

13/05
Var
6

DISERTASI

KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER PADA KERUSAKAN SEL HATI SEBAGAI AKIBAT PROSES OKSIDATIF BIOTRANSFORMASI AFB₁

Suatu eksperimental murni laboratorium
pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)



YANWIRASTI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004

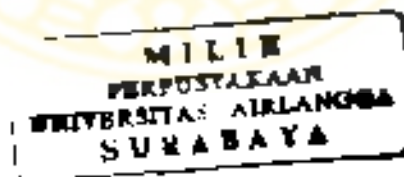


**KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER PADA KERUSAKAN SEL HATI
SEBAGAI AKIBAT PROSES AKSIDATIF
BIOTRANSFORMASI AFB₁**

**Suatu eksperimen murni laboratorium
pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 20 Juli 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB



Oleh :

YANWIRASTI
NIM. 099913645 D

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 2 AGUSTUS 2004**

Oleh

PROMOTOR

**Prof.H.Ari Gunawan,dr,MS, PhD
NIP: 130 531 759**

KOPROMOTOR 1

KOPROMOTOR 2

**Prof.Dr.Hj.Juliati Hood A,dr,MS,SpPA,FIAC
NIP: 130 517 159**

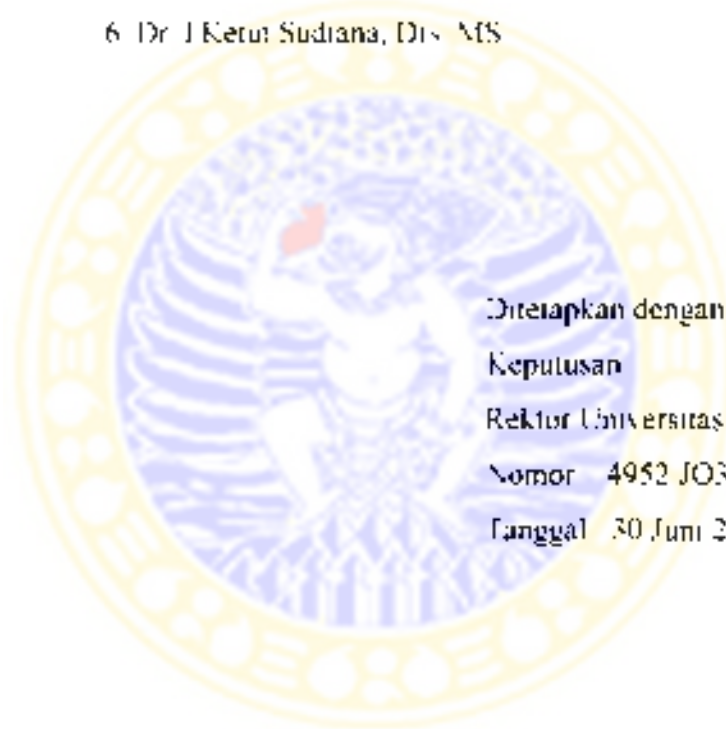
**Prof. Soetjipto,dr,MS,PhD
NIP:130 687 606**

Telah diuji pada Ujian Tertutup

Tanggal 24 Juni 2004

PANITIA PENGEJER DISERTASI

- Ketua Prof. H. Bambang Rahimo Setokoesoemo, dr
- Anggota
1. Prof. H. Ari Gunawan, dr. MS, PhD
 2. Prof. Dr. Julian Hood A. dr. MS, DSPA, FACS
 3. Prof. Soetnpto, dr. MS, PhD
 4. Prof. Dr. Soehartoyo Hardjoprangoto, drh, MSc
 5. Prof. Dr. Ny. Lockito Retno Moestriati, dr
 6. Dr. J. Kerut Sudriana, Dis. MS



Ditetapkan dengan Surat
Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor 4952/JO3/PP/2004
Tanggal 30 Juni 2004

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan hati yang bersuud kepada Allah SWT seraya mengunandangkan salam shalawat kepada Rasulullah SAW dan keluarganya saya panatkan puji syukur yang sedalam-dalamnya kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala-galanya, karunia, taufik dan hidayahNya, sehingga saya mendapat kekuatan, ketabahan serta tuntunanNya dalam menyelesaikan disertasi ini. Semoga hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Tersusunnya disertasi ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, maka dari itu dengan hati yang tulus dan dengan penuh rasa syukur saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat

Prof. H. Ari Gunawan, dr, MS, PhD, sebagai Promotor yang telah dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, membantu, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan, serta memberikan saran dan dukungan moril secara terus-menerus, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof. Dr. Juliati Hood Alsagoff, dr, SpPA, MS, FIAC sebagai Ko promotor I yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing, memperluas wawasan keilmuan khususnya dalam bidang Patologi Anatomi, mengoreksi, mendorong, memberikan kepustakaan serta menolong saya dalam banyak hal, sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD sebagai Ko promotor II yang telah banyak memberikan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing, memberikan pengarahan, memperluas wawasan keilmuan, memberikan artikel, mengoreksi serta dorongan yang terus menerus dan dukungan moril yang diberikan selama saya mengikuti Program Doktor ini, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan, dan sebagai Ketua Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, saya juga mengucapkan terima kasih atas izin yang diberikan untuk pemeliharaan

Andalas yang telah mendorong dan mengizinkan saya mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Ketua Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, M. Setia Budi Zein, dr. serta seluruh staf pengajar di Bagian Anatomi yang telah memberi dorongan semangat dan mengizinkan saya mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Dr. I Ketut Sudiana, Drs. M.Kes. Tania AS Hariadi, Dra. MS dari Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Airlangga, Prof. Dr. Hj. Wiryatun Lestariana dari Bagian Biokimia Universitas Gajah Mada, Dr. Utami Sri Hastuti dari FMIPA Universitas Negeri Malang yang telah memberikan masukan dan nasehat yang sangat berharga kepada saya dalam pelaksanaan penelitian

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS kepala LEMLIT Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan dalam pengolahan data.

Bapak H. Muhammad Yuwono, Apt. MS, Dr. Irnat Kepala Laboratorium Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah mengizinkan pemakaian alat-alat untuk penimbangan Aflatoksin B- serta Bapak Harjono dari laboratorium Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu menimbang Aflatoksin B untuk percobaan

Bapak Heri Soemantoro dan Chairul Anwar dari Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu saya dalam pemeliharaan hewan coba dan memberikan perlakuan percobaan pada penelitian disertasi ini

Kepala Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang, Dr. Soemarno, dr. SpMK dan Prof. Dr. H. Mulyohadi Alu, dr. SpFK, mantan kepala Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya, yang telah memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas Laboratorium yang beliau pimpin. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan juga kepada Hj. Locki Enggar Fitri, dr, M.Kes. Wibi Riawan, SSi dan anggota staf biomedik lainnya. Saudari Afrida, Pujiati A Md dan Bambang Eko Mulyono yang sangat membantu saya dalam pemeriksaan enzim SOD, katalase serta MDA jaringan hati tikus percobaan

Ketua Bagian Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga H. Abdoel Kamid Iskandar, dr. MS yang telah memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin, serta Bapak Sutirno yang telah membantu saya dalam pembuatan preparat histologis

Ketua Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Hj. Salmiah Agus, dr. SpPA yang telah memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Hj. Rachmahiyah Zuryati Nizar, dr. SpPA yang bersama-sama dengan Hj. Salmiah Agus, dr. SpPA membimbing saya dalam pengamatan sediaan histopatologis pada penelitian ini, yang akhirnya menjadi observer yang kedua, serta membantu pemotretan sediaan diatas. Semoga Allah SWT selalu memberkahi rahmat dan hidayahNya kepada beliau berdua

Ketua Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Hj. Rismawati Yaswir, dr. SpPK(K) yang memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin pada pengecatan imunohistokimia dan pemotretan

Muhammad Yunus, S.Kom yang sangat membantu sekali dalam pengetikan naskah disertasi ini

Semua guru saya sejak dari sekolah taman kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi, yang telah memberi pandangan kepada saya, sampai akhirnya saya dapat menyelesaikan pendidikan ini

Teman-teman peserta didik Program Doktor Universitas Airlangga yang berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang (kelompok 14) yaitu : Rusdan Djamil, dr, MSc, Sofina Rusdan, dr, Cert. Med, Prof Nasrul Zubir, dr, SpPD-KGF, Tilyza Nasrul, dr, SpPK(K), Prof Dr Asman Manaf, dr, SpPD-KE, Adnil Edwin Nurdin, dr, SpKJ, Ervati Darwin, dr, Rismawati Yaswir, dr, SpPK, Hafni Baehriar, dr, MPH, Masrul, dr, MSc, Suhasyril ZA, dr, MPH, Azryta Aziz, dr dan Isnindyah Kurniati, drg, saya sampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga atas segala kerja sama yang baik serta saling mendukung dalam suka dan duka selama bersama-sama menjalani pendidikan

Bapak saya H. Sofyan Jamal dan Ibu saya Almarhumah Sawiyah yang selalu penuh tanggung jawab, cinta kasih dalam mendidik saya, serta senantiasa memberi semangat, doa dan dorongan untuk maju, namun sangat disayangkan sekali, Ibu saya tidak sempat menyaksikan keberhasilan anaknya. Saya selalu berdoa semoga Allah SWT akan mengampuni segala dosa dan menerima amal ibadah Ibunda dan akan ditempatkan disisi Allah SWT dengan baik.

Kakak-kakak dan adik-adik saya yang selalu bergandengan tangan dalam keadaan suka maupun duka, serta memberi dorongan, semangat yang tiada hentinya kepada saya dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Suamiku, Eneep Kusnandar, dr. SpKK yang dengan penuh keintaan dan kasih sayang selalu memberi dorongan untuk maju, walaupun banyak halangan dan rintangan yang kita terima, tetapi doa kita yang selalu bersatu padu dan rahmat Allah YME membuat saya bisa menyelesaikan pendidikan ini.

Anak-anakku yang tercinta Vanda Lestari, ST, MSc dan Mohamad Iqbal, SE Akt yang terus menerus memberikan cinta kasih dan dorongan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan ini. Semoga ini baru merupakan langkah awal yang akan kalian lanjutkan kelak.

Kepada semua pihak, handai taulan dan para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan dorongan selama saya menempuh pendidikan Doktor ini. Untuk itu saya mengucapkan terima kasih.

Semoga Allah SWT selalu memberikan petunjuk, rahmat dan hidayahNya kepada kita semua didalam menjalani kehidupan di dunia ini. Amin Ya Rabbal Alamin

RINGKASAN

KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER PADA KERUSAKAN SEL HATI SEBAGAI AKIBAT PROSES OKSIDATIF BIOTRANSFORMASI AFB₁

Yanwirasti

Aflatoxin B₁ merupakan hasil metabolisme yang dihasilkan oleh *Aspergillus Flavus*, suatu kapang yang sering terdapat pada bahan makanan yang disimpan tidak menurut hygiene kesehatan. Aflatoxin B₁ telah terbukti sebagai zat atau bahan hepatotoksik yang kuat, yang dapat menyebabkan kerusakan sel hati mulai dari yang ringan sampai kanker hati. Di dalam hati, Aflatoxin B₁ mengalami biotransformasi menjadi berbagai-bagai metabolit dengan katalisator sitokrom P-450. Sebagai efek samping biotransformasi AFB₁ oleh sitokrom P-450 ini akan dihasilkan produk-produk senyawa oksigen reaktif yang akan merusak sel hati melalui proses oksidatif. Dalam keadaan normal tanpa induksi pembentukan senyawa oksigen reaktif, pembentukan senyawa oksigen reaktif akan diredam oleh anti oksidan tubuh, tetapi bila induksi terus berlanjut, maka akan timbul suatu keadaan yang disebut stres oksidatif yang akan menimbulkan kerusakan oksidatif.

Di dalam tubuh senyawa oksigen reaktif akan menimbulkan kerusakan pada tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu lipid, protein dan DNA. Kerusakan oksidatif lipid akan menimbulkan peroksidasi lipid pada membran sel yang menyebabkan sel kehilangan integritas yang ditandai oleh meningkatnya peroksida lipid seperti MDA. Kerusakan oksidatif DNA akan menyebabkan teraktivasinya gen p53 yang akan mengaktifkan gen *down stream*, sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel dan memicu terjadinya apoptosis. Bila induksi terus berlanjut, maka akan terjadi kerusakan dan perubahan sel yang ditandai dengan terjadinya displasia yang dapat berlanjut terus menjadi pertumbuhan sel kanker.

Walaupun para peneliti telah mendapatkan berbagai kerusakan sel hati akibat pemaparan Aflatoxin B₁, tetapi kajian mengenai perubahan biologi molekuler pada kerusakan sel hati sebagai akibat proses oksidatif biotransformasi AFB₁ menurut lama pemberian dan dosis yang berbeda dari Aflatoxin B₁ masih belum ada.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap perubahan biologi molekuler kerusakan sel hati tikus putih akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ menurut lama dan kadar pemberian.

Penelitian ini bersifat eksperimental, murni dengan rancangan faktorial, karena mempergunakan 3 faktor lama pemberian dan 4 faktor dosis pemberian. Dalam penelitian ini digunakan 96 ekor tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) yang berumur ± 2 bulan dengan berat badan = 180-200 g, yang dibagi atas 12 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri atas 8 ekor tikus yang masing-masing kelompok diberikan Aflatoxin B₁ secara oral dengan dosis 0 µg,

10 µg, 15 µg dan 20 µg yang dilarutkan dengan 0,2 ml propilen glikol setiap hari selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Pada akhir percobaan, masing-masing tikus dikorbankan dan diperiksa kadar enzim superoksida dismutase jaringan hati dengan metode Wong (1989), enzim katalase jaringan hati tikus dengan metode Sinha (1972), malonaldehid jaringan hati dengan metode Uchiyama and Mihara (1978), kerusakan sel hati dengan sayatan histologi yang diwarnai dengan hematoxilin eosin, ekspresi protein p53 dengan pemeriksaan imunohistokimia, sel hati yang mengalami apoptosis dengan metode Tunnel Assay serta sel hati yang mengalami displasia atau pertumbuhan sel hati yang tak terkendali dengan sayatan histologi yang diwarnai dengan hematoxilin eosin. Hasil penelitian dianalisis dengan ANAVA dan kalau ada perbedaan dilanjutkan dengan Tukey HSD.

Analisis hasil penelitian ini menunjukkan bahwa : 1) ada perbedaan yang bermakna antara lama pemberian Aflatoxin B₁ 12 minggu dengan 20 minggu dengan dosis 10 µg dan 20 µg terhadap penurunan aktivitas enzim SOD dan enzim katalase jaringan hati, peningkatan kadar malonaldehid jaringan hati dan kerusakan sel hati serta displasia sel hati. 2) makin lama pemberian dan makin tinggi dosis Aflatoxin B₁ akan semakin menurunkan aktivitas enzim SOD jaringan hati dan enzim katalase jaringan hati, serta akan semakin meningkatkan kadar MDA jaringan hati, kerusakan sel hati, serta displasia sel hati, dimana displasia baru terjadi pada pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu. 3) tidak ada perbedaan bermakna antara dosis 10 µg Aflatoxin B₁ dengan dosis 15 µg atau dosis 15 µg dengan dosis 20 µg dan lama pemberian Aflatoxin B₁ selama 12 minggu dengan 16 minggu atau 16 minggu dengan 20 minggu terhadap penurunan aktivitas enzim SOD dan katalase jaringan hati serta peningkatan kadar malonaldehid jaringan hati serta displasia sel hati. 4) tidak ada perbedaan bermakna antara lama pemberian dan dosis Aflatoxin B₁ terhadap sel hati yang mengalami apoptosis, bahkan tidak terdapat ekspresi protein p53 pada setiap lama pemberian dan dosis pemberian. 5) hasil interaksi dosis dan lama pemberian menunjukkan bahwa pemberian Aflatoxin B₁ selama 20 minggu dengan dosis 20 µg akan menyebabkan kerusakan sel hati yang sangat tinggi.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Aflatoxin B₁ menimbulkan kerusakan sel hati melalui proses oksidatif yang terjadi akibat produk-produk senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan biotransformasi Aflatoxin B₁ oleh sitokrom P-450. Semakin lama pemberian dan semakin tinggi dosis Aflatoxin B₁ yang diberikan akan semakin meningkatkan kerusakan sel hati yang meliputi degenerasi bengkak keruh, degenerasi lemak dan displasia serta menurunkan aktivitas enzim SOD dan katalase, serta meningkatkan kadar MDA.

SUMMARY

**MOLECULAR BIOLOGY STUDY ON LIVER CELL
DAMAGE DUE TO OXIDATIVE PROCESS
OF AFLATOXIN B₁ BIOTRANSFORMATION**

Yanwirasti

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a metabolic product of *aspergillus flavus* mushroom usually presents in food lacking hygienic precautions. The product has been proven to be a strong hepatotoxic substance, causing liver cell damage ranges from mild to liver cancer. In the liver, it undergoes biotransformation into different metabolites catalyzed by cytochrome, P-450. Side effect of P-450 catalyization is the production of oxygen reactive species. In normal state, without the induction of reactive oxygen species production, the product would be overcome by body antioxidants. However, with the continuation of induction, oxidative stress resulted from increasing reactive oxygen species production would result in oxidative damages.

In the body, reactive oxygen species will damage three important components responsible for maintaining cell integrity, such as lipid, protein, and DNA. Oxidative damage on lipid results in lipid peroxidation on cell membrane, which in turn causes loss of cell integrity, confirmed by the presence of increased lipid peroxide such as malonaldehyd (MDA). Oxidative damage on DNA causes activation of gene p53 which in turn activates downstream genes, resulting in the inhibition of cell growth and induction of apoptosis. If the induction continues, cell could be damaged and changed as indicated by dysplasia and followed by cancer.

Although the researchers have found different damages on liver cell due to exposure to Aflatoxin B₁, the study on biomolecular changes as the result of oxidative process on AFB₁ in term of length and doses of exposure have not been carried out.

This molecular biology study aims to disclose the damaging effect of oxidative process produced by different dosages and exposure times of Aflatoxin B₁ on white rat's liver cells. Using factorial design, in this experimental study, three exposure times and four doses of Aflatoxin B₁ were used. The experiment used 96 white rats (*Rattus norvegicus*) with age around eight weeks old and weight 180-200 grams, divided into four groups of 24 rats each, based on the dosages of Aflatoxin B₁ given. Each group was divided further into three subgroups of eight rats based on the length of exposure time to Aflatoxin B₁.

Four dosages of Aflatoxin B₁ were administered orally everyday into different groups, consisted of 0 ug, 10 ug, 15 ug, and 20 ug, dissolved in 0.2 ml propylene glycol. Three subgroups received the dosage for 12 weeks, 16 weeks, and 20 weeks. At the end of the experiment, the rats were sacrificed, and liver

enzymes were analyzed. Superoxide dismutase (SOD) was analyzed using Wong method, catalase using Sinha method, and malondialdehyde using Uchiyama and Mihara method. Liver cell damages were examined using histological slices stained by haematoxylin eosin. Expression of p53 protein was investigated using immunohistochemistry examination. Liver cells with apoptosis were scrutinized using Tunnel Assay method. Cells with dysplasias or uncontrolled growth were examined using haematoxylin eosin stained slices. Data was analyzed using analysis of variance, and $P < 0.05$ was considered to be significantly different.

There were significant differences between the effects of 12 weeks and 20 weeks exposure, and between dosage of 10 μg and 20 μg on reduction of enzymes SOD and catalase of liver tissue, increase in malondialdehyde of liver tissue, liver cell damage, and liver cell dysplasia. This also showed that increasing exposure time and dosages of Aflatoxin B₁ reduces SOD and catalase of liver tissue, and increases in malondialdehyde of liver tissue, liver cell damage and dysplasia. Moreover, dysplasia started on exposure to 15 μg AFB₁ for 16 weeks and it increases with increasing dosage and exposure time. There were no significant differences between 10 μg and 15 μg , between 15 μg and 20 μg dosages, between 12 weeks and 16 weeks, or between 16 and 20 weeks exposures, on reduction of enzymes SOD and catalase of liver tissue, increasing in malondialdehyde of liver tissue and dysplasia. No significant difference either was found between different exposure times or dosages on apoptosis of the liver cells. Moreover, no expression of p53 protein was found on any exposure time or dosages given. Analysis on the interaction between exposure time and dosage showed that 20 weeks exposure of 20 μg Aflatoxin B₁ would result in a very damaging effect on the liver cells.

The result of this study concluded that Aflatoxin B₁ damages liver cells by means of oxidative process due to reactive oxygen species generated by its biotransformation using cytochrom P-450. Increasing exposure time and dosages of Aflatoxin B₁ would increase the damage on liver cells such as cloudy swelling, degeneration, fatty degeneration, necrosis, apoptosis and dysplasia.

ABSTRACT

**MOLECULAR BIOLOGY STUDY ON LIVER CELL
DAMAGE DUE TO OXIDATIVE PROCESS
OF AFLATOXIN B₁ BIOTRANSFORMATION**

Yanwirasti

This molecular biology study aims to disclose the damaging effect of oxidative process produced by different dosages and exposure times of Aflatoxin B₁ on white rat's liver cells. Using factorial design, in this experimental study three exposure times and four doses of Aflatoxin B₁ were used. The experiment used 96 white rats (*Rattus norvegicus*) with age around eight weeks old and weight 180-200 grams, divided into four groups of 24 rats each, based on the dosages of Aflatoxin B₁ given. Each group was divided further into three subgroups of eight rats based on the length of exposure time to Aflatoxin B₁.

Four dosages of Aflatoxin B₁ were administered orally everyday into different groups, consisted of 0 µg, 10 µg, 15 µg, and 20 µg, dissolved in 0.2 ml propylene glycol. Three subgroups received the dosage for 12 weeks, 16 weeks, and 20 weeks. At the end of the experiment, the rats were sacrificed, and liver enzymes were analyzed. Superoxide dismutase (SOD) was analyzed using Wong method, catalase using Sinha method, and malondialdehyde using Uchivama and Mihara method. Liver cell damages were examined using histological slices stained by haematoxilin eosin. Expression of p53 protein was investigated using immunohistochemistry examination. Liver cells with apoptosis were scrutinized using Tunnel Assay method. Cells with dysplasias or uncontrolled growth were examined using haematoxilin eosin stained slices. Data was analyzed using analysis of variance, and P<0.05 was considered to be significantly different.

There were significant differences between the effects of 12 weeks and 20 weeks exposure, and between dosage of 10 µg and 20 µg on reduction of enzymes SOD and catalase of liver tissue, increase in malondialdehyde of liver tissue, liver cell damage, and liver cell dysplasia. This also showed that increasing exposure time and dosages of Aflatoxin B₁ reduces SOD and catalase of liver tissue, and increases in malondialdehyde of liver tissue, liver cell damage and dysplasia. Moreover, dysplasia started on exposure to 15 µg AFB₁ for 16 weeks and it increases with increasing dosage and exposure time. There were no significant differences between 10 µg and 15 µg, between 15 µg and 20 µg dosages, between 12 weeks and 16 weeks, or between 16 and 20 weeks exposures, on reduction of enzymes SOD and catalase of liver tissue, increasing in malondialdehyde of liver tissue and dysplasia. No significant difference either was found between different exposure times or dosages on apoptosis of the liver cells. Moreover, no expression of p53 protein was found on any exposure time or dosages given. Analysis on the interaction between exposure time and dosage

showed that 20 weeks exposure of 20 µg Aflatoxin B₁ would result in a very damaging effect on the liver cells

The result of this study concluded that Aflatoxin B₁ damages liver cells by means of oxidative process due to reactive oxygen species generated by its biotransformation using cytochrom P-450. Increasing exposure time and dosages of Aflatoxin B₁ would increase the damage on liver cells such as cloudy swelling, degeneration, fatty degeneration, necrosis, apoptosis and dysplasia.

Keywords: Aflatoxin B₁, liver cell damage, oxidative process, AFB₁, biotransformation.



DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	...A
SAMPUL DALAM	... B
PRASYARAT GELAR	...iii
LEMBAR PENGESAHAN	...iv
PENETAPAN PANCTIA	...v
UCAPAN TERIMA KASIH	...vi
RINGKASAN	...xi
SUMMARY	... xiii
ABSTRACT	...xv
DAFTAR ISI	...xvii
DAFTAR TABEL	...xxii
DAFTAR GAMBAR	...xxiv
DAFTAR SINGKATAN	...xxvi
DAFTAR LAMPIRAN	...xxviii
BAB I PENDAHULUAN	... 1
1.1 Latar Belakang	... 1
1.2 Rumusan Masalah	... 12
1.3 Tujuan Penelitian	... 13
1.3.1 Umum	... 13
1.3.2 Khusus	...13
1.4 Manfaat Penelitian	...13
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	...15
2.1 Hati	... 15
2.1.1 Struktur Hati	...15
2.1.2 Sel Hati (Hepatosit sel parenkim)	... 16
2.1.3 Fungsi Hati	... 21

2.1.4	Jejas Seluler Hepatosit	22
2.1.4.1	Mekanisme terjadinya Jejas Seluler	22
2.1.4.2	Nekrosis	25
2.2	Aflatoksin B ₁	26
2.2.1	Struktur kimia dan jenis aflatoksin	27
2.2.2	Epidemiologi Aflatoksin	28
2.2.3	Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi Aflatoksin	30
2.2.4	Pengaruh AFB ₁ terhadap organ-organ sistem tubuh	34
2.2.4.1	Pengaruh AFB ₁ terhadap hati	35
2.2.4.2	Pengaruh AFB ₁ terhadap respons imun	39
2.2.4.3	Pengaruh AFB ₁ terhadap sistem reproduksi	40
2.2.4.4	Pengaruh AFB ₁ terhadap organ-organ tubuh lain	41
2.2.4.5	Pengaruh AFB ₁ terhadap gen dan alel yang berhubungan dengan gen tersebut	41
2.2.4.5.1	Ekskresi <i>adduct guanine</i> melalui urin	41
2.2.4.5.2	Ikatan kovalen ke DNA	41
2.2.4.5.3	Mutasi gen p53 pada karsinoma hepatoseluler	42
2.2.4.6	Pengaruh AFB ₁ terhadap pembentukan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	45
2.3	Radikal bebas dan Senyawa Oksigen Reaktif (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	48
2.3.1	Radikal Bebas	49
2.3.2	<i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>	52
2.3.2.1	Oksigen	53
2.3.2.2	Klasifikasi senyawa oksigen reaktif (<i>Reactive Oxygen Species - ROS</i>)	56
2.3.2.2.1	Superoksida ($O_2^{\bullet -}$)	56
2.3.2.2.2	Radikal Hidroksil (OH^{\bullet})	58
2.3.2.2.3	Radikal Peroksil (RO_2^{\bullet}) dan Radikal Alkoksil (RO^{\bullet})	60
2.3.2.2.4	Hidrogen Peroksida (H_2O_2)	61
2.3.2.2.5	Asam Hipoklorit ($HOCl$ - OCl^{\bullet})	62
2.3.2.2.6	Ozon (O_3)	63
2.3.2.2.7	Singlet Oksigen (1O_2)	63
2.4	Antioksidan	64
2.4.1	Antioksidan enzimatik	66
2.4.1.1	Superoksida dismutase (SOD)	67
2.4.1.1.1	Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD - SOD2)	67
2.4.1.1.2	Copper, Zinc, Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD - SOD1)	69
2.4.1.1.3	Iron SODs (Fe-SOD)	70
2.4.1.1.4	Superoksida dismutase ekstra seluler (Ec-SOD)	71
2.4.1.1.5	Nickel superoxide dismutase (Ni-SOD)	71
2.4.1.2	Katalase -Cat-	72
2.4.1.3	Golongan Glutaron peroksidase (GPX)	74

2.4.1.4	Glutation S-transferase (GST)	77
2.5	Stres Oksidatif	78
2.5.1	Pengaruh stres oksidatif terhadap Kalsium (Ca^{++})	81
2.5.2	Kerusakan Oksidatif	83
2.5.2.1	Kerusakan oksidatif pada membran sel	84
2.5.2.1.1	Kerusakan oksidatif pada membran lipid	84
2.5.2.1.2	Produksi Dekomposisi Peroksida	87
2.5.2.1.3	Kerusakan membran protein	91
2.5.2.1.4	Kerusakan yang terjadi akibat peroksidasi lipid	91
2.5.2.2	Kerusakan Oksidatif Protein	93
2.5.2.2.1	Kerusakan oksidatif pada residu asam amino yang spesifik	94
2.5.2.2.2	Gangguan yang timbul akibat kerusakan oksidatif protein	96
2.5.3	Kerusakan Oksidatif DNA	97
2.5.3.1	Kerusakan Oksidatif DNA secara langsung oleh senyawa oksigen reaktif	97
2.5.3.2	Kerusakan DNA secara tidak langsung oleh senyawa oksigen reaktif	100
2.5.3.3	Kerusakan yang terjadi akibat kerusakan Oksidatif DNA	102
2.5.4	Senyawa oksigen reaktif dan karsinogen	104
2.6	Gen p53	105
2.6.1	Peranan p53 dalam aktivasi transkripsi	108
2.6.2	Peranan gen p53 di dalam regulasi siklus sel	110
2.6.3	Apoptosis	112
2.6.3.1	Mekanisme terjadinya apoptosis	113
2.6.4	Peranan gen p53 terhadap apoptosis	120
2.6.5	Peranan p53 dalam stabilitas genom	121
2.6.6	Mutasi gen p53 (p53 Mutant)	122
2.6.6.1	Hubungan p53 dengan kanker	125
2.6.7	Deteksi p53	126
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN		129
3.1	Kerangka konseptual penelitian	129
3.2	Hipotesis penelitian	133
BAB IV. METODE PENELITIAN		134
4.1	Jenis Penelitian	134
4.2	Rancangan Penelitian	134
4.3	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	135
4.3.1	Populasi Penelitian	135
4.3.2	Sampel Penelitian	135
4.3.3	Besar Sampel	136
4.3.4	Teknik Pengambilan Sampel	136

4.4	Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel	136
4.4.1	Klasifikasi Variabel	136
4.4.2	Definisi Operasional Variabel	137
4.5	Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian	139
4.5.1	Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah	139
4.5.2	Instrumen Penelitian	141
4.5.3	Persyaratan Etik	143
4.5.4	Reliabilitas dan Validitas	143
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	143
4.7	Prosedur atau Pengumpulan Data	144
4.7.1	Persiapan Hewan Coba	145
4.7.2	Penentuan lama dan Dosis Aflatoxin B ₁	145
4.7.3	Perlakuan pada hewan coba	146
4.7.4	Pemeriksaan Laboratorium	146
4.7.4.1	Pemeriksaan <i>Super Oxide Dismutase (SOD)</i>	146
4.7.4.2	Pemeriksaan Aktivitas Katalase	146
4.7.4.3	Pemeriksaan MDA Jaringan Hati	147
4.7.4.4	Pemeriksaan Histopatologis Hati	147
4.7.4.5	Pemeriksaan ekspresi protein p53	148
4.7.4.6	Pemeriksaan sel hati yang mengalami apoptosis	148
4.8	Analisis Data	149
BAB V	ANALISIS HASIL PENELITIAN	150
5.1.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih	150
5.2	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih	153
5.3.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih	156
5.4.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih	159
5.5	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap ekspresi protein p53	162
5.6	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis	163
5.7	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia	166
BAB VI	PEMBAHASAN	175
6.1.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap enzim superoksida dismutase dan enzim katalase jaringan hati tikus putih	175
6.2.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih	179
6.3.	Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB ₁ terhadap kerusakan sel hati	183

6.4. Pengaruh lama pemberian dan kadar AFB ₁ terhadap ekspresi protein p53 dan apoptosis	187
6.5. Pengaruh lama pemberian dan kadar AFB ₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia	191
BAH VII KESIMPULAN DAN SARAN	197
7.1 Kesimpulan	197
7.2 Saran	198
DAFTAR PUSTAKA	200
DAFTAR LAMPIRAN	214



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbedaan karakteristik tipe kematian sel akibat nekrosis dan apoptosis	25
Tabel 2.2 Beberapa contoh radikal bebas	49
Tabel 2.3 Senyawa oksigen reaktif	56
Tabel 5.1 Nilai rerata aktivitas SOD (μ ml) jaringan hati tikus putih pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian yang berbeda	150
Tabel 5.2 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim SOD (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB ₁	151
Tabel 5.3 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD analisis aktivitas enzim SOD (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB ₁	152
Tabel 5.4 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim SOD (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁	152
Tabel 5.5 Nilai rerata aktivitas enzim katalase jaringan hati (μ ml) tikus putih pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian AFB ₁	153
Tabel 5.6 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim katalase (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB ₁	154
Tabel 5.7 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim katalase (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan bermacam-macam lama pemberian AFB ₁	155
Tabel 5.8 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap aktivitas enzim katalase (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁	155
Tabel 5.9 Nilai rerata kadar MDA (μ g ml) jaringan hati tikus putih akibat pemberian AFB ₁ pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian	156
Tabel 5.10 Tingkat Kemaknaan hasil uji HSD kadar MDA (μ g ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB ₁	157

Tabel 5.11	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB ₁	158
Tabel 5.12	Tingkat kemaknaan uji HSD terhadap kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁ ..	158
Tabel 5.13	Nilai rerata sel hati tikus putih yang rusak akibat pemberian AFB ₁ menurut dosis dan lama pemberian yang berbeda - 50 sel ..	159
Tabel 5.14	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami kerusakan berdasarkan dosis pemberian AFB ₁ ..	160
Tabel 5.15	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD kerusakan sel hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB ₁ ..	161
Tabel 5.16	Tingkat kemaknaan uji HSD kerusakan sel hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁ ..	161
Tabel 5.17	Nilai rerata sel hati tikus putih yang mengekspresikan protein p53 Akibat pemberian AFB ₁ pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian - 100 sel ..	162
Tabel 5.18	Nilai rerata sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis akibat pemberian AFB ₁ pada berbagai dosis dan lama pemberian - 100 sel ..	163
Tabel 5.19	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan dosis pemberian AFB ₁ ..	164
Tabel 5.20	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan lama pemberian AFB ₁ ..	164
Tabel 5.21	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁ ..	165
Tabel 5.22	Nilai rerata sel hati tikus putih yang mengalami displasia akibat pemberian AFB ₁ pada berbagai dosis dan lama pemberian - 50 sel ..	166
Tabel 5.23	Tingkat kemaknaan sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan dosis pemberian AFB ₁ ..	167
Tabel 5.24	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan lama pemberian AFB ₁ ..	168
Tabel 5.25	Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB ₁ ..	168

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Gambar lobulus hati babi normal 19
Gambar 2.2	Diagram ultrastruktur hepatosit 21
Gambar 2.3.	Rumus Bangun Aflatoksin B 28
Gambar 2.4.	Aktivasi AFB ₁ oleh sitokrom P-450 yang menghasilkan derivat-derivatnya 32
Gambar 2.5	Metabolit utama aflatoksin B. 34
Gambar 2.6.	Mekanisme Hidroksilasi substrat oleh sitokrom P-450 di dalam hati 46
Gambar 2.7.	Representasi Reaksi Inisiasi dan propagasi dari Peroksidasi Lipid . 87
Gambar 2.8	Perubahan struktur DNA akibat kerusakan oksidatif 98
Gambar 2.9	Modifikasi guanin oleh radikal hidroksil 99
Gambar 2.10	Beberapa mekanisme ROS yang dapat memfasilitasi pertumbuhan Kanker 101
Gambar 2.11	Representasi dan kejadian apoptosis 114
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual Penelitian 129
Gambar 5.1	Gambar jaringan hati tikus putih normal yang hanya mendapat pelarut propilen glikol (Pembesaran 200x) 170
Gambar 5.2	Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB ₁ yang mengalami degenerasi bengkak keruh dan degenerasi lemak 170
Gambar 5.3	Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB ₁ yang mengalami Nekrosis (Pembesaran 400x). 171
Gambar 5.4.	Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB ₁ yang mengalami Displasia (Pembesaran 400x) 171
Gambar 5.5	Gambar sel hati tikus putih yang mengalami nekrosis hebat setelah di induksi AFB ₁ 20 µg selama 20 minggu (Pembesaran 200x) 172

Gambar 5.6	Gambar sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis (Pembesaran 400x)	172
Gambar 5.7	Gambar sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis (Pembesaran 1000x)	173
Gambar 5.8	Gambar kontrol pewarnaan imunohistokimia pada pemeriksaan p53 jaringan hati (Pembesaran 200x)	173
Gambar 5.9	Gambar sel hati tikus putih yang tidak mengekspresikan p53 (Pembesaran 400x)	174



Gambar 5.6	Gambar sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis (Pembesaran 400x)	172
Gambar 5.7	Gambar sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis (Pembesaran 1000x)	173
Gambar 5.8	Gambar kontrol pewarnaan imunohistokimia pada pemeriksaan p53 jaringan hati (Pembesaran 200x)	173
Gambar 5.9	Gambar sel hati tikus putih yang tidak mengekspresikan p53 (Pembesaran 400x)	174



DAFTAR SINGKATAN

8-OhdG	= 8-hydroxy deoxy guanosine
ADP	= adenosine diphosphate
APAF-1	= pro-apoptotic protease activating factor
AFB	Aflatoxin B ₁
APsite	= apurine site
Asetil Ko A	asetil koenzim A
ATP	= adenosine triphosphate
Bcl-2	= b cell lymphoma
CAD	= cytoplasma DN ase
CDK	= cyclin dependent kinase
cDNA	= complementary DNA
Ced-9	= Caenorhabditis elegans death
CTL	= cytotoxic T-Lymphosit
CT scan	= computed tomography
DNA	= deoxybonucleic acid
EGF-R	= epidermal growth factor receptor
ELISA	= enzyme linked immunosorbent assay
FADD	= fas associated protein with a death domain
FaPyG	= formamido pyrimidine guanin
G1	= Gap 1
G2	= Gap 2
GADD-45	= growth-arrest DNA damage - inducible
HBV	= hepatitis B virus

HCC	= hepatocellular carcinoma
HPLC	= high performance liquid chromatography
IGF	= insulin like growth factor
IGF-BP3	= insulin like growth factor – binding protein 3
MDA	= malondialdehyd
MDM2	= mouse double minute No. 2
NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PARP	= poly ADP ribose polymerase
PCR	= polymerase chain reaction
ppb	= part per billion
PEG	= propilen glikol
PUFA	= poly unsaturated fatty acid
ROS	= reactive oxygen species
SGOT	= serum glutamic pyruvic transaminase
SOD	= super oxide dismutase
SSCP	= single strand conformational polymorphism
SS DNA	= single strand DNA
SV 40	= simian virus 40
Tc	= T cytotoxic
TGF	= transforming growth factor
TNF	= tumor necrosis factor
TRADD	= TNFR-adaptor protein with a death domain
USA	= United States of America
w	= wild type

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Surat melakukan penelitian 214
Lampiran 1a	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim SOD (U/ml) pada tikus putih percobaan setelah diberi AFB ₁ 215
Lampiran 1b	Analisis Aktivitas Enzim SOD Jaringan Hati Tikus putih Percobaan menurut lama pemberian dan dosis AFB ₁ 216
Lampiran 2a	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Katalase (U/ml) Jaringan hati tikus putih percobaan setelah diberi AFB ₁ 225
Lampiran 2b	Analisis Aktivitas Enzim Katalase Jaringan Hati Tikus putih Percobaan menurut lama pemberian dan Dosis AFB ₁ 226
Lampiran 3a	Hasil Perhitungan Kadar MDA (pg/ml) Jaringan hati tikus putih percobaan setelah diberi AFB ₁ 235
Lampiran 3b	Analisis Kadar MDA Jaringan hati tikus putih menurut lama pemberian dan dosis AFB ₁ 236
Lampiran 4a	Hasil perhitungan kerusakan sel hati tikus putih percobaan setelah diberi AFB ₁ 245
Lampiran 4b	Analisis Kerusakan Sel Hati akibat pemberian AFB ₁ menurut lama pemberian dan dosis 246
Lampiran 5a	Hasil perhitungan sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis setelah diberi AFB ₁ 255
Lampiran 5b	Analisis sel hati yang mengalami apoptosis menurut lama pemberian dan dosis AFB ₁ 256
Lampiran 6a	Hasil perhitungan sel hati tikus putih yang mengalami displasia setelah diberi AFB ₁ 265
Lampiran 6b	Analisis sel hati yang mengalami displasia akibat pemberian AFB ₁ menurut lama pemberian dan dosis 266
Lampiran 7	Hasil perhitungan ekspresi protein p53 sel hati tikus setelah diberi AFB ₁ 275
Lampiran 8	Pemeriksaan Aktivitas SOD jaringan hati tikus percobaan menurut metode Wong (1989) 276

Lampiran 9	Pemeriksaan aktivitas katalase jaringan hati tikus percobaan menurut metode Sinha (1972)	277
Lampiran 10	Pemeriksaan kadar MDA jaringan hati tikus putih percobaan menurut metode Uchiyama dan Mihara (1978)	278
Lampiran 11	Pembuatan sediaan histologi jaringan hati menurut Teknik pembuatan sediaan histologi laboratorium Anatomi Histologi FK Unair Surabaya (Hariadi, 2000)	279
Lampiran 12	Pemeriksaan ekspresi protein p53 sel hati tikus percobaan dengan imunohistokimia menurut prosedur Kit Dako LSAB	281
Lampiran 13	Pemeriksaan sel hati tikus percobaan yang menjalani apoptosis dengan metode Apoptag (Peroxidase Insitu Apoptosis Detection Kit)	282



BAB I PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Aflatoxin B₁ (AFB₁) merupakan salah satu persoalan yang serius di bidang hygiene makanan, karena disamping bersifat sebagai hepatokarsinogen yang kuat juga mempunyai sifat *clastogenik*, *mito-inhibitory* dan *indirect genotoxic* (WHO, 1993; van Gijssel et al., 1997; Chao et al., 1999; Foster and Rosche, 2001; Stern et al., 2001).

AFB₁ dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus*. Kapang ini tumbuh baik pada suhu 25°-28°C dengan kelembaban 70-80 %, kadar air 11-14 %, suatu keadaan yang cocok dengan kondisi Indonesia (Julius, 1990). Temperatur yang hangat, kelembaban yang tinggi serta kerusakan tanaman baik di ladang maupun di tempat penyimpanan merupakan lahan yang subur untuk pertumbuhan jamur ini yang akan memproduksi AFB₁ (Foster and Rosche, 2001). AFB₁ yang dihasilkan kapang ini mempunyai titik lebur 237°-289° C sehingga sukar untuk menghilangkan dari bahan makanan, karena di samping AFB₁ rusak, makanan itu sendiri juga akan rusak pada pemanasan setinggi itu. (Julius, 1990)

Pada negara-negara maju dan mempunyai metoda penyimpanan makanan yang modern, kontaminasi dengan AFB₁ dapat dihindarkan, apalagi negara-negara tersebut telah memberlakukan dengan ketat kadar AFB₁ yang diperbolehkan dalam bahan makanan (*part per billion* pph). Kadar AFB₁ yang diperbolehkan dalam bahan makanan berbeda-beda untuk setiap negara. WHO merekomendasikan bahwa kadar AFB₁ yang ada dalam makanan tidak boleh melebihi 30 pph (Julius, 1990).

Negara-negara lain seperti Kanada 15 ppb, Perancis 10 ppb, United Kingdom 10 ppb, Australia 5 ppb, Jepang 10 ppb dan Belanda memperbolehkan kadar AFB₁ yang terdapat dalam makanan lebih rendah lagi yaitu 5 ppb (Tabata et al., 1993). FAD (*Food and Drug Administration*) USA, memperbolehkan kadar AFB₁ yang terdapat dalam makanan tidak boleh melebihi 30 ppb (Julius, 1990).

Berlainan dengan negara-negara modern, di negara-negara yang berkembang dan miskin, pencemaran makanan oleh AFB₁ merupakan persoalan yang cukup serius. Hal ini disebabkan karena untuk mencukupi kebutuhan bahan makanan, negara-negara tersebut sering mendapatkannya dari negara-negara lain yang biasanya bahan pangan tersebut sudah tersimpan lama. Penyimpanan bahan makanan tersebut biasanya dilakukan pada tempat yang tidak memadai, sehingga memudahkan pertumbuhan *Aspergillus flavus*. Di samping itu penyimpanan bahan makanan yang dihasilkan sendiri oleh negara-negara tersebut masih jauh dari harapan higienis makanan, sehingga akan meningkatkan insiden pencemaran oleh aflatoksin (Faton and Gallagher, 1994).

Aflatoksin dalam keadaan lembab, temperatur yang tinggi sanggup mengkontaminasi seluruh makanan dimana ancaman yang terbesar adalah kontaminasi pada kacang-kacangan, beras, jagung dan biji-bijian (Foster and Rosche, 2001). Survey yang dilakukan pada 3054 sampel makanan dan bahan makanan di Tokyo Jepang pada tahun 1986-1990 didapatkan bahwa aflatoksin mengkontaminasi beras, jagung, gula pasir, kacang-kacangan, merica, pala, kenari, cabai, paprika dan bumbu masak. Insiden pencemaran yang paling tinggi oleh aflatoksin terdapat pada kenari yaitu 1382 ppb (Tabata et al., 1993). Di Thailand dan Afrika, 65 % sampel kacang-kacangan dan 30 % sampel padi-padian yang diperiksa, ternyata tercemar

aflatoksin (Shank et al., 1972). Di Mesir, Hafez (1993) dalam penelitiannya dapat mendeteksi aflatoksin pada 90 % dari sampel kemiri dan 75 % dari sampel kenari. Di Addis Abeba, Fufa dan Urga (1996), menemukan bahwa AFB₁ terdeteksi pada 13,3 % cabai dan 8,33 % shiro. Dengan meneliti bumbu masak yang dibeli dari 2 *supplier* di United Kingdom, Flannigan dan Hue (1976) mendapatkan bahwa 13 % dari sampel cabai yang diperiksa mengandung aflatoksin. Di Qidong dan Fusui Cina, AFB₁ mengkontaminasi jagung, minyak, kacang tanah dan beras (Shun, 1995). Di Indonesia sendiri, Soeryodibroto (1978) mendapatkan AFB₁ mencemari kacang-kacangan, tempe, oncom, kentang rusak, gaplek, beras berjamur dan jamu-jamuan yang kadar aflatoksinnya sangat jauh melampaui ppb yang diperbolehkan oleh WHO. Lestariana (1988) di Yogyakarta dapat mendeteksi AFB₁ pada makanan yang banyak dimakan rakyat seperti kacang, jagung, ubi, tempe dan kecap. Kandungan AFB₁ juga terdapat dalam konsentrasi tinggi (>30 ppb) pada jagung yang dikumpulkan dari petani, pedagang kecil dan menengah di Provinsi Lampung (Dharmaputra dkk. 1993). Bahri dkk. (1995) juga mendapatkan hubungan antara keberadaan AFB₁ yang terdapat dalam pakan ternak dengan residu AFM₁ pada air susu sapi. Hastuti (1996) mendeteksi pula AFB₁ pada biji lada rusak yang banyak dikonsumsi oleh rakyat golongan bawah di Malang.

Di dalam tubuh AFB₁ akan menimbulkan kerusakan pada bermacam-macam organ tubuh. Walaupun demikian, hati adalah sasaran utama dengan menimbulkan kerusakan sel hati mulai dari yang ringan seperti degenerasi sampai pada yang berat seperti karsinoma hepatoseluler (Chao et al., 1999; Foster and Rosche, 2001; Stern et al., 2001). Namun mekanisme terjadinya kerusakan dan perubahan sel hati akibat pemberian AFB₁ masih belum jelas.

Pemberian AFB₁ yang menyebabkan degenerasi heptak keruh pada sel hati sampai dengan karsinoma menandakan telah terjadi kerusakan pada membran sel yang menyebabkan meningkatnya permeabilitas membran sel. Keadaan ini akan meningkatkan kebocoran substansi yang secara normal tidak boleh melewati membran tersebut, seperti Ca²⁺, enzim-enzim intraseluler yang seharusnya berada di dalam sel. Akibat kerusakan membran sel, enzim-enzim tersebut akan keluar dari sel menuju ruang intra vaskuler, sehingga kadar enzim tersebut meningkat di dalam serum. (Sherlock, 1989). Ini telah dibuktikan oleh Wang et al. (1994) dan Hastuti (1999) yang mendapatkan peningkatan enzim transaminase, alkali fosfatase dan glutathion S-transferase dengan pemberian AFB₁ pada tikus putih percobaan. Terjadinya kerusakan membran sel akibat pemberian AFB₁ dapat disebabkan banyak faktor. Salah satu teori yang dapat dipakai untuk menjelaskan kerusakan dan perubahan sel hati akibat pemberian AFB₁ adalah karena pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) sebagai akibat terjadinya proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁.

AFB₁ dimetabolisme di dalam hati dengan menghasilkan metabolit yang reaktif. Perubahan ini dikatalisator oleh sitokrom P-450 dengan cara mengoksidasi AFB₁ melalui reaksi rantai hidroksilasi substrat (Mace et al., 1997, Lestariana, 1997). Reaksi rantai ini akan menghasilkan O₂⁻ (superoksida) dan H₂O₂ pada rantai 4 dan 5 rantai hidroksilasi substrat P-450 (3), yang terbentuk sangat berbahaya bila terdapat bersamaan dengan H₂O₂ karena dapat membentuk radikal hidroksil (OH[•]), suatu bentuk ROS yang sangat berbahaya. Di samping itu H₂O₂ yang terbentuk dapat membentuk OH[•] bila bereaksi dengan logam transisi seperti Fe²⁺ dan Cu²⁺ melalui

reaksi Fenton (Gutteridge, 1995; Preedy et al., 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryuhudoyo, 2006.)

Dalam keadaan normal tanpa induksi pembentukan O_2^- dan H_2O_2 , pembentukan OH $^\cdot$ dapat diredam oleh enzim antioksidan tubuh seperti katalase dan *superoxide dismutase (SOD)*. Tetapi induksi yang terus menerus akan menyebabkan enzim ini lumpuh, sehingga memudahkan pembentukan OH $^\cdot$ (Mc Cord, 1998). Akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dengan enzim antioksidan tubuh akan timbul stres oksidatif. Pemaparan stres oksidatif pada sel mamalia akan menghasilkan oksidasi glutathion dan NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) yang diikuti oleh gangguan homeostasis thiol protein dan deplesi ATP. Deplesi ATP akan menyebabkan sistem pompa Natrium berkurang sehingga ion Na akan berakumulasi di dalam sel, sehingga akan terjadi pemasukan air ke dalam sel yang ditandai dengan membengkaknya sel dan dilatasi retikulum endoplasma. Secara morfologi akan terjadi degenerasi hidrofik dan degenerasi lemak. Gangguan homeostasis thiol akan menyebabkan gangguan homeostasis Ca^{++} di dalam sel yang akan diikuti oleh peningkatan Ca^{++} intra seluler. Hal ini akan menyebabkan pengaktifan sejumlah enzim seperti fosfolipase, protease dan endonuklease yang akan menimbulkan kerusakan mitokondria yang ditandai dengan terbentuknya porus pada mitokondria yang disebut *mitochondrial permeability transition (MPT)* sehingga akan mengakibatkan kematian sel seperti nekrosis dan apoptosis. (Cochrane, 1991; Feher et al., 1992; Orrenius, 1993; Cotran et al., 1999; Widodo, 2003)

ROS mempunyai target pada tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu lipid, protein dan DNA (Halliwell and

Gutteridge, 1999, Suryohudoyo, 2000). Kerusakan oksidatif pada lipid terutama dialami oleh asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid* - PUFA) yang mengalami oksidasi. Kerusakan ini berupa reaksi rantai yang akan membentuk hasil akhir berupa peroksida, aldehid seperti malonaldehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon dan etana yang bersifat toksik terhadap sel (Comporti, 1993, Siems et al., 1993, Suryohudoyo, 2000, Setiati 2003). Peroksidasi lipid pada membran sel akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran, sehingga terjadi pembengkakan pasif mitokondria yang akan memperparah kerusakan sel. (Halliwell and Gutteridge, 1999). Hal ini telah dibuktikan oleh Hastuti (1999), dimana dengan pemberian AFB₁ 1 mg/Kg BB, 1.75 mg/Kg BB dan 2.5 mg/Kg BB kepada mencit percobaan selama 4 hari terjadi pembengkakan mitokondria.

Studi epidemiologi yang telah dilakukan di berbagai negara menunjukkan bahwa terdapat hubungan positif antara jumlah AFB₁ yang terdapat di dalam bahan makanan dengan insidens karsinoma hepatoseluler (Kew, 1994). Survey secara random yang dilakukan di provinsi Guangxi Cina tahun 1987-1988, menunjukkan bahwa *intake* AFB₁ berkorelasi secara positif dengan kematian akibat karsinoma hepatoseluler ($r=0.5531$, $p < 0.001$) (Shun, 1995). Penelitian di Guangxi China juga mendapatkan insidens karsinoma hati pada laki-laki berkisar antara 120 - 100.000 populasi / tahun, suatu angka 35 kali lebih tinggi dari Amerika Serikat. Penelitian secara *cohort* di daerah ini mendapatkan bahwa paparan AFB₁ diperkirakan sebesar 2575 ng/kg hari, suatu keadaan yang berbeda di Amerika Serikat dimana paparan AFB₁ sebesar 3 ng/kg hari (Stem et al., 2001). Penelitian pada hewan percobaan, juga mendapatkan bahwa AFB₁ terbukti sebagai hepato karsinogen yang kuat. Keadaan ini merupakan suatu problem yang serius karena hati di dalam tubuh

mempunyai fungsi yang sangat kompleks yang berguna untuk kelangsungan hidup manusia.

Telah lama diyakini, bahwa karsinoma hepatoseluler terbentuk karena hasil metabolit AFB₁ yang bersifat reaktif yaitu 8-9 epoksida bereaksi secara kovalen dengan DNA untuk membentuk AFB₁-DNA adduct, di mana secara *in vitro* ataupun *in vivo* telah terbukti membentuk AFB₁-N7 Gua (Bailey et al., 1996). Adduct ini mempromosikan depurinasi dengan menghasilkan pembentukan *apurinic site* (AP-site). Kemungkinan lain cincin AFB₁-N7 Gua terbuka untuk membentuk AFB₁-FAPy (*formamido pyrimidine guanine*), AFB₁-N7 Gua, AP-site dan AFB₁-FAPy merupakan prekursor terhadap efek genetik yang diakibatkan AFB₁ (Bailey et al., 1996; Foster and Rosche, 2001; Smeila et al., 2001) dan dipercaya sebagai langkah pertama insiasi AFB₁ didalam mengembangkan HCC. (Bailey et al., 1996). Bagaimana DNA adduct ini terbentuk masih merupakan lahan penelitian bagi para ahli (Mace et al., 1999). Salah satu teori yang dapat menerangkan pembentukan DNA adduct adalah karena terjadinya pembentukan ROS sebagai akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ sehingga akan menyebabkan kerusakan oksidatif DNA.

Kerusakan oksidatif DNA akan menimbulkan kerusakan pada DNA yang berupa putusya rantai DNA, kerusakan pada deoksiribosa dan modifikasi basa purin dan pirimidin. Kerusakan ini terjadi baik secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung akan terbentuk adduct pada 8 hidroksil guanin, pembukaan cincin imidazol yang menghasilkan FAPy adduct (*formamido pyrimidine guanine*). Kerusakan secara tidak langsung disebabkan MDA yang terbentuk akibat peroksidasi lipid akan membentuk MDA-DNA adduct yang berkontribusi untuk terjadinya mutagenesis (Halliwell and Gutteridge, 1999). Disamping itu OH[•] yang terbentuk juga akan

mempengaruhi sinyal transduksi proliferasi, kematian sel dan penurunan komunikasi sel sehingga akan menimbulkan proliferasi sel yang berlebihan (Van Asbeck et al., 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999). Akibat pembentukan ROS yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan DNA yang dikemudian hari akan berkembang ke arah terjadinya kanker (Takashi and Niki, 1998).

Kerusakan oksidatif DNA yang terjadi bila tidak terlalu parah masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Di dalam penelitian para peneliti, ternyata p53 memainkan peranan penting di dalam pengaturan siklus sel dan mempertahankan integritas genom setelah sel tersebut mengalami induksi yang menyebabkan kerusakan genetik (van Gijssel et al., 1997; Hansen and Oren, 1997). Hal ini dilakukan p53 bukan saja dengan menghentikan pertumbuhan sel yang mengalami kerusakan DNA, tetapi juga memfasilitasi perbaikan DNA baik secara langsung atau transaktivasi gen.

Akibat perubahan material genetik, terjadi peningkatan aktivasi protein p53. Penelitian pada hewan percobaan menunjukkan pemberian AFB₁ pada sel hati normal akan memicu peningkatan kadar protein p53 yang diikuti oleh pengaktifan ekspresi gen-gen yang mengandung situs p53 binding spesifik dan berinteraksi dengan sejumlah faktor-faktor transkripsi untuk menghambat ekspresi gen lainnya yang terutama mempengaruhi pengaturan siklus sel (Yang and Hughes, 1998). Hal ini telah dibuktikan oleh Gijssel et al., 1997 dengan teknik imuno presipitasi. Mereka mendapatkan bahwa induksi tunggal (0,52 μ mol/kg AFB₁) pada tikus putih percobaan setelah 14 hari akan meningkatkan kadar protein p53. Hal serupa juga telah ditunjukkan oleh Yang and Hughes (1998) dengan mendapatkan peningkatan

kadar protein p53 setelah menginduksi kultur sel fibroblas mouse NCTC 1429 dengan 40 µg/ml AFB₁.

Aktivasi p53 akan merangsang pengeluaran protein p21 yang akan menghambat pembentukan kompleks cyclin-cdk, sehingga fosforilasi protein tidak terjadi dan sel tidak masuk kedalam fase S siklus pertumbuhan sel. Disamping itu p53 juga akan mempengaruhi GADD45 (*Growth arrest DNA damage inducible*) yang berfungsi memperbaiki DNA dan perlambatan siklus G1 (Harris and Hollstein, 1993; Oliner, 1994; Attardi et al., 1996; Weinberg, 1996; Cotran et al., 1999; Soussié, 2000).

Bila selama beristirahat didalam fase G1, kerusakan sel tidak dapat diperbaiki dengan baik, maka gen p53 akan meningkatkan sintesa bax dan IGF-BP₁. Bax akan meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menginduksi pelepasan sitokrom C serta mencegah pengikatan APAF-1 oleh Bcl-2, dimana APAF-1 merupakan inisiator *caspase*. Akibatnya terjadi pengaktifan enzim *caspase* yang akan mengganggu sitoskeleton dengan sasaran utama yang berhubungan dengan transkripsi, replikasi dan perbaikan DNA, sehingga menyebabkan apoptosis (Yang and Hughes, 1998; Parton et al., 2002). IGF-BP₁ akan melekat pada reseptor IGF (*insulin like growth factor*) dan menginduksi apoptosis dengan memblok sinyal intra seluler yang dimediasi oleh IGF (Harris and Hollstein, 1993; Yang and Hughes, 1998; Cotran et al., 1999; Soussié et al., 2000; Parton et al., 2002).

Bila apoptosis masih tidak dapat memperbaiki kerusakan DNA, sedangkan induksi karsinogen masih berlanjut, maka gen p53 akan kehilangan fungsinya. Akibatnya terjadi proliferasi sel yang tak terkendali (Van Gijssel et al., 1997; Van Oijen and Slootweg, 2000) dan akan menimbulkan pertumbuhan sel kanker (Takashi

and Niki, 1998), sehingga status gen p53 dapat dianggap sebagai indikator prognostik dari keganasan yang terjadi pada manusia (Yang and Hughes, 1998).

Akhir-akhir ini dilaporkan bahwa kejadian mutasi gen p53 banyak ditemukan pada penderita HCC dari beberapa negara. Pada daerah-daerah dengan paparan AFB₁ yang tinggi seperti Cina, Afrika Selatan, Mozambique dan Spanyol, 44 % penderita HCC mengalami mutasi p53. Pada daerah dengan paparan AFB₁ sedang seperti Hongkong, Singapura, Taiwan, Vietnam dan Mesir, ditemukan mutasi p53 sebanyak 7 %, dan daerah-daerah dengan paparan AFB₁ rendah, seperti Eropa, Australia dan USA hanya ditemukan sebanyak 1 % mengalami mutasi p53 (Smela, 2001).

Pada hewan percobaan, peneliti-peneliti mendapatkan pula hubungan HCC yang diakibatkan AFB₁ dengan gen p53 pada hewan percobaan. Gebranos and Sell (1998) mendapatkan, bila tikus putih transgenik p53 ser 246 dikawinkan dengan tikus putih transgenik lainnya yang kekurangan gen p53 dan tikus putih yang positif HbsAg, maka pemberian AFB₁ pada anak-anak tikus putih ini akan meningkatkan mutasi p53 ser 246 sehingga dapat menyebabkan HCC. Ia berpendapat bahwa terdapatnya p53 ser 246 mutant tidak hanya secara signifikan mempunyai efek karsinogenik, tetapi juga meningkatkan tumorigenesis pada tikus-tikus putih yang mempunyai p53 *heterozygot* dan *homozygot* bila diberi AFB₁, bukan karena adanya HbsAg. Penelitian sebelumnya Gebranos et al., (1995) telah menemukan bahwa mutasi gen p53 pada kodon 246 mempunyai sifat yang sama dengan gen p53 manusia pada kodon 249.

Penelitian Lee et al., (1998) dengan memberikan AFB₁ 37,5 µg hari selama 8 minggu pada tikus putih yang telah terlebih dahulu dilakukan hepatektomi parsial

mendapatkan 38 % (5 dari 13) dari tikus-tikus putih ini yang menderita HCC mempunyai mutasi gen p53. Peneliti lain, Park et al., (2000) dengan menginduksi AFB₁ pada *tree shrews* (*Tupaia Belangeri* *Cinensis*) dan injeksi EBV, mendapatkan 5 dari tupai-tupai ini mengalami mutasi titik pada gen p53. Park et al., (2000) juga mengatakan bahwa sekuensing wt p53 pada tupai memperlihatkan nukleotida dan asam amino yang homolog 91.7 % dan 93.4 % dengan nukleotida dan asam amino gen p53 gen manusia. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan terdapat mutasi gen p53 pada hewan percobaan yang diinduksi HBV dan AFB₁ (Schwartz and Carthers, 2001)

Akibat mutasi gen p53 akan terjadi proliferasi sel hati yang tak terkendali sehingga terjadi HCC. Pada HCC yang terdiferensiasi dengan baik, sel tumor hati terlihat sangat mirip dengan sel parenkim hati dengan ukuran yang lebih besar. Diantara keadaan sel normal dan sel tumor hati terdapat suatu keadaan dimana sel hati mengalami displasia, yang ditandai oleh pembesaran sel hati, inti pleomorfisme dan sel multi nuklear yang mengenai kelompok atau keseluruhan nodulus (Cotran et al., 1999)

Lama pemberian dan kadar AFB₁ yang berbeda akan memberikan efek toksik yang berbeda terhadap sel hati. Efek toksik yang berbeda ini mungkin disebabkan oleh karena ROS yang dihasilkan sebagai akibat proses oksidatif biotransformasi AFB₁ yang terjadi pada sel hati berbeda, sehingga akan menimbulkan kerusakan oksidatif sel hati yang berbeda pula. Akibatnya terdapat perubahan MDA, kerusakan sel hati dan ekspresi p53 yang berbeda.

