

2.6 Tinjauan Tentang MDA

Malondialdehyde (MDA) adalah senyawa aldehida yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. *Malondialdehyde* (MDA) juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Senyawa MDA memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$ (Arkhaesi, 2008).

Ratnayanti (2011) menyatakan konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan ada proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasa diikuti oleh penurunan kadar MDA. *Malondialdehyde* (MDA) dapat berikatan dengan berbagai molekul biologis seperti lemak, protein dan DNA secara kovalen.

Pengukuran MDA mudah dilakukan baik secara spektrofotometri atau fluorimetrik. Karena MDA tidak stabil maka cara penyimpanan sampel harus terlindung dari cahaya dan bila tidak segera diperiksa harus disimpan pada suhu -80°C. Pada suhu tersebut tidak akan terjadi perubahan kadar MDA sampai selama 6 bulan penyimpanan (Arkhaesi, 2008).

2.7 Tinjauan Tentang Pengukuran Kadar MDA

Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat pendek sehingga sulit diukur dalam laboratorium. Gangguan atau kerusakan akibat radikal bebas pada suatu sel tubuh dapat diperiksa salah satu dengan mengukur kadar MDA, yang merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid. Produksi radikal bebas secara tidak langsung dapat dinilai dengan kadar peroksidasi lipid (Arkhaesi, 2008). Menurut Konig and Berg., (2002); Dalle *et al.*, (2006) pengukuran kadar MDA serum dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu sebagai berikut :

1. Tes TBARs

Dasar pemikiran adalah reaksi spektrofotometri sederhana, dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi dua molekul 2-asam *thiobarbiturat*. Reaksi tersebut berjalan pada pH 2 sampai 3. *Thiobarbituric Acid* (TBA) akan

memberikan warna merah muda-kromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometri. Tes TBARs selain mengukur kadar MDA yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid juga mengukur produk aldehid lain termasuk produk non-volatil yang terjadi akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran MDA serum. Kadar MDA juga dapat diperiksa baik di plasma, jaringan maupun urin.

Beberapa metode pengukuran TBARs adalah sebagai berikut :

a. Pengukuran reaksi TBARs

a) Pengukuran reaksi TBARs dengan metode kolorimetri

Pengukuran reaksi TBARs dengan metode kolorimetri, dengan spektrofotometer, merupakan kadar MDA yang paling sering dilakukan. Metode yang digunakan adalah metode Yagi. Metode ini mudah dilakukan akan tetapi bersifat tidak spesifik oleh karena mengukur produk aldehid lain.

b) Pengukuran reaksi TBARs dengan metode fluoresens

Metode ini memiliki keunggulan dibanding metode kolorimetri oleh karena tidak terganggu oleh beberapa substansi produk reaksi TBARs yang larut air. Pemeriksaan dilakukan dengan metode spektrofluorometri.

b. Pengukuran MDA-TBARs dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Metode ini secara spesifik dapat mengukur kompleks MDA-TBARs, sehingga pengukuran kadar MDA lebih akurat. Akan tetapi metode ini membutuhkan kondisi asam dengan suhu tinggi sehingga tetap ada kemungkinan terbentuk MDA yang bukan karena peroksidasi lipid.

2. Pengukuran kadar MDA serum bebas dengan metode HPLC

Merupakan metode pengukuran MDA serum yang paling sensitif dan spesifik. *Malondialdehyde* (MDA) bukan produk yang spesifik dari proses peroksidasi lipid sehingga dapat menimbulkan positif palsu yang berakibat nilai duga positif yang rendah dan telah dilaporkan dapat meningkatkan spesifisitas pada pemeriksaan kadar MDA serum.

2.8 Tinjauan Tentang Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai suatu substansi yang terdapat dalam jumlah yang sedikit, yang secara signifikan dapat menunda atau menghambat oksidasi dari suatu substansi tertentu. Peran fisiologi dari antioksidan adalah mencegah kerusakan komponen seluler yang terjadi sebagai akibat dari reaksi kimia yang melibatkan radikal bebas. Antioksidan dapat mencegah radikal bebas dalam menginduksi gangguan atau kerusakan komponen seluler dengan mencegah pembentukan radikal, efek *scavenge* atau membantu dekomposisi sel atau jaringan tubuh yang rusak (Prasetyastuti dan Sunarti, 2008; Tuminah 2000).

Dalam meredam dampak negatif radikal bebas, terdapat dua mekanisme, yaitu mencegah terhimpun senyawa-senyawa radikal bebas secara berlebihan dan

mencegah reaksi rantai yang berkelanjutan. Radikal bebas memiliki kemampuan bereaksi dalam berbagai cara untuk menimbulkan kerusakan pada hampir semua komponen seluler. Oleh sebab itu diperlukan pertahanan antioksidan yang luas, dari endogen sampai eksogen untuk melindungi komponen seluler dari radikal bebas yang menginduksi gangguan atau kerusakan. Berdasarkan fungsi, antioksidan dibedakan menjadi lima golongan, yaitu :

1. Antioksidan primer

Antioksidan yang berfungsi untuk mencegah terbentuk radikal bebas baru, karena antioksidan tersebut dapat mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatif yang dapat ditimbulkan (sebelum sempat bereaksi). Antioksidan primer yang ada di dalam tubuh antara lain enzim SOD, CAT, GSH-PX dan GR. Antioksidan tersebut memiliki peranan penting di dalam tubuh karena dapat melindungi sel-sel dari serangan radikal bebas. Antioksidan tersebut bekerja dipengaruhi oleh mineral-mineral di dalam tubuh seperti mangan, seng, tembaga dan selenium.

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadi reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Antioksidan tersebut antara lain vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat) dan β -karoten.

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Antioksidan tersebut seperti enzim metionin sulfoksidan reduktase, yang dapat memperbaiki DNA di dalam inti sel.

4. *Oxygen Scavenger*

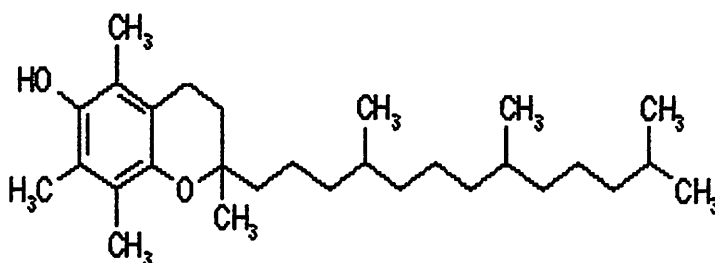
Antioksidan yang termasuk *oxygen scavenger* yang dapat mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, seperti vitamin C.

5. *Chelators* atau *Sequesstrants*

Senyawa yang dapat mengikat logam sehingga logam tersebut tidak dapat mengkatalis reaksi oksidasi, pada akhirnya kerusakan dapat dicegah. Senyawa tersebut antara lain asam sitrat dan asam amino (Kumalaningsih, 2006).

2.9 Tinjauan Tentang Vitamin E

Vitamin E pertama kali ditemukan pada tahun 1922 oleh Evan dan Bishop yang merupakan vitamin larut dalam lemak. Vitamin E secara alami memiliki 8 isomer yang dikelompokkan dalam 2 kelas substansi alami, yaitu 4 *tocopherol* (α , β , γ dan δ) dan 4 *tokotrienol* (α , β , γ dan δ). Vitamin E paling aktif adalah *α -tocopherol*, sehingga aktivitas vitamin E diukur sebagai *α -tocopherol*. Oleh sebab itu *α -tocopherol* sering digunakan sebagai standar pengukuran vitamin E dalam makanan. *Tocopherol* terdiri dari struktur cincin *6-chromanol* dengan rantai samping jenuh panjang enam belas *carbon phytol*. Perbedaan antar jenis *tocopherol* terletak pada jumlah dan posisi gugus metal struktur cincin (EFSA, 2008).



TOKOFEROL

Gambar 2.4 Struktur kimia *tocopherol* (EFSA, 2008)

Sumber vitamin E, terutama *tocopherol*, dapat diperoleh dari bahan makanan antara lain minyak tumbuh-tumbuhan dan biji-bijian seperti minyak biji bunga matahari, minyak biji kapas, minyak buah kenari, minyak gandum, minyak jagung, minyak kacang kedelai, minyak kacang tanah, minyak kelapa, minyak kelapa sawit, minyak wijen serta minyak zaitun (EFSA, 2008).

Seperti vitamin larut lemak yang lain, vitamin E diabsorpsi di usus halus secara difusi. Vitamin E tidak memiliki protein pembawa yang spesifik dalam plasma darah. Vitamin E yang terabsorpsi bergabung ke dalam kilomikron, yang secara cepat berpindah ke lipoprotein plasma dan terikat tidak spesifik. Vitamin E ditangkap di hati dan bergabung dengan *Very Low Density Lipoprotein (VLDL)*, lebih banyak dalam bentuk *α-tocopherol* dibanding bentuk yang lain, untuk kemudian disekresikan kembali. Sebagian besar sisa VLDL kaya trigliserida akan kembali ke hati, sebagian lagi diubah oleh lipoprotein *lipase* menjadi LDL. Selama proses tersebut vitamin E juga secara spontan berpindah ke *High Density Lipoprotein (HDL)*. *Tocopherol* plasma lebih banyak didistribusikan oleh LDL dan HDL. Vitamin E masuk ke dalam sel terjadi melalui proses mediasi reseptor (LDL

membawa vitamin E ke dalam sel) atau melalui proses yang dibantu oleh lipoprotein *lipase*. Di dalam sel, transpor intraseluler dari *tocopherol* membutuhkan protein pengikat *tocopherol* intraseluler, yaitu dikenal dengan *α -tocopherol* transfer protein, (*α -TPP*). Vitamin E pada sel terdapat pada bagian membran sel sehingga mudah untuk dimobilisasi. Jalur ekskresi vitamin E, yaitu melalui empedu, feses dan urin dalam bentuk *tocopheronat* dan *tocopheronalactone* yang dapat terkonjugasi dengan glukoronat (Jurczuk, *et al.*, 2005; Sareharto, 2010).

Vitamin E merupakan suatu antioksidan yang bekerja mencegah terjadi reaksi berantai radikal bebas. Vitamin E merupakan garis pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi lipid, terutama pada PUFA yang terdapat dalam fosfolipid dan glikolipid membran sel. Dalam mencegah peroksidasi lipid, vitamin E sendiri diubah menjadi suatu radikal. Radikal vitamin E tersebut di daur ulang dalam tubuh oleh beberapa antioksidan yang larut air seperti vitamin C dan glutathione, sehingga kembali ke bentuk asal vitamin E dan kembali menunjukkan aktifitas antioksidan. Sebagai antioksidan, vitamin E memutuskan rantai reaksi radikal bebas dengan memindahkan hidrogen fenolat yang terletak pada gugus OH cincin *chromanol* ke radikal peroksil (CO_2^\bullet) dari PUFA yang telah mengalami peroksidasi. Gugus OH cincin *chromanol* berhadapan dengan daerah hidrofili, sedangkan rantai fitil vitamin E akan tertambat di daerah hidrofobik membran. Gerakan untuk mengikat radikal bebas adalah dengan cara cincin *chromanol* akan bergerak turun naik tegak lurus terhadap membran. Selain itu, walaupun ujung rantai fitil tertambat pada membran, cincin *chromanol* vitamin E tersebut dapat bergerak dengan mudah ke

segala arah, sehingga memudahkan mengikat radikal bebas yang terdapat di dekat vitamin E. Vitamin E dapat menghilangkan radikal peroksil ($\text{CO}_2\bullet$) lebih cepat daripada reaksi radikal peroksil ($\text{CO}_2\bullet$) tersebut dengan protein membran, rantai samping asam lemak ataupun PUFA (Prasetyastuti dan Sunarti, 2008; Evstigneva *et al.*, 2001; Simanjuntak, 2007).

Defisiensi vitamin E terjadi bila asupan kurang atau absorpsi oleh tubuh terganggu. Malabsorpsi lemak juga dapat menimbulkan defisiensi vitamin E, karena pembawa vitamin E adalah lemak. Defisiensi vitamin E mempengaruhi beberapa sistem organ yang berbeda. Manifestasi defisiensi vitamin E sangat beragam, secara umum mempengaruhi tiga sistem, yaitu neuromuskuler, vaskuler dan reproduksi. (Guyton *and* Hall, 1997).

2.10 Tinjauan Tentang Mencit (*Mus Musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan mamalia yang paling umum digunakan sebagai hewan coba pada laboratorium (sekitar 40 sampai 80%), untuk berbagai kegiatan penelitian (Kusumawati, 2004; Alvernita, 2011). Mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan coba antara lain mudah diperoleh, mudah dikembangbiakkan, jinak dan berukuran kecil sehingga mudah dalam penanganan, memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, jumlah anak per-kelahiran banyak serta harga relatif murah (Alvernita, 2011).

Mencit yang sudah dipelihara di laboratorium adalah mencit yang masih satu famili dengan mencit liar (Kusumawati, 2004). Mencit tersebut memiliki berat badan

yang hampir sama dengan mencit liar, yaitu antara 15 sampai 30 gram pada umur sepuluh minggu. Mencit tersebut memiliki bulu yang pendek, halus dan berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari badan dan kepala (Yossa, 2008).



Gambar 2.5 Mencit galur Balb/c (BRC, 2009).

Semua galur mencit yang sudah dipelihara di laboratorium, yang ada saat ini, merupakan turunan dari mencit liar sesudah melalui peternakan selektif. Banyak galur berbeda dari mencit tersebut yang telah dikembangkan oleh ahli genetika. Beberapa galur seperti DDY, Balb/c, DBA dan B6 dikembangkan secara *inbreed* dengan gen-gen yang homozigot (Spiridonova *et al.*, 2003).

Klasifikasi mencit adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordota
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Sub Ordo : Myomorpha
Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

Mencit dikelompokkan dalam ordo Rodentia karena memiliki sepasang gigi insisivus yang berbentuk seperti pahat dan cukup tajam. Genus Mus memiliki empat bentuk morfotipe yang sudah dikenal sebagai spesies tertentu, yaitu *Mus musculus*, *Mus domesticus*, *Mus castaneus* dan *Mus bactrianus*, maupun sebagai sub spesies dari *Mus musculus*, yaitu *Mus musculus domesticus* (Spiridonova *et al.*, 2003).

Mencit memiliki lama hidup antara satu hingga dua tahun, bahkan beberapa dapat mencapai umur tiga tahun. Mencit mencapai dewasa kelamin pada umur lima sampai delapan minggu. Mencit merupakan hewan *polyestrus*, yaitu hewan yang mengalami estrus lebih dari dua kali dalam setahun. Seekor mencit betina akan mengalami estrus setiap empat sampai lima hari sekali (Yossa, 2008; Spiridonova *et al.*, 2003). Mencit betina memiliki lima pasang kelenjar mammae, yaitu tiga pasang di bagian dada dan dua pasang di bagian inguinal. Lama kebuntingan mencit adalah sembilan sampai dua puluh satu hari dengan jumlah anak rata-rata 6 ekor (Alvernita, 2011).

Tabel 2.1 Data biologi mencit

Berat badan :	
Jantan (gram)	20 sampai 40
Betina (gram)	18 sampai 35
Lama hidup (tahun)	1 sampai 3
Temperatur tubuh (^o C)	36,5
Kebutuhan air	<i>ad libitum</i>
Kebutuhan pakan (gram/hari)	4 sampai 5
Protein	20 sampai 25%
Lemak	5 sampai 12%
Serat kasar	2,5%
Karbohidrat	45 sampai 60%
Pubertas (hari)	28 sampai 49
Lama kebuntingan (hari)	17 sampai 21
Mata membuka (hari)	12 sampai 13

Sumber : Kusumawati (2004)

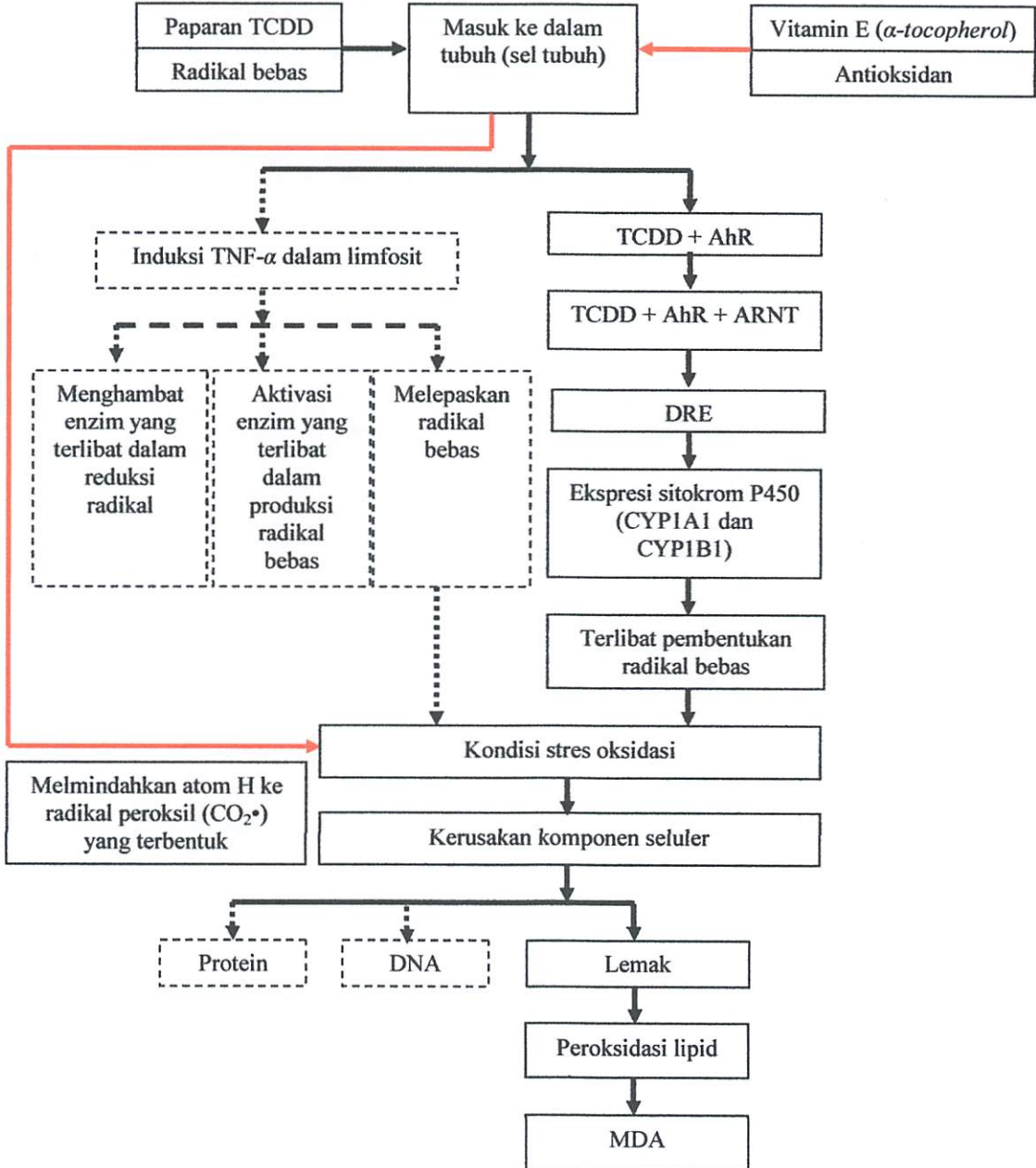
Kandang untuk mencit memiliki berbagai macam variasi dalam hal desain, ukuran dan komposisi. Kandang yang paling populer adalah *kandang* berbentuk kotak yang terbuat dari plastik (*polycarbonate*, *polypropylene* atau *polystyrene*) dengan kawat kasa sebagai penutup bagian atas *kandang* (Kusumawati, 2004). Kandang mencit memiliki luasan 97 cm²/ekor untuk mencit dewasa sedangkan untuk betina beserta anak-anak mencit yaitu 390 cm². Syarat yang harus dipenuhi untuk kandang mencit yaitu kandang harus memiliki luasan yang cukup sehingga mencit bebas bergerak. Satu kandang digunakan untuk 5 sampai 6 ekor. Mencit memiliki sifat takut cahaya oleh sebab itu ditempatkan dalam kondisi yang redup atau agak gelap dengan cahaya kurang dari 60 lux. Kandang tidak boleh ditempatkan pada daerah bising, lembab dan berdebu (Kusumawati, 2004; Yossa, 2008).

