

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN A BERLEBIHAN  
TERHADAP GAMBARAN HISTOLOGIK HEPAR MECIT  
(*Mus musculus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

**A N I K E**

**NIM. 090214744.M**

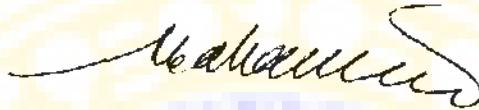
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005  
4 Agustus 2005**

iii

Lembar Pengesahan

TESIS TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 4 AGUSTUS 2005

Pembimbing Ketua



Abd. Kamid Iskandar, dr, MS  
NIP. 130 541 811

Pembimbing



Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 531 759

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof Retno Handajani, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 541 984

Diuji pada

Tanggal 4 Agustus 2005

**PANITIA PENGUJI TESIS**

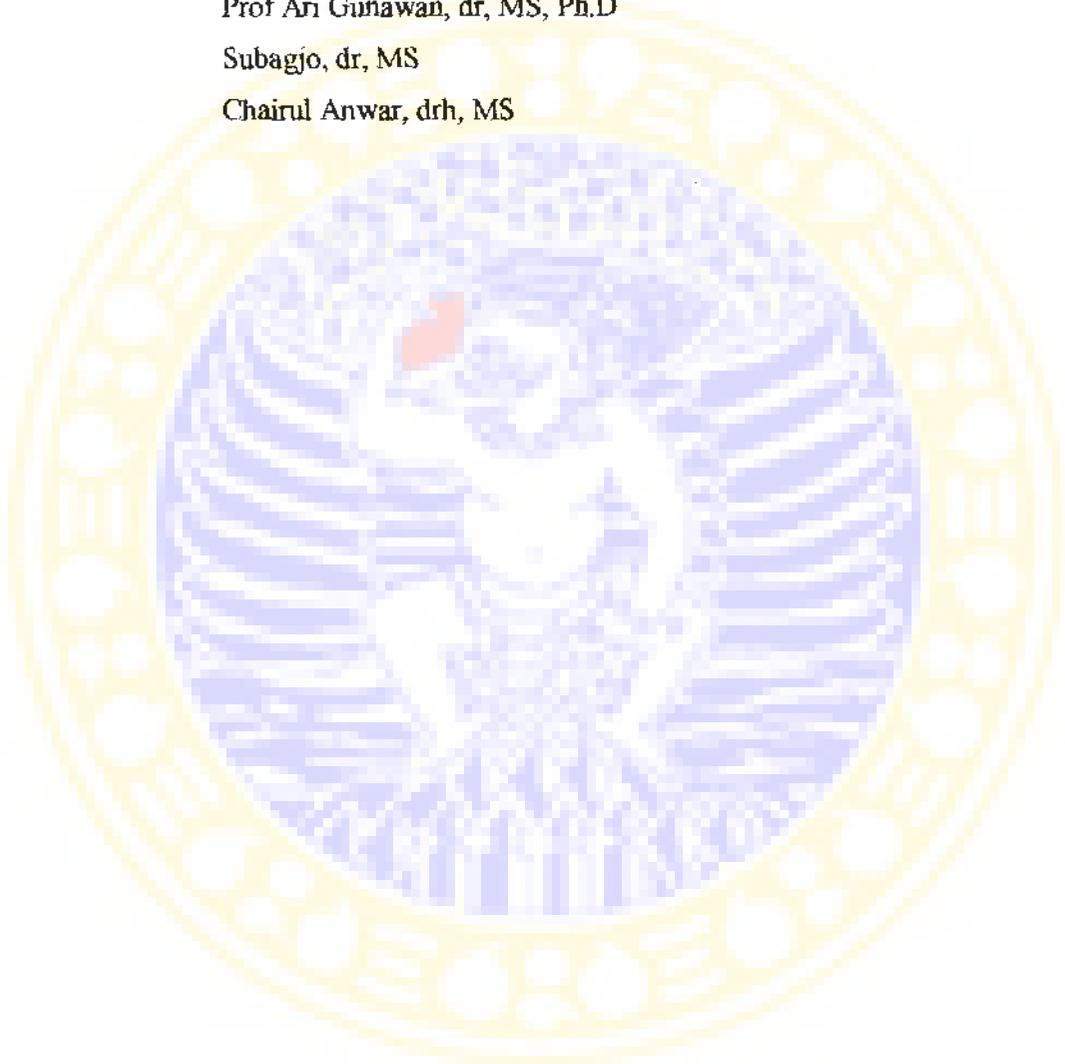
**Ketua** : Moch. Wirono Aman Santoso, dr, MS

**Anggota** : Abd. Kamid Iskandar, dr, MS

Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D

Subagjo, dr, MS

Chairul Anwar, drh, MS



## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa dan Maha Pengasih oleh karena atas perkenaan-Nya saja sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Abd Kamid Iskandar, dr, MS, sebagai pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah *memberikan* dorongan, bimbingan dan saran.

Terimakasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya pula penulis ucapkan kepada Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D, pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah *memberikan* dorongan, bimbingan dan saran.

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada pemerintah Republik Indonesia cq Universitas Cendrawasih yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban biaya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan penulis mengucapkan terimakasih kepada Rektor Universitas Airlangga Prof Puruhito, dr, SpBT atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr Muh. Amin, dr, SpP atas kesempatan yang diberikan pada penulis untuk mengikuti Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Prof Retno Handajani, dr, MS, Ph.D yang selama ini telah membantu dalam kelancaran proses pelaksanaan ujian tesis.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof Dr HMS Wiyadi, dr, SpTHT atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.

Ketua Bagian Anatomi-Histologi, Abd. Kamid, dr, MS yang telah memberi dorongan, semangat dan mengizinkan penulis mengikuti Program Pendidikan Magister.

Moch. Wirono Aman Santoso, dr, MS, Subagio, dr, MS dan Chairul Anwar, drh, MS yang telah memberikan bimbingan dan saran dengan tulus serta bersedia sebagai penguji.

Rektor Universitas Cendrawasih Jayapura B. Kambuaya, Drs, MBA yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.

Ketua Program Pendidikan Dokter Universitas Cendrawasih Paulina Watofa, dr, SpR yang telah banyak memberikan dorongan dan memperhatikan selama mengikuti pendidikan Program Magister.

Terimakasih pula penulis ucapkan kepada para staf pengajar dan karyawan pada Bagian Anatomi - Histologi atas kerjasama dan dukungannya selama mengikuti pendidikan Program Magister.

Terimakasih saya pada teman-teman seperjuanganku dalam mengikuti Program Magister Unair pada bagian Anatomi-Histologi angkatan tahun 2002: Riami, dr, Antonius Oktavian, dr, Elieser, dr, Irianto Ramandey, dr, atas

dukungan dan kerjasamanya selama pendidikan. Semoga kerjasama ini akan tetap terjalin diwaktu-waktu mendatang.

Demikian pula kepada teman-teman saya; Agnes Supraptiwi Rahayu, dr, MKes dan Aries Susanto Dewobroto, SE yang telah banyak membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Kepada kedua orangtua yang telah banyak mendukung, terimakasih atas perhatian dan dukungan doa dari Bapak Yusak Mangentang dan Ibunda Halwiah, juga kepada saudara saya Adri Mangentang, S.Sos, Alfrida Mangentang, Dra dan keluarga, Adelina Mangentang dan keluarga dan Irbar Mangentang, Ir dan keluarga. Dan segenap keluarga terima kasih untuk dukungan serta doa kalian, Tuhan memberkati.

Kepada semua pihak yang telah terlibat dalam penulisan tesis ini yang tidak penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih untuk perhatian, dukungan dan kerjasamanya.

Akhirnya penulis mohon maaf atas segala kekurangan penulis selama mengikuti Program Magister dan dalam penulisan tesis ini. Kiranya Tuhan Yang Maha Pengasih memberkati kita sekalian.

## RINGKASAN

### **Pengaruh Pemberian Vitamin A Berlebihan Terhadap Gambaran Histologik Hepar Mencit (*Mus musculus*)**

**Anike**

Vitamin A sebagai sumber gizi yang banyak ditemukan dalam bahan makanan nabati maupun hewani, merupakan vitamin larut lemak yang pertama kali ditemukan, memiliki peranan penting dalam tubuh misalnya pada penglihatan, diferensiasi sel-sel epitel, pertumbuhan dan reproduksi.

Konsumsi vitamin A yang dianjurkan harus berdasarkan Angka Kebutuhan Gizi (AKG). Vitamin A bilamana dikonsumsi secara berlebihan atau digunakan secara rutin jauh melebihi AKG dapat bersifat toksik baik secara akut maupun kronik.