Walaupun penelitian para peneliti yang terdahulu telah mendapatkan kelainan sel hati akibat pemaparan AFB₁, tetapi belum ada penelitian tentang mekanisme

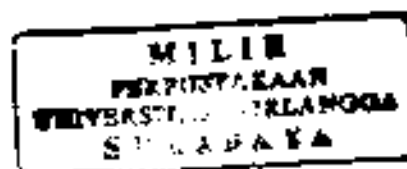
kerusakan dan perubahan sel hati sebagai akibat ROS yang dihasilkan oleh proses oksidatif biotransformasi AFB₁ ditinjau dari aspek biologi molekuler seperti perubahan enzim SOD, katalase, MDA, kerusakan dan perubahan sel hati dan ekspresi p53

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, maka dalam penelitian ini akan diungkapkan aspek biologi molekuler pada kerusakan dan perubahan sel hati akibat ROS yang dihasilkan oleh proses oksidatif biotransformasi AFB₁ menurut lama dan kadar pemberian pada tikus putih.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah penelitian, dapat dibuat perumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih sebagai akibat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)?
2. Apakah ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap kadar malonaldehid hati tikus putih?
3. Apakah ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase dan aktivitas enzim superoksida dismutase jaringan hati tikus putih?
4. Apakah ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap ekspresi protein p53 dan apoptosis sel hati tikus putih?
5. Apakah ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap perubahan sel hati baik berupa displasia atau proliferasi yang tak terkendali pada tikus putih?



1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Mengungkap aspek biologi molekuler pada kerusakan sel hati tikus putih sebagai akibat proses oksidatif biotransformasi AFB₁ menurut lama dan kadar pemberian AFB₁.

1.3.2. Khusus

1. Mengkaji ada atau tidak pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih sebagai akibat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)
2. Mengkaji ada atau tidak pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap kadar malonaldehid jaringan hati tikus putih
3. Mengkaji ada atau tidak pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase dan aktivitas enzim superoksida dismutase jaringan hati tikus putih
4. Mengkaji ada atau tidak pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap ekspresi protein p53 dan apoptosis sel hati tikus putih
5. Mengkaji ada atau tidak pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap perubahan sel hati baik berupa displasia atau proliferasi yang tak terkendali pada tikus putih

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini mempunyai manfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan karena dapat mengetahui mekanisme terjadinya kerusakan sel hati sebagai akibat

proses oksidatif biotransformasi AFB dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler. Lebih lanjut penelitian ini juga memberi manfaat bagi pengembangan pengetahuan dibidang biologi molekuler terhadap perkembangan karsinogenesis sel hati



BAB II**TINJAUAN PUSTAKA****2.1. Hati**

Hati merupakan organ terbesar dalam tubuh manusia yang terletak dalam rongga abdomen dibawah sekat rongga badan. Berat hati manusia dewasa normal kurang lebih satu setengah kilogram. Sebagian besar aliran darahnya (± 70%) berasal dari vena porta dan sebagian kecil disuplai oleh arteri hepatica. Melalui vena porta, semua zat yang diabsorpsi melalui usus mencapai hati kecuali lipida yang ditransport terutama oleh pembuluh-pembuluh limfatik (Gray, 1995). Di dalam hati, nutrien yang diabsorpsi dari saluran pencernaan, dikumpulkan, diubah, ditambah metabolitnya untuk dinetralkan serta dibuang zat toksiknya. Pembuangan ini terjadi dalam empedu, suatu sekresi eksokrin hati yang penting untuk pencernaan lipida (Ganong, 2003).

2.1.1. Struktur Hati

Hati dilindungi oleh jaringan tipis yang disebut kapsul Glisson yang bersifat lunak dan lentur. Terdiri atas lobus kanan dan lobus kiri. Dengan terdapatnya kandung empedu, fisura ligamentum teres hepatis, vena cava inferior dan fisura ligamentum venosum, lobus kanan akan terbagi lagi menjadi lobus kuadratus dan lobus kaudatus. Lobus ini terdiri atas lobulus-lobulus yang berbentuk heksagonal. Lobulus hati membentuk massa poligonal prismatis jaringan hati dengan ukuran 0,7 x 2 mm. Pada hewan tertentu, misalnya babi dan hewan memamah buah, lobulus-lobulus terpisah satu sama lain dan dibatasi oleh lapisan jaringan penyambung yang

jelas (Dellmann, 1971). Tetapi hal ini tidak terdapat pada manusia, dimana berbagai lobulus berhubungan erat hampir pada seluruh permukaannya, sehingga menyulitkan untuk menentukan dengan tepat batas antara lobulus-lobulus. Akan tetapi pada beberapa daerah, lobulus-lobulus dipisahkan oleh jaringan penyambung dan pembuluh-pembuluh darah (Junqueira et al., 1995). Pada bagian pusat lobulus terdapat vena sentralis, sedang pada tiap sudut lobulus terdapat daerah segitiga Kiernan. Darah masuk kedalam hati melalui vena interlobularis yang terdapat di daerah segitiga Kiernan tersebut yang selanjutnya akan masuk kedalam sinusoid-sinusoid (Fox, 1999).

Komponen struktural dasar hati adalah sel hati (hepatosit = sel parenkim), sedang komponen struktural lainnya adalah sel Kupffer dan sel penimbun lemak (sel Ito sel Stelat). Secara struktural, sel hati menunjukkan variasi dalam histokimia. Dua sel hati apabila berdekatan membentuk saluran yang disebut kanalikuli empedu (Junqueira et al., 1995).

2.1.2. Sel Hati (Hepatosit = sel parenkim)

Hepatosit tersusun secara radier dalam lobulus hati. Mereka bertumpukan, membentuk lapisan sel yang tebalnya satu lapis seperti dinding tembok. Lempeng-lempeng berjaisan dari perifer lobulus menuju ke bagian tengah dan beranastomose dengan bebas membentuk suatu kompleks labirin dan struktur yang menyerupai busa. Celah antara lempeng-lempeng ini mengandung sinusoid-sinusoid kapiler yang disebut sinusoid hati, dimana sinusoid merupakan pembuluh yang melebar tidak teratur dan hanya terdiri atas satu lapisan sel endotel yang tidak kontinu. (Junqueira et al., 1995). Zat-zat yang terkandung dalam darah yang terdapat di dalam sinusoid

dapat di absorpsi ke dalam hepatosit di sekitar sinusoid. Hal ini dimungkinkan karena sinusoid mempunyai dinding tipis serupa dengan pembuluh kapiler (Bioulac-Sage et al., 1999). Sinusoid dikelilingi dan disokong oleh selubung serabut retikuler halus yang penting untuk mempertahankan bentuknya. Sinusoid berasal dari pinggir lobulus, diisi oleh vena-vena dalam cabang-cabang terminal vena porta dan arteriola hepatica. Mereka berjalan ke arah pusat untuk bermuara ke dalam vena sentralis. (Junqueira et al., 1995)

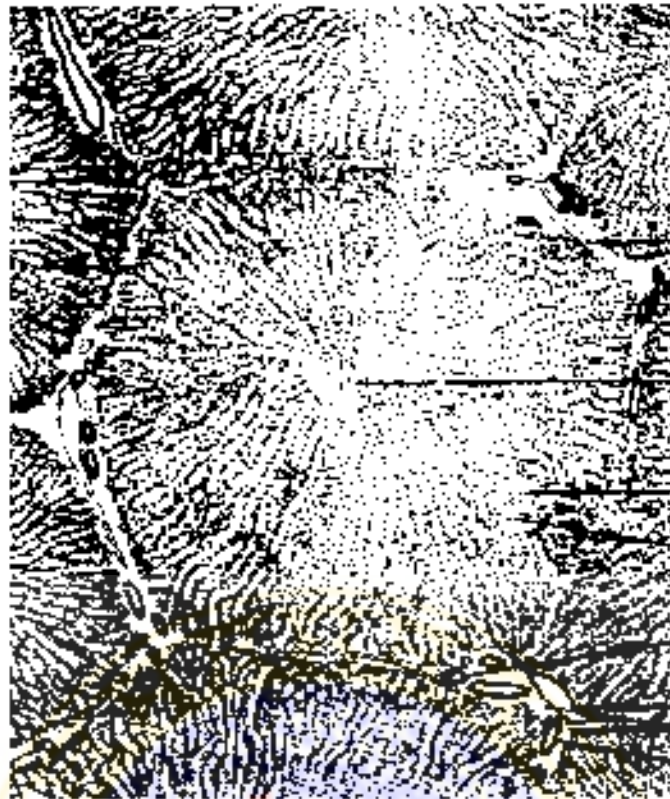
Di dalam lobulus, hepatosit dapat dibedakan atas 3 zona yaitu zona perifer, zona sentral dan zona sentrilobular (Bioulac-Sage et al., 1999). Hepatosit yang terdapat pada zona perifer terletak di sekitar segitiga Kiernan. Hepatosit ini menerima pertama kali darah serta zat-zat yang terkandung di dalamnya. Selanjutnya darah diabsorpsi oleh hepatosit-hepatosit yang terdapat pada zona-zona sentral dan sentrilobular. Hepatosit-hepatosit yang terdapat pada kedua zona tersebut menerima darah dengan kadar zat-zat yang terkandung di dalamnya lebih rendah dibandingkan dengan kadar pada zona perifer (Bioulac-Sage et al., 1999). Darah dalam sinusoid yang terdapat di sekitar zona sentrilobular akan keluar dari hati melalui vena hepatica.

Selain sel-sel endotel, sinusoid juga mengandung sel-sel fagosit dari seri retikulo endotel yang dikenal dengan sel Kupffer. Sel-sel ini terdapat pada permukaan terminal sel endotel. Sel Kupffer mempunyai sifat sitologis yang nyata seperti vakuola yang jernih, lisosom dan retikulum endoplasma granuler yang tersebar diseluruh sitoplasma yang membedakan mereka dari sel endotel (Junqueira et al., 1995)

Di samping itu, terdapat juga sel-sel yang menyimpan lemak (sel Ito = sel Stelat) yang berbentuk bintang yang terletak pada celah pada sinusoid (celah Disse). Sel Stelat mempunyai kemampuan mengumpulkan vitamin A yang diberikan dari luar dalam bentuk tetesan lipid, tetapi peran fisiologis sel tersebut belum jelas (Junqueira et al., 1995).

Pada potongan yang diwarnai dengan hematoxilin dan eosin, sel hati terlihat polihedral dengan mempunyai 6 permukaan atau lebih dengan panjang 30 μm dan lebar 20 μm . Sitoplasma bersifat eosinofilik terutama karena adanya mitokondria dalam jumlah besar dan sedikit retikulum endoplasma yang halus (Broulac-Sage et al., 1999).

Dengan menggunakan mikroskop elektron membran sel dan membran organela sel terdiri atas dua lapis, yaitu membran luar dan membran dalam. Dalam keadaan normal, membran dalam dan membran luar berada dalam keadaan utuh. Pada membran dalam terdapat lipatan-lipatan atau krista-krista yang menonjol ke bagian tengah mitokondria. Membran luar bersifat lebih permeabel bila dibandingkan membran dalam yang mempunyai permeabilitas sangat terbatas. Dalam matriks terdapat enzim-enzim yang berperan dalam siklus asam sitrat. Pada membran dalam mitokondria terdapat enzim yang berperan dalam rantai respirasi. Apabila terjadi kerusakan pada membran luar dan membran dalam, maka enzim-enzim respirasi seluler akan keluar dari mitokondria, sehingga respirasi seluler terhambat (Jones and Schmucker, 1999).



Gambar 2.1. Gambar elektron hati pada babi

(Dikuip dari De Jman, *Cellular Histology*, 1971)

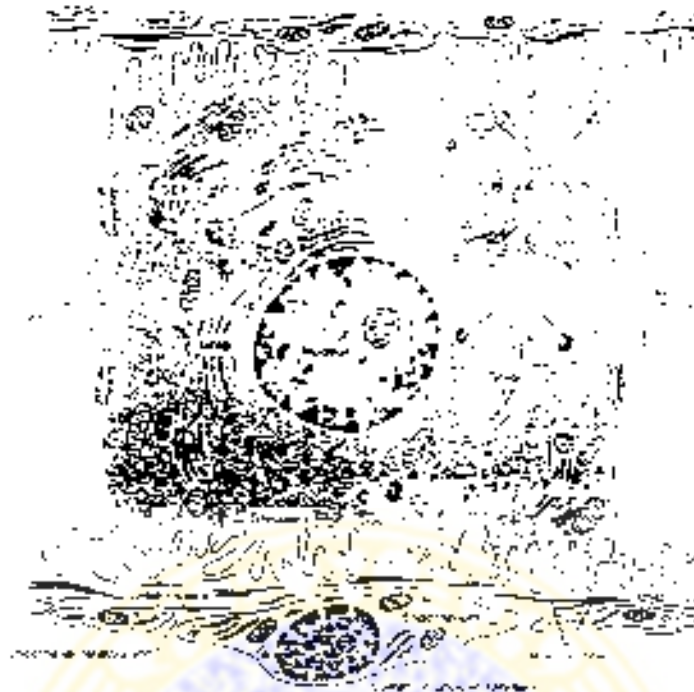
Di dalam sehati terdapat organel yang terdiri dari mitokondria, retikulum endoplasma, tetes-tetes lemak, glikogen, kompleks Golgi dan lisosom dengan sate atau dua inti bulat yang mempunyai satu atau dua anak inti yang khas. Retikulum endoplasma pada hati ada yang kasar dan halus yang dalam keadaan normal berbentuk saluran-saluran intra seluler. Retikulum endoplasma granuler membentuk kelompok yang tersebar di dalam sitoplasma. Beberapa protein seperti albumin dan fibrinogen darah disintesis dalam struktur ini. Retikulum endoplasma halus yang tersebar secara difusi di seluruh sitoplasma, sehatannya bertanggung jawab terhadap proses konjugasi dimana berbagai zat dioksidasi pada sulfat atau glukuronida selama proses inaktivasi atau detoksifikasi sebelum dikeluarkan dari tubuh. Organel ini

merupakan sistem labil yang bereaksi cepat terhadap perubahan lingkungan (Jones and Schmucker, 1999).

Sel hati kaya akan glikogen. Polisakarida ini dalam mikroskop elektron tampak sebagai granula padat, kasar yang seringkali berkumpul dekat retikulum endoplasma dan berbentuk seperti buah arbei. Glikogen hati merupakan depot glukosa dan dimobilisasi bila kadar glukosa darah turun dibawah normal (Jones and Schmucker, 1999).

Sel hati mempunyai banyak mitokondria, lebih kurang 2.000 buah dengan bentuk sferis atau ovoid. Membran terdiri atas 2 lapis, dimana bagian dalam terinvaginasi. Seperti apa yang terjadi pada sebagian unsur sel, protein mitokondria hati secara terus menerus diperbaharui. Mereka banyak mengandung enzim, terutama dari siklus asam sitrat yang terlibat dalam β oksidasi asam lemak untuk menghasilkan ATP (Jones and Schmucker, 1999).

Unsur sel lain yang terdapat adalah tetesan lemak yang jumlahnya sangat berubah-ubah. Lisosom dan peroksisom banyak terdapat dalam hepatosit, walaupun fungsinya masih merupakan dugaan. Lisosom berbentuk pleomorfik dengan ukuran dan jumlah yang bervariasi, sedang peroksisom berbentuk partikel dengan selapis membran yang berisi matriks granuler (Jones and Schmucker, 1999). Sistem Golgi terdiri atas beberapa kelompok yang biasanya terletak dekat inti berdampingan dengan kanalikuli biliaris, masing-masing dibentuk oleh lamel-lamel yang berdekatan. Fungsinya dalam hepatosit tidak jelas, walaupun ia dapat berperanan dalam pembentukan lisosom dan pada sekresi protein-protein darah (Junqueira et al., 1995).



Gambar 2.2 Diagram ultrastruktur hepatosit
 GER = Retikulum endoplasma granula RER = Retikulum endoplasma halus
 (Dikutip dari Junqueira et al., *Basic Histology*, 1995)

2.1.3. Fungsi Hati

Sebagai organ terbesar di dalam tubuh hati mempunyai banyak sekali fungsi. Tiga fungsi dasar hati adalah (1) pembentukan dan sekresi empedu yang dimasukkan ke dalam usus halus, (2) berperan pada aktivitas metabolisme yang berhubungan dengan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein, dan (3) menyaring darah untuk membuang bakteri dan benda asing lain yang masuk ke dalam darah dan jumen usus (detoksikasi) (Snell, 1943; Fox, 1999; Ganong, 2001)

Berbagai obat dan senyawa dapat dinaktifkan dengan cara oksidasi, metilasi dan konjugasi. Enzim-enzim yang berperan dalam proses ini diduga terutama terdapat di dalam retikulum endoplasma halus. Glukuronil transferase, suatu enzim

yang mengkonjugasi asam glukuronat dengan bilirubin menyebabkan konjugasi beberapa senyawa lain seperti steroid, barbiturat, anti histamin dan anti konvulsan (Cianong, 2001).

Di samping ketiga fungsi di atas, hati masih mempunyai fungsi yang lain yaitu sebagai penyimpanan metabolit-metabolit dan penyimpanan vitamin seperti vitamin A (Junquiera et al., 1995).

2.1.4. Jejas Seluler Hepatosit

Sel hati dapat berubah struktur, komponen maupun fungsi akibat hipoksia anoksia, fisik bahan kimia dan obat, infeksi, reaksi imunogenik, cacat genetik maupun ketidak seimbangan nutrisi. Kerusakan tergantung pada kadar, lama dan keganasan dari stimuli (Cotran et al., 1999).

2.1.4.1. Mekanisme terjadinya Jejas Seluler

Proses terjadinya jejas seluler secara umum disebabkan karena deplesi ATP, peningkatan Ca^{2+} intra seluler, kehilangan homeostasis Ca^{2+} , terbentuknya derivat oksigen radikal bebas, defek permeabilitas membran plasma dan kerusakan mitokondria (Cotran et al., 1999).

Kelainan iskemik dan toksin tertentu akan menyebabkan peningkatan konsentrasi sitosolik Ca^{2+} yang disebabkan masuknya Ca^{2+} melalui membran plasma dan pembebasan kalsium dari mitokondria dan retikulum endoplasma. Peningkatan ini akan mengubah sejumlah aktivitas enzim yang berpotensi merusak sel, seperti fosfolipase (menurunkan fosfolipid dan berpotensi merusak membran), protease

memecah membran dan protein sitoskeleton. ATPase (penurunan ATP) dan endonuklease (menimbulkan kerusakan kromatin) (Cotran et al., 1999).

Selama proses jejas seluler berlangsung, terjadi pembentukan senyawa oksigen reaktif sebagai akibat yang tak dapat dielakkan yang dihasilkan oleh respirasi mitokondria. Beberapa dari senyawa ini berbentuk radikal bebas yang akan merusak lipid, protein dan asam nukleat yang dapat dicegah oleh mekanisme pertahanan tubuh. Ketidak seimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan tubuh yang disebut stres oksidatif akan menghasilkan jejas seluler (Cotran et al., 1999, Halliwell and Gutteridge, 1999).

Akibat jejas seluler, membran sel akan kehilangan permeabilitas yang selektif, yang dapat menimbulkan kerusakan membran sel yang merupakan gambaran umum dari jejas seluler. Defek yang terjadi disebabkan oleh karena deplesi ATP, aktivasi fosfolipase sebagai akibat modulasi Ca^{2+} intra seluler.

Secara langsung atau tidak langsung mitokondria adalah target yang penting dari stimulus yang menyebabkan jejas seluler baik yang disebabkan oleh hipoksia ataupun toksin. Kerusakan mitokondria ini dapat disebabkan oleh peningkatan Ca^{2+} sitosolik, stres oksidatif, pemecahan fosfolipids melalui jalur fosfolipase A_2 dan sfingomielin dan derivat-derivat asam lemak dan seramid sebagai pemecahan lipid. Kerusakan ini ditandai dengan terbentuknya porus yang disebut *mitochondrial permeability transition (MPT)*. Walaupun kerusakan mitokondria ini bersifat reversibel pada stadium permulaan, porus-porus yang non selektif akan menetap bila stimulus tetap ada yang akan menghalangi pemeliharaan tenaga mitokondria, sehingga fosforilasi oksidatif mitokondria mengalami krisis. Kerusakan mitokondria

juga menimbulkan kebocoran sitokrom C ke dalam sitosol yang dapat memicu apoptosis (Cotran et al., 1999).

Bila hipoksia menetap, maka akan terjadi jejas seluler yang ireversibel. Jejas seluler yang ireversibel terjadi oleh karena ketidakmampuan untuk mengembalikan disfungsi mitokondria yang ditandai oleh semakin terjadinya deplesi ATP dan kerusakan membran sel. Kerusakan membran sel yang lebih lanjut juga disebabkan oleh karena kehilangan fosfolipid membran, kerusakan sitoskeleton, pembentukan *reactive oxygen species*, degradasi fosfolipid dan kehilangan asam amino intra seluler.

Jejas seluler ireversibel ditandai oleh pembengkakan yang hebat di mitokondria, kerusakan yang luas membran plasma dan pembengkakan lisosom yang mengakibatkan jejas pada membran lisosom. Ini diikuti oleh kebocoran sejumlah enzim yang terdapat dalam lisosom seperti RNase, DNase, protease, fosfatase, glukosidase dan katepsin ke dalam sitoplasma. Aktivasi enzim-enzim ini menimbulkan pencernaan enzimatik komponen sel yang mengakibatkan kematian sel (Cotran et al., 1999).

Kematian sel mempunyai dua bentuk yaitu nekrosis dan apoptosis. Apoptosis berbeda dengan nekrosis, dimana nekrosis merupakan suatu bentuk perubahan morfologi yang mengikuti kematian sel dalam jaringan hidup, sedang apoptosis merupakan suatu proses penghilangan sel yang terprogram dalam berbagai jaringan yang terjadi baik pada keadaan fisiologis maupun patologis. Perbedaan antara nekrosis dan apoptosis dapat dilihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Perbedaan Karakteristik tipe kematian sel akibat nekrosis dan apoptosis

Kriteria	Apoptosis	Nekrosis
1. Morfologi	<ul style="list-style-type: none"> - Delesi dari satu sel - Membran sel menggelembung tetapi tidak kehilangan integritas - Sel mengkerut yang berakibat dengan pembentukan <i>apoptotic bodies</i> - Tidak ada respon inflamasi - Difagosit oleh sel berdekatan dan beberapa oleh makrofag - Lisosom utuh - Kromatin terkondensasi 	<ul style="list-style-type: none"> - Kematian dan group sel - Integritas membran sel hilang - Sel membengkak dan lisis - Terdapat respon inflamasi - Difagosit oleh makrofag - Lisosom bocor - Kromatin mengalami koagulasi
2. Biokimia	<ul style="list-style-type: none"> - Dirangsang oleh stimuli fisiologik dan patologik - Proses diregulasi dengan langkah sintetik dan aktivasi - Membutuhkan energi - Membutuhkan sintesa makromolekuler - <i>De Novo</i> transkripsi gen - Terdapat fragmen DNA 	<ul style="list-style-type: none"> - Dirangsang oleh keadaan patologik seperti hipoksia dan toksin - Kehilangan regulasi homeostatis ion - Tidak membutuhkan energi - Tidak membutuhkan protein atau sintesa asam nukleat - Tidak ada transkripsi gen baru - Terjadi digesti DNA secara random

(Dikutip dari *The Complete Apoptosis Manual*)

2.1.4.2. Nekrosis

Nekrosis terjadi akibat aksi degradasi yang progresif oleh enzim pada sel yang mengalami jejas dengan stimuli mematikan dan denaturasi protein. Enzim-enzim katalitik ini dihasilkan oleh lisosom sel yang mengalami kematian sehingga terjadi autolisis. Manifestasi yang sering terlihat adalah nekrosis koagulasi yang ditandai dengan denaturasi protein sitoplasma, organela sel pecah dan pembengkakan sel (Cotran et al., 1999).

Secara morfologi, sel kelihatan lebih transparan dari sel normal yang disebabkan kehilangan partikel glikogen. Di dalam sitoplasma terlihat banyak

vakuola-vakuola. Dengan elektron mikroskop sel-sel yang mati ditandai dengan terdapatnya diskontinuitas membran plasma dan membran organel. Terjadi dilatasi mitokondria, pembenukan mielin di dalam sitoplasma dan akibat pecahnya DNA inti berubah menjadi salah satu dari tiga bentuk di bawah ini yaitu

1. Píknosis, ditandai oleh nukleus yang mengkerut dan peningkatan basofil yang disebabkan karena DNA berkoagulasi menjadi solid dan mengkerutnya massa basofilik.
2. Karioreksis, dimana inti dapat hancur dan meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar di dalam sel.
3. Kariolisis, dimana kromatin yang bersifat basofilik akan menjadi pudar atau hilang disebabkan aktivitas DNase, sehingga kehilangan kemampuan untuk diwarnai dan menghilang begitu saja.

Nukleus akan hilang setelah satu sampai dua hari. Setelah mati, komponen sel secara progresif mengalami kebocoran yang luas. Akibatnya enzim-enzim seluler akan masuk ke ruang ekstraseluler dan sebaliknya. Daerah jaringan yang mengalami nekrosis akan menimbulkan respon peradangan. Sebagai akibat dari respon peradangan ini, jaringan yang mati akan dihancurkan dan dihilangkan sehingga membuka jalan bagi proses perbaikan yang mengganti daerah nekrosis dengan sel-sel regenerasi atau dengan jaringan parut (Price and Wilson, 1992, Cotran et al., 1999).

2.2. Aflatoksin B₁

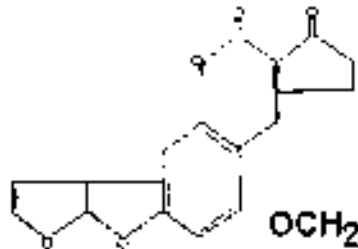
Aflatoksin B₁ (AFB₁) adalah toksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* yang mengkontaminasi biji-bijian (Foster and Rosche, 2001). Kapang ini mudah tumbuh pada suhu 25 - 28°C dengan kelembaban 70- 80% dan kadar air 11-

15 °C (Julius, 1990). Temperatur yang hangat lembab dan jejas pada tumbuh-tumbuhan di ladang dan selama penyimpanan, meningkatkan pertumbuhan jamur dan produksi aflatoxin. Ancaman terbesar terhadap kesehatan masyarakat berasal dari kontaminasi kacang, biji kapas, jagung dan beras (Foster and Rosche, 2001). Aflatoxin dikenal setelah peristiwa *Irish potato diseases* pada tahun 1960 yang menyebabkan kematian lebih dari 100.000 kalkun di Inggris. Toksin ini juga menyerang angsa dan domba (Julius, 1990).

2.2.1. Struktur kimia dan jenis aflatoxin

Aflatoxin adalah suatu senyawa yang terdiri dari 2 cincin furan dan 1 cincin kumarin atau disebut juga senyawa difuranokumarin. Berdasarkan fluoresensi dibawah sinar ultra violet, jenis aflatoxin yang telah dapat diisolasi dapat dibagi atas 2 bagian yang memberikan fluoresensi biru dinamakan aflatoxin B (Blue) dan yang memberikan fluoresensi hijau dinamakan aflatoxin G (Green). Sampai sekarang telah dikenal beberapa jenis aflatoxin yaitu aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, P₁, Q₁, D) antara berbagai macam aflatoxin tersebut di atas yang paling berbahaya bagi manusia adalah aflatoxin B₁ (AFB₁) dengan rumus kimia, seperti pada gambar 2.3. (Julius, 1990).

AFB₁ mempunyai titik lebur 270 °C, daya bunuh l.d 50 sebesar 20 µg/50 g. Dengan cara memasak biasa, aflatoxin tidak akan rusak atau hilang. Cara yang pernah dicoba untuk menghilangkan aflatoxin dari bahan makanan adalah dengan pemanasan yang tinggi, bahan kimia, iradiasi dan secara biologis tetapi hasilnya masih tidak memuaskan, karena selain aflatoxinnya rusak juga menyebabkan hilangnya zat gizi yang dikandung dalam bahan makanan tersebut (Julius, 1990).



Gambar 2.3 Rumus Bangun Aflatoksin B₁.

(Dikutip dari Eaton and Gallagher. *Mechanism of aflatoxin carcinogenesis*, 1994)

2.2.2. Epidemiologi Aflatoksin

Aflatoksin, terutama merupakan masalah bagi negara-negara berkembang dan miskin seperti Indonesia, karena mendapatkan bahan makanan dari negara-negara lain yang sudah tentu telah menyimpan bahan makanan tersebut sejak lama. Di samping itu penyimpanan bahan pangan yang berasal dari dalam negeri sendiri juga jauh dari memadai, karena tidak diberlakukannya kadar aflatoksin yang diperkenankan dalam makanan (ppb). Pemberlakuan ppb ini tergantung pada negara-negara yang bersangkutan, seperti 20 ppb di USA, 15 ppb di Kanada, 10 ppb di Prancis, 10 ppb di United Kingdom, 5 ppb di Australia dan 10 ppb di Jepang (Tabata et al. 1993). Indonesia sendiri sampai saat ini belum memperlakukan ppb AFB₁ yang diperbolehkan terdapat di dalam makanan.

Aflatoksin sanggup mengkontaminasi seluruh makanan. Survey yang dilakukan pada 3054 sampel makanan dari bahan makanan dipasar Tokyo Jepang pada tahun 1986-1990, ditemukan bahwa aflatoksin mengkontaminasi beras, jagung, gula pasir, kacang-kacangan, merica, pala, kenari, cabai, paprika dan bumbu masak. Insiden pencemaran yang paling tinggi terdapat pada pala (80 %) (Tabata dkk, 1993).

Di Thailand dan Afrika, 65 % sampel kacang-kacangan dan 30 % sampel padi-padian yang diperiksa ternyata tercemar oleh aflatoxin (Shank et al. 1972). Di Mesir, Hafez (1993) dapat mendeteksi aflatoxin pada 90 % kemiri dan 75 % sampel kenari. Di Addis Abeba, Fufa dan Urga (1996) menemukan bahwa AFB₁ dideteksi pada 13,3 % cabai dan 8,33 % shiro. Di United Kingdom, Flannigan dan Hue (1976), mendapatkan bahwa 13 % dari sampel cabai yang diperiksa mengandung aflatoxin. Di Qidong dan Fusui Cina, AFB₁ mengkontaminasi jagung, minyak goreng, kacang tanah dan beras (Shun, 1995). Di Indonesia sendiri, Sutyodibroto (1978) mendapatkan bahwa AFB₁ mencemari kacang-kacangan, tempe, oncom, kentang rusak, gaplek, beras berjamur dan jamu-jamuan yang kadar aflatoxinnya sangat jauh melampaui ppb yang diperbolehkan oleh WHO yaitu 30 ppb.

Lestariana dkk (1988) di Jogjakarta dapat mendeteksi AFB₁ pada makanan-makanan rakyat seperti kacang, jagung, ubi, tempe dan kecap. Kandungan AFB₁ juga terdapat dalam konsentrasi tinggi (>30 ppb) pada jagung yang dikumpulkan dari petani, pedagang kecil dan menengah di Provinsi Lampung (Dharmaputra dkk, 1993). Bahri dkk. (1995) juga mendapatkan hubungan antara keberadaan AFB₁ yang terdapat dalam pakan ternak dengan residu AFM₁ pada air susu sapi. Hastuti (1996) dalam penelitian terhadap biji lada rusak yang banyak dikonsumsi oleh rakyat golongan bawah di Malang menemukan bahwa lada tersebut mengandung AFB₁. Peningkatan keracunan AFB₁ ini juga berhubungan dengan musim, dimana selama musim panas di Songkhla Thailand kontaminasi AFB₁ lebih rendah (WHO, 1993).

2.2.3. Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi Aflatoksin

AFB₁ seperti bahan-bahan xenobiotik lainnya, akan mengalami biotransformasi di dalam tubuh. Hati merupakan organ utama untuk melakukan biotransformasi senyawa-senyawa xenobiotik tersebut. Ini disebabkan karena hati merupakan organ utama yang berfungsi menerima dan memproses senyawa-senyawa kimia yang diabsorpsi dari saluran pencernaan sebelum senyawa-senyawa tersebut didistribusikan ke organ-organ lainnya. AFB₁ yang sudah diserap akan terikat pada albumin yang merupakan transport utama AFB₁. (Eaton and Gallager, 1994)

Di dalam mitokondria, AFB₁ mengalami biotransformasi menjadi berbagai senyawa yang erat hubungannya dengan efek toksik dan karsinogenitasnya, sedangkan di dalam mikrosoma hati AFB₁ mengalami biotransformasi dengan menghasilkan metabolit-metabolit yang tidak ikut berperan serta dalam sifat karsinogenik AFB₁. (Eaton and Gallager, 1994)

AFB₁ mengalami biotransformasi melalui dua fase yaitu fase I dan fase II. Pada fase I, bahan-bahan tersebut akan mengalami oksidasi, reduksi dan reaksi hidrolisis yang meliputi hidroksilasi, epoksidasi dan konjugasi yang secara umum akan mengubah bahan xenobiotik yang hidrofobik menjadi derivat yang lebih larut dalam air, sehingga dengan mudah menuju fase ke II. Bahan-bahan yang bersifat karsinogen pada fase I ini akan menghasilkan derivat yang lebih berbahaya dari pada bahan asalnya. (Lawson, 1996)

Biotransformasi AFB₁ pada fase I akan menghasilkan metabolit yang terhidroksilasi dan mengalami oksidasi menjadi 8, 9 epoksid AFB₁ yang reaktif. Reaksi ini dikatalisis oleh sitokrom P-450, walaupun kadang terlihat juga hipoksigenase dan prostaglandin H-sintase. (Eaton and Groobman, 1994). Penelitian

secara *invitro* dengan menggunakan *cell lines epitelial* hati manusia, ternyata dari famili sitokrom P-450, hanya sitokrom P-450 1A2 dan sitokrom P-450 3A4 yang aktif pada metabolisme AFB₁ dengan menginduksi pembentukan epoksi AFB₁. Sitokrom P-450 2A6 dan sitokrom P-450 2B6 tidak memainkan peranan yang berarti (Mace et al., 1997). 8,9 epoksid AFB₁ yang reaktif ini akan berikatan secara kovalen dengan DNA pada N- dari basa guanin, sehingga terbentuk 8,9 dihidro 8- (N-guaninyl) - 9 - hydroxy aflatoxin B₁ (AFB₁ - N- guanin). Ikatan kovalen ini ada yang bisa lepas kembali dan ada yang stabil. Ikatan yang stabil menimbulkan kelainan pada sel (Eaton and Groobman, 1994).

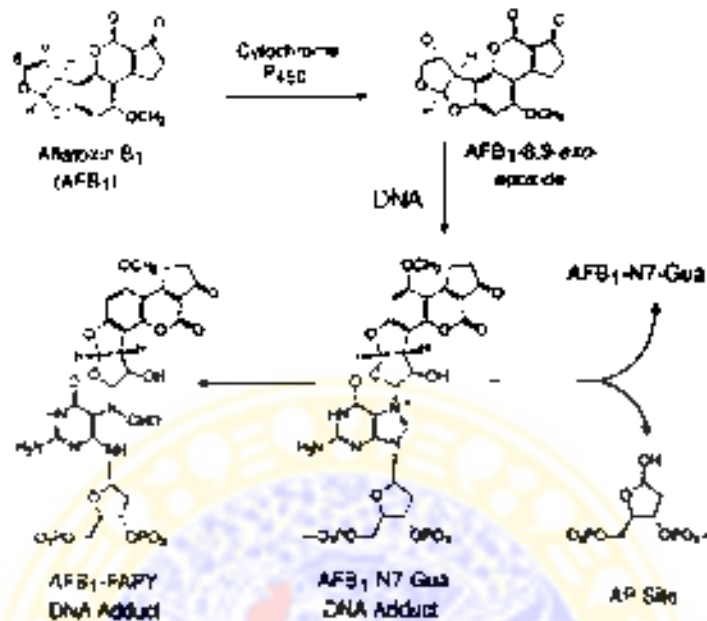
Adduct guanin ini dapat mengalami dua reaksi yaitu :

1. Mempromosikan depurinasi yang menghasilkan pembentukan *apurinic site (AP-site)*.
2. Cincin AFB₁ - N- Gua terbuka, sehingga terbentuk AFB₁ - FAPY

AFB₁ - N- Gua *adduct*, AFB₁ - FAPY dan *AP-site*, secara bersama-sama atau sendiri sendiri merupakan prekursor terhadap efek karsinogenesis dari AFB₁ (Bailey et al., 1996, Foster and Rosche, 2001, Smella et al., 2001).

Pada fase II akan terjadi proses detoksifikasi dari pada derivat-derivat yang telah dihasilkan. Fase II ini akan melibatkan sejumlah enzim-enzim seperti glukuronil transferase, glutathion-S-transferase (GST), group α amino dari sistein dan epoxide hidrolase mikrosoma (EPHX) (Eaton and Groobman, 1994, Mc Glynn et al., 1995, Clawson, 1996). Enzim glukuronil transferase akan menyebabkan metabolit yang sudah terhidroksitasi berkonyugasi dengan asam glukuronida sehingga akan terbentuk 8,9 dihidro-8-(γ -glutathion- γ hidroksi) AFB₁. Senyawa ini bersifat kurang toksik. Selanjutnya senyawa ini akan membentuk *AFB₁ mercapturic acid* yang

akan dikeluarkan dan tubuh bersama-sama dengan urin (Eaton and Groobman, 1994).



Gambar 2.4 Aktivasi AFB₁ oleh sitokrom P-450 yang menghasilkan derivat-derivatnya (Dikutip dari Bailey et al., *Nucleic Acids Research*, 1996)

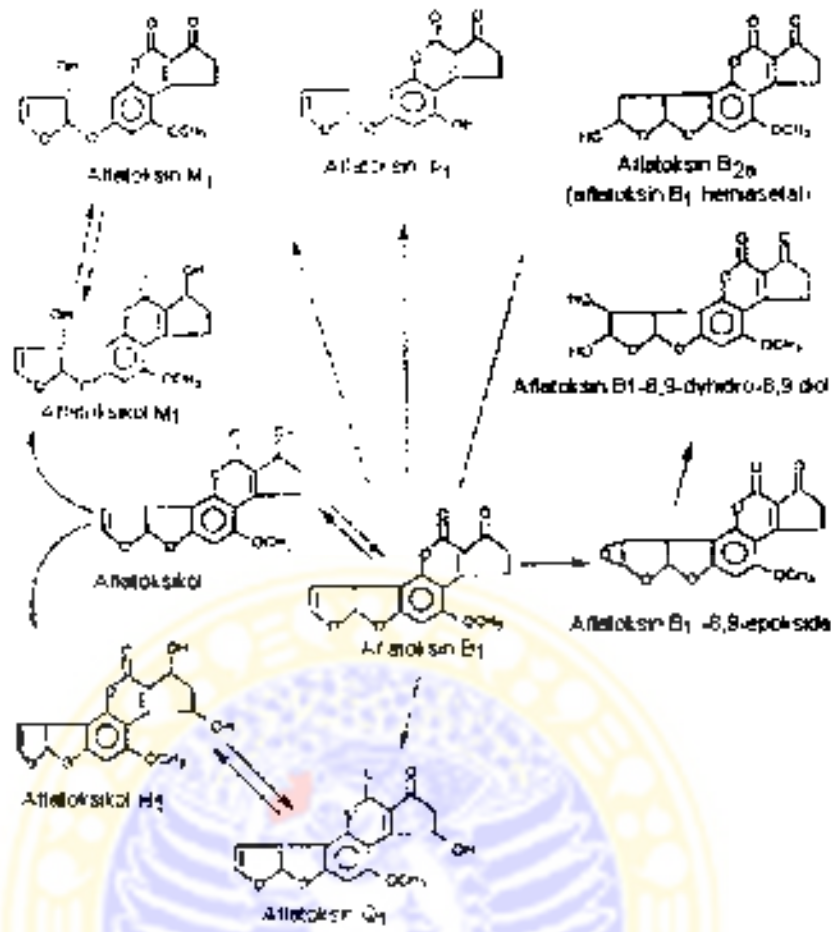
EPHX akan mendetoksikasi epoksi dengan cara mengkonversi menjadi 1,2 dihidriols AFB₁ (Mc Glynn et al., 1995). Dihidriol AFB₁ yang terbentuk dapat berikatan secara kovalen dengan protein yang dapat menyebabkan kematian sel dan menimbulkan keracunan (Eaton and Gallager, 1994).

Bila paparan AFB₁ terjadi terus menerus maka konsentrasi enzim-enzim ini akan menurun. Akibatnya epoksi AFB₁ yang terbentuk hanya sedikit mengalami detoksifikasi dan menyebabkan lebih banyak epoksi yang berikatan dengan DNA, sehingga akan menimbulkan kelainan pada sel (Eaton and Gallager, 1994, Mc Glynn et al., 1995).

Individu-individu yang mempunyai fraksi sitosol hati yang kurang mampu memproduksi enzim GST mempunyai faktor resiko yang tinggi untuk menderita keracunan AFB₁. Dalam penelitiannya Mc Glynn (1995) mendapatkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara genotipe mutasi pada EPHX dan GST dengan pengembangan AFB₁ *adduct*.

Biotransformasi AFB₁ di dalam mikrosom hati menghasilkan metabolit-metabolit yang lebih polar yaitu AFM₁, AFP dan AFQ. Metabolit-metabolit ini tidak ikut berperan serta dalam sifat karsinogenik AFB₁. Disamping itu, enzim sitosolik akan menghasilkan aflatoksikol, sedangkan enzim sitosolik dan enzim mikrosom akan menghasilkan aflatoksikol H₁ dan M₁ (WHO, 1993).

Distribusi dan ekskresi AFB₁ dapat diketahui dengan memberikan dosis tunggal AFB₁ radioaktif 0,8-1 mg/kg BB secara intraperitoneal. Setelah 24 jam pemberian, ternyata AFB₁ diekskresikan 60 % ke feses melalui traktus biliaris, 20 % diekskresikan melalui urin dan sebagian diekskresikan melalui paru (Julius, 1990). Ekskresi konjugasi glutation dari AFB₁ hampir semuanya melalui empedu, sedangkan melalui urin didapatkan konjugasi AFB₁ dan asam merkapturat. AFM₁ pada beberapa spesies merupakan hasil metabolit AFB₁ yang utama terdapat di dalam urin. *Adduct AFB₁-N⁷-glutathione* juga diekskresikan melalui urin. Dengan mengukur hasil metabolit AFB₁ di dalam urin dan *adduct AFB₁ albumin* pada serum darah manusia dapat dijadikan pemindaian paparan AFB₁ pada seseorang (Kew, 1994; Wang et al., 1994). Konsentrasi AFB₁ terbanyak dalam hati dan ginjal setelah 30 menit, dimana di dalam jaringan hati terdapat 5-15 kali lebih banyak dibandingkan dengan jaringan lain (Julius, 1990).



Gambar 2.5. Metabolit utama Aflatoxin B₁

(Dikutip dari WHO, *IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans*, 1993)

2.2.4. Pengaruh AFB₁ terhadap organ / sistem tubuh

Pengaruh AFB₁ pada organ sistem tubuh tergantung kepada lama pemberian, kadar, cara masuk, jenis kelamin dan spesies organisme yang mengkonsumsi. Pengaruh ini akan menimbulkan reaksi akut, sub akut dan kronis.

Keracunan aflatoxin (aflatoksikosis) dapat menimbulkan gejala-gejala ikterus, demam, astes, edema dan muntah. Hal ini dapat dilihat dari penelitian

Krishnamachari et al. (1975) di India yang mendapatkan gejala-gejala ini pada populasi yang mengkonsumsi jagung yang terkontaminasi 2-6 mg aflatoxin / hari selama 3 bulan, dimana terdapat 106 orang meninggal dari 397 penderita (WHO, 1993).

Di Kenia, wabah ikterus yang disertai kematian juga didapatkan pada populasi yang mengkonsumsi jagung yang mengandung AFB₁ sampai 12 mg / Kg. Hasil biopsi hati menunjukkan nekrosis sentrolobuler (WHO, 1993). Sebuah kasus yang dilaporkan dari Kenia juga melaporkan aflatoksikosis yang akut pada seorang anak laki-laki yang mengkonsumsi ubi kayu yang telah berjamur. Analisis yang dilakukan menunjukkan ubi kayu itu mengandung AFB₁ 1.7 mg / Kg. Pemeriksaan pada hati menunjukkan lesi sentrolobuler yang ditandai oleh nekrosis, degenerasi lemak, infiltrasi polimorfonuklear di dalam sel (WHO, 1993).

Paparan AFB₁ juga menimbulkan kwashiorkor pada anak-anak. Hendrickse dan Maxwell (1989) mendapatkan hasil biopsi hati anak-anak yang menderita kwashiorkor di Sudan mengandung 32 ng AFB₁ / g hati. Serum anak-anak ini juga mengandung aflatoxin 706 pg / ml, sementara anak-anak yang tidak menderita kwashiorkor tidak menderita kelainan pada serum darahnya. (WHO, 1993).

2.2.4.1. Pengaruh AFB₁ terhadap hati

Pengaruh AFB₁ pada organ tubuh terutama adalah hati, karena hati merupakan organ sasaran utama AFB₁, sehingga fungsi hati akan terganggu. Percobaan pada hewan menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ dengan dosis tinggi (1 mg / Kg ransum makanan) dapat menyebabkan kerusakan hati yang akut dan dapat menyebabkan kematian dalam waktu pendek. Apabila AFB₁ diberikan dalam kadar

rendah dalam waktu yang lama, ternyata juga dapat menimbulkan kelainan pada hati (Witt, 1993).

AFB₁ akan menghambat aktivitas enzim Ca⁺⁺ ATPase, sehingga terjadi peningkatan kalsium intra seluler (Adebayo et al., 1995). Hal ini akan mengaktifkan enzim-enzim fosfolipase dan protease yang akan menimbulkan kerusakan pada membran sel. ATPase dapat menurunkan ATP. Di samping itu AFB₁ dapat menghambat aktivitas beberapa macam enzim yang berperan dalam respirasi seluler. Akibatnya terjadi penurunan ATP yang akan menghambat aktivitas pompa Natrium, sehingga terjadi peningkatan pemasukan air ke dalam sel yang dapat berakhir dengan kematian sel (Cotran et al., 1999).

Akibat kerusakan struktur hepatosit, maka sejumlah fungsi metabolik hati terganggu. Sintesis lipoprotein hepatic akan terganggu, sehingga terjadi penimbunan lemak dalam hepatosit. Hal ini dapat dilihat dari penelitian Dwivedi et al., (1993), dimana dengan pemberian dosis tunggal secara oral (7 mg/kg BB), AFB₁ akan meningkatkan total lipid, kolesterol didalam hati. Akibat kerusakan struktur hati juga akan mengakibatkan enzim-enzim dalam hepatosit seperti serum *glutamic oxaloacetic transaminase* (SGOT), serum *glutamic pyruvic transaminase* (SGPT) meningkat. Ini juga dibuktikan oleh Dwivedi et al., (1993) yang mendapatkan peningkatan enzim-enzim transaminase didalam serum setelah terpapar dosis tunggal 7 mg/kg BB AFB₁ secara oral, sedangkan protein dan glikogen hepar serta total protein menurun.

AFB₁ merupakan hepatokarsinogen yang kuat. Sifat ini telah dibuktikan dengan berbagai-bagai hewan percobaan, dimana telah terbukti bahwa AFB₁ adalah hepatokarsinogen yang kuat (Shen et al., 1995). Dari penelitian pada hewan

percobaan terdapat beberapa langkah untuk menimbulkan HCC: yaitu inisiasi, promosi dan perkembangan tumor. Pada inisiasi telah terjadi perubahan genetik yang irreversible. Sel yang terinisiasi dapat merespons promotor tumor dengan menghasilkan ekspansi klonal dari sel yang terinisiasi. Efek dari promotor tumor tergantung pada dosis dan reversibe yang umum. Pada stadium perkembangan, sel berkembang menjadi ganas secara nyata. Ini membutuhkan perubahan genetik tambahan (Holema, 1998).

Sel kanker pada HCC bervariasi mulai dari sel yang berdiferensiasi dengan baik sampai tidak berdiferensiasi dengan baik (anaplasia). Sel kanker hati terlihat sangat mirip dengan sel-sel parenkhim hati pada HCC yang biasanya terdiferensiasi dengan baik. Ukurannya lebih besar dari pada sel-sel hati normal ataupun sel-sel hati yang mengalami hiperplasia. Sel-sel tumor berbentuk poligonal dengan sitoplasma granuler mengelilingi sinus-sinus pada bentuk sinusoid. Sebelum hepatosit berkembang menjadi sel tumor, terdapat suatu keadaan yang disebut displasia, yang ditandai oleh pembesaran sel, inti pleomorfisme dan sel multi nuklear yang mengenai kelompok atau keseluruhan nodulus. (Sirica, 1996; Cotran et al., 1999).

Studi epidemiologi yang dilakukan diberbagai negara juga menunjukkan bahwa terdapat hubungan positif antara jumlah AFB₁ yang terdapat di dalam bahan makanan dengan insiden lokal HCC (Kew, 1994). Survey yang dilakukan secara random di Fusui, propinsi Guangxi Cina tahun 1987-1988 menunjukkan bahwa asupan AFB₁ berkorelasi positif dengan kematian akibat karsinoma hepatoseluler ($r = 0,5531, p < 0,001$) (Shun, 1995). Penelitian lain yang dilakukan di daerah Fusui di selatan Guangxi China, didapatkan insiden HCC pada laki-laki 120-100 000 populasi pertahun, suatu angka 35 kali lebih tinggi dari USA. HCC tercatat sebagai 50 %

penyebab kematian akibat kanker. Penelitian secara *cohort* yang dilakukan di daerah ini mendapatkan hubungan yang positif secara linier antara paparan AFB₁ yang terdapat di dalam bahan makanan dan kematian akibat HCC. Tingkat paparan AFB₁ diperkirakan 2-575 ng / Kg / hari suatu angka yang bertolak belakang dengan paparan AFB₁ di USA yaitu 3 ng / Kg / hari (Stem et al., 2001)

Hasil penelitian *International Agency for Research on Cancer* (WHO, 1993) menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ per oral pada tikus putih dengan variasi kadar dan waktu percobaan memberikan reaksi efek toksik yang berbeda pula. Tikus putih yang diberi AFB₁ 300 µg/minggu selama 39 minggu, 100 % menderita karsinoma hepatoseluler, sedang tikus putih yang diberi AFB₁ 35 µg/minggu selama 66 minggu akan menderita karsinoma hepatoseluler sebesar 20 %. Wogan dan Newborn (1967) mendapatkan bahwa pemberian AFB₁ 40 µg selama 30 hari pada tikus putih percobaan akan menimbulkan 20 % dan tikus putih ini menderita karsinoma hepatoseluler. (WHO, 1993)

Beberapa penelitian epidemiologi dan hewan percobaan mendapatkan interaksi antara HBV (Hepatitis B Virus) dan AFB₁ di dalam menimbulkan HCC. Penelitian yang telah dilakukan pada penderita yang positif antigen AFB₁ - N₇ Gua akan mempunyai kemungkinan HCC 3 kali lebih banyak. Kemungkinan terjadi HCC pada penderita yang positif HBsAg 7 kali lebih banyak dan bila terdapat AFB₁ - N₇ Gua yang positif bersamaan dengan HBsAg positif, akan mempunyai kemungkinan terjadi HCC 60 kali lebih banyak (Stem et al., 2001)

Penelitian pada hewan percobaan *tree shrews* (*stupa belangeri chinensis*), didapatkan bahwa group yang mendapat infeksi HBV dan paparan AFB₁ 150 mg / kg BB / hari selama 105 minggu, 57 % akan menderita HCC. Group yang mendapat

AFB₁ saja, 30 % akan menderita HCC dan tidak ada HCC yang ditemukan pada group yang hanya mendapat infeksi HBV (Li et al., 1999)

Kemungkinan peningkatan HCC ini disebabkan oleh peningkatan proliferasi seluler yang diinduksi oleh HBV dapat meningkatkan kemungkinan ekspansi klonal AFB₁ yang menginduksi mutasi p53 249 ser. Protein HBV x yang menyandi HBV mengganggu jalur yang memperbaiki nukleotida yang digunakan sel untuk memperbaiki AFB₁ DNA adduct, sehingga keberadaan HBV x dapat meningkatkan frekuensi induksi mutasi AFB₁ (Stem et al., 2001)

Beberapa penelitian menunjukkan, bahwa gen yang dihasilkan HBV berikatan dan menyebabkan protein p53 tidak aktif. Pengikatan HBV x ke regio terminal C p53 menghambat fungsi p53 sebagai aktivator transkripsi. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekspresi HBV x dapat menghambat fungsi induksi apoptosis p53 (Smella et al., 2001).

Pada daerah yang tinggi pencemaran AFB₁, sampel yang diambil dari penderita HBV positif, 47 % akan mengalami mutasi gen p53 pada kodon 249 dan sampel yang diambil di daerah ini yang mempunyai HBV negatif, 42 % juga mempunyai mutasi yang sama. Sampel yang diambil dari daerah paparan AFB₁ sedang dengan HBsAg positif, 35 % mengalami mutasi gen p53 sedang sampel yang diambil dari HBsAg negatif pada daerah ini tidak memperlihatkan mutasi gen p53. (Smella et al., 2001)

2.2.4.2. Pengaruh AFB₁ terhadap respons imun

AFB₁ telah dilaporkan mempengaruhi sistem imun baik humoral maupun sistem sel imun. Pengaruh langsung AFB₁ terhadap limfosit telah dilaporkan pada

menet, dimana AFB₁ mempunyai efek inhibisi terhadap sel T dan sel NK. AFB₁ juga dilaporkan mengurangi kemampuan fagositosis pada makrofag intra peritoneal (WHO, 1993). Penelitian Moon et al. (1999), mendapatkan induksi AFB₁ mempunyai efek supresi terhadap fungsi makrofag secara invitro. Disamping itu Moon et al. (1999) juga mendapatkan bahwa induksi AFB₁ akan menghambat TNF α , IL-1 dan IL-6 oleh makrofag. Han et al. (1999) juga mendapatkan bahwa induksi AFB₁ akan menyebabkan supresi ekspresi gen IL-2.

2.2.4.3. Pengaruh AFB₁ terhadap sistem reproduksi

AFB₁ dapat melewati sawar plasenta manusia. Penelitian yang dilakukan di Songkhla Thailand oleh Denning et al. (1990) mendapatkan konsentrasi AFB₁ lebih tinggi pada serum tali pusat bayi dan serum ibu yang segera diambil setelah lahir, dimana 17 dari 35 sampel yang diambil mengandung AFB₁ dengan konsentrasi 0,064 sampai 13,6 nmol/ml. Semua wanita itu mengakui bahwa mereka sering memakan kacang-kacangan, jagung dan makanan yang berjamur. (WHO, 1993).

Di Gambia, Wild et al. (1991) mendapatkan hubungan yang sangat signifikan ($r = 0,52$, $p < 0,001$) dan *afatoxin albumin adduct* antara serum tali pusat dengan serum darah ibu. Ibu-ibu yang menyusui di Afrika (Sudan, Ghana, Kenya dan Nigeria) yang mendapatkan paparan aflatoxin di dalam dietnya akan mensekresikan terutama aflatoxin M₁ pada air susu, sedikit AFM₂ dan sangat sedikit sekali AFB₁, AFB₂, AFG₁ dan AFG₂. Di Ghana, AFM₁ terdeteksi pada ASI lebih sering pada musim hujan (41 %) dan pada musim kering (28 %) (WHO, 1993).

2.2.4.4. Pengaruh AFB₁ terhadap organ-organ tubuh lain

AFB₁ dapat mengenai organ tubuh lainnya di samping hati. Ginjal merupakan tempat kedua yang diserang AFB₁. Lee et al (1969) dalam penelitiannya pada pemberian 184 ppb AFB₁ pada tikus putih selama 18 bulan, mendapatkan 34 % menderita adenoma tubuli ginjal. Kelenjar adrenal juga bisa terkena, dimana pada 24 jam pertama adrenal mengalami kongesti dan setelah 48 jam mengalami nekrosis. Saluran cerna, limfa dan jantung juga dapat terkena. Perubahan yang terjadi dapat berupa petekie, perdarahan submukosa dan degenerasi lemak pada otot jantung (Julius, 1990).

2.2.4.5. Pengaruh AFB₁ terhadap gen dan efek yang berhubungan dengan gen tersebut

2.2.4.5.1. Ekskresi *adduct guanin* melalui urin

Paparan AFB₁ pada individu akan menyebabkan ekskresi *adduct guanin* melalui urin individu tersebut. Pemeriksaan urin yang dilakukan pada 30 sampel laki-laki dan 12 sampel wanita di daerah Guangxi China yang mendapat paparan AFB₁ 48,4 µg/hari selama 7 hari didapatkan hubungan yang sangat signifikan ($r=0.05$; $p < 0,000001$) antara ekskresi AFB₁-N-Gua dengan *intake* AFB₁ pada hari sebelumnya (Groopman et al., 1992).

2.2.4.5.2. Ikatan kovalen ke DNA

AFB₁ membutuhkan konversi metabolit menjadi 8, 9 epoksid yang bertujuan merusak DNA. Epoksid ini bereaksi dengan DNA untuk membentuk populasi

adduct, yaitu AFB₁-N-Gua. baik yang didapatkan secara invitro maupun secara in vivo (Bailey et al., 1996).

Terdeteksinya AFB₁-N-Gua pada urin individu yang terpapar AFB₁ oleh para peneliti, ternyata juga mendapatkan *adduct AFB₁-Gua* pada jaringan hati manusia yang dilakukan dengan pemeriksaan *immuno assay* dari DNA. Hal ini telah dilaporkan oleh peneliti Gartner et al. (1988) di Cekoslovakia dan Lee et al. (1989) di California (WHO, 1993).

2.2.4.5.3. Mutasi gen p53 pada karsinoma hepatoseluler

Kontaminasi AFB₁ pada makanan berhubungan dengan peningkatan insiden HCC, terutama pada penduduk dengan angka kejadian hepatitis B yang tinggi (Bailey et al., 1996). Penelitian-penelitian pada akhir ini melaporkan bahwa mutasi gen p53 hanya ditemukan pada penderita HCC. Dari hasil penelitian pada penderita HCC di China ditemukan mutasi gen p53 pada 50 % penderita. Di Afrika Selatan mutasi gen p53 ditemukan pada 30 % penderita HCC yang diperiksa. Semua mutasi terjadi pada kodon 249 (Tabor and Kobayashi, 1994).

Pada daerah-daerah dengan paparan AFB₁ yang tinggi seperti China, Afrika Selatan dan Mozambik, 44 % penderita HCC mengalami mutasi gen p53. Pada daerah dengan paparan AFB₁ yang sedang seperti Hongkong, Singapura, Taiwan, Vietnam dan Mesir, ditemukan mutasi gen p53 sebanyak 7 %. Pada daerah-daerah dengan paparan AFB₁ rendah seperti Eropa, Australia dan USA, hanya ditemukan mutasi gen p53 sebanyak 1 % pada penderita HCC (Smella et al., 2001).

Mutasi gen p53 pada HCC yang berasal dari kontaminasi AFB₁ terjadi pada kodon 249 (Tabor and Kobayashi, 1994; Mc Glynn et al., 1995; Sirica, 1996; Lee et

al., 1998). Stern et al., (2001) mendapatkan korelasi yang positif antara mutasi gen p53 pada kodon 249 dengan paparan AFB₁ ($r = 0.0001$), dimana mutasi spesifik berupa transversi G (Guanin) menjadi T (Timin) pada basa ke tiga dari kodon 249 pada ekson 6 – 8 yang mengubah AGG → AGT, sehingga pada p53 protein arginin → serin (Mc Glynn et al., 1995, Deng and Ma, 1998, Ming et al., 1999, Reeves and De Matteo, 2000; Hussain et al., 2001, Smella et al., 2001, Stern et al., 2001). Begitu seringnya mutasi gen p53 pada HCC yang terjadi pada manusia akibat paparan AFB₁ menjadikan mutasi yang spesifik dari G → T pada kodon 249 dianggap sebagai *biomarker* untuk paparan AFB₁ pada manusia (Foster and Rosche, 2001).

AFB₁ tidak hanya menyebabkan mutasi titik, tetapi AFB₁ juga bersifat *clastogenic* yang kuat, *mutoinhibition* dan *genotoxic indirect* pada sel normal (WHO, 1993, Van Gijssel et al., 1997). Sifat *clastogenic* AFB₁ akan menyebabkan kromosom yang abnormal pada beberapa spesies secara invitro. Ini mungkin disebabkan karena AFB₁ menghilangkan alel. Penelitian Scarsone et al., (1992) memperlihatkan dari 21 penderita yang mempunyai mutasi kodon 249 pada p53, 12 diantaranya menunjukkan kehilangan alel. Diduga langkah awal dalam melakukan inaktivasi p53 oleh AFB₁ pada HCC adalah mutasi titik pada alel yang diikuti oleh kehilangan alel p53 wt (WHO, 1993).

Sifat *mito inhibitory* AFB₁, mungkin disebabkan karena ekspresi protein p53 yang menyebabkan induksi gen p21, sehingga akan terjadi blokade dari siklus sel dari G₁ → S (Van Gijssel et al., 1997). Sifat *genotoxic indirect* AFB₁, disebabkan AFB₁ memerlukan aktivasi metabolik oleh enzim seluler untuk membentuk metabolik DNA yang reaktif (Yang and Hughes, 1998).

Penelitian pada hewan percobaan menunjukkan pemberian AFB₁ pada sel hati yang normal akan memicu peningkatan kadar protein p53 yang diikuti oleh pengaktifan ekspresi gen-gen yang mengandung *status p53 binding specific* dan berinteraksi dengan sejumlah faktor-faktor transkripsi untuk menghambat ekspresi gen-gen lain yang terutama mempengaruhi pengaturan siklus sel (Yang and Hughes, 1998). Penelitian yang dilakukan oleh van Gijssel et al. (1997), dengan paparan AFB₁ dengan dosis rendah (0.32 µmol/kg B₁) pada tikus putih percobaan, telah menunjukkan peningkatan kadar protein p53 pada sel hati yang diperiksa dengan teknik immuno-presipitasi yang diikuti dengan Western Blotting. Yang and Hughes (1998) dengan metode yang sama mendapatkan peningkatan kadar protein p53 pada kultur sel fibroblast mencit (NCTC 929) yang dipapari AFB₁.