BAB 3

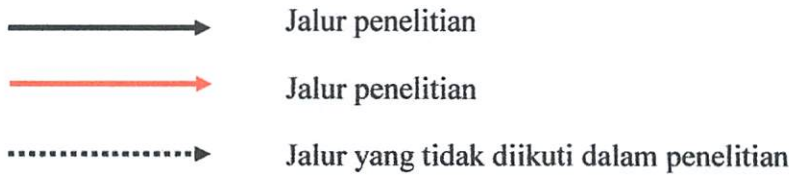
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual



2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan senyawa kimia toksik yang secara luas mengkontaminasi lingkungan. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* dapat menimbulkan respon toksik dalam tubuh karena TCDD memiliki reseptor spesifik yaitu AhR (Yoshida *and* Ogawa, 2000). Setelah TCDD masuk ke dalam tubuh dan menembus membran sel, akan berikatan dengan AhR yang berada di sitosol kemudian berpindah ke dalam inti sel. Di inti sel, AhR yang telah berikatan dengan TCDD membentuk dimer dengan protein ARNT. Dalam kompleks senyawa TCDD-AhR-ARNT, mengikat elemen DNA tertentu yaitu DRE. Ikatan tersebut akan meningkatkan ekspresi sitokrom P450, terutama CYP1A1 dan CYP1B1 (Doi *et al.*, 2003).

Yang *et al.*, (2005) menyatakan sitokrom P450 merupakan enzim yang berperan sebagai katalisator hidroksilasi dalam lintasan metabolisme xenobiotik (obat, karsinogen, pestisida, petroleum dan polutan) dan senyawa endogen (steroid, retinoid, eikosanoid dan asam lemak). Sitokrom P450 terlibat dalam rangkaian pembentukan radikal bebas. Radikal bebas yang memicu stres oksidasi dapat merusak beberapa komponen seluler yang penting, yaitu lemak, protein dan DNA. Kerusakan pada lemak menyebabkan terjadi peroksidasi lipid membran sel yang dapat diikuti dengan kerusakan sampai kematian sel. Kerusakan pada protein dapat mengganggu sistem

enzimatis dan kerusakan pada DNA menyebabkan terjadi mutasi gen. Pada kondisi stres oksidasi yang berat dapat berakhir hingga kematian sel (Hilscherova *et al.*, 2003; Nazrun *et al.*, 2011).

Kejadian stres oksidasi akibat TCDD diduga oleh sitokrom P450 (CYP1A1 dan CYP1B1) yang terpapar oleh TCDD. Siklus redoks yang terjadi setelah sitokrom P450 (CYP1A1 dan CYP1B1) memetabolisme TCDD kemudian dapat meningkatkan stres oksidasi secara *in vivo*. Beberapa peneliti juga menduga kejadian stres oksidasi akibat TCDD adalah dengan terinduksi Tumor Nekrosis Faktor (TNF- α) dalam limfosit yang kemudian menyebabkan TNF- α melepaskan radikal bebas, mengaktivasi enzim yang terlibat dalam produksi radikal bebas atau menghambat enzim yang terlibat dalam reduksi radikal bebas. Diketahui TNF- α mempunyai aktivitas fagositosis yang dapat sebagai promotor pembentukan radikal bebas pada kondisi tertentu (Yoshida *and* Ogawa, 2000).

Antioksidan diketahui mempunyai kemampuan melindungi kerusakan seluler akibat stres oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas, dengan memberikan tambahan elektron (Suryohudoyo, 2007). Vitamin E (*α -tocopherol*) merupakan suatu antioksidan yang bekerja menangkap radikal bebas dan mencegah terjadi reaksi berantai radikal bebas. Vitamin E (*α -tocopherol*) merupakan garis pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi lipid, terutama pada PUFA yang terdapat dalam fosfolipid dan glikolipid membran sel (Prasetyastuti dan Sunarti, 2008). Aktivitas vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap paparan TCDD yang dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas, dengan kemampuan vitamin E (*α -*

tocopherol) memindahkan atom hidrogen ke radikal bebas peroksil (CO_2^\bullet) dari PUFA yang telah mengalami peroksidasi (Simanjuntak, 2007). Mekanisme penghambatan oleh vitamin E (*α -tocopherol*) tersebut dikenal sebagai antioksidan pemecah (*scavenge*) atau pemutus rantai (*chain breaking*) (Kumalaningsih, 2006).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) secara cepat mengikat AhR, mekanisme tersebut mengakibatkan ekspresi sitokrom P450 (CYP1A1 dan CYP1B1) dalam waktu 2 jam dan mencapai puncak pada 4 jam (Doi *et al.*, 2003). Oleh sebab itu dalam penelitian ini, vitamin E (*α -tocopherol*) diberikan 4 jam setelah paparan TCDD.

3.2 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu :

1. Pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat memproteksi sel hati mencit dari kerusakan akibat paparan TCDD.
2. Pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat menurunkan kadar MDA hati mencit akibat paparan TCDD.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis dari penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Pada penelitian ini, rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima kelompok perlakuan dan ulangan masing-masing 6 ekor mencit. Kelompok perlakuan pada penelitian ini meliputi :

- Kontrol (-) : 6 ekor mencit tanpa diberi TCDD dan hanya diberi pelarut minyak jagung sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral*, sebagai kontrol negatif, selama tiga puluh lima hari.
- Perlakuan 0 : 6 ekor mencit diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* dan diberi pelarut minyak jagung sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* selama tiga puluh lima hari.
- Perlakuan 1 : 6 ekor mencit diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 11 mg/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* selama tiga puluh lima hari.
- Perlakuan 2 : 6 ekor mencit diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 20 mg/kg berat

badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* selama tiga puluh lima hari.

Perlakuan 3 : 6 ekor mencit diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 37 mg/kg berat badan/hari/ekor sebanyak 0,1 ml/hari/ekor *per-oral* selama tiga puluh lima hari.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor mencit jantan galur Balb/c umur sepuluh minggu dengan berat badan berkisar 20 gram. Dengan masa adaptasi selama satu minggu, maka umur mencit ketika akan digunakan untuk perlakuan penelitian adalah sebelas minggu. Mencit diperoleh dari Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Adapun kriteria mencit yang digunakan adalah bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak dilaporkan terdapat bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain.

4.2.2 Besar Sampel

Penentuan besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan rumus penentuan replikasi untuk RAL (Kusriningrum, 2008) yaitu dihitung berdasarkan rumus :

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

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

n: replikasi (ulangan)

Pada penelitian ini $t = 5$, sehingga $5(n-1) \geq 15$, dengan memakai rumus tersebut diperoleh jumlah $n \geq 4$, yang memiliki arti ulangan dilakukan minimum empat kali. Pada penelitian ini digunakan $n = 6$, sehingga hewan coba yang diperlukan pada penelitian ini adalah 30 ekor hewan coba. Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling*. Mencit dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan penelitian yang masing-masing perlakuan penelitian terdiri dari 6 ekor mencit. Metode pengacakan dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows 20.0*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas yaitu dosis pemberian vitamin E (*α -tocopherol*).
2. Variabel tergantung yaitu gambaran histopatologi hati mencit dan kadar MDA hati mencit.
3. Variabel kendali yaitu umur mencit, galur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan mencit, waktu perlakuan, pakan dan air minum yang diberikan serta kandang dengan kondisi yang sama.
4. Variabel antara yaitu dosis pemberian TCDD.

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

1. Vitamin E (*α -tocopherol*) merupakan suatu mikronutrien yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang bekerja menangkap radikal bebas dan mencegah terjadi reaksi berantai radikal bebas.
2. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* merupakan senyawa aromatik hidrokarbon terhalogenasi dan termasuk ke dalam golongan PCDD, yang memiliki taraf toksisitas tertinggi.
3. Dosis merupakan takaran jumlah suatu obat atau senyawa yang diberikan kepada suatu makhluk hidup dengan tujuan tertentu.
4. Gambaran histopatologi hati mencit merupakan penampakan gambaran perubahan histopatologi hati mencit setelah diberikan perlakuan, yang dilihat melalui mikroskop cahaya. Gambaran perubahan histopatologi meliputi nekrosis, degenerasi, inflamasi dan fibrosis.

5. Nekrosis merupakan kematian sel yang patologis dari jaringan tubuh tertentu pada kondisi saat masih hidup. Nekrosis merupakan proses degradatif yang sudah melanjut sehingga melampaui kemampuan reversibilitas suatu sel.
6. Degenerasi merupakan perubahan morfologik sel yang bersifat *reversible*. Perubahan degenerasi ditandai dengan terdapat akumulasi beberapa produk dari hasil metabolisme sel, seperti air, lemak, protein dan glikogen.
7. Inflamasi merupakan respon fisiologis tubuh terhadap suatu kerusakan dan gangguan oleh faktor eksternal.
8. Fibrosis merupakan pembentukan struktur menyerupai *scar* yang halus dan menyebabkan jaringan mengeras (pembentukan jaringan ikat).
9. Kadar MDA pada hati mencit, MDA merupakan produk akhir peroksidasi lipid, digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidasi.
10. Berat badan mencit sebelum perlakuan penelitian adalah berat badan rata-rata pada mencit yang diukur sebelum perlakuan penelitian dengan timbangan satuan gram (berkisar 20 gram). Umur mencit yang digunakan adalah sepuluh minggu dari galur Balb/c dengan jenis kelamin jantan.
11. Waktu perlakuan dimulai pada waktu yang sama setiap hari selama tiga puluh lima hari. Pakan dan air minum yang diberikan juga sama, yaitu pakan komersil BR1 dan air minum kemasan.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah TCDD Sigma 48599 dan vitamin E (*α-tocopherol*) Sigma T3251 *for analytical standart* yang diperoleh dari Sigma Aldrich Singapore. Minyak jaguh yang digunakan adalah Mazola®-Codaa Switzerland AG. Pakan mencit yang digunakan adalah pakan komersil BR 1. Air minum yang digunakan adalah air minum kemasan. Formalin 10% digunakan sebagai pengawet organ hati mencit setelah dipanen untuk dibuat preparat histopatologi. *Dry ice* digunakan sebagai media penyimpanan organ hati mencit untuk diperiksa kadar MDA. Bahan-bahan lain yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan-bahan untuk membuat preparat histopatologi hati mencit meliputi : air kran, alkohol (70%, 80%, 90% dan 95%), alkohol absolut (I, II dan III), alkohol asam, amoniak air, *aquadest*, *egg albumin*, *entellan*, *gliserin*, *paraffin* (I, II dan III), *paraffin cair*, *xylol* (I dan II), pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE). Bahan-bahan untuk memeriksa kadar MDA hati mencit meliputi : *Phospat Buffer Saline* (PBS) dingin, larutan *Trichloroacetat Acid* (TCA) 15%, larutan TBA 0,37% dan HCl 0,25 N.

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen-instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba berupa kandang baterai yang terbuat dari plastik berukuran 30x25x15 cm dengan penutup kandang terbuat dari kawat kasa. Setiap kandang berisi 5 ekor mencit. Tiap kandang dilengkapi dengan tempat minum *nipple* yang terbuat dari plastik dan serbuk gergaji sebagai alas kandang. Instrumen-instrumen lain yang

digunakan pada penelitian ini adalah sonde lambung, botol kaca gelap steril, *vortex*, *disposable syringe*, *needle*, mikrotip, mikropipet, masker, *hand gloves*, pinset, gunting bedah, *scalpel*, bak seksi, pot plastik, *cool box*, *dry ice*, kertas label, kertas koran, *aluminium foil*, kantung plastik, mikroskop dan mikroskop foto. Instrumen-instrumen yang digunakan untuk membuat preparat histopatologi hati mencit meliputi : alat *tissue processor*, bak rendam reagen, cetakan besi, *cover glass*, *object glass*, *hot plate*, kertas tisu, mikrotom dan *water bath*. Instrumen-instrumen yang digunakan untuk memeriksa kadar MDA hati mencit meliputi : timbangan, gelas tabung, *water bath*, mesin sentrifugasi dan spektrofotometer.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Perlakuan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya selama empat puluh dua hari, mulai bulan April hingga Mei 2013. Masa adaptasi selama tujuh hari dan masa perlakuan penelitian selama tiga puluh lima hari. Selama masa adaptasi, mencit diberikan pakan komersil BR 1 dan air minum kemasan *ad libitum*.

Pembuatan preparat histopatologi hati mencit dilakukan di Gedung *Diagnostic Center* (GDC) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo Surabaya. Pemeriksaan preparat histopatologi hati mencit dilakukan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pemeriksaan kadar MDA hati mencit dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1 Perhitungan Dosis TCDD

Dosis TCDD yang digunakan untuk penelitian ini adalah dosis tunggal pada mencit yaitu 100 ng/kg berat badan/hari/ekor. Penentuan dosis tersebut ditentukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) diberikan secara *per-oral* dengan menggunakan sonde lambung selama tiga puluh lima hari.

4.7.2 Perhitungan Dosis Vitamin E (*α-tocopherol*)

Penentuan dosis vitamin E (*α-tocopherol*) yang digunakan untuk penelitian ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.*, (2012) dengan menggunakan dosis 20, 100, dan 500 mg/kg berat badan/hari/ekor. Pada penelitian-penelitian tersebut penghambatan terhadap toksisitas TCDD oleh vitamin E (*α-tocopherol*) lebih tinggi ditemukan pada dosis vitamin E (*α-tocopherol*) terkecil yaitu 20 mg/kg berat badan/hari/ekor. Sehingga perlu dilakukan penelitian dengan rentang dosis tengah 20 mg/kg berat badan/hari/ekor.

Dosis tertinggi ditentukan berdasarkan konversi dosis manusia. Bahan makanan yang dikonsumsi manusia setiap hari rata-rata mengandung vitamin E (*α-tocopherol*) sebesar 25 IU. Untuk mendapatkan kebutuhan maksimal dari vitamin E (*α-tocopherol*) memerlukan konsumsi tambahan 100 sampai 400 IU/hari. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa hal tersebut merupakan dosis optimal untuk

mengurangi resiko penyakit kronis (*Institute of Medicine* US, 2012). Adapun konversi dosis vitamin E (*α -tocopherol*) manusia ke mencit sebagai berikut :

1. Dosis manusia 125 IU

Konversi manusia ke mencit 20 gram = 0,0026

Dosis untuk mencit 20 gram = $125 \times 0,0026 = 0,325$ IU

Dosis per-kilogram mencit per-hari = 16,25 IU/kg berat badan/hari

1 IU vitamin E (*α -tocopherol*) setara dengan 2/3 mg

Maka dosis per-kilogram mencit per-hari 11 mg/kg berat badan/hari/ekor (pembulatan).

2. Dosis manusia 425 IU

Konversi manusia ke mencit 20 gram = 0,0026

Dosis untuk mencit 20 gram = $425 \times 0,0026 = 1,105$ IU

Dosis per-kilogram mencit per-hari = 55,25 IU/kg berat badan/hari

1 IU vitamin E (*α -tocopherol*) setara dengan 2/3 mg

Maka dosis per-kilogram mencit per-hari 37 mg/kg berat badan/hari/ekor (pembulatan).

Dengan demikian rentang dosis vitamin E (*α -tocopherol*) yang akan diteliti adalah 11, 20 dan 37 mg/kg berat badan/hari/ekor.