Hepar sebagai organ utama tempat penyimpanan vitamin A dapat berubah baik secara makroskopik maupun mikroskopik bilamana konsumsi vitamin A berlebihan, hal ini disebabkan hiperplasia dan proliferasi sel-sel stelate hepar oleh karena sintesis jaringan ikat kolagen meningkat yang berasal sel-sel stelate dan akibatnya terjadi fibrosis. Hiperplasia sel-sel stelate terjadi oleh aktivitas sel-sel stelate oleh stimulasi dari TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor- $\beta$ 1*), PDGF (*Platelet derived growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*), dan peroksidase lipid, sementara proliferasi sel-sel stelate terjadi oleh stimulasi PDGF, trombin, ET-1 (*Endothelin-1*), dan *Insulin like growth factor* (IGF).

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian vitamin A berlebihan terhadap berat hepar dan gambaran histologik hepar.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *posttest only control group design* dengan hewan coba mencit (*Mus musculus* strain *BALB/C*) jantan, dengan umur sekitar 3-4 minggu, sebanyak 40 ekor. Perlakuan yang diberikan adalah vitamin A secara berlebihan per oral dalam bentuk emulsi dengan dosis, (1) 1/8LD<sub>50</sub> (160,62iu)/grBB/hr, (2) 1/6LD<sub>50</sub> (214,16iu)/grBB/hr, (3) 1/4LD<sub>50</sub> (321,25iu)/grBB/hr. Perlakuan diberikan setiap hari selama 9 hari. Satu hari

setelah pemberian perlakuan terakhir, hewan coba dikorbankan dan diambil hepar sebagai sampel penelitian. Selanjutnya dilakukan penimbangan berat hepar dan pembuatan preparat histologik, kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

Data berat hepar di analisis dengan Uji Anova dengan taraf kepercayaan 95%, sementara data gambaran histologik hepar dengan Uji Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vitamin A berlebihan secara deskriptif berat hepar meningkat tetapi secara statistik dengan uji Anova peningkatannya tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) bahkan berat hepar cenderung menurun pada kelompok perlakuan  $1/4LD_{50}$ , tetapi ada perubahan pada gambaran histologik hepar (jaringan ikat kolagen) dilihat dari tingkat fibrosis (0-4), yang secara statistik bermakna dengan ( $p < 0,05$ ).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin A berlebihan tidak meningkatkan berat hepar secara signifikan, meskipun ada perubahan gambaran histologik hepar yaitu bertambahnya jaringan ikat kolagen dan secara signifikan bermakna.

## SUMMARY

### The Effect of Excessive Vitamin A Feeding on Histological Profile of Mice (*Mus musculus*) Liver

Anike

As a nutritional source, vitamin A can be found in plant or animal foods. It is the firstly-found fat-soluble vitamin, whose role is important in the body, for example, for vision, epithelial differentiation cells, growth and reproduction. Vitamin A consumption should be based on Nutritional Requirement Rate (NRR). If it is consumed excessively or routinely used far above the requirement rate, it may become toxic, both acutely and chronically.

The liver, as the primary organ in which vitamin A is reserved, may be transformed, either macroscopically or microscopically, if there is an excessive consumption of vitamin A. This may be due to hyperplasia and hepatic stellate cells proliferation, because the increase synthesis of collagenous tissue by stellate cells, that results in fibrosis. Stellate cells hyperplasia occurs due to the activity of stellate cells resulting from the stimulation of TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*), PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), and lipid peroxidation, while stellate cells proliferation occurs due to the stimulation of PDGF, thrombin, ET-1 (*Endothelin-1*), and *insulin-like growth factor* (IGF).

The objective of this study was to prove the effect of excessive vitamin A feeding on hepatic weight and histological profile of hepatic. This study used posttest only control group design involving 40 male mice (*BALB/C* strain *Mus musculus*) aged 3-4 weeks. Treatments were given as excessive vitamin A per oral in emulsion with the doses of (1) 1/8LD<sub>50</sub> (160.62iu)/grBW/day, (2) 1/6LD<sub>50</sub> (214.16iu)/grBW/day, (3) 1/4LD<sub>50</sub> (321.25iu)/grBW/day). Treatment was given daily in 9 days. One day after the end of treatment, animals were sacrificed for hepatic removal to be used as samples. Hepatic weight was identified and histological preparations were made, followed with observation using light microscope. Data on hepatic weight were analyzed using Anova with significance level of 95%, while data on histological profile of hepatic