Pada hewan percobaan, peneliti-peneliti juga mendapatkan hubungan HCC yang ditimbulkan oleh AFB₁ dengan gen p53. Ghebranos and Sell (1998) melakukan penelitian pada tikus putih transgenik yang mempunyai gen protein p53 mutan dikawinkan dengan tikus putih yang kekurangan gen p53 dan tikus-tikus putih yang mempunyai HBsAg positif. Pada anak-anak tikus putih ini diberikan paparan AFB₁ yang setelah 13 bulan menunjukkan tumor hepatic. Pada tikus putih jantan yang diinduksi AFB₁ akan meningkatkan mutasi p53 yang menimbulkan tumor 0 sampai 14 % pada tikus putih yang mempunyai HBsAg negatif dan p53^{+/+} (*wild type homozygotes*), 14 sampai 71 % pada tikus putih yang mempunyai HBsAg negatif dan p53^{+/+} (*wild type heterozygotes*) dan 62 % - 100 % pada tikus putih HBsAg positif dan p53^{+/+}. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa ekspresi HBsAg dan AFB₁ bersama-sama adalah karsinogenik yang kuat. Terdapatnya p53 mutasi tidak hanya secara signifikan meningkatkan efek ko-karsinogenik, tetapi juga meningkatkan

tumorigenesis AFB₁ pada tikus putih yang mempunyai p53 *heterozygote* dan *homozygote*

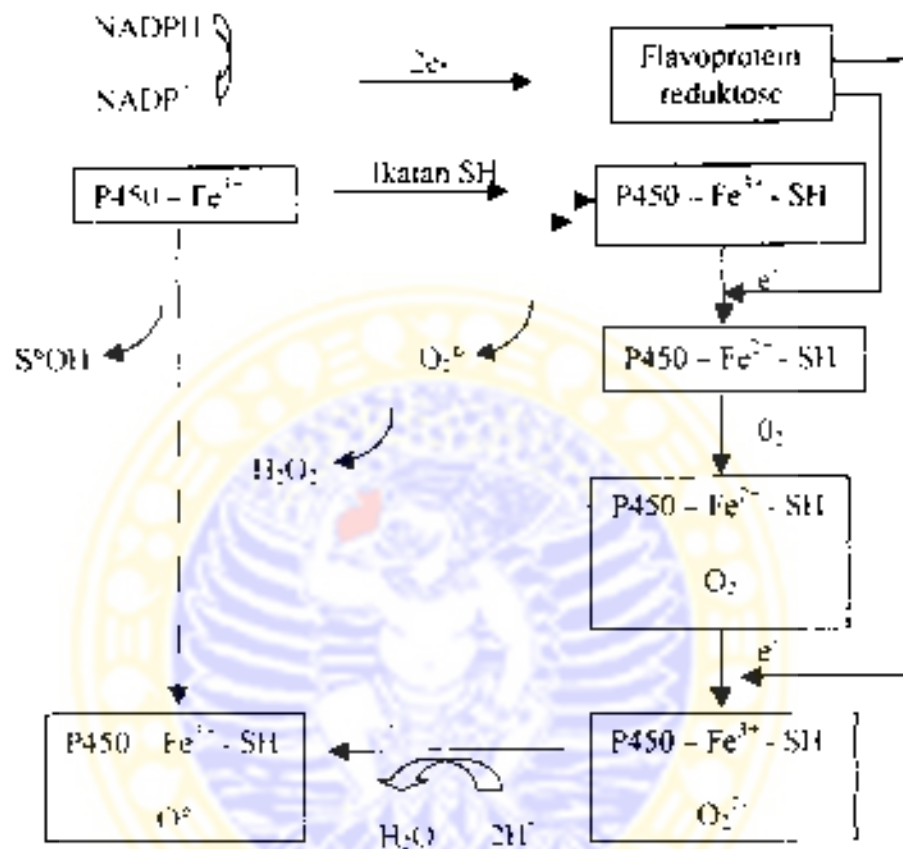
Penelitian Lee et al. (1998) pada tikus putih yang telah lebih dahulu dilakukan hepatektomi parsial sebelum diberikan AFB₁ 37.5 µg/hari selama 8 minggu mendapatkan 38 % (5 dari 13) dari tikus-tikus putih ini menderita HCC dengan mutasi p53. 1 dari tikus putih ini mengalami mutasi gen p53 pada kodon 247 (CGG → CGT) dan kodon 280 (CGE → CCT). Tikus putih yang lain mengalami mutasi titik yang berbeda pada gen p53.

Peneliti lain Park et al. (2000) dalam penelitiannya pada *Tree Shrew (Tupaia belangeri chinensis)* yang diinduksi AFB₁ untuk mengembangkan HCC, mendapatkan bahwa 1 HCC dan jaringan hati yang berasal dari tupai yang diberi AFB₁ dan diinjeksi HBV tidak didapatkan perubahan urutan nukleotida p53. 3 HCC dan tupai yang diinduksi AFB₁ dan HBV memperlihatkan mutasi titik pada gen p53. 1 HCC mengalami mutasi pada kodon 275 yang kemungkinan merupakan *domain binding DNA* dari gen p53. Beberapa penelitian lain pada hewan percobaan juga mendapatkan mutasi gen p53 pada HCC yang diinduksi dengan HBV dan aflatoxin (Schwartz and Cantlers, 2001).

2.2.4.6. Pengaruh AFB₁ terhadap pembastukan *Reactive Oxygen Species (ROS)*

ROS yang terjadi akibat paparan AFB₁ disebabkan karena dalam biotransformasi AFB₁ melibatkan sejumlah enzim dan sitokrom P-450 (Mace et al., 1997). Sitokrom P-450 merupakan suatu hemoprotein yang mempunyai tapak pengikat baik untuk molekul oksigen maupun substrat besi heme dan semua sitokrom dikat pada atom nitrogen (N). Dalam siklus katalisis sitokrom P-450, besi heme

mengalami proses reduksi oksidasi yang bersamaan dengan pengikatan substrat dan pengaktifan oksigen. Dalam keadaan fisiologis peristiwa ini terjadi di mitokondria melalui suatu rantai yang disebut rantai substrat hidroksilasi oleh P-450 (Halliwell and Gutteridge, 1999)



Gambar 2.6 Mekanisme Hidroksilasi substrat oleh sitokrom P-450 di dalam hati

(Dikutip dari Halliwell and Gutteridge, *Free radical in biology and medicine*, 1999)

Dalam hati elektron yang dibutuhkan oleh sistem P-450 didonatur oleh NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) melalui enzim flavoprotein reduktase. Rantai ini melibatkan 6 tahap reaksi seperti yang terlihat pada gambar 2.7. Tahapan-tahapan tersebut meliputi:

1. Pengikatan substrat (SH)
2. Pemindahan elektron yang pertama
3. Pengikatan molekul oksigen
4. Pemindahan elektron yang kedua
5. Penguraian ikatan oksigen

Monooksigenasi substrat (Halliwell and Gutteridge, 1999)

Reaksi rantai P-450 akan menghasilkan $O_2^{\cdot -}$ dan H_2O_2 pada rantai 4 dan 5.

$O_2^{\cdot -}$ yang terbentuk akan sangat berbahaya karena akan membentuk radikal hidroksil (OH^{\cdot}), bila terdapat bersamaan dengan H_2O_2 . (Reaksi Haber-Weiss) Disamping itu H_2O_2 yang terbentuk juga dapat membentuk OH^{\cdot} bila bereaksi dengan logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu dalam reaksi Fenton (Gutteridge, 1994). Induksi yang terus menerus dari AFB₁ akan meningkatkan sitokrom P-450. Hal ini dapat dilihat pada pemberian AFB₁ secara terus menerus pada tikus putih percobaan selama 16 minggu, dimana terlihat kenaikan enzim sitokrom P-450 yang berbeda bermakna dengan tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁ (Ilesarijana, 1997). Peningkatan enzim sitokrom P-450 ini dengan sendirinya akan meningkatkan pembentukan $O_2^{\cdot -}$ dan H_2O_2 sehingga meningkatkan pembentukan OH^{\cdot} .

Sebagai penghasil ROS, AFB₁ akan menimbulkan kerusakan pada tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu

1. Asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh jamak (PUFA). ROS yang dihasilkan AFB₁ akan merusak asam lemak ini yang merupakan komponen terpenting membran sel, sehingga akan menyebabkan terputusnya asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik seperti MDA. Hal ini telah dibuktikan oleh

- Shen et al. (1994) yang mendapatkan peningkatan MDA dalam hepar tikus putih percobaan, setelah diinduksi AFB₁ 100 µg/100 mg BB secara I.P. Kenaikan MDA menggambarkan kenaikan peroksidasi lipid.
2. Protein, terutama yang mengandung peranan penting seperti enzim-enzim transaminase, alkali fosfatase, glutathion S transferase. Hal ini juga telah dibuktikan oleh Wang et al. (1994) yang mendapatkan peningkatan enzim-enzim transaminase, alkali fosfatase, glutathion S transferase setelah pemaparan AFB₁ 2 mg/kg BB secara I.P.
 3. DNA yang dapat berupa pemutusan rantai dan modifikasi basa. Kerusakan basa ini dapat diukur dengan pembentukan 8-OHdG yang merupakan reaksi antara ROS dengan DNA. Hal ini telah dibuktikan oleh Shen et al (1995) yang menemukan peningkatan konsentrasi 8-OHdG pada tikus putih yang diinduksi dengan AFB₁ 100 µg/100 gr BB secara I.P.

2.3. Radikal bebas dan Senyawa Oksigen Reaktif (*Reactive Oxygen Species*)

Radikal bebas dan *Reactive Oxygen Species (ROS)* menarik perhatian para peneliti dibidang kedokteran pada akhir-akhir ini karena dianggap menjadi penyebab atau mendasari berbagai keadaan patologis, seperti penyakit kardiovaskuler, penyakit respiratorik, gangguan sistem imun, karsinogenesis, bahkan dicurigai ikut berperan dalam proses penuaan (Suryohudoyo, 2000). Penelitian mengenai radikal bebas pertama-tama dilakukan di USA, Eropa dan Australia. Kemudian penelitian ini juga berkembang dengan pesat di Asia terutama di Jepang yang meneliti mengenai radikal bebas dan stres oksidatif, di Malaysia menitikberatkan pada anti oksidan yang berasal dari sumber alamnya. Demikian juga dengan di Indonesia, dimana peneliti

telah mengarahkan penelitiannya terhadap radikal bebas serta konsekuensinya terhadap berbagai-bagai penyakit serta pemanfaatan sumber daya alamnya sebagai anti oksidan (Freisleben, 1999)

2.3.1. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki elektron yang tidak berpasangan pada lingkarannya (Halliwell, 1994, Halliwell and Gutteridge, 1999, Surhohudoyo, 2000, Setiati, 2003). Bila dua radikal bertemu, mereka dapat menggabungkan elektron yang tidak berpasangan untuk membentuk ikatan kovalen

Beberapa contoh radikal bebas dapat dilihat pada tabel 2.2

Tabel 2.2 Beberapa contoh radikal bebas

No	Nama	Formula	Keterangan
1	Atom hidrogen	H	Radikal bebas yang sederhana
2	Triklorometil	CCl ₃	<i>Carbon centered radical</i> biasanya bereaksi cepat dengan O ₂ membentuk radikal peroksil
3	Superoksida	O ₂ ⁻	Oxygen - centered radical
4	Hidroksil	OH	Merupakan <i>reactive oxygen centered radical</i> yang menyerang seluruh biomolekul
5	Thiyl / Perthiyl	RS [•] /RSS	Kumpulan radikal yang mempunyai elektron tidak berpasangan, residu pada sulfur
6	Peroksil, Alkoksil	RO ₂ [•] , RO [•]	<i>Oxygen - centered radicals</i> yang terbentuk selama pembelahan peroksida dan reaksi radikal karbon dengan O ₂
7	Nitrogen Oksida	NO [•] , NO ₂ [•]	NO [•] terbentuk secara <i>in vivo</i> dari asam amino L-arginin. NO ₂ [•] terbentuk bila NO [•] bereaksi dengan O ₂
8	Nitrogen Centered radicals	C ₂ H ₅ N [•] , N [•]	Terbentuk selama oksidasi feni hidrazin oleh entrosit
9	Ion logam transisi	Fe, Cu	Sering berupa katalisator yang kuat untuk reaksi radikal bebas

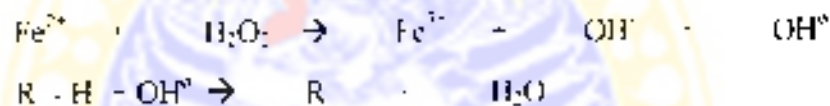
(Dikutip dari Halliwell and Gutteridge *Free radical in Biology and Medicine*, 1999:37)

Radikal bebas memiliki dua sifat yaitu reaktivitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal. Sifat radikal bebas mirip dengan oksidan yaitu suatu senyawa penerima elektron, tetapi radikal bebas jauh lebih berbahaya dibanding dengan oksidan. Hal ini disebabkan reaktivitasnya yang tinggi, juga kecenderungannya membentuk radikal baru, yang apabila menjumpai molekul baru akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadilah reaksi rantai. (Halliwell and Gutteridge, 1999, Suryohudoyo, 2000)

Seluruh reaksi radikal bebas dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu

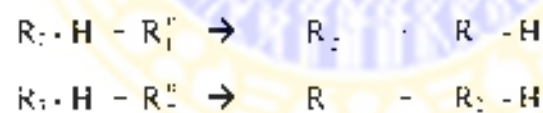
1. Tahap inisiasi

Pada tahap ini akan terjadi pembentukan radikal bebas awal



2. Tahap propagasi

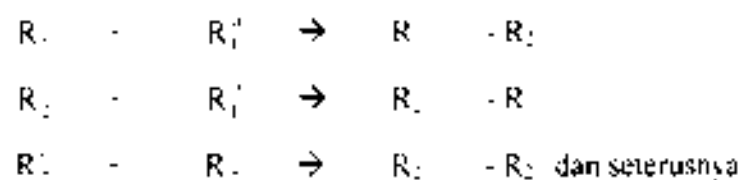
Setelah pembentukan radikal bebas awal, maka radikal bebas cenderung bertambah banyak dengan membuat reaksi rantai dengan molekul lain.



dan seterusnya

3. Tahap terminasi

Pada tahap ini akan terjadi reaksi antara radikal bebas dengan radikal bebas lain atau antara radikal bebas dengan suatu senyawa pemhasmi radikal (scavenger).



Radikal bebas yang terbentuk akan merusak molekul yang elektronnya ditangk oleh radikal bebas tersebut, sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel bahkan kematian sel. Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas tak stabil dan berumur pendek, sehingga sulit dideteksi, kecuali dengan metode-metode khusus seperti pengukuran EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) (Halliwell and Gutteridge, 1999; Freisleben, 1999; Suryohudoyo, 2000; Setiati, 2003).

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (*endogenous free radical*) ataupun dari luar tubuh (*exogenous free radical*). Secara berkesinambungan tubuh akan menghasilkan radikal bebas melalui

1. Reaksi redoks biokimiawi yang melibatkan oksigen, yang merupakan bagian metabolisme sel. Kaskade asam arakhidonat menjadi prostaglandin dan prostasiklin melalui lipoksigenase dan siklooksigenase akan menghasilkan $O_2^{\cdot -}$ ataupun H_2O_2 . Pembentukan enzim oksidase seperti monoamino oksidase atau aldehyd oksidase akan menghasilkan $O_2^{\cdot -}$ atau H_2O_2 . Superoksida terbentuk karena penambahan 1 elektron pada O_2 , yang terjadi secara tidak sengaja. Demikian juga sitokrom P-450, yang terlibat di dalam biotransformasi dan detoksifikasi metabolit intermediet dan *xenobiotics* akan menghasilkan peroksida dan senyawa oksigen reaktif lainnya. Lebih lanjut didapatkan bahwa metabolisme sel yang melibatkan enzim yang menghasilkan radikal bebas adalah karena perubahan xantin dehidrogenase menjadi xantin oksidase ataupun iskemia yang terutama muncul pada jaringan endotelial.
2. Proses fagosit, yang merupakan bagian dari reaksi inflamasi. Di dalam proses ini akan dihasilkan sejumlah besar superoksida sebagai bagian dari mekanisme

tubuh dengan cara oksidasi dan oksigenase yang bertujuan untuk membunuh mikro organisme asing.

3. Walaupun produksi H_2O_2 tidak terlalu mengganggu, tetapi dengan kehadiran ion logam transisi seperti Fe dan Cu akan dapat menghasilkan dengan segera OH^\bullet melalui reaksi Haber Weis ataupun reaksi Fenton. Contoh mono amino oksidase yang terdapat di dalam bentuk isoenzimik di dalam otak akan menghasilkan H_2O_2 . Dengan kehadiran Fe^{2+} dan Cu^+ , maka H_2O_2 yang terbentuk akan bereaksi membentuk OH^\bullet yang akan menghancurkan struktur seluler.
4. Gangguan pada sistem pertahanan antioksidan tubuh. Gangguan ini dapat berupa induksi atau represi protein yang terlibat didalam sistem ini, sehingga mengurangi cadangan anti oksidan sel seperti glutathion dan vitamin E. (Halliwell, 1994, Wijaya, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Freisleben, 1999, Asikin, 2001);

Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh dapat berasal dari respons terhadap radiasi, sinar ultraviolet, polusi lingkungan, asap rokok, olahraga yang berlebihan dan iskemia, serta penggunaan bahan-bahan kimia dan industri. (Halliwell, 1991, Wijaya, 1995)

2.3.2. Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) atau senyawa oksigen reaktif seperti namanya, berasal dari oksigen (O_2) senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerobik, termasuk manusia.

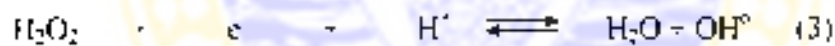
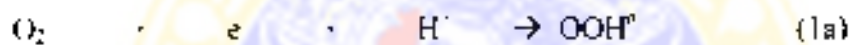
2.3.2.1. Oksigen

Elemen oksigen dengan simbol kimia O terdapat di dalam udara sebagai dua atom molekul yang biasanya disebut oksigen (Hallweil and Gutteridge, 1999). O₂ pertama kali diisolasi dan dikenal antara tahun 1772-1774 oleh Priestley, Lavoisier dan Scheele (Supari, 2004). Dioksigen yang akhirnya dikenal sebagai oksigen terdapat dalam jumlah yang cukup banyak di permukaan bumi. Persentase O₂ pada udara kering lebih kurang 21% (Gutteridge, 1995). Lebih dari 99 % makhluk hidup, kecuali organisme seluler anaerobik membutuhkan O₂ untuk menghasilkan energi mereka dengan menggunakan rantai transport O₂ dependent elektron (Frieleben, 1999).

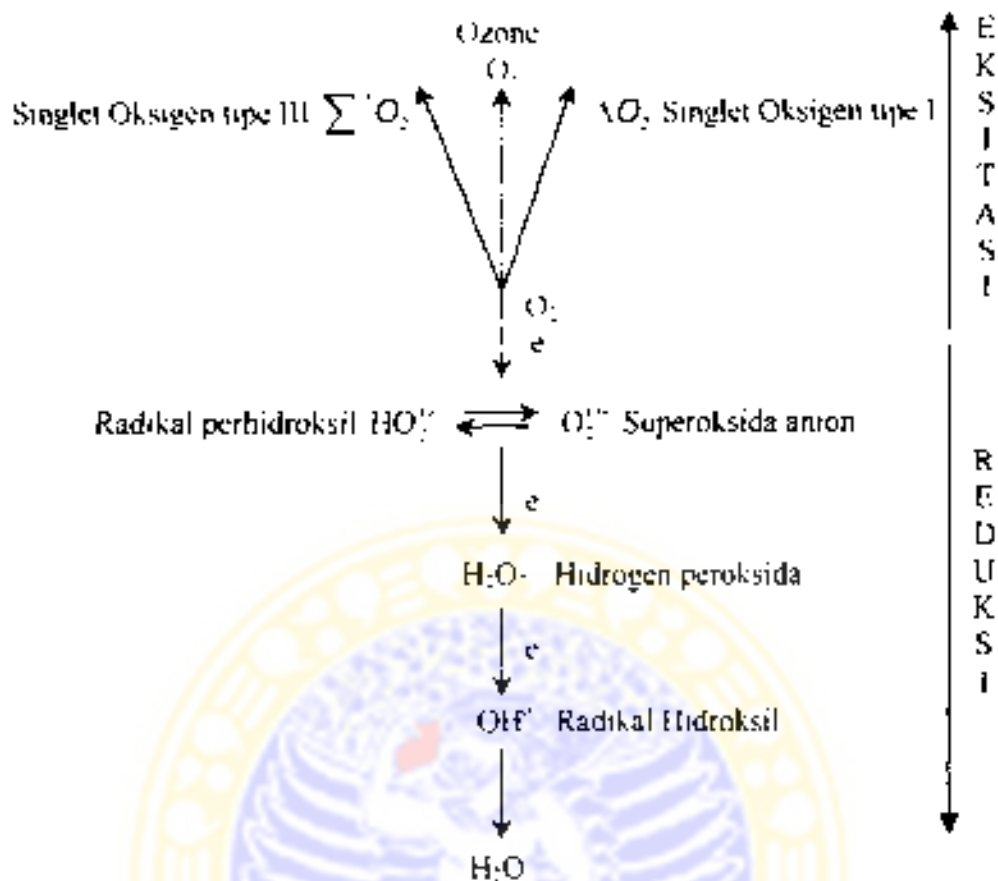
Lebih dari 85-90 % O₂ yang diambil oleh hewan diutilisasi oleh mitokondria dengan menggunakan oksigen pada proses transformasi energi metabolik untuk menghasilkan energi. Produk energi dihasilkan oleh metabolisme yang berasal dari material makanan yang teroksidasi. Mereka melepas elektron yang diterima oleh pengangkut elektron seperti *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺) dan flavin (*flavin mononucleotide* (FMN) dan *flavin adenine dinucleotide* (FAD). Hasil dari reduksi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) dan reduksi flavin (FMN H₂ dan FADH₂) dioksidasi kembali oleh O₂ di mitokondria, menghasilkan ATP dalam jumlah besar.

Oksidasi dilakukan dalam beberapa langkah sehingga energi dilepaskan secara berangsur-angsur. Ini di atur oleh sistem rantai transport elektron yang terdapat di membran interna mitokondria. Bagian dari sistem rantai transport elektron yang sebenarnya menggunakan O₂ adalah enzim sitokrom oksidase (Hallweil and Gutteridge, 1999; Frieleben, 2001).

Hasil dari proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik tersebut, ternyata mempunyai efek samping yang berupa terbentuknya senyawa-senyawa radikal bebas pada peristiwa oksidasi tersebut (Soewoto, 2001). Bila molekul dioksidasi dengan oksigen, oksigen itu sendiri akan mengalami reduksi dengan membentuk berbagai-bagai bentuk intermediet (Gutteridge, 1995; Freisleben, 1999). Reduksi oksigen memerlukan pengalihan empat elektron, dimana pengalihan ini tidak dapat terjadi sekaligus, tetapi dalam empat tahapan yang setiap tahap melibatkan pengalihan satu elektron. Oleh karena oksigen hanya dapat menerima satu elektron setiap tahap akan menyebabkan kurang reaktifnya oksigen dan terjadinya senyawa-senyawa oksigen reaktif



Dari reaksi di atas dapat dilihat bahwa radikal peroksil, ion superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang terjadi disebabkan karena pengalihan elektron yang kurang sempurna pada saat terjadi reduksi oksigen (Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000; Freisleben, 2001).



(Dikutip dari Freisleben and Deisinger *Free Radical Related Diseases and Anti Oxidants in Indonesia*, 1999)

Molekul oksigen memiliki dua elektron yang tidak berpasangan. Keduanya terletak pada orbital yang berbeda dan menunjukkan angka kuantum putaran (*Spin quantum number*) yang sama. Dikatakan bahwa kedua elektron tersebut mempunyai putaran sejajar. Keadaan inilah yang menyebabkan O_2 tidak bersifat seaktif OH^{\cdot} . Bila O_2 tereksitasi, kedua elektron tunggalnya bersatu dalam satu orbital dengan putaran yang berlawanan, molekul oksigen akan berubah menjadi sangat reaktif. Hal ini disebabkan orbital yang kosong mudah diisi oleh sepasang elektron dengan putaran yang berlawanan. Keadaan ini dapat terjadi dalam pembentukan singlet oksigen (Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000).

2.3.2.2. Klasifikasi senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species = ROS*)

Senyawa oksigen reaktif dapat diklasifikasikan berupa radikal dan non radikal seperti terlihat pada tabel 2.3

Tabel 2.3 Senyawa oksigen reaktif

Radikal	Non Radikal
Superoksida ($O_2^{\bullet -}$)	Hidrogen Peroksida (H_2O_2)
Hidroksil (OH^{\bullet})	Asam Hipoklorat ($HOCl$)
Peroksil (RO_2^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Singlet Oksigen (1AgO_2)
Hidroperoksil (HO_2^{\bullet})	

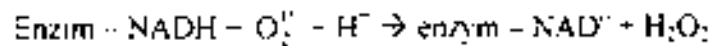
(Dikutip dari Halliwell and Gutteridge *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1999, 27)

2.3.2.2.1. Superoksida ($O_2^{\bullet -}$)

Bila molekul O_2 mengalami reduksi, maka akan terbentuk radikal superoksida. Reaktivitas $O_2^{\bullet -}$ tergantung pada kelarutan lingkungannya dan pH. Di dalam larutan *aqueous*, $O_2^{\bullet -}$ merupakan agen oksidasi yang lemah. Dibandingkan dengan OH^{\bullet} , $O_2^{\bullet -}$ kurang reaktif, tetapi akan cepat bereaksi dengan beberapa radikal seperti NO^{\bullet} , beberapa golongan besi dan sulfur di dalam enzim (Gutteridge, 1995)

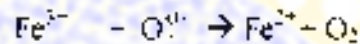
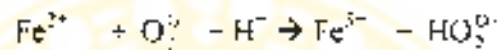
$O_2^{\bullet -}$ akan cepat hilang di dalam larutan *aqueous* disebabkan oleh reaksi dismutase dengan menghasilkan H_2O_2 . Reaksi dismutase akan terjadi lebih cepat pada pH yang asam. $O_2^{\bullet -}$ di dalam larutan *aqueous* akan bereaksi sebagai *reducing agent*. $O_2^{\bullet -}$ tidak mengoksidasi NADPH ataupun NADH, tetapi dapat berinteraksi

dengan ikatan NADH dalam bentuk aktif enzim laktat dehidrogenase untuk membentuk NAD[•] radikal.



Di dalam larutan organik, O₂^{•-} biasanya beraksi sebagai agen oksidasi terhadap senyawa-senyawa yang dapat menjadi donor ion H[•] seperti asam askorbat, katekol dan α tokoferol.

Didalam larutan garam Fe, menurut penelitian Bielski, O₂^{•-} akan bereaksi sebagai berikut :

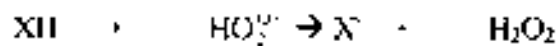


Jadi, O₂^{•-} dapat mereduksi Fe³⁺, tetapi juga dapat mengoksidasi Fe²⁺ (Halliwell and Gutteridge, 1999)

Salah satu reaksi O₂^{•-} di dalam larutan aquoes adalah ketika O₂^{•-} menerima elektron dengan membentuk HO₂[•] yang bersifat lebih reaktif dari O₂^{•-}



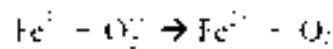
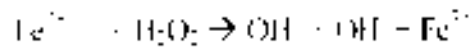
Seperti halnya radikal lain, radikal ini sangat reaktif dan akan membentuk radikal baru dan H₂O₂.



Ion superoksida akan sangat berbahaya bila terdapat bersamaan dengan H₂O₂ karena dapat membentuk radikal hidroksil (OH[•]) melalui reaksi Haber - Weiss.



dimana reaksi ini akan memerlukan ion Fe ataupun Cu yang terjadi dalam dua tahap yaitu:



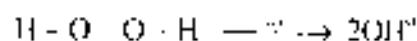
(Dikutip dari : Halliwell and Gutteridge, 1999, Suryohudoyo, 2000)

Mitochondria secara kuantitatif merupakan tempat produksi utama ROS di dalam sel. Diperkirakan 1 % oksigen yang dipergunakan untuk respirasi mitochondria diubah menjadi O_2^\cdot . Pada keadaan fisiologis normal, konsentrasi O_2^\cdot di dalam mitochondria sebesar 8×10^{-12} M (Widodo, 2003)

Di dalam tubuh, O_2^\cdot terbentuk melalui proses enzimatik maupun non enzimatik seperti elektron transport di mitochondria, reaksi hidroksilasi pada endoplasmik retikulum, reaksi xantin oksidase pada pembentukan asam urat, auto oksidasi katekolamin yang semuanya merupakan proses biokimia yang penting untuk kelangsungan proses fisiologis tubuh (Halliwell and Gutteridge, 1999, Suryohudoyo, 2000)

2.3.2.2.2. Radikal Hidroksil (OH^\cdot)

Diantara senyawa-senyawa oksigen reaktif, OH^\cdot merupakan yang paling reaktif, namun OH^\cdot bukanlah merupakan produk primer proses biologik. Secara biologik OH^\cdot dapat dihasilkan oleh berbagai-bagai reaksi seperti reaksi Fenton maupun Haber Weiss (Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999, Suryohudoyo, 2000). Ultraviolet juga dapat menginduksi pembelahan ikatan O-O di dalam H_2O_2 dengan menghasilkan OH^\cdot



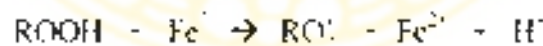
2.3.2.2.3. Radikal Peroksid (RO_2^{\cdot}) dan Radikal Alkoksil (RO^{\cdot})

Walaupun bukan produk primer proses biologik, tetapi RO_2^{\cdot} dan RO^{\cdot} secara umum merupakan agen pengoksidasi yang baik. HO_2^{\cdot} , molekul yang terbentuk dari O_2 juga dianggap sebagai radikal peroksid yang sederhana. Radikal RO_2^{\cdot} dan RO^{\cdot} dapat memecah H^{\cdot} dan molekul-molekul lain seperti reaksi pada peroksidasi lipid. Disamping itu radikal peroksid dapat bereaksi satu sama lain dengan menghasilkan singlet oksigen (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Radikal peroksid dihasilkan akibat serangan OH^{\cdot} terhadap senyawa organik dengan menghasilkan *carbon-centered radicals*. Dengan kondisi aerobik akan bereaksi langsung dengan O_2 membentuk RO_2^{\cdot} :



Radikal peroksid juga dihasilkan oleh dekomposisi peroksida organik ($ROOH$) dengan menghasilkan RO_2^{\cdot} dan RO^{\cdot} . Kebanyakan peroksida stabil pada temperatur ruangan, tetapi akan mengalami dekomposisi oleh panas, pemaparan sinar UV atau pada penambahan ion logam transisi:



Reaksi ini terjadi pada stimulasi peroksidasi lipid oleh ion logam transisi di dalam sistem biologik. HO_2^{\cdot} juga akan mengubah peroksida menjadi radikal peroksid (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.3.2.2.4. Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

H_2O_2 merupakan cairan biru pucat yang mempunyai titik didih $15^\circ C$. H_2O_2 mudah bercampur dengan air dan dapat melintasi membran sel dan membran mitokondria dengan cepat. Apabila di bagian dalam membran sel terdapat Fe atau Cu, H_2O_2 akan segera bereaksi dengan ion-ion tersebut membentuk OH^\cdot yang akan menimbulkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein dan DNA (Widodo, 2003). Perubahan H_2O_2 menjadi OH^\cdot dapat juga disebabkan oleh pemaparan ultraviolet (Gutteridge, 1995).

H_2O_2 mempunyai reaktivitas yang rendah. Penelitian telah menunjukkan bahwa tidak terjadi oksidasi DNA, lipid atau protein bila di inkubasi dengan H_2O_2 pada konsentrasi millimolar. Walaupun demikian H_2O_2 sanggup menginaktifkan beberapa enzim secara langsung, biasanya dengan cara mengoksidasi senyawa thiol (-SH). H_2O_2 juga dapat mendegradasi beberapa hemoprotein seperti mioglobin, hemoglobin dan sitokrom C, sehingga akan melepas ion Fe (Halliwell and Gutteridge, 1999).

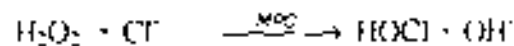
Walaupun inaktivitas H_2O_2 rendah, tapi ia bersifat toksik pada beberapa mikroorganisme. Pada konsentrasi yang tinggi, sering digunakan sebagai desinfektans. Beberapa jenis bakteri sangat sensitif terhadap H_2O_2 dan banyak sel hewan di dalam kultur akan mati bila H_2O_2 ditambahkan pada medium kultur pada konsentrasi diantara 10-100 μM (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Secara *in vivo*, beberapa enzim dapat menghasilkan H_2O_2 seperti xantin, D-asam amino oksidase, urat oksidase yang secara langsung mentransfer dua elektron ke oksigen. Sistem biologik yang menghasilkan $O_2^{\cdot -}$ juga akan memproduksi H_2O_2 dengan perantaraan desmutase $O_2^{\cdot -}$. H_2O_2 yang tidak diinginkan, akan dikeluarkan

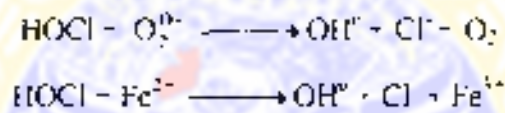
dari sel dengan aksi katalase dan glutathion peroksidase dan peroksidase yang tertentu (Gutteridge, 1995)

2.3.2.2.5. Asam Hipoklorit (HOCl = OCl⁻)

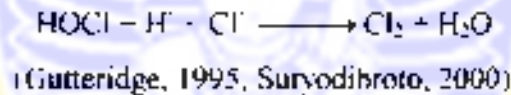
HOCl diproduksi oleh enzim mieloperoxidase (MPO) sewaktu mengaktifkan neutrofil. Heme yang terdapat di dalam enzim mieloperoxidase akan mengkatalisator pembentukan HOCl dari H₂O₂ dan ion klorida



HOCl yang terbentuk akan menghasilkan OH⁻ melalui reaksi baik yang tergantung Fe ataupun tidak melalui Fe



Disamping itu HOCl akan mengalami dekomposisi menjadi gas klorin

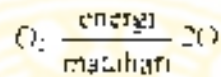


Walaupun di dalam fungsinya untuk membunuh bakteri secara fagositosis tidak jelas, HOCl menarik perhatian karena reaktivitasnya yang tinggi dan sanggup merusak biomolekul baik secara langsung ataupun melalui dekomposisi untuk membentuk klorin. Penambahan HOCl kepada bakteri seperti *Escherichia Coli*, akan menghambat sintesis ATP dengan merusak komponen sistem rantai transport elektron dan ATP sintase. Percobaan pada hewan, ternyata HOCl dapat menginaktifkan berbagai-bagai enzim. Penambahan HOCl dapat mengoksidasi thiol, askorbat, NADPH (H) dan menyebabkan klorinasi basa DNA, terutama piridin dan residu tirosin di dalam protein. HOCl kelihatannya dapat melintasi membran sel dan

menimbulkan kerusakan membran protein dan unsur-unsur di dalam sel (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.3.2.2.6. Ozon (O₃)

Merupakan gas yang berwarna biru pucat yang menyediakan *stratospheric* yang bersifat pelindung (*global antimutation*) terhadap radiasi matahari pada lapisan yang tinggi atmosfer. Ozon diproduksi oleh fotodisosiasi molekul O₂ menjadi atom oksigen yang kemudian bereaksi dengan molekul O₂.



Tidak seperti O₂, O₃ tidak merupakan radikal bebas. Tetapi dalam bentuk *ground state*, ozon bersifat toksik dan merupakan polutan yang bersifat pengoksidasi yang tidak diinginkan (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Ozon diproduksi didalam udara yang tercemar. Ozon dapat merusak paru-paru, mengoksidasi protein, DNA dan lemak (Gutteridge, 1995).

2.3.2.2.7. Singlet Oksigen (¹AgO₂)

Singlet oksigen bersifat lebih reaktif dari O₂ dalam bentuk *ground state*. Sebetulnya singlet oksigen bukan radikal bebas, karena tidak mempunyai elektron yang tidak berpasangan, tetapi ia merupakan bentuk yang reaktif dari O₂ karena kedua elektron tunggal O₂ disatukan dalam satu orbital dengan putaran yang berlawanan (Gutteridge, 1995; Suryohudoyo, 2000). Singlet oksigen mempunyai 2 bentuk yaitu ¹AgO₂ dan ²Σ⁺O₂, tetapi bentuk ²Σ⁺O₂ sangat energetik dan sangat

cepat melebur ke bentuk ΔgO_2 , sehingga bentuk inilah yang dikenal dengan singlet oksigen. Walaupun singlet oksigen bukan radikal bebas, tetapi ia dapat terbentuk dalam beberapa reaksi radikal dan dapat menyebabkan pembentukan radikal yang lainnya (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.4. Antioksidan

Proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik akan menghasilkan sekumpulan zat lain yang dengan mudah membentuk ROS. Untuk menanggulangi pembentukan senyawa ini dan akibat yang ditimbulkannya pada organisme, maka organisme tersebut akan berusaha melindungi dirinya terhadap pengaruh ROS tersebut. Proses perlindungan ini dilakukan oleh golongan senyawa yang dapat merubah ROS menjadi senyawa yang tidak aktif yang antara lain dengan cara mereduksi. Senyawa yang melakukan perlindungan ini dikenal dengan nama antioksidan (Halliwell and Gutteridge, 1999; Preedy et al., 1999; Soewoto, 2001; Ramelan, 2003).

Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donors*) (Suryohudoyo, 2000). Secara biologis, antioksidan mempunyai arti yang luas yang dapat didefinisikan sebagai suatu senyawa yang terdapat dalam kadar yang sangat rendah bila dibandingkan dengan substratnya dan secara signifikan dapat mencegah atau menghambat oksidasi substrat tersebut sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap sel, jaringan atau organ dapat dicegah atau diperbaiki (Halliwell and Gutteridge, 1999; Preedy et al., 1999; Soewoto, 2001; Setiati, 2003).

Sebagai pertahanan terhadap radikal bebas, antioksidan akan berperan dengan berbagai-bagai cara

1. Berperan sebagai penyapu, pembersih (*scavenger*) radikal bebas atau senyawa reaktif yang dihasilkan oleh proses oksidatif
2. Berperan sebagai pencegah (*interceptor*) terhadap radikal bebas tersebut
3. Berperan sebagai pengikat atau pengasingan (*sequester*) bahan-bahan pro-oksidan seperti ion Fe, Cu dan hem, sehingga pro-oksidan tersebut tidak bekerja.
4. Berperan sebagai pelindung biomolekul terhadap kerusakan, terutama kerusakan oksidatif (Dersinger and Freisleiben, 1999; Suryohudoyo, 2000; Soewoto, 2001; Setiati, 2003)

Menurut tempat kerjanya, dalam melakukan pertahanan terhadap radikal bebas, antioksidan dapat dibedakan atas

1. Antioksidan yang bekerja di tingkat sel. Pada dasarnya antioksidan ini mempunyai fungsi sebagai antioksidan pencegah terbentuknya radikal hidroksil. Antioksidan yang berperan disini adalah enzim superoksid dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Pembentukan senyawa oksigen reaktif akan menyebabkan peningkatan enzim antioksidan tubuh. Satu molekul enzim antioksidan ini dapat menetralsisir beberapa ratus radikal bebas. Tetapi bila induksi terus berlanjut, maka protein ini akan menurun yang pada akhirnya akan kehilangan fungsinya. Penurunan dan hilangnya fungsi protein ini serta peningkatan MDA (malonaldehid), merupakan *biomarker* kerusakan oksidatif.

2. Antioksidan yang bekerja di membran sel

Kelompok ini berfungsi sebagai pemutus rantai. Termasuk ini adalah Vitamin E, betakaroten, koenzim Q.

3. Antioksidan yang bekerja ekstra seluler

Kelompok ini berfungsi mencegah terbentuknya logam transisi Fe dan Cu. Termasuk ini adalah transferrin, laktoferrin, seruloplasmin (Halliwell, 1994; Gutteridge, 1995; Suryohudoyo, 2000; Setiati, 2003).

Secara umum antioksidan dapat digolongkan atas

1. Antioksidan enzimatik
2. Antioksidan yang bekerja mengikat bahan-bahan pro oksidan
3. Antioksidan dengan berat molekul rendah yang disintesis oleh tubuh sendiri.
4. Antioksidan dengan berat molekul ringan yang berasal dari luar tubuh (diet) (Halliwell and Gutteridge, 1999).

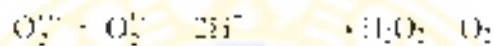
Antioksidan ini dapat dibuat oleh organisme sendiri (endogen) atau yang berasal dari luar tubuh organisme itu (eksogen). Antioksidan endogen dapat diinduksi aktivitasnya bila lingkungannya terganggu oleh radikal bebas atau oleh molekul-molekul sitokin (Soewoto, 2001).

2.4.1. Antioksidan enzimatik

Antioksidan enzimatik merupakan sistem antioksidan endogen yang terdiri atas enzim-enzim dari berbagai senyawa yang disintesis oleh tubuh yang bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas yang baru. Yang termasuk ini adalah enzim-enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan peroksidase (Pironi et al., 1998; Preedy et al., 1999; Suryohudoyo, 1999; Setiati, 2003).

2.4.1.1. Superoksid dismutase (SOD)

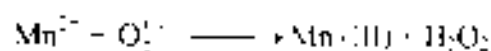
Di dalam pertahanan tubuh terhadap radikal bebas dan ROS, SOD berfungsi menghancurkan $O_2^{\cdot -}$ dengan mengubahnya menjadi peroksida yang nantinya akan dihancurkan pula oleh katalase atau glutathion peroksidase. Sifat radikal yang tinggi dari $O_2^{\cdot -}$ akan diubah oleh SOD menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif (Halliwell, 1994; Mates and Jimenez, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000; Setrati, 2003).



Pada manusia SOD ditemukan pada sitosolik berupa Cu, Zn, SOD, sedangkan pada mitokondria berupa Mn-SOD. SOD juga ditemukan ekstra selular (Mates and Jimenez, 1999).

2.4.1.1.1. Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD = SOD2)

Pertama-tama Mn-SOD di isolasi dari *Escherichia Coli* dengan warna yang berupa pink. Di dalam sel hewan dan ragi, SOD terutama ditemukan di mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 1999). Mn-SOD adalah homotetramer dengan 96 kDa berisi 4 atom Mn-persubunit yang berputar dari Mn (III) menjadi Mn^{2+} dan kembali menjadi Mn (III) selama dua langkah dismutase superoksida



(Mates and Jimenez, 1999). Gen enzim ini terletak pada lengan panjang kromosom 6 (Asikin, 2001).

Mitokondria secara kuantitatif merupakan tempat produksi utama dari ROS di dalam sel, dimana diperkirakan 1 % oksigen yang dipergunakan untuk respirasi mitokondria diubah menjadi $O_2^{\cdot-}$ (Widodo, 2003). Mn-SOD (SOD 2) dipercaya sebagai antioksidan yang mempunyai fungsi membersihkan (scavenger) radikal superoksida. Mn-SOD telah didemonstrasikan mempunyai kepentingan biologis seperti berikut:

1. Inaktivasi gen Mn-SOD pada *Escherichia Coli* dapat meningkatkan frekuensi mutasi bila tumbuh pada kondisi aerobik.
2. Eliminasi gen *Saccharomyces cerevisiae* akan meningkatkan sensitivitas terhadap oksigen.
3. Kekurangan ekspresi Mn-SOD mematikan tikus putih dalam usia 10-21 hari, akibat kardiomiopati.
4. TNF secara selektif menginduksi Mn-SOD, tetapi tidak Cu/Zn-SOD, katalase atau GPX-RNA di dalam berbagai jaringan tikus putih dan kultur sel.
5. Transfeksi Mn-SOD cDNA ke kultur sel akan menyebabkan sel resisten terhadap toksisitas paraguat, TNF, adriamycin dan radiasi yang menyebabkan transformasi neoplastik.
6. Ekspresi gen Mn-SOD manusia pada mencit transgenik akan melindunginya terhadap oksigen yang menyebabkan kerusakan paru dan adriamycin yang menyebabkan toksisitas jantung.

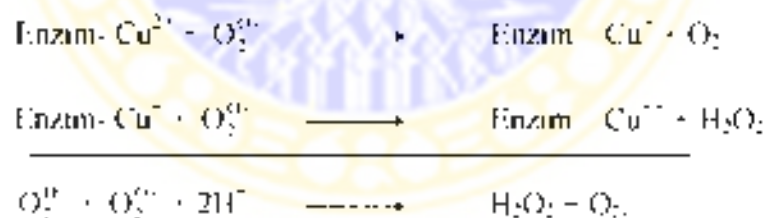
Dengan ini dapat dikatakan bahwa ekspresi Mn-SOD penting untuk kelangsungan hidup aerobik dan perkembangan resisten seluler terhadap toksisitas yang dimediasi oleh radikal oksigen (Halliwell and Gurrigge, 1999, Mates and Jimenes, 1999, Asikin, 2001).

2.4.1.1.2. *Copper, Zinc, Superoxide Dismutase (Cu Zn-SOD = SOD1)*

Cu Zn-SOD adalah golongan enzim SOD homodimer, mempunyai 2 subunit protein + 32 KDA. Masing-masing mengandung 1 ion Cu dan 1 ion Zn pada tempat yang aktif dengan diembatasi oleh ligan biasa (Mates and Jimenez, 1999). Pada sel hewan, Cu Zn-SOD terdapat pada sitosol, tetapi beberapa terdapat pada lisosom, nukleus dan ruangan antara membran luar dan dalam mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Gen enzim ini pada manusia terletak pada kromosom 21, dan diketahui bahwa mutasi berhubungan dengan bentuk autosom dominan *amyotrophic lateral sclerosis (ALS)* (Asikin, 2001). Sianida merupakan penghambat yang sangat kuat terhadap kerja enzim ini (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Cu Zn-SOD dipercaya memainkan peran penting pada lini pertahanan antioksidan dengan mengkatalisis dismutasi anion superoksida yang radikal membentuk H_2O_2 dan O_2 .



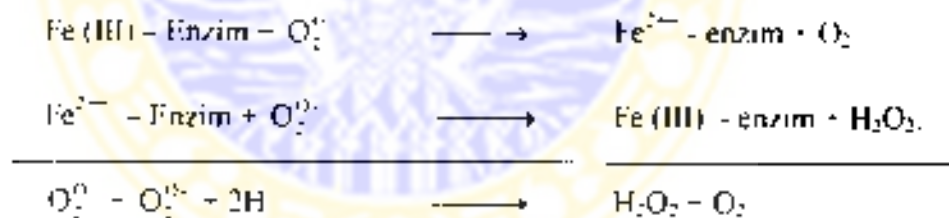
(Halliwell and Gutteridge, 1999; Mates and Jimenez, 1999)

Berlainan dengan Mn-SOD yang dapat ditemukan pada seluruh tumor, Cu Zn-SOD ditemukan sedikit pada tumor. Mencuri transgenik dengan overekspresi gen SOD manusia akan terfindung dari kerusakan paska iskemta. Tikus putih yang kekurangan enzim ini memperlihatkan kecenderungan yang nyata terhadap toksisitas

paraquat. Menet benina yang tidak mempunyai ekspresi gen (*knock out*) yang *homozygote* mempunyai fertilitas yang kurang dibandingkan dengan menet yang *wt* dan *heterozygote*. Menet-menet ini mengalami peningkatan kematian embrional. Data ini menunjukkan peranan radikal bebas di dalam menyebabkan abnormalitas reproduksi wanita pada mamalia. Penelitian yang lain menunjukkan bahwa Mn-SOD penting untuk hidup, sementara Cu-Zn SOD yang *knock out* masih bisa hidup normal, sedangkan tikus-tikus putih yang mempunyai Mn-SOD yang *knock out* hanya bisa hidup sampai tiga minggu (Halliwell and Gutteridge, 1999, Mates and Jimenez, 1999, Asikin, 2001). Penelitian lain mendapatkan bahwa Cu-Zn SOD hepatic akan menurun setelah pemberian 20 bulan etanol (Preedy et al., 1999).

2.4.1.1.3. Iron SODs (Fe SOD)

Fe SOD berisi 2 subunit protein. Enzim dimerik ini biasanya berisi satu atau dua ion Fe per molekul enzim. Fe terdapat dalam bentuk Fe (III)



Fe SOD pada pH yang tinggi akan menurun aktivitas katalistiknya, tetapi ternyata kenyanya tidak dihambat oleh CN. Pada *Escherichia Coli*, Fe SOD ditemukan pada matriks sel dan penemuan yang terakhir mendapatkan bahwa Fe SOD terdapat pada ruang periplasmik. Pada jaringan hewan, Fe SOD tidak ditemukan, hanya terdapat pada jaringan pohon yang tinggi (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.4.1.1.4. Superoksida dismutase ekstra seluler (Ec- SOD)

Ec- SOD merupakan tetrametrik dengan \pm 135 KDa, masing-masing subunit berisi Cu dan Zn. Ada bermacam-macam bentuk Ec-SOD yaitu A, B dan C. B dan C terikat pada heparin. Kelihatannya Ec- SOD terikat pada permukaan sel yang berhubungan dengan permukaan sel yang berbentuk karbohidrat terutama pada paru-paru dan dinding pembuluh darah (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Ec- SOD tidak diinduksi oleh subunitnya ataupun oksidan lain, dan regulasinya di dalam jaringan mamalia terutama dikoordinasi oleh sitokin dan pada respon terhadap oksidan. Mencit transgenik yang mempunyai Ec- SOD *knock out*, terlihat normal tetapi mereka dapat menderita kerusakan paru dan kematian lebih cepat bila terpapar O_2 murni dan memperlihatkan peradangan yang hebat pada paru-paru bila dipapir oleh ozon pada 1,5 pp (*part per billion*) (Halliwell and Gutteridge, 1999, Mates and Jimenez, 1999).

2.4.1.1.5. Nickel superoxid dismutase (Ni- SOD)

Ni - SOD telah dapat dimurnikan dari fraksi sitosolik *streptomyces griseus* dan *streptomyces coelicolor*. Terdiri atas 4 subunit dengan 12,4 KDa, stabil pada pH 4-8 dan suhu sampai 70°C. Komposisi asam amino berbeda dengan Fe, Mn dan Cu Zn SOD. Apoenzim, suatu keadaan yang kekurangan Ni, tidak mempunyai kesanggupan untuk menjadi mediator perubahan anion superoksida menjadi H_2O_2 . Ini menunjukkan bahwa Ni ikut memainkan peranan penting pada dismutase $O_2^{\bullet-}$ (Mates and Jimenez, 1999).

Walaupun SOD berfungsi mengkatalisis $O_2^{\bullet-}$, tetapi telah dapat juga dibuktikan bahwa SOD dapat bereaksi langsung dengan OH^{\bullet} , radikal peroksid atau

alkohol dan singlet oksigen, karena SOD bersi histidin dari sisi rantai lain yang bereaksi dengan senyawa-senyawa ini. Bila sejumlah SOD ditambahkan kepada sistem yang memproduksi ROS RNS, akan terjadi penghambatan kerusakan (Halliwell and Gutteridge, 1999). Di samping itu SOD juga melindungi inaktivasi dehidratases (dihydroxy acid dehidratase, aconitase, 6 phosphogluconate dehidratase dan fumarase A dan B) terhadap radikal superoksida (Mates and Jimenez, 1999).

Untuk mengidentifikasi aktivitas dan golongan SOD ini dapat dilakukan berbagai-bagai metode. Aktivitas Cu Zn SOD akan dihambat oleh sianida, tetapi tidak menghambat aktivitas Fe SOD dan Mn SOD, sehingga pemberian sianida dapat digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas Cu Zn SOD pada jaringan yang *hemozigot*. Baik Cu Zn SOD maupun Fe SOD akan menjadi inaktivasi pada paparan H_2O_2 , yang lama, sementara Mn SOD tidak terpengaruh, sehingga dapat membedakan aktivitas kedua enzim ini. Metode yang lain yang digunakan untuk membedakan aktivitas enzim ini adalah dengan menambahkan azide (N_3^-). Pada pH 7.8-10 m M azide akan menghambat Cu Zn, Mn dan Fe SOD berturut-turut sebanyak 10%, 30% dan 70% (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.4.1.2. Katalase (Cat)

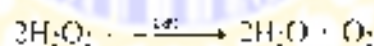
Katalase pada hewan merupakan enzim *tetrameric haemin* yang terdiri atas 4 subunit protein, yang masing-masing bersi senyawa hem ferri yang terikat pada tempat aktivitasnya. Masing-masing subunit biasanya mempunyai 1 molekul NADPH yang terikat pada protein tersebut. Pada waktu penyimpanan terjadi disosiasi katalase menjadi subunit yang biasanya menyebabkan kehilangan

aktivitasnya, tetapi enzim ini merupakan salah satu enzim yang paling efisien yang diketahui (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Pada jaringan hewan, aktivitas katalase terutama terdapat pada peroksisom dimana paling tinggi terdapat pada hati dan eritrosit, aktivitas sedang pada paru-paru, pankreas, limfa dan ginjal dan aktivitas rendah terdapat pada otot-otot skeletal (Halliwell, 1994; Deisigner and Freisleben, 1999). Mitokondria dan retikulum endoplasma berisi sedikit katalase. Aktivitas katalase yang dideteksi pada jaringan homogenat hewan, mungkin disebabkan oleh rusaknya peroksisom yang merupakan organel yang mudah pecah selama homogenisasi (Halliwell and Gutteridge, 1999).

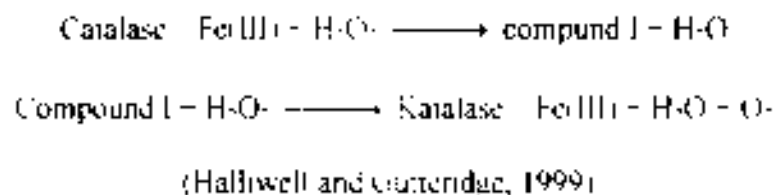
H_2O_2 dihasilkan akibat dismutasi $O_2^{\cdot -}$. Di samping itu H_2O_2 juga dihasilkan oleh beberapa enzim oksidasi *in vivo*, termasuk xantin, urat dan D amino oksidase. Hidrogen peroksidase biasanya dikeluarkan pada jaringan aerob oleh 2 tipe enzim yaitu enzim katalase dan peroksidase (Halliwell, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1999; Preedy et al., 1999).

Katalase akan mengeluarkan H_2O_2 dari jaringan tubuh dengan membentuk air dan *ground state* O_2 .



(Mates and Jimenez, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000; Asikin, 2001).

Mekanisme reaksi katalase dapat ditulis sebagai berikut



Aktivitas katalase akan dihambat oleh pembedan azide, stanida dan HOCl, dimana penghambat utama adalah amino imazole. Pada *acatalasemia*, yaitu suatu keadaan dimana terjadi mutasi gen yang mengkode katalase manusia, terdapat defisiensi aktivitas yang hebat dari katalase dengan gejala peningkatan ulserasi pada rongga mulut. Delesi gen katalase bakteri hanya menimbulkan sedikit efek pertumbuhan, tetapi sel akan menjadi sangat sensitif terhadap perubahan H_2O_2 atau terhadap H_2O_2 yang dihasilkan oleh toksin (Halliwell and Gutteridge, 1999). Pada penderita kecanduan alkohol, aktivitas katalase menurun (Preedy et al., 1999).

Walaupun enzim-enzim aerobik yang lain dapat menghilangkan H_2O_2 , tetapi enzim katalase memainkan peranan penting di dalam perolehan tambahan respon adaptasi sel terhadap stres oksidatif dengan mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Dengan cara ini katalase dapat memelihara konsentrasi O_2 yang akan digunakan untuk mengulang siklus reduksi kimia atau untuk berinteraksi langsung dengan toksin (Mates and Jimenez, 1999).

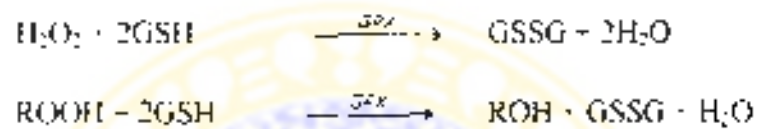
2.4.1.3. Golongan Glutation peroksidase (GPX)

GPX pertama-tama ditemukan pada tahun 1957. GPX (80 kDa) terdiri atas empat subunit protein yang masing-masing berisi satu atom elemen selenium (Se) yang penting untuk aktivitasnya sebagai selenosistein, dimana amino acid sistein atau sulfur diganti oleh selenium ($R-Se H$ sebagai pengganti $R-SH$). Seleno sistein dikode sebagai TGA (Halliwell and Gutteridge, 1999; Mates and Jimenez, 1999; Preedy et al., 1999).

GPX terdapat di dalam sitoplasma dan mitokondria. Aktivitas yang tinggi terdapat pada hati. Aktivitas sedang terdapat pada eritrosit, paru-paru, pankreas,

limfa dan ginjal dan aktivitas rendah pada otot skeletal. Walaupun demikian tidak selamanya enzim ini terdapat pada tumbuh-tumbuhan tinggi atau bakteri (Deisigner and Freisleben, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Mates and Jimenez, 1999; Ramelan, 2003).

Enzim ini berperan penting dalam melindungi sel, tidak saja dari H_2O_2 , tetapi juga dari peroksida organik yang terbentuk pada oksidasi kolesterol dan asam lemak dengan menggunakan glutation (GSH), sehingga akan melindungi sel mamalia terhadap kerusakan oksidatif.



(Mates and Jimenez, 1999; Asikin, 2001). Pada hewan percobaan, pemberian diet etanol akan menyebabkan penurunan aktivitas GPX (Preedy et al., 1999).

Golongan enzim ini terdiri atas

1. Glutation Peroksidase (GPX)

Walaupun ekspresi enzim ini ada dimana-mana, konsentrasi bervariasi tergantung pada jenis jaringan. Plasma mamalia mengandung kadar GPX yang rendah. Glutation peroksidase sitosolik (cGPX) dan glutation peroksidase mitokondria (mGPX) akan mereduksi asam lemak hidroperoksida dan H_2O_2 dengan menggunakan glutation (GSH) tetapi tidak dapat bereaksi langsung terhadap ester asam lemak peroksida menjadi molekul lipida di dalam lipoprotein atau membran. Mereka pertama-tama dibebaskan dahulu oleh enzim lipase.

2. Fosfolipid hidroperoksida glutation peroksidase (PHGPX), merupakan protein dengan massa 19.000. Enzim ini dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol dan fosfolipid teroksidasi pada membran sel darah

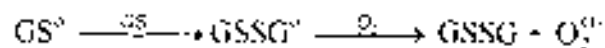
merah atau lipoprotein. Enzim ini juga sangat aktif mereduksi timin hidroperoksida yang terhentuk sebagai akibat serangan radikal bebas pada basa timin DNA. Diduga pertahanan aktivitas PHGPX lebih penting dari GPX.

5. *Intestinal glutathione peroxidase (iGPX)*

Enzim ini ditemukan pada lapisan sel traktus gastro intestinal dan dapat memetabolisme peroksida di dalam makanan yang berlemak yang dihasilkan selama peroksidasi lipid dalam traktus gastro intestinal (Halliwell and Gutteridge, 1999; Mates and Jimenez, 1999; Asikin, 2001).

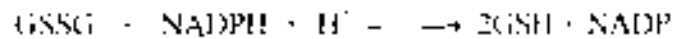
Glutathion (GSH) di samping berfungsi sebagai ko-faktor untuk golongan glutathion peroksidase, juga terlibat di dalam berbagai proses metabolik seperti metabolisme asam askorbat, komunikasi antar sel dan secara umum mencegah oksidasi dan ikatan silang -SH Group GSH juga terlibat dalam transportasi Cu intra seluler dan dapat melakukan *chelation* Cu dengan menghancurkan kesanggupan Cu menghasilkan radikal bebas (Halliwell and Gutteridge, 1999). Biosintesa GSH tergantung pada 2 enzim yaitu γ glutathion sistein sintase dan glutathion sintase (Freisleben, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000).

Secara invitro, GSH dapat bereaksi dengan OH^\bullet , HOCl, peroksi nitrit, RO^\bullet , RO_2^\bullet , *carbon centered radicals*. Reaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal thyl (GS^y). Radikal thyl akan menghasilkan $\text{O}_2^{\bullet-}$ dengan reaksi :



(Halliwell and Gutteridge, 1999)

Kadar glutatton dipertahankan melalui siklus redoks glutatton. Ini dilakukan oleh enzim glutatton reduktase dan NADPH yang mengkatalisis reaksi



Kebutuhan NADPH disediakan oleh jaringan hewan dan tumbuh-tumbuhan (Halliwell and Gutteridge, 1999; Asikin, 2001)

GSH mengandung gugusan SH (gugusan thiol) yang relatif tinggi, dimana gugusan SH merupakan gugusan yang penting untuk mengurangi efek dari ROS. Dalam keadaan stres oksidatif yang berat, GSH dapat berikatan dengan disulfida campuran (*mixed disulphides*) (Preedy et al., 1991; Halliwell and Gutteridge, 1991; Asikin, 2001)

Glutatton peroksidase bersama-sama dengan enzim katalase akan memberikan kontribusi di dalam menghilangkan H_2O_2 . Pada eritrosit, produksi H_2O_2 yang rendah atau sedang, kelihatannya hanya GPX yang bekerja, tetapi bila konsentrasi H_2O_2 tinggi, katalase berperan di dalam menghancurkan H_2O_2 . Sel hati mengandung konsentrasi yang tinggi baik katalase maupun GPX. Pada mata, paru-paru dan otot skeletal, kelihatannya kapasitas GPX rendah.

2.4.1.4. Glutation S-transferase (GST)

GST merupakan sejumlah enzim yang berperan dalam detoksikasi berbagai senyawa xenobiotika, seperti asetaminofen, aflatoksin, kloroform, nitrat organik, DDT. Proses detoksifikasi dimulai dengan melakukan konjugasi glutatton kepada berbagai substrat elektrofilik melalui *ATP-dependent glutatton S-conjugate*. Akibatnya konjugasi dapat didegradasi dan diasetilasi dengan membentuk asam

merangkap yang akan diekskresikan melalui urine (Halliwell and Gutteridge, 1999, Asikin, 2001)

Beberapa glutathion transferase dapat memetabolisme aldehid yang sitotoksik yang diproduksi selama peroksidasi lipid seperti 4-hidroksinonenal. Beberapa GST memerlukan aktivitas seperti glutathion peroksidase dengan hidroperoksida organik, mengkatalisis peroksida organik dengan GSH untuk membentuk GSSG dan alkohol. Pada saat ini telah dikenal 6 golongan gene yang mengkode GST yaitu alpha, mu, pi, sigma, kappa dan theta GST. Secara *invivo* glutathion transferase belum memberikan hasil yang signifikan di dalam memetabolisme peroksida. (Halliwell and Gutteridge, 1999; Asikin, 2001)

2.5. Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu keadaan yang tidak seimbang antara produksi ROS dengan sistem pertahanan antioksidan. Kerusakan jaringan tubuh yang timbul akibat stres oksidatif disebut dengan kerusakan oksidatif.

Secara prinsip stres oksidatif disebabkan oleh 2 faktor yaitu :

1. Kekurangan Antioksidan.

Keadaan ini dapat terjadi pada perubahan enzim antioksidan seperti *copper-zinc peroxidase dismutase* (Cu-Zn SOD), Mn SOD atau glutathion peroksidase yang terjadi akibat kekurangan diet antioksidan ataupun bahan-bahan diet esensial lainnya. Penelitian di Jamaika menunjukkan, anak-anak yang menderita kwashiorkor mengalami penurunan kadar GSH, *overload* Fe dan mendapat persoalan dengan hal-hal yang ditimbulkan oleh stres oksidatif.