Dosis vitamin E (*α -tocopherol*) ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$F = \sqrt{n} \sqrt{I}$$

Keterangan:

F: factor pengali

n: (jumlah dosis dalam rentang)-1

I: dosis terbesar

dosis terkecil

$$F = \sqrt[3-1]{37/11} = \sqrt[2]{37/11} = \frac{1}{2} \times \log 37/11 = \text{antilog} (1/2 \times \log 37) = 1,83$$

$$\text{Dosis 1} = 11 \text{ mg/kg berat badan/hari/ekor}$$

$$\text{Dosis 2} = 11 \times 1,83 = 20 \text{ mg/kg berat badan/hari/ekor (pembulatan)}$$

$$\text{Dosis 3} = 20 \times 1,83 = 37 \text{ mg/kg berat badan/hari/ekor (pembulatan)}$$

Vitamin E (*α-tocopherol*) diberikan secara *per-oral* dengan menggunakan sonde lambung selama tiga puluh lima hari.

4.7.3 Pembuatan Larutan Uji

Sediaan vitamin E (*α-tocopherol*) dilarutkan dalam minyak jagung untuk dibuat seri dosis yang kemudian disimpan dalam botol kaca gelap steril. Dosis yang diberikan pada mencit terdiri dari 3 seri dosis yaitu 11, 20 dan 37 mg/kg berat badan/hari. Hal yang sama dilakukan pada TCDD. Setiap botol tersebut diberi kertas label untuk menghindarkan dari faktor kekeliruan peneliti. Pembuatan sediaan TCDD terdapat pada Lampiran 2. Sedangkan, pembuatan sediaan vitamin E (*α-tocopherol*) terdapat pada Lampiran 3.

4.7.4 Tahapan Perlakuan

Pemberian TCDD dan vitamin E (*α-tocopherol*) dilakukan satu kali dalam satu hari selama tiga puluh lima hari. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) diberikan pada pagi hari pukul 09.30 WIB. Vitamin E (*α-tocopherol*) diberikan empat jam setelah pemberian TCDD yaitu pada pukul 13.30 WIB.

4.7.5 Pengambilan Organ Hati Mencit

Pengambilan organ hati mencit untuk dibuat preparat histopatologi dan pemeriksaan kadar MDA dilakukan pada akhir penelitian (hari ke-43). Mencit dikorbankan dengan cara *cervicalis dislocasio*. Setelah mati, mencit segera dibedah dan diambil organ hati dengan perhatian khusus untuk menghindari kerusakan jaringan. Organ hati mencit yang digunakan untuk pemeriksaan histopatologi dimasukkan ke dalam pot plastik yang telah diisi dengan Formalin 10% dan yang telah diberi kertas label. Organ hati mencit yang digunakan untuk pemeriksaan kadar MDA dibungkus dengan *aluminium foil* kemudian dimasukkan ke dalam pot plastik yang telah diberi kertas label dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan pemeriksaan.

4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Hati Mencit

Organ hati mencit yang telah diperoleh kemudian dibuat preparat histopatologi dengan teknik pewarnaan HE. Prosedur pembuatan preparat histopatologi hati mencit terdapat pada Lampiran 4.

4.7.7 Pemeriksaan Preparat Histopatologi Hati Mencit

Pengamatan secara mikroskopis terhadap perubahan gambaran histopatologi hati mencit pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya, mula-mula digunakan perbesaran seratus kali kemudian dilanjutkan dengan perbesaran empat ratus kali. Pengamatan setiap preparat histopatologi hati mencit dilakukan pada seluruh lapang pandang yang berbeda.

Pengamatan perubahan gambaran histopatologi hati mencit meliputi nekrosis, degenerasi, portal inflamasi dan fibrosis dilakukan dengan cara pemberian skor yaitu seperti yang tersaji pada Tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1 Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit

Bentuk Lesi	Skor	Keterangan
A. Nekrosis	0	Tidak terjadi nekrosis
	3	Nekrosis terjadi pada <25% seluruh lapang pandang
	5	Nekrosis terjadi antara 25 sampai 50% seluruh lapang pandang
	7	Nekrosis terjadi antara >50% seluruh lapang pandang
	9	Nekrosis terjadi pada 25 sampai 50% seluruh lapang pandang disertai dengan <i>bridging</i> nekrosis
	11	Nekrosis terjadi pada >50% seluruh lapang pandang disertai dengan <i>bridging</i> nekrosis
	13	Multilobular nekrosis
B. Degenerasi	0	Tidak terjadi degenerasi
	1	Jika perubahan degenerasi terjadi pada <1/3 dari seluruh lapang pandang
	3	Jika perubahan degenerasi terjadi pada 1/3 sampai 2/3 dari seluruh lapang pandang
	5	Jika perubahan degenerasi terjadi pada >2/3 dari seluruh lapang pandang
C. Inflamasi	0	Tidak ditemukan sel radang
	1	Jika ditemukan sel radang pada <1/3 total area segitiga Kiernan's
	3	Jika ditemukan sel radang pada 1/3 sampai 2/3 total area segitiga Kiernan's
	5	Jika ditemukan sel radang pada >2/3 total area segitiga Kiernan's
D. Fibrosis	0	Tidak terjadi fibrosis
	5	Jika ditemukan fibrosis <1/3 total porta hepatica
	11	Jika ditemukan fibrosis 1/3 sampai 2/3 total porta hepatica
	13	sirosis

Sumber: Knodell (2000)

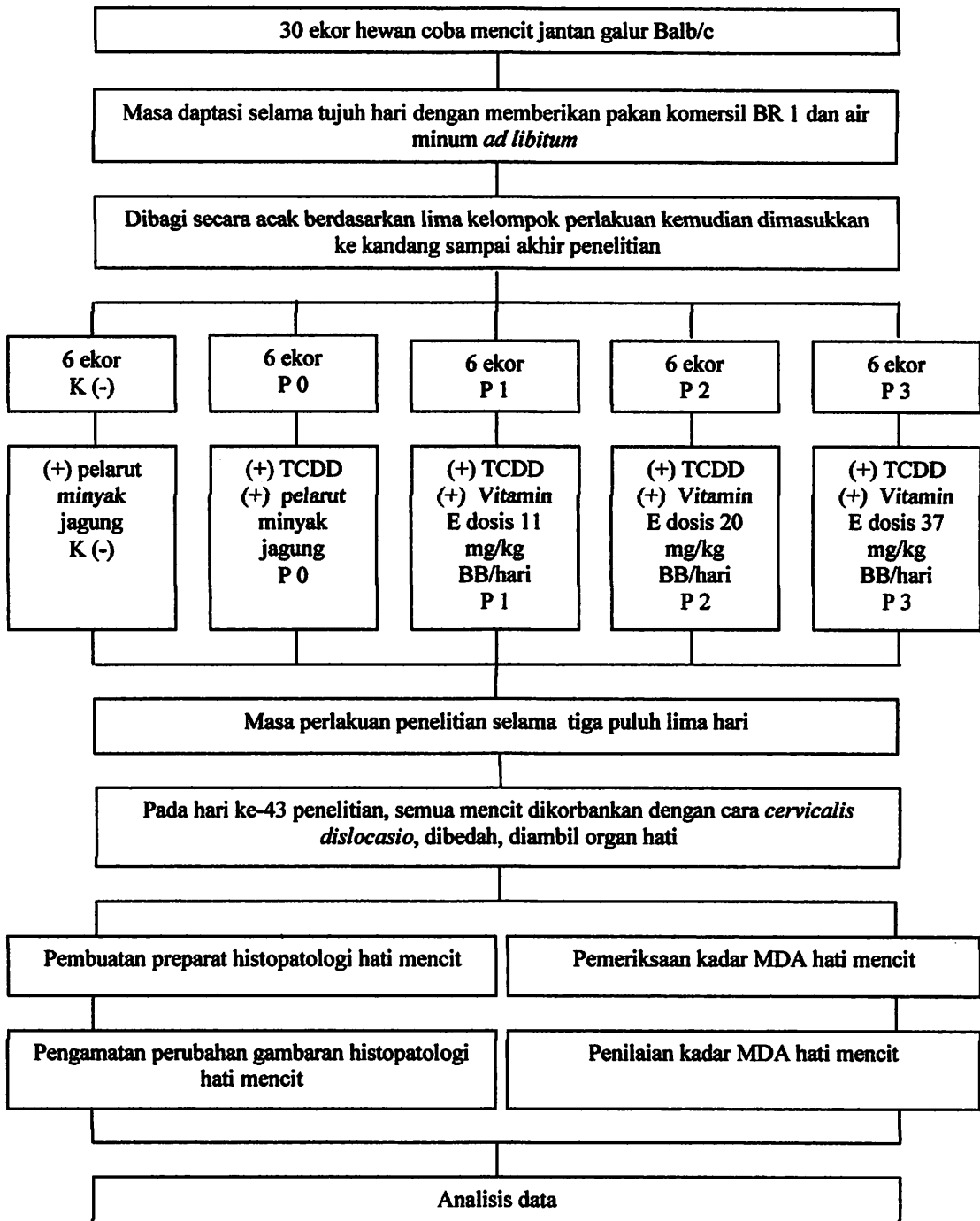
4.7.8 Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit

Organ hati mencit yang telah diperoleh kemudian diperiksa kadar MDA dengan teknik TBARS. Prosedur pemeriksaan kadar MDA hati mencit terdapat pada Lampiran 5.

4.7.9 Penilaian Kadar MDA Hati Mencit

Penilaian kadar MDA hati mencit dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan nilai kurva baku standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Kemudian nilai hasil perkalian pada kurva standar baku, dikalikan lagi dengan faktor pengenceran yang digunakan. Kadar MDA diukur berdasarkan jumlah μg atau nmol MDA pada setiap mg atau ml sampel (Rahman, 2011).

4.8 Bagan Kerangka Operasional



4.9 Cara Pengolahan Dan Analisis Data

Data yang diperoleh pada pengamatan histopatologi hati mencit diolah dengan menggunakan Uji Kruskal-Wallis karena data yang diperoleh berdasarkan *scoring* atau penilaian derajat perubahan. Apabila terdapat perbedaan nyata diantara kelompok perlakuan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney.

Data yang diperoleh pada pemeriksaan kadar MDA hati mencit diolah dengan menggunakan *Uji Analysis of Varian* (ANOVA) karena data yang diperoleh merupakan data rasio. Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan Uji Duncan. Analisis statistika pada masing-masing pengamatan dilakukan dengan menggunakan program SPSS *for Windows* 20.0.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit

Berdasarkan data skoring pada perubahan gambaran histopatologi dengan bentuk lesi nekrosis yang diperoleh, dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan diperoleh hasil $p < 0,05$ ($p = 0$). Analisis statistik tersebut disajikan pada Lampiran 8. Hasil $p < 0,05$ ($p = 0$) menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan penelitian, sehingga dilanjutkan dengan menggunakan Uji Mann-Whitney. Hasil analisis statistik tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan pada Tabel 5.1 di bawah ini.

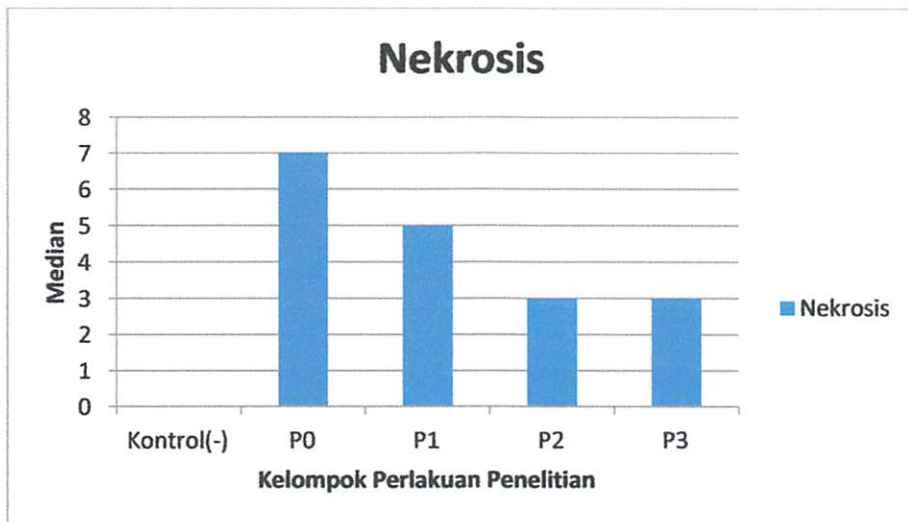
Tabel 5.1 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian

Perlakuan Penelitian	Median
Kontrol (-)	0 ^a
Perlakuan 0	7,00 ^d
Perlakuan 1	5,00 ^c
Perlakuan 2	3,00 ^{bc}
Perlakuan 3	3,00 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan analisis dengan uji Mann-Whitney diperoleh hasil bahwa kelompok Kontrol (-) (0) berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan penelitian yang lain. Kelompok Perlakuan 0 (7,00) juga berbeda nyata dengan seluruh kelompok penelitian yang lain. Kelompok Perlakuan 1 (5,00) berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan Kontrol (-) (0), kelompok Perlakuan 0 (7,00), kelompok Perlakuan 3 (3,00) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 2 (3,00).

Kelompok Perlakuan 2 (3,00) berbeda nyata dengan kelompok Kontrol (-) (1,00) dan kelompok Perlakuan 0 (7,00) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 1 (0) dan kelompok Perlakuan 3 (3,00). Kelompok Perlakuan 3 (3,00) berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan Kontrol (-) (0), kelompok Perlakuan 0 (7,00), kelompok Perlakuan 1 (5,00) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 2 (3,00). Gambaran median tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan dengan diagram batang pada Gambar 5.1 di bawah ini.



Gambar 5.1 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (nekrosis) hati mencit

Berdasarkan data skoring pada perubahan gambaran histopatologi dengan bentuk lesi degenerasi yang diperoleh, dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan diperoleh hasil $p > 0,05$ ($p = 0,795$). Analisis statistik tersebut disajikan pada Lampiran 9. Hasil $p > 0,05$ ($p = 0,795$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan penelitian,

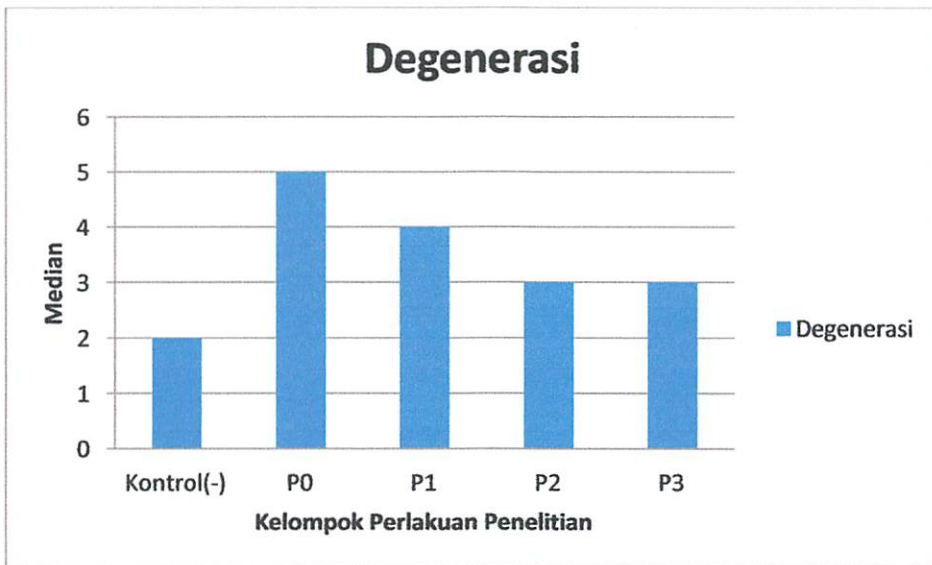
sehingga tidak dilanjutkan dengan menggunakan Uji Mann-Whitney. Hasil analisis statistik tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan pada Tabel 5.2 di bawah ini.

Tabel 5.2 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Degenerasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian

Perlakuan Penelitian	Median
Kontrol (-)	2,00 ^a
Perlakuan 0	5,00 ^a
Perlakuan 1	4,00 ^a
Perlakuan 2	3,00 ^a
Perlakuan 3	3,00 ^a

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$).

Gambaran median tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan dengan diagram batang pada Gambar 5.2 di bawah ini.



Gambar 5.2 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (degenerasi) hati mencit.