2. Peningkatan Produksi ROS

Keadaan ini dapat terjadi pada peningkatan paparan O_2 , toksin yang di dalam metabolismenya akan meningkatkan produksi ROS atau oleh aktivasi yang berlebihan dari sistem ROS yang natural misalnya . aktivasi yang berlebihan dari sel fagosit pada penyakit inflamasi yang kronis seperti *rheumatoid arthritis* dan kolitis ulseratif) (Sies, 1991, Halliwell, 1994, Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000; Sitompul, 2003).

Akibat stres oksidatif pada sel akan terjadi keadaan-keadaan berupa adaptasi, jejas seluler, perubahan perilaku sel dan kematian sel.

1. Adaptasi

Stres oksidatif yang ringan biasanya dapat ditolerir oleh sel. Hal ini biasanya terjadi akibat regulasi sistem pertahanan enzim antioksidan dalam rangka memperbaiki keseimbangan oksidan dan antioksidan. Keadaan ini dapat dilihat pada tikus putih dewasa yang secara berangsur-angsur menyesuaikan diri dengan peningkatan konsentrasi oksigen. akan dapat mentoleransi oksigen murni lebih lama dari pada tikus putih kontrol. Hal ini rupanya disebabkan oleh peningkatan sintesa antioksidan paru.

Dalam beberapa kasus, stres oksidatif yang ringan dapat meningkatkan regulasi pertahanan anti oksidan sehingga dapat memproteksi sel terhadap stres oksidatif selanjutnya. Mekanisme adaptasi ini melibatkan perubahan ekspresi gen yang menghasilkan peningkatan pertahanan anti oksidan tubuh. Stres oksidatif juga dapat menurunkan transkripsi dari beberapa gen. Contoh ; bila hepatosit dipapari H_2O_2 atau bila tikus putih diberi peningkatan O_2 , maka transkripsi dari RNA

yang mengkode dari beberapa enzim P-450 akan menurun (Halliwell and Gutteridge, 1999)

2. Jejas seluler

Stres oksidatif menimbulkan kerusakan pada seluruh tipe biomolekul termasuk DNA, protein dan lipid. Target yang terutama dari stres oksidatif bervariasi tergantung pada sel, tipe stres oksidatif dan berapa hebat stres oksidatif itu. Contoh : peroksidasi lipid adalah target utama CCL, sedang DNA adalah target pertama bila H₂O₂ dipaparkan pada sel mamalia. Putusnya rantai DNA dihubungkan dengan depresi kadar ATP dan NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) seluler. Depresi NAD⁺ terjadi karena enzim yang terikat pada kromatin, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) memecah molekul NAD⁺ dan mentransfer ADP-ribose ke protein inti (Halliwell and Gutteridge, 1999)

3. Perubahan perilaku sel

Pengaruh stres oksidatif terhadap perilaku sel bervariasi tergantung pada kadar stres oksidatif. Kadar yang rendah dapat menstimulasi proliferasi berbagai-bagai sel pada kultur, tetapi kadar yang tinggi akan menurunkan proliferasi sel pada kultur. Mekanisme kenapa terjadi efek yang meningkatkan proliferasi pada kadar rendah stres oksidatif belum diketahui dengan jelas. Disamping itu stres oksidatif juga akan mempengaruhi komunikasi antar sel dan sinyal transduksi (Orrenius, 1993; Schieven, 1998)

4. Kematian sel

Sel yang dipapari stres oksidatif yang kuat akan mengalami kematian. Kematian sel disebabkan oleh bermacam-macam mekanisme. Akibat meningkatnya aktivasi PARP akan menyebabkan deplesi NAD⁺ / NADP⁺, sehingga sel-sel tidak

dapat membuat ATP dan mati. Efek ini disebut sebagai *senescent response*, yang terjadi karena perbaikan DNA tidak efisien dan komplit untuk mencegah terhentuknya sel kanker.

Kematian sel dapat melalui 2 mekanisme yaitu nekrosis dan apoptosis, walaupun demikian kematian kedua-duanya dapat terjadi. Nekrosis dan Apoptosis merupakan hasil stres oksidatif (Takahashi and Niki, 1998)

2.5.1. Pengaruh stres oksidatif terhadap Kalsium (Ca^{2+})

Dalam keadaan normal kadar Ca^{2+} bebas yang terdapat intra seluler, sangat rendah, berkisar ± 0,1 μM . Secara keseluruhan, kadar Ca^{2+} di dalam sel lebih besar dan terdapat dengan aman di dalam mitokondria dan retikulum endoplasma serta terikat pada protein sitoplasmik (Orrenius, 1993, Halliwell and Gutteridge, 1999).

Akibat stres oksidatif, terjadi disregulasi Ca^{2+} . Hal ini disebabkan oleh kerusakan mitokondria, sehingga terjadi pelepasan Ca^{2+} . Peroksida juga merusak sistem pengemhantaran Ca^{2+} oleh retikulum endoplasma dan mengintervensi *efflux* Ca^{2+} melalui oksidasi SH group yang essential pada terowongan trans membran (Orrenius, 1993). Hambatan *efflux* Ca^{2+} akan mengakibatkan akumulasi Ca^{2+} dan menambah kerusakan akibat peningkatan tersebut. Sebagai tambahan toksin-toksin yang dihasilkan dapat meningkatkan masuknya Ca^{2+} dengan cara berinteraksi dengan saluran Ca^{2+} ataupun peningkatan permeabilitas membran atas Ca^{2+} (Orrenius, 1993).

Akibat peningkatan Ca^{2+} , maka akan terjadi disosiasi mikrofilamen aktif dari *actinin*, suatu protein yang bertindak sebagai penghubung mikrofilamen dengan ikatan *protein actin* di dalam membran plasma. Ca^{2+} juga akan mengaktifkan

protease tertentu yaitu *calpain* yang memecah ikatan *protein actin*, sehingga membran plasma akan terikat pada sitoskeleton. Hal ini akan menyebabkan membran plasma menggelembung. Oksidasi dari SH group pada protein sitoskeletal oleh ROS dan menurunnya ATP, juga akan menimbulkan membran plasma menggelembung (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Salah satu fungsi Ca^{2+} adalah mengatur sintesa *nitric-oxide* dan aktivitas fosfolipase A₂. Enzim fosfolipase berfungsi memecah membran fosfolipid untuk menghasilkan asam arakhidonat yang berguna untuk mensintesa prostaglandin dan leukotrien. Aktivitas kedua enzim ini sangat bergantung kepada kadar Ca^{2+} dan karena itu akan menjadi abnormal bila terjadi peningkatan Ca^{2+} yang bebas di dalam sel. Peningkatan Ca^{2+} akan menghasilkan asam lemak yang bebas dan NO° , dimana NO° dapat menimbulkan kematian langsung pada sel. NO° juga dapat membentuk $ONOO^{\circ}$, yang mempunyai efek sitotoksik yang potensial. Produksi yang berlebihan asam lemak dari hasil hidrolisis membran lipid dapat meningkatkan produksi prostaglandin yang bekerja sebagai deterjen pada membran (Orrenius, 1993, Halliwell and Gutteridge, 1999).

Pada beberapa sel tertentu yang mengandung enzim xantin dehidrogenase, aktivasi calpain akan menyebabkan perubahan xantin dehidrogenase menjadi xantin oksidase yang merupakan sumber pembentukan $O_2^{\bullet-}$ (Bast et al., 1991). Peningkatan Ca^{2+} juga akan mengaktifkan *Ca^{2+} dependent endonuclease* di dalam sel yang menyebabkan fragmentasi DNA, suatu hal yang penting untuk terjadinya apoptosis (Takahishi and Niki, 1998).

Mitokondria seperti halnya retikulum endoplasma berfungsi sebagai tangki penyimpanan Ca^{2+} . Membran dalam mitokondria memiliki sistem untuk pemasukan

maupun untuk pengeluaran ion kalsium. Pemasukan ion Ca^{2+} didorong oleh potensi membran negatif disebelah dalam yang menarik ion positif. Pengeluaran Ca^{2+} dari matrik hanya terjadi melalui pertukaran dengan Na^+ melalui sistem *anti port*. Jika konsentrasi Ca^{2+} sitosol meningkat maka laju pemasukan ion Ca^{2+} ke mitokondria meningkat, sementara laju pengeluaran konstan. Sebaliknya jika konsentrasi ion Ca^{2+} sitosol menurun, maka laju pemasukan menurun. Dengan demikian mitokondria berfungsi sebagai buffer konsentrasi ion Ca^{2+} sitosol (Artika, 2003).

Pada keadaan dimana terdapat produksi radikal bebas yang berlebihan dan kurangnya antioksidan dalam mitokondria, akan menyebabkan terbukanya porus-porus yang terdapat pada membran mitokondria, sehingga matriks mitokondria berhubungan langsung dengan sitoplasma (Widodo, 2003). Terbukanya porus ini akan menyebabkan isi matrik mitokondria seperti ion kalsium, substrat metabolik yang penting seperti NADH keluar dari mitokondria, sehingga sintesa ATP berhenti (Halliwell and Gutteridge, 1999). Akibatnya keseimbangan osmotik terganggu dan mitokondria membengkak sehingga mitokondria rusak dan mengakibatkan kematian sel seperti nekrosis dan apoptosis (Widodo, 2003).

2.5.2. Kerusakan Oksidatif

Kerusakan jaringan tubuh yang timbul akibat stres oksidatif dinamakan kerusakan oksidatif. ROS dapat menyerang seluruh tipe biomolekul, tetapi terutama adalah asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, DNA yang merupakan perangkat genetik sel serta protein yang memegang peranan penting seperti enzim, reseptor, anti bodi pembentuk matriks serta sitoskeleton (Suryohudoyo, 2004).

2.5.2.1. Kerusakan oksidatif pada membran sel

Membran yang menyelubungi sel merupakan struktur elastik tipis dengan tebal 7,5 sampai 10 nanometer. Hampir seluruh membran sel terdiri dari protein dan lipid dengan perkiraan komposisi protein 55 persen, fosfolipid 25 persen, kolesterol 13 persen, lipid lain 4 persen dan karbohidrat 3 persen (Guyton and Hall, 1996).

2.5.2.1.1. Kerusakan oksidatif pada membran lipid

Komponen terpenting dari membran lipid adalah fosfolipid dan glikolipid. Kedua asam lemak ini mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rawan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil. Bila radikal hidroksil bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ini, maka akan terjadi reaksi berantai yang dikenal sebagai peroksidasi lipid (Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000).

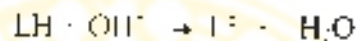
Peroksidasi lipid pada beberapa dekade yang lalu hanya dikenal dalam bidang kimia. Pengetahuan mengenai peroksidasi lipid di dalam biologis sebagai proses yang merusak sel pertama kali diperkenalkan oleh Tappel (1962), yang pada saat itu, implikasi biopatologi yang timbul terbatas pada kondisi defisiensi vitamin E. Saat ini telah dikenal dengan baik, bahwa peroksidasi lipid adalah satu reaksi sebagai akibat pembentukan radikal bebas didalam sel dan jaringan (Comporti, 1993).

Peroksidasi lipid terbentuk melalui proses inisiasi, propagasi dan terminasi (Comporti, 1993; Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999)

a. Inisiasi

Inisiasi merupakan langkah pertama dan serangkaian peroksidasi yang terjadi pada asam lemak tak jenuh (*poly unsaturated fatty acids - PUFA*). Reaksi ini

dihasilkan akibat serangan beberapa spesies pada *allylic hydrogen* pada atom karbon di antara ikatan rangkap dua. ROS yang dapat memisahkan atom hidrogen itu adalah hidroksil (OH^\bullet), radikal alkoksil (RO^\bullet), radikal peroksil (ROO^\bullet), tetapi tidak H_2O_2 ataupun O_2^- (Gutteridge, 1995). Akibat serangan ini, akan terjadi pemisahan atom H (H^\bullet) dari group metilen ($-\text{CH}_2-$). Oleh karena atom hidrogen hanya berisi satu elektron, pemisahan ini akan menghasilkan elektron yang tidak berpasangan pada karbon ($-\text{CH}_2^\bullet$) sehingga terbentuk *allylic radical*.

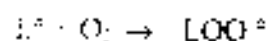


(lipid radical)

Karbon radikal biasanya distabilkan oleh penyusunan molekul untuk membentuk *conjugated dienes*. Karbon radikal yang terbentuk dapat mengalami berbagai-bagai reaksi seperti 2 di antara mereka akan saling bertabrakan di dalam membran, sehingga dapat menjadi inisiator pada proses ini. Kebanyakan dari karbon radikal (*carbon-centered radicals*) akan bereaksi dengan O_2 (Comporti, 1993; Halliwell, 1994; Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999).

b) Propagasi

Karbon radikal seperti lemak radikal dengan mudah bereaksi dengan oksigen untuk membentuk *oxygen-centered lipid peroxyl radicals (LOO[•])*.



(lipid peroxyl radicals)

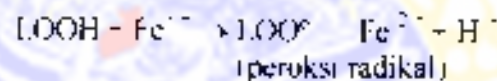
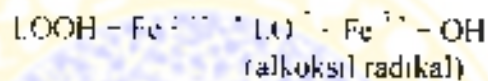
Lipid peroxyl radicals ini dapat memecah hidrogen dari PUFA yang berdekatan, sehingga membentuk lipid hidroperoksida ($-\text{LOOH}$) yang biasa disebut juga lipid peroksida.



(lipid peroksida)

Reaksi *lipid peroxy radicals* dengan PUFA akan menghasilkan *lipid radicals* yang baru, sehingga menambah jumlah radikal lipid pada reaksi rantai ini (Comporti, 1993; Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999).

Dekomposisi dari hidroperoksida dikatalisator oleh ion Fe dan logam transisi lainnya dengan menghasilkan alkoxil radikal dan peroksi radikal, sehingga meningkatkan propagasi. Akibatnya generasi yang kedua dari radikal bebas dapat menginisiasi pembentukan rantai baru dari lipid peroksida.



(Comporti, 1993; Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1995)

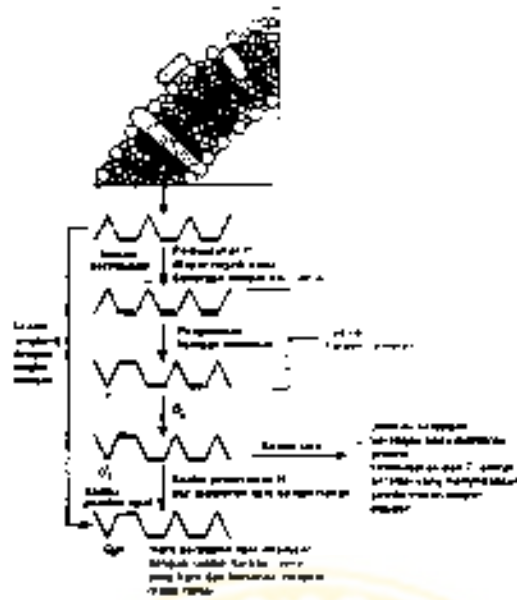
c. Terminasi

Reaksi rantai ini dapat berakhir bila terjadi penggabungan 2 lipid radikal untuk membentuk hasil asam lemak yang non radikal atau antara radikal dengan suatu senyawa pembasmi radikal.



(lipid non radikal)

(Comporti, 1993; Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1991)



Gambar 2.7 Representasi Reaksi inisiasi dan propagasi dari Peroksidasi lipid (Dikutip dari Halliwell and Gutteridge *Free radicals in Biology and Medicine*, 1999, 294)

Pemisahan H^o dari PUFA dapat terjadi pada titik yang berlainan dari rantai karbon, sehingga akan menghasilkan bermacam-macam produk. Contoh peroksidasi asam linoleat akan menghasilkan 2 hidroperoksida, asam linolenat akan menghasilkan 4 hidroperoksida, asam arakhidonat menghasilkan 6 hidroksi peroksida seperti siklik peroksida (Halliwell and Gutteridge, 1999)

2.5.2.1.2. Produksi Dekomposisi Peroksida

Dekomposisi lipid peroksida akibat panas yang terjadi pada temperatur tinggi atau oleh karena paparan ion Fe atau Cu akan menghasilkan sejumlah hasil yang berupa epoksi, *saturated aldehyda* (seperti hexanal), *unsaturated aldehyda*, keton (seperti butanon, pentanon, oktanon) dan hidrokarbon. Di samping itu ion logam juga

dapat melakukan dekomposisi pada temperatur fisiologis. Bila Fe bereaksi dengan hidroperoksida pada rantai karbon ke lima dari metilen asam lemak, maka akan terbentuk gas pentan. Ini terjadi pada asam linoleat dan asam arakidonat. Demikian juga etan dan etilen juga akan terbentuk pada reaksi yang sama dari asam linoleat (Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000)

Dekomposisi peroksidasi lipid ini dapat diukur dengan berbagai-bagai metode, seperti thio barbituric acid (TBA test) dan fluoresensi untuk malondialdehid acid, UV spektrofotometri untuk kojugasi dien, GC-MS, (*Gas chromatography-mass spectrophotometry*), HPLC (*High performance liquid chromatography*) untuk α_2 atau F_2 isoprostanes, antibodi techniques, GC-MS, HPLC untuk 4 hidroksinonal.

Dari pemeriksaan-pemeriksaan yang telah dilakukan terdapat hubungan yang bermakna antara peroksidasi lipid dan kerusakan fungsi membran (Comporti, 1993; Gutteridge, 1995).

a. Malondialdehid

Malondialdehid, kadang-kadang disebut juga malonaldehid, merupakan pusat perhatian peroksidasi lipid bertahun-tahun, karena mudah dideteksi dengan test TBA yang merupakan suatu pemeriksaan yang sederhana. MDA terbentuk dalam jumlah yang besar selama peroksidasi mikrosom sel hati dengan kehadiran garam Fe (Gutteridge, 1995)

MDA dihasilkan akibat peroksidasi PUFA yang mempunyai lebih dua ikatan rangkap seperti asam linoleat, asam arakhidonat dan asam dokosaheksanoid. MDA terdapat dalam bermacam-macam bentuk tergantung pada pH. Bila pH rendah reaktivitas akan meningkat (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Dalam kondisi fisiologis, MDA dengan mudah menyerang protein dibandingkan dengan asam amino bebas, sehingga akan menghasilkan bermacam-macam residu seperti lisin, ikatan rangkap intra dan intermolekul protein. Disamping itu MDA juga akan bereaksi dengan basa DNA yang dapat menimbulkan lesi mutagenik. Target yang paling disenangi adalah guanin. MDA dengan cepat dimetabolisme oleh jaringan mamalia dan merupakan inhibitor kompetitif dengan enzim dehidrogenase di mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 1999).

b. 4-Hidroksi-2-trans-nonanal (HNE) dan *unsaturated aldehyd*

HNE merupakan produk utama dari *unsaturated aldehyd*, disamping trans-4-hidroksi-2-hexanal (HHE). HNE menjadi pusat perhatian, karena merupakan produk akhir yang sangat toksik yang terbentuk pada hati selama metabolisme *pyrrolizidine alkaloid* seperti *senecionine* yang terdapat banyak pada tanaman dan dapat meracuni hati.

Selama peroksidasi lipid terbentuk HNE yang bersifat sangat toksik terhadap mitokondria. Beberapa penelitian telah mendapatkan sifat-sifat toksik HNE seperti inhibisi sintesa DNA, inhibisi bermacam-macam aktivitas enzim, peningkatan permeabilitas kapiler dan sanggup memodifikasi lipoprotein dan mempromosi aterosklerosis yang tergantung pada konsentrasi HNE (Siems et al., 1993; Halliwell and Gutteridge, 1999).

4-HNE telah terbukti sebagai mutagen, dimana sejumlah *salutet* 4-HNE guanin telah dapat dideteksi. Akhir-akhir ini telah dapat dibuktikan, dengan paparan p53 wt kepada *cell line lymphoblastoid human* akan menyebabkan peningkatan frekuensi mutasi transersi G-T pada basa ke tiga dari kodon 249

Penemuan ini meningkatkan kemungkinan bahwa 4-HNE menjadi etiologi yang penting pada kanker manusia yang mempunyai mutasi pada kodon 249 gen p53 (Hu et al., 2002)

c. Isoprostan

Isoprostan merupakan salah satu hasil toksik peroksidasi lipid. Isoprostan terbentuk dari peroksidasi asam arakhidonat yang berbentuk seperti senyawa prostaglandin. Karena strukturnya yang sama dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$, maka senyawa ini secara bersama-sama disebut dengan F_2 isoprostan.

F_2 isoprostan merupakan nilai yang sangat berguna pada peroksidasi lipid dan dapat diukur pada plasma darah manusia dan urin. Zat ini juga terdapat pada orang normal yang mengindikasikan bahwa peroksidasi lipid terjadi terus menerus pada orang sehat. Sebagian besar dari isoprostan terdapat dalam bentuk ester fosfolipid, walaupun ada juga yang berbentuk bebas (Marangon et al., 1998).

Salah satu bentuk isoprostan yaitu 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ merupakan vasokonstriktor yang kuat pada ginjal yang akan menyebabkan pengurangan aliran darah ke ginjal dan pengurangan filtrasi glomerulus. 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ juga akan meningkatkan respon platelet terhadap zat yang bersifat promotor penumpukan platelet. Isoprostan dimetabolisme dengan cepat oleh tubuh dan diekskresikan melalui urin. Peningkatan konsentrasi F_2 - isoprostan akan menyebabkan kegagalan ginjal dan kerusakan hati yang hebat yang dikenal dengan sindrom hepato-renal. Ekskresi isoprostan yang meningkat juga ditemukan pada penderita skleroderma (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.2.1.3. Kerusakan membran protein

Akibat peroksidasi lipid akan terjadi kerusakan struktur membran protein dan fungsinya. Selama peroksidasi lipid, 2 asam lemak yang berdekatan akan bergabung dengan cara ikatan abnormal. Hal ini akan menyebabkan struktur enzim rusak, karena beberapa membran protein strukturnya berasal dari membran lipid yang berdekatan. Di samping itu produk dari radikal peroksi, aldehid (terutama HNE) dan produk yang lainnya yang terdapat di dalam membran dan lipoprotein yang terjadi selama peroksidasi lipid akan menimbulkan kerusakan yang berat pada membran protein. Radikal peroksi lipid dapat membelah atom hidrogen dari protein disampingnya juga akan menghasilkan ikatan silang (*cross-linking*) lipid-protein dan protein-protein. Aldehid seperti 4-hidroxy alkenal dapat berikatan dengan SH group dari protein. Aldehid dapat juga bereaksi dengan group amino dan asam amino, protein, fosfolipid dan asam nukleat (Comporti, 1993; Gutteridge and Halliwell, 1999).

Telah lama dibuktikan, bahwa peroksidasi yang terjadi pada membran sel hati dan eritrosit akan menyebabkan pembentukan sejumlah massa molekular protein di dalam membran. Akibatnya molekul reseptor di permukaan yang menyebabkan sel merespon hormon dan sitokin akan menjadi tidak aktif. Di samping itu beberapa enzim juga tidak aktif dan selama peroksidasi lipid juga akan terjadi kerusakan saluran K^+ (Gutteridge and Halliwell, 1999).

2.5.2.1.4. Kerusakan yang terjadi akibat peroksidasi lipid

Secara umum, peroksidasi lipid akan menyebabkan penurunan pengaliran cairan melalui membran. Hal ini akan memudahkan fosfolipid diantara dua

monolayer bertukar, sehingga meningkatkan kebocoran membran *bilayer* terhadap substansi yang secara normal tidak boleh melalui saluran tersebut (seperti ion Ca^{2+}). Kian sitang yang terjadi pada membran protein menyebabkan menurunnya mobilitas terhadap lateral dan rotasional dari membran ini, sehingga akan mengurangi fungsi membran. Produksi hidropersida dan karbonil pada regio hidrofosfolipid menyebabkan pembentukan pusat hidrofilik yang akan mempengaruhi fungsi membran. Ini akan meningkatkan permeabilitas membran, sehingga akan terjadi pembengkakan pasif mitokondria, pembentukan vesikula pada retikulum endoplasma, kebocoran enzim dan ko-enzim ke sel yang tersisa dan menimbulkan kerusakan yang lebih lanjut (Comporti, 1993; Takahashi and Niki, 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999).

Oksidasi yang berlanjut dari rantai samping asam lemak dan fragmentasi asam lemak ini akan menghasilkan aldehid dan hidrokarbon (seperti pentan), akan menyebabkan membran kehilangan integritas yang akan menyebabkan kematian sel. DNA mitokondria yang tidak dilapisi oleh histon dapat dengan mudah dimodifikasi oleh hasil-hasil produksi ini. Kerusakan yang terjadi pada retikulum endoplasmik kasar oleh peroksidasi juga akan mengurangi kesanggupan sel untuk mensintesis dan mengekspor protein (Bacon et al., 1992; Comporti, 1993; Halliwell and Gutteridge, 1999).

Di samping itu kerusakan sel yang disebabkan oleh ROS akan meningkatkan inisiasi sinyal pada jalur kematian sel yang terprogram, sehingga menimbulkan apoptosis. Ini dapat dilihat pada *cell line pro Bcl-1*, yang dipapari AAPH. AAPH akan menyebabkan stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan membran. Kerusakan komponen sel akan memicu sinyal apoptotik baik secara langsung

ataupun tidak langsung dengan memproduksi mediator seperti derivat hidroperoksida ataupun aldehid (Takahashi and Niki, 1998)

2.5.2.2. Kerusakan Oksidatif Protein

Kerusakan oksidatif protein telah diselidiki bertahun-tahun silam, dimana pemaparan hiperbarik oksigen terhadap *Escherichia coli* akan menyebabkan inaktivasi enzim yang spesifik. Pemaparan (0; 100 %) terhadap hepatosi tikus putih akan menyebabkan oksidasi protein dan kehilangan sintesa glutamin dan aktivitas glukose-6 fosfatase dehidrogenase, sedangkan tikus putih yang dipapari hiperbarik oksigen di dalam otaknya akan ditemukan lebih banyak kerusakan protein dan pada peroksidasi lipid (Halliwell and Gutteridge, 1999)

Kerusakan oksidatif protein bukan saja merusak fungsi protein seperti, kerusakan reseptor, enzim, jalur transduksi sinyal, transpor protein dan enzim yang memerlukan konsentrasi ion Ca bebas yang rendah intraseluler, tetapi kerusakan oksidatif juga berkontribusi terhadap kerusakan biomolekul. Hal ini telah dibuktikan dimana oksidan akan mengaktifkan fosfolipase A₂ (Recknagel and Glende, 1992) dan fosfolipase C (Natarayan et al., 1998), menghambat aktivasi reseptor EGF (Hugo, 1998) dan menurunkan bradikinin yang menstimulasi produksi PGI₂ (*prostacyclin*) (Stow et al., 1998)

Protein yang teroksidasi dikenal sebagai benda asing oleh sistem imun, sehingga menjadi pencetus pembentukan antibodi dan kemungkinan menimbulkan reaksi auto-imun seperti pada penyakit *rheumatoid arthritis* dan skleroderma. Kerusakan terhadap enzim perbakar: DNAendonuklease, ligase) dapat meningkatkan kerusakan oksidatif DNA dan meningkatkan frekwensi mutasi.

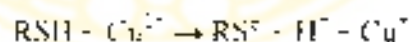
Kerusakan enzim polimerase DNA menyebabkan pengurangan replikasi DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Kerusakan oksidatif protein dapat terjadi karena serangan langsung ROS / RNS ataupun akibat produk akhir peroksidasi lipid seperti MDA dan HNE sehingga menimbulkan apa yang disebut AGE (*advanced glycoxylated endproducts*) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Wijaya, 1996). Berbagai-bagai hasil degradasi MDA akan merubah protein yang dapat ditemukan pada urine mamalia dalam bentuk N-(2 - propenal - lysine N^ε - acetyl-N^ε-2 propenal - lysine, N-(2 - propenal) serine dan N-(2 - propenal) etholamine. Beberapa HNE merubah protein yang dapat menghambat fungsi multikatalitik protease (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.2.2.1. Kerusakan oksidatif pada residu asam amino yang spesifik

1. Sistein dan metionin

Diantara asam amino yang paling peka terhadap serangan ROS / RNS adalah sistein, karena sistein mengandung gugusan sulfhidril yang sangat peka terhadap ROS / RNS ataupun bereaksi langsung dengan ion logam transisi, sehingga membentuk *thiyl radicals*.



Akibat dari reaksi ini akan terbentuk disulfida (-S-S-) dan terjadi ikatan silang di dalam atau antar rantai, atau produk oksidasi yang lebih lanjut seperti sulfonat.

Metionin dapat segera dioksidasi oleh OH[•], H₂O₂, HOCL, kloramin dan ONOO⁻ dengan menghasilkan produk pertama metionin sulfoksida yang dapat berlanjut mengalami oksidasi membentuk sulfon. Residu metionin penting untuk aktivitas protein seperti keratin α₁-antiproteinase (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2. Histidin

Oksidasi residu histidin kelihatannya penting di dalam reaksi silang ikatan protein. Oksidasi ini membentuk 2-oxohistidin dan produk-produk lainnya.

3. Prolin dan Arginin

Radikal bebas yang menyerang residu prolin dan arginin di dalam protein akan membentuk glutamat semi aldehyd.

4. Triptotan

Residu triptotan di dalam protein sensitif terhadap OH^\bullet dan radikal oksigen lainnya dengan menghasilkan radikal peroksid, peroksida dan N-formyl-kynurenine.

5. Tirosin

Residu tirosin di dalam protein yang diserang RNS dan HOCL akan mengalami nitrasasi dan klorinasi, sedangkan radikal OH^\bullet dapat menghidroksilasi tirosin menjadi dihydroxy phenilamine (DOPA). Di antara akibat yang ditimbulkan radikal tyrosin adalah ikatan rangkap yang akan membentuk biotirosin. Nitrasasi, klorinasi ataupun ikatan rangkap residu tyrosin akan menghambat transduksi sinyal fosforilasi tirosin (Hallweil and Guneridge, 1999).

Fosforilasi tirosin berhubungan dengan mitogenesis, transformasi dan kematian sel (Hugo et al., 1998).

6. Fenilalanin

Serangan radikal OH^\bullet terhadap fenilalanin menghasilkan bermacam-macam intermediet radikal yang berubah menjadi ortho, para dan meta fenilalanin. Serangan RNS terhadap fenilalanin akan menghasilkan nitrofenilalanin.

- Valin

Bila OH^\bullet menyerang protein akan segera terbentuk hidroperoksida valin. Telah dikenal 3 bentuk hidroperoksida valin yaitu *H-hydroperoxy valine* (ϵ -S₁-S₂)- γ -hydroperoxyvaline dan ϵ -S₁-R₁- γ -hydrovaline (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.2.2.2. Gangguan yang timbul akibat kerusakan oksidatif protein

Kerusakan oksidatif protein tidak saja mengganggu fungsi enzim, tetapi juga akan mengganggu fungsi reseptor (seperti β adreno reseptor dan α_1 -adrenergik reseptor) dan transportasi oleh protein. Kerusakan dapat terjadi pada protein yang terlibat didalam mempertahankan keseimbangan ion intraseluler, seperti Ca^{2+} -ATPase dan sistem keseimbangan pertukaran Ca^{2+} dan Na^+ yang menjaga Ca^{2+} intraseluler tetap rendah dan ekstra seluler. Sistem Na^+ , K^+ -ATPase didalam membran plasma menjaga konsentrasi K^+ intra seluler tinggi dan Na^+ intra seluler lebih rendah bila dibandingkan dengan ekstraseluler. Ca^{2+} -ATPase, Na^+ dan K^+ -ATPase mengandung gugusan sulfhidril (SH) (Halliwell and Gutteridge, 1999), dimana gugusan SH penting untuk fungsi berbagai macam protein (Bast et al., 1999). Tetapi justru gugusan ini sangat rawan terhadap serangan radikal bebas seperti OH^\bullet (Suryohudoyo, 2000).

Kerusakan gugusan SH akan menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel, sehingga ion Ca^{2+} akan meningkat di dalam sel. Di samping itu, reseptor hormon yang menjaga keseimbangan ion Ca^{2+} intraseluler juga mengandung gugusan SH dan akan mengalami gangguan (Bast et al., 1991). Gangguan permeabilitas ini juga disebabkan oleh peroksidasi lipid (Pohl et al., 1992). ROS, RNS dan HNE juga akan

menverang saluran K^+ . Gangguan keseimbangan ion intra seluler akan menyebabkan perubahan volume di dalam sel yang akan mempengaruhi segala aspek fungsi sel. Dengan menambahkan substrat monokuminoksidase yang menghasilkan H_2O_2 pada perfusi hati tikus putih akan menyebabkan pelepasan ion K^+ (karena terbukanya saluran ion K yang abnormal), menyebabkan sel hati mengkerut (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.3. Kerusakan Oksidatif DNA

ROS dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada DNA baik secara langsung atau tidak langsung.

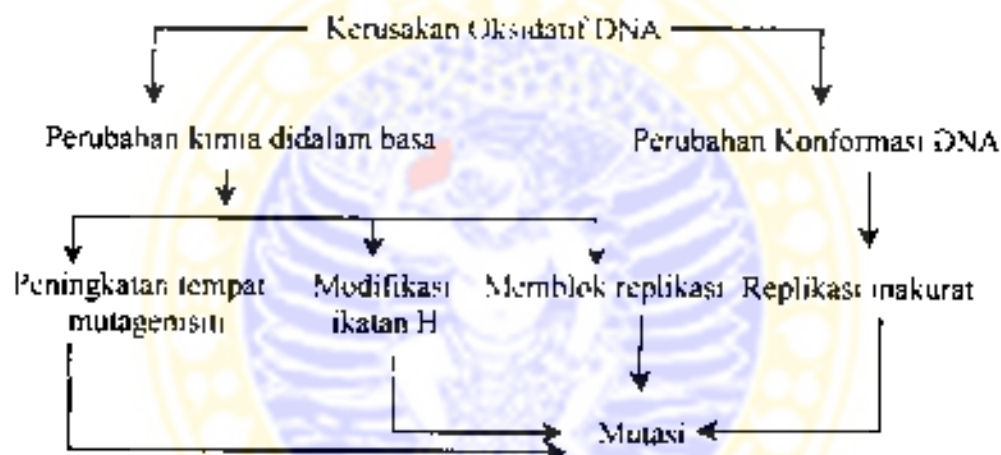
2.5.3.1. Kerusakan Oksidatif DNA secara langsung oleh senyawa oksigen reaktif

Pemaparan sinar pengion kepada organisme telah diketahui menimbulkan kanker dikemudian hari. Radiasi menimbulkan karsinogenesis baik sebagai inislator ataupun promotor, sehingga akan menyebabkan aktivasi dari onkogen ataupun inaktivasi gen penekan tumor seperti p53. Beberapa kerusakan gen karena radiasi muncul oleh karena terjadi absorpsi energi langsung oleh DNA, tetapi sebagian lagi melalui ionisasi air dan pembentukan radikal hidroksil yang tinggi (Halliwell and Gutteridge, 1999).

DNA merupakan suatu molekul yang stabil, tetapi dapat mengalami dekomposisi kimia secara spontan sepanjang hidup. Kehilangan purin dapat muncul 10^7 kali perhari didalam genom manusia. Sitosin dapat kehilangan secara pelan-pelan grup aminonya (deaminasi) menjadi bentuk urasil, sedangkan 5-metil sitosin di dalam DNA dapat mengalami deaminasi menjadi timin (Alberts et al., 1989).

Kerusakan DNA secara kimia oleh beberapa senyawa oksigen reaktif (ROS) telah banyak diperlihatkan pada penelitian secara *in vitro*. Kerusakan oksidatif DNA menghasilkan putusny rantai, kerusakan pada deoksiribosa dan modifikasi basa purin dan pirimidin (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Kerusakan satu rantai DNA biasanya mudah diperbaiki, tetapi kerusakan kedua rantai akan menimbulkan problem yang serius. Rantai DNA yang putus yang disebabkan oleh stres oksidatif ini dapat dideteksi dengan bermacam-macam teknik penentuan DNA. Putusnya rantai DNA akan menimbulkan perubahan konfigurasi DNA (Suryohudoyo, 2000).

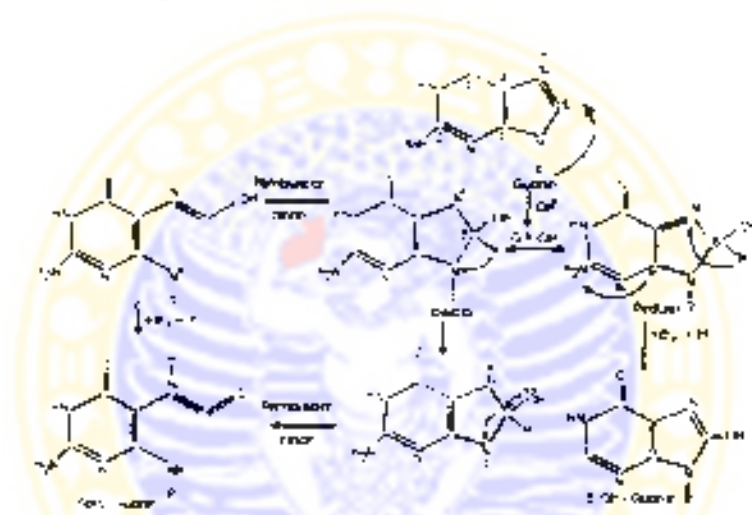


Gambar 2.8 Perubahan struktur DNA akibat kerusakan oksidatif (Dikutip dari Halliwell and Gutteridge, *Free radical in Biology and Medicine*, 1999:697)

Pada keadaan fisiologis, superoksida, H_2O_2 ataupun NO tidak menimbulkan reaksi terhadap basa DNA atau basa RNA maupun gula. Tetapi reaksi yang tinggi dari H_2O_2 ataupun pemaparan DNA dengan OH^\bullet akan menyerang gula, purin dan pirimidin. Contoh akibat serangan ROH^\bullet , OH^\bullet akan terikat pada posisi 4, 5, 8 guanin pada cincin purin. Akibatnya pada C8 akan dihasilkan C-8 OH adduct yang radikal yang dapat membentuk 8-hidroksil guanin atau pembukaan cincin imidazol

yang biasanya diikuti oleh pengurangan satu elektron atau protonasi untuk membentuk 2-6 deamino-4 hidroksi -5 formamid pirimidin yang biasanya disingkat dengan Fapy-G (Boiteux, 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999)

OH^\bullet juga dapat terikat pada C4, C5 atau C8 dari adenin. Pirimidin juga bisa diserang oleh OH^\bullet dengan menghasilkan bermacam-macam produk. Timin dapat mengalami pemindahan hidrogen dari cincin ataupun group metil. Akibatnya terbentuk bermacam-macam produk yang dapat menjadi *cis* dan *trans* timin glikol (Halliwell and Gutteridge, 1999)



Gambar 2.9 Modifikasi guanin oleh radikal hidroksil.

(Dikutip dari Halliwell and Gutteridge, *Free Radical in Biology and Medicine*, 1999:270)

Radikal hidroksil juga akan memecah gula dan menghasilkan bermacam-macam produk. Radikal hidroksil dapat mengenai seluruh posisi gula dengan formasi karbon dimana di tengahnya bersifat radikal sebagai akibat pemindahan hidrogen oleh OH^\bullet .

Beberapa lesi gula akan menyebabkan putusnya rantai DNA. Contohnya irradiasi 2-deoksi-D ribose pada *Salmonella typhimurium* akan menghasilkan karbonil dan diskarbonil yang bersifat mutagen (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2 deoksi - D ribose seperti karbohidrat lainnya mempunyai ikatan lemah dengan Fe yang mudah diserang oleh OH^\cdot yang dihasilkan pada reaksi Fenton. Pelepasan MDA oleh 2 deoksi-D ribose merupakan bahan untuk mentest keberadaan OH^\cdot (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.3.2. Kerusakan DNA secara tidak langsung oleh senyawa oksigen reaktif

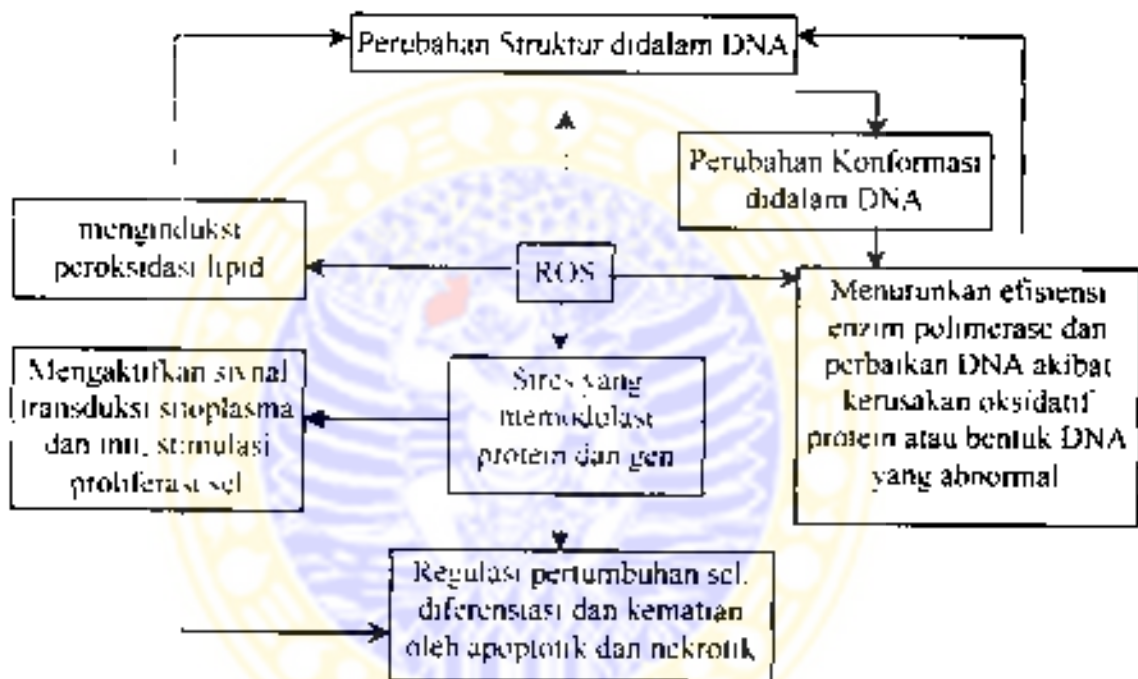
Kerusakan oksidatif pada lipid dan protein dapat juga menimbulkan efek mutagenik. Radikal hidroksil akan menimbulkan reaksi rantai pada membran protein yang terdiri dari lipoprotein. Hasil akhir dari reaksi rantai ini akan menyebabkan terputusnya rantai asam lemak yang menghasilkan senyawa aldehid seperti malondialdehid (MDA) (Shen, 1994, Suryahudoyo, 2000). MDA yang terbentuk mudah menyerang protein. MDA juga akan bereaksi dengan basa DNA. Guanin adalah sasaran yang disenangi dengan membentuk *adduct* pada gugusan karbon DNA hati manusia. Telah diketahui bahwa terdapat 9 *adduct* per 10^7 basa. Adenin juga bisa diserang oleh MDA. *Adduct* MDA-DNA berkontribusi terhadap mutagenesis, walaupun secara *in vivo* mekanisme belum jelas benar. (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Bila terjadi induksi ringan stres oksidatif, maka akan terjadi stimulasi proliferasi sel. Hal ini diperlihatkan oleh peneliti yang memaparkan H_2O_2 pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*, maka akan terjadi peningkatan sintesis protein dan sel akan menjadi resisten terhadap kadar yang tinggi dari H_2O_2 .

tetapi induksi dengan kadar yang tinggi dari H_2O_2 akan menurunkan sintesis protein.

(Wang et al., 1992; Dwivedi et al., 1993)

ROS dapat meningkatkan jaringan fosforilasi protein (sering dengan penurunan aktivitas protein fosfat) dan membantu peningkatan proliferasi. Aktivitas ini diikuti oleh pemanjangan sintese dan transkripsi dari sub famili gen efektor seperti c-fos dan c-myc. Pengaktifan sirkulasi ekspresi gen ini dapat meningkatkan promosi tumor secara progresif (Cerutti, 1994)



Gambar 2.10 Beberapa mekanisme ROS yang dapat memfasilitasi pertumbuhan kanker

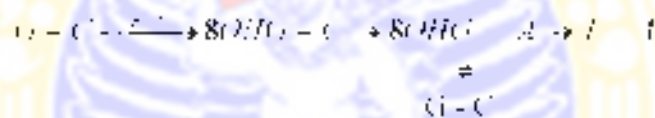
(Dikutip dari Halliwell and Gutteridge, *Free radicals in Biology and Medicine*, 1999:697)

Jalan lain yang ditempuh oleh ROS dalam menimbulkan tumor adalah dengan cara merusak komunikasi sel. Pada tumor biasanya terjadi penurunan

kommunikasi sel melalui *gap-junctions*. Keadaan inilah yang diduga menyebabkan proliferasi sel yang berlebihan (van Asbeck et al., 1998).

2.5.3.3. Kerusakan yang terjadi akibat kerusakan Oksidatif DNA

Akibat kerusakan DNA oleh ROS maka akan terjadi pemutusan rantai DNA dan modifikasi basa. Pemutusan rantai DNA akan mengaktifkan enzim PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) yang diduga menyebabkan kematian sel. Modifikasi basa didalam DNA akan menyebabkan mutasi, baik secara langsung atau selama usaha sel untuk replikasi atau pada waktu perbaikan kerusakan DNA. Sebagai contoh OH^\bullet dapat terikat pada posisi 4, 5, 8 guanin pada cincin purin yang akan menghasilkan 8 hidroksi guanin yang akan menyebabkan mutasi transversi $\text{GC} \rightarrow \text{TA}$.



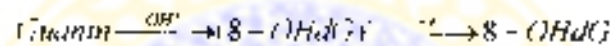
8 hidroksi guanin berpasangan salah dengan sitosin.

8 hidroksi adenin sedikit sekali kemungkinannya berpasangan dengan guanin, tetapi kebanyakan berpasangan dengan timin. Pembukaan cincin purin (FAPG, FAPyA) merupakan penghalang replikasi DNA. Beberapa hasil akhir dari lipid peroksida juga dapat berikatan dengan DNA yang akan menyebabkan mutasi (Halliwell and Gutteridge, 1999) yang akan sangat berbahaya bila mengenai gen-gen tertentu (Cerutti, 1994).

Kerusakan oksidatif DNA disebabkan oleh ROS dapat diukur. Putusnya rantai DNA merupakan satu parameter yang signifikan karena hal ini dapat merupakan aktivitas nuklease yang muncul selama perbaikan DNA, sehingga tidak adekuat untuk ukuran kerusakan DNA. Pecahnya deoksiribose pada kerusakan oksidatif akan menghasilkan bermacam-macam produk yang sukar dihitung. Salah

satu cara untuk mengetahui bahwa ROS memainkan peranan dalam pertumbuhan kanker dapat dilakukan dengan memeriksa perubahan basa di dalam onkogen atau gen penekan tumor untuk melihat apakah mereka adalah tipe yang timbul akibat stres oksidatif. Perhatian yang paling banyak terfokus pada saat ini adalah pengukuran 8-OHdG, karena produk ini bersifat mutagenik dan diproduksi di dalam DNA dengan jumlah yang cukup signifikan oleh bermacam-macam ROS seperti OH^\bullet , RO_2^\bullet , singlet oksigen

8-OHdG terikat ke deoksiribose yang terbentuk pada waktu serangan OH^\bullet terhadap DNA dengan diikuti oleh oksidasi 1 elektron akibat radikal bebas



Walaupun pengukuran kerusakan DNA dapat dilakukan dengan mengukur 8-OHdG, timin glikof, 5 hidroksi metil urasil, 8-hidroksi adenin dan 7-metil - 8 hidroksiguanozin, tetapi yang paling sering dilakukan adalah pengukuran 8-OHdG sebagai induksi kerusakan oksidatif DNA. 8-OHdG muncul bila sejumlah ROS menyerang DNA. Analisa 8-OHdG dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yang digabungkan dengan deteksi elektro-kimia, merupakan teknik yang paling sensitif dan paling sering digunakan. Sebagai contoh adalah transversi G → T pada kodon 249 yang sering terjadi pada gen p53 pada kanker hati primer di Asia dan Afrika. Transversi yang terjadi disebabkan oleh efek mutagenik akibat peningkatan level 8-OHdG (Shen et al., 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.4. Senyawa oksigen reaktif dan karsinogen

Pembentukan senyawa oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan akibat induksi yang terus menerus dan karsinogen dapat memicu terjadinya kanker dikemudian hari (Takashi and Niko, 1998). Pada tahun 1984 diperlihatkan oleh para peneliti bahwa pemaparan ROS pada fibroblast akan menimbulkan transformasi yang maligna. Menginkubasi plasmid yang membawa protoonkogen (k-ras) dengan ROS akan menyebabkan transfeksi ROS kedalam sel yang menimbulkan transformasi sel. Bersamaan dengan itu terdapat penggabungan 8-OH dG keposisi 1 dan 2 dan 12 dari k-ras yang akan menimbulkan transformasi sel. Beberapa organik peroksida seperti benzil peroksida bersifat promotor tumor pada kulit tikus putih, yang akan berubah menjadi radikal bebas sehubungan dengan efek promosi. Telah diketahui bahwa pengembangan kanker oleh ROS disebabkan oleh kerusakan DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999). Pengembangan kanker ini bukan saja disebabkan efek langsung dari DNA, tetapi juga dipengaruhi oleh transduksi sinyal, proliferasi sel, kematian sel, dan komunikasi intra seluler. (Hanahan and Weinberg, 2000).

Pertumbuhan sel kanker merupakan suatu proses transformasi dari sel normal menjadi suatu keadaan yang ganas yang diinduksi oleh suatu karsinogen yang berlangsung lama dan rumit sehingga akan terjadi multiplikasi sel yang tidak terkontrol dan progresif (Cavenee and White, 1995). Hal ini terjadi karena sel yang berubah melepaskan diri dari mekanisme pengaturan pertumbuhan normal. (Bostman, 1996; Pannal and Kotasek, 1997).

Transformasi sel normal menjadi sel kanker dapat diwujudkan oleh karena terdapatnya enam kerusakan yang esensial didalam sel normal yang secara bersama sama akan menimbulkan pertumbuhan yang malignan. Kerusakan yang terjadi di

dalam sel ini dapat berupa terdapatnya sinyal pertumbuhan dalam diri sel tersebut. sel tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan. sel menghindarkan diri dari program kematian sel (apoptosis). sel mempunyai kesanggupan bereplikasi yang tidak terbatas. perhentukan angiogenesis yang terus menerus dan sel mempunyai kesanggupan untuk invasi ke jaringan dan bermetastase. Perubahan fisiologis dari sel ini akan memicu pertumbuhan sel menjadi maligna (Hanahan and Weinberg, 2000).

Sebagai dasar dari transformasi sel ini adalah gangguan kelainan didalam genom dari sel yang mengalami transformasi. Ternyata dibutuhkan tidak hanya satu perubahan genom melainkan beberapa perubahan genom untuk melakukan transformasi suatu sel. Di samping itu perubahan transformasi sel juga dimodulasi oleh faktor-faktor hospes seperti faktor hormonal atau faktor imunologik (Bostman, 1996; Pharoah and Caldas, 1999; Hanahan and Weinberg, 2000)

2.6. Gen p53

p53 disebut juga *guardian of genome* merupakan suatu protein nuklear yang ditemukan pertama kali pada sel yang mengalami transformasi oleh *simian virus 40* (SV 40), terikat oleh antigen T yang besar yang dihasilkan oleh SV 40 onkogen. (Levine et al., 1991; Donchower et al., 1992; Kern, 1996). Karena itu Lane dan Crawford (1979) menyebutnya sebagai antigen tumor. Kemudian sejumlah p53 didapatkan pada berbagai tumor yang berasal dari *cell lines* yang mengalami transformasi pada kultur percobaan. Dari sejumlah penelitian didapatkan bahwa *complementary DNA* dan p53 yang disolasi dapat memajukan sel di dalam kultur dan bekerja sama dengan ras onkogen membentuk transformasi primer sel fibroblas embrio tikus putih pada kultur sel. Hal ini menyebabkan Oren dan Brienz

mengklasifikasikan p53 sebagai onkogen. Dengan mengeluarkan seluruh cDNA p53 yang mengalami transformasi, ternyata yang ditemukan adalah bentuk p53 mutant dimana p53 mengalami mutasi dan menimbulkan perubahan pada protein produk (Levine et al., 1991; Hollywood et al., 1995).

Pada tahun 1991, Levine et al. meneliti bentuk p53 yang tidak mengalami mutasi yang disebut *wild type* (wt) p53, dimana wt p53 dapat menghambat pertumbuhan sel dan mensupresi sel yang mengalami transformasi di dalam kultur oleh onkogen lain. Dengan ini, maka p53 sekarang diklasifikasikan sebagai gen penekan tumor yang berfungsi sebagai pengatur pertumbuhan sel secara negatif (Levin, 1992).

Gen p53 adalah gen supresor tumor dengan berat molekul 53 kilodalton. Gen ini berlokasi pada lengan pendek kromosom 17 *band* 13 (kromosom 17 p13) dan berisi 11 exon dan terdiri dari 393 asam amino (Oliner, 1994; Levine, 1995). Gen p53 mempunyai 3 daerah fungsi yang berbeda yaitu :

1. *Transcriptional activation domain (transactivation domain).*

Yaitu daerah paling ujung. Domain ini pada N terminal mempunyai urutan asam amino 1-75, dan bermuatan sangat asam serta berperan pada aktivasi transkripsi.

2. *DNA binding domain (central core domain).*

Yaitu suatu daerah tengah berfungsi mengenal dan mengikat materi DNA lain. Domain ini mempunyai urutan asam amino 102-292. Yang menarik, sebagian besar mutasi terjadi pada domain ini.

3. *Oligomerisation Domain.*

Yaitu daerah ujung karboksi yang mempunyai urutan asam amino 323-393. Daerah ini terdiri atas bentuk tetramer dan non spesifik DNA binding domain. Domain ini merupakan bentuk yang aktif (van Oijen and Slootweg, 2000).

Gen p53 menghasilkan protein p53 yang juga dikenal sebagai TP53 (tumor protein 53). Protein p53 yang tidak bermutasi (*wild type*) mempunyai waktu paruh 20 menit, dan berlokasi di nukleus (Cotran et al., 1999), sedangkan p53 yang telah mengalami mutasi (*mutant*) mempunyai waktu yang lebih panjang yaitu beberapa jam, sehingga kadarnya lebih tinggi (Levine et al., 1991; Donehower, 1992; Levine, 1992; Velculescu, 1996; Bates, 1996; Cotran et al., 1999). Waktu paruh yang pendek dari p53 (*wt*) mungkin disebabkan oleh proteolisis yang dimediasi oleh ubiquitin (Cotran et al., 1999).

Berlainan dengan gen RB yang bertindak sebagai polisi sel, maka p53 bertindak sebagai rem darurat. Misalnya bila DNA rusak akibat radiasi, sinar UV atau karsinogen kimia, terjadi perubahan secara dramatis pada p53 yang sedang inaktif di nukleus. Melalui mekanisme yang belum jelas, terdapat peningkatan kadar p53 dan pengaktifan p53 sebagai faktor transkripsi. Akumulasi p53 akan terikat pada DNA yang akan menstimulasi transkripsi dan beberapa gen yang dimediasi dua efek dari p53 yaitu penghentian siklus sel dan apoptosis (Levine et al., 1991, Donehower et al., 1992, Bates, 1996, Cotran et al., 1999).

Protein p53 mempunyai fungsi mengaktifkan transkripsi sejumlah gen yang mengandung *situs p53 binding spesifik*, menghentikan pertumbuhan sel dalam kondisi yang tidak optimal, mendorong sel untuk melakukan apoptosis dan stabilitas genom (Hansen and Oren, 1997, Cotran et al., 1999). Penelitian akhir-akhir ini juga

menunjukkan bahwa p53 dapat secara langsung mengenal kerusakan DNA dan memperbaiki DNA yang rusak (Soussi et al., 2000).

2.6.1. Peranan p53 dalam aktivasi transkripsi

Pada keadaan sel tidak tersimulasi oleh keadaan yang menyebabkan kerusakan DNA, translasi mRNA p53 ditekan pada regio 3'. Pada keadaan dimana terjadi kerusakan DNA, penekanan translasi ini dilepas, sehingga terjadi aktivasi p53. Lebih dari 30 karboksil terminal asam amino p53 dibutuhkan untuk mengubah bentuk jalen menjadi aktif. Seluruh panjang p53 dapat diaktifkan secara serentak dengan cara fosforilasi di dalam daerah oleh casein kinase II (CK II) atau protein kinase C (PKC). Yang penting, domain karboksil terminal p53 dapat mengenal tipe tertentu dari kerusakan DNA (Hansen and Oren, 1997).

Protein p53 difosforilasi oleh sejumlah protein kinase. Gen-gen spesifik p53 *Armadillo* tidak saja diaktifkan oleh CK II dan PKC, tetapi juga oleh CDK pada fase G1 dan G2. M siklus pertumbuhan sel. Menariknya, fosforilasi oleh CDK ini juga mempengaruhi tempat-tempat pengikatan yang selektif pada DNA oleh p53 dan karena itu dapat memodulasi aktivasi target gen oleh p53. Di dalam respon terhadap kerusakan DNA, c-Abl tirosinkinase mengikat p53 dan meningkatkan kapasitas aktivasi transkripsinya (Hansen and Oren, 1997).

Bila terjadi perubahan material genetik akan terjadi sinyal kepada p53 di nukleus untuk mengaktifkan p53 sebagai faktor transkripsi. Aktivasi dari p53 wt akan menstimulasi gen-gen *down stream* seperti p21, MDM-2, GADD 45, bax, IGF-3P, dan siklin G untuk memperbaiki DNA yang rusak atau memberi sinyal molekuler yang menegaskan telah terjadi kerusakan DNA dan meneruskan pada

program apoptosis (Oliner, 1993, Apolinario et al., 1993, Attardi and Lowe, 1996; Hansen and Oren, 1997, Cotran et al., 1999).

p21 disebut juga *wild type 53 activated fragment 1 (WAF1 1)* atau *CDK-Interacting protein 1 (CIP 1)*. Aktivasi protein p21 secara langsung diatur oleh p53. Bila terjadi kerusakan DNA, maka p53 akan mengaktifasi transkripsi p21 sehingga menghambat kompleks *cyclin dependent kinase*. Akibatnya tidak terjadi fosforilasi protein Rb, sehingga kompleks Rb-E2F tetap stabil. Dengan demikian sel tidak akan masuk ke dalam fase S. Ekspresi p21 menyebabkan sel diperbaiki dan menurunkan kemungkinan mutasi selama replikasi DNA. Bila kerusakan DNA telah diperbaiki, aktivitas p53 turun dan p21 tidak lagi menghambat kompleks *cyclin dependent kinase*, sehingga fosforilasi Rb terjadi dan memberikan sinyal sel masuk ke fase S (Bates and Vousden, 1996; Apolinario et al., 1997; Hansen and Oren, 1997, Cotran et al., 1999; Lee et al., 2001).

Target transkripsi yang lain GADD-45 yaitu protein yang mempengaruhi perbaikan DNA. GADD-45 juga membantu perlambatan G1 dengan mekanisme yang belum jelas (Cotran et al., 1999). Bila kerusakan DNA diperbaiki dengan baik, p53 akan mengaktifkan gen yang disebut MDM2, yang sekresinya mengatur regulasi p53 dengan cara mengikat p53 sehingga menjadi bentuk inaktif. Dengan demikian pertumbuhan sel berlangsung kembali (Oliner, 1993; Cotran et al., 1999).

Bila selama beristirahat di dalam pembelahan sel, kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki dengan baik, p53 wt dalam usahanya yang terahur akan mengaktifasi gen-gen yang menginduksi apoptosis (Soussi et al., 2000). Bax dan IGF-BP3 adalah dua gen yang bertanggung jawab yang menyebabkan apoptosis atas komando p53 (Cotran et al., 1999). Bax akan melekat ke bcl-2, protein yang mencegah apoptosis.

IGF-1R3 melekat ke reseptor IGF dan menginduksi apoptosis dengan memblokir sinyal mitogenik dan kelangsungan hidup. (Hansen and Oren, 1997).

2.6.2. Peranan gen p53 di dalam regulasi siklus sel

p53 normal berfungsi mengatur regulasi siklus sel. Selama fase G₁, p53 terkumpul di dalam sitoplasma dan berpindah ke nukleus selama permulaan fase S. Ada 2 hipotesis untuk menerangkan mekanisme aksi p53 di dalam regulasi sel. Yang pertama menyatakan bahwa p53 mengatur inisiasi dan replikasi DNA. Ini dapat dilihat pada p53 murin *wild type* yang menghambat interaksi α polimerase DNA dengan antigen T besar SV 40, sehingga replikasi DNA SV 40 terganggu. Kemungkinan yang kedua adalah p53 berlaku sebagai transaktivator dari transkripsi baik distimulasi oleh gen penghambat pertumbuhan atau represi oleh gen stimulator pertumbuhan. Penelitian pada jamur, gen p53 mempunyai aktivitas transaktivasi (Donehower et al., 1992).

Di dalam siklus sel terdapat paling sedikit dua stadium yang bertanggung jawab terhadap perbaikan kerusakan DNA yaitu transisi G₁-S dan G₂-M. Transisi ini berlaku sebagai *check point* yang bisa menyebabkan perlambatan perjalanan siklus sel yang bertujuan untuk perbaikan kerusakan sebelum sel masuk ke fase S. Bila kerusakan tetap ada pada fase M, maka akan menghasilkan perubahan material genom. *Check point* dianggap sebagai mekanisme pengawasan yang dapat mendeteksi kerusakan DNA, jalur transduksi sinyal yang meneruskan dan meningkatkan sinyal untuk replikasi dan kemungkinan aktivitas perbaikan. Baik *check point* G₁-S ataupun G₂-S diketahui di bawah kontrol genetik. (Hartwell, 1992).

Pada saat ini telah terbukti bahwa penghentian G_1 tergantung pada p53 melalui transaktivasi p21 yang secara langsung diatur oleh p53 dan berfungsi menekan *cyclin dependent kinase* dengan menstabilkan Rb - E2F kompleks sehingga tidak terjadi fosforilasi pRb. Akibatnya sel tidak dapat masuk ke dalam fase S. Ekspresi p21 menyebabkan sel diperbaiki dan menurunkan kemungkinan mutasi selama replikasi DNA. Bila kerusakan DNA telah diperbaiki, jumlah aktivitas p53 turun dan p21 tidak lagi menghambat kompleks *cyclin-cdk*, sehingga fosforilasi Rb terjadi lagi dan memberikan sinyal sel masuk ke fase S. (Harper et al., 1993; Miyashita and Read, 1995; Attardi and Lowe, 1996; Hansen and Oren, 1997; Cotran et al., 1999).