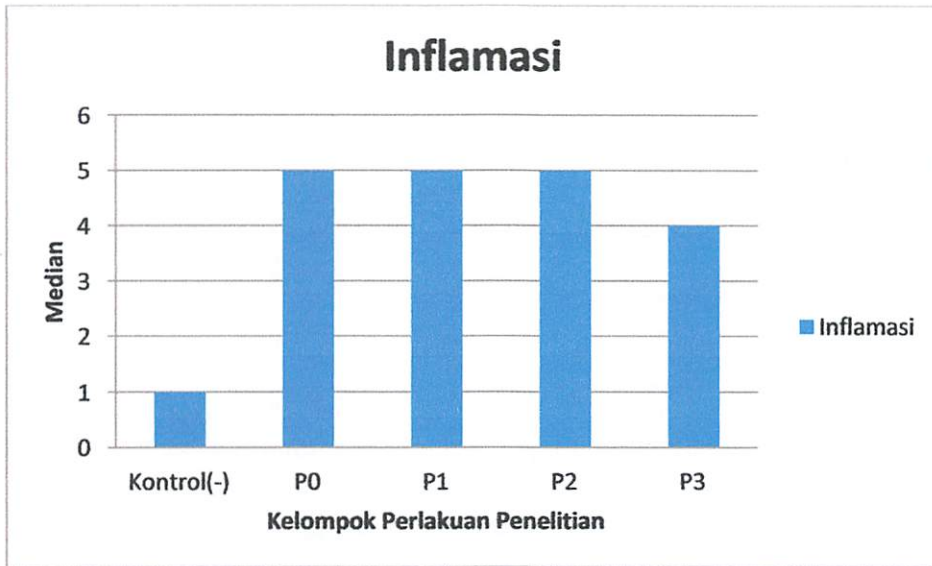
Berdasarkan data skoring pada perubahan gambaran histopatologi dengan bentuk lesi inflamasi yang diperoleh, dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan diperoleh hasil $p < 0,05$ ($p = 0,003$). Analisis statistik tersebut disajikan pada Lampiran 10. Hasil $p < 0,05$ ($p = 0,003$) menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan penelitian. Sehingga dilanjutkan dengan menggunakan Uji Mann-Whitney. Hasil analisis statistik tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan pada tabel 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.3 Median Perubahan Gambaran Histopatologi (Inflamasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian

Perlakuan Penelitian	Median
Kontrol (-)	1,00 ^a
Perlakuan 0	5,00 ^b
Perlakuan 1	5,00 ^b
Perlakuan 2	5,00 ^b
Perlakuan 3	4,00 ^b

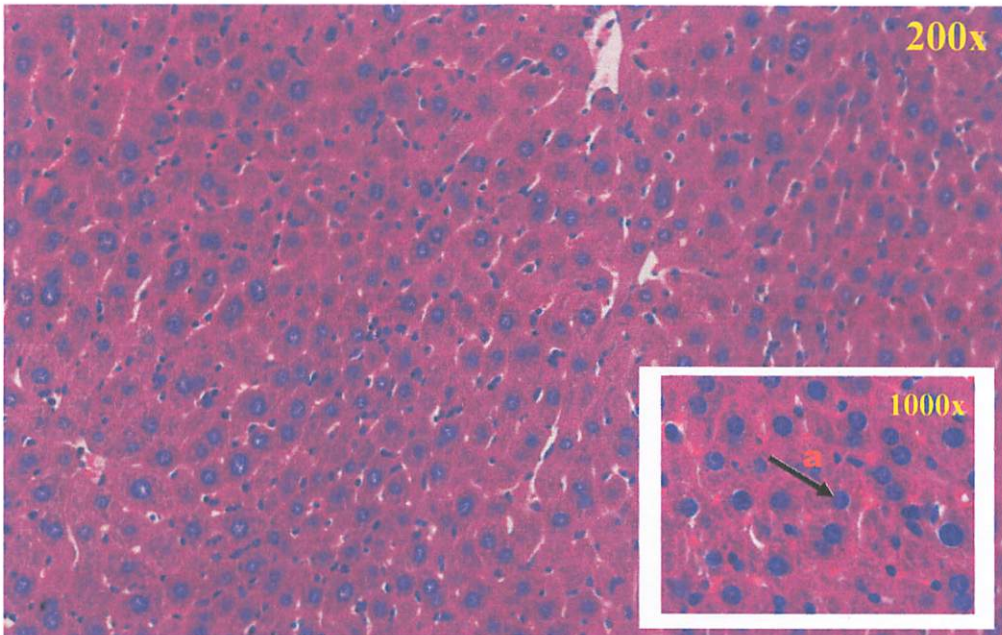
Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan analisis dengan uji Mann-Whitney diperoleh hasil bahwa kelompok Kontrol (-) (1,00) berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan penelitian yang lain. Akan tetapi, tidak terdapat perbedaan nyata diantara kelompok Perlakuan 0 (5,00), Perlakuan 1 (5,00), Perlakuan 2 (5,00) dan Perlakuan 3 (4,00). Gambaran median tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan dengan diagram batang pada Gambar 5.3 di bawah ini.



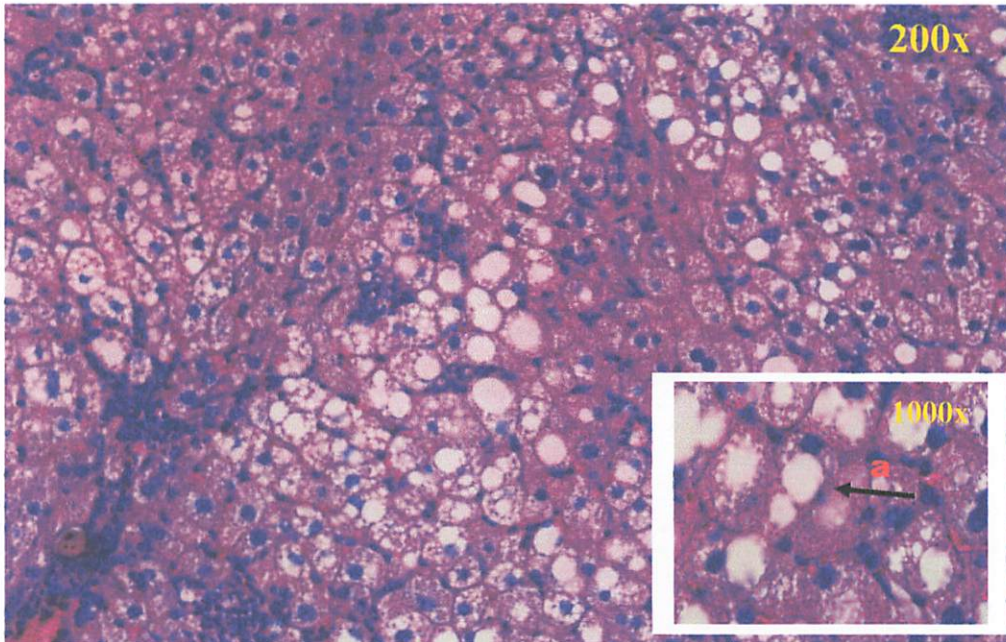
Gambar 5.3 Diagram batang median perubahan gambaran histopatologi (inflamasi) hati mencit

Pada Gambar 5.4 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Kontrol (-), merupakan kelompok perlakuan penelitian yang tidak diberi TCDD dan hanya diberi pelarut minyak jagung. Sebagian besar sel-sel hepatosit tampak normal. Tampak dengan jelas inti sel-sel hepatosit, yang memiliki satu atau dua inti yang bulat dengan satu atau lebih nukleolus. Susunan sel-sel hepatosit juga masih tampak teratur.



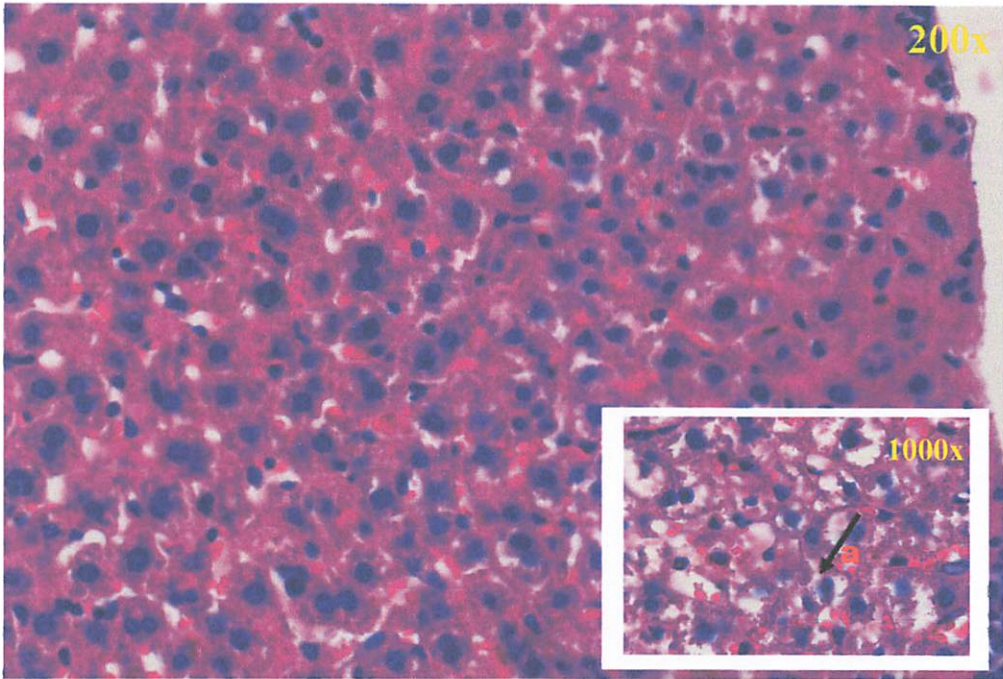
Gambar 5.4 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Kontrol (-) dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang normal.

Pada Gambar 5.5 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0, merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung. Sel-sel hepatosit mengalami degenerasi melemap yang meluas. Degenerasi melemap ditandai dengan manifestasi vakuola berwarna putih yang ditunjukkan dengan anak panah.



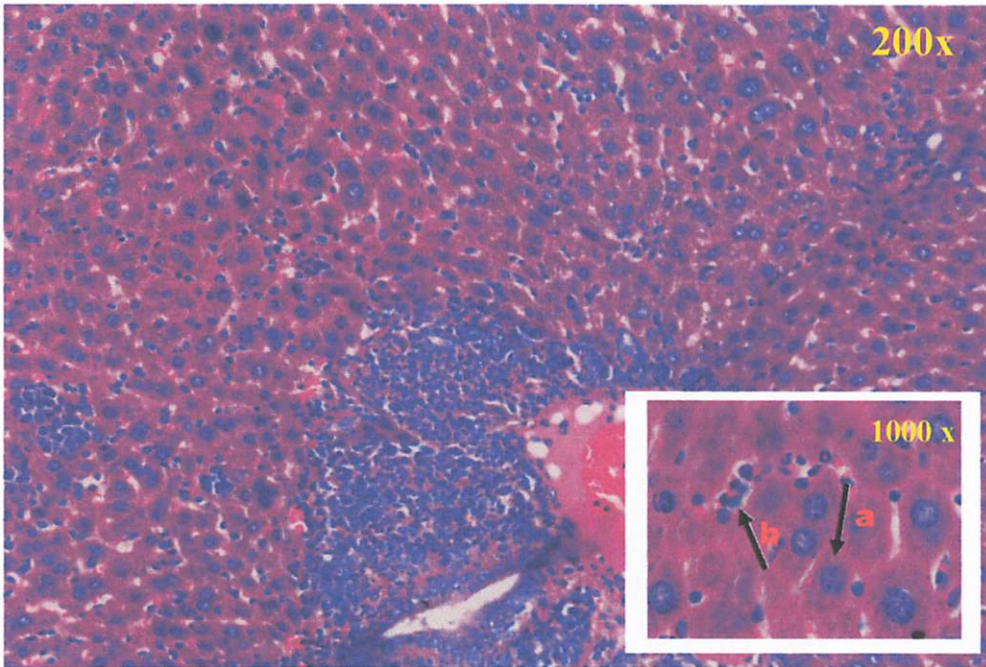
Gambar 5.5 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang mengalami degenerasi melemak.

Pada Gambar 5.6 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0, merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung., Sebagian besar sel-sel hepatosit mengalami nekrosis. Nekrosis pada sel-sel hepatosit ditandai dengan gambaran pepadatan kromatin inti sel (piknosis) yang ditunjukkan dengan anak panah, pecahnya inti sel (karyoreksis) hingga hilangnya inti sel (karyolisis). Sinusoid hati juga tampak melebar yang menunjukkan adanya kerusakan pada hati.



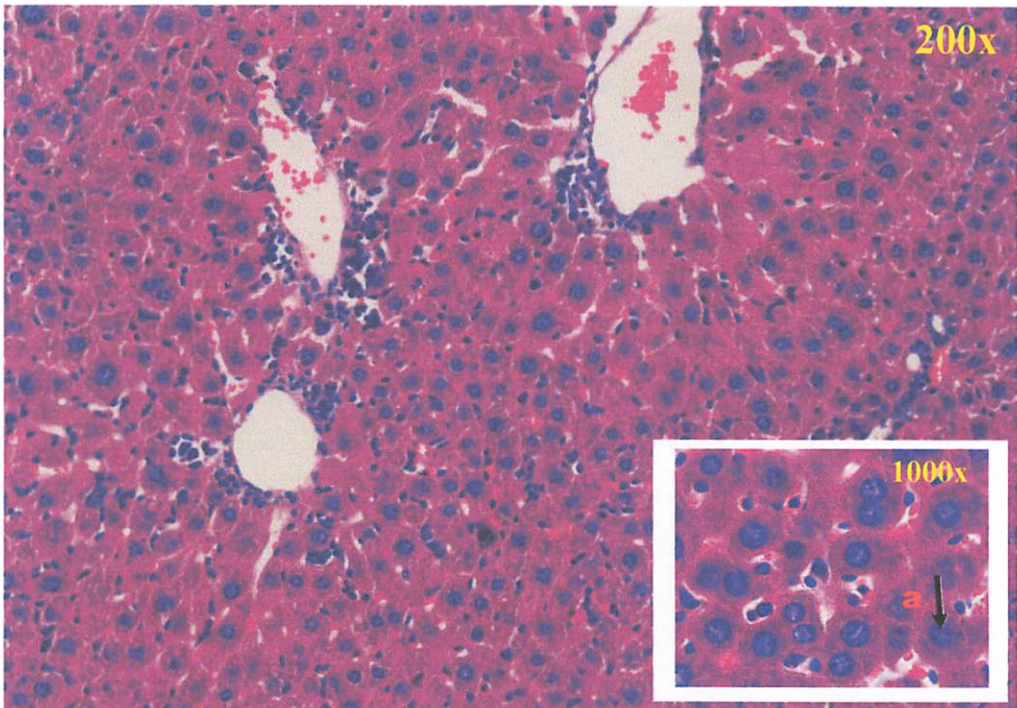
Gambar 5.6 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang mengalami nekrosis dengan pepadatan kromatin inti sel (piknosis).

Pada Gambar 5.7 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 1, merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 11 mg/kg berat badan/hari. Tampak penurunan jumlah sel-sel hepatosit yang mengalami nekrosis. Namun sel-sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik masih cukup banyak. Tampak terdapat infiltrasi sel radang di sinusoid hati.



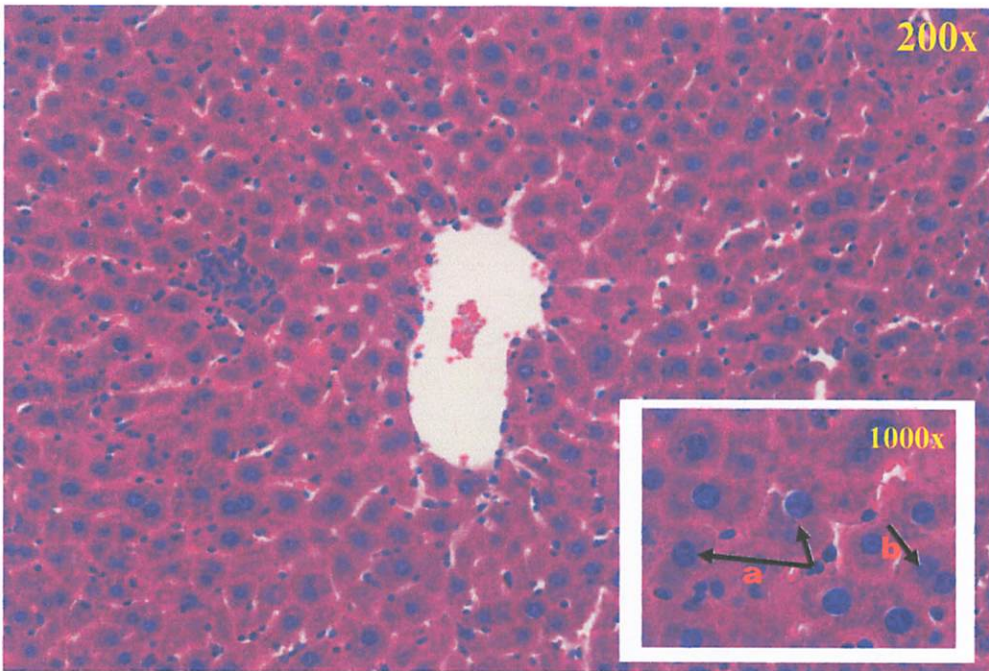
Gambar 5.7 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 1 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik, (b) merupakan infiltrasi sel radang pada sinusoid hati.

Pada Gambar 5.8 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 2, merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Masih tampak sel-sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik. Degenerasi hidropik ditandai dengan sel-sel hepatosit yang membengkak sehingga mendesak sinusoid hati dan tampak lebih pucat.



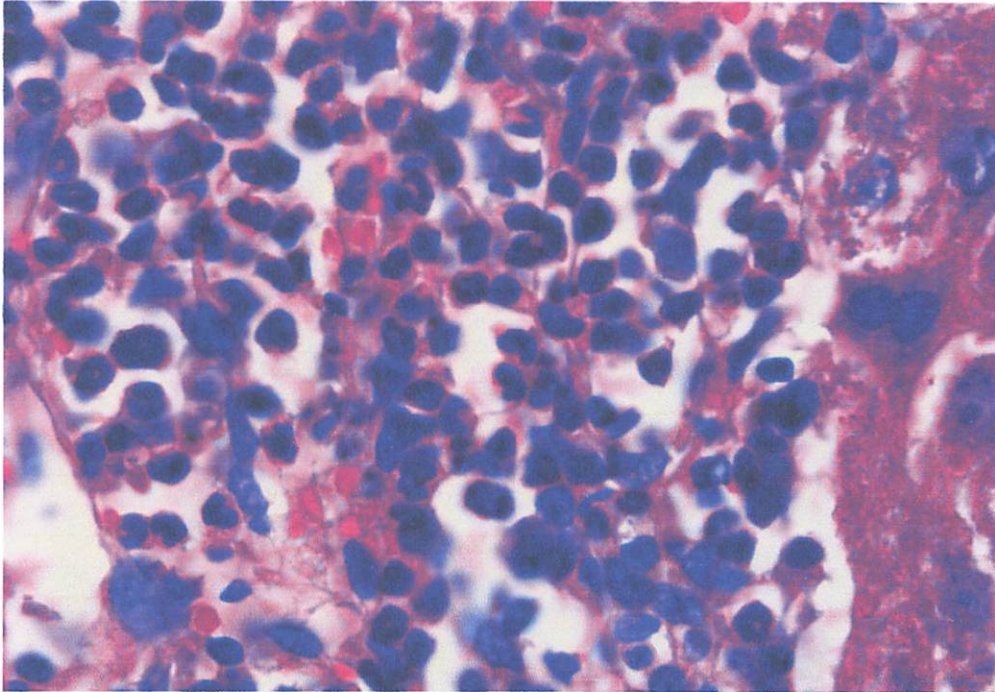
Gambar 5.8 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 2 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik.