Penelitian eksperimental yang dilakukan peneliti, mendapatkan bahwa p53 wt dapat mensupresi atau menghambat sel yang mengalami transformasi didalam kultur baik yang disebabkan oleh virus maupun onkogen. Dengan melakukan pemaparan p53 wt atau cDNA ke sel yang mengalami transformasi di dalam kultur, terjadi penghambatan pertumbuhan sel pada fase G_1 , malahan p53 wt dapat mengurangi sifat tumorigenik *cell-lines* yang potensial di dalam kultur (Levin et al., 1991).

Di samping itu p53 juga akan mempengaruhi ekspresi GADD-45. GADD-45 merupakan suatu protein yang berfungsi mempengaruhi perbaikan DNA, sehingga kerusakan DNA dapat diperbaiki. GADD-45 juga membantu perlambatan G_1 dengan mekanisme yang tidak jelas (Harris and Hollstern, 1993; Attardi and Lowe, 1996; Oliner, 1994; Weinberg, 1996; Cotran et al., 1999).

Bila kerusakan DNA sudah diperbaiki dengan baik, p53 akan mengaktifkan mdm 2, dimana sekresinya mengatur regulasi p53 dengan cara mengikat p53, sehingga p53 menjadi bentuk inaktif. Dengan demikian pertumbuhan sel berlangsung

kembali. Jadi mdm 2 bersifat *feed back* negatif terhadap p53. Bila selama beristirahat di dalam pembelahan sel, kerusakan sel tidak dapat diperbaiki dengan baik, maka p53 akan merangsang gen-gen yang berfungsi menginduksi apoptosis. (Oliner, 1994; Harris and Hollstein, 1993; Weinberg, 1996). Kelihatannya p53 juga berperan di dalam stadium G2, tapi tidak merupakan komponen yang penting (Burns and El Dary, 1999).

Karena p53 terlibat didalam kontrol siklus sel, kemungkinan p53 sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan embrio. Walaupun p53 tampak banyak pada jaringan embrio tikus putih, tetapi kadar totalnya rendah. Ini disebabkan *half life* yang relatif pendek (Donehower et al, 1992). Embrio tikus putih yang mengalami defisiensi p53 menunjukkan perkembangan yang abnormal, terutama yang berhubungan dengan defek penutupan tabung neural. p53 dibutuhkan untuk menekan teratogenesis akibat radiasi atau kimia yang menyebabkan kerusakan DNA (Hansen and Oren, 1997).

Bila selama penghentian siklus sel pada stadium G1 kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, maka p53 akan mendorong sel untuk melakukan bunuh diri yang disebut apoptosis.

2.6.3. Apoptosis

Istilah apoptosis sering digunakan untuk kematian sel yang terprogram. Istilah ini pertama kali dikemukakan oleh Kerr (1972) yang dengan penamaan Yunani disebut juga *Falling off*. Di dalam pengertian yang sempit, apoptosis digunakan untuk bentuk kematian sel yang membutuhkan keberadaan gen tanpa memenuhi beberapa atau seluruhnya kriteria morfologi apoptosis.

Saat ini apoptosis dapat didefinisikan sebagai "Bentuk kematian sel yang dirancang untuk menghilangkan sel-sel yang tidak dikehendaki melalui aktivasi serangkaian kejadian yang terkoordinasi dan terprogram secara internal serta dikendalikan oleh gen" (Cotran et al., 1999; Renchan et al., 2001). Bagaimanapun apoptosis terlibat di dalam proses biologi normal sampai kepada berjenis-jenis penyakit yang pada saat ini merupakan bidang riset yang menarik.

Pemeriksaan histologis yang diwarnai dengan HE (hematoksin-eosin), apoptosis terjadi pada satu sel atau sejumlah kecil sel. Sel yang mengalami apoptosis terlihat sebagai masa yang bundar atau bulat dengan sitoplasma eosinofilik yang luas dengan kromatin nukleus yang padat. Karena sel mengkerut dan pembentukan *apoptotic bodies* terjadi dalam waktu yang cepat, fragmen ini dengan cepat akan difagositosis, dihancurkan atau dikeluarkan melalui lumen, menyebabkan sel apoptosis sulit dideteksi dengan cara histologi (Cohen, 1993; Cotran et al., 1999).

Metoda yang terbaik untuk mengidentifikasi apoptosis adalah dengan memeriksa fragmentasi DNA yang terjadi akibat perubahan ultra struktural morfologi sel yang mengalami apoptosis. Fragmen DNA ini terjadi karena aktivitas enzim endonuklease dan perubahan struktur kromatin (Parton, 2001)

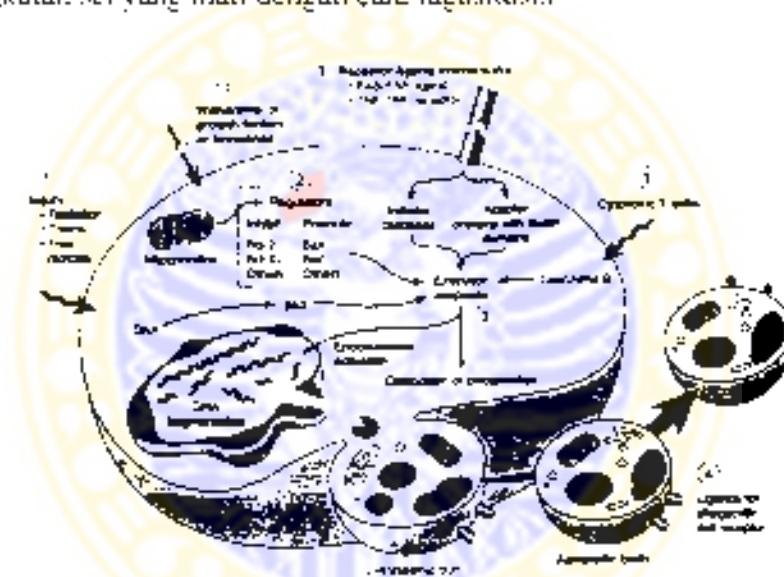
2.6.3.1. Mekanisme terjadinya apoptosis

Apoptosis adalah titik akhir dari *cellular dependent energy* dan kejadian-kejadian molekuler yang diinisiasi oleh rangsangan tertentu. Apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur utama yaitu :

- 1 Jalur ekstrinsik atau *death receptor (DR pathway)*
- 2 Jalur intrinsik atau jalur mitokondria

Mekanisme terjadinya apoptosis terdiri atas 4 komponen yang berbeda tetapi saling melengkapi. Komponen tersebut adalah

1. Sinyal yang menginisiasi apoptosis
2. Faktor-faktor yang memodulasi apoptosis yang terdiri atas molekul intraseluler baik yang meningkatkan, maupun mengurangi pengaturan inhibisi, stimulasi atau mencegah apoptosis
3. Fase eksekusi yang terdiri dari program kematian yang nyata dimana penyelesaian sebagian besar oleh caspase
4. Pengangkatan sel yang mati dengan cara fagositosis



Gambar 2.11. Skema Representasi dari kejadian apoptosis

1. Stimulus yang menyebabkan apoptosis
2. Regulasi dan kontrol yang dilakukan oleh Bcl-2
3. Eksekusi caspase
4. Pembentukan *apoptotic bodies* yang akan difagositosis oleh sel yang berdekatan atau sel fagosit

(Dikutip dari Cotran et al., *Pathologic basis of disease*, 1996: 221)

Sinyal / stimulus yang menginisiasi apoptosis

Sinyal yang menginisiasi apoptosis dikenal oleh membran sel dan akan ditransmisi melalui membran plasma menuju molekul-molekul yang berfungsi

mengatur dan mengontrol apoptosis yang terdapat didalam sel. Sinyal trans membran dapat bersifat positif atau negatif. (Mann and Cidlowski, 1999, Cotran et al., 1999, Renehan et al., 2001, Muljono, 2002)

Beberapa sinyal yang dapat menginisiasi apoptosis adalah

- a. Sinyal dari reseptor famili *tumor necrosis factor* (TNF). Yang termasuk golongan ini adalah protein-protein yang menginisiasi apoptosis, menginisiasi proliferasi sel dan menginisiasi kedua-duanya.

Protein-protein yang memicu apoptosis akan memicu apoptosis melalui dua jalur yaitu :

1. *Fas-fas ligand*

Jalur apoptosis ini terjadi karena reseptor permukaan mengekspresikan suatu protein permukaan yang disebut Fas, suatu *glycosylated cell-surface protein* dengan berat molekul 42-52 KDA. Fas akan diikat oleh Fas L (*Fas ligand*) yang diproduksi oleh sistem imun. Ikatan Fas-Fas L ini akan mengaktifkan FADD (*Fas-associated protein with a death domain*). Protein ini menggerakkan efektor kematian pada daerah yang merupakan inisiator *caspase* (*procaspase-8*). Sistem ini penting untuk mengeliminasi aktivasi limfosit akibat reaksi imun.

Reseptor TNF teraktivasi oleh sitokin TNF juga mengaktifkan protein TRADD (*TNF R-adaptor protein with a death domain*). Seperti *Fas-Fasligand*, TRADD akan terikat pada FADD dan menimbulkan apoptosis melalui aktivasi *caspase*.

2. Sebagian induksi yang berasal dari TNF- α juga memicu apoptosis dengan menstimulasi mitokondria.

b. Sinyal dari *cytotoxic T-lymphocyte* (CTL)

Sel T sitotoksik membunuh sel yang tak dikehendaki melalui dua jalur yaitu jalur *Fas-Fas ligand* dan jalur perforin atau granzim. Bila sel T sitotoksik mengenal antigen pada permukaan sel target, maka ia akan melepaskan granul yang berisi dua efektor protein yang bersifat sitotoksik, yaitu perforin dan protease yang dikenal sebagai granzim. Perforin dilepas melalui *exocytosis* pada titik kontak dan berpolimerasi di dalam membran target sel, menghasilkan suatu porus yang berbentuk silinder di dalam lipid dwilapis. Akibatnya akan terjadi aliran air dan garam yang tidak normal melalui porus ini yang akan menghancurkan integritas membran sel target.

Granzim, terutama granzim A dan B yang dihasilkan oleh granul akan mencapai sel target. Granzim B merupakan komponen sitotoksik yang sanggup memecah protein pada residu aspartat dan sanggup mengaktifkan sejumlah *caspase* seluler. Dengan cara ini sel sitotoksik membunuh sel target melalui jalur langsung dan menginduksi fase efektor dari apoptosis.

c. Sinyal akibat kehilangan faktor pertumbuhan atau hormon.

Kelangsungan hidup dari beberapa sel tergantung pada suplier sitotoksin atau faktor pertumbuhan. Bila faktor-faktor ini tidak ada, maka sel akan mengalami apoptosis.

d. Sinyal yang berasal dari kerusakan DNA.

Pemaparan sel dengan radiasi atau kemoterapi, toksin dan radikal bebas akan menginduksi apoptosis dengan mekanisme inisiasi kerusakan DNA. Jalur ini melibatkan p53 yang akan memicu apoptosis (Cotran et al., 1999; Mann and Cidlowseski, 1999; Russel, 1999).

Aktivasi apoptosis dapat terjadi intraseluler yaitu melalui jalur intrinsik. Pada jalur ini inisiasi apoptosis ditimbulkan oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler, seperti stres oksidatif, perubahan redoks, ikatan kovalen dan peroksidasi lipid. Bahan-bahan tersebut akan memberikan sinyal kepada mitokondria yang menyebabkan perubahan mitokondria yang dimulai dari terbukanya membran luar diikuti oleh pembengkakan matriks dan hilangnya potensial transmembran sehingga mitokondria kehilangan fungsi transport elektron. Akibatnya protein-protein mitokondria akan keluar seperti sitokrom C. Keluarnya sitokrom C dari mitokondria akan mengaktifkan *caspase 9* yang menggerakkan efek apoptosis (CMGS, 1998, Green and Red, 1998; Cotran et al., 1999; Mann and Cidlowski, 1999; Russel, 1999; Mulyono, 2003; Widodo, 2003).

Molekul-molekul intra seluler yang mengontrol dan mengintegrasikan apoptosis

Pengontrolan dan integrasi apoptosis dilakukan oleh protein spesifik yang berhubungan dengan sinyal kematian sampai program eksekusi. Aksi-aksi dari protein akan menghasilkan suatu keputusan apakah mereka akan memutuskan untuk mengelakkan kematian sel atau tidak mengelakkan kematian sel. Sinyal kematian yang diterima akan menyebabkan perubahan pada membran mitokondria yang ditentukan oleh protein membran mitokondria.

Golongan Bcl-2 memainkan peranan penting dalam memodulasi apoptosis. Bcl-2 pada mamalia homolog dengan gen anti apoptosis *ced-9* (*C. elegans death*) pada *Caenorhabditis elegans*, dan terdapat pada bagian luar membran mitokondria, retikulum endoplasma dan membran nukleus. Golongan Bcl-2 pada saat ini telah diketahui mempunyai 20 anggota yang masing-masing bersifat *pro apoptotic* atau gen yang menimbulkan apoptosis dan *anti apoptotic* atau gen yang mempertahankan

sel tetap hidup. Protein yang termasuk *pro-apoptotic* adalah Bax, Bak, Bad, Bit, Bik dan Bel-Xs, sedangkan Bel-2 dan Bel-xl, Mcl-1, Bcl-1, A1 dan Ced 9 termasuk gen yang *anti-apoptotic* (Cornelisse, 1998; Cotran et al., 1999; Renehan et al., 2001; Parton et al., 2001; Sjöström and Berg, 2001).

Bel-2 mensupresi apoptosis melalui dua cara yaitu bereaksi langsung pada mitokondria untuk mencegah peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga mencegah pelepasan sitokrom C (Muljono, 2003) dan berefek sebagai mediator akibat interaksi dengan protein lainnya. Golongan *pro-apoptotic* akan bertindak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria untuk menghasilkan sitokrom C. Permeabilitas mitokondria ditentukan oleh rasio anggota *pro-apoptotic* dan *anti-apoptotic* dan golongan Bel-2 yang terdapat didalam membran mitokondria.

Pada beberapa sel tertentu, Bel-2 mensupresi apoptosis dengan cara bekerja sebagai *docking protein*, yaitu mengikat protein dari sitosol dan mengasingkan mereka pada membran mitokondria. Protein yang tercatat berikatan dengan Bel-2 adalah Apaf-1 (*pro-apoptotic protease activating factor*). Apaf-1 homolog dengan ced-4 nematoda. Protein ini akan berhubungan dengan bentuk aktif zimogen dan merupakan inisiator *caspase*. Pelepasan sitokrom C oleh mitokondria akibat adanya sinyal kematian, akan menimbulkan hubungan antara zimogen dan Apaf-1 dan memicu inisiator *caspase*. Aksi *anti-apoptotic* Bel-2 diduga melalui dua skenario yaitu secara langsung mencegah sitokrom lepas dan menghambat Apaf-1 menginduksi *caspase* meskipun sitokrom terlepas (Cotran et al., 1999; Renehan et al., 2001; Parton et al., 2001; Sjöström and Berg, 2001).

Fase eksekusi

Fase ini merupakan jalan terakhir atau kaskade proteolitik dari apoptosis. Protein yang memicu dan memediasi fase eksekusi dilakukan oleh golongan *caspase*, suatu protein yang homolog dengan *ced-3* pada *C. elegans*. Huruf *c* menggambarkan sistem protease dan *caspase* menggambarkan kesanggupan yang unik untuk memecah residu asam aspartat. Golongan *caspase* pada saat ini telah mempunyai lebih dari 10 anggota yang secara fungsional dapat dibagi atas 2 group inisiator dan eksekutor (Cotran et al., 1999; Parton et al., 2001).

Caspase merupakan suatu enzim sistem protease yang terdapat di dalam suatu kantung di sitoplasma sel dalam keadaan inaktif. Mitokondria berpartisipasi di dalam aktivasi *caspase* dimana sinyal kematian akan mempengaruhi mitokondria melalui dua jalur yaitu :

1. Menyebabkan transmisi permeabilitas mitokondria, dimana terjadi pembentukan porus di dalam membran bagian dalam mitokondria, sehingga menyebabkan pengurangan potensi membran dan pembengkakan mitokondria
2. Menyebabkan peningkatan permeabilitas membran bagian luar mitokondria, sehingga akan melepaskan pencetus apoptosis seperti sitokrom C dari mitokondria ke sitosol. (Cotran et al., 1999; Renehan et al., 2001; Parton et al., 2001; Sjoström and Berg, 2001). Sitokrom C akan melekat pada APAF-1 yang menyebabkan oligomerisasi. Ini membuat APAF-1 mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan *caspase 9*. Sekali *caspase 9* teraktivasi ia akan memecah dan mengaktifkan efektor *caspase* (Bossy-Wessel and Green, 1999).

Eksekusi *caspase* akan mengganggu sitokleton dengan sasaran utama adalah protein yang berhubungan dengan transkripsi, replikasi dan perbaikan DNA. *Caspase*

3 terutama mengubah CAD (*cytochrome DNA se*) yang akan memecah internukleosomal DNA sehingga terjadi apoptosis (Cotran et al., 1999, Parton et al., 2001).

Pengangkatan sel yang mati

Sel yang mengalami apoptosis beserta fragmennya mempunyai petanda molekul pada permukaan yang dapat dikenal secara dini oleh sel yang berdekatan atau sel fagosit untuk difagosit atau dibuang. Prosesnya begitu efisien sehingga sel yang mati akan ditiadakan tanpa meninggalkan tanda dan proses inflamasi (Cotran et al., 1999).

2.6.4. Peranan gen p53 terhadap apoptosis

Peranan p53 di dalam mengaktifasi kaskade kaspase nampaknya melalui jalur *pro apoptotic* Bcl-2 dan mengaktifkan IGF-BP₃ (Cotran et al., 1999) serta melalui jalur DR (*Death Receptor*) (Faudion and Gores, 1999). p53 akan meningkatkan sintesa Bax. Perbandingan Bcl-2 dan Bax merupakan hal yang penting untuk kematian sel. Bila Bcl-2 berlebihan, seluruh kesanggupan Bax untuk mencetuskan apoptosis tidak terjadi. Bila Bax berlebihan, seluruh Bcl-2 akan diikat dan sel akan mengalami apoptosis. (Renehan et al., 2001). Bax akan meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menginduksi pelepasan sitokrom C (Parton, 2001). Bax juga memperlihatkan kemiripan dengan protein yang membentuk porus, sehingga diduga bahwa Bax dapat membentuk porus transmembran antara membran luar dan membran dalam mitokondria. Hal ini menyebabkan potensial mitokondria hilang, sehingga terjadi *efflux* sitokrom dan AIF (*apoptosis inducing factor*). Bcl-2 dan Bcl-xl mencegah terjadinya porus ini (Dash, 2001). p53 juga meningkatkan

sintesa protein IGF-1BP. IGF-1BP akan melekat ke reseptor IGF (*insulin like growth factor*) dan menginduksi apoptosis dengan memblok sinyal intra seluler yang dimediasi oleh IGF (Cotran et al., 1999)

Induksi apoptosis oleh p53 melalui jalur DR terjadi bila p53 meningkatkan konsentrasi DR5. Reseptor ini akan terikat pada *cytotoxic factor* yang disebut *trail* (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*). Bila trail berikatan dengan DR-5 ia akan mempromosikan aktivasi dan pemecahan *caspase 8* (CMGS, 1998).

Kesanggupan p53 mengontrol apoptosis di dalam merespon kerusakan DNA mempunyai implikasi didalam praktek terapeutik. Radiasi dan kemoterapi merupakan dua model utama pada pengobatan kanker yang menginduksi kerusakan DNA dan menyebabkan apoptosis. Ini mengindikasikan bahwa kanker yang mempunyai p53 tetap normal mempunyai respon yang baik terhadap terapi dibandingkan dengan tumor yang mengandung p53 mutan. (Cotran et al., 1999).

2.6.5. Peranan p53 dalam stabilitas genom

Fungsi primer p53 adalah pemeliharaan integritas genom. Walaupun fungsi ini dapat dicapai melalui penghentian pertumbuhan sel ataupun pembuangan sel yang mempunyai kerusakan genom, p53 sekarang juga kelihatannya memfasilitasi perbaikan DNA baik secara langsung atau melalui transaktivasi beberapa gen. Defisiensi p53 akan mengurangi efisiensi NER (*nucleotide excision repair*). Beberapa penelitian menunjukkan p53 mempunyai aktivitas *exonuclease 3'-5'*, yang memungkinkan rekombinasi DNA, replikasi dan perbaikan (Hansen and Oren, 1997).

Sebagai tambahan untuk mempertahankan integritas genom, p53 mencegah penyimpangan genom dalam skala tinggi. p53 juga berkontribusi pada integritas mitotik dengan cara memastikan bahwa duplikasi sentrosom hanya 1 kali per siklus. Lebih lanjut p53 berpartisipasi di dalam *check point* untuk meyakinkan bahwa replikasi DNA tidak terinisiasi kembali tanpa penyelesaian pemisahan kromosom yang tepat. Jadi, p53 mencegah lesi karsinogenik dan teratogenik dengan cara mengawasi replikasi dan pembelahan gen. (Hansen and Oren, 1997)

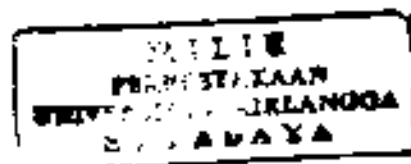
2.6.6. Mutasi gen p53 (p53 Mutant)

Bila karena sesuatu sebab, seperti faktor kimia, fisika dan biologik, p53 dapat kehilangan fungsinya sehingga tidak dapat mengontrol siklus pertumbuhan dan akan mengembangkan pertumbuhan kanker. Di dalam perkembangan kanker, p53 diduga mempunyai dua peran yaitu : satu kehilangan fungsi dari p53 yang akan menimbulkan mutasi, aberasi kromosom dan kerusakan gen yang mengakibatkan pertumbuhan tumor, kedua memainkan peranan penting dalam menyeleksi sel yang kehilangan fungsi gen p53 (Van Gijssel et al., 1997).

p53 mutant manusia dengan kerusakan 2 alel bila dipaparkan pada cell-lines atau tikus putih muda yang kekurangan p53 akan menimbulkan potensi tumorigenik di dalam agar sel kultur ataupun tikus putih tersebut. Penelitian yang lain, tikus putih *null* (yang kekurangan p53 wt) bila diinjeksi dengan 10^5 fibroblast sel nul yang telah ditransfeksi dengan p53 mutant akan mengembangkan pertumbuhan tumor. p53 *null*, leukemia sel T yang ditransfeksi dengan p53 mutant memperlihatkan kapasitas untuk bermetastase bila mereka diinjeksikan ke tikus putih yang menderita imunodefisiensi (Van Oijen and Slootweg, 2000).

Mutasi gen p53 terdapat pada bermacam-macam tumor primer dan merupakan lesi genetik yang paling sering terjadi pada tumor manusia yang spontan. Kanker yang disebabkan mutasi gen p53 dapat terjadi pada *germ line* (sel induk) dan somatik. Kanker yang terjadi pada sel induk dikenal sebagai sindroma Li-Fraumeni yaitu satu sindrom autosom yang jarang, ditandai oleh terdapatnya bermacam-macam neoplasma pada berbagai-bagai tempat didalam tubuh. Orang yang terkena sering diwarisi mutasi titik pada daerah yang penting pada gen p53. Dan sejumlah yang diperiksa, enam diantaranya yang diperiksa mempunyai mutasi gen p53 pada kodon 245-258 dan paling sedikit mempunyai 2 mutasi yang diwariskan pada kodon 248. Mutasi yang diwariskan berupa heterozigot dengan status sel yang tidak berubah menjadi sel kanker dan tidak mempengaruhi proses pertumbuhan dan fungsi normal dan p53. (Levin et al., 1991; Stratton, 1992; Harris and Hollstein, 1993; Vesculesce and El-Deiry, 1996)

Untuk mengetahui peranan p53 di dalam pembentukan tumor, digunakan tikus putih *chimeric* yang dilahirkan dengan alel p53 yang mengalami mutasi. Tikus putih ini mempunyai defisiensi p53 heterozigot dan homozigot. Dengan memonitor perkembangan tikus putih ini, ternyata tikus putih dengan p53 wt, setelah 9 bulan tidak ada yang menderita satu tumorpun. Pada tikus putih yang mempunyai defisiensi p53 heterozigot sebelum 9 bulan 2 dari 96 tikus putih ini mengembangkan karsinoma embrional dan testis dan yang lainnya mengembangkan limfoma maligna pada umur 9 bulan. Kerentanan yang dramatis untuk mengembangkan bermacam-macam tipe dari kanker ditemukan pada tikus putih yang mempunyai defisiensi p53 yang homozigot. 74 % dari tikus putih ini mengembangkan neoplasma sebelum umur



6 bulan, bahkan beberapa tumor muncul sangat dini sebelum 10 minggu. (Donehower et al., 1992).

Mutasi gen p53 terdapat pada daerah di antara asam amino 130-290 dimana domain ini penting untuk pengikatan DNA spesifik yang penting untuk fungsi p53. Kebanyakan terdapat pada 4 daerah yaitu 117-142, 171-181; 234-258 dan 270-286 yang ditemukan pada berbagai-bagai jenis hewan. Ada 3 titik mutasi (*hot-spots*) yang disenangi yaitu 175, 248 dan 273. Frekwensi dan distribusi dari tiga *hot-spots* berbeda di antara bermacam-macam kanker dan tipe jaringan, tetapi tidak diketahui kenapa terjadi perbedaan tersebut. (Levine et al., 1991, Van Oijen and Slootweg, 2000)

p53 mutant diindikasikan mempunyai pengaruh secara langsung atau tidak langsung terhadap peningkatan ekspresi dari gen pertumbuhan dengan cara menstimulasi faktor pertumbuhan ataupun reseptor faktor pertumbuhan. Gen EGFR (*epidermal growth factor receptor*) akan meningkat akibat p53 mutant. Ludcs-Mayes et al., (1996) mendapatkan bahwa promotor EGFR juga meningkat akibat p53 mutant. Juga diperlihatkan bahwa p53 mutasi mengaktifkan ekspresi gen b FGF, reseptor IGF1 dan interleukin. Dengan assay transfeksi, p53 mutant murni menginduksi ekspresi VEGF (vaskuler EGFL) mRNA dan protein dengan cara aktivasi protein kinase C. VEGF adalah mediator yang sangat penting dan neoangiogenesis tumor yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tumor (Van Oijen and Slootwey, 2000)

2.6.6.1. Hubungan p53 dengan kanker

Mutasi p53 pada kanker mempunyai prevalensi yang tinggi pada keganasan, sehingga dapat digunakan sebagai petanda keganasan. Mutasi dapat terjadi pada stadium dini atau lanjut tergantung dari tipe tumornya.

Beroud dan Soussi (1999) melaporkan terjadi 500 mutasi gen p53 pada kanker manusia dari 11.000 tumor, dimana data ini tersedia pada *European Bioinformatics Institute*. Analisis dilakukan dengan menggunakan posisi asam amino yang mengalami mutasi pada protein p53 dan dengan cara memeriksa kejadian mutasi yang menyebabkan kerusakan gen tersebut

Dengan menggunakan PCR (*polymerase chain reaction*) dan DNA sekuensing dapat di analisis kerusakan DNA. Berbeda dengan ras, dimana hanya mempunyai 3 kodon yang merupakan target tempat mutasi, p53 mempunyai 300 dari 393 kodon yang mengalami perubahan (Soussi et al., 2000)

Pada dekade terakhir ini, dilaporkan bahwa mutasi gen p53 banyak terjadi pada penderita karsinoma hepatoseluler. Dengan memeriksa HCC sebanyak 14 kasus, Fujimoto et al., (1994) dalam penelitiannya di Jepang mendapatkan 25 % dari kasus ini mengalami mutasi gen p53 yang dengan pemeriksaan histopatologi memperlihatkan diferensiasi yang jelek. Kehilangan heterozigote dan p53 didapatkan pada 25 % kasus dan kehilangan Rb 15%. Data yang diperoleh juga menginformasikan bahwa inaktivasi gen p53 lah yang mempengaruhi HCC, bukan gen APC / MCC

Di negara yang berkembang, HCC merupakan endemik dengan faktor resiko HBV, HCV dan AFB₂ dengan 300 kasus per annum yang mempunyai 20 % mutasi

gen p53 (Soussi et al., 2001). Di India penderita HCC dengan mayoritas HBV dan alkoholik tanpa ditemukan AFB₁, didapatkan mutasi gen p53 sebanyak 14 % (Sarin et al., 2001). Tetapi di Cina, dimana HCC dengan faktor resiko HBV dan ekposur AFB₁ tinggi, banyak sekali ditemukan mutasi gen p53 (36 %) dan 50 % positif mempunyai akumulasi p53 yang dideteksi dengan imunohistokimia. (Stern et al., 2001)

Deng and Ma (1998) dalam penelitiannya terhadap 62 HCC yang berasal dari daerah paparan AFB₁ tinggi dan rendah di Cina mendapatkan 69 % dan 20 % dari penderita ini mengalami mutasi gen p53. Ming et al., (1999) dengan memeriksa 99 sampel HCC dari Qidong (resiko tinggi terhadap paparan AFB₁) mendapatkan 53,6 % mengalami mutasi p53 dan 22 sampel dari Beijing (resiko rendah terhadap paparan AFB₁) tidak mendapatkan mutasi p53.

2.6.7. Deteksi p53

Untuk mendeteksi mutasi p53 dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu :

I. Imunohistokimia.

Imunohistokimia dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi p53 pada jaringan tumor. Pemeriksaan ini bergantung pada jumlah protein yang bermutasi yang biasanya meningkat pada sel tumor. WT p53 hampir tidak terdeteksi, karena waktu paruhnya singkat, sebaliknya p53 mutant dapat dengan mudah dideteksi. Sensitifitas imunohistokimia untuk p53 mutant adalah 75 % dengan ketepatan 63 % (Vesculescu and El Deiry, 1996). Tetapi nilai prognostik dari over ekspresi (mutasi) p53 ini masih kontroversial (Lin and Fan, 2000). Hal ini terbukti dari penelitian Bourdone et al., (1995) 5 dan 10 tumor yang mempunyai over ekspresi p53 ini 5 diantaranya menunjukkan mutasi titik, sedangkan 5 lainnya

memperlihatkan sequencing wt p53. Protein p53 yang stabil ini diduga melekat pada molekul seluler yang lain.

Dengan demikian, penilaian secara imunohistokimia harus dilakukan secara hati-hati, karena mutasi ini mempunyai 2 efek yang penting yaitu pertama, p53 kehilangan fungsinya dan kedua p53 menjadi stabil. Kehilangan fungsi p53 menyebabkan sel tidak berhenti pada G₁ dan tidak dapat memblokir jalur menuju apoptosis. p53 stabil menyebabkan protein terakumulasi. Keadaan ini dapat menyebabkan disregulasi fungsi dan protein yang tersisa yang mempunyai normal allel dengan terikat pada MDM2 (van der Valk, 1999).

Prinsip imunohistokimia adalah menambahkan potongan jaringan atau sel yang mengandung p53 dengan anti bodi monoklonal. Kemudian diberi anti immunoglobulin yang berlabel biotin sebagai anti bodi sekunder. Kemudian ditambahkan Avidin - peroksidase dan kromogen, sehingga akan terbentuk warna yang dapat dilihat dibawah mikroskop cahaya. (Bartkova et al., 1993).

2. *Enzyme linked immunosorbent-assay (Elisa)*

Pemeriksaan Elisa dapat mendeteksi peningkatan p53 secara dini. Prinsipnya adalah : potongan jaringan atau sel yang mengandung p53 ditambahkan anti bodi spesifik p53 yang dilekatkan pada fase padat, sehingga akan membentuk kompleks. Kemudian ditambahkan antibodi monoklonal terhadap p53 dan diberi anti bodi terhadap Ig yang berlabel enzim. Setelah itu diberi substrat sehingga akan membentuk warna (Bartkova et al., 1993).

3. PCR (*polymerase chain reaction*)

Metode amplikasi berdasarkan PCR dapat mendeteksi perubahan susunan DNA yang kemudian dilanjutkan dengan sekuensing. Sekuensing dapat mendeteksi 85% mutasi p53 (Kumiviuon et al., 1995)

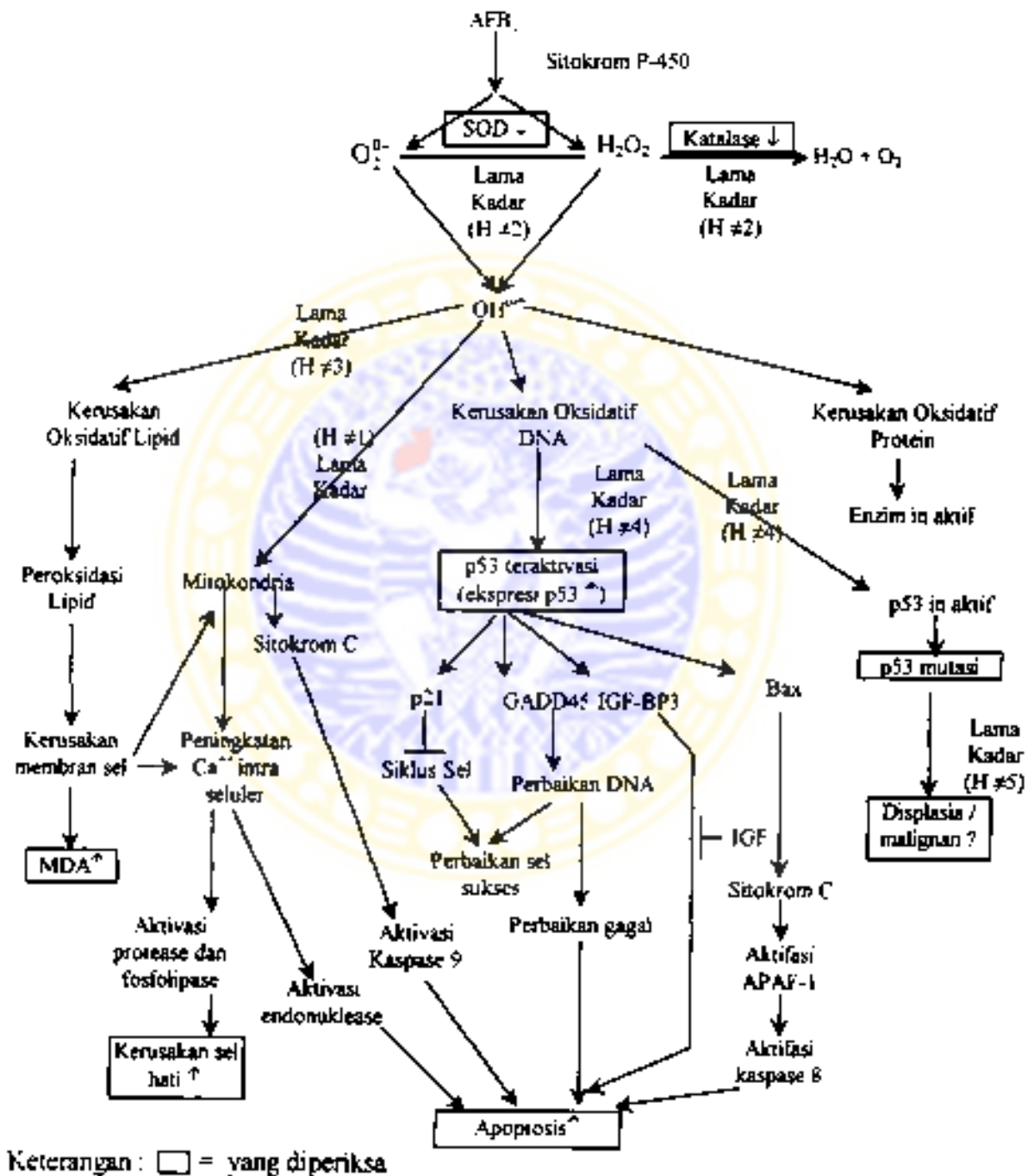
4. SSCP (*single strand conformational polymorphism*)

SSCP adalah prosedur yang cepat dan nyaman dan dapat mendeteksi perbedaan satu basa DNA yang disebabkan oleh mutasi titik pada untai DNA. Prinsip kerja SSCP cukup sederhana dengan cara memisahkan untai ganda produk PCR, lalu dielektroforesis pada gel poli akrilamid. Perbedaan pola migrasi antara DNA wt dan DNA mutant akan terdeteksi pada gel poli akrilamid, karena adanya perbedaan komposisi basa dari ke dua DNA yang dielektroforesis. Sensitivitas mencapai 90% bila dilakukan dalam kondisi yang tepat akibat perubahan satu nukleotida (Kurvinen et al., 1995).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konseptual penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Penjelasan kerangka konseptual.

AFB₁ di dalam tubuh akan dimetabolisme oleh *monokrom P-450 dependent mono oxygenase* melalui enzim flavoprotein reduktase. Reaksi rantai ini akan menghasilkan O₂^{•-} dan H₂O₂. O₂^{•-} yang terbentuk dengan perantara enzim SOD akan diubah menjadi H₂O₂, dimana H₂O₂ akan diubah menjadi H₂O + O₂ oleh enzim katalase. Bila induksi AFB₁ berlanjut terus, maka produksi O₂^{•-} akan meningkat, sehingga H₂O₂ yang terbentuk juga akan meningkat. Bila enzim SOD dan katalase tidak dapat menetralkan O₂^{•-} dan H₂O₂ yang terbentuk berlebihan, maka akan terbentuk OH[•] (Reaksi Haber-Weiss). Bila H₂O₂ bertemu dengan Fe²⁺ dan Cu²⁺, maka akan terbentuk OH[•] (Reaksi Fenton). OH[•] merupakan suatu senyawa oksigen reaktif yang sangat berbahaya bagi tubuh yang akan menimbulkan kerusakan oksidatif pada tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu lipid, protein, dan DNA. Kerusakan oksidatif lipid akan menimbulkan peroksidasi lipid.

Dekomposisi peroksidasi lipid akan menghasilkan sejumlah epoksid yang diantaranya adalah MDA yang mudah dideteksi dan merupakan tanda dari terputusnya rantai asam lemak membran sel.

Peroksidasi lipid akan menimbulkan kebocoran pada membran *bilayer* sel, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran. Hal ini akan menyebabkan ion-ion seperti Ca²⁺ yang dalam keadaan normal tidak boleh memasuki saluran dalam membran *bilayer* akan masuk dalam sel, sehingga terjadi pembengkakan pasif mitokondria. Di samping itu stres oksidatif yang terjadi akibat OH[•] yang dihasilkan terus menerus oleh metabolisme AFB₁ akan menghasilkan produk biokimia yang

akan memberikan sinyal kepada mitokondria, sehingga menyebabkan perubahan mitokondria yang dimulai dengan terbukanya membran bagian luar. Akibatnya akan terjadi mega kanal antara membran bagian luar dan bagian dalam mitokondria. Terbukanya porus antara membran dalam dan luar mitokondria, menyebabkan tumpahnya isi matriks seperti, ion Ca^{++} , sitokrom C dan NADH yang menyebabkan pembentukan ATP berkurang. Akibat penumpahan ion Ca^{++} dari matriks mitokondria akan terjadi peningkatan ion Ca^{++} di dalam sitoplasma. Peningkatan Ca^{++} akan menyebabkan terjadi peningkatan enzim fosfolipase yang berfungsi memecah membran fosfolipid dan protease kalpain yang menyebabkan kerusakan sel, serta ATP-ase yang menyebabkan penurunan ATP. Deplesi ATP akan menyebabkan kerusakan sistem pompa natrium, sehingga ion Na berakumulasi di dalam sel. Keadaan ini menyebabkan peningkatan konsentrasi ion Na di dalam sel, tekanan osmosis intra seluler meningkat dan terjadi pemasukan air ke dalam sel. Di bawah mikroskop cahaya keadaan ini ditandai oleh degenerasi bengkak keruh, degenerasi lemak dan nekrosis.

Pelepasan sitokrom C yang terjadi karena terbukanya porus antara membran dalam dan luar mitokondria akan mengaktifkan *caspase 9* yang menyebabkan fragmentasi DNA dan mencetuskan apoptosis. Peningkatan Ca^{++} intra seluler akan menghasilkan endonuklease yang menyebabkan fragmentasi DNA, suatu hal yang penting untuk terjadinya apoptosis.

Peningkatan OH° akan menimbulkan kerusakan oksidatif DNA yang menyebabkan p53 akan teraktivasi. Aktivasi p53 akan menginduksi p21 yang akan menghambat kompleks cyclin E-CDK2, sehingga siklus sel berhenti sampai kerusakan DNA diperbaiki. Di samping itu p53 juga menginduksi pembentukan

GAAD-45 yang berfungsi memperbaiki kerusakan DNA. Setelah kerusakan DNA diperbaiki, MDM 2 akan mengikat kembali p53, sehingga menjadi inaktif sehingga siklus sel berjalan kembali.

Bila kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, maka p53 akan menstimulasi Bax yang berfungsi menginduksi apoptosis dengan cara meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menginduksi pelepasan sitokrom C. Sitokrom C akan melekat pada APAF-1 yang menyebabkan oligomerasasi APAF-1. Hal ini menimbulkan kemampuan APAF-1 mengaktifkan *caspase*. Aktivasi *caspase* akan mengganggu sitoskeleton dan sasaran utama adalah protein yang memecah internukleosomal DNA sehingga menimbulkan apoptosis. Bel-2 merupakan inhibitor yang utama dari kerja Bax. Bila dengan ini, kerusakan DNA tidak juga dapat diperbaiki, maka berarti protein p53 tidak aktif, atau disebabkan oleh mutasi gen p53.

Inaktivasi p53 menyebabkan gen-gen yang tergantung pada p53 seperti p21, GAAD-45 dan Bax tidak aktif, sehingga siklus sel berjalan terus dengan DNA yang mengalami kerusakan. Akibatnya terjadi proliferasi sel yang tak terkendali dan pertumbuhan kanker. Sebelum terjadi pertumbuhan sel kanker terdapat suatu keadaan yang dinamakan displasia. Displasia ditandai oleh inti yang lebih besar dan kromatin berubah strukturnya dan memperlihatkan pleomorfisme yang bervariasi di dalam ukuran dan bentuk dengan inti yang hiperkromatik.

Berdasarkan uraian di atas, maka dalam penelitian ini kerusakan sel hati disebabkan oleh proses oksidatif yang ditimbulkan oleh AFB₁, sebagai akibat proses biotransformasinya yang menggunakan enzim sitokrom P-450. Akibatnya terjadi penurunan enzim anti oksidan, kerusakan pada membran lipid, DNA dan protein. Kerusakan pada tiga jenis struktur yang penting untuk mempertahankan integritas sel

akan menimbulkan kerusakan sel hati. Lama pemberian dan meningkatnya dosis juga akan meningkatkan pembentukan ROS yang akan meningkatkan pula kerusakan sel hati.

3.2. Hipotesis penelitian

Berdasarkan teori pada uraian kajian pustaka, maka dapat dibuat hipotesis penelitian sebagai berikut

1. Ada pengaruh lama pemberian dan peningkatan kadar AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih sebagai akibat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)
2. Ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih.
3. Ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD dan katalase jaringan hati tikus putih
4. Ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap ekspresi protein p53 dan apoptosis sel hati tikus putih.
5. Ada pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap displasia sel hati atau proliferasi sel hati tikus putih.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, karena semua variabel yang berpengaruh selain perlakuan dapat dikendalikan. Penelitian ini bersifat *cross sectional*.

4.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial, karena di dalam penelitian digunakan 2 faktor yaitu faktor lama pemberian dan faktor dosis pemberian. Faktor lama pemberian terdiri atas 3 tingkat dan faktor dosis terdiri atas 4 tingkat. Dengan ini, maka akan terdapat 3 x 4 perlakuan yaitu 12 perlakuan, sehingga bagan rancangan penelitian dapat dibuat sebagai berikut :

Lama Pemberian	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
	Dosis 0 µg	Dosis 10 µg	Dosis 15 µg	Dosis 20 µg
Lama 1 (12 Minggu)				
Lama 2 (16 Minggu)				
Lama 3 (20 Minggu)				

4.3. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah *Rattus norvegicus* Strain Wistar jantan yang didapatkan dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dengan pertimbangan : tikus putih merupakan *animals model*, murah dan mudah pemeliharaannya

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian terdiri dari tikus putih *Rattus norvegicus* Strain Wistar jantan yang memenuhi persyaratan :

- Jumlah memenuhi persyaratan jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini
- Anggota sampel berjenis kelamin jantan dengan pertimbangan agar sampel lebih homogen
- Berumur 2 bulan dengan berat badan 180 – 200 g

Replikasi pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Steel and Torrie (1980)

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot p\delta^2}{\delta}$$

n = besar sampel pada masing-masing kelompok

$Z\alpha$ - nilai standar normal yang besarnya tergantung α

$$\text{Bila } \alpha = 0,05 \rightarrow Z\alpha = 1,96$$

$Z\beta$ - nilainya tergantung beta yang ditentukan (berdasarkan tabel)

$$\text{Bila } \beta = 0,80 \rightarrow Z\beta = 0,842$$

δ besarnya penyimpangan yang masih bisa ditolerir.

Untuk kelompok yang berpasangan $\frac{p\delta^2}{\sigma^2} = 1$, sehingga hasilnya $n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2$.

Dari rumus ini, maka didapatkan $n = (1,96 + 0,8421)^2$. Jadi $n = 7,85$ dan dibulatkan menjadi 8

4.3.3. Besar Sampel

Dari perhitungan diatas, maka replikasi pada setiap kelompok pada penelitian ini adalah 8. Banyak kelompok pada penelitian ini adalah 12, sehingga dalam penelitian ini diperlukan $8 \times 12 = 96$ ekor tikus putih.

4.3.4. Teknik Pengambilan Sampel

Tikus putih yang diambil untuk sampel dalam penelitian ini diambil dari tikus putih jantan yang sudah disapih dari induknya sebanyak 96 ekor. Kemudian diberi ransum dasar dan cukup vitamin sampai berat badan dan umur memenuhi syarat dalam penelitian ini. Setelah cukup waktu dan berat badan, maka tikus-tikus putih tersebut dibagi menjadi 12 kelompok secara acak sederhana.

4.4. Klasifikasi Variabel dan Defenisi Operasional Variabel

4.4.1. Klasifikasi Variabel

Penelitian ini merupakan penelitian multivariat yang mempunyai

1 Variabel bebas, yaitu

- a. Lama pemberian aflatoxin B₁.
- b. Dosis aflatoxin B₁.
- c. Kombinasi lama dan dosis pemberian aflatoxin B₁.

2. Variabel kendah yaitu
 - a. Umur hewan percobaan
 - b. Jenis kelamin hewan percobaan
 - c. Berat badan hewan percobaan
3. Variabel tergantung yaitu .
 - a. Enzim superoksida dismutase dan enzim katalase jaringan hati hewan percobaan.
 - b. Malonaldehid jaringan hati hewan percobaan
 - c. Sel hati yang mengekspresikan protein p53
 - d. Sel hati yang mengalami displasia - proliferasi
 - e. Sel hati yang mengalami apoptosis
 - f. Kerusakan sel hati.

4.4.2. Definisi Operasional Variabel

- a. AFB₁ yang digunakan adalah AFB₁ yang didapatkan dari Sigma Grade A-6636 Lama pemberian AFB₁ ditetapkan 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu Dosis pemberian ditetapkan 0 µg, 10µg, 15 µg dan 20 µg yang diberikan setiap hari
- b. Aktivitas enzim SOD jaringan hati ditetapkan dengan cara pengukuran menurut metode Wong (1989), sedangkan aktivitas enzim katalase jaringan hati ditetapkan menurut pengukuran cara kolometrik Sinha (1972)
- c. Kadar MDA jaringan hati ditetapkan melalui pengukuran MDA jaringan hati berdasarkan test TBA (*Thio Barbituric Acid*) menurut metode Uchiyama dan Mihara (1978)

d Kerusakan sel hati ditentukan dengan pemeriksaan sediaan histopatologik yang diwarnai dengan hematoksilin eosin dan dapat dibedakan yaitu :

- 1 Degenerasi bengkak keruh, yang ditandai dengan ciri-ciri sel membengkak, sitoplasma tampak keruh bergranula dan di dalam sitoplasma terdapat beberapa vakuola yang nampak jernih.
- 2 Degenerasi lemak, yang ditandai dengan ciri-ciri di dalam sitoplasma terdapat vakuola besar dan nukleus terdesak ke tepi sel.
- 3 Nekrosis yang ditandai dimana membran sel mengalami lisis, sehingga batas sel menjadi kabur. Inti sel mengalami perubahan piknotis, karioreksis dan kariolisis.
- 4 Displasia, ditandai oleh pembesaran sel hati, inti lebih besar, pleomorfisme dan hiperkromatik.
5. Sel hati yang mengalami proliferasi atau sel kanker hati, ditandai dengan sel hati yang lebih besar dari normal, sel berbentuk poligonal dengan sitoplasma granuler mengelilingi sinus-sinus atau ditemukan pigmen empedu. Sel-sel berinti banyak dan mengalami mitosis dan hiperkromatik.

Tingkat kerusakan sel hati didapatkan berdasarkan hasil penghitungan jumlah sel hati yang mengalami kerusakan dikalikan dengan nilai yang diberikan pada tiap-tiap tahap kerusakan. Degenerasi bengkak keruh diberi nilai 1, degenerasi lemak diberi nilai 2, nekrosis diberi nilai 3 dan displasia diberi nilai 4.

- c. Ekspresi protein p53 ditandai terdapatnya warna merah pada inti yang diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi p53.
- f. Sel-sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan terdapatnya inti yang berwarna hitam dan coklat dengan pewarnaan metode Apoptag, yaitu suatu metode deteksi molekuler secara imunohistokimia.

4.5. Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian

4.5.1. Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah :

- a. Tikus putih jantan *Rattus norvegicus strain Wistar*
- b. Makanan dasar tikus putih berupa pelet butiran jenis 521 produksi PT. Charoen Pokphand Indonesia, Mojokerto Jawa Timur yang mengandung :
 - protein 10 - 21 %
 - hidrat arang 36 - 40 %
 - serat 3 - 5 %
 - lemak 5 - 8 %
 - mineral 4 - 7 %
 - kandungan energi 2.800 - 3.000 kkal/kg
- c. Aflatoksin B₁ diperoleh dari Sigma Grade A-6636 Saint Louis, USA
- d. Bahan pemeriksaan untuk menentukan protein p53 diperoleh dari Kit DAKO LSAB 2, yaitu *monoclonal Mouse Anti Rat p53 protein Clone : C19, Code No : SC1311*.
- e. Bahan pemeriksaan untuk menentukan sel yang mengalami apoptosis diperoleh dari apoptag peroksidase Insitu Apoptosis Detection Kit.

f. Bahan pemeriksaan sediaan histopatologi sel hati

- Alkohol dengan konsentrasi 99 %, 90 %, 80 % dan 70 %
- metil benzoat
- benzol
- parafin
- gliserin
- hematoksin
- eosin
- balsam

g. Bahan pemeriksaan MDA jaringan hati .

- Tris buffer
- HCl
- Na - Thio barbiturat

h. Bahan pemeriksaan SOD dan katalase jaringan hati

- Triton X
- NaCl fisiologis
- Bufer fosfat
- H_2O_2
- PMSF
- EDTA
- KH_2PO_4
- Xantin oksidase dan Xantin
- NBT
- H_2O

4.5.2. Instrumen Penelitian

1. Alat Gelas

Alat gelas sebelumnya telah direndam dengan asam pencuci kalium bikromat 10 % selama kurang lebih 24 jam. Setelah direndam gelas-gelas tersebut dicuci dengan air kran terakhir dicuci dengan air suling.

2. Timbangan

2.1 Timbangan untuk mengukur berat badan tikus putih

Dipakai timbangan *triple beam* merek Fisher Scientific made in USA dengan skala terkecil 0,1 gram.

2.2 Timbangan untuk menimbang bahan-bahan kimia.

Dipakai timbangan elektronik merek Precisa 125 A tipe 300-9213/B buatan Switzerland dengan skala terkecil 0.01 μg

3. Kandang Tikus putih.

Kandang tikus putih yang digunakan terbuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat berjalaskan sekam. Masing-masing kelompok menempati satu kandang. Sebelum digunakan kandang dicuci bersih, kemudian alas kandang diberi sekam. Setiap dua hari sekam diganti sehingga kebersihan tetap terjaga.

Tempat pakan dipakai dari bahan yang terbuat dari plastik. Tempat minum terbuat dari botol plastik yang dilengkapi tutup jenis termo plastik. Botol diletakkan diatas kandang dengan posisi terbalik yang berisi aquades yang diganti tiap hari.

4 Homogenizer

Dipakai homogenizer merek Lightin model L *mixing equipment* Co. Inc, Rochester, N J USA, yang digunakan untuk membuat homogenat hati tikus putih.

5 Sentrifuge

Dengan *high speed centrifuge* merek Kokusan model H 251 A Japan

6 Kertas Aluminium

Dipakai kertas aluminium produksi Laspop Raya Sentosa, Indonesia yang digunakan untuk pelindung terhadap cahaya

7 Tabung Mikro

Digunakan tabung mikro (*micro test tube*) jenis 3810, dengan isi 1,5 ml made in Republic of Germany.

8 Pipet Mikro

Digunakan jenis Socorex Swiss dengan akurasi 5-50 μ l, 50 - 200 μ l dan 200-1000 μ l.

9 Spektro fotometer Vis-UV

Digunakan spektro fotometer merek Hitachi 150-120 Made in Japan

10. Mikroskop

Digunakan mikroskop merek Olympus BH 2 Japan untuk melihat sayatan hati.

11 Perlengkapan untuk membedah tikus putih

Digunakan sarung tangan karet, pinset, pisau bedah, papan bedah, botol spesimen.

12 Mikrotom

Digunakan mikrotom merek AO (American Optical) untuk memotong jaringan hati

4.5.3. Persyaratan Etik

Implikasi etik pada hewan. pengelolaan hewan coba pada penelitian ini mengikuti *Animal Ethic* yang meliputi perawatan dalam kandang, pemberian makan dan minum, aliran udara dalam kandang, perlakuan pada saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan urin analisis penelitian dan pemusnahannya.

4.5.4. Reliabilitas dan Validitas

Khusus untuk alat spektrofotometer sebelum digunakan untuk pemeriksaan kadar variabel-variabel yang akan diperiksa, dilakukan *quality control system* dengan menentukan harga *coefficient of variation* (CV). Setelah harga CV diperoleh dari masing-masing senyawa tersebut lebih kecil dari 5 %, baru dilakukan penetapan kadar sampel. Analisis sampel dilakukan pada hari yang sama dengan pengambilan sampel.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

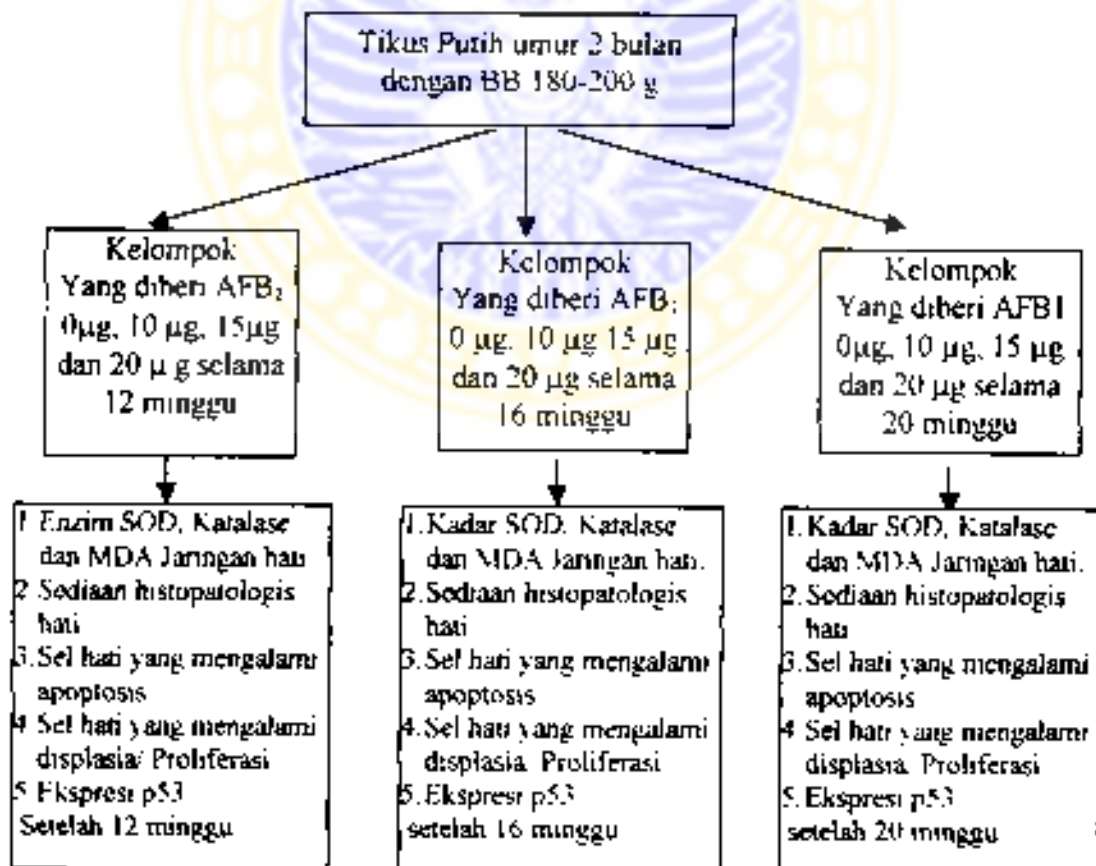
Penelitian dilakukan di :

1. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya untuk pemeliharaan hewan coba.
2. Laboratorium Analisis Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk penimbangan Aflatoksin B₁
3. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pemeriksaan enzim SOD, Katalase, MDA jaringan hati tikus putih percobaan.

- 4 Bagian Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pembuatan sediaan histologi dan pewarnaan hematoxilin eosin.
 - 5 Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya untuk pengamatan sediaan histopatologis
 - 6 Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang untuk pengamatan sediaan histopatologis
 - 7 Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang untuk pembuatan sediaan yang diwarnai dengan immunohistokimia dan pemotretan.
- Seluruh penelitian dimulai dari bulan Desember 2002 sampai Desember 2003.

4.7. Prosedur atau Pengumpulan Data

Kerangka Operasional Penelitian



Prosedur Penelitian

4.7.1. Persiapan Hewan Coba

Setelah sampel didapatkan, maka tikus-tikus putih dibagi atas kelompok-kelompok seperti yang tertera dirancangan percobaan. Didapatkan 12 kelompok untuk penelitian ini. Tikus putih ditempatkan pada kandang yang sudah disediakan dan diadaptasikan dulu selama 10 hari. Kemudian masing-masing kelompok diberi perlakuan sesuai dengan rancangan percobaan.

4.7.2. Penentuan lama dan Dosis Aflatoksin B₁

Lama pemberian AFB₁ ditentukan berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan penelitian sebelumnya.

Pemberian selama 16 minggu berdasarkan pada penelitian Lestariana (1997) yang mendapatkan bahwa pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu menemukan adanya lesi preneoplastik (*Altered foci*) pada sediaan histopatologis sel hati dengan pewarnaan HE. Pada foci tersebut sel-sel parenkim hati mengalami pengkerutan dan adanya congested sinusoid. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan diteliti bagaimana efek pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu dan bagaimana pula dengan pemberian 4 minggu sebelum dan sesudah itu. Dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg juga berdasarkan penelitian Lestariana (1997), dimana pada dosis 15 µg AFB₁ selama 16 minggu sudah menimbulkan lesi preneoplasik. Pada penelitian ini akan diteliti bagaimakah efek AFB₁ dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu.

4.7.3. Perlakuan pada hewan coba

Setelah melewati masa adaptasi, tikus putih yang sudah dibagi atas 12 kelompok mendapat perlakuan sesuai dengan rancangan percobaan. Pada akhir percobaan masing-masing kelompok yaitu setelah 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu, tikus putih dimatikan dan hatinya diambil, dimasukkan kedalam sukrosa 0,25 M pada suhu 4°C. Hati dicuci dengan larutan sukrosa 0,25 M hingga bersih, dikeringkan dengan kertas tisu, kemudian dilakukan pemeriksaan secara makroskopis yang meliputi bentuk hati secara umum, warna hati dan bentuk tepi hati. Sebagian hati diambil untuk pemeriksaan MDA, katalase dan SOD jaringan hati. Sebagian lagi diambil untuk pemeriksaan protein p53, sel hati yang mengalami apoptosis dan pemeriksaan histopatologi hati.

4.7.4. Pemeriksaan Laboratorium

4.7.4.1. Pemeriksaan *Super Oxide Dismutase (SOD)*

Pemeriksaan ini menggunakan metode Wong et al., (1989) Superoksida mereduksi NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), SOD dapat menghambat reduksi NBT oleh superoksida, karena SOD mengikat superoksida. Apabila xantin direduksi dengan xantin oksidase akan terbentuk superoksida yang dapat mereduksi NBT. (Prosedur terlampir pada lampiran 8).

4.7.4.2. Pemeriksaan Aktivitas Katalase

Pemeriksaan katalase hati dilakukan dengan metode kolorimetrik (Sinha, 1972). Uji ini menggunakan warna sebagai indikator. Sebagai reagen warna yang digunakan potasium dikromat 5% dan asam asetat glasial (1:3). Ion dikromat asetat

dapat dideteksi absorpsinya pada panjang gelombang 570 nm. Satu unit aktivitas katalase dinyatakan sebagai banyaknya hidrogen peroksida (dalam mol) yang dipakai oleh katalase permenit. (Prosedur terlampir pada lampiran 9).

4.7.4.3. Pemeriksaan MDA Jaringan Hati

Penentuan kadar MDA dengan menggunakan Spektrofotometer dilakukan dengan metode Uchiyama dan Mihara (1978), yang berdasarkan fluoresensi yang terbentuk antara senyawa thio barbiturat dengan MDA. (Lihat Lampiran 10).

4.7.4.4. Pemeriksaan Histopatologis Hati

Potongan hati yang sudah diredam dalam formalin 10 %, minimum selama 2 jam diproses dan dibuat sediaan histologis dengan metode laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Hariadi, 2000). Untuk pemeriksaan gambaran histopatologis hati digunakan mikroskop cahaya (Prosedur terlampir pada lampiran 11). Tiap-tiap sediaan sampel penelitian diamati di bawah mikroskop. Dari masing-masing sediaan ditentukan 5 medan pandang mikroskop yang berpusat pada vena sentralis. Pada awal pemeriksaan dilakukan pengamatan secara umum terhadap struktur sel hati, baik yang masih dalam keadaan normal maupun yang mengalami kerusakan. Kemudian dilakukan pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel hati yang mengalami kerusakan pada bagian yang padat sel hati dengan berpusat pada vena sentralis. Dihitung sel sebanyak 50 buah dengan pembesaran 400 x. dengan cara menggeser slide seperti menghitung jenis leukosit dan ditentukan berapa sel yang mengalami bengkak keruh, lemak, nekrosis dan displasia. Pemeriksaan dilakukan dibawah bimbingan pembimbing sebagai observer

I dan ahli patologi di bagian patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang sebagai observer ke II

4.7.4.5. Pemeriksaan ekspresi protein p53

Pemeriksaan ekspresi protein p53 ditentukan dengan metode imunohistokimia dengan prosedur Dako LSAB Kit. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan dengan menambahkan antibodi monoklonal p53 kepada jaringan atau sel yang mengandung p53, kemudian diberi anti imunoglobulin yang berlabel biotin sebagai antibodi sekunder. Setelah itu ditambahkan Avidin peroksidase dan kromogen yang akan membentuk inti yang berwarna merah yang dapat dilihat dibawah mikroskop cahaya. (Prosedur terlampir pada lampiran 12). Setelah itu dilakukan penghitungan sel hati yang mengalami aktivasi protein p53 dengan mencari bagian yang padat sel hati yang berpusat pada vena sentralis. Dengan pembesaran 200x dihitung jumlah sel yang mengalami ekspresi protein p53 yang ditandai dengan inti yang berwarna merah pada 100 sel.

4.7.4.6. Pemeriksaan sel hati yang mengalami apoptosis

Pemeriksaan sel hati yang mengalami apoptosis dilakukan dengan cara menurut prosedur pada *apoptag peroxidase kits* (Prosedur terlampir pada lampiran 13). Setelah itu dilakukan penghitungan sel yang mengalami apoptosis dengan mencari bagian yang padat sel hati yang berpusat pada vena sentralis. Dengan pembesaran 200x dihitung jumlah sel yang mengalami apoptosis pada 100 sel, dimana sel apoptosis ditandai oleh inti yang berwarna hitam dan coklat.

4.8. Analisis Data

Hasil analisis di laboratorium yang diperoleh terdiri dari hasil analisis enzim SOD, Katalase dan MDA jaringan hati, protein p53, gambaran histopatologis sel hati, dan sel hati yang mengalami apoptosis. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan ANAVA, yang dilanjutkan dengan uji Tukey HSD. Hasil analisis statistik dinyatakan bermakna bila didapat harga $p < 0.05$.



BAB V

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Dalam penelitian ini telah dilakukan pememksaan pengaruh AFB₁ terhadap kerusakan sel hati akibat proses oksidatif pada 96 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang berumur lebih kurang dua bulan dengan berat badan antara 180-200 g yang dibagi atas 12 kelompok perlakuan.

Hasil analisa statistik penelitian dapat dilihat pada tabel-tabel dibawah ini.

5.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.1, 5.2, 5.3 dan 5.4 di bawah ini

Tabel 5.1. Nilai rerata aktivitas SOD (u/ml) jaringan hati tikus putih pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian yang berbeda.

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (µg)			
	0 Rerata	10 Rerata	15 Rerata	20 Rerata
12 minggu	41,84 ± 3,2	35,92 ± 0,57	33,96 ± 4,4	32,60±3,17
16 minggu	40,87 ± 4,3	33,37 ± 1,37	30,90 ± 3,12	28,56±1,49
20 minggu	39,56 ± 4,14	31,05 ± 2,40	29,78 ± 3,56	26,67±2,57

Dari tabel 5.1 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih pada kenarikan dosis dan bertambah lamanya pemberian.

Hasil yang didapat kemudian diuji dengan ANAVA. Untuk mengetahui kemaknaan perbedaan aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis, lama, dan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ dilakukan uji Tukey HSD.

Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim SOD (μ ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (μ g)			
	0	10	15	20
Rata-rata Konsentrasi SOD	40,76 ^a	33,44 ^b	31,55 ^{bc}	29,28 ^c
Simpangan Baku	3,86	2,56	3,99	3,48

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.2 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) antara aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat 10 μ g AFB₁ dengan kelompok tikus putih yang tidak mendapat AFB₁. Demikian juga terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) antara aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ 15 μ g dan 20 μ g dengan kelompok tikus putih yang tidak mendapat AFB₁. Walaupun demikian tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,153$) antara aktivitas kadar enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat 10 μ g AFB₁ dengan kadar enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat pemberian 15 μ g AFB₁, tetapi terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) bila dibandingkan dengan aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus yang mendapat 20 μ g AFB₁. Hasil analisis juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,60$) antara aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat 15 μ g AFB₁ dengan aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih yang mendapat 20 μ g AFB₁ (lihat lampiran 1b).

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.3

Tabel 5.3. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD analisis aktivitas enzim SOD (u/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB₁.

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Rata-rata Aktivitas SOD	36,08 ^a	33,42 ^b	31,76 ^b
Simpangan Baku	4,67	5,42	5,75

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.3 dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0,03$) antara tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 12 minggu dengan pemberian AFB₁ selama 16 minggu. Aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih juga berbeda bermakna ($p=0,000$) antara tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 12 minggu dengan tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 20 minggu, tetapi aktivitas enzim SOD jaringan tikus putih tidak berbeda ($p=0,86$) antara tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 16 minggu dan 20 minggu (lihat lampiran 1b).

Hasil analisis pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.4. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim SOD (u/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁.

Dosis	Lama	0			10			15			20		
		12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
0	12	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	16	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	20	-	-	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
10	12	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	s	s	s	s
	16	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	s
	20	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
15	12	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	s	s
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns
20	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	s
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ns = Non signifikan ($p > 0,05$), s = Signifikan ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.4. dapat disimpulkan bahwa lama pemberian 12 minggu, 16 minggu, 20 minggu dengan dosis 10 μg AFB₁, 15 μg dan 20 μg akan menunjukkan perbedaan yang bermakna antara aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih dengan aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁. Dari tabel 5.4 ini juga dapat disimpulkan bahwa terjadi interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa dosis 20 μg AFB₁ dengan lama pemberian 20 minggu menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan dosis 10 μg AFB₁ dengan lama pemberian 12 minggu ($p=0,000$), dosis 10 μg AFB₁ dengan lama pemberian 16 minggu ($p=0,02$). Pemberian AFB₁ 10 μg selama 20 minggu juga menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan pemberian AFB₁ dosis 15 μg selama 12 minggu ($p=0,01$) dan dosis 20 μg AFB₁ selama 12 minggu ($p=0,012$). (lihat lampiran 1b).

5.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.5, 5.6, 5.7 dan 5.8 dibawah ini.

Tabel 5.5. Nilai rerata aktivitas enzim katalase jaringan hati (u/ml) tikus putih pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian AFB₁.

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (μg)			
	0	10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	731,29 \pm 0,44	729,18 \pm 0,23	729,04 \pm 0,35	728,18 \pm 0,71
16 minggu	730,73 \pm 0,25	728,15 \pm 0,15	727,02 \pm 0,41	725,47 \pm 2,07
20 minggu	729,56 \pm 0,60	726,15 \pm 2,01	725,24 \pm 2,23	723,42 \pm 1,80

Dari tabel 5.5 dapat diketahui terjadi penurunan aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih pada kenaikan dosis dan bertambah lamanya pemberian Hasil yang di dapat diuji dengan ANAVA. Untuk mengetahui kemaknaan perbedaan aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis, lama, dan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ dilakukan Tukey HSD.

Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim katalase (u/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (µg)			
	0	10	15	20
Rata-rata Aktivitas Katalase	730,53 ^a	727,83 ^b	727,10 ^b	725,69 ^c
Simpangan Baku	0,85	1,71	2,03	2,53

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.6 dapat disimpulkan bahwa pemberian 10 µg AFB₁ pada tikus putih menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0,000$) antara aktivitas enzim katalase dengan enzim katalase kelompok tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁. Aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih juga menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikus putih yang mendapatkan dosis 10 µg AFB₁ dan 20 µg AFB₁ ($p=0,000$) ataupun pada tikus-tikus putih yang mendapatkan 15 µg dan 20 µg AFB₁ ($p=0,000$). Tetapi aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikus putih yang mendapat 10 µg AFB₁ dan 15 µg AFB₁ ($p=0,18$) (lihat lampiran 2b).

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.7

Tabel 5.7. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD aktivitas enzim katalase (u/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan bermacam-macam lama pemberian AFB₁.

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Rata-rata Aktivitas Katalase	729,42 ^a	727,84 ^b	726,09 ^c
Simpangan Baku	1,24	2,20	2,83

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.7 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 12 minggu dengan aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 16 minggu ($p=0,000$) dan 20 minggu ($p=0,000$). Dari tabel 5.7, juga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 16 minggu ($p=0,000$) dengan aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ selama 20 minggu (lihat lampiran 2b).

Hasil analisis pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim katalase jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap aktivitas enzim katalase (u/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁

Dosis	Lama	0			10			15			20		
		12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
0	12	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	16		-	ns	ns	s	s	ns	s	s	s	s	s
	20			-	ns	ns	s	ns	s	s	ns	s	s
10	12				-	ns	s	ns	s	s	ns	s	s
	16					-	ns	ns	ns	s	ns	s	s
	20						-	s	ns	ns	ns	ns	s
15	12							-	ns	s	ns	s	s
	16								-	ns	ns	ns	s
	20									-	s	ns	ns
20	12										-	s	s
	16											-	ns
	20												-

ns = Non signifikan ($p > 0,05$); s = Signifikan ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.8 dapat disimpulkan bahwa aktivitas katalase jaringan hati tikus putih pada lama pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg pada tikus-tikus putih akan memberikan hasil perbedaan yang bermakna ($p=0,000$) dengan aktivitas enzim katalase jaringan hati pada tikus-tikus putih yang tidak mendapat AFB₁. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa aktivitas enzim katalase jaringan hati pada tikus yang mendapatkan AFB₁ selama 20 minggu dengan dosis 20 µg AFB₁ berbeda bermakna dengan dosis lama pemberian 12 minggu dosis 10 µg AFB₁ ($p=0,000$), dengan dosis 10 µg lama pemberian 16 minggu ($p=0,000$), dengan dosis 10 µg dengan lama 20 minggu ($p=0,002$), dosis 15 µg dengan lama 12 minggu ($p=0,000$), dan dosis 15 µg dengan lama 16 minggu ($p=0,000$). (lihat lampiran 2b).

5.3. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.9, 5.10, 5.11 dan 5.12 di bawah ini.

Tabel 5.9. Nilai rerata kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih akibat pemberian AFB₁ pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian.

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (µg)			
	0	10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	0,12 ± 0,025	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,01
16 minggu	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,02
20 minggu	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,07

Dari tabel 5.9 dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan kadar MDA jaringan hati tikus pada kenaikan dosis dan bertambah lamanya pemberian. Hasil yang didapat diuji dengan ANAVA. Untuk mengetahui kemaknaan kadar MDA jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis, lama pemberian dan interaksi dosis dan lama pemberian dilakukan uji Tukey HSD. Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.10.

Tabel 5.10. Tingkat Kemaknaan hasil uji HSD kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (µg)				
	0	5	10	15	20
Rata-rata Kadar MDA	0,12 ^a	0,17 ^b	0,23 ^c	0,27 ^d	0,28 ^e
Simpangan Baku	0,02	0,04	0,04	0,05	0,06

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.10 dapat disimpulkan bahwa pemberian AFB₁ pada tikus putih dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg menunjukkan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang berbeda bermakna ($p=0,000$) dengan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁. Dari hasil penelitian juga disimpulkan bahwa pemberian AFB₁ pada tikus putih dengan dosis 20 µg menunjukkan kadar MDA jaringan hati yang berbeda secara bermakna ($p=0,000$) dengan kadar MDA jaringan hati pada tikus yang mendapat AFB₁ dosis 10 µg, tetapi kadar MDA jaringan hati ini tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0,35$) dengan pada tikus yang mendapat dosis AFB₁ 15 µg (lihat lampiran 3b).

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.11

Tabel 5.11 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB₁

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Rata-rata Kadar MDA	0,20 ^a	0,22 ^b	0,27 ^b
Simpangan Baku	0,06	0,06	0,09

Nilai rata-rata yang diikuti supersknp berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.11, dapat disimpulkan bahwa kadar MDA jaringan hati tikus putih dengan lama pemberian AFB₁ 12 minggu berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ selama 20 minggu ($p=0,000$), tetapi tidak berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ selama 16 minggu ($p = 0,111$). Kadar MDA jaringan hati tikus putih yang mendapatkan AFB₁ selama 20 minggu menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0,000$) dengan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang mendapatkan AFB₁ selama 16 minggu. (lihat lampiran 3b).

Hasil analisis pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap MDA jaringan hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.12.

Tabel 5.12. Tingkat kemaknaan uji HSD terhadap kadar MDA (pg/ml) jaringan hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁

Dosis	Lama	0			10			15			20		
		12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
10	12	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	16	-	-	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	20	-	-	-	s	s	s	s	s	s	s	s	s
15	12	-	-	-	-	ns	s	ns	ns	s	ns	ns	s
	16	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	s	ns	ns	s
	20	-	-	-	-	-	-	s	ns	s	ns	ns	s
20	12	-	-	-	-	-	-	-	ns	s	ns	ns	s
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	s	s	ns	s
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	s	s	s

ns = Non signifikan ($p > 0,05$); s = Signifikan ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.12 dapat disimpulkan bahwa pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg memberikan hasil kadar MDA jaringan hati tikus putih yang berbeda bermakna ($p=0.000$) dengan kelompok tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa tikus putih yang mendapatkan AFB₁ 20 µg selama 20 minggu memberikan hasil kadar MDA jaringan hati tikus putih yang berbeda bermakna ($p=0.000$) dengan kadar MDA jaringan hati pada tikus putih yang mendapat AFB₁ 10 µg selama 12 minggu, dosis 10 µg selama 16 minggu ($p=0.000$), dosis 10 µg selama 20 minggu ($p=0.000$). Kadar MDA jaringan hati juga menunjukkan perbedaan yang bermakna pada tikus yang mendapat AFB₁ 20 µg selama 20 minggu dengan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ dosis 15 µg selama 12 minggu ($p=0.000$), dosis 15 µg selama 16 minggu ($p=0.000$) dan dosis 20 µg selama 12 minggu ($p=0.000$) dan dosis 20 µg selama 16 minggu (lihat lampiran 3b)

5.4. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.13, 5.14, 5.15 dan 5.16.

Tabel 5.13 Nilai rerata sel hati tikus putih yang rusak akibat pemberian AFB₁ menurut dosis dan lama pemberian yang berbeda 50 sel

Lama Pemberian	0	Dosis pemberian AFB ₁ (µg)		
		10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	0	73,78 ± 3,54	80,38 ± 3,54	95,88 ± 8,00
16 minggu	0	81,75 ± 5,44	102,88 ± 8,98	117,75 ± 13,50
20 minggu	0	99 ± 9,18	123,25 ± 9,78	137,88 ± 16,82

Dari tabel 5.13 dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan kerusakan sel hati pada kenaikan dosis dan bertambah lamanya pemberian. Hasil yang didapat kemudian diuji dengan ANAVA. Untuk mengetahui kemaknaan perbedaan sel hati yang rusak pada tikus putih berdasarkan dosis, lama pemberian dan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ dilakukan uji Tukey HSD.

Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap kerusakan sel hati dapat dilihat pada tabel 5.14.

Tabel 5.14. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami kerusakan berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (µg)			
	0	10	15	20
Kerusakan Sel Hati	0 ^a	84,71 ^b	102,17 ^c	117,17 ^d
Simpangan Baku	0	12,54	19,76	21,69

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.14, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kerusakan sel hati pada tikus yang mendapat AFB₁ dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg dengan kelompok tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁. Hasil analisis juga menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kerusakan sel hati tikus putih yang mendapat AFB₁ 10 µg dengan kerusakan sel hati tikus putih yang mendapat AFB₁ 15 µg ($p=0,000$) serta kerusakan sel hati tikus putih yang mendapat AFB₁ 20 µg ($p>0,000$). Hasil analisis juga menunjukkan bahwa terdapat kerusakan sel hati yang berbeda bermakna antara kelompok tikus putih yang diberi AFB₁ 15 µg dan 20 µg. ($p=0,000$) (lihat lampiran 4b).

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.15.

Tabel 5.15. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD kerusakan sel hati tikus putih berdasarkan lama pemberian AFB₁

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Kerusakan Sel Hati	62,41 ^a	75,59 ^b	90,03 ^c
Simpangan Baku	37,95	46,92	55,61

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.15 dapat disimpulkan bahwa pemberian AFB₁ selama 12 minggu akan menyebabkan kerusakan sel hati tikus putih yang berbeda bermakna dengan kerusakan sel hati pada tikus putih yang diberi AFB₁ selama 16 minggu ($p=0,000$) dan yang diberi AFB₁ selama 20 minggu ($p=0,000$). Hasil analisis juga menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) antara kerusakan sel hati tikus putih yang diberi AFB₁ selama 16 minggu dan 20 minggu (lihat lampiran 4b)

Hasil analisis pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap kerusakan sel hati tikus putih dapat dilihat pada tabel 5.16.

Tabel 5.16. Tingkat kemaknaan uji HSD kerusakan sel hati tikus putih berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁

Dosis	Lama	0			10			15			20		
		12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
0	12	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	16		-	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	20			-	s	s	s	s	s	s	s	s	s
10	12				-	s	ns	s	ns	s	s	s	s
	16					-	s	ns	s	s	ns	s	s
	20						-	s	ns	s	ns	s	s
15	12							-	s	s	s	s	s
	16								-	s	ns	s	s
	20									-	s	ns	s
20	12										-	s	s
	16											-	s
	20												-

ns = Non signifikan ($p > 0,05$); s = Signifikan ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.16 dapat disimpulkan bahwa lama pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg

menunjukkan kerusakan sel hati yang berbeda bermakna ($p < 0,000$) dengan kelompok tikus putih yang tidak diberi AFB₁. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ dengan dosis 30 μg selama 20 minggu menyebabkan kerusakan sel hati yang berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu dengan dosis 10 μg ($p=0,000$). Kerusakan sel hati tikus putih yang diberi 20 μg AFB₁ selama 20 minggu juga berbeda bermakna dengan kerusakan sel hati tikus putih yang diberi AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu and 20 minggu dengan dosis 15 μg ($p=0,000$). Kerusakan sel hati tikus putih yang diberi AFB₁ 20 μg juga berbeda bermakna dengan kerusakan sel hati yang diberi AFB₁ dosis 20 μg selama 12 minggu ($p=0,000$) dan dosis 20 μg selama 16 minggu ($p=0,000$) (lihat lampiran 4b)

5.5. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap ekspresi protein p53

Hasil pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap ekspresi protein p53 dapat dilihat pada tabel 5.17.

Tabel 5.17 Jumlah rerata sel hati tikus putih yang mengekspresikan protein p53 akibat pemberian AFB₁ pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian / 4 sel

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (μg)			
	0	10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	0	0	0	0
16 minggu	0	0	0	0
20 minggu	0	0	0	0

Dari tabel 5.17 diatas dapat disimpulkan bahwa tidak ada sel hati yang mengekspresikan protein p53 yang disebabkan oleh pemberian AFB₁ pada setiap lama dan dosis pemberian.

5.6. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis dapat dilihat pada tabel 5.18, 5.19 dan 5.20.

Tabel 5.18. Nilai rerata sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis akibat pemberian AFB₁ pada berbagai dosis dan lama pemberian 100 sel.

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (μg)			
	0	10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	0,50 ± 0,54	5,38 ± 1,77	6,38 ± 2,13	7,75 ± 2,25
16 minggu	0,38 ± 0,74	10,50 ± 2,67	9,13 ± 2,74	9,13 ± 2,36
20 minggu	0,25 ± 0,46	8,0 ± 1,77	7,88 ± 2,10	7,75 ± 2,05

Dari tabel 5.18 dapat disimpulkan bahwa sel hati yang mengalami apoptosis telah terjadi selama 12 minggu, pada pemberian AFB₁ dengan dosis 0 μg selama 12 minggu. Sel hati yang mengalami apoptosis akan meningkat sampai pemberian AFB₁ 10 μg selama 16 minggu, tetapi setelah itu peningkatan dosis dan lama pemberian AFB₁ tidak menunjukkan peningkatan sel hati yang mengalami apoptosis. Untuk mengetahui kemaknaan perbedaan sel hati yang mengalami apoptosis berdasarkan dosis, lama pemberian, interaksi dosis dan lama pemberian dilakukan uji Tukey HSD

Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap sel hati yang mengalami apoptosis dapat dilihat pada tabel 5.19.

Tabel 5.19. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (µg)			
	0	10	15	20
Sel Mengalami Apoptosis	0,37 ^a	8,13 ^b	7,79 ^b	8,21 ^b
Simpangan Baku	0,58	2,95	2,52	2,23

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.19 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis antara tikus-tikus putih yang diberi dosis 10 µg AFB₁, 15 µg AFB₁ dan 20 µg AFB₁ dengan sel hati tikus putih yang tidak mendapat AFB₁ ($p=0,000$). Dari tabel 5.19 juga dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara sel hati yang mengalami apoptosis pada pemberian 10 µg dengan sel hati yang mengalami apoptosis pada pemberian 15 µg ($p=0,935$) serta sel hati yang mengalami apoptosis pada pemberian 20 µg ($p=0,999$). (lihat lampiran 5b).

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap sel hati yang mengalami apoptosis dapat dilihat pada tabel 5.20.

Tabel 5.20. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan lama pemberian AFB₁.

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Sel Mengalami Apoptosis	5,00 ^a	7,28 ^b	6,09 ^a
Simpangan Baku	3,26	4,63	3,81

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.20 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis pada pemberian AFB₁ selama

16 minggu dengan pemberian AFB₁ selama 12 minggu ($p=0.000$) dan pemberian AFB₁ selama 16 minggu dengan pemberian AFB₁ selama 20 minggu ($p=0.045$)

Dari tabel 5.20 juga dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$) antara sel hati yang mengalami apoptosis pada pemberian selama 12 minggu dan 20 minggu (lihat lampiran 5b)

Hasil analisis pengaruh interaksi antara pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis dapat dilihat pada tabel 5.21

Tabel 5.21. Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁

Dosis	Lama	0			10			15			20		
		12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
0	12	-	ns	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	16	-	ns	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	20	-	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
10	12	-	-	-	s	ns	ns	s	ns	ns	ns	s	ns
	16	-	-	-	s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	20	-	-	-	s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
15	12	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	16	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	20	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
20	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns

ns = Non signifikan ($p > 0,05$), s = Signifikan ($p < 0,05$)

Dari tabel 5.21 dapat disimpulkan bahwa sel hati yang mengalami apoptosis berbeda bermakna diantara tikus putih yang mendapat AFB₁ dengan dosis 10 μ g, 15 μ g dan 20 μ g selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu dengan kelompok tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu ($p=0.000$). Dari tabel 5.21 juga dapat disimpulkan bahwa sel hati yang mengalami apoptosis pada tikus putih yang diben AFB₁ dengan dosis 10 μ g selama 12 minggu berbeda bermakna ($p=0.000$) dengan dosis 10 μ g selama 16 minggu, berbeda

bermakna ($p=0.012$) dengan dosis 15 μg selama 16 minggu, berbeda bermakna ($p=0.012$) dengan dosis 20 μg selama 16 minggu. Sel hati yang mengalami apoptosis juga berbeda bermakna ($p=0,002$) pada tikus yang mendapat AFB₁ dengan dosis 10 μg selama 16 minggu dengan pemberian AFB₁ selama 12 minggu dosis 15 μg . Juga dapat disimpulkan bahwa sel hati yang mengalami apoptosis tidak berbeda bermakna pada tikus yang mendapatkan AFB₁ dengan dosis 20 μg selama 20 minggu dengan pemberian AFB₁ dengan sel hati yang mengalami apoptosis pada tikus yang mendapatkan AFB₁ dengan dosis 10 μg dan 15 μg dengan lama pemberian 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Demikian juga sel hati yang mengalami apoptosis pada tikus yang mendapatkan AFB₁ dengan dosis 20 μg selama 20 minggu juga tidak berbeda bermakna dengan sel hati yang mengalami apoptosis pada tikus yang mendapatkan AFB₁ selama 12 minggu dan 16 minggu dengan dosis 20 μg (lihat lampiran 5b).

5.7. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia

Hasil analisis pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia dapat dilihat pada tabel 5.22, 5.23, 5.24 an 5.25

Tabel 5.22. Nilai rerata sel hati tikus putih yang mengalami displasia akibat pemberian AFB₁ pada berbagai dosis dan lama pemberian : 50 sel.

Lama Pemberian	Dosis pemberian AFB ₁ (μg)			
	0	10	15	20
	Rerata	Rerata	Rerata	Rerata
12 minggu	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
16 minggu	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	3,38 \pm 1,84	5,62 \pm 3,16
20 minggu	0 \pm 0,00	0,88 \pm 0,84	5,88 \pm 4,36	8,63 \pm 6,94

Dari tabel 5.22 dapat disimpulkan displasia sel hati tikus putih telah mulai terjadi pada pemberian AFB₁ selama 20 minggu dengan dosis 10 µg. Hasil yang didapat kemudian diuji dengan ANAVA. Untuk mengetahui kemaknaan perbedaan sel hati yang mengalami displasia berdasarkan dosis, lama pemberian dan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ dilakukan uji Tukey HSD.

Hasil analisis pengaruh dosis AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia dapat dilihat pada tabel 5.23

Tabel 5.23 Tingkat kemaknaan sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan dosis pemberian AFB₁.

	Dosis AFB ₁ (µg)			
	0	10	15	20
Sel Hati Mengalami Displasia	0 ^a	0,29 ^a	3,08 ^b	4,75 ^b
Simpangan Baku	0	0,62	3,59	5,57

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.23 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara sel hati yang mengalami displasia antara tikus-tikus putih yang diberi dosis 15 µg AFB₁ ($p=0,001$) dengan tikus-tikus putih yang diberi AFB₁ dosis 10 µg ($p=0,000$) serta tikus putih yang tidak diberi AFB₁. Hasil analisis menunjukkan pula tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,980$) sel hati yang mengalami displasia antara tikus putih yang diberi AFB₁ 10 µg dengan tikus putih yang tidak diberi AFB₁. Perbedaan tidak bermakna ($p=0,127$) sel hati yang mengalami displasia juga ditunjukkan antara tikus putih yang diberi 15 µg AFB₁ dengan tikus putih yang diberi 20 µg AFB₁. (lihat lampiran 6b)

Hasil analisis pengaruh lama pemberian AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia dapat dilihat pada tabel 5.24

Tabel 5.24 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan lama pemberian AFB₁

	Lama Pemberian AFB ₁ (minggu)		
	12	16	20
Sel Hati Mengalami Displasia	0 ^a	2,25 ^b	3,84 ^c
Simpangan Baku	0	2,98	5,33

Nilai rata-rata yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari tabel 5.24 dapat disimpulkan bahwa lama pemberian AFB₁ 12 minggu berbeda secara bermakna ($p = 0,02$) dengan pemberian AFB₁ selama 16 minggu, serta berbeda bermakna ($p=0,000$) dengan pemberian AFB₁ selama 20 minggu. Pemberian AFB₁ selama 16 minggu juga berbeda bermakna ($p=0,043$) dengan pemberian AFB₁ selama 20 minggu. (lihat lampiran 6b).

Hasil analisis pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia dapat dilihat pada tabel 5.25

Tabel 5.25 Tingkat kemaknaan hasil uji HSD terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia berdasarkan interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁

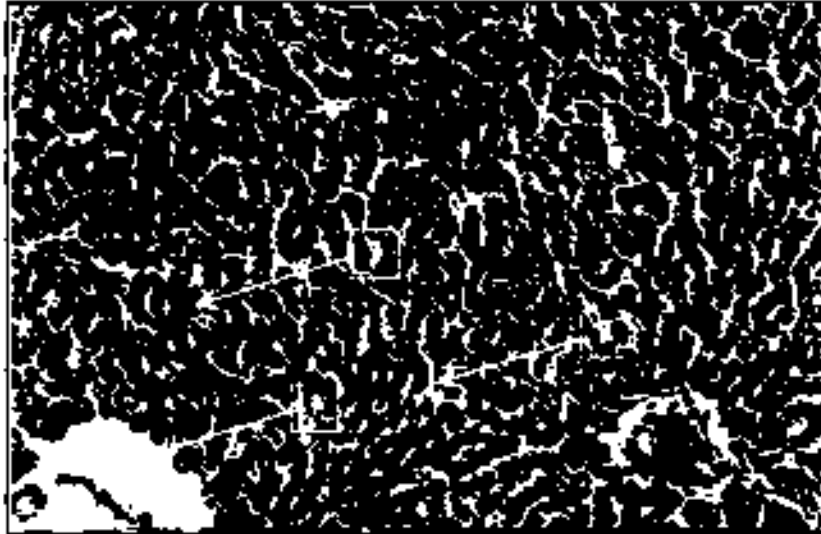
Dosis	0			10			15			20		
	12	16	20	12	16	20	12	16	20	12	16	20
0	12	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	s	ns	s
	16		-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	s	ns	s
	20			-	ns	ns	ns	ns	ns	s	ns	s
10	12			-	ns	ns	ns	ns	s	ns	s	s
	16				-	ns	ns	ns	s	ns	s	s
	20					-	ns	ns	s	ns	s	s
15	12						-	ns	s	ns	s	s
	16							-	ns	ns	ns	s
	20								-	s	ns	ns
20	12									-	s	s
	16										-	ns
	20											-

ns = Non signifikan ($p > 0,05$), s = Signifikan ($p < 0,05$)

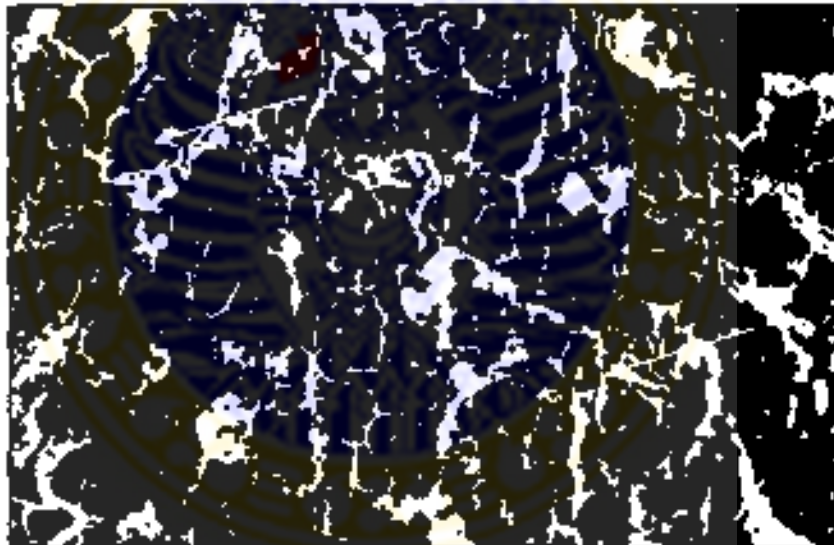
Dari tabel 5.25 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$) antara sel hati yang mengalami displasia antara tikus putih yang tidak diberi AFB₁ dengan tikus putih yang diberi AFB₁ dosis 15 μ g selama 20 minggu,

tikus putih yang diberi AFB₁ 20 µg selama 16 minggu (0,002) dan tikus putih yang diberi AFB₁ selama 20 µg selama 20 minggu (0,000). Dari tabel 5.25 juga dapat disimpulkan bahwa sel hati yang mengalami displasia menunjukkan perbedaan yang bermakna pada tikus yang mendapat AFB₁ 20 µg selama 20 minggu (p=0,001) dengan sel hati yang mengalami displasia pada tikus yang mendapatkan AFB₁ 10 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Sel hati tikus putih yang mengalami displasia juga berbeda bermakna antara tikus putih yang mendapat AFB₁ 20 µg selama 20 minggu dengan tikus yang mendapat AFB₁ 15 µg selama 12 minggu (p=0,000), 16 minggu (p=0,006) serta dengan pemberian 20 µg AFB₁ selama 12 minggu (p=0,000). Pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu juga berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 20 µg selama 16 minggu (p=0,002) (lihat lampiran 6b)

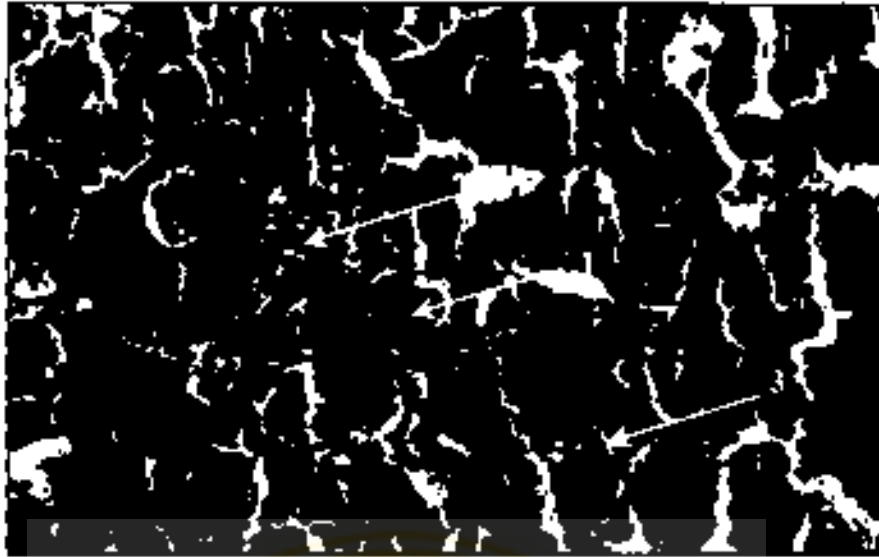
Foto-foto berikut ini menunjukkan jaringan hati tikus putih dari kelompok kontrol sampai kelompok perlakuan yang digunakan untuk pemeriksaan histopatologik, imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi protein p53 dan sel hati yang mengalami apoptosis.



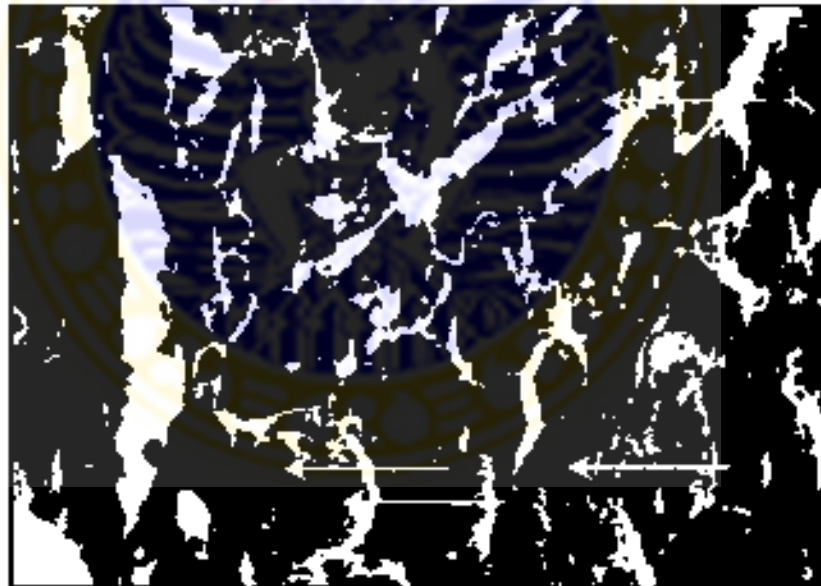
Gambar 5.1. Gambar jaringan hati tikus putih normal yang hanya mendapat pelarut propilen glikol. Sel hati tampak berderet-deret melingkari vena sentralis. 1. Vena Sentralis, 2. Sinusoid, 3. Sel hati. (HE, 200x)



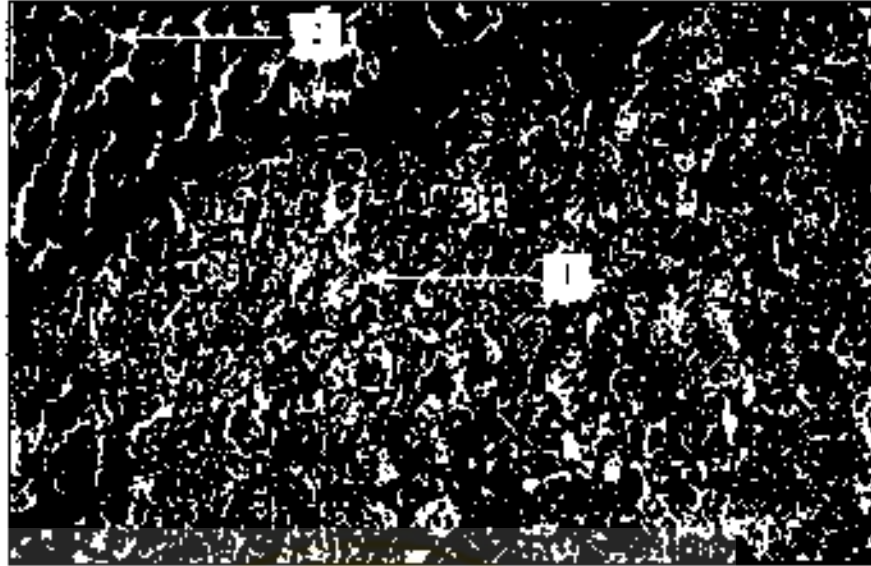
Gambar 5.2. Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ yang mengalami degenerasi bengkak keruh dan degenerasi lemak. 1. Degenerasi Bengkak Keruh, 2. Degenerasi Lemak (HE, 400x)



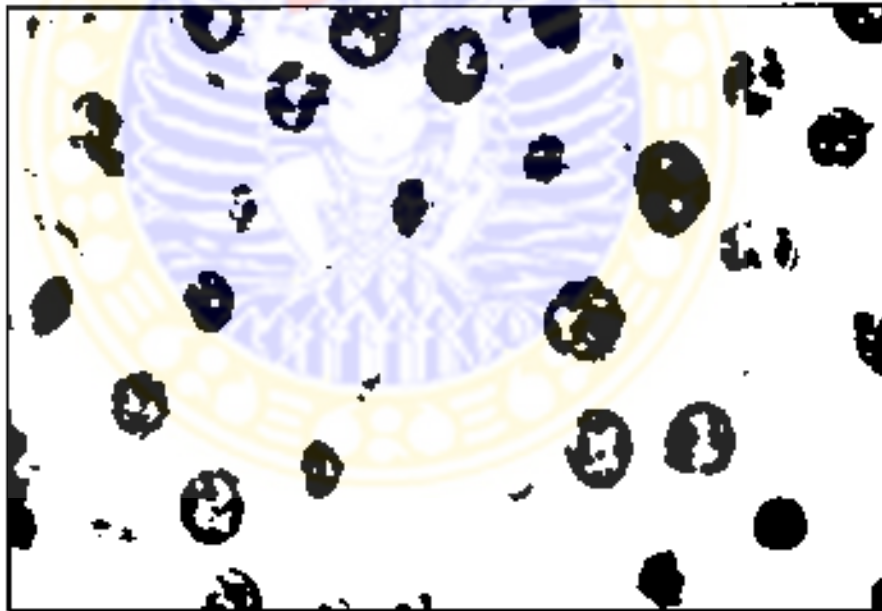
Gambar 5.3 Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ yang mengalami Nekrosis dimana itu mengalami karioreksis, kariolisis dan piknosis. 1. Karioreksis, 2. Kariolisis, 3. Piknosis. (HE, 400x)



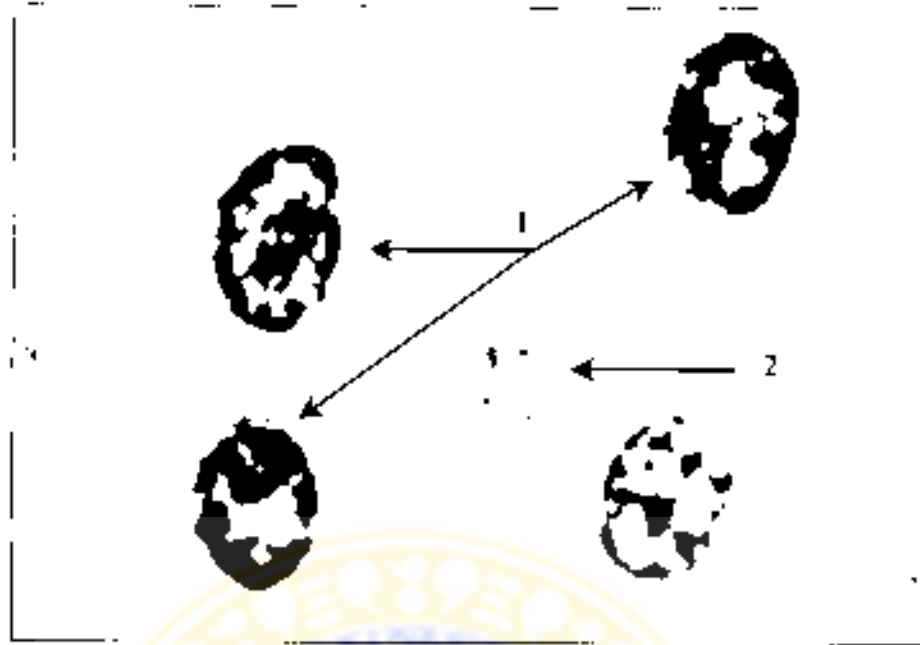
Gambar 5.4. Gambar jaringan hati tikus putih yang mendapat AFB₁ yang mengalami Displasia 1. Sel Normal, 2. Displasia ringan, 3. Displasia sedang dan Displasia berat (He, 400x)



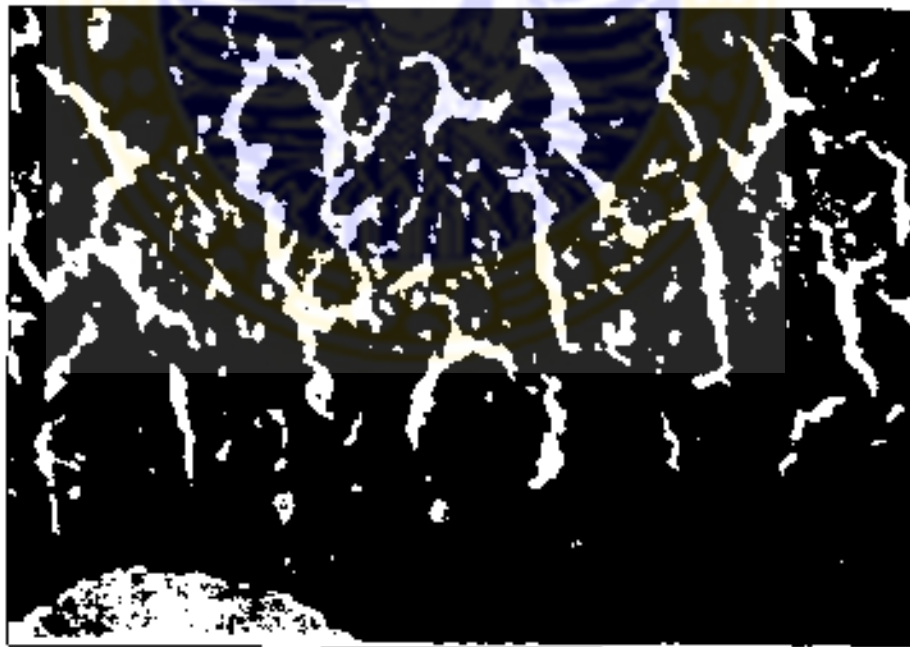
Gambar 5.5. Gambar sel hati tikus putih yang mengalami nekrosis hepari setelah di induksi AFB₁ 20 µg selama 20 minggu. 1. Nekrosis, 2. Sel Normal (HE, 200x)



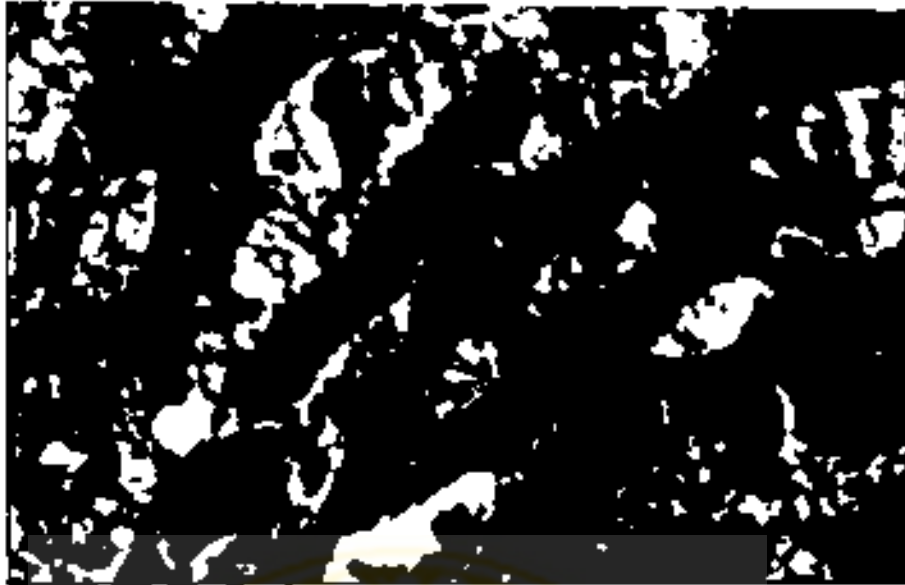
Gambar 5.6. Gambar sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis setelah mendapat AFB₁. Terlihat inti sel berwarna hitam coklat dengan metode *Tunel Assay* (Pembesaran 400x)



Gambar 5.7. Gambaran sel hati tikus puma yang mengalami apoptosis setelah mendapat ALB. Terlihat inti sel berwarna hitam coklat dengan metode pewarnaan *Janus Green*. 1. Sel hati yang mengalami apoptosis 2. Sel hati yang tidak mengalami apoptosis. (Pembesaran 1000x)



Gambar 5.8. Gambaran kondensasi kromatin sel hati tikus puma pada pemeriksaan p53 jaringan hati (Pembesaran 200x)



Gambar 5.9. Gambar sel otak tikus putih yang tidak mengekspresikan p53 yang diwarnai dengan immunohistokimia. Tanpa nukleus tidak mengalami perubahan warna menjadi coklat kemerahan. (Perbesaran 400x)

BAB VI**PEMBAHASAN****6.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap enzim superoksida dismutase dan enzim katalase jaringan hati tikus putih**

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas enzim SOD ataupun enzim katalase jaringan hati tikus putih setelah pemberian AFB₁ dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg selama 12 minggu, 16 minggu maupun 20 minggu. Ini menunjukkan bahwa AFB₁ adalah penghasil ROS yang akan menguras enzim antioksidan tubuh.

Aktivitas enzim SOD pada pemberian AFB₁ 20 µg menurun dan berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ pada dosis 10 µg ($p=0.000$) ataupun pada tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁ ($p=0.000$). Demikian juga dengan pemberian AFB₁ 20 µg akan menurunkan aktivitas enzim katalase yang berbeda nyata ($p=0.000$) dengan enzim katalase yang diberi AFB₁ 10 µg ataupun pada tikus putih yang tidak mendapatkan AFB₁ ($p=0.000$). Dengan metode yang sama penurunan enzim SOD dan katalase jaringan hati ini juga didapatkan oleh Narasimhan et al. (2000) dengan menyuntikkan AFB₁ 500 ppb yang dilarutkan dalam minyak 50 µl secara i.p selama 10 hari. Penurunan enzim anti oksidan tubuh ini berhubungan dengan meningkatnya senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan oleh AFB₁.

Peningkatan senyawa oksigen reaktif yang diakibatkan oleh pemberian AFB₁ yang terus menerus, disebabkan oleh karena efek samping yang terjadi akibat proses

oksidatif pada biotransformasi AFB₁ oleh sitokrom P-450. Efek samping tersebut adalah pembentukan O₂⁻ dan H₂O₂ pada rantai 4 dan 5 dari reaksi substrat hidroksilasi oleh sitokrom P-450. Makin meningkat induksi AFB₁, maka semakin banyak sitokrom P-450 yang diperlukan untuk melakukan proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁. Akibatnya akan semakin banyak pula senyawa oksigen reaktif yang terjadi. Hal ini telah dibuktikan oleh Lestana (1997) dengan memberikan AFB₁ 15 µg selama 8 minggu dan 16 minggu pada tikus percobaan dapat meningkatkan sitokrom P-450 yang berbeda secara bermakna ($p < 0.001$) dengan sitokrom P-450 pada tikus putih percobaan yang tidak diberi AFB₁.

O₂⁻ yang terbentuk akan dihancurkan oleh enzim *superoxide dismutase (SOD)* dengan mengubahnya menjadi H₂O₂ yang nantinya akan dihancurkan pula oleh enzim katalase dan enzim glutathion peroksidase menjadi H₂O dan O₂. Walaupun demikian, pada konsentrasi H₂O₂ yang tinggi, ternyata enzim katalase memainkan peranan penting di dalam perolehan tambahan respon adaptasi sel terhadap stres oksidatif (Mates and Jimenez, 1999). Di samping itu aktivitas enzim katalase paling tinggi terdapat pada hati. Oleh karena itu, penelitian ini hanya akan meneliti enzim katalase saja mengingat pembentukan H₂O₂ yang akan meningkat banyak akibat pemberian AFB₁ sehingga hanya enzim katalase saja yang memainkan peranan penting. Disamping itu pada penelitian ini yang diteliti adalah enzim katalase jaringan hati, dimana hati mempunyai aktivitas katalase yang tinggi.

Hati sebetulnya merupakan organ yang memiliki sistem protektor antioksidan yang terbaik dibandingkan dengan organ lain (Fcher, 1992). Tetapi akibat pemberian AFB₁ yang terus menerus, maka produksi O₂⁻ dan H₂O₂ akan meningkat terus. Semakin banyak AFB₁ yang diberikan, semakin banyak pula O₂⁻ dan H₂O₂ yang

terbentuk. Akibatnya terjadi pula peningkatan kebutuhan enzim SOD dan katalase untuk menetralsir ROS. Dengan demikian enzim SOD dan katalase akan semakin terkuras dan akhirnya akan menurun bila dibandingkan dengan enzim SOD dan katalase pada tikus-tikus putih yang tidak mendapat AFB₁.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa lama pemberian akan menurunkan aktivitas enzim SOD dan katalase baik pada pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu maupun 20 minggu. Makin lama pemberian AFB₁ aktivitas kedua enzim ini akan semakin menurun. Ini menunjukkan bahwa enzim SOD dan katalase akan semakin terkuras untuk menetralsir O₂^{•-} dan H₂O₂ yang terbentuk akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁.

Pemberian AFB₁ dengan dosis 15 µg ternyata tidak menurunkan aktivitas enzim superoksidase dan enzim katalase yang berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg. Ini menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ dengan dosis 15 µg akan menghasilkan O₂^{•-} dan H₂O₂ yang tidak jauh berbeda dengan dosis 10 µg sehingga tidak akan menurunkan aktivitas SOD dan katalase yang jauh berbeda. Untuk ini dianjurkan memberikan AFB₁ hanya pada kelipatan dosis 1 seperti, seperti 10 µg, 20 µg dan 30 µg.

Pemberian AFB₁ selama 16 minggu juga tidak menurunkan secara bermakna aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih bila dibandingkan dengan enzim SOD pada pemberian selama 12 minggu. Ini juga menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ selama 16 minggu menghasilkan O₂^{•-} yang tidak jauh berbeda dengan pemberian selama 12 minggu, sehingga enzim SOD yang digunakan untuk menetralsir O₂^{•-} juga tidak jauh berbeda.

terbentuk. Akibatnya terjadi pula peningkatan kebutuhan enzim SOD dan katalase untuk menetralkan ROS. Dengan demikian enzim SOD dan katalase akan semakin terkuras dan akhirnya akan menurun bila dibandingkan dengan enzim SOD dan katalase pada tikus-tikus putih yang tidak mendapat AFB₁.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa lama pemberian akan menurunkan aktivitas enzim SOD dan katalase baik pada pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu maupun 20 minggu. Makin lama pemberian AFB₁ aktivitas kedua enzim ini akan semakin menurun. Ini menunjukkan bahwa enzim SOD dan katalase akan semakin terkuras untuk menetralkan O₂^{•-} dan H₂O₂ yang terbentuk akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁.

Pemberian AFB₁ dengan dosis 15 µg ternyata tidak menurunkan aktivitas enzim superoksidasase dan enzim katalase yang berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg. Ini menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ dengan dosis 15 µg akan menghasilkan O₂^{•-} dan H₂O₂ yang tidak jauh berbeda dengan dosis 10 µg sehingga tidak akan menurunkan aktivitas SOD dan katalase yang jauh berbeda. Untuk ini dianjurkan memberikan AFB₁ hanya pada kelipatan dosis 1 seperti, seperti 10 µg, 20 µg dan 30 µg.

Pemberian AFB₁ selama 16 minggu juga tidak menurunkan secara bermakna aktivitas enzim SOD jaringan hati tikus putih bila dibandingkan dengan enzim SOD pada pemberian selama 12 minggu. Ini juga menunjukkan bahwa pemberian AFB₁ selama 16 minggu menghasilkan O₂^{•-} yang tidak jauh berbeda dengan pemberian selama 12 minggu. sehingga enzim SOD yang digunakan untuk menetralkan O₂^{•-} juga tidak jauh berbeda.

Hal yang berbeda terlihat pada enzim katalase, dimana pemberian AFB₁ selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu menunjukkan penurunan yang berbeda nyata. Ini mungkin disebabkan enzim katalase harus lebih banyak menetralsir H₂O₂ baik yang dihasilkan oleh kerja enzim SOD yang menetralsir O₂^{•-} ataupun yang dihasilkan secara langsung oleh proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁.

Ditinjau dari pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap aktivitas enzim SOD jaringan hati, ternyata bahwa dosis AFB₁ 20 µg dan lama pemberian 20 minggu menurunkan aktivitas enzim SOD yang berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12 minggu, 16 minggu, pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 minggu dan pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu. Hal yang sama juga terlihat pada penurunan enzim katalase, bahkan enzim ini turun berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 12 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Enzim katalase pada pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu akan turun berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 minggu dan 16 minggu, serta pemberian AFB₁ 20 µg dengan lama 12 minggu. Ini menunjukkan pula bahwa enzim katalase lebih banyak terkuras untuk menetralsir H₂O₂ yang terbentuk baik yang dihasilkan enzim SOD dalam menetralsir O₂^{•-} ataupun H₂O₂ yang langsung dihasilkan akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ yang dikatalisator oleh enzim P-450.

Pemberian pelarut profilen glikol pada kelompok yang tidak mendapat AFB₁ menunjukkan aktivitas enzim SOD dan katalase tidak berbeda secara bermakna baik pada pemberian selama 12 minggu, 16 minggu ataupun 20 minggu. Ini juga menunjukkan bahwa aktivitas enzim SOD dan katalase hanya menurun akibat pemberian AFB₁.

Dari pembahasan mengenai pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap enzim superoksida dismutase dan katalase terbukti bahwa pemberian AFB₁ pada dosis 10 µg selama 12 minggu telah menurunkan aktivitas enzim SOD dan katalase jaringan hati tikus putih. Lama pemberian dan dosis AFB₁ berpengaruh terhadap penurunan aktivitas enzim superoksida dismutase dan katalase jaringan hati tikus putih. Makin tinggi dosis dan makin lama paparan AFB₁, akan semakin menurunkan aktivitas enzim superoksida dismutase dan katalase jaringan hati tikus putih, tetapi penurunan ini akan sangat bermakna bila pada perlakuan diberikan dosis dan lama pemberian yang merupakan kelipatan dari dosis dan lama pemberian pertama.

6.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan terjadi peningkatan kadar MDA jaringan hati tikus putih setelah pemberian AFB₁ 10 µg, 15 µg dan 20 µg baik selama 12 minggu, 16 minggu maupun 20 minggu. Ini menunjukkan ketidakmampuan enzim SOD dan katalase jaringan hati tikus putih menetralsir O₂^{•-} dan H₂O₂ yang terbentuk akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ yang dikatalisator oleh sitokrom P-450 sehingga terbentuk OH[•] suatu bentuk ROS yang sangat berbahaya. OH[•] mempunyai target pada tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu lipid, protein dan DNA. Pada membran lipid OH[•] menimbulkan kerusakan melalui serangkaian kegiatan yang dikenal dengan peroksidasi lipid dan akan menghasilkan produk dekomposisi lipid. Produk ini mempunyai bermacam-macam bentuk, salah satunya adalah malonaldehid. Pada

penelitian ini hanya akan diukur kadar MDA saja, karena mudah dideteksi dengan test TBA yang merupakan satu pemeriksaan yang sederhana, tetapi cukup akurat, karena kenaikan MDA menggambarkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid (Shen, 1994).

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa peningkatan kadar MDA jaringan hati akan semakin meningkat pada peningkatan dosis, dimana pemberian AFB₁ 10 µg akan meningkatkan kadar MDA jaringan hati yang berbeda secara bermakna ($p=0,000$) dengan tikus putih yang mendapat AFB₁ 15 µg ($p=0,001$) dan tikus-tikus putih yang mendapat AFB₁ 20 µg ($p=0,000$). Hasil ini menunjukkan bahwa makin tinggi dosis AFB₁ yang diberikan akan meningkatkan peroksida lipid, sebagai akibat dari semakin ketidak mampuan enzim SOD dan katalase menetralkan $O_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 yang terbentuk akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ yang dikatalisator sitokrom P-450.

Dari hasil penelitian, ternyata pada pemberian AFB₁ 15 µg tidak berbeda secara bermakna ($p=0,34$) dengan kadar MDA pada pemberian 20 µg. Ini disebabkan karena aktivitas SOD juga tidak berbeda pula pada pemberian 15 µg AFB₁ dengan pemberian AFB₁ 20 µg. Demikian juga hasil yang ditunjukkan oleh kadar enzim katalase pada pemberian AFB₁ 10 µg yang lebih berbeda bermakna ($p=0,000$) dengan pemberian AFB₁ 20 µg, dari pada pemberian AFB₁ 15 µg dan pemberian AFB₁ 20 µg ($p=0,001$). Oleh karena $O_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 yang terbentuk tidak akan di netralkan berbeda oleh kedua enzim tersebut pada dosis 15 µg, maka pembentukan OH^{\bullet} juga tidak akan berbeda pula, sehingga peroksidasi lipid yang terjadi juga tidak berbeda. Hal ini ditunjukkan oleh kadar MDA yang terjadi juga tidak berbeda pada

pemberian AFB₁ 15 µg dan 20 µg. Untuk itu juga dianjurkan supaya pemberian AFB₁ hanya pada kelipatan dosis.

Ditinjau dari lama pemberian AFB₁, ternyata semakin lama pemberian AFB₁ akan semakin meningkatkan kadar MDA jaringan hati tikus putih. Ini disebabkan semakin lama pemberian AFB₁ akan semakin meningkatkan pembentukan O₂^{•-} dan H₂O₂ akibat proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ oleh sitokrom P-450. Hal ini akan menyebabkan semakin banyaknya enzim SOD dan katalase jaringan hati tikus putih yang terkuras untuk menetralsir O₂^{•-} dan H₂O₂ yang terbentuk, sehingga akan mengakibatkan aktivitas kedua enzim ini makin lama makin menurun.

Dan hasil penelitian, ternyata pemberian AFB₁ selama 12 minggu akan meningkatkan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang berbeda secara bermakna ($p=0,000$) dengan pemberian AFB₁ selama 20 minggu, tetapi tidak berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ selama 16 minggu ($p=0,111$). Hal ini juga berhubungan dengan penurunan enzim SOD yang tidak berbeda secara bermakna pada pemberian AFB₁ selama 16 minggu. Akibatnya H₂O₂ yang terbentuk juga tidak akan berbeda bermakna, sehingga pembentukan OH[•] juga tidak berbeda bermakna. Pembentukan OH[•] yang tidak berbeda bermakna ini akan mengakibatkan peroksidasi lemak juga tidak berbeda bermakna yang ditandai oleh kadar MDA yang tidak berbeda bermakna pula. Untuk mendapatkan hasil yang lebih berbeda bermakna, maka dianjurkan untuk memberikan AFB₁ dengan lama pemberian kelipatan lama pemberian pertama.

Ditinjau dari pengaruh interaksi dosis dan pemberian AFB₁ terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih, ternyata pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12 minggu. 16

minggu dan 20 minggu, dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 minggu dan 20 minggu, serta dengan pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu dan 16 minggu. Hal ini berbeda dengan penurunan SOD dan katalase jaringan hati tikus putih yang diberi 20 µg selama 20 minggu yang hanya berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12, 16, dan 20 minggu serta pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 dan 16 minggu serta 20 µg selama 12 minggu. Hal ini mungkin disebabkan selain faktor merendahnya SOD dan katalase yang menetralkan O₂^{•-} dan H₂O₂, menurut Shen et al., (1994) peroksidasi lipid juga terjadi akibat 8-9 epoksid AFB₁ yang terbentuk pada fase I biotransformasi AFB₁ berikatan dengan fosfolipid membran sel, sehingga akan meningkatkan peroksidasi lipid.

Dari hasil pengaruh interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁ terhadap kadar AFB₁ dapat disimpulkan bahwa pemberian AFB₁ pada dosis 10 µg selama 12 minggu telah meningkatkan kadar MDA jaringan hati tikus putih. Lama pemberian dan dosis AFB₁ berpengaruh terhadap kadar MDA jaringan hati tikus putih. Semakin lama pemberian dan semakin tinggi kadar dosis AFB₁ yang diberikan akan semakin meningkatkan kadar MDA jaringan hati tikus putih, tetapi peningkatan ini akan sangat bermakna bila kadar perlakuan diberikan dosis dan lama pemberian yang merupakan kelipatan dari lama dan dosis pemberian yang pertama.

Dari penelitian juga dapat dilihat bahwa MDA terdapat pada jaringan hati tikus putih yang tidak mendapat AFB₁ walaupun kadar MDA ini tidak berbeda secara bermakna pada pemberian 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Ini disebabkan peroksidasi lemak juga terjadi pada keadaan normal dengan kadar yang rendah. Hal ini juga ditegaskan oleh Maragon et al., (1998) bahwa peroksidasi lipid terjadi terus menerus pada orang normal. Dalam keadaan normal, mitokondria secara

kuantitatif merupakan tempat produksi utama ROS di dalam sel. Walaupun dikontrol dengan ketat oleh enzim anti oksidan tubuh ataupun oleh anti oksidan non enzimatik, tetapi peroksidasi lemak ini terjadi juga dalam kadar yang rendah, sehingga akan menghasilkan pembentukan MDA.

6.3. Pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap kerusakan sel hati

Pemeriksaan secara makroskopik dapat dilihat bahwa warna hati pada tikus putih yang tidak mendapat AFB₁ terlihat berwarna coklat kemerahan, warna yang terdapat pada hati yang normal. Pemberian AFB₁ 10 µg, 15 µg dan 20 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu pada tikus putih percobaan akan merubah warna hati mulai dari coklat pucat kekuningan sampai coklat kekuningan dengan belang putih. Warna pucat kekuningan disebabkan oleh karena sel hati mengalami degenerasi, sedangkan warna kuning dengan belang putih disebabkan karena sel hati sudah mengalami nekrosis (Cotran et al., 1999). Warna hati kekuningan dengan belang putih terlihat makin meningkat dengan makin lamanya pemberian dan makin meningkatnya dosis AFB₁. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel hati yang mengalami kerusakan dengan makin meningkatnya dosis dan lama pemberian AFB₁. Pada pemeriksaan secara makroskopik tidak ditemukan nodul-nodul yang menandakan telah terjadi keganasan.