Pada Gambar 5.9 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 3, merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 37 mg/kg berat badan/hari..Sebagian sel-sel hepatosit tampak normal namun sebagian lagi sel-sel hepatosit mengalami degenerasi hidropik.



Gambar 5.9 Gambaran mikroskopis hati mencit pada kelompok Perlakuan 3 dengan pewarnaan HE perbesaran 200 kali dan 1000 kali. Ditunjukkan dengan anak panah (a) merupakan sel hepatosit yang normal, (b) merupakan sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik.

Pada Gambar 5.10 di bawah ini merupakan gambaran mikroskopis hati mencit dengan bentuk lesi inflamasi. Pada kelompok Perlakuan 0, 1, 2 dan 3 terdapat inflamasi meskipun dengan intensitas yang relatif menurun. Inflamasi pada kelompok perlakuan penelitian tersebut didominasi oleh limfosit.

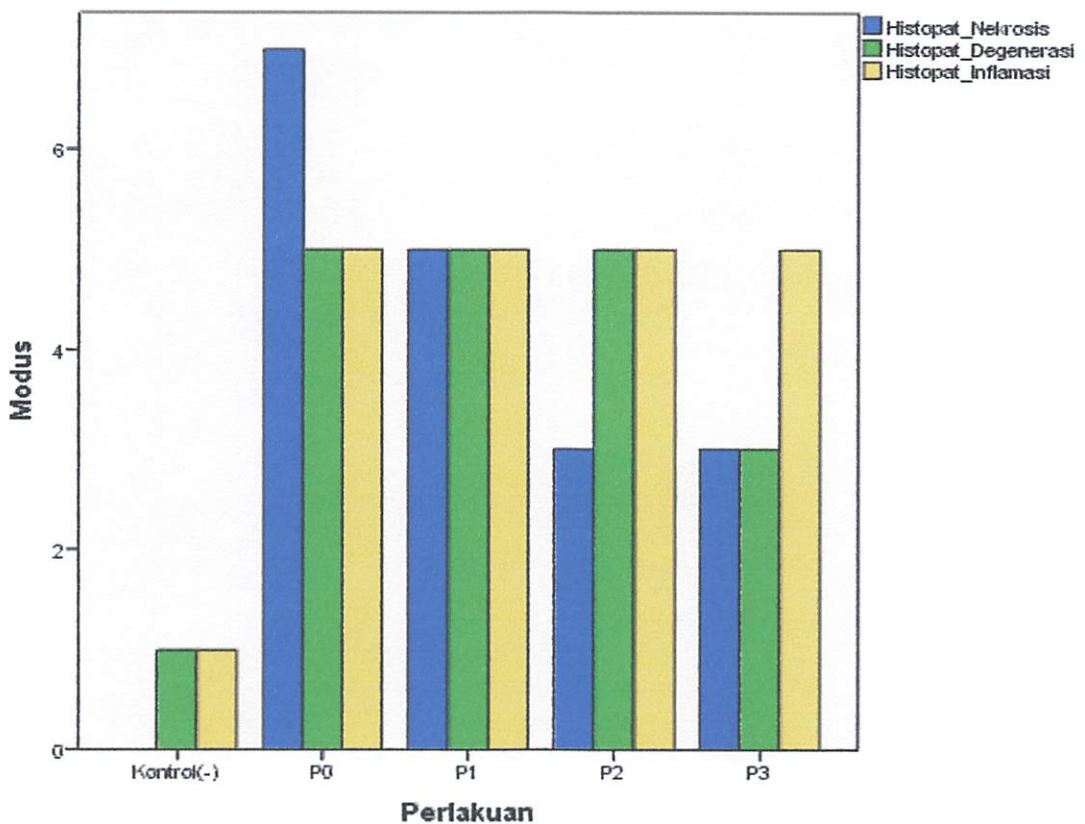


Gambar 5.10 Gambaran mikroskopis hati mencit dengan bentuk lesi inflamasi pada kelompok Perlakuan 0 dengan pewarnaan HE perbesaran 1000 kali.

Data skoring pada perubahan gambaran histopatologi dengan bentuk lesi nekrosis, degenerasi dan inflamasi yang diperoleh dari tiap kelompok perlakuan, juga dilakukan analisis statistik untuk mendapatkan modus, yaitu frekuensi skor yang sering muncul pada tiap perubahan dari tiap kelompok perlakuan. Tujuan mendapatkan modus adalah untuk melihat aktivitas proteksi vitamin E (*α-tocopherol*).

Tabel 5.4 Modus Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis, Degenerasi dan Inflamasi) Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian

Perlakuan	Histopat-Nekrosis	Histopat-Degenerasi	Histopat-Inflamasi
Kontrol (-)	0	1	1
P0	7	5	5
P1	5	5	5
P2	3	5	5
P3	3	3	5



Gambar 5.11 Diagram batang modus perubahan gambaran histopatologi hati mencit

Berdasarkan diagram batang modus perubahan gambaran histopatologi hati mencit tersebut dapat diketahui pertama untuk nekrosis, pada kelompok perlakuan Kontrol (-) skor nekrosis yang sering muncul adalah 0, memiliki arti dari enam

ulangan banyak yang tidak terjadi nekrosis. Pada kelompok Perlakuan 0 skor nekrosis yang sering muncul adalah 7, memiliki arti dari enam ulangan nekrosis banyak terjadi antara >50% seluruh lapang pandang. Pada kelompok Perlakuan 1 skor nekrosis yang sering muncul adalah 5, memiliki arti dari enam ulangan nekrosis banyak terjadi antara 25 sampai 50% seluruh lapang pandang. Pada kelompok Perlakuan 2 dan Perlakuan 3 skor nekrosis yang sering muncul adalah 3, memiliki arti dari enam ulangan nekrosis banyak terjadi pada <25% seluruh lapang pandang.

Kedua untuk degenerasi, pada kelompok perlakuan Kontrol (-) skor degenerasi yang sering muncul adalah 1, memiliki arti dari enam ulangan degenerasi banyak terjadi pada <1/3 dari seluruh lapang pandang. Pada kelompok Perlakuan 0, Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 skor degenerasi yang sering muncul adalah 5, memiliki arti dari enam ulangan banyak terjadi pada >2/3 dari seluruh lapang pandang. Pada kelompok Perlakuan 3 skor degenerasi yang sering muncul adalah 3, memiliki arti dari enam ulangan banyak terjadi pada 1/3 sampai 2/3 dari seluruh lapang pandang.

Ketiga untuk inflamasi, pada kelompok Perlakuan Kontrol (-) skor inflamasi yang sering muncul adalah 1, memiliki arti dari enam ulangan inflamasi (sel radang) banyak ditemukan pada <1/3 total area segitiga Kiernan's. Pada kelompok Perlakuan 0, Perlakuan 1, Perlakuan 2 dan Perlakuan 3 skor inflamasi (sel radang) yang sering muncul adalah 5, memiliki arti dari enam ulangan banyak ditemukan pada >2/3 total area segitiga Kiernan's.

5.2 Data Kadar MDA Hati Mencit

Berdasarkan data yang diperoleh, dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA dan diperoleh hasil $p < 0,05$ ($p = 0$). Analisis statistik tersebut disajikan pada Lampiran 11. Hasil $p < 0,05$ ($p = 0$) menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan menggunakan Uji Duncan. Hasil analisis statistik tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan pada Tabel 5.5 di bawah ini.

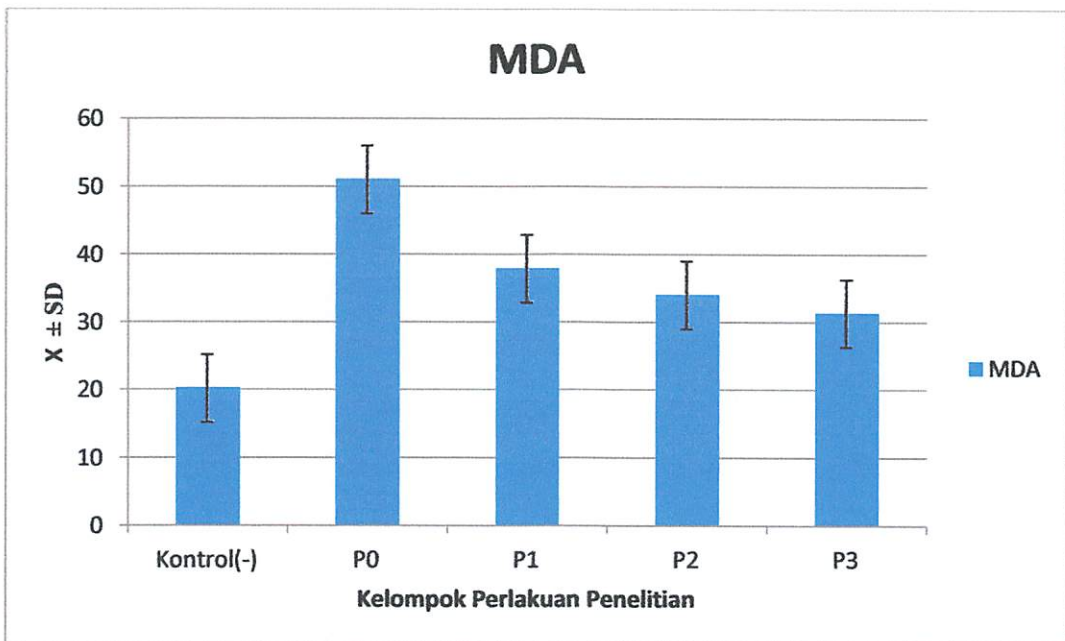
Tabel 5.5 Mean dan Standar Deviasi Kadar MDA Hati Mencit Dari Seluruh Kelompok Perlakuan Penelitian

Perlakuan	$\bar{X} \pm SD$
Kontrol (-)	$20,29667^a \pm 4,949422$
Perlakuan 0	$51,10833^d \pm 3,932114$
Perlakuan 1	$38,00717^c \pm 6,331380$
Perlakuan 2	$34,12433^{bc} \pm 5,198830$
Perlakuan 3	$31,39383^b \pm 3,171820$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan analisis dengan uji Duncan, maka diperoleh hasil bahwa kelompok Kontrol (-) (20,29667) berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan penelitian yang lain. Kelompok Perlakuan 0 (51,10833) juga berbeda nyata dengan seluruh kelompok penelitian yang lain. Kelompok Perlakuan 1 (38,00717) berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan Kontrol (-) (20,29667), kelompok Perlakuan 0 (51,10833), kelompok Perlakuan 3 (31,39383) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 2 (34,12433). Kelompok Perlakuan 2 berbeda nyata dengan kelompok Kontrol (-) (20,29667) dan kelompok Perlakuan 0 (51,10833) tetapi tidak

berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 1 (38,00717) dan kelompok Perlakuan 3 (31,39383). Kelompok Perlakuan 3 (31,39383) berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan Kontrol (-) (20,29667), kelompok Perlakuan 0 (51,10833), kelompok Perlakuan 1 (38,00717) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 2 (34,12433). Gambaran mean tiap kelompok perlakuan penelitian disajikan dengan diagram batang pada Gambar 5.1 di bawah ini.



Gambar 5.12 Diagram batang mean kadar MDA hati mencit

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit

Pengamatan terhadap perubahan gambaran histopatologi hati (sel-sel hepatosit) mencit dengan bentuk lesi nekrosis menunjukkan, median tertinggi terdapat pada kelompok Perlakuan 0 (7,00). Perlakuan 0 merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung. Kelompok Perlakuan 0 menimbulkan efek toksik pada hati (sel-sel hepatosit). Hal ini dapat diketahui dengan membandingkan pada kelompok Kontrol (-) (0). Adikwu *and* Nelson (2012) menyatakan bahwa hati sering menjadi organ sasaran senyawa-senyawa yang bersifat toksik karena sebagian besar senyawa-senyawa tersebut memasuki tubuh melalui sistem gastrointestinal dan setelah diserap kemudian dibawa oleh vena porta menuju ke hati. Nekrosis adalah perubahan yang bersifat *irreversible*. Sel yang mengalami nekrosis tidak dapat kembali lagi seperti semula. Pada titik akhir nekrosis, sel akan mengalami kematian (Onyema *et al.*, 2006).

Median pada kelompok Perlakuan 1 (5,00), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 11 mg/kg berat badan/hari, mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 0 (7,00), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung. Hal serupa juga terjadi pada kelompok

Perlakuan 2 (3,00), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Serta pada kelompok Perlakuan 3 (3,00), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi vitamin E (*α-tocopherol*) dengan dosis 37 mg/kg berat badan/hari. Hal ini menunjukkan terdapat efek proteksi oleh vitamin E (*α-tocopherol*) terhadap paparan TCDD. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dapat memproteksi kerusakan hati (sel-sel hepatosit) karena fungsi vitamin E (*α-tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas, yang dibentuk oleh senyawa-senyawa yang bersifat toksik, yang pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan komponen seluler. Menurut Hariyatmi (2004), vitamin E (*α-tocopherol*) merupakan baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi lipid (pada PUFA) yang terdapat dalam membran sel, fosfolipid pada mitokondria, retikulum endoplasma serta membran plasma yang memiliki afinitas terhadap vitamin E (*α-tocopherol*) karena vitamin E (*α-tocopherol*) banyak terkonsentrasi pada bagian-bagian tersebut.

Pengamatan terhadap perubahan gambaran histopatologi hati (sel-sel hepatosit) mencit dengan bentuk lesi degenerasi menunjukkan, pada seluruh kelompok perlakuan, median relatif sama (Perlakuan Kontrol (-) (2,00), Perlakuan 1 (4,00), Perlakuan 2 (3,00) dan Perlakuan 3 (3,00), walaupun pada kelompok Perlakuan 0 (5,00) memiliki median yang tertinggi. Degenerasi yang tampak pada pengamatan secara mikroskopis adalah degenerasi hidropik dan degenerasi melemak. Degenerasi adalah perubahan yang bersifat *reversible*, yaitu dapat kembali seperti

semula. Hal tersebut berarti apabila paparan yang menyebabkan kerusakan dihentikan, maka sel akan kembali normal seperti saat sebelum diberi paparan (Onyema *et al.*, 2006). Pada kelompok Kontrol (-) juga terdapat degenerasi dimungkinkan bukan karena faktor patologis akibat paparan TCDD. Hal tersebut dapat terjadi karena faktor fisiologis dari tiap individu hewan coba atau dapat karena faktor dari hati (sel-sel hepatosit) yang mudah mengalami kerusakan karena fungsinya yang memetabolisme berbagai senyawa atau benda asing yang memasuki tubuh (Simanjuntak, 2007).

Secara teoritis, proses kerusakan hati dimulai dari proses degenerasi dengan ciri pembengkakan sel. Perlakuan dengan paparan TCDD tampak menyebabkan cairan ekstraseluler memasuki sitosol dalam jumlah besar. Menurut Karami (2001) dan Zodrow (2004), salah satu perubahan yang disebabkan oleh senyawa-senyawa yang bersifat toksik dan dapat menyebabkan terbentuk radikal bebas, yaitu perubahan sifat-sifat membran sel dan membran sitoplasma pada komponen seluler, seperti mitokondria dan lisosom yang diakibatkan oleh peroksidasi lipid yang terjadi. Setelah merusak membran sel, senyawa-senyawa toksik juga dapat mencapai dan merusak inti sel, yang mengakibatkan struktur sel menjadi tidak normal dan berlanjut pada nekrosis. Nekrosis merupakan degradasi atau disorganisasi sel yang bersifat *irreversible* atau kematian sel sebagai akibat pengaruh jejas, dengan perubahan morfologi yang nyata pada inti sel sebagai piknosis (pemadatan kromatin inti sel), karyoreksis (pecahnya inti sel) dan karyolisis (hilangnya inti sel) (Onyema *et al.*, 2006).

Inflamasi adalah respon fisiologis tubuh terhadap suatu kerusakan dan gangguan oleh faktor eksternal. Inflamasi terbagi menjadi dua pola dasar. Inflamasi akut adalah radang yang berlangsung relatif singkat, dari beberapa menit sampai beberapa hari dan ditandai dengan perubahan vaskuler, eksudasi cairan dan protein plasma serta akumulasi neutrofil yang menonjol. Inflamasi akut dapat berkembang menjadi suatu inflamasi kronis apabila agen penyebab kerusakan masih tetap ada. Inflamasi kronis adalah respon proliferasi, terjadi proliferasi fibroblas, endotelium vaskuler dan infiltrasi sel mononuklear (limfosit, sel plasma dan makrofag). Respon peradangan meliputi suatu perangkat kompleks yang mempengaruhi perubahan vaskuler dan seluler (Onyema *et al.*, 2006).

Median perubahan gambaran histopatologi hati (sel-sel hepatosit) mencit dengan bentuk inflamasi terendah terdapat pada kontrol (-) (1,00). Hal tersebut menunjukkan tidak terdapat agen penyebab kerusakan yang mampu menimbulkan inflamasi yang parah. Sedangkan, pada kelompok perlakuan yang lain memiliki nilai median yang relatif sama (Perlakuan 0 (5,00), Perlakuan 1 (5,00), Perlakuan 2 (5,00) dan Perlakuan 3 (4,00). Infiltrasi sel radang di ruang sinusoid, daerah porta dan daerah vena sentralis didominasi oleh sel-sel limfosit.