Secara mikroskopik, dari hasil penelitian didapatkan bahwa kerusakan sel hati tikus putih berbeda secara bermakna antara pemberian AFB₁ 10 µg, 15 µg dan 20 µg dengan tikus-tikus putih yang tidak mendapat AFB₁. Demikian pula dengan lama pemberian, kerusakan sel hati ternyata berbeda bermakna antara pemberian 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu. Bila dihubungkan dengan kadar MDA jaringan

hati, ternyata kerusakan sel hati lebih tinggi dan pada kadar MDA yang merusak membran lipid. Ini menunjukkan bahwa kerusakan sel hati tidak saja disebabkan oleh peroksidasi lipid, tapi juga disebabkan oleh banyak faktor.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terlihat degenerasi bengkak keruh pada pemberian AFB₁ pada semua dosis dan pada setiap lamanya pemberian. Hal ini disebabkan terjadinya deplesi ATP yang disebabkan peningkatan aktivasi PARP sebagai akibat putusnya rantai DNA yang disebabkan kerusakan oksidatif DNA. Kerusakan mitokondria juga menyebabkan menurunkan pembentukan ATP, dimana mitokondria merupakan satu-satunya organella yang mensintesis ATP. Deplesi ATP dan memanjangnya aktivitas ATPase akan menyebabkan sistem pompa natrium berkurang, sehingga ion Na akan berakumulasi di dalam sel. Hal ini menimbulkan peningkatan konsentrasi ion Na dan tekanan osmosis intra seluler meningkat, sehingga terjadi pemasukan air ke dalam sel yang ditandai oleh membengkaknya sel dan dilatasi retikulum endoplasma. Keadaan ini diperparah lagi oleh kerusakan membran sel akibat peroksidasi lipid yang meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga membran sel bisa dilalui oleh ion-ion yang dalam keadaan normal tidak boleh melalui membran sel.

Sel yang dipapari dengan stres oksidatif yang kuat akan mengalami kematian. Hal ini berhubungan dengan ketersediaan ATP intra seluler. Bila ATP intra seluler tidak tersedia, maka akan terjadi kematian sel melalui program nekrosis. Keadaan ini terjadi juga di dalam penelitian ini, dimana didapatkan bahwa sel hati mengalami nekrosis pada setiap pemberian AFB₁ dan pada setiap lama pemberian, dimana makin lama pemberian dan semakin meningkat dosis akan menambah kematian sel.

Dengan ini dapat disimpulkan bahwa kematian sel hati akibat paparan AFB₁ ini disebabkan oleh beberapa faktor

1. Stres oksidatif yang kuat akan mengakibatkan penipisan ATP semakin buruk, sehingga sitoskeleton akan terurai
2. Peningkatan ROS yang dihasilkan oleh induksi AFB₁ juga akan meningkatkan aktivasi PARP, sehingga terjadi depleksi NAD⁺ atau NADP⁺. Akibatnya sel tidak dapat lagi membuat ATP yang akan menyebabkan sel menjadi mati.
3. Penyebab kematian sel yang lain adalah karena peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler yang akan mengubah sejumlah aktivitas enzim yang berpotensi merusak sel, seperti fosfolipase, protease dan endonuklease.
4. Akibat induksi AFB₁ yang meningkatkan pembentukan ROS akan menimbulkan pembengkakan mitokondria, yang akan mempercepat kematian sel karena terbukanya porus antara membran dalam dan luar mitokondria. Pembukaan porus ini akan menyebabkan tumpahnya isi matriks mitokondria, sehingga fosforilasi oksidatif mitokondria mengalami krisis.
5. Peningkatan MDA yang menandakan peningkatan peroksidasi lipid juga mempercepat kematian sel hati dengan cara meningkatkan permeabilitas membran sel.

Ditinjau dari interaksi dosis dan lama pemberian AFB₁, ternyata kerusakan sel hati pada tikus putih yang mendapat AFB₁ 20 µg selama 20 minggu, berbeda bermakna dengan kerusakan sel hati pada tikus yang mendapat AFB₁ 10 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu, serta pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu serta pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu

dan 16 minggu. Hal ini juga membuktikan bahwa semakin lama pemberian AFB₁ semakin tinggi kerusakan sel hati tikus putih.

Kerusakan struktur sel hati biasanya diawali oleh pembengkakan sel termasuk organela-organela sel, kemudian diikuti oleh vakulola-vakuola dalam sitoplasma yang diikuti oleh pecahnya sel serta organela-organela. Keadaan ini disebut *enosis* yaitu perubahan *prelethal* yang mendahului kematian sel dalam bentuk nekrosis (Cotran et al., 1999). Pada penelitian juga didapatkan kerusakan sel hati pada tikus yang mendapat AFB₁ 10 µg selama 12 minggu lebih banyak sel hati yang mengalami degenerasi bengkak keruh. Makin tinggi dosis pemberian AFB₁ dan makin lama pemberian AFB₁ degenerasi bengkak keruh makin berkurang, tetapi sel hati yang mengalami nekrosis bertambah banyak. Hal ini menunjukkan makin tinggi pembentukan ROS makin tinggi terjadi peroksidasi lipid, makin tinggi terjadi disregulasi Ca²⁺, makin tinggi terjadi kerusakan mitokondria dan makin tinggi deplesi ATP sehingga akan meningkatkan pula kerusakan sel hati tikus putih.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa AFB₁ adalah hepatotoksin yang sangat kuat yang menyebabkan kerusakan sel hati melalui pembentukan ROS yang dihasilkan proses oksidatif biotransformasi AFB₁ oleh sitokrom P-450, sehingga terjadi kerusakan membran plasma, kerusakan mitokondria, disregulasi Ca²⁺ dan deplesi ATP. Kerusakan sel hati ini juga akan diperparah oleh kerusakan oksidatif protein dan kerusakan oksidatif DNA. Semakin lama dan semakin tinggi dosis AFB₁ yang diberikan, akan menyebabkan semakin tinggi kerusakan sel hati tikus putih akibat ROS yang dihasilkan oleh proses oksidatif biotransformasi AFB₁.

6.4. Pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap ekspresi protein p53 dan apoptosis

Akibat ketidak mampuan enzim SOD dan katalase meredam pembentukan O₂[•] dan H₂O₂ maka akan terbentuk OH[•] yang merupakan suatu bentuk ROS yang berbahaya. Salah satu target serangan OH[•] adalah DNA yang menimbulkan kerusakan oksidatif DNA, sehingga terjadi perubahan material genetik. Perubahan material genetik yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif DNA akan meningkatkan ekspresi protein p53 wt sebagai faktor transkripsi.

Pada penelitian ini, tidak ditemukan peningkatan ekspresi p53 wt untuk semua dosis dan lama pemberian AFB₁. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena pada penelitian ini deteksi p53 wt dilakukan dengan imunohistokimia, dimana protein p53 wt mempunyai *half life* yang pendek, sehingga kadarnya rendah dalam jaringan hati, karena cepat dimetabolisme (van Gijssel et al., 1997). Untuk ini dianjurkan mendeteksi protein p53 yang teraktivasi akibat perubahan material genetik DNA dengan menggunakan teknik immuno presipitasi seperti metode yang dilakukan Van Gijssel et al., ataupun seperti metode Yang and Hughes. Demikian juga pada pemberian AFB₁ selama 16 minggu dengan dosis 15 µg, dimana telah terjadi displasia sel hati, ekspresi p53 belum juga didapatkan.

Kegagalan protein p53 melakukan perbaikan DNA akan mendorong sel untuk melakukan apoptosis. Dari hasil penelitian, didapatkan bahwa apoptosis yang terjadi pada sel hati dengan pemberian AFB₁ dengan dosis 10 µg, 15 µg dan 20 µg tidak berbeda bermakna. Demikian juga dengan lama pemberian, ternyata pemberian AFB₁ selama 12 minggu dan 20 minggu tidak berbeda secara bermakna, sedangkan

pemberian AFB₁ selama 16 minggu berbeda secara bermakna dengan pemberian 12 minggu dan 20 minggu

Dengan hasil ini dapat dijelaskan bahwa sel-sel hati yang mengalami apoptosis akibat pemberian AFB₁ terjadi melalui 2 jalur yaitu jalur p53 dan jalur kerusakan mitokondria. Kerusakan mitokondria akibat peningkatan OH[•] akan menyebabkan peningkatan Ca²⁺ intra seluler yang akan mengaktifkan Ca²⁺ dependent endonuklease sehingga terjadi fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin, suatu hal yang penting untuk terjadinya apoptosis. OH[•] juga akan menyebabkan kerusakan mitokondria sehingga porus antara membran dalam dan luar mitokondria akan terbuka. Akibatnya sitokrom C akan tumpah ke dalam sitoplasma yang akan mengaktifkan caspase 9 yang menyebabkan fragmentasi DNA sehingga mencetuskan apoptosis.

Seandainya apoptosis hanya disebabkan oleh ROS yang menyebabkan kerusakan mitokondria dan peningkatan Ca²⁺ intraseluler, maka dengan meningkatnya dosis dan pemberian AFB₁ akan makin meningkatkan kerusakan mitokondria dan Ca²⁺ intraseluler yang akan meningkatkan pula apoptosis. Tetapi hal ini tidak terjadi. Disini protein p53 yang menginduksi apoptosis nampaknya berperan walaupun tidak terdeteksi.

Peranan p53 menstimulasi apoptosis dimulai dengan teraktivasi p53 oleh kerusakan oksidatif DNA akibat pemberian AFB₁. Aktivasi ini akan mengaktifkan gen-gen yang akan menginduksi apoptosis seperti bax dan IGF-BP3. Teraktivasi p53 akan memicu apoptosis yang mencapai puncak pada pemberian AFB₁ 10 µg selama 16 minggu. Ini dapat dihubungkan dengan telah terjadinya displasia pada sel hati. Pada pemberian dosis 10 µg selama 16 minggu, dengan pemeriksaan

mikroskopik sel hati belum menampakkan displasia. Ini menunjukkan aktivitas p53 masih baik sebagai penginduksi apoptosis tetapi pada pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu dengan pemeriksaan mikroskopik sel hati telah menampakkan displasia. Ini menunjukkan bahwa protein p53 telah mulai gagal dalam menginduksi apoptosis. Akibatnya sel yang mengalami apoptosis pada pemberian 15 µg selama 16 minggu sudah mulai berkurang, walaupun pengurangan itu tidak berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 16 minggu (P=0,959).

Sel-sel yang mengalami apoptosis juga tidak berbeda bermakna antara pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12, 16 dan 20 minggu. Ini juga menerangkan peranan p53 dalam menginduksi apoptosis. Pada pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu telah terjadi displasia yang hebat yang mengindikasikan kegagalan p53 dalam menginduksi apoptosis. Apoptosis yang masih terjadi hanya disebabkan oleh karena kerusakan mitokondria yang hebat dan peningkatan Ca²⁺ intra seluler serta sisa-sisa p53 yang aktif. Pada pemberian AFB₁ 10 µg selama 12 minggu, 16 minggu dan 20 minggu, apoptosis yang terjadi disebabkan oleh kerusakan mitokondria dan peningkatan Ca²⁺ intra seluler serta aktivasi p53. Akibatnya apoptosis yang dihasilkan antara pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu tidak berbeda secara bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12, 16 dan 20 minggu karena peningkatan dosis hanya akan meningkatkan kerusakan mitokondria dan Ca²⁺ intra seluler tetapi tidak aktivasi p53. Apoptosis yang terjadi pada pemberian AFB₁ 20 µg juga tidak berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 minggu, 16 minggu ataupun 20 minggu. Ini mungkin disebabkan pembentukan OH[•] yang tidak berbeda bermakna.

Sel hati yang mengalami apoptosis pada pemberian $10 \mu\text{g}$ selama 12 minggu berbeda bermakna dengan pemberian AFB_1 $10 \mu\text{g}$ selama 16 minggu. Hal ini bisa diterangkan karena pada dosis $10 \mu\text{g}$ selama 16 minggu sel hati tikus putih belum mengalami displasia, sehingga p53 masih aktif menginduksi apoptosis, di samping terjadinya kerusakan mitokondria serta peningkatan Ca^{2+} intraseluler akibat peningkatan pembentukan OH \cdot , dimana pembentukan OH \cdot lebih besar pada pemberian AFB_1 $10 \mu\text{g}$ selama 12 minggu. Pemberian AFB_1 $15 \mu\text{g}$ selama 16 minggu juga berbeda bermakna ($p = 0.012$) dengan pemberian AFB_1 $10 \mu\text{g}$ selama 12 minggu. Ini disebabkan karena pada pemberian AFB_1 $15 \mu\text{g}$ selama 16 minggu sel hati baru mengalami displasia yang menandakan p53 yang gagal menginduksi apoptosis belum begitu banyak, akibatnya sel hati yang mengalami apoptosis disebabkan oleh kerusakan mitokondria, peningkatan Ca^{2+} serta aktivasi protein p53. Demikian juga dengan pemberian AFB_1 $20 \mu\text{g}$ selama 16 minggu, displasia yang terjadi tidak berbeda bermakna dengan displasia yang terjadi dengan pemberian AFB_1 $15 \mu\text{g}$ selama 16 minggu ($p = 0.745$). Keadaan ini juga menunjukkan p53 yang gagal menginduksi apoptosis belum banyak, sehingga akan menginduksi apoptosis lebih banyak dan pemberian AFB_1 $10 \mu\text{g}$ selama 12 minggu. Untuk mengetahui aktivitas protein p53 dalam menginduksi apoptosis dianjurkan untuk mendeteksi protein yang terlibat dalam terjadinya apoptosis seperti Bax dan caspase.

Apoptosis juga terlihat pada tikus-tikus putih yang tidak diberi AFB_1 . Ini menunjukkan bahwa apoptosis dapat terjadi pada proses biologi normal sebagai bentuk sel mempertahankan diri.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh lama pemberian dan dosis AFB₁ terhadap sel hati yang menunjukkan ekspresi p53 dan sel hati yang mengalami apoptosis. Dengan ini maka hipotesis ke 4 ditolak.

6.5. Pengaruh lama pemberian dan kadar AFB₁ terhadap sel hati tikus putih yang mengalami displasia

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa sel hati yang mengalami displasia berbeda bermakna pada pemberian AFB₁ 10 µg dengan pemberian AFB₁ 15 µg dan 20 µg, sedangkan pemberian AFB₁ 15 µg tidak berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 20 µg. Ini juga memberi bukti bahwa pemberian AFB₁ 15 µg tidak efektif sehingga dianjurkan hanya memberi dosis kelipatan dari dosis I.

Lama pemberian ternyata sangat berpengaruh untuk terjadinya displasia sel hati tikus putih. Pada penelitian ini ternyata pemberian AFB₁ 20 minggu berbeda sangat bermakna dengan pemberian 12 minggu dan 16 minggu. Walaupun berbeda bermakna ($p=0,043$) antara pemberian 16 minggu dengan 20 minggu tetapi sel hati yang mengalami displasia lebih berbeda bermakna ($p=0,000$) antara pemberian 12 minggu dan 20 minggu. Dengan ini juga dibuktikan bahwa untuk mendapatkan hasil yang lebih bermakna dianjurkan lama pemberian [dan] merupakan kelipatan pemberian I.

Displasia merupakan suatu keadaan dimana sel sudah mengalami lesi DNA yang permanen dan merupakan bentuk inisiasi untuk terjadinya neoplasma. Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa intake AFB₁ yang tinggi akan menimbulkan HCC yang tinggi disertai mutasi gen p53 yang tinggi, seperti yang dikemukakan oleh Tabor and Kobayashi (1994) dan Smella et al., (2001). Pada

penelitian ini dimana sel hati sudah mengalami displasia tidak ditemukan mutasi gen p53 dengan pemeriksaan imunohistokimia. Padahal sensitivitas imunohistokimia untuk pemeriksaan mutasi p53 adalah 75 % dengan ketepatan 63 %.

Tidak terdeteksinya p53 dengan pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini dapat disebabkan oleh hal-hal sebagai berikut

1. p53 tidak mengalami mutasi, dimana yang mengalami mutasi adalah gen yang termasuk onkogen yang bersifat memacu pertumbuhan. p53 hanya kehilangan fungsi sebagai gen tumor supresor yang menghambat pertumbuhan sel yang berlebihan akibat aktivasi gen-gen yang menyebabkan proliferasi sel. Oleh karena p53 yang mengalami inaktivasi adalah p53 wt, maka p53 tidak akan terdeteksi dengan imunohistokimia karena *half life* nya yang pendek
2. Mutasi p53 yang terjadi pada hewan percobaan yang dipapari AFB₁ hanya akan terjadi bila terdapat faktor-faktor yang meningkatkan mutasi p53. Hal ini telah dibuktikan oleh Ghebranius and Sell (1998) mendapatkan mutasi gen p53 pada anak-anak tikus putih yang mempunyai HBsAg positif bila diberikan AFB₁. Lee et al. (1998) juga mendapatkan mutasi gen p53 pada tikus-tikus putih yang diberi AFB₁ setelah terlebih dahulu dilakukan sebagian hepatektomi. Demikian juga dengan Park et al. (2000) mendapatkan mutasi gen p53 pada tupai-tupai yang menderita HCC setelah diberi AFB₁ dan HBV. Penelitian pada manusia juga menunjukkan bahwa mutasi gen p53 yang terjadi pada HCC akibat paparan AFB₁ yang tinggi biasanya terjadi pada daerah yang mempunyai faktor resiko HBV yang tinggi (Stern et al., 2001)
3. Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa over ekspresi p53 pada penderita HCC berhubungan dengan fenotip yang invasif dari tumor. Disamping itu juga

berhubungan dengan diferensiasi yang jelek dari tumor dan metastasis intra hepatic. Jadi over ekspresi p53 terdapat pada stadium lanjut HCC (Lin and Fan, 2006). Berhubung pada penelitian ini baru terjadi displasia sel hati yang merupakan stadium dini dari HCC, kemungkinan gen p53 belum mengalami mutasi sehingga tidak terdeteksi dengan pemeriksaan imunohistokimia.

Dari hasil penelitian para peneliti diatas dapat disimpulkan bahwa mutasi gen p53 tidak hanya disebabkan oleh AFB₁, tetapi diperlukan faktor-faktor lain yang meningkatkan mutasi gen p53 seperti keberadaan HBVx, protein yang menyandi HBV, yang akan meningkatkan frekwensi induksi mutasi yang disebabkan oleh AFB₁. Hal ini terjadi karena protein HBVx berikatan ke regio terminal C p53, sehingga akan menghambat fungsi p53 sebagai aktivator transkripsi. Lee et al. (1998) berpendapat bahwa proses regenerasi pada sel hati yang mengalami hepatektomi merupakan faktor yang meningkatkan mutasi gen p53 pada tikus putih yang diberi AFB₁. Di samping itu mutasi gen p53 juga terjadi pada stadium lanjut dari HCC. Hal-hal inilah yang mungkin menyebabkan dimana gen p53 tidak terdeteksi pada tikus-tikus putih yang sudah mengalami displasia.

Interaksi antara lama pemberian dan dosis AFB₁ pada penelitian menunjukkan bahwa tikus-tikus putih yang tidak diberi AFB₁, sel hati yang mengalami displasia tidak berbeda bermakna dengan tikus putih yang diberi AFB₁ 10 µg selama 12, 16 dan 20 minggu ataupun pada tikus putih yang diberi AFB₁ 15 µg selama 12 dan 16 minggu serta pada pemberian AFB₁ 20 minggu. Ini disebabkan karena pemberian AFB₁ pada waktu di atas belum ada sel hati yang menunjukkan displasia, kecuali pada pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu telah ada sel hati yang menunjukkan displasia, tetapi hanya 1 atau 3 sel saja.

Displasia yang hebat dan berat terjadi pada pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu yang berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12, 16 dan 20 minggu, pemberian AFB₁ 15 µg selama 12 dan 16 minggu, serta pemberian AFB₁ 20 µg selama 12 minggu. Pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu tidak berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu dan pemberian AFB₁ 20 µg selama 16 minggu. Ini juga menunjukkan pemberian dosis 15 µg dan lama 16 minggu tidak efektif sehingga disarankan hanya memberikan dosis dua kali dosis pertama dan lama pemberian dua kali lama pertama.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa displasia sel hati baru terjadi pada pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu. Makin lama pemberian dan makin tinggi dosis pemberian akan semakin meningkatkan displasia. Perubahan sel yang mengalami displasia menjadi sel kanker membutuhkan tindakan lebih lanjut yang akan menyebabkan mutasi gen yang lainnya dan secara bersama-sama akan menyebabkan pertumbuhan sel kanker. Dibutuhkan waktu yang lama untuk terjadinya perubahan sel yang mengalami displasia menjadi sel kanker.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dijelaskan kerusakan sel hati akibat AFB₁ disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan oleh proses oksidatif biotransformasi AFB₁ yang terjadi pada sel hati. Pemberian AFB₁ pada tikus putih akan meningkatkan $O_2^{\bullet -}$ dan H_2O_2 di dalam sel hati yang disebabkan proses oksidatif pada biotransformasi AFB₁ oleh sitokrom P-450. $O_2^{\bullet -}$ yang terjadi akan dinetralkan oleh enzim SOD sementara H_2O_2 dinetralkan oleh enzim katalase. Karena pemberian AFB₁ terus menerus, maka kedua enzim anti oksidan ini akan semakin terkurus, akibatnya $O_2^{\bullet -}$ dan H_2O_2 yang tidak bisa dinetralkan akan semakin banyak sehingga

akan terbentuk OHF' suatu bentuk ROS yang sangat berbahaya. OHF akan merusak membran lipid, DNA dan protein. Di samping itu OHF juga akan merusak organel lainnya seperti mitokondria. Akibatnya akan menimbulkan kerusakan pada sel hati seperti degenerasi bengkak keruh, degenerasi lemak, nekrosis, apoptosis dan displasia. Apabila keadaan ini berlanjut terus kemungkinan besar pertumbuhan sel kanker akan terjadi. Ini sangat berbahaya karena hati merupakan organ yang sangat penting di dalam tubuh yang mempunyai fungsi yang kompleks untuk kelangsungan hidup manusia.

Mengingat hasil-hasil yang telah didapatkan dan dukungan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti-peneliti terdahulu, dapat disimpulkan bahwa semakin lama pemberian dan semakin tinggi dosis pemberian AFB₁ akan semakin meningkatkan terbentuknya ROS sebagai akibat proses oksidatif biotransformasi AFB₁ yang terjadi di dalam sel hati dan akan semakin meningkatkan kerusakan dan perubahan sel hati.

Oleh karena pada saat ini Indonesia merupakan negara pengimpor beras yang besar dan mengingat hati adalah suatu organ di dalam tubuh yang mempunyai fungsi yang sangat kompleks yang berguna bagi kepentingan hidup manusia, maka dianjurkan kepada pemerintah untuk betul-betul melindungi rakyat dalam pengadaan bahan makanan yang didatangkan dari luar negeri. Pemerintah harus berani menolak beras yang akan dibagikan pada masyarakat dimana beras itu sudah berjamur, karena biasanya negara pengimpor beras tersebut menyimpan beras tersebut pada tempat yang tidak memadai, sehingga memudahkan pertumbuhan jamur yang dihasilkan oleh AFB₁. Bahan makanan ini sebelum disajikan haruslah disimpan pada tempat yang mempunyai ventilasi yang cukup, tidak lembab dan penerangan yang cukup.

sehingga tidak memudahkan tumbuhnya jamur. Di samping itu untuk produksi bahan makanan yang dihasilkan di dalam negeri, dianjurkan kepada pemerintah supaya selalu memberikan penerangan kepada petani tentang penyimpanan hasil panen yang baik. Untuk persediaan makanan sehari-hari dianjurkan supaya selalu mengkonsumsi bahan makanan yang utuh dan segar.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil penelitian dan pembahasannya, dapat dibuat kesimpulan

1. Pemberian AFB₁ pada tikus percobaan dengan dosis 10 µg selama 12 minggu menurunkan aktivitas enzim SOD dan katalase jaringan hati tikus putih, dimana makin lama pemberian dan makin tinggi dosis AFB₁ yang diberikan akan semakin menurunkan aktivitas enzim SOD dan enzim katalase jaringan hati tikus putih, tetapi pemberian AFB₁ dengan dosis 15 µg selama 16 minggu ternyata tidak menurunkan aktivitas enzim SOD dan enzim katalase jaringan hati tikus putih secara bermakna jika dibandingkan dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12 minggu. Pemberian dosis 20 µg selama 20 minggu ternyata tidak menurunkan aktivitas enzim SOD dan enzim katalase secara bermakna jika dibandingkan dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu.
2. Pemberian AFB₁ pada tikus putih percobaan dosis 10 µg selama 12 minggu telah meningkatkan konsentrasi MDA jaringan hati tikus putih dimana makin lama pemberian dan makin meningkat dosis AFB₁ yang diberikan akan semakin meningkatkan kadar MDA jaringan hati tikus putih, tetapi pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu tidak menaikkan kadar MDA jaringan hati tikus putih yang berbeda bermakna dengan pemberian AFB₁ 10 µg selama 12 minggu. Pemberian AFB₁ 20 µg selama 20 minggu juga tidak menaikkan kadar MDA jaringan hati

- tikus putih yang berbeda bermakna jika dibandingkan dengan pemberian AFB₁ 15 µg selama 16 minggu.
3. Pemberian AFB₁ pada tikus percobaan dosis 10 µg selama 12 minggu telah menimbulkan kerusakan sel hati, dimana makin lama pemberian dan semakin meningkat dosis AFB₁ yang diberikan akan semakin meningkatkan kerusakan sel hati tikus putih
 4. Sel hati tikus putih tidak mengekspresikan protein p53 pada pemberian AFB₁ untuk semua dosis dan lama pemberian. Ini mungkin disebabkan *half life* p53 wt yang pendek dan sel hati tikus putih baru mengalami displasia. Pemberian AFB₁ pada dosis 10 µg selama 12 minggu telah menimbulkan apoptosis sel hati, tetapi peningkatan lama pemberian dan dosis tidak berpengaruh terhadap sel hati yang mengalami apoptosis
 5. Pemberian AFB₁ pada dosis 15 µg selama 16 minggu telah menyebabkan displasia sel hati tikus putih, dimana semakin lama pemberian dan makin meningkat dosis AFB₁ yang diberikan akan semakin meningkatkan sel hati tikus putih yang mengalami displasia

7.2. Saran

Berhubung protein p53 tidak terdeteksi baik pada keadaan tidak terjadinya displasia ataupun sudah terjadinya displasia, maka dianjurkan untuk melakukan penelitian biologi molekuler yang lebih lanjut mengenai keterlibatan gen-gen yang lain sebagai penyebab terjadinya kerusakan dan perubahan sel hati akibat paparan AFB₁ pada hewan percobaan, seperti:

1. Gen *down stream p53* seperti Bax, IGF-1R, yang bersifat *pro apoptotic* dan bel-2 yang bersifat *anti apoptotic* yang dapat menunjukkan teraktivasinya gen p53
2. Gen yang menyebabkan telah terjadinya perubahan sel hati (displasia) seperti gen ras ataupun onkogen lainnya



DAFTAR PUSTAKA

- Adchayo AO, Okunade GW and Olorunsogo OO. 1995. The anti calmodulin effect of Aflatoxin B₁ on purified erythrocyte Ca²⁺ ATPase. *Biosci Rep* 15 (4) : 209 - 220
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 1989. The molecular genetics of cancer In *Molecular Biology of the cell*. 2nd ed. New York, London: Garland Publishing, Inc pp 1204-1216.
- Apolarinario RM, Valk PUD and Jong JSD, Deville M and Otte JVA, 1997. Prognostic value of the expression of p53, Bcl-2 and bax oncoproteins and neovascularization in patients with radically resected non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15 (6) : 2456-2466.
- Asikin N, 2001. Antioksidan Endogen dan Penilaian status antioksidan Kursus Penyegar 2001. Radikal bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan. Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan alam Bag. Biokimia FKUI : 1-17
- Artika IM, 2003. Struktur, Fungsi dan Biogenesis mitokondria dalam (Suryadi H, Malik S, Gusti Ananda M, Sudoyo H dan Marzuki, Sk ed) *Mitochondrial Medicine*. Lembaga Eijkman Jakarta. Hal 42-44.
- Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J and Jacks T. 1996. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *The EMBO J* 15 : 3693-3701
- Bahrn S, Ohim dan Maryam R. 1995. Residu afltoksin B₁ pada susu sapi dan hubungannya dengan keberadaan afltoksin B₁ pada pakan sapi. Kumpulan makalah lengkap Kongres Nasional Perhimpunan Mikologi Kedokteran Manusia dan Hewan Indonesia 1 dan Temu Ilmiah. Bogor : 269 -275.
- Bacon BR, Britton RS and Neill RO. 1992. LipidPeroxidation an Associated Hepatic Organelle Dysfunction. In (Csomos G and Feher J, eds) *Free Radicals and the Liver* Berlin Heidelberg : Springer Verlag pp 63-.
- Bailey EA, Iyer RS, Harris TM and Essigmann JM. 1996. A viral genome containing an unstable aflatoxin B₁-N⁷-guanine DNA adduct situated at a unique site *Nucleic Acids Research* : 24 (14) 2821 - 2828
- Bast A, Guido RMM, Haenen C and Doelman JA. 1991. Oxidant and antioxidant State of Art. *The American Journal of Medicine*: 3 C - 2s.
- Bates S and Vousden KH. 1996. P53 in signaling check point arrest or apoptosis. *Current Opinion In Genetics and Development* 6 : 12 -18

- Hatkova J, Bartek J and Vojtesek B. 1993. Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein in matched primary and metastatic human tumors. *Int J Cancer* 29 (6) : 881-886
- Bioulac-Sage P, Le Bail B and Balaband C. 1999. Liver and biliary tract histology. In (Bircher J, Berhamou JP, Mc Intyre N, Rizzeto M and Rodes J, eds) *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* 2nd ed Oxford Oxford University Press, pp 13-15
- Bismuth H, Majno E and Krustlager, 1999. Macroscopic anatomy of the liver. In (Bircher J, Berhamou JP, Mc Intyre N, Rizzeto M and Rodes J, eds) *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* 2nd ed Oxford Oxford University Press, pp 1-5
- Boiteux S. 1998. Endogenous Oxidative DNA damage and spontaneous mutagenesis: Role of 8 oxoguanine. In (Montagner L, Oliver R and Pasquier C, eds) *Oxidative stress in Cancer, AIDS and neurodegenerative Disease*. New York, Basel, Hongkong Marcel Dekker, Inc. p 351 - 358
- Boix-Ferrero J, Pellini A, Blesa R, Adrados Mand Llóm - Bar - Bosch. 199. Absence of p53 gene mutations in hepato carcinomas from a Mediterranean area of Spain. A study of 129 archival tumour samples. *Virchows Arch*, 434 (6) : 497-501.
- Bostman FI. 1996. Aspek-aspek fundamental kanker. Dalam (Aryono ed) *Onkologi*. Ed Kelima : Gajah Mada University Press, hal 3-35
- Bosny WE and Green DR. 1995. Apoptosis - check point at the mitochondrial frontier. *Mutant Res* : 424 (3) : 243 - 251
- Bourdane JC, D'Enco A, Paterlini P, Gngom W, May E and Debutre B. 1995. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 mutation. *Gastroenterology* . 108 (4) : 1176-82
- Burns T and El-Deiry W. 1999. p53 and apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* . 181 : 231-239
- Carnece WK and White RL. 1995. The genetic basis of cancer. *Scientific* : 50-57.
- Chao HK, Tsai TF, Lin CS and Su TS. 1999. Evidence that mutational activation of the ras genes may not be involved in aflatoxin B₁ induced human hepatocarcinogenesis, based on sequence analysis of the ras and p53 genes. *Mol carcinog*, 26 (2) 69-73

- Cerruti PA. 1994. Oxyradicals and cancer. *The Lancet*. 334: 862-863.
- Clawson G.A. 1996. Environmental Pathology. In (Sirica AE, eds) *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Lippin-Cott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 265.
- CMGS, 1998. Tumor supressor genes-p53. MRC path course cancer genetics AA.24/09.98. Diakses dari <http://www.ich.bpmf.ac.uk/cmgs/p53ts.htm>.
- Cochrane CG. 1991. Cellular Injury by Oxidants. In (Crystal R.G and Bast A eds) *Oxidants and Antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. *AMJ* 91 (sup 3C): 23S-28S.
- Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol* 14 (3): 126-130.
- Comporti M. 1993. Lipid peroxidation: An Overview. In (Poli G, Albino E and Dianzani, eds) *Free radicals Science to Medicine*, Switzerland: Birkhanser Verlag Basel, pp 65-79.
- Cornelise CJ. 1998. Apoptosis. In (Santoso R, Senedoko R, Suryohudoyo P, Judigma, P and Murtejo U, eds) *Modern Pathology for service and Research in Cancer*. Dutch Foundation for post graduated cancers in Indonesia Airlangga University School of Medicine Dr. Soetomo Teaching Hospital, 125-128.
- Cotran RS, Vinary K and Tucker C. 1999. Neoplasma. In *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp 260-300.
- Cotran RS, Vinary K and Tucker C. 1999. Tissue Repair: Cellular Growth, Fibrosis and Wound healing. In *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed, Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp 90-98.
- Cotran RS, Vinary K and Tucker C. 1999. Cellular Pathology 1: Cell Injury and cell death. In *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp 18-25.
- Cotran RS, Vinary K and Tucker C. 1999. The Liver and the Biliary Tract. In *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp 888-891.
- Dash P, 2001. Role of mitochondria in apoptosis. Nitric oxide research group St George's hospital medical school, University of London. http://www.sghms.ac.uk/depth/immunology/~dash/apoptosis_mito.html.

- Dellmann HD, 1971 Veterinary histology an Outline text atlas Lea and Febringer USA, pp 174-175
- Deng ZL and Ma J. 1998. Aflatoxin suffer and p53 gene mutation in hepatocellular carcinoma. World J. Gastroenterol 4 (1) 28-29
- Dharmaputra OS, Retnowati I, Sunjaya dan Ambarwati S, 1993. Populasi *Aspergillus Flavus* dan kandungan Aflatoksin pada jagung di tempat petani dan pedagang di Provinsi Lampung. Kongres Nasional XII dan seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia, Jogjakarta
- Donchower LA, Havey M, Slagle BL and Mc Arthur MJ, 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. Nature 356 215-220.
- Dwivedi YR, Rastogi R, Mekrota R, Garg NK and Dhawan BN, 1993. Picroliv protects against Aflatoxin B₁ acute hepatotoxicity in rats. Pharmacol Res 27 (2) 189-199.
- Eaton LD and Gallagher, E.P. 1994 Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annu. Rev Pharmacol Toxicol 34 135 - 72
- Eaton DL and Groobman JD, 1994. The toxicology of aflatoxins: Human Health, Veterinary & Agricultural Significance. California: Academic Press, Inc: pp 3-84.
- Faubion WA and Groes GJ, 1999 Death Receptors in Liver Biology and Pathobiology. Hepatology : 29(11): 1-4
- Feher J, Gsomos G and Verecheti A. 1992 Role of free radical reactions in liver diseases. In (Gsomos G, Feher J, eds) Free radicals and the liver Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York : pp 1-12
- Flannigan B and Hue SC, 1976. The occurrence of aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould floras of Ground spices. Journal of Applied Bacteriology 41 411-418
- Foster PL and Rosche WA, 2001 Aflatoxins Academic Press : 21-22
- Fox SL, 1999 Liver, Gallbladder and Pancreas In Human Physiology 6th ed. Boston : Mc Graw-Hill, pp 580-585

- Freisleben HJ, 1999. Free Radicals and the Antioxidant network. In (Freisleben HJ and Deisinger, eds) Free radical-related diseases and antioxidants in Indonesia. St Agustin : Gardez. Verlag. pp 1-10
- Freisleben HJ, 2001. Free Radicals and ROS (Reactive Oxygen Species) in Biological System. Kursus penerang dan Pelatihan 2001 Radikal Bebas dan Antioksidan : Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam. Bagian Biokimia FKUI.
- Fufa H and Urga, K. 1996. Screening of aflatoxins in shiro and ground red pepper in Addis Ababa. *Ethiop Med J* 34 (4) : 243-249.
- Fujimoto J, 1994. Abberations of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Hokkaido-Igaku-Zassen* 69 (5) : 1252 - 1260.
- Ganong WF, 2001. Liver & Biliary System. In *Review of Medical Physiology*, 20th ed. New York: Lange Medical Book : Mc. Graw Hill Medical Publishing Division. 483-487.
- Gray H, 1995. The Liver. In *Anatomy Descriptive and Logical*. London Paragon Book Service, pp 625-627.
- Ghebranious N and Sells S, 1998. The mouse equivalent of the human p53 ser 249 mutation enhances aflatoxin hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic and p53 heterozygous nullmice. *Hepatology* 27 (4) : 967-73. *Mol - Carcinog* 13 (2) : 104 - 110.
- Ghebranious N, Knoll RJ, Win H, Lozano G and Cells, 1995. Characterization of a murine p53 ser 246 mutant equivalent to the human p53 ser 249 associated with hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure. *Mol-Carcinog* 13(2):104 - 110.
- Groopman JD, Hasler J, Truder LL and Wogan GN, 1992. Of aflatoxin N7 guanine and other metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and HPLC. *Cancer Res*: 52 : 267-274.
- Golstein P, 1997. Controlling Cell Death. *Science* 257 : 1081 - 1082.
- Green DR and Read JC, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 72-75
- Gutteridge JMC, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem* 41(12): 1819-1828

- Guyton AC, Hall JE. 1996. The Liver as an organ In (Text book of Medical Physiology: Philadelphia. WB Sanders Company. pp 883-886.
- Hadi S, 2000. Gambaran laparoskopi tumor hati jinak dan ganas dalam Hepatologi Bandung CV. Bandar Maju. hal 493 – 497.
- Hafez A. Al and Saber SM, 1993. Mycoflora and mycotoxin of hazelnut (*Corylus Avellana* L.) and walnut (*Juglans regia* L.) seeds in Egypt. *Zentralbe Mikrobiol* 148(2) -147
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. The chemistry of free radicals and related reactive species. In *Free Radicals in Biology Medicine* New York : Oxford University pp 48-95.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999. Oxidative stress : adaption, damage repair and death. In *Free radical in biology and medicine*. New York : Oxford University pp 267-276.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. Free radicals, other reactive species and disease. In *Free Radicals in Biology Medicine* New York : Oxford University pp 701-706
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The hall marks of Cancer. *Cell* (100) : 57-70.
- Han SH, Youen YY, Yea SS, 1999. Suppression of the interleukin 2 gene expression by aflatoxin B₁ is mediated through the down regulation of the NF-AT and AP-1 transcription factors. *Toxicol Lett* 108 (1) 1-10.
- Hansen R and Oren M, 1997. p53. from inductive signal to cellular effect. *Current Opinion in genetics & development*. 7 46-51.
- Hariadi T, 2000. Teknik pembuatan sediaan histologi. *Bagian Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Unair Surabaya*
- Harris CC and Hollstein M, 1993. Clinical implications of the p53 tumor supressor gene. *N Engl J Med* 329 : 1318-1327.
- Harper JW, Adams GR, Wei N, Keyomarsi K and Elledge SJ, 1993. The p21 CDK interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin Dependent Kinases. *Cell* , 75 : 805-816
- Hartwell L. 1992. Defect in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instibility of cancer cells. *Cell* 71 543-546.

- Hastuti US, 1996. Mikroflora pada biji lada utuh dan biji lada rusak di Kotamadya Malang. PIT dan Seminar Nasional PERMI. Malang
- Hollema H, 1998. Viral carcinogenesis. In (Santoso R, Soedoko R, Suryohudoyo P, Indrayana FX and Murtejo U. Eds) *Modern Pathology for service and research in cancer*. Surabaya. May 12-14. 89-90.
- Hollywood D, Sikin K and Ponten J, 1995. Oncogenes. In (Peacockham M, Pineda H and Veronesi, eds) *Oxford text book of oncology*. 1st ed. New York: Oxford University : 54-71.
- Hugo PM, Olivera LCB, Paranovich MS, Penha RG and Stern A, 1999. Nitric oxide stimulated tyrosine Phosphorylation- dependent signaling pathways in cultured cells. In (Montagner L, Oliver R and Pasquer C, eds). *Oxidative stress in Cancer, AIDS and neuro degenerative diseases*. New York. Basel. Hongkong : Marcel Dekker. Inc. pp 139-145
- Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC, 2001. Tumor suppressor genes at the cross roads of molecular carcinogenesis. *molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assesment*. Lung Cancer 2. 7-15
- Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S, Chung F L and Tang MS, 2000. The Major lipid peroxidation product, trans - 4 hydroxy-2 no-nenal, preferentially forms DNA adduct at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot inhepatocellular carcinoma. *American Journal of Phatology*, 160 : 1831-1837.
- Jones AL and Schmuker DL, 1999. Electron microscopy of the liver. In (Bircher J, Benhamou JP, Mc Intyre N, Rizzeto M and Rodes J, eds) *Oxford Textbook of Clinical hepatology* 2nd Oxford. Oxford University Press. pp 24-26.
- Julius, 1990. Aflatoxin Dalam (Sulaiman A, Daldiyono, Akbar N dan Rani AA eds) *Gastroenterologi Hepatologi*. Jakarta. CV Infomedika, pp 385-393
- Junqueira LC, Carneiro J and Kelley RO, 1995. Glands Associated with the Digestive Tract. In *basic histology*. 8th ed. Appleton & Lange. pp 306-319.
- Kew MC, 1994. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. In (Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S and Oda T. eds) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York, London. Springer Verlag : pp 681-684.

- Kurniyen K, Hietanen S, Syrjanen K and Syrjanen S, 1995. Rapid and effective detection of mutations in p53 gene using non radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on Phast system. *J Virol Methods* 51: 43-54
- Lane DP, 1992. P53 guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
- Lee CC, Lin JY, Lin JK, Chu JS and Shew JY, 1998. P53 mutation enhanced by hepatic regeneration in aflatoxin B₁-induced rat liver tumors and preneoplastic lesions. *Cancer Lett* 125: 1-7.
- Lestariana W, Angerahini S, Madyan N dan Hastuti P, 1988. Cemaran Aflatoksin pada bahan makanan yang beredar di Yogyakarta. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada.
- Lestariana W, 1997. Pengaruh kandungan vitamin A dalam ransum terhadap efek toksik aflatoksin B₁ pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*). Disertasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Levine AJ, 1992. Tumor suppressor genes, the cell cycle and cancer. 1st ed New Jersey: Cold Harbor Laboratory: 59-74
- Levine A J, 1995. Tumor suppressor genes. *Scientific American Science & Medicine* 28-37
- Levine AJ, Momand J and Finlay CA, 1991. The P53 tumor suppressor gene. *Nature* 351:356
- Lewin B, 1997. *Genes*, 6th ed oxford: Oxford university: 1162-1172.
- Lie KH, Kim KC, Jung YY, Ham YH, Yang YY, Kwon H, Sung YC, Kim Sh, Han SK and Kim CM, 2001. Induction of apoptosis in p53-deficient Human Hepatoma Cell Line by Wild Type p53 gene transduction. Inhibition by antioxidant. *Mol cells*, 12 (1): 17-24
- Lin IO and Fan ST, 2000. Is the p53 gene mutation of prognostic value in hepatocellular carcinoma. *Arch Surg*, 135: 1476
- Li Y, Su JJ, Qin LL, Yang C, Han KC and Yan RQ, 1999. Synergistic affect of Hepatitis B Virus and Aflatoxin B₁ in hepatocarcinogenesis in Tree shrews. *Ann Acad Med Singapore*, 28: 67-71

- Liu TJ, Hwu JS, Chao TW and Chi CW, 1995. Mechanism Study of the inhibition of aflatoxin B₁ - induced hepatotoxicity by dimethyl 4, 4'-dimethoxy 5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl -2,2'-dicarboxylate. *Cancer Lett* 89 (2) : 201-5
- Mace K et al., 1997. Aflatoxin B₁ - induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP-450 - expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* ; 18(7): 1291-97.
- Mann CL and Cidlowski, 1999. Signaling cascades of apoptosis. In (Winkler JD, eds) *Apoptosis and Inflammation* Basel Boston Berlin : Birkhauser. Verlag : 7-18
- Maragon K, Herbeth B, Lecomte E, Douphin AP, Grolier J, Chancerelle Y, Artur Yand Siest G, 1998. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr*, 67:231-9
- Mates MJ, Jimenez FS, 1999. Antioxidant enzymes and their implication in pathologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 4, 399-345
- McCord JM, 1998. The importance of oxidant - Antioxidant Balance. In (Montagner L, Olivier R and Pasqueter C, eds). *Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative disease* New York Basel, Hongkong : Marcel Dekker, Inc. pp. 1-9.
- Mc Glynn KA et al., 1995. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in enzymatic detoxification of aflatoxin B₁. *Proc - Natl Acad Sci USA* ; 92(16) : 2384-7
- Ming L, Yuan Band Thorgerisson SS, 1999. Characteristic of high frequency 249 codon mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in prevalent area of China. *Zhonghua Zong lin Za Zhi* 12(12) : 122-124.
- Miyashita T and Reed JC, 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 : 293-299
- Moon EJ, Rhee DK and Pyo S, 1999. In vitro suppressive effect of aflatoxin B₁ on immune peritoneal macrophage functions. *Toxicology* 133 (2-3) : 171-179
- Moon EJ, Rhee DK and Pyo S, 1999. Inhibition of various function in immune peritoneal macrophage by aflatoxin B₁ on exposure in vivo. *Int J Immuno pharmacol* 21 (1) : 47-58

- Narasimhan M, Shanmugasundaran R and Lakshmi K, 2000. 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences
- Natarajan U, Vepa S and Scabiner WM. 1998. Oxidant – Mediated Modulation of Phospholipases in Endothelial Cells – Possible Implication in Vascular Disorders In (Montagnier L, Oliver R and Pasquier C, eds) *Oxidative Stress In Cancer, Aids and Neuro degenerative diseases* New York: Marcel Dekker Inc, pp 45-49
- Oliner JD, 1994. The role of P53 in cancer development. *Scientific American Science & medicine*, 16-25
- Orrenius S, 1993. Mechanism of oxidative cell damage. In (Poly G, Albano E and Dianzani MU eds) *Free radicals – From Basic Science to Medicine*, Switzerland: Birkhauser Verlag, pp 47-64
- Pannal P and Kotasek P, 1997. The nature of malignancy. In *Cancer and clinical Biochemistry*, London: ACB Venture Publications, pp 1-11
- Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH and Lee YI, 2000. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepato cellular carcinoma associated with hepatitis B infection and intake of aflatoxin B₁. *gene* 251 (1): 73-80
- Paron M, Dowsett M and Smith I. 2001. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*, 22, 528-152.
- Pharoah PDP and Caldes C, 1999. Molecular genetics and the assessment of human cancer. *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge University Press 1-10
- Price SA, Wilson LM, 1992. *Pathophysiology: Clinical concept of disease processes*. Mosby Year Book Inc, 4th ed, pp 25-27
- Preddy VR, Reilly ME, Mantle D and Peters TY, 1998. Oxidative damage in liver disease. *JFCC* 10 (1): 16-19
- Poly G, Chiarotto E, Biasi F, Albano E and Danni O. 1992. Lipid peroxidation and hepatocyte damage in the animal model and in Human Patients. In (Csomos G and Echer J, eds) *Free Radicals and the Liver*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag pp 36-42
- Ramelan, 2003. Antioksidan. Perannya dalam kedokteran. *Medika* 6 (29): 370-372

- Recknagel RO and Glender EA, 1992. Calcium, Phospholipase A₂ and Eicosanoids in Toxicogenic Liver Cell Injury. In (Csomos G and Fehér J, eds) *Free Radicals and the Liver*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag pp 43-53
- Reeves MF and De Matteo RP, 2000. Genes and viruses in hepatobiliary neoplasia. *Semin Surf Oncol* 19 (2) : 84-93
- Renchan AG, Booth C and Potten CD, 2001. What is apoptosis, and why is it important. *BMJ* 322; 1536-1538
- Russel JH, 1999. Apoptosis in the regulation of and function of T and B lymphocytes in inflammation. In (Winkler JD eds) *Apoptosis and Inflammation*. Basel, Boston, Berlin : Birkhäuser Verlag, pp 39-42.
- Schieve GI, 1998. Activator of Lymphocytes signal Pathways by oxidative stress : Role of Tyrosine kinase and Phosphatase In (Montagnier L, Oliver R and Pasquer C, eds) *Oxidative Stress In Cancer, Aids and Neuro degenerative diseases* New York : Marcel Dekker Inc, pp 35-38.
- Schwartz JM and Carithers RL, 2001. Epidemiology and etiologic associations of primary hepatocellular environment – up to date. www.update.com, 1-5.
- Setiati S, 2003. Radikal bebas, antioksidan dan Proses Menua, *Modika* 6 (24) : 366-369
- Shank, R. C et al. 1992. Contamination of Food with aflatoxins. *Toxicol* 10 : 181-91
- Shen H,M, Shi C J, Lee HP, Ong CN, 1994, Aflatoxin B₁ induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol appl. Pharmacol* 127 (1) : 145-50.
- Shen HM, Ong CN, Lee BL and Shi CJ, 1995. Aflatoxin B₁ – induced 8 – hydroxy deoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* ; 16 (2) : 419-22
- Sherlock S. 1989. *Anatomy and Functional In Disease of the liver and biliary system*. Blackwell Scientific Publication, pp 1-17.
- Sherlock S. 1989. *Neoplasia of the liver*. In *Disease of the liver and and biliary system*. Blackwell Scientific Publication, pp 597-617
- Shun, ZY. 1995. Primary Journal prevention of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology and hepatology*, J 10 : 674-682.

- Siems WG, Grune T, Zollner H and Esterbauer H. 1993. Formation and metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in liver and small intestine In (Poly G, Albino E and Dianzoni MU eds) *Free Radicals From Basic Science to Medicine*. Switzerland Birkhäuser Verlag, pp89-95.
- Sinha L, 1997. Colorimetric Assay of Catalase. *Anal Biochem* 47 : 389-394
- Sies H, 1991. Oxidative stress : From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 30-31 S
- Sitompul B, 2003. Antioksidan dan pengikat aterosklerosis. *Medika* . 6(29) : 344-346.
- Sirica AE, 1996. Multistage Carcinogenesis. In *Cellular and Molecular Pathogenesis* Philadelphia New York Lippincott-Raven 283-320.
- Sjöström J and Bergh J, 2001. How apoptosis regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*. 332 : 1538-1539
- Smella ME, Currier SS, Bailey EA and Essigmann JM, 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B₁ : from mutational spectrometry to carcinogenesis, *Carcinogenesis* 22 (4) : 535-545
- Soussi T, Dehouche K and Beroud C. 2000. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer . Forging a link Between Epidemiology and carcinogenesis, *Human Mutation* 15 : 105-113
- Stratton MR, 1992. The p53 gene in human cancer. *Eur J Cancer* 28 : 293-295.
- Suryohudoyo, P. 2000. Oksidan, Antioksidan dan radikal bebas. *Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler. Info Medika*. Jakarta . 31-47
- Soerjodibroto, W S, 1978. Pelbagai mikotoksin dalam makanan dan penyakit hati. *Kumpulan Naskah Ilmiah Simposium Nasional Penyakit Hati Menahun*. Jakarta 71-74
- Slow RCM, Jay MT, Sato H, Pearson JD and Mann GE, 1999. Low Density Lipoproteins modulate nitric oxide and heme oxygenase signal transduction Pathways in vascular endothelium and smooth muscle In (Montagner L, Oliver R and Pasquere C. eds) *Oxidative stress in Cancer, AIDS and neuro degenerative diseases*. New York Basel Hongkong : Marcel Dekker, Inc, pp 127-138

- Soewoto H, 2001. Antioksidan Eksogen sebagai lini pertahanan kedua dalam menanggulangi peran radikal bebas. *Kursus Penyegar dan Pelatihan 2001 Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI*
- Stern MA, Umbach DM, Yu MC, London SJ, Zhang ZQ and Taylor JA, 2001. Hepatitis B, aflatoxin B₁ and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guang Xi, People's Republic of China and meta analysis of existing studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10 : 617-625
- Steel RGD and Torrie JH, 1980. *Principle and procedures of statistics*. McGraw-Hill Inc
- Tabata, S et al, 1993. Aflatoxin Contamination in foods and food stuffs in Tokyo . 1986-1990. *Journal of AOAC International* 76 (1) : 32-35.
- Tabor, E and Kobayashi, K, 1994. Current issue in hepatocellular carcinoma : Hepatitis B virus, Hepatitis C virus and the p53 gen tumor suppressor gene. In (Nishioka, K, Suzuki H, H, Mishiho, S and Oda T eds) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Berlin, Heidelberg, Tokyo : Springer Verlag, pp 669-671
- Takashi M and Niki E, 1998. The effect of oxidative stress on cell by oxygen radical and its inhibition by antioxidants. In (Montagner L, Oliver R and Pasqueter C, eds). *Oxidative stress in cancer, AIDS and neuro degenerative disease*. New York, Basel, Hongkong. Marcel Dekker, Inc, pp 9-15.
- Van Asbeck BS, Sprony RC, Bruggen Vander T, Oirschot van JFLM and Borleff's JCC, 1998. The role of Hydrogen Peroxide in Signal Transduction and the Involvement of Iron. In (Montagner L, Oliver R and Pasqueter C, eds). *Oxidative stress in Cancer, AIDS and neuro degenerative diseases*. New York, Basel, Hongkong. Marcel Dekker, Inc. pp 97-112
- Van der Valk P, 1999. *Practical Pathology of the cell cycle*. Indonesian Journal of pathology. *(2) L 1-4
- Van Gijssel HE, Maasen CBM, Mulder GJ and Meerman JHN, 1997. p53 protein expression by hepatocarcinogens in rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepato tumour promotion. *Carcinogenesis* 18 (5) : 1027-1033
- Van Oijen MGCT and Slootweg PJ, 2000. Gain of function mutations in tumor suppressor gene p53. *Clinical Cancer Research* 6. 2138-2145

- Vescelescu MFV and El deiry ES. 1996. Biological and clinical importance of the 53 tumor suppressor gene. *Clin chem* 42 (6) : 858-868.
- Volgestein B and Kanler KW. 1992. p53 function and dysfunction. *Cell* 70 : 523-526.
- Uchiyama M and Mihara M. 1998. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thio barbituric acid test. *Anal Biochem* 86 : 271-278.
- Wang CJ, Hsu JD and Lin JK. 1994. Suppression of aflatoxin B₁ induced hepatotoxic lesions by crocetin. *Carcinogenesis* 12 (10) : 1807-1810.
- Weinberg RA. 1996. How Cancer Arises. *Scientific American* : 32-40.
- Widodo MA. 2003. Calcium dan Generasi Spesies Oksigen Reaktif pada fungsi mitokondria. *Basic molecular Biology course on mitochondrial medicine*. 1-2 Agustus : 15-31.
- Wang SS et al., 1999. Elevated F0RT mutation frequencies in aflatoxin - exposed resident of Daxin, Qidong Country, People's Republic of China. *Carcinogenesis*: 20 (11):2181-2184.
- Wijaya A. 1996. Radical bebas dan parameter status antioksidan. *Forum Diagnosticum Prodia Diagnostic Educational Services* : 1-12.
- World Health Organization, 1993. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human international agency for research on cancer 56 : 268.
- Yang J and Hughes PD. 1998. A new approach to identifying genotoxic carcinogen . p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis* 19 (6) : 1117-1125.

SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. Salmiah Agus, SpPA (K)

Jabatan : Kepala Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

menerangkan bahwa :

Nama : Yanwirasti

Pekerjaan : Mahasiswa S3 Jurusan Ilmu Kedokteran

Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

telah melakukan pengamatan histopatologi jaringan hati tikus percobaan yang diinduksi aflatoksin B₁ dalam rangka penelitian disertasi yang berjudul: **KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER KERUSAKAN SEL HATI SEBAGAI AKIBAT PROSES OKSIDATIF PADA BIOTRANSFORMASI AFB₁**. Suatu eksperimental mumi laboratorium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 29 Maret 2004
Kepala Bagian Patologi Anatomi,
Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas



dr. Salmiah Agus, SpPA (K)

NIP. 130.353.214

SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : **DR. dr. Sumarno, DMM, SpPK**
Jabatan : **Kepala Laboratorium Sentral Biomedik**
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

mencerangkan bahwa :

Nama : **Yanwirasti**
Pekerjaan : **Mahasiswa S3 Jurusan Ilmu Kedokteran**
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

Telah melakukan pemeriksaan :

MDA - SOD - Katalase organ hepar tikus *Rattus norvegicus* yang diinduksi Aflatoksin B₁ dalam rangka penelitian disertasi yang berjudul: **KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER KERUSAKAN SEL HATI SEBAGAI AKIBAT PROSES OKSIDATIF PADA BIOTRANSFORMASI AFB₁**. Suatu eksperimental mumi laboratorium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 24 Oktober 2003
Kepala Laboratorium Sentral BIOMEDIK

Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK.
NIP. 130 809 130

SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. Rismawati Yaswir, SpPK.K
Jabatan : Kepala Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

menerangkan bahwa :

Nama : Yanwirasti
Pekerjaan: Mahasiswa S3 Jurusan Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

telah melakukan pewarnaan Imonohistokimia untuk mengetahui ekspresi protein p53, sel hati yang mengalami apoptosis pada tikus percobaan yang di induksi Aflatoxin B1 serta pemotretan dalam rangka penelitian disertasi yang berjudul: **KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER KERUSAKAN SEL HATI SEBAGAI AKIBAT PROSES OKSIDATIF PADA BIOTRANSFORMASI AFB₁**. Suatu eksperimental mumi laboratorium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 29 Maret 2004
Kepala Bagian Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas



dr. Rismawati Yaswir, SpPK (K)
NIP. 130 797 467

Lampiran 1a

**Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim SOD (U/ml)
pada tikus percobaan setelah diberi AFB₁.**

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	42,600	36,705	37,653	35,547
	2	40,074	36,284	35,863	33,342
	3	41,968	36,389	31,442	32,600
	4	44,495	34,916	31,653	32,916
	5	40,179	35,968	41,232	31,653
	6	39,968	35,863	30,811	28,311
	7	37,547	35,811	35,442	28,705
	8	47,863	35,389	27,547	37,758
16 Minggu	1	38,179	33,442	35,442	27,968
	2	38,284	34,610	33,232	28,705
	3	46,600	33,021	26,495	26,705
	4	45,021	33,126	33,442	30,705
	5	43,337	30,389	29,021	28,389
	6	33,126	34,021	28,600	28,284
	7	41,600	34,811	32,389	27,021
	8	40,811	33,521	28,600	30,705
20 Minggu	1	46,705	30,600	34,179	27,968
	2	41,232	35,863	33,021	25,968
	3	38,179	31,442	24,705	23,547
	4	35,547	31,653	32,389	28,074
	5	35,232	31,442	30,600	28,600
	6	41,232	30,811	27,337	22,916
	7	42,811	29,021	25,442	30,389
	8	35,547	27,547	30,600	25,863

Lampiran 1b

Analisis Kadar Enzim SOD Jaringan Hati Tikus Percobaan menurut lama pemberian dan dosis AFB₁

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: konsentrasi SOD

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	41.83675	3.201146	8
	16 minggu	40.86975	4.318137	8
	20 minggu	39.56063	4.141399	8
	Total	40.75571	3.863166	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	35.81563	.570205	8
	16 minggu	33.36762	1.369751	8
	20 minggu	31.04738	2.404856	8
	Total	33.44354	2.560243	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	33.95537	4.382252	8
	16 minggu	30.90263	3.122762	8
	20 minggu	29.78413	3.556663	8
	Total	31.54738	3.991509	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	32.60400	3.171377	8
	16 minggu	28.56025	1.487496	8
	20 minggu	26.66563	2.568086	8
	Total	29.27683	3.484805	24
Total	12 minggu	36.07794	4.675137	32
	16 minggu	33.42506	5.421326	32
	20 minggu	31.76444	5.750192	32
	Total	33.75581	5.540887	96

ANOVA

konsentrasi SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2114.422	11	192.220	20.127	.000
Within Groups	802.214	84	9.550		
Total	2916.636	95			

Post Hoc Tests



Dependent Variable: konsentrasi SOD

218

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2114.422 ^a	11	192.220	20.127	.000
Intercept	109387.668	1	109387.668	11454.007	.000
DOSIS	1778.873	3	592.291	62.019	.000
LAMA	302.952	2	151.476	15.861	.000
DOSIS * LAMA	34.597	6	5.766	.604	.727
Error	802.214	84	9.550		
Total	112304.304	96			
Corrected Total	2916.636	95			

a. R Squared = .725 (Adjusted R Squared = .688)

Post Hoc Tests

dosis pemberian AFB1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi SOD

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	7.31217*	.892103	.000
	dosis 2 (15 mcg)	9.20833*	.892103	.000
	dosis 3 (20 mcg)	11.47908*	.892103	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	-7.31217*	.892103	.000
	dosis 2 (15 mcg)	1.89617	.892103	.153
	dosis 3 (20 mcg)	4.16692*	.892103	.000
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	-9.20833*	.892103	.000
	dosis 1 (10 mcg)	-1.89617	.892103	.153
	dosis 3 (20 mcg)	2.27075	.892103	.060
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	-11.47908*	.892103	.000
	dosis 1 (10 mcg)	-4.16692*	.892103	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-2.27075	.892103	.060

Based on observed means.

Dependent Variable: konsentrasi SOD
Tukey HSD

(I) lama pemberian	(J) lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12 minggu	16 minggu	2.65288*	.772584	.003	.80952	4.49623
	20 minggu	4.31350*	.772584	.000	2.47015	6.15685
16 minggu	12 minggu	-2.65288*	.772584	.003	-4.49623	-.80852
	20 minggu	1.66062	.772584	.086	-.18273	3.50398
20 minggu	12 minggu	-4.31350*	.772584	.000	-6.15685	-2.47015
	16 minggu	-1.66062	.772584	.086	-3.50398	.18273

Based on observed means

*. The mean difference is significant at the .05 level

Homogeneous Subsets

konsentrasi SOD

Tukey HSD^{a,b}

lama pemberian	N	Subset	
		1	2
20 minggu	32	31.76444	
16 minggu	32	33.42606	
12 minggu	32		36.07794
Sig.		.086	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 9.550.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32.000.
- b. Alpha = .05.

Tukny HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	n	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
20 minggu dosis 20 mcg	8	26.66563					
16 minggu dosis 20 mcg	8	28.56025	28.56025				
20 minggu dosis 15 mcg	8	29.78413	29.78413	29.78413			
16 minggu dosis 15 mcg	8	30.90263	30.90263	30.90263	30.90263		
20 minggu dosis 10 mcg	8	31.04738	31.04738	31.04738	31.04738		
12 minggu dosis 20 mcg	8		32.60400	32.60400	32.60400		
16 minggu dosis 10 mcg	8		33.36762	33.36762	33.36762		
12 minggu dosis 15 mcg	8			33.95538	33.95538		
12 minggu dosis 10 mcg	8				35.91563	35.91563	
20 minggu dosis 0	8					39.56063	39.56063
16 minggu dosis 0	8					40.86975	40.86975
12 minggu dosis 0	8						41.83675
Sig		.184	.097	.245	.069	.076	.944

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.