Dari hal tersebut diatas dapat diketahui bahwa vitamin E (*α -tocopherol*) mampu memproteksi hati (sel-sel hepatosit) dari kerusakan. Dan dengan melihat modus tiap perubahan gambaran histopatologi pada tiap kelompok perlakuan, dapat diketahui kemampuan vitamin E (*α -tocopherol*) tersebut lebih menonjol pada kemampuan memproteksi dari kejadian perubahan nekrosis daripada perubahan

degenerasi dan inflamasi. Dengan dosis yang semakin meningkat (11, 20 dan 37 mg/kg berat badan/hari), proteksi vitamin E (*α-tocopherol*) semakin meningkat yang ditandai dengan penurunan perubahan nekrosis yang terjadi.

6.2 Kadar MDA Hati Mencit

Pada kelompok Perlakuan 0 ($51,10833 \pm 3,932114$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung, terjadi peningkatan mean kadar MDA apabila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (-) ($20,29667 \pm 4,949422$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang tanpa diberi TCDD dan hanya diberi pelarut minyak jagung. Hal ini menunjukkan bahwa TCDD mampu menyebabkan terjadi stres oksidasi dalam tubuh. Ketika TCDD masuk ke dalam tubuh dan menembus membran sel, akan berikatan dengan reseptor spesifik, yaitu AhR yang berada di sitosol kemudian berpindah ke dalam inti sel. Di inti sel, AhR yang telah berikatan dengan TCDD membentuk dimer dengan protein ARNT. Dalam kompleks senyawa TCDD-AhR-ARNT, mengikat elemen DNA tertentu yaitu DRE. Ikatan tersebut akan meningkatkan ekspresi sitokrom P450, terutama CYP1A1 dan CYP1B1 (Doi *et al.*, 2003).

Membran sel terdiri dari banyak komponen penting, yaitu fosfolipid, glikolipid (banyak mengandung PUFA), kolesterol dan protein (Suryohudoyo, 2007). *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) sangat peka terhadap radikal hidroksil (OH•). Proses oksidasi PUFA oleh radikal hidroksil (OH•) sering disebut dengan peroksidasi

lipid. Peroksidasi PUFA merupakan suatu reaksi rantai radikal bebas yang diinisiasi oleh abstraksi atom hidrogen oleh radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dan membentuk suatu produk, yaitu radikal radikal lipid. Apabila radikal lipid bereaksi dengan oksigen, maka akan terbentuk radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$). Radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$) dapat mengabstraksi atom hidrogen pada lemak yang lain. Apabila hal tersebut terjadi, maka akan terbentuk radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$). Radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) adalah produk primer peroksidasi yang bersifat sangat sitotoksik. Proses dari peroksidasi lipid tersebut menghasilkan suatu produk, yaitu MDA. *Malondialdehyde* (MDA) terbentuk dari radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) yang sudah dipecah menjadi produk peroksidasi lipid sekunder (Young and Woodside., 2000; Fang *et al.*, 2002; Niki, 2008).

Mean kadar MDA pada kelompok Perlakuan 1 ($38,00717 \pm 6,331380$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi vitamin E (*α -tocopherol*) dengan dosis 11 mg/kg berat badan/hari, mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 0 ($51,10833 \pm 3,932114$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi pelarut minyak jagung. Hal serupa juga terjadi pada kelompok Perlakuan 2 ($34,12433 \pm 5,198830$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan diberi vitamin E (*α -tocopherol*) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Serta pada kelompok Perlakuan 3 ($31,39383 \pm 3,171820$), yaitu kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100 ng/kg berat badan/hari dan

diberi vitamin E (*α -tocopherol*) dengan dosis 37 mg/kg berat badan/hari. Hal tersebut terjadi terkait dengan kemampuan vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan dan penghambat peroksidasi lipid (Sahin *et al.*, 2001). Vitamin E (*α -tocopherol*) menghambat mekanisme pengrusakan hati (sel-sel hepatosit) dengan cara menghambat aktivasi dan pembentukan radikal bebas (Adikwu *and* Nelson, 2012)

Proses peroksidasi lipid berawal dari radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang bereaksi dengan lemak menghasilkan radikal lipid. Untuk melanjutkan siklus, radikal lipid akan bereaksi dengan oksigen dan membentuk radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$) kemudian berlanjut membentuk radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$). Dengan mekanisme seperti tersebut yang berulang-ulang akan mengakibatkan peningkatan radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$). Radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) bersifat sangat sitotoksik. Apabila jumlah radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) terbentuk banyak, maka kerusakan hati (sel-sel hepatosit) akan terjadi (Niki, 2008).

Vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas memiliki kemampuan memindahkan atom hidrogen ke radikal peroksil ($\text{CO}_2\cdot$) (Simanjuntak, 2007). Dengan keberadaan vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai penghambat peroksidasi lipid, maka radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) yang terbentuk akan diikat oleh tokoferol menjadi radikal tokoferoksil ($\text{TOO}\cdot$). Radikal tokoferoksil ($\text{TOO}\cdot$) tidak bersifat sitotoksik seperti radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$). Fungsi utama *tocopherol* mengikat radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) sebelum radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) mengikat substansi lain. Dengan pengikatan radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}\cdot$) oleh *tocopherol* tersebut, maka rantai pembentukan radikal

bebas dalam tubuh dapat dihambat sehingga stres oksidasi dapat dihentikan. Hal ini mengakibatkan kerusakan hati (sel-sel hepatosit) dapat berkurang atau bahkan dapat dicegah (Wresdiyawati dkk., 2007; Setiawan dan Suhartono, 2007).

Apabila dibandingkan mean kadar MDA antara kelompok Perlakuan 1 ($38,00717 \pm 6,331380$), Perlakuan 2 ($34,12433 \pm 5,198830$) dan Perlakuan 3 ($31,39383 \pm 3,171820$) semakin menurun. Hal tersebut menunjukkan terdapat pengaruh dosis vitamin E (*α -tocopherol*) dalam hal kemampuan memproteksi sel hati menciit dari kerusakan akibat paparan TCDD. Pada dasarnya kebutuhan vitamin E (*α -tocopherol*) tiap individu sangat beragam. Hal tersebut tergantung pada PUFA, karena setiap individu memiliki konsumsi PUFA yang berlainan (Sediaoetama, 2012).

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat memproteksi sel hati mencit dari kerusakan akibat paparan TCDD.
2. Pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dapat menurunkan kadar MDA hati mencit akibat paparan TCDD

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, peneliti menyarankan:

1. Bagi masyarakat umum dan masyarakat yang memiliki resiko tinggi terpapar TCDD untuk memanfaatkan potensi vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas yang ditimbulkan oleh paparan TCDD.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui aktivitas vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas yang ditimbulkan oleh paparan TCDD pada organ atau sistem organ lain.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Adikwu, E. and B. Nelson. 2012. Hepatoprotective Effect of Vitamin A. *American J. of Pharm. and Toxicol.* 7(4): 154-163.
- Alvernita, G. 2011. Gambaran Histopatologi Hati Mencit Setelah Pemberian Suspensi Daging Buah Kepel (*Stelechocarpus burahol*) Secara Intragastrik Selama 14 Hari. Artikel Penelitian Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. 10-11.
- Amalia, N. S. 2011. Buku Ajar Metabolisme Xenobiotik. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang. 12-13.
- Arkhaesi, N. 2008. Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Serum Sebagai Indikator Prognosis Keluaran Pada Sepsis Neonatorum. Tesis Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. Semarang. 10-16, 59.
- Bertazzi, P. Alberto, D. Consonni, S. Bachetti, M. Rubagotti, A. Baccarelli, C. Zocchetti and A. C. Pesatori. 2001. Health Effects of Dioxin Exposure : a 20-Year Mortality Study. *American J. of Epidemiology.* 153 (11) : 1031.
- Bintoro, V. P. 2009. Peranan Ilmu dan Teknologi Dalam Peningkatan Keamanan Pangan Asal Ternak. Pidato Pengukuhan Diucapkan Pada Peresmian Jabatan Guru Besar Dalam Teknologi Hasil Ternak Pada Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang. 14-15.
- Calkosinski, I., J. R. Tonderys, J. Bazan, K. Dzierzba, M. Calkosinska, J. Majda, M. Dobrzynski, A. B and Szydelko. 2012. The Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on Hematological Parameters during Experimentally Induced Pleuritis in Rats. 36(2): 387-404.
- Dalle, D. I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini and A. Milzani. 2006. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinic. Chem. J.* 52 : 601-623.
- Dobrzynski, M., I. Calkosinski, I. Przywitowska, J. K. Brzoza, A. C. Waszkiewicz, E. Soltan and O. Parulska. 2009. Effects of Dioxins in Environmental Pollution on Development of Tooth Disorders. *Polish J. of Environ. Stud.* 18 (3): 319-323.

- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama, and K. Nohara. 2003. Functional Activation of Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in Primary T Cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere J.* 52 : 655-662.
- Ebtekar, M. 2004. Effects of Persistent Organic Pollutants on the Immune System: the Case of Dioxin. *Iranian J. Env. Health. Sci. Eng.* 1(2): 1-7.
- EFSA. 2008. Opinion on Mixed Tocopherols, Tocotrienol Tocopherol and Tocotrienols as Sources for Vitamine E Added as a Nutritional Substance in Food Supplements. *The European Food Safety Authority (EFSA) J.* 640 : 1-34.
- EPA. 2012. EPA's Reanalysis of Key Issues Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS Comments, Volume 1 (CAS No. 1746-01-6). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 1-344.
- Evstigneva, R. P., I. M. Volkov and V. V. Chudinova. 2001. Vitamin E as a Universal Antioxidant and Stabilizer of Biological Membranes. *Lomonov Moscow State Academy J. of Fine Chem. Techno.* 12(2): 151-172.
- Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu. 2002. Free Radicals, Antioxidan and Nutrition-Regulation of Physiological System by Nutrients. *Nutr. J.* 18 : 872-879.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9.* Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 1124.
- Guyton A. C. and J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 11.* Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 902-908.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal bebas Pada Usia Lanjut. *MIPA.* 14(1): 54.
- Haskito, A. E. P. 2011. Efek Pemberian Ekstrak Daun Srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap Gambaran Histopatologi Bursa Fabricius dan Limpa Ayam Pedaging yang Diinfeksi Virus *Infectious Bursal Disease*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 52-57.
- Hassoun, E. A., F. Li, A. Abuchaban and S. J. Stohs. 2000. The Relative Abilities of TCDD and Its Congener to Induce Oxidative Stress in the Hepatic and Brain Tissue of Rats after Subchronic Exposure. *Toxicol. J.* 145: 103-113.

- Hilscherova, K., A. L. Blankenship, M. Nie, K. K. Coady, B. L. Upham, J. E. Trosko and J. P. Giesy. 2003. Oxidative Stress in Liver and Brain of the Hatchling Chicken (*Gallus domesticus*) Following in Ovo Injection with TCDD. *J. of Comparative Biochem. and Physio. Part. C.* 136: 29-45.
- Hutahaean, S. 2010. Kajian Palatogenesis Mencit (*Mus musculus* L.) Akibat Pemberian 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Disertasi Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1-3.
- Hwang, S. Y., J. J. Wee, J. B. Yang, T. W. Song and K. Y. Nam. 2001. Effect of Crude Ginseng Saponin on Clinical Pathological Parameters of the Female Adult Guinea Pigs Exposed to 2,3,7,8-TCDD. *J. Biomed. Lab. Sci.* 7: 197-203.
- Juniarti. 2005. Pengaruh Dioksin Terhadap Kesehatan. *Jurnal Kedokteran Yarsi.* 13 (2) : 244-252.
- Jurczuk, M., J. M. Jakoniuk, M. M. Brzoska and A. Roszczenko. 2005. Vitamins E and C Concentrations in the Liver and Kidney of Rats Exposed to Cadmium and Ethanol. *Polish J. of Environ. Stud.* 14 (5) : 599-604.
- Karami, M., M. G. Khansari, M. Rezayat, B. Minaei, M. Abdollahi, O. Sabzevari. 2001. Histopathological Study of TCDD by Isolated Rat Liver Perfusion System. *Medic. J. of the Islamic Republic of Iran.* Vol. 15 (1) : 55-60.
- Katzung, B. G. 2001. *Basic and Clinical Pharmacology.* 8th ed. Lange Medical Book Mc.Graw-Hill. Medical Publishing Devision. USA. 21-35.
- Kern, P. A., R. B. Fishman, W. Song, A. D. Brown and V. Fonseca. 2002. The Effect of 2,3,7,8-TCDD on Oxidative Enzyme in Adipocytes and Liver. *Toxicol. J.* 171: 117-125.
- Kim, H. S., S. Y. Park, K. Y. Yoo, S. K. Lee and W. W. Jung. 2012. Induction of Heat Shock Proteins and Antioxidant Enzymes in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Rats. *Korean J. Phys. Pharm.* 16: 469-476.
- Kniec, Z. 2001. Cooperation of Liver Cells in Health and Disease. *J. of Anato. Embrio. Cell. Bio.* 161 (3-13) : 1-151.
- Knodell. 2000. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis: the Knodell Histology Activity Index and Beyond. *Hepatology.* 31 (1): 241-246.

- Konig, D. and A. Berg. 2002. Exercise and Oxidative Stress : is there a Need for Additional Antioxidant. *Osterreichisches J. Fur Sportmedizin*. 3 : 6-15.
- Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami : Penangkap Radikal Bebas*. Trubus Agrisarana. Surabaya. 7-22.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 31-32.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 5-7, 25-26.
- Lee, H. C., S. G. Hwang, Y. G. Lee., H. O. Sohn, D. W. Lee, S. Y. Hwang, Y. S., Kwak, J. J. Wee, W. H. Joo, Y. K. Cho and J. Y. Moon. 2002. In Vivo Effects of *Panax* Ginseng Extracts on the Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase System in the Liver of 2,3,7,8-TCDD Exposed Guinea Pig. *Life Scienc. J.* 71: 759-769.
- Liu, J., H. C. Yeo., D. E. Overvik., T. Hagen., S. J. Doniger., D. W. Chu., G. A. Brooks and B. N. Ames. 2000. Chronically and Acutely Exercised Rats: Biomarkers of Oxidative Stress and Endogenous Antioxidant. *J. Appl. Physiol.* 89: 21-28.
- Llobet, J. M., J. L. Domingo, A. Bocio, C. Casas, A. Teixido, and L. Muller. 2003. Human Exposure to Dioxins Through the Diet in Catalonia, Spain : Carcinogenic and Non-Carcinogenic Risk. *Chemosphere J.* 50 : 1193-1200.
- Maslachah, L., R. Sugihartuti, R. Kurniasanti. 2008. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida (O_2^-) oleh Antioksidan Vitamin E (*α -tokoferol*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik. *Media Kedokteran Hewan.* 24 (1) : 21-26.
- Massaad, C., F. Entezami, L. Massade, M. Benahmed, F. Olivennes, R. Barouki, and S. Hamamah. 2002. How can Chemical Compounds Alter Human Fertility ?. *European J. of Obste. and Gyneco. and Repro. Bio.* 100 (2) : 127-137.
- Nazrun, A. S., N. M. F. Azlina, M. Norazlina, Y. Kamisah, M. S. Qodriyah, A. Y. Azma, M. Alini. 2011. Effects of Phytosterol Supplementation on Lipid Peroxidation Induced by Carbon Tetrachloride in a Rat Model. *Med. and Health J.* 6 (1) : 25-32.
- Niki, E. 2008. Lipid Peroxidation Products as Oxidative Stress Biomarkers. *Bio. Factors J.* 34: 171-180.

- Onyema, O. O., E. O. Farombi, G. O. Emerole, A. I. Ukoha and G. O. Onyeze. 2006. Effect of Vitamin E on Monosodium Glutamate Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats. *Indian J. of Biochem. and Biophys.* 43: 20-23.
- Prasetyastuti dan Sunarti. 2008. Vitamin E dan Malondialdehida Darah Wanita Hamil di Daerah Endemik Gondok di Jawa Tengah. *Berita Kedokteran Masyarakat.* 24(2): 65-68.
- Priscilla, M. C. and H. S. Thompson. 2000. Antioxidants: What Role do They Play in Physical and Health. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 637-646.
- Rahman, M. N. 2011. Perbedaan Penggunaan Berbagai Diluter Terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Frisian Holstein* (FH) pada Proses Pembekuan. Tesis Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 35-36.
- Ratnayanti, I. G. A. D. 2011. Pemberian Growth Hormone Memperbaiki Profil Lipid Dan Menurunkan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) Pada Tikus Jantan Yang Dislipidemia. Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Udayana. Denpasar. 22-26.
- Ray, P. K. and A. K. Prasad. 1992. Immunotoxic and other Health Effects of TCDD and Toxic Oil. In: *Principles and Practice of Immunotoxicology*. Blacwell Scientific Publications. Boston. 251-256.
- Sahin, K., N. Sahin, M. Onderci, S. Yaralioglu and O. Kucuk. 2001. Protective Role of Supplemental Vitamin E on Lipid Peroxidation, Vitamin E, A and Some Mineral Concentrations of Broiler Reared Under Heat Stress. *Original Paper. Vet. Med. Czech.* 46(5): 140-144.
- Saragih, H. T. S. 2005. Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis (EEP) Terhadap Hepatotoksisitas dan Stres Oksidasi Akibat Pemberian 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) Secara Kronis Pada Tikus Albino (*Sprague Dawley*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 7-9.
- Sareharto, T. P. 2010. Kadar Vitamin E Rendah Sebagai Faktor Resiko Peningkatan Bilirubin Serum Pada Neonatus. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang. 24-30.

- Schechter, A., P. Cramer, K. Bogges, J. Stanley, O. Papke, J. Olson, A. Silver and M. Schmitz. 2001. Intake of Dioxin and Related Compounds from Food in the U.S. Population. *J. of Toxicol. and Environ. Health.* 63 : 1-18.
- Schechter, A., L. Birnbaum, J. J. Ryan and J. D. Constable. 2005. Dioxins: An Overview. *Review Environmental Research.* Article in Press Science Direct. 1-10.
- Sediaoetomo, A. D. 2012. Ilmu Gizi untuk Mahasiswa dan Profesi Jilid 1. Dian Rakyat. Jakarta. 123-126.
- Setiawan, B. dan E. Suhartono. 2007. Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif pada Bayi Prematur. *Majalah Kedokteran.* 57 (1) : 10-14.
- Simanjuntak, K. 2007. Radikal Bebas Dari Senyawa Toksik Karbontetraklorida (CCl₄). *Bina Widya.* 18 (01): 7-31.
- Son, W. K., D. Y. Lee, S. H. Lee, W. A. Joo and C. W. Kim. 2003. Analysis of Proteins Expressed in Rats Plasma Exposed to Dioxin Using 2-Dimensional Gel Electrophoresis. *Proteomic. J.* 3: 2393-2401.
- Spiridonova, L. N., 2003. Genetic and Taxonomic Diversity of the House Mouse *Mus musculus* from the Asian Part of the Former Soviet Union, Russia. *Genetic. J.* 40 (10) : 1134-1143.
- Sugiyanto. 2006. Peran Aktivasi Metabolik Pada Toksikologi Biokimiawi Xenobiotik. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 13-16.
- Suharjono. 2006. Penentuan Isoform Sitokrom P450 Potensial Pada Metabolisme Obat Dengan Model Obat Gliklazid. *J. Farmasi Indonesia.* 3 (1): 28-37.
- Suryohudoyo, P. 2007. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. Sagung Seto. Surabaya. 31-47.
- Susanti, R. 2000. Efek 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) terhadap Gambaran Hematologik, Respon Imun Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 6-23.
- Susanti, R., S. I. O. Salasia dan S. Mangkoewidjodjo. 2001. Efek 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) terhadap Respon Imun Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Agrosains.* 14 (2): 153-164.

- Susanti, R., H. T. Saragih dan S. I. O. Salasia. 2001. Intoksikasi 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD): II. Efek terhadap Gambaran Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *J. Sain Vet.* 19 (1): 14-19.
- Susanti, R., S. I. O. Salasia dan Nuryanto. 2002. Intoksikasi 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD): II. Efek terhadap Histopatologi Hati, Ginjal dan Paru Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Biota.* 7 (1): 29-36.
- Tuminah, S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronis. *Review Research. Cermin Dunia Kedokteran.* 128 : 49-51.
- Warlina, L. 2008. Model Dampak Pencemaran Untuk Penyusunan Kebijakan Pengendalian Dioksin/Furan (Studi Kasus Industri Logam di Kawasan Cilegon). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 13-20.
- Winarti, C. dan S. J. Munarso. 2005. Kajian Kontaminasi Dioksin Pada Bahan Pangan. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Inovatif Pascapanen Untuk Pengembangan Industri Berbasis Pertanian.* 1208-1216.
- Yang, Y. M., D. Y. Huang, G. F. Liu, J. C. Zhong, K. Du, Y. F. Li and X. H. Song. 2005. Inhibitory Effects of Vitamin A on TCDD-induced Cytochrome P-4501A1 Enzyme Activity and Expression. *Toxicological Science.* 85 : 727-734.
- Yin, H. P., J. P. Xu, X. Q. Zhou and Y. Wang. 2012. Effects of Vitamin E on Reproductive Hormones and Testis Structure in Chronic Dioxin-Treated Mice. *Toxicol and Industrial Health.* J. 28 (2) : 152-168.
- Yoshida, R. and Y. Ogawa. 2000. Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-TCDD: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins. *Indust. Health.* J. 38: 5-14.
- Yossa, I. 2008. Profil Toksisitas Limbah Kerak Kilang Minyak (Green Coke) Terhadap Mencit (*Mus musculus*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 14-15.
- Young, I. S. and J. V. Woodside. 2000. Antioxidants in Health and Disease. *Clinic. Pathol. J.* 54: 176-186.
- Zodrow, J. M., J. J. Stegeman, R. L. Tanguay. 2004. Histological Analysis of Acute Toxicity of 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) in Zebrafish. *J. of Aquatic Toxicol.* 66 : 25-38.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekam Data Berat Badan Mencit Selama Perlakuan Penelitian

	Masa Adaptasi	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4	Minggu 5
Kontrol (-)	20	40	35	35	30	30
	20	35	35	30	30	30
	20	45	35	30	30	30
	20	35	35	35	30	30
	20	40	35	35	30	30
	20	35	35	35	30	30
Total	120	230	210	200	180	180
Rata-rata	20	38,333	35	33,333	30	30
Perlakuan 0	20	35	25	20	20	15
	20	30	25	25	20	15
	20	35	25	20	20	15
	20	30	25	20	20	15
	20	30	20	20	15	15
	20	30	25	20	20	15
Total	120	190	145	125	115	90
Rata-rata	20	31,667	24,167	20,833	19,167	15
Perlakuan 1	20	30	25	25	25	20
	20	30	25	25	25	20
	20	35	30	25	25	20
	20	30	25	25	25	15
	20	35	30	25	20	15
	20	35	30	25	20	20
Total	120	195	165	150	140	110
Rata-rata	20	32,5	27,5	25	23,333	18,333
Perlakuan 2	20	30	30	30	30	25
	20	30	30	30	25	25
	20	35	30	25	25	25
	20	30	25	25	25	25
	20	35	30	25	25	25
	20	35	30	25	25	25
Total	120	195	175	160	155	150
Rata-rata	20	32,5	29,167	26,667	25,833	25
Perlakuan 3	20	30	30	30	30	30
	20	30	30	30	30	30
	20	30	30	30	30	30
	20	30	30	30	30	25
	20	30	30	25	25	25
	20	30	30	30	25	25
Total	120	180	180	175	170	165
Rata-rata	20	30	30	29,167	28,333	27,5

Keterangan: Berat badan mencit dalam satuan gram

Lampiran 2. Pembuatan Sediaan TCDD

1. Sediaan TCDD = 10 µg dalam 10 ml pelarut
 = 1 µg dalam 1 ml pelarut
 = 1000 ng dalam 1 ml pelarut
2. Dosis TCDD yang digunakan dalam perlakuan penelitian = 100 ng/kg berat badan/hari/ekor.
3. Pembuatan sediaan TCDD sebagai berikut:

Perlakuan 0-Minggu 1
<p>TCDD = 100 ng x $\frac{31,667 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 3,1667 ng/ekor Untuk 6 ekor = 6 x 3,1667 ng = 19,0002 ng Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml Jadi : 19,0002 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
Perlakuan 0-Minggu 2
<p>TCDD = 100 ng x $\frac{24,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 2,4167 ng/ekor Untuk 6 ekor = 6 x 2,4167 ng = 14,5002 ng Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml Jadi : 14,5002 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
Perlakuan 0-Minggu 3
<p>TCDD = 100 ng x $\frac{20,833 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 2,0833 ng/ekor Untuk 6 ekor = 6 x 2,0833 ng = 12,4998 ng Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml Jadi : 12,4998 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>

Perlakuan 0-Minggu 4

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{19,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,9167 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,9167 \text{ ng}$$

$$= 11,5002 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 11, 5002 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 0-Minggu 5

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{15 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,5 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,5 \text{ ng}$$

$$= 9 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 9 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 1

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{32,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 3,25 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 3,25 \text{ ng}$$

$$= 19,5 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 19,5 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 2

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{27,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 2,75 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,75 \text{ ng}$$

$$= 16,5 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 16,5 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 3

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{25 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 2,5 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,5 \text{ ng}$$

$$= 15 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 15 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 4

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{23,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 2,3333 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,3333 \text{ ng}$$

$$= 13,9998 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 13,9998 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 5

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{18,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,8333 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,8333 \text{ ng}$$

$$= 10,9998 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 10,9998 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 2-Minggu 1

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{32,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 3,25 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 3,25 \text{ ng}$$

$$= 19,5 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 19,5 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 2-Minggu 2
<p>TCDD = $100 \text{ ng} \times \frac{29,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ $= 2,9167 \text{ ng/ekor}$ Untuk 6 ekor = $6 \times 2,9167 \text{ ng}$ $= 17,5002 \text{ ng}$ Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ $= 0,6 \text{ ml}$ Jadi : 17,5002 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
Perlakuan 2-Minggu 3
<p>TCDD = $100 \text{ ng} \times \frac{26,667 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ $= 2,6667 \text{ ng/ekor}$ Untuk 6 ekor = $6 \times 2,6667 \text{ ng}$ $= 16,0002 \text{ ng}$ Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ $= 0,6 \text{ ml}$ Jadi : 16,0002 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
Perlakuan 2-Minggu 4
<p>TCDD = $100 \text{ ng} \times \frac{25,833 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ $= 2,5833 \text{ ng/ekor}$ Untuk 6 ekor = $6 \times 2,5833 \text{ ng}$ $= 15,4998 \text{ ng}$ Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ $= 0,6 \text{ ml}$ Jadi : 15,4998 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
Perlakuan 2-Minggu 5
<p>TCDD = $100 \text{ ng} \times \frac{25 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ $= 2,5 \text{ ng/ekor}$ Untuk 6 ekor = $6 \times 2,5 \text{ ng}$ $= 15 \text{ ng}$ Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ $= 0,6 \text{ ml}$ Jadi : 15 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>

Perlakuan 3-Minggu 1

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{30 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 3 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 3 \text{ ng}$$

$$= 18 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 18 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 2

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{30 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 3 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 3 \text{ ng}$$

$$= 18 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 18 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 3

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{29,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 2,9167 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,9167 \text{ ng}$$

$$= 17,5002 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 17,5002 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 4

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{28,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 2,8333 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,8333 \text{ ng}$$

$$= 16,9998 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 16,9998 ng TCDD *ad* 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 5

$$\text{TCDD} = 100 \text{ ng} \times \frac{27,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$
$$= 2,75 \text{ ng/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 2,75 \text{ ng}$$
$$= 16,5 \text{ ng}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$
$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 16,5 ng TCDD ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Lampiran 3. Pembuatan Sediaan Vitamin E (*α-tocopherol*)

1. Sediaan Vitamin E (*α-tocopherol*) = 5 gram dalam 25 ml pelarut
 - = 5000 mg dalam 25 ml pelarut
 - = 200 mg dalam 1 ml pelarut
 - = 200 mg dalam 1000 µl pelarut
2. Dosis TCDD yang digunakan dalam perlakuan penelitian = 11, 20 dan 37 mg/kg berat badan/hari/ekor.
3. Pembuatan sediaan Vitamin E Dosis 11 mg/kg berat badan/hari sebagai berikut:

Perlakuan 1-Minggu 1
Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) = $11 \text{ mg} \times \frac{32,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 0,3575 mg/ekor
Untuk 6 ekor = $6 \times 0,3575 \text{ mg}$ = 2,145 mg
Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 µl pelarut
$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ µl}} = \frac{2,145 \text{ mg}}{X}$
X = 10,725 µl
Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ = 0,6 ml
Jadi : 10,725 µl vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung
Perlakuan 1-Minggu 2
Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) = $11 \text{ mg} \times \frac{27,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 0,3025 mg/ekor
Untuk 6 ekor = $6 \times 0,3025 \text{ mg}$ = 1,815 mg
Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 µl pelarut
$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ µl}} = \frac{1,815 \text{ mg}}{X}$
X = 9,075 µl
Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = $6 \times 0,1 \text{ ml}$ = 0,6 ml
Jadi : 9,075 µl vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 3

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 11 \text{ mg} \times \frac{25 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 0,275 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 0,275 \text{ mg}$$

$$= 1,65 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{1,65 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 8,25 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 8,25 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 4

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 11 \text{ mg} \times \frac{23,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 0,2566 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 0,2566 \text{ mg}$$

$$= 1,5396 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{1,5396 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 7,698 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 7,698 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 1-Minggu 5

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 11 \text{ mg} \times \frac{18,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 0,2016 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 0,2016 \text{ mg}$$

$$= 1,2096 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{1,2096 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 6,048 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 6,048 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

4. Pembuatan sediaan Vitamin E Dosis 20 mg/kg berat badan/hari sebagai berikut:

<p style="text-align: center;">Perlakuan 2-Minggu 1</p> <p>Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) = 20 mg x $\frac{32,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 0,65 mg/ekor</p> <p>Untuk 6 ekor = 6 x 0,65 mg = 3,9 mg</p> <p>Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 µl pelarut</p> $\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{3,9 \text{ mg}}{X}$ <p>X = 19,5 µl</p> <p>Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml</p> <p>Jadi : 19,5 µl vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
<p style="text-align: center;">Perlakuan 2-Minggu 2</p> <p>Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) = 20 mg x $\frac{29,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 0,5833 mg/ekor</p> <p>Untuk 6 ekor = 6 x 0,5833 mg = 3,4998 mg</p> <p>Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 µl pelarut</p> $\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{3,4998 \text{ mg}}{X}$ <p>X = 17,499 µl</p> <p>Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml</p> <p>Jadi : 17,499 µl vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>
<p style="text-align: center;">Perlakuan 2-Minggu 3</p> <p>Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) = 20 mg x $\frac{26,667 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$ = 0,5333 mg/ekor</p> <p>Untuk 6 ekor = 6 x 0,5333 mg = 3,1998 mg</p> <p>Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 µl pelarut</p> $\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{3,1998 \text{ mg}}{X}$ <p>X = 15,999 µl</p> <p>Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor = 6 x 0,1 ml = 0,6 ml</p> <p>Jadi : 15,999 µl vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung</p>

Perlakuan 2-Minggu 4

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 20 \text{ mg} \times \frac{25,833 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \\ = 0,5167 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 0,5167 \text{ mg} \\ = 3,1002 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{3,1002 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 15,501 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml} \\ = 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 15,501 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 2-Minggu 5

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 20 \text{ mg} \times \frac{25 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \\ = 0,5 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 0,5 \text{ mg} \\ = 3 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{3 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 15 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml} \\ = 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 15 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

5. Pembuatan sediaan Vitamin E Dosis 37 mg/kg berat badan/hari sebagai berikut:**Perlakuan 3-Minggu 1**

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 37 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \\ = 1,11 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,11 \text{ mg} \\ = 6,66 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{6,66 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 33,3 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml} \\ = 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 33,3 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 2

$$\text{Vitamin E (}\alpha\text{-tocopherol)} = 37 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,11 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,11 \text{ mg}$$

$$= 6,66 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{6,66 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 33,3 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 33,3 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 3

$$\text{Vitamin E (}\alpha\text{-tocopherol)} = 37 \text{ mg} \times \frac{29,167 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,079 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,079 \text{ mg}$$

$$= 6,474 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{6,474 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 32,37 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 32,37 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 4

$$\text{Vitamin E (}\alpha\text{-tocopherol)} = 37 \text{ mg} \times \frac{28,333 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}}$$

$$= 1,048 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,048 \text{ mg}$$

$$= 6,288 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{6,288 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 31,44 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 31,44 μ l vitamin E (*α -tocopherol*) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Perlakuan 3-Minggu 5

$$\text{Vitamin E } (\alpha\text{-tocopherol}) = 37 \text{ mg} \times \frac{27,5 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \\ = 1,0175 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Untuk 6 ekor} = 6 \times 1,0175 \text{ mg} \\ = 6,105 \text{ mg}$$

Sediaan vitamin E = 200 mg dalam 1000 μ l pelarut

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{6,105 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 30,525 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume pelarut minyak jagung yang dibutuhkan untuk 6 ekor} = 6 \times 0,1 \text{ ml} \\ = 0,6 \text{ ml}$$

Jadi : 30,525 μ l vitamin E (α -tocopherol) ad 0,6 ml pelarut minyak jagung

Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Hati Mencit

Pembuatan preparat histopatologi hati mencit dilakukan di GDC RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dengan tahap-tahap :

1. Fiksasi dan Pencucian

Bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme jaringan, mencegah terjadi degenerasi jaringan pasca mati, mematikan kuman atau bakteri, menjadikan jaringan lebih keras sehingga lebih mudah untuk dipotong dan meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna.

Bahan : Formalin 10% dan air kran

Alat : Pot plastik

Cara kerja :

Setelah mencit dimatikan, kemudian dilakukan pembedahan guna mengambil organ hati. Organ hati difiksasi dengan larutan BNF 10% dalam pot plastik selama 4 sampai 24 jam. Kemudian organ hati yang telah dipotong dengan ketebalan 0,5 cm dan lebar 1 cm, dicuci dengan air mengalir selama 10 menit.

2. Dehidrasi dan *Clearing*

Bertujuan untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Bahan : alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut I, II, III, *xylol* I dan II.

Alat : *tissue processor*

Cara kerja :

Organ hati yang telah dicuci dengan air keran selama 10 menit lalu dimasukkan ke *tissue processor* berisi bahan dengan urutan sebagai berikut : alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), alkohol absolut (I, II dan III), *xylol* (I dan II) masing-masing selama 1 jam.

3. Infiltrasi (*Embeding*)

Bertujuan untuk menginfiltrasi jaringan dengan *paraffin*. *Paraffin* akan menembus ruang antar sel dan dalam sel sehingga jaringan lebih tahan terhadap pemotongan.

Bahan : *paraffin* I, II dan III

Alat : *tissue processor*

Cara kerja :

Organ hati dimasukkan ke *tissue processor* berisi bahan dengan urutan sebagai berikut : *paraffin* I, II dan III yang mencair masing-masing selama 1 jam.

4. Pembuatan Balok *Paraffin*

Bertujuan agar jaringan mudah dipotong.