Dependent Variable: konsentrasi SCD

22

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	-.96700	1.545167	1.000
	20 minggu dosis 0	2.27613	1.545167	.944
	12 minggu dosis 10 mcg	5.92113*	1.545167	.012
	16 minggu dosis 10 mcg	8.46913*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	10.78938*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	7.88137*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	10.93413*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	12.05263*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	9.23275*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	13.27650*	1.545167	.000
20 minggu dosis 20 mcg	15.17113*	1.545167	.000	
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-.96700	1.545167	1.000
	20 minggu dosis 0	1.30912	1.545167	.989
	12 minggu dosis 10 mcg	4.95412	1.545167	.076
	16 minggu dosis 10 mcg	7.50213*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	9.82237*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	6.91437*	1.545167	.001
	16 minggu dosis 15 mcg	9.96712*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	11.08562*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	8.26575*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	12.30950*	1.545167	.000
20 minggu dosis 20 mcg	14.20412*	1.545167	.000	
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-2.27613	1.545167	.944
	16 minggu dosis 0	-1.30912	1.545167	.989
	12 minggu dosis 10 mcg	3.84500	1.545167	.445
	16 minggu dosis 10 mcg	6.19300*	1.545167	.007
	20 minggu dosis 10 mcg	8.51325*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	5.60525*	1.545167	.023
	16 minggu dosis 15 mcg	8.65800*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	9.77650*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	6.95663*	1.545167	.001
	16 minggu dosis 20 mcg	11.00038*	1.545167	.000
20 minggu dosis 20 mcg	12.89500*	1.545167	.000	

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-5.92113*	1.545167	.012
	16 minggu dosis 0	-4.95412	1.545167	.076
	20 minggu dosis 0	-3.64500	1.545167	.445
	16 minggu dosis 10 mcg	2.54800	1.545167	.885
	20 minggu dosis 10 mcg	4.86825	1.545167	.088
	12 minggu dosis 15 mcg	1.96025	1.545167	.881
	16 minggu dosis 15 mcg	5.01300	1.545167	.069
	20 minggu dosis 15 mcg	6.13150*	1.545167	.008
	12 minggu dosis 20 mcg	3.31162	1.545167	.594
	16 minggu dosis 20 mcg	7.35536*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	9.25000*	1.545167	.000
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-8.46913*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 0	-7.50213*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 0	-6.19300*	1.545167	.007
	12 minggu dosis 10 mcg	-2.54800	1.545167	.885
	20 minggu dosis 10 mcg	2.32025	1.545167	.936
	12 minggu dosis 15 mcg	-.58775	1.545167	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	2.46500	1.545167	.906
	20 minggu dosis 15 mcg	3.58350	1.545167	.472
	12 minggu dosis 20 mcg	.76362	1.545167	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	4.80738	1.545167	.097
	20 minggu dosis 20 mcg	6.70200*	1.545167	.002
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-10.78938*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 0	-9.82237*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 0	-8.51325*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-4.86825	1.545167	.088
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.32025	1.545167	.936
	12 minggu dosis 15 mcg	-2.90800	1.545167	.767
	16 minggu dosis 15 mcg	.14475	1.545167	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	1.26325	1.545167	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-1.55663	1.545167	.997
	16 minggu dosis 20 mcg	2.48713	1.545167	.901
	20 minggu dosis 20 mcg	4.38175	1.545167	.184

Dependent Variable: konsentrasi SOD

22

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-7.88137*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 0	-6.91437*	1.545167	.001
	20 minggu dosis 0	-5.60525*	1.545167	.023
	12 minggu dosis 10 mcg	-1.96025	1.545167	.981
	16 minggu dosis 10 mcg	.58775	1.545167	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	2.90800	1.545167	.767
	16 minggu dosis 15 mcg	3.05275	1.545167	.708
	20 minggu dosis 15 mcg	4.17125	1.545167	.245
	12 minggu dosis 20 mcg	1.35138	1.545167	.999
	16 minggu dosis 20 mcg	5.39513*	1.545167	.035
	20 minggu dosis 20 mcg	7.28975*	1.545167	.001
16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-10.93413*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 0	-9.96712*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 0	-8.65800*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-5.01300	1.545167	.069
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.46500	1.545167	.906
	20 minggu dosis 10 mcg	-.14475	1.545167	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	3.05275	1.545167	.708
	20 minggu dosis 15 mcg	1.11850	1.545167	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-1.70137	1.545167	.994
	16 minggu dosis 20 mcg	2.34238	1.545167	.932
	20 minggu dosis 20 mcg	4.23700	1.545167	.225
20 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-12.05263*	1.545167	.000
	16 minggu dosis 0	-11.08562*	1.545167	.000
	20 minggu dosis 0	-9.77650*	1.545167	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-6.13150*	1.545167	.008
	16 minggu dosis 10 mcg	-3.58350	1.545167	.472
	20 minggu dosis 10 mcg	-1.26325	1.545167	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-4.17125	1.545167	.245
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.11850	1.545167	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-2.81987	1.545167	.800
	16 minggu dosis 20 mcg	1.22388	1.545167	1.000
	20 minggu dosis 20 mcg	3.11850	1.545167	.680

Dependent Variable: konsentrasi SOD

224

Tukey MSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (i-j)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-9,23275*	1,545167	.000
	16 minggu dosis 0	-8,26575*	1,545167	.000
	20 minggu dosis 0	-6,95663*	1,545167	.001
	12 minggu dosis 10 mcg	-3,31162	1,545167	.594
	16 minggu dosis 10 mcg	-.76362	1,545167	1,000
	20 minggu dosis 10 mcg	1,55663	1,545167	.987
	12 minggu dosis 15 mcg	-1,35138	1,545167	.999
	16 minggu dosis 15 mcg	1,70137	1,545167	.984
	20 minggu dosis 15 mcg	2,81987	1,545167	.800
	16 minggu dosis 20 mcg	4,04375	1,545167	.287
20 minggu dosis 20 mcg	5,93837*	1,545167	.012	
16 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-13,27650*	1,545167	.000
	16 minggu dosis 0	-12,30950*	1,545167	.000
	20 minggu dosis 0	-11,00038*	1,545167	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-7,35538*	1,545167	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-4,80738	1,545167	.097
	20 minggu dosis 10 mcg	-2,48713	1,545167	.801
	12 minggu dosis 15 mcg	-5,39513*	1,545167	.035
	16 minggu dosis 15 mcg	-2,34238	1,545167	.932
	20 minggu dosis 15 mcg	-1,22388	1,545167	1,000
	12 minggu dosis 20 mcg	-4,04375	1,545167	.287
20 minggu dosis 20 mcg	1,89462	1,545167	.985	
20 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-15,17113*	1,545167	.000
	16 minggu dosis 0	-14,20412*	1,545167	.000
	20 minggu dosis 0	-12,89500*	1,545167	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-9,25000*	1,545167	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-6,70200*	1,545167	.002
	20 minggu dosis 10 mcg	-4,38175	1,545167	.184
	12 minggu dosis 15 mcg	-7,28975*	1,545167	.001
	16 minggu dosis 15 mcg	-4,23700	1,545167	.225
	20 minggu dosis 15 mcg	-3,11650	1,545167	.680
	12 minggu dosis 20 mcg	-5,93837*	1,545167	.012
16 minggu dosis 20 mcg	-1,89462	1,545167	.985	

Lampiran 2a

Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Katalase (U/ml) Jaringan hati tikus putih percobaan setelah diberi AFB₁

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	731,000	729,485	728,879	727,364
	2	731,000	728,879	728,879	727,667
	3	731,000	728,879	729,182	728,879
	4	731,303	729,485	728,879	727,970
	5	731,606	729,182	728,879	727,970
	6	731,303	729,182	729,182	729,485
	7	731,909	729,182	728,879	728,424
	8	732,212	729,182	728,879	727,667
16 Minggu	1	730,394	728,273	726,758	721,909
	2	730,394	728,273	726,455	726,758
	3	730,697	728,273	726,758	727,061
	4	730,697	727,970	727,061	724,333
	5	730,697	727,970	727,364	728,273
	6	731,000	728,121	727,364	724,333
	7	731,000	728,121	727,667	726,758
	8	731,000	728,197	726,758	724,333
20 Minggu	1	730,394	721,909	721,904	721,909
	2	730,394	726,758	726,455	726,758
	3	729,182	727,061	726,758	724,333
	4	729,485	727,061	726,758	724,333
	5	728,576	727,364	724,333	721,909
	6	729,485	726,758	727,364	724,333
	7	729,485	727,970	726,455	721,909
	8	729,485	724,333	721,909	721,909

Lampiran 2h

Analisis Kadar Enzim Katalase Jaringan Hati Tikus Percobaan menurut lama pemberian dan Dosis AFB₁

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: konsentrasi katalase

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	731.29163	.438784	8
	16 minggu	730.73488	.252860	8
	20 minggu	729.56075	.600585	8
	Total	730.52908	.854959	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	729.16200	.229046	8
	16 minggu	728.14975	.127659	8
	20 minggu	726.15175	2.016819	8
	Total	727.82783	1.705840	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	729.04188	.354476	8
	16 minggu	727.02313	.410929	8
	20 minggu	725.24200	2.239884	8
	Total	727.10233	2.032483	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	729.17825	.710265	8
	16 minggu	725.46975	2.079320	8
	20 minggu	723.42413	1.803778	8
	Total	725.69071	2.532953	24
Total	12 minggu	729.42344	1.245405	32
	16 minggu	727.84438	2.200447	32
	20 minggu	726.05465	2.827852	32
	Total	727.78749	2.551928	96

ANOVA

konsentrasi katalase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	496,503	11	45,137	29,848	,000
Within Groups	127,027	84	1,512		
Total	623,530	95			

Post Hoc Tests



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: konsentrasi ADLN di perpustakaan Universitas Airlangga

228

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	496.503 ^a	11	45.137	29.848	.000
Intercept	50848764.48	1	50848764.479	33625034	.000
DOSIS	297.213	3	99.071	65.513	.000
LAMA	177.448	2	88.724	58.571	.000
DOSIS * LAMA	21.841	6	3.640	2.407	.034
Error	127.027	64	1.984		
Total	50849388.01	96			
Corrected Total	623.530	95			

a. R Squared = .796 (Adjusted R Squared = .770)

Post Hoc Tests

dosis pemberian AFB1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi katalase

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	2.70125*	.354992	.000
	dosis 2 (15 mcg)	3.42675*	.354992	.000
	dosis 3 (20 mcg)	4.83837*	.354992	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	-2.70125*	.354992	.000
	dosis 2 (15 mcg)	.72550	.354992	.180
	dosis 3 (20 mcg)	2.13712*	.354992	.000
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	-3.42675*	.354992	.000
	dosis 1 (10 mcg)	-.72550	.354992	.180
	dosis 3 (20 mcg)	1.41162*	.354992	.001
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	-4.83837*	.354992	.000
	dosis 1 (10 mcg)	-2.13712*	.354992	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-1.41162*	.354992	.001

Based on observed means.

konsentrasi katalase

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
20 minggu dosis 20 mcg	8	723.42412				
20 minggu dosis 15 mcg	8	725.24200	725.24200			
16 minggu dosis 20 mcg	8	725.46975	725.46975			
20 minggu dosis 10 mcg	8		726.15175	726.15175		
16 minggu dosis 15 mcg	8		727.02313	727.02313	727.02313	
16 minggu dosis 10 mcg	8			728.14975	728.14975	728.14975
12 minggu dosis 20 mcg	8			728.17825	728.17825	728.17825
12 minggu dosis 15 mcg	8				729.04188	729.04188
12 minggu dosis 10 mcg	8					729.18200
20 minggu dosis 0	8					729.56075
16 minggu dosis 0	8					
12 minggu dosis 0	8					
Sig.		.055	.161	.060	.062	.488

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

konsentrasi katalase

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	Subset for alpha = .05	
	6	7
20 minggu dosis 20 mcg		
20 minggu dosis 15 mcg		
16 minggu dosis 20 mcg		
20 minggu dosis 10 mcg		
16 minggu dosis 15 mcg		
16 minggu dosis 10 mcg		
12 minggu dosis 20 mcg		
12 minggu dosis 15 mcg	729.04188	
12 minggu dosis 10 mcg	729.18200	
20 minggu dosis 0	729.56075	729.56075
16 minggu dosis 0	730.73488	730.73488
12 minggu dosis 0		731.29162
Sig.	.220	.193

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Dependent Variable: konsentrasi katalase
Tukey HSD

(I) lama pemberian	(J) lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12 minggu	16 minggu	1.57906*	.307432	.000	.84554	2.31258
	20 minggu	3.32878*	.307432	.000	2.59526	4.06230
16 minggu	12 minggu	-1.57906*	.307432	.000	-2.31258	-.84554
	20 minggu	1.74972*	.307432	.000	1.01620	2.48324
20 minggu	12 minggu	-3.32878*	.307432	.000	-4.06230	-2.59526
	16 minggu	-1.74972*	.307432	.000	-2.48324	-1.01620

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

konsentrasi katalase

Tukey HSD^{a,b}

lama pemberian	N	Subset		
		1	2	3
20 minggu	32	726.09466		
18 minggu	32		727.84438	
12 minggu	32			729.42344
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.512.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32.000.

b. Alpha = .05.

Dependent Variable: konsentrasi katalase

131

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	.55575	.614864	.999
	20 minggu dosis 0	1.73067	.614864	.193
	12 minggu dosis 10 mcg	2.10962*	.614864	.041
	16 minggu dosis 10 mcg	3.14187*	.614864	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	5.13987*	.614864	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	2.24975*	.614864	.021
	16 minggu dosis 15 mcg	4.26850*	.614864	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	6.04962*	.614864	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	3.11337*	.614864	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	5.82187*	.614864	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	7.86750*	.614864	.000
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-.55575	.614864	.999
	20 minggu dosis 0	1.17413	.614864	.750
	12 minggu dosis 10 mcg	1.55286	.614864	.339
	16 minggu dosis 10 mcg	2.56513*	.614864	.004
	20 minggu dosis 10 mcg	4.58313*	.614864	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	1.69300	.614864	.220
	16 minggu dosis 15 mcg	3.71175*	.614864	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	5.49286*	.614864	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	2.55663*	.614864	.004
	16 minggu dosis 20 mcg	5.26513*	.614864	.000
20 minggu dosis 20 mcg	7.31075*	.614864	.000	
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-1.73087	.614864	.193
	16 minggu dosis 0	-1.17413	.614864	.750
	12 minggu dosis 10 mcg	.37875	.614864	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	1.41100	.614864	.488
	20 minggu dosis 10 mcg	3.40900*	.614864	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.51887	.614864	.999
	16 minggu dosis 15 mcg	2.53762*	.614864	.005
	20 minggu dosis 15 mcg	4.31875*	.614864	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	1.38250	.614864	.520
	16 minggu dosis 20 mcg	4.09100*	.614864	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	6.13663*	.614864	.000

Dependent Variable: konsentrasi kataiase
Tukey HSD

271

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-2.10962*	.614864	.041
	16 minggu dosis 0	-1.55288	.614864	.339
	20 minggu dosis 0	-.37875	.614864	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	1.03225	.614864	.873
	20 minggu dosis 10 mcg	3.03025*	.614864	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.14012	.614864	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	2.15887*	.614864	.033
	20 minggu dosis 15 mcg	3.94000*	.614864	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	1.00375	.614864	.892
	16 minggu dosis 20 mcg	3.71225*	.614864	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	5.75788*	.614864	.000
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-3.14187*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-2.58513*	.614864	.004
	20 minggu dosis 0	-1.41100	.614864	.488
	12 minggu dosis 10 mcg	-1.03225	.614864	.873
	20 minggu dosis 10 mcg	1.99800	.614864	.068
	12 minggu dosis 15 mcg	-.89212	.614864	.949
	16 minggu dosis 15 mcg	1.12662	.614864	.796
	20 minggu dosis 15 mcg	2.90775*	.614864	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	-.02850	.614864	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	2.68000*	.614864	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	4.72563*	.614864	.000
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	-5.13967*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-4.58313*	.614864	.000
	20 minggu dosis 0	-3.40900*	.614864	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-3.03025*	.614864	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-1.99800	.614864	.068
	12 minggu dosis 15 mcg	-2.89013*	.614864	.001
	16 minggu dosis 15 mcg	-.87138	.614864	.957
	20 minggu dosis 15 mcg	.90975	.614864	.942
	12 minggu dosis 20 mcg	-2.02650	.614864	.060
	16 minggu dosis 20 mcg	.68200	.614864	.993
	20 minggu dosis 20 mcg	2.72783*	.614864	.002

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-2.24975*	.614864	.021
	16 minggu dosis 0	-1.69300	.614864	.220
	20 minggu dosis 0	-.51887	.614864	.999
	12 minggu dosis 10 mcg	-.14012	.614864	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.89212	.614864	.949
	20 minggu dosis 10 mcg	2.89013*	.614864	.001
	16 minggu dosis 15 mcg	2.01875	.614864	.062
	20 minggu dosis 15 mcg	3.79988*	.614864	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	.86362	.614864	.958
	16 minggu dosis 20 mcg	3.57213*	.614864	.000
16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-4.26850*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-3.71175*	.614864	.000
	20 minggu dosis 0	-2.53762*	.614864	.005
	12 minggu dosis 10 mcg	-2.15887*	.614864	.033
	16 minggu dosis 10 mcg	-1.12662	.614864	.796
	20 minggu dosis 10 mcg	.87138	.614864	.957
	12 minggu dosis 15 mcg	-2.01875	.614864	.062
	20 minggu dosis 15 mcg	1.78113	.614864	.161
	12 minggu dosis 20 mcg	-1.15512	.614864	.768
	16 minggu dosis 20 mcg	1.55338	.614864	.339
20 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	-6.04962*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-5.49288*	.614864	.000
	20 minggu dosis 0	-4.31875*	.614864	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-3.94000*	.614864	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.90775*	.614864	.001
	20 minggu dosis 10 mcg	-.90975	.614864	.842
	12 minggu dosis 15 mcg	-3.79988*	.614864	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-1.78113	.614864	.161
	12 minggu dosis 20 mcg	-2.93625*	.614864	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.22775	.614864	1.000
20 minggu dosis 20 mcg	1.81788	.614864	.141	

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-3.11337*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-2.55663*	.614864	.004
	20 minggu dosis 0	-1.36250	.614864	.520
	12 minggu dosis 10 mcg	-1.00375	.614864	.892
	16 minggu dosis 10 mcg	.02850	.614864	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	2.02650	.614864	.060
	12 minggu dosis 15 mcg	-.86362	.614864	.858
	16 minggu dosis 15 mcg	1.15512	.614884	.769
	20 minggu dosis 15 mcg	2.93625*	.614864	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	2.70850*	.614864	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	4.75413*	.614864	.000
16 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-5.82187*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-5.26513*	.614864	.000
	20 minggu dosis 0	-4.09100*	.614864	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-3.71225*	.614864	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.68000*	.614884	.002
	20 minggu dosis 10 mcg	-.68200	.614864	.993
	12 minggu dosis 15 mcg	-3.57213*	.614864	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-1.55338	.614864	.339
	20 minggu dosis 15 mcg	.22775	.614864	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-2.70850*	.614864	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	2.04563	.614864	.055
20 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	-7.86750*	.614864	.000
	16 minggu dosis 0	-7.31075*	.614864	.000
	20 minggu dosis 0	-6.13663*	.614864	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-5.75788*	.614864	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-4.72563*	.614864	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-2.72763*	.614864	.002
	12 minggu dosis 15 mcg	-5.61775*	.614864	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.59900*	.614864	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-1.81788	.614864	.141
	12 minggu dosis 20 mcg	-4.75413*	.614864	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-2.04563	.614864	.055

Lampiran 3a

**Hasil Perhitungan Kadar MDA (pp/ml) Jaringan hati tikus percobaan
setelah diberi AFB₁**

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	0,091	0,213	0,192	0,251
	2	0,104	0,251	0,255	0,247
	3	0,138	0,196	0,234	0,255
	4	0,133	0,196	0,242	0,251
	5	0,075	0,188	0,200	0,259
	6	0,142	0,184	0,247	0,226
	7	0,112	0,196	0,272	0,238
	8	0,140	0,205	0,251	0,221
16 Minggu	1	0,133	0,230	0,251	0,301
	2	0,104	0,213	0,247	0,288
	3	0,138	0,221	0,255	0,230
	4	0,112	0,274	0,251	0,230
	5	0,117	0,272	0,255	0,247
	6	0,146	0,196	0,238	0,274
	7	0,125	0,196	0,217	0,268
	8	0,129	0,272	0,272	0,226
20 Minggu	1	0,121	0,242	0,318	0,322
	2	0,138	0,213	0,402	0,318
	3	0,125	0,247	0,318	0,360
	4	0,112	0,314	0,305	0,477
	5	0,146	0,284	0,318	0,309
	6	0,129	0,276	0,309	0,381
	7	0,133	0,278	0,314	0,247
	8	0,154	0,249	0,305	0,402

Lampiran 3b

Analisis Kadar MDA Jaringan hati tikus putih menurut lama pemberian dan dosis AFB₁

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: konsentrasi MDA

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	.11688	.025312	8
	16 minggu	.12550	.013949	8
	20 minggu	.13225	.013604	8
	Total	.12488	.018758	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	.20587	.023173	8
	16 minggu	.23425	.033809	8
	20 minggu	.28287	.031234	8
	Total	.23433	.037058	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	.23663	.027443	8
	16 minggu	.24825	.015827	8
	20 minggu	.32363	.032156	8
	Total	.26950	.046606	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	.24350	.013836	8
	16 minggu	.25800	.028830	8
	20 minggu	.35200	.069652	8
	Total	.28450	.064819	24
Total	12 minggu	.20072	.055725	32
	16 minggu	.21650	.058900	32
	20 minggu	.26769	.094725	32
	Total	.22830	.076805	96

Oneway

ANOVA

konsentrasi MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.479	11	.044	45.123	.000
Within Groups	.081	84	.001		
Total	.560	95			

Post Hoc Tests



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: konsentrasi MDA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.479 ^a	11	.044	45.123	.000
Intercept	5.004	1	5.004	5181.788	.000
DOSIS	.374	3	.125	129.151	.000
LAMA	.078	2	.039	40.617	.000
DOSIS * LAMA	.027	6	.004	4.611	.000
Error	.081	84	.001		
Total	5.564	96			
Corrected Total	.560	95			

a. R Squared = .855 (Adjusted R Squared = .836)

Post Hoc Tests**dosis pemberian AFB1**

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi MDA

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	-.10946*	.008970	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-.14463*	.008970	.000
	dosis 3 (20 mcg)	-.15963*	.008970	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	.10946*	.008970	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-.03517*	.008970	.001
	dosis 3 (20 mcg)	-.05017*	.008970	.000
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	.14463*	.008970	.000
	dosis 1 (10 mcg)	.03517*	.008970	.001
	dosis 3 (20 mcg)	-.01500	.008970	.345
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	.15963*	.008970	.000
	dosis 1 (10 mcg)	.05017*	.008970	.000
	dosis 2 (15 mcg)	.01500	.008970	.345

Based on observed means.

konantraer MOA

121

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
12 minggu dosis 0	8	.1688			
16 minggu dosis 0	8	.12550			
20 minggu dosis 0	8	.13225			
12 minggu dosis 10 mcg	8		.20587		
16 minggu dosis 10 mcg	8		.23425	.23425	
12 minggu dosis 15 mcg	8		.23663	.23663	
12 minggu dosis 20 mcg	8		.24350	.24350	
16 minggu dosis 15 mcg	8		.24825	.24825	
16 minggu dosis 20 mcg	8		.25800	.25800	
20 minggu dosis 10 mcg	8			.26288	
20 minggu dosis 15 mcg	8				.32363
20 minggu dosis 20 mcg	8				.35200
Sig.		.998	.051	.790	.799

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi_MDA

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	.00862	.015537	1.000
	20 minggu dosis 0	-.01538	.015537	.998
	12 minggu dosis 10 mcg	-.08900*	.015537	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-.11737*	.015537	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.14600*	.015537	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-.11975*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-.13138*	.015537	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-.20675*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.12662*	.015537	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.14113*	.015537	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-.23512*	.015537	.000	
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.00862	.015537	1.000
	20 minggu dosis 0	-.00675	.015537	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-.08037*	.015537	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-.10875*	.015537	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.13738*	.015537	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-.11113*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-.12275*	.015537	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-.19813*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.11800*	.015537	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.13250*	.015537	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-.22650*	.015537	.000	
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.01538	.015537	.998
	16 minggu dosis 0	.00675	.015537	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-.07362*	.015537	.001
	16 minggu dosis 10 mcg	-.10200*	.015537	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.13063*	.015537	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-.10438*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-.11600*	.015537	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-.19138*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.11125*	.015537	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.12575*	.015537	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-.21975*	.015537	.000	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi MDA

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.08900*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.08037*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.07362*	.015537	.001
	16 minggu dosis 10 mcg	-.02638	.015537	.799
	20 minggu dosis 10 mcg	-.05700*	.015537	.020
	12 minggu dosis 15 mcg	-.03075	.015537	.706
	16 minggu dosis 15 mcg	-.04238	.015537	.232
	20 minggu dosis 15 mcg	-.11775*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.03763	.015537	.404
	16 minggu dosis 20 mcg	-.05213	.015537	.051
	20 minggu dosis 20 mcg	-.14613*	.015537	.000
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.11737*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.10875*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.10200*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.02838	.015537	.789
	20 minggu dosis 10 mcg	-.02863	.015537	.790
	12 minggu dosis 15 mcg	-.00238	.015537	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-.01400	.015537	.999
	20 minggu dosis 15 mcg	-.08938*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.00925	.015537	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.02375	.015537	.928
	20 minggu dosis 20 mcg	-.11775*	.015537	.000
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.14500*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.13738*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.13063*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.05700*	.015537	.020
	16 minggu dosis 10 mcg	.02863	.015537	.790
	12 minggu dosis 15 mcg	.02625	.015537	.868
	16 minggu dosis 15 mcg	.01463	.015537	.998
	20 minggu dosis 15 mcg	-.06075*	.015537	.010
	12 minggu dosis 20 mcg	.01938	.015537	.983
	16 minggu dosis 20 mcg	.00488	.015537	1.000
	20 minggu dosis 20 mcg	-.08912*	.015537	.000

Multiple Comparisons

217

Dependent Variable: konsentrasi MDA

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	.11975*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.11113*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.10438*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.03075	.015537	.706
	16 minggu dosis 10 mcg	.00238	.015537	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.02625	.015537	.868
	16 minggu dosis 15 mcg	-.01162	.015537	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	.08700*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-.00687	.015537	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.02137	.015537	.965
	20 minggu dosis 20 mcg	-.11537*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	.13138*	.015537
16 minggu dosis 0		.12275*	.015537	.000
20 minggu dosis 0		.11600*	.015537	.000
12 minggu dosis 10 mcg		.04238	.015537	.232
16 minggu dosis 10 mcg		.01400	.015537	.999
20 minggu dosis 10 mcg		-.01463	.015537	.998
12 minggu dosis 15 mcg		.01162	.015537	1.000
20 minggu dosis 15 mcg		-.07538*	.015537	.000
12 minggu dosis 20 mcg		.00475	.015537	1.000
16 minggu dosis 20 mcg		-.00975	.015537	1.000
20 minggu dosis 20 mcg		-.10375*	.015537	.000
20 minggu dosis 15 mcg		12 minggu dosis 0	.20675*	.015537
	16 minggu dosis 0	.19813*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.19138*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.11775*	.015537	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.08938*	.015537	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	.06075*	.015537	.010
	12 minggu dosis 15 mcg	.08700*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	.07538*	.015537	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	.08013*	.015537	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	.06562*	.015537	.003
	20 minggu dosis 20 mcg	-.02837	.015537	.799

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi MDA

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	.12662*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.11800*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.11125*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.03763	.015537	.404
	16 minggu dosis 10 mcg	.00925	.015537	.1000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.01938	.015537	.983
	12 minggu dosis 15 mcg	.00687	.015537	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-.00475	.015537	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-.08013*	.015537	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.01450	.015537	.598
20 minggu dosis 20 mcg	-.10850*	.015537	.000	
16 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	.14113*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.13250*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.12575*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.05213	.015537	.051
	16 minggu dosis 10 mcg	.02375	.015537	.928
	20 minggu dosis 10 mcg	-.00488	.015537	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.02137	.015537	.965
	16 minggu dosis 15 mcg	.00975	.015537	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-.06562*	.015537	.003
	12 minggu dosis 20 mcg	.01450	.015537	.999
20 minggu dosis 20 mcg	-.09400*	.015537	.000	
20 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	.23512*	.015537	.000
	16 minggu dosis 0	.22650*	.015537	.000
	20 minggu dosis 0	.21975*	.015537	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.14613*	.015537	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.11775*	.015537	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	.08912*	.015537	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.11537*	.015537	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	.10375*	.015537	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	.02637	.015537	.799
	12 minggu dosis 20 mcg	.10850*	.015537	.000
16 minggu dosis 20 mcg	.09400*	.015537	.000	

Lampiran 4a

Hasil perhitungan kerusakan sel hati tikus putih percobaan setelah diberi AFB₁

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	0	71	75	82
	2	0	77	75	89
	3	0	73	77	95
	4	0	71	80	108
	5	0	76	78	101
	6	0	67	97	101
	7	0	75	85	90
	8	0	77	76	101
16 Minggu	1	0	72	97	105
	2	0	75	113	129
	3	0	86	108	96
	4	0	81	94	109
	5	0	84	100	119
	6	0	84	95	133
	7	0	85	98	132
	8	0	87	118	119
20 Minggu	1	0	81	125	164
	2	0	97	111	125
	3	0	94	121	137
	4	0	101	139	128
	5	0	97	133	127
	6	0	111	127	130
	7	0	105	118	165
	8	0	106	112	127

Lampiran 4b

Analisis Kerusakan Sel Hati akibat pemberian AFB₁ menurut lama pemberian dan dosis

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	n
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: kerusakan sel hati

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	.00	.000	8
	16 minggu	.00	.000	8
	20 minggu	.00	.000	8
	Total	.00	.000	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	73.38	3.543	8
	16 minggu	81.75	5.445	8
	20 minggu	99.00	9.181	8
	Total	84.71	12.540	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	80.38	7.482	8
	16 minggu	102.88	8.963	8
	20 minggu	123.25	9.780	8
	Total	102.17	19.765	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	95.88	8.459	8
	16 minggu	117.75	13.509	8
	20 minggu	137.88	16.822	8
	Total	117.17	21.689	24
Total	12 minggu	62.41	37.849	32
	16 minggu	75.59	46.918	32
	20 minggu	90.03	55.611	32
	Total	76.01	48.229	96

Oneway

247

ANOVA

kerusakan sel hati.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	214700.11	11	19518.192	261.451	.000
Within Groups	6270.875	84	74.653		
Total	220970.99	95			

Post Hoc Tests



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: kerusakan sel hati

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	214700.115 ^a	11	19518.192	261.451	.000
Intercept	554648.010	1	554648.010	7429.654	.000
DOSIS	197549.365	3	65849.788	882.075	.000
LAMA	12218.583	2	6109.292	81.836	.000
DOSIS * LAMA	4932.167	6	822.028	11.011	.000
Error	6270.875	84	74.653		
Total	775619.000	96			
Corrected Total	220970.990	95			

^a R Squared = .972 (Adjusted R Squared = .968)

Post Hoc Tests

dosis pemberian AFB1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kerusakan sel hati

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	-84.71*	2.494	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-102.17*	2.494	.000
	dosis 3 (20 mcg)	-117.17*	2.494	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	84.71*	2.494	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-17.46*	2.494	.000
	dosis 3 (20 mcg)	-32.46*	2.494	.000
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	102.17*	2.494	.000
	dosis 1 (10 mcg)	17.46*	2.494	.000
	dosis 3 (20 mcg)	-15.00*	2.494	.000
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	117.17*	2.494	.000
	dosis 1 (10 mcg)	32.46*	2.494	.000
	dosis 2 (15 mcg)	15.00*	2.494	.000

Based on observed means

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kerusakan sel hati

Tukey HSD

(I) lama pemberian	(J) lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12 minggu	16 minggu	-13.19*	2.160	.000	-18.34	-8.03
	20 minggu	-27.63*	2.160	.000	-32.78	-22.47
16 minggu	12 minggu	13.19*	2.160	.000	8.03	18.34
	20 minggu	-14.44*	2.160	.000	-19.59	-9.28
20 minggu	12 minggu	27.63*	2.160	.000	22.47	32.78
	16 minggu	14.44*	2.160	.000	9.28	19.59

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

kerusakan sel hati

Tukey HSD^{a,b}

lama pemberian	N	Subset		
		1	2	3
12 minggu	32	62.41		
16 minggu	32		75.59	
20 minggu	32			90.03
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 74.853.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32.000.

b. Alpha = .05.

kerusakan sel hati

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
12 minggu dosis 0	8	.00					
16 minggu dosis 0	8	.00					
20 minggu dosis 0	8	.00					
12 minggu dosis 10 mcg	8		73.38				
12 minggu dosis 15 mcg	8		80.38				
16 minggu dosis 10 mcg	8		81.75	81.75			
12 minggu dosis 20 mcg	8			95.88	95.88		
20 minggu dosis 10 mcg	8				99.00		
16 minggu dosis 15 mcg	8				102.88		
16 minggu dosis 20 mcg	8					117.75	
20 minggu dosis 15 mcg	8					123.25	
20 minggu dosis 20 mcg	8						137.88
Sig.		1.000	.732	.064	.897	.980	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.



Dependent Variable: kerusakan sel hati

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-73.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-81.75*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-99.00*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-80.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-102.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-123.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-95.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-117.75*	4.320	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-137.88*	4.320	.000	
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-73.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-81.75*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-99.00*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-80.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-102.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-123.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-95.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-117.75*	4.320	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-137.88*	4.320	.000	
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	16 minggu dosis 0	.00	4.320	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-73.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-81.75*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-99.00*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-80.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-102.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-123.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-95.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-117.75*	4.320	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-137.88*	4.320	.000	

Dependent Variable: kerusakan sel hati

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	73.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	73.38*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	73.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-8.38	4.320	.732
	20 minggu dosis 10 mcg	-25.63*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-7.00	4.320	.697
	18 minggu dosis 15 mcg	-29.50*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-49.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-22.50*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-44.38*	4.320	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	-64.50*	4.320	.000
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	81.75*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	81.75*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	81.75*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	8.38	4.320	.732
	20 minggu dosis 10 mcg	-17.25*	4.320	.007
	12 minggu dosis 15 mcg	1.38	4.320	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-21.13*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-41.50*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-14.13	4.320	.064
	16 minggu dosis 20 mcg	-36.00*	4.320	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	-58.13*	4.320	.000
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	99.00*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	99.00*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	99.00*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	25.63*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	17.25*	4.320	.007
	12 minggu dosis 15 mcg	18.63*	4.320	.002
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.88	4.320	.999
	20 minggu dosis 15 mcg	-24.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	3.13	4.320	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-18.75*	4.320	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-38.88*	4.320	.000

Multiple Comparisons

253

Dependent Variable: kerusakan sel hati
Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	80.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	80.38*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	80.38*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	7.00	4.320	.897
	16 minggu dosis 10 mcg	-1.38	4.320	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-18.63*	4.320	.002
	16 minggu dosis 15 mcg	-22.50*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-42.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-15.50*	4.320	.026
	16 minggu dosis 20 mcg	-37.38*	4.320	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-57.50*	4.320	.000	
16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	102.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	102.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	102.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	29.50*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	21.13*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	3.88	4.320	.999
	12 minggu dosis 15 mcg	22.50*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-20.38*	4.320	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	7.00	4.320	.897
	16 minggu dosis 20 mcg	-14.88*	4.320	.040
20 minggu dosis 20 mcg	-35.00*	4.320	.000	
20 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	123.25*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	123.25*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	123.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	49.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	41.50*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	24.25*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	42.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	20.38*	4.320	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	27.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	5.50	4.320	.980
20 minggu dosis 20 mcg	-14.63*	4.320	.047	

Dependent Variable: kerusakan sel hati

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	95.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	95.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	95.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	22.50*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	14.13	4.320	.064
	20 minggu dosis 10 mcg	-3.13	4.320	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	15.50*	4.320	.026
	16 minggu dosis 15 mcg	-7.00	4.320	.897
	20 minggu dosis 15 mcg	-27.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-21.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	-42.00*	4.320	.000
16 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	117.75*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	117.75*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	117.75*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	44.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	36.00*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	18.75*	4.320	.002
	12 minggu dosis 15 mcg	37.38*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	14.88*	4.320	.040
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.50	4.320	.980
	12 minggu dosis 20 mcg	21.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 20 mcg	-20.13*	4.320	.001
20 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	137.88*	4.320	.000
	16 minggu dosis 0	137.88*	4.320	.000
	20 minggu dosis 0	137.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	64.50*	4.320	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	58.13*	4.320	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	38.88*	4.320	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	57.50*	4.320	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	35.00*	4.320	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	14.63*	4.320	.047
	12 minggu dosis 20 mcg	42.00*	4.320	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	20.13*	4.320	.001

Lampiran 5a

**Hasil perhitungan sel hati tikus putih yang mengalami apoptosis
setelah diberi AFB₁**

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	0	6	10	12
	2	1	8	7	8
	3	0	5	6	9
	4	0	5	8	7
	5	1	2	3	6
	6	0	5	5	9
	7	1	7	5	6
	8	1	5	7	5
16 Minggu	1	0	13	10	10
	2	0	15	9	12
	3	0	10	13	11
	4	2	12	10	7
	5	0	10	12	8
	6	0	8	8	11
	7	1	7	5	9
	8	0	9	6	5
20 Minggu	1	0	11	12	8
	2	0	11	9	12
	3	0	9	8	8
	4	1	7	8	8
	5	0	6	7	7
	6	0	8	5	6
	7	0	8	8	5
	8	1	8	6	8

Lampiran 5b

Analisis sel hati yang mengalami apoptosis menurut lama pemberian dan dosis AFB₁

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	.50	.535	8
	16 minggu	.38	.744	8
	20 minggu	.25	.463	8
	Total	.37	.576	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	5.38	1.768	8
	16 minggu	10.50	2.673	8
	20 minggu	8.50	1.773	8
	Total	8.13	2.953	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	6.38	2.134	8
	16 minggu	9.13	2.748	8
	20 minggu	7.88	2.100	8
	Total	7.79	2.519	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	7.75	2.252	8
	16 minggu	9.13	2.357	8
	20 minggu	7.75	2.053	8
	Total	8.21	2.226	24
Total	12 minggu	5.00	3.263	32
	16 minggu	7.28	4.830	32
	20 minggu	6.09	3.813	32
	Total	6.12	4.011	96

Oneway

ANOVA

sel yang mengalami apoptosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1207.750	11	109.795	28.754	.000
Within Groups	320.750	84	3.818		
Total	1528.500	95			

Post Hoc Tests



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1207.750 ^a	11	109.785	28.754	.000
Intercept	3601.500	1	3601.500	949.183	.000
DOSIS	1060.333	3	353.444	92.562	.000
LAMA	83.312	2	41.656	10.909	.000
DOSIS * LAMA	64.104	6	10.684	2.798	.016
Error	320.750	84	3.818		
Total	5130.000	96			
Corrected Total	1528.500	95			

^a. R Squared = .790 (Adjusted R Squared = .763)

Post Hoc Tests

dosis pemberian AFB1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	-7.75*	.564	.000
	dosis 2 (15 mcg)	-7.42*	.564	.000
	dosis 3 (20 mcg)	-7.83*	.564	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	7.75*	.564	.000
	dosis 2 (15 mcg)	.33	.564	.935
	dosis 3 (20 mcg)	-.08	.564	.999
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	7.42*	.564	.000
	dosis 1 (10 mcg)	-.33	.564	.935
	dosis 3 (20 mcg)	-.42	.564	.881
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	7.83*	.564	.000
	dosis 1 (10 mcg)	.08	.564	.999
	dosis 2 (15 mcg)	.42	.564	.881

Based on observed means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

Tukey HSD

(I) lama pemberian	(J) lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12 minggu	16 minggu	-2.28*	.489	.000	-3.45	-1.12
	20 minggu	-1.09	.489	.071	-2.26	.07
16 minggu	12 minggu	2.28*	.489	.000	1.12	3.45
	20 minggu	1.19*	.489	.045	.02	2.35
20 minggu	12 minggu	1.09	.489	.071	-.07	2.26
	16 minggu	-1.19*	.489	.045	-2.35	-.02

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

sel yang mengalami apoptosis

Tukey HSD^{a,b}

lama pemberian	N	Subset	
		1	2
12 minggu	32	5.00	
20 minggu	32	6.09	
16 minggu	32		7.28
Sig.		.071	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 3.818.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32.000.

b. Alpha = .05.

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
20 minggu dosis 0	8	.25			
16 minggu dosis 0	8	.38			
12 minggu dosis 0	8	.50			
12 minggu dosis 10 mcg	8		5.38		
12 minggu dosis 15 mcg	8		6.38	6.38	
12 minggu dosis 20 mcg	8		7.75	7.75	7.75
20 minggu dosis 20 mcg	8		7.75	7.75	7.75
20 minggu dosis 15 mcg	8		7.88	7.88	7.88
20 minggu dosis 10 mcg	8		8.50	8.50	8.50
16 minggu dosis 15 mcg	8			9.13	9.13
16 minggu dosis 20 mcg	8			9.13	9.13
16 minggu dosis 10 mcg	8				10.50
Sig.		1.000	.078	.193	.193

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.



Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis
Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	.13	.977	1.000
	20 minggu dosis 0	.25	.977	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-4.88*	.977	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-10.00*	.977	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-8.00*	.977	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	.977	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-8.63*	.977	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-7.38*	.977	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-7.25*	.977	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-8.53*	.977	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-7.25*	.977	.000	
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-.13	.977	1.000
	20 minggu dosis 0	.13	.977	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-5.00*	.977	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-10.13*	.977	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-8.13*	.977	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-6.00*	.977	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-8.75*	.977	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-7.50*	.977	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-7.38*	.977	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-6.75*	.977	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-7.38*	.977	.000	
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	-.25	.977	1.000
	16 minggu dosis 0	.13	.977	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	-5.13*	.977	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-10.25*	.977	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-8.25*	.977	.000
	12 minggu dosis 15 mcg	-6.13*	.977	.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-8.88*	.977	.000
	20 minggu dosis 15 mcg	-7.63*	.977	.000
	12 minggu dosis 20 mcg	-7.50*	.977	.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-8.88*	.977	.000
20 minggu dosis 20 mcg	-7.50*	.977	.000	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	4.88*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	5.00*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	5.13*	.977	.000
	16 minggu dosis 10 mcg	-5.13*	.977	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-3.13	.977	.078
	12 minggu dosis 15 mcg	-1.00	.977	.997
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.75*	.977	.012
	20 minggu dosis 15 mcg	-2.50	.977	.320
	12 minggu dosis 20 mcg	-2.38	.977	.398
	16 minggu dosis 20 mcg	-3.75*	.977	.012
	20 minggu dosis 20 mcg	-2.38	.977	.398
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	10.00*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	10.13*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	10.25*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	5.13*	.977	.000
	20 minggu dosis 10 mcg	2.00	.977	.661
	12 minggu dosis 15 mcg	4.13*	.977	.003
	16 minggu dosis 15 mcg	1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 15 mcg	2.63	.977	.251
	12 minggu dosis 20 mcg	2.75	.977	.193
	16 minggu dosis 20 mcg	1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 20 mcg	2.75	.977	.193
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	8.00*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	8.13*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	8.25*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	3.13	.977	.078
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.00	.977	.661
	12 minggu dosis 15 mcg	2.13	.977	.572
	16 minggu dosis 15 mcg	-.63	.977	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	.63	.977	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	.75	.977	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-.63	.977	1.000
	20 minggu dosis 20 mcg	.75	.977	1.000

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis
 Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	5.88*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	6.00*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	6.13*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	1.00	.977	.997
	16 minggu dosis 10 mcg	-4.13*	.977	.003
	20 minggu dosis 10 mcg	-2.13	.977	.572
	16 minggu dosis 15 mcg	-2.75	.977	.193
	20 minggu dosis 15 mcg	-1.50	.977	.926
	12 minggu dosis 20 mcg	-1.38	.977	.959
	16 minggu dosis 20 mcg	-2.75	.977	.193
20 minggu dosis 20 mcg	-1.38	.977	.959	
16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	8.63*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	8.75*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	8.88*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	3.75*	.977	.012
	16 minggu dosis 10 mcg	-1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 10 mcg	.83	.977	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	2.75	.977	.193
	20 minggu dosis 15 mcg	1.25	.977	.980
	12 minggu dosis 20 mcg	1.38	.977	.959
	16 minggu dosis 20 mcg	.00	.977	1.000
20 minggu dosis 20 mcg	1.38	.977	.959	
20 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	7.38*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	7.50*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	7.63*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	2.50	.977	.320
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.63	.977	.251
	20 minggu dosis 10 mcg	-.63	.977	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	1.50	.977	.926
	16 minggu dosis 15 mcg	-1.25	.977	.980
	12 minggu dosis 20 mcg	.13	.977	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-1.25	.977	.980
20 minggu dosis 20 mcg	.13	.977	1.000	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel yang mengalami apoptosis

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	7.25*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	7.38*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	7.50*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	2.38	.977	.398
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.75	.977	.193
	20 minggu dosis 10 mcg	-.75	.977	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	1.38	.977	.959
	16 minggu dosis 15 mcg	-1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 15 mcg	-.13	.977	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 20 mcg	.00	.977	1.000
16 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	8.63*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	8.75*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	8.88*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	3.75*	.977	.012
	16 minggu dosis 10 mcg	-1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 10 mcg	.63	.977	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	2.75	.977	.193
	16 minggu dosis 15 mcg	.00	.977	1.000
	20 minggu dosis 15 mcg	1.25	.977	.980
	12 minggu dosis 20 mcg	1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 20 mcg	1.38	.977	.958
20 minggu dosis 20 mcg	12 minggu dosis 0	7.25*	.977	.000
	16 minggu dosis 0	7.38*	.977	.000
	20 minggu dosis 0	7.50*	.977	.000
	12 minggu dosis 10 mcg	2.38	.977	.398
	16 minggu dosis 10 mcg	-2.75	.977	.193
	20 minggu dosis 10 mcg	-.75	.977	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	1.38	.977	.959
	16 minggu dosis 15 mcg	-1.38	.977	.959
	20 minggu dosis 15 mcg	-.13	.977	1.000
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	.977	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-1.38	.977	.959

Lampiran 6a

Hasil perhitungan sel hati tikus putih yang mengalami displasia setelah diberi AFB₁

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
16 Minggu	1	0	0	4	1
	2	0	0	5	4
	3	0	0	6	4
	4	0	0	3	5
	5	0	0	3	10
	6	0	0	2	7
	7	0	0	4	4
	8	0	0	0	10
20 Minggu	1	0	1	5	23
	2	0	1	5	5
	3	0	2	3	8
	4	0	0	5	6
	5	0	0	7	3
	6	0	2	16	6
	7	0	1	2	15
	8	0	0	4	3

Lampiran 6b

Analisis sel hati yang mengalami displasia akibat pemberian AFB₁ menurut lama pemberian dan dosis

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
dosis pemberian AFB ₁	1	dosis 0	24
	2	dosis 1 (10 mcg)	24
	3	dosis 2 (15 mcg)	24
	4	dosis 3 (20 mcg)	24
lama pemberian	1	12 minggu	32
	2	16 minggu	32
	3	20 minggu	32

Descriptive Statistics

Dependent Variable: sel hati mengalami displasia

dosis pemberian AFB ₁	lama pemberian	Mean	Std. Deviation	N
dosis 0	12 minggu	.00	.000	8
	16 minggu	.00	.000	8
	20 minggu	.00	.000	8
	Total	.00	.000	24
dosis 1 (10 mcg)	12 minggu	.00	.000	8
	16 minggu	.00	.000	8
	20 minggu	.88	.835	8
	Total	.29	.624	24
dosis 2 (15 mcg)	12 minggu	.00	.000	8
	16 minggu	3.38	1.847	8
	20 minggu	5.88	4.357	8
	Total	3.08	3.586	24
dosis 3 (20 mcg)	12 minggu	.00	.000	8
	16 minggu	5.62	3.159	8
	20 minggu	8.63	6.948	8
	Total	4.75	5.574	24
Total	12 minggu	.00	.000	32
	16 minggu	2.25	2.984	32
	20 minggu	3.84	5.329	32
	Total	2.03	3.832	96

Oneway

ANOVA

sel hali mengalami displasia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	825.531	11	75.048	11.072	.000
Within Groups	569.375	64	8.776		
Total	1394.906	95			

Post Hoc Tests



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: sel hati mengalami displasia

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	825,531 ^a	11	75,046	11,072	,000
Intercept	396,094	1	396,094	58,438	,000
DOSIS	375,615	3	125,205	18,471	,000
LAMA	238,688	2	119,344	17,607	,000
DOSIS * LAMA	211,229	6	35,205	5,194	,000
Error	569,375	84	6,778		
Total	1781,000	96			
Corrected Total	1394,906	95			

a. R Squared = .592 (Adjusted R Squared = .538)

Post Hoc Tests

dosis pemberian AFB1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel hati mengalami displasia

Tukey HSD

(I) dosis pemberian AFB1	(J) dosis pemberian AFB1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
dosis 0	dosis 1 (10 mcg)	-.29	.752	.980
	dosis 2 (15 mcg)	-3,08*	.752	.001
	dosis 3 (20 mcg)	-4,75*	.752	.000
dosis 1 (10 mcg)	dosis 0	.29	.752	.980
	dosis 2 (15 mcg)	-2,79*	.752	.002
	dosis 3 (20 mcg)	-4,46*	.752	.000
dosis 2 (15 mcg)	dosis 0	3,08*	.752	.001
	dosis 1 (10 mcg)	2,79*	.752	.002
	dosis 3 (20 mcg)	-1,67	.752	.127
dosis 3 (20 mcg)	dosis 0	4,75*	.752	.000
	dosis 1 (10 mcg)	4,46*	.752	.000
	dosis 2 (15 mcg)	1,67	.752	.127

Based on observed means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sel hati mengalami displasia

Tukey HSD

(I) lama pemberian	(J) lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12 minggu	16 minggu	-2.25*	.651	.002	-3.80	-.70
	20 minggu	-3.84*	.651	.000	-5.40	-2.29
16 minggu	12 minggu	2.25*	.651	.002	.70	3.80
	20 minggu	-1.59*	.651	.043	-3.15	-.04
20 minggu	12 minggu	3.84*	.651	.000	2.29	5.40
	16 minggu	1.59*	.651	.043	.04	3.15

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

sel hati mengalami displasia

Tukey HSD^{a,b}

lama pemberian	N	Subset		
		1	2	3
12 minggu	32	.00		
16 minggu	32		2.25	
20 minggu	32			3.84
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares.

The error term is Mean Square(Error) = 6.776.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 32.000
- Alpha = .05.

sel hati mengalami displasia

Tukey HSD^a

kombinasi dosis dan lama pemberian	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
12 minggu dosis 0	8	.00		
16 minggu dosis 0	8	.00		
20 minggu dosis 0	8	.00		
12 minggu dosis 10 mcg	8	.00		
16 minggu dosis 10 mcg	8	.00		
12 minggu dosis 15 mcg	8	.00		
12 minggu dosis 20 mcg	8	.00		
20 minggu dosis 10 mcg	8	.68		
16 minggu dosis 15 mcg	8	3.38	3.38	
16 minggu dosis 20 mcg	8		5.63	5.63
20 minggu dosis 15 mcg	8		5.88	5.88
20 minggu dosis 20 mcg	8			8.63
Sig.		.301	.743	.482

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.



Dependent Variable: sel hati mengalami displasia

Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 0	16 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000
16 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000
20 minggu dosis 0	12 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000

Dependent Variable: sel hali mengalami displasia
Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000
16 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
	20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000
20 minggu dosis 10 mcg	12 minggu dosis 0	.88	1.302	1.000
	16 minggu dosis 0	.88	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.88	1.302	1.000
	18 minggu dosis 10 mcg	.88	1.302	1.000
	12 minggu dosis 15 mcg	.88	1.302	1.000
	18 minggu dosis 15 mcg	-2.50	1.302	.743
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.00*	1.302	.012
	12 minggu dosis 20 mcg	.88	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-4.75*	1.302	.022
	20 minggu dosis 20 mcg	-7.75*	1.302	.000

Dependent Variable: sel hati mengalami displasia
Tukey HSD

(I) kombinasi dosis dan lama pemberian	(J) kombinasi dosis dan lama pemberian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
12 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 0	.00	1.302	1.000
	12 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 10 mcg	.00	1.302	1.000
	20 minggu dosis 10 mcg	-.68	1.302	1.000
	16 minggu dosis 15 mcg	-3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 20 mcg	.00	1.302	1.000
	16 minggu dosis 20 mcg	-5.63*	1.302	.002
20 minggu dosis 20 mcg	-8.63*	1.302	.000	
16 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	3.38	1.302	.301
	16 minggu dosis 0	3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 0	3.38	1.302	.301
	12 minggu dosis 10 mcg	3.38	1.302	.301
	16 minggu dosis 10 mcg	3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 10 mcg	2.50	1.302	.743
	12 minggu dosis 15 mcg	3.38	1.302	.301
	20 minggu dosis 15 mcg	-2.50	1.302	.743
	12 minggu dosis 20 mcg	3.38	1.302	.301
	16 minggu dosis 20 mcg	-2.25	1.302	.850
20 minggu dosis 20 mcg	-5.25*	1.302	.006	
20 minggu dosis 15 mcg	12 minggu dosis 0	5.88*	1.302	.001
	16 minggu dosis 0	5.88*	1.302	.001
	20 minggu dosis 0	5.88*	1.302	.001
	12 minggu dosis 10 mcg	5.88*	1.302	.001
	16 minggu dosis 10 mcg	5.88*	1.302	.001
	20 minggu dosis 10 mcg	5.00*	1.302	.012
	12 minggu dosis 15 mcg	5.88*	1.302	.001
	16 minggu dosis 15 mcg	2.50	1.302	.743
	12 minggu dosis 20 mcg	5.88*	1.302	.001
	16 minggu dosis 20 mcg	.25	1.302	1.000
20 minggu dosis 20 mcg	-2.75	1.302	.615	

Lampiran 7

Hasil perhitungan ekspresi protein p53 sel hati tikus setelah diberi AFB₁

Lama Pemberian	No	Dosis Pemberian AFB ₁ (µg)			
		0	10	15	20
12 Minggu	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
16 Minggu	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
20 Minggu	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0

Lampiran 8

Pemeriksaan aktivitas SOD jaringan hati tikus percobaan menurut metode Wong (1989)

Hati ditimbang 10 µg. Kemudian digerus dengan buffer fosfat 800 µl di atas es (dalam keadaan dingin). Ditambahkan 100 µl xanthin oksidase, 100 ml xanthin dan 100 µl NBT (nitro blue tetrazo lisin). Kemudian dipanaskan 30°C selama 10 menit, akan terbentuk formazon yang berwarna biru ungu. Centrifuge 3000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan, tambahkan buffer fosfat sampai 2 cc. Baca dengan spectrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm. Hasil yang dibaca adalah nilai absorbansi. Masukkan dalam kurva baku, kemudian dicari nilai unit aktivitas enzim SOD menggunakan rumus:

$$x = \frac{y - 0,0083}{0,0095}$$

x = nilai aktivitas
y = nilai absorbansi



Lampiran 9**Pemeriksaan aktivitas katalase jaringan hati tikus percobaan menurut metode Sinba (1972)**

Hati ditimbang 100 mg, digerus dengan buffers fosfat 1000 μ l. Kemudian di centrifuge 3500 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan ditambahkan 1000 μ l H_2O_2 20 mM. Baca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm dalam 30 detik. Hasil yang dibaca adalah nilai absorbansi. Masukkan dalam kurva baku, dicari nilai aktivitas dengan menggunakan rumus :

$$x = \frac{y \cdot 1,3127}{0,0033}$$

x = nilai aktivitas

y = nilai absorpsi yang didapat

Lampiran 10

Pemeriksaan kadar MDA jaringan hati tikus putih percobaan menurut metode Uchiyama dan Mibara (1978)

Timbang hati 10 mg, kemudian digerus dalam mortar dingin (4°C) dengan penambahan 50 mM tris buffer (5 % berat vol). Ambil 1 cc homogenat, tambahkan 100 µl TCA 100%, 250 µl HCl 1 N, vortex sampai homogen, saring dengan gelas wali dan kertas saring. Tambahkan 100 µl Na Thiobarbiturat, panaskan dalam water bath 100 °C selama 20 menit, diamlkan pada suhu kamar. terlihat warna merah jambu muda. Disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil, tambahkan H₂O sampai 2 cc. Baca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 531 nm. Nilai yang dibaca adalah nilai absorbansi, dimasukkan ke kurva baku dan didapatkan nilai konsentrasi dengan menggunakan rumus

$$X = \frac{Y - 0,0048}{0,2385}$$

X - Konsentrasi MDA

Y - Nilai Absorbansi yang dibaca

Lampiran 11

Pembuatan sediaan histologi jaringan hati menurut Teknik pembuatan sediaan histologi laboratorium Anatomi Histologi FK Unair Surabaya (Hariadi, 2000)

Hati yang telah direndam formalin paling kurang 2 jam, dipotong-potong dengan tebal kira-kira 2 mm. Potongan-potongan hati dimasukkan ke dalam kantong strimin. Untuk identitas sampel, masing-masing kantong diberi nomor sampel, tanggal dan lain-lain. Masing-masing kantong selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan berikut secara berurutan dan dalam waktu yang sudah ditentukan.

1. Alkohol 80 % selama 2 jam
2. Alkohol 80 % selama 2 jam
3. Alkohol 80 % selama 2 jam
4. Alkohol 100 % selama 1 jam
5. Alkohol 100 % selama 1 jam
6. XyloI selama 2 jam
7. XyloI selama 2 jam
8. Parafin (56 – 58°C) selama 3 jam
9. Parafin (56 – 58°C) selama 3 jam
10. Metil benzoat I selama 6 jam
11. Metil benzoat II selama 6 jam
12. Benzol I selama 6 jam
13. Benzol II selama 6 jam
14. Parafin I selama 20 – 30 menit
15. Parafin II selama 20 – 30 menit
16. Parafin III selama 20 – 30 menit

Jaringan diblok ke dalam parafin dan dibiarkan sampai dingin. Dipotong dengan ketebalan 5 μ dengan mikrotom. Dimasukkan dalam waterbath 50°C, ditempelkan pada objek glass. Dipanasi lagi untuk mencairkan parafin, baru diwarnai.

Pengecatan hematoksin-eosin

Sediaan histologis diatas selanjutnya diperlakukan sebagai berikut

1. Deparafinasi Sediaan dimasukan berturut-turut kedalam xylol I dan xylol II, masing-masing selama 10 menit.

Sediaan histologis selanjutnya dimasukan berturut-turut kedalam alkohol 94 %, 90 %, 80 % dan 70 %, masing-masing selama 10 menit dan terakhir dicuci dengan air suling sampai bersih dan alkohol

2. Pengecatan hemaktosilin. Sediaan dimasukan kedalam larutan hemaktosilin selama 5 menit. Selanjutnya sediaan dicuci dengan air mengalir selama 20 menit.

Sediaan selanjutnya dimasukan kedalam larutan eosin selama 2 menit, kemudian berturut-turut dicuci dengan alkohol 80 %, 90 %, 96 % dan 99 %, masing-masing selama 10 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol I, xylol II selama 2 menit. Terakhir sediaan dikeringkan, kemudian diawetkan dengan menambahkan balsam, ditutup dengan gelas penutup, dan dikeringkan. Selanjutnya sediaan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x dan 400x. Untuk dokumentasi dilakukan pemotretan dengan menggunakan photo mikroskop merk Leica D01 LB.

Lampiran 12

Pemeriksaan ekspresi protein p53 sel hati tikus percobaan dengan imunohistokimia menurut prosedur Kit Dako LSAB

Sediaan histologis yang sudah dideparafinisasi, di inkubasi dengan buffer glicin HCl dengan pH 3,5 selama 5 menit pada suhu 45°C sebanyak 2 kali. Kemudian dengan 0,1% H₂O₂ selama 5 menit sebanyak 3 kali. Sediaan selanjutnya diinkubasi Cuci dengan d H₂O selama 5 menit sebanyak 3 kali. Setelah itu sediaan di inkubasi dengan saponin 0,05 % selama 30 menit pada temperatur ruangan. Lalu cuci dengan H₂O selama 5 menit selama 3 kali. Selanjutnya sediaan di blocking endogenous peroksidase dengan 15 % H₂O₂ selama 5 menit sebanyak 3 kali. Lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan lagi blocking unspezifisik anti gen dengan 1 % NGS (normal goat serum) selama 30 menit dalam tempertatur ruangan. Lalu inkubasi dengan polyclonal p53 anti bodi (pAbp53) sepanjang malam. Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Selanjutnya diinkubasi lagi dengan 2nd anti bodi p53 biotin conjugated selama 1 jam, setelah itu cuci dengan PBS dengan pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Tetesi dengan SA-HRP (Strept Avidin Horse Radist Peroksidase) selama 15 menit, kemudian cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Tetesi dengan larutan chromogen selama 15 menit dan cuci dengan H₂O selama 3-5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian sediaan dicounterstain dengan hemotoksilin dari Meyer selama 10 menit, cuci dengan air kran dan tetesi dengan gelatin dan tutup dengan gelas penutup. Selanjutnya sediaan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 200x dan 400x.

Untuk dokumentasi dilakukan pemotretan dengan menggunakan photo mikroskop merk Leica DNLB.

Lampiran 13

Pemeriksaan sel hati tikus percobaan yang mengalami apoptosis dengan metode Apoptag (Peroxidase Insitu Apoptosis Detection Kit)

Sediaan histologis yang sudah di deparafinasi, diinkubasi dengan proteinase K 20 µg/ml selama 15 menit, lalu cuci dengan H_2O selama 5 menit sebanyak 3 kali, kemudian dilakukan blocking endogenous peroksidase dengan 15 % H_2O_2 selama 5 menit lalu cuci dengan PBS pH 7.4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Sediaan kemudian ditetesi dengan equilibrium buffer selama 10 detik, dan teteskan lagi dengan enzim TdT pada suhu 37°C selama 1 jam. Reaksi distop dengan menempatkan sediaan pada tempat yang berisi stop buffer reaction selama 10 menit pada suhu kamar, lalu dicuci dengan PBS pH 7.4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Sediaan kemudian ditetesi dengan anti digoxigenin conjugate selama 30 menit, lalu cuci PBS pH 7.4 selama 5 menit sebanyak 3 kali, selanjutnya sediaan ditetesi dengan larutan chromogen DAB (diamatrol benzidine) selama 3 sampai 5 menit, lalu cuci dengan H_2O selama 5 menit sebanyak tiga kali. Kemudian sediaan di counterstain dengan methyl green selama 10 menit, lalu cuci dengan H_2O selama 5 menit sebanyak 3 kali. Tetesi dengan entelan dan tutup dengan gelas penutup. Selanjutnya sediaan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 200x dan 400x.

Untuk dokumentasi dilakukan pemotretan dengan menggunakan Photo Microscop merk Leica DMLB