Bahan : *paraffin* cair dan *gliserin*

Alat : cetakan besi dan pinset

Cara kerja :

Disiapkan beberapa cetakan besi yang sebelumnya telah diolesi *gliserin*. *Gliserin* dengan maksud untuk mencegah *paraffin* cair yang panas melekat. Cetakan besi diisi *paraffin* yang masih cair. Jaringan hati kemudian diletakkan ke dalam cetakan besi dengan bantuan pinset, ditunggu sampai *paraffin* cair membeku dan mengeras.

5. Pengirisan dengan Mikrotom

Bertujuan untuk mendapatkan jaringan setipis mungkin agar dapat dilihat di bawah mikroskop.

Bahan : *egg albumin*

Alat : mikrotom, *water bath*, *hot plate*, *obyek glass* dan kertas tisu.

Cara kerja :

Balok *paraffin* yang telah mengeras dengan jaringan hati di dalam, kemudian dipotong dengan menggunakan mikrotom. Mikrotom dibersihkan terlebih dahulu, digosok dengan kertas tisu pada bagian rel hingga bersih. Mata pisau dipasang pada gagang pisau, kemudian dipasang pada mikrotom. Balok sediaan dipasang pada mikrotom, diatur tinggi rendah permukaan horisontal, diatur sudut permukaan organ dengan arah potongan pisau harus membentuk sudut 45° dan tebal potongan diatur $3\ \mu\text{m}$, untuk organ yang keras ketebalannya kurang lebih $5\ \mu\text{m}$. Pemotongan dilakukan secara acak, tiap 10 kali pemotongan diambil satu dengan ketebalan 5 sampai $7\ \mu\text{m}$, kemudian jaringan hati dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu 20°C sampai 30°C agar mengembang dengan baik. Jaringan hati kemudian diletakkan pada *obyek*

glass yang telah diolesi *egg albumin*, kemudian dikeringkan di atas *hot plate* dengan suhu 60°C.

6. Pewarnaan

Bertujuan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Terdapat dua macam pewarnaan jaringan pada pemeriksaan histopatologi, yaitu pewarnaan umum dan pewarnaan khusus. Pewarnaan umum yaitu dengan HE yang mewarnai inti sel dengan *Hematoxylin* dan sitoplasma dengan *Eosin*. Pewarnaan khusus hanya dilakukan untuk mengidentifikasi atau membantu diagnosa yang tidak dapat dilakukan dengan pewarnaan umum. Pewarnaan jaringan dengan HE dapat terlihat bagian-bagian sel, inti berwarna biru sedangkan sitoplasma berwarna merah.

Bahan : zat warna HE, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), alkohol absolut (I, II dan III), *xylol* (I dan II), *paraffin* (I, II dan III), alkohol asam, amoniak air, *aquadest* dan air kran.

Alat : *obyek glass* dengan sayatan jaringan hati diatas, bak rendam reagen dan kertas tisu.

Cara kerja :

Obyek glass dengan sayatan jaringan hati di bagian atas diwarnai dengan HE dengan menggunakan Metode Harris. Pertama *obyek glass* dimasukkan dalam *xylol* I selama 5 menit dan *xylol* II selama 3 sampai 4 menit. Kemudian secara berurutan dimasukkan dalam alkohol absolut (I, II dan III), alkohol (95%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 3 sampai 4 menit dan air keran selama 5 menit. Proses

tersebut bertujuan untuk menghilangkan *paraffin*. Kemudian secara berurutan dimasukkan ke dalam zat warna *Hematoxylin* selama 3 sampai 10 menit, air kran selama 5 menit, alkohol asam sebanyak 3 sampai 10 kali pencelupan, air keran selama 5 menit, amoniak air selama 2 menit, air kran selama 5 menit, *aquadest* selama 3 menit, zat warna *Eosin* selama 3 menit dan dimasukkan lagi ke *aquadest* selama 3 menit. Proses lebih lanjut bertujuan untuk mendehidrasi air dari proses pewarnaan, yaitu secara berurutan dimasukkan dalam alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), alkohol absolut (I, II dan III), *xylol* (I dan II) masing-masing selama 3 menit. Setelah itu *obyek glass* dengan sayatan jaringan hati diatas dibersihkan dari sisa pewarnaan dengan menggunakan kertas tisu dan dibiarkan mengering.

7. *Mounting*

Bahan : *entellan*

Alat : *cover glass* dan *obyek glass* dengan sayatan jaringan hati diatas yang telah mengalami proses pewarnaan.

Cara kerja :

Setelah *obyek glass* dengan sayatan hati diatas yang telah mengalami proses pewarnaan mengering, ditutup dengan *cover glass* yang sudah ditetesi *entellan* terlebih dahulu.

8. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 400 kali (Haskito, 2011).

Lampiran 5. Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit

Pemeriksaan kadar MDA pada hati mencit dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, dengan tahap-tahap :

1. Menimbang sampel sebanyak 1 gram.
2. Sampel yang telah ditimbang kemudian ditambah dengan 9 ml larutan PBS dingin, lalu digerus.
3. Setelah digerus, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
4. Diambil supernatan sebanyak 4 ml.
5. Supernatan tersebut ditambah dengan 1 ml larutan TCA 15% dan 1 ml larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N.
6. Setelah itu dipanaskan dalam *water bath* suhu 80°C selama 15 menit, dilanjutkan dengan didinginkan pada suhu ruang selama 60 menit.
7. Setelah didinginkan, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
8. Diukur absorbansi supernatan MDA sampel pada spektrofotometer dengan $\lambda = 532$ nm.
9. Dihitung kadar MDA dengan menggunakan persamaan garis regresi dari kurva standar (baku) larutan MDA.

Lampiran 6. Skor Pemeriksaan Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit

Perlakuan	Sampel	Bentuk Lesi			
		A	B	C	D
Kontrol (-)	1	0	3	3	0
	2	0	1	3	0
	3	3	1	1	0
	4	0	5	1	0
	5	3	1	1	0
	6	0	5	1	0
P0	1	9	1	5	5
	2	5	5	5	0
	3	7	5	5	0
	4	7	5	5	0
	5	7	5	5	0
	6	13	0	5	0
P1	1	3	3	5	0
	2	5	1	5	0
	3	5	5	5	0
	4	5	5	3	0
	5	7	5	5	0
	6	5	3	5	0
P2	1	5	1	1	0
	2	5	3	5	0
	3	3	1	5	0
	4	3	5	3	0
	5	3	5	5	0
	6	3	3	5	0
P3	1	3	3	5	0
	2	3	3	5	0
	3	3	1	3	0
	4	3	3	3	0
	5	3	5	5	0
	6	3	1	3	0

Lampiran 7. Hasil Pemeriksaan Kadar MDA Hati Mencit

Perlakuan	Sampel	Absorbansi	Kadar MDA (nmol/ml)
Kontrol (-)	1	0,168	24,655
	2	0,098	14,134
	3	0,152	22,251
	4	0,160	23,453
	5	0,096	13,834
	6	0,160	23,453
P0	1	0,359	53,363
	2	0,312	46,299
	3	0,342	50,808
	4	0,318	47,200
	5	0,382	56,820
	6	0,351	52,160
P1	1	0,195	28,714
	2	0,220	32,471
	3	0,291	43,142
	4	0,259	38,333
	5	0,305	45,247
	6	0,271	40,136
P2	1	0,174	25,557
	2	0,270	39,986
	3	0,220	32,471
	4	0,238	35,176
	5	0,262	38,784
	6	0,222	32,772
P3	1	0,225	33,223
	2	0,208	30,667
	3	0,187	27,511
	4	0,207	30,517
	5	0,248	36,679
	6	0,202	29,766

Lampiran 8. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Nekrosis) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Histopat_Nekrosis * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		Histopat_Nekrosis		
Perlakuan	Kontrol(-)	1	0	
		2	0	
		3	3	
		4	0	
		5	3	
		6	0	
		N	6	
		Total	Median	.00
			Range	3
	P0	1	9	
		2	5	
		3	7	
4		7		
5		7		
6		13		
	N	6		
	Total	Median	7.00	
		Range	8	
P1	1	3		
	2	5		
	3	5		
	4	5		
	5	7		
	6	5		
	N	6		
	Total	Median	5.00	
		Range	4	
P2	1	5		
	2	5		
	3	3		

	4		3
	5		3
	6		3
		N	6
	Total	Median	3.00
		Range	2
	1		3
	2		3
	3		3
	4		3
P3	5		3
	6		3
		N	6
	Total	Median	3.00
		Range	0
		N	30
Total		Median	3.00
		Range	13

a. Limited to first 100 cases.

Kruskal-Wallis Test

		Ranks	
	Perlakuan	N	Mean Rank
Histopat_Nekrosis	Kontrol(-)	6	5.33
	P0	6	26.58
	P1	6	20.25
	P2	6	14.33
	P3	6	11.00
	Total	30	

Test Statistics^{a,b}

		Histopat_Nekrosis
Chi-Square		23.204
df		4
Asymp. Sig.		.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	Kontrol(-)	6	3.50	21.00
	P0	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	Kontrol(-)	6	3.67	22.00
	P1	6	9.33	56.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-2.844
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	Kontrol(-)	6	4.17	25.00
	P2	6	8.83	53.00
	Total	12		

Test Statistics^a

Histopat Nekrosis	
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-2.447
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	Kontrol(-)	6	4.50	27.00
	P3	6	8.50	51.00
	Total	12		

Test Statistics^a

Histopat_Nekrosis	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	27.000
Z	-2.345
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P0	6	8.75	52.50
	P1	6	4.25	25.50
	Total	12		

Test Statistics^a

Histopat_Nekrosis	
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-2.285
Asymp. Sig. (2-tailed)	.022
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P0	6	9.33	56.00
	P2	6	3.67	22.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-2.812
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P0	6	9.50	57.00
	P3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-3.102
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P1	6	8.17	49.00
	P2	6	4.83	29.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-1.782

Asymp. Sig. (2-tailed)	.075
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P1	6	9.00	54.00
	P3	6	4.00	24.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.739
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Nekrosis	P2	6	7.50	45.00
	P3	6	5.50	33.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat_Nekrosis
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-1.483
Asymp. Sig. (2-tailed)	.138
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Lampiran 9. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Degenerasi) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Histopat_Degenerasi * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		Histopat_Degenerasi		
Perlakuan	Kontrol(-)	1	3	
		2	1	
		3	1	
		4	5	
		5	1	
		6	5	
		Total	N	6
			Median	2.00
			Range	4
	P0	1	1	
		2	5	
		3	5	
		4	5	
		5	5	
		6	0	
	Total	N	6	
		Median	5.00	
		Range	5	
P1	1	3		
	2	1		
	3	5		
	4	5		
	5	5		
	6	3		
	Total	N	6	
		Median	4.00	
		Range	4	
P2	1	1		
	2	3		
	3	1		

	4		5
	5		5
	6		3
		N	6
	Total	Median	3.00
		Range	4
	1		3
	2		3
	3		1
	4		3
P3	5		5
	6		1
		N	6
	Total	Median	3.00
		Range	4
		N	30
Total		Median	3.00
		Range	5

a. Limited to first 100 cases.

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Histopat_Degenerasi	Kontrol(-)	6	13.58
	P0	6	17.50
	P1	6	18.08
	P2	6	15.00
	P3	6	13.33
	Total	30	

Test Statistics ^{a,b}	
	Histopat Degenerasi
Chi-Square	1.676
df	4
Asymp. Sig.	.795

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 10. Perhitungan Statistik Data Perubahan Gambaran Histopatologi (Inflamasi) Hati Mencit Dengan Uji Kruskal-Wallis

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Histopat_Inflamasi * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

				Histopat_Inflamasi
Perlakuan	Kontrol(-)	1		3
		2		3
		3		1
		4		1
		5		1
		6		1
		Total	N	6
			Median	1.00
			Range	2
	P0	1		5
		2		5
		3		5
		4		5
5			5	
6			5	
	Total	N	6	
		Median	5.00	
		Range	0	
P1	1		5	
	2		5	
	3		5	
	4		3	
	5		5	
	6		5	
	Total	N	6	
		Median	5.00	
		Range	2	
P2	1		1	
	2		5	
	3		5	

	4		3
	5		5
	6		5
		N	6
	Total	Median	5.00
		Range	4
	1		5
	2		5
	3		3
	4		3
P3	5		5
	6		3
		N	6
	Total	Median	4.00
		Range	2
		N	30
Total		Median	5.00
		Range	4

a. Limited to first 100 cases.

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Histopat_Inflamasi	Kontrol(-)	6	5.00
	P0	6	21.50
	P1	6	19.42
	P2	6	16.33
	P3	6	15.25
	Total	30	

Test Statistics ^{a,b}	
	Histopat_Inflamasi
Chi-Square	16.376
df	4
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	Kontrol(-)	6	3.50	21.00
	P0	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-3.146
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	Kontrol(-)	6	3.67	22.00
	P1	6	9.33	56.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-2.900
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	Kontrol(-)	6	4.33	26.00
	P2	6	8.67	52.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	26.000
Z	-2.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.027
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	Kontrol(-)	6	4.00	24.00
	P3	6	9.00	54.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.559
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P0	6	7.00	42.00
	P1	6	6.00	36.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	15.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P0	6	7.50	45.00
	P2	6	5.50	33.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-1.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.140
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P0	6	8.00	48.00
	P3	6	5.00	30.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-1.915
Asymp. Sig. (2-tailed)	.056
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P1	6	7.08	42.50
	P2	6	5.92	35.50
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	14.500
Wilcoxon W	35.500
Z	-.738
Asymp. Sig. (2-tailed)	.461
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P1	6	7.50	45.00
	P3	6	5.50	33.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-1.173
Asymp. Sig. (2-tailed)	.241
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopat_Inflamasi	P2	6	6.75	40.50
	P3	6	6.25	37.50
	Total	12		

Test Statistics^a

	Histopat Inflamasi
Mann-Whitney U	16.500
Wilcoxon W	37.500
Z	-.274
Asymp. Sig. (2-tailed)	.784
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Lampiran 11. Perhitungan Statistik Data Pengukuran Kadar MDA Hati Mencit Dengan Uji ANOVA

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MDA * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		MDA		
Kontrol(-)	1		24.655	
	2		14.134	
	3		22.251	
	4		23.453	
	5		13.834	
	6		23.453	
		N		6
	Total	Mean		20.29667
		Median		22.85200
		Std. Deviation		4.949422
	Perlakuan P0	1		53.363
		2		46.299
3			50.808	
4			47.200	
5			56.820	
6			52.160	
		N		6
Total		Mean		51.10833
		Median		51.48400
		Std. Deviation		3.932114
P1		1		28.714
		2		32.471
	3		43.142	
	4		38.333	
	5		45.247	
	6		40.136	
		N		6
	Total	Mean		38.00717
		Median		39.23450
		Std. Deviation		6.331380
	P2	1		25.557

	2		39.986
	3		32.471
	4		35.176
	5		38.784
	6		32.772
		N	6
		Mean	34.12433
		Median	33.97400
		Std. Deviation	5.198830
	1		33.223
	2		30.667
	3		27.511
	4		30.517
P3	5		36.679
	6		29.766
		N	6
		Mean	31.39383
		Median	30.59200
		Std. Deviation	3.171820
		N	30
Total		Mean	34.98607
		Median	32.99750
		Std. Deviation	11.105362

a. Limited to first 100 cases.

Oneway ANOVA

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol(-)	6	20.29667	4.949422	2.020593	15.10257	25.49077	13.834	24.655
P0	6	51.10833	3.932114	1.605279	46.98183	55.23483	46.299	56.820
P1	6	38.00717	6.331380	2.584775	31.36279	44.65154	28.714	45.247
P2	6	34.12433	5.198830	2.122413	28.66850	39.58017	25.557	39.986
P3	6	31.39383	3.171820	1.294890	28.06521	34.72245	27.511	36.679
Total	30	34.98607	11.105362	2.027552	30.83926	39.13288	13.834	56.820

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2990.878	4	747.720	31.918	.000
Within Groups	585.665	25	23.427		
Total	3576.543	29			

*Post Hoc Test**Homogeneous Subsets*

MDA

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol(-)	6	20.29667			
P3	6		31.39383		
P2	6		34.12433	34.12433	
P1	6			38.00717	
P0	6				51.10833
Sig.		1.000	.338	.177	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 12. Sertifikat Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 265-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Aktivitas Vitamin E (α -Tocopherol) Sebagai Antioksidan Terhadap Gambaran Histopatologi dan Kadar Malondialdehyde (MDA) Hati Mencit Jantan Yang Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)

PENELITI UTAMA : Ajeng Erika Prihastuti Haskito

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 28 Juni 2013

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 195312161978062001

Ketua,



Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 196609201992031003

Lampiran 13. Surat Keterangan Sehat Mencit Yang Digunakan Dalam Perlakuan Penelitian



**LABORATORIUM PARASITOLOGI VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS WIJAYA KUSUMA SURABAYA**

Sekretariat : Jl. Dukuh Kupang XXV/54, Telp. (031) 5677577, 5619709 Psw. 122. Fax (031) 5619709
Email : skhwks@gmail.com. Surabaya 60225



SURAT KETERANGAN
No : 001/IV/2013

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Marek Yohana Kurniabudhi., drh., M.Vet
Tingkat/Golongan : Penata muda tingkat I / III b
NIK : 12696-ET

Mcnerangkan :

Jenis : Mencit / *Mus musculus*
Strain : *balb/c*
Umur : ± 12-16 minggu
Jenis Kelamin : Jantan
Berat badan : 25-30 gram
Kondisi : Sehat dan tidak terjangkit penyakit
Jumlah : 40 ekor

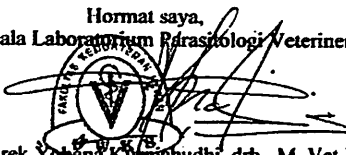
Ditujukan kepada :

Nama : Ochi
Fakultas : Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Surabaya, 22 April 2013

Hormat saya,
Kepala Laboratorium Parasitologi Veteriner


(Marek Yohana Kurniabudhi, drh., M. Vet)
NIK 12696 -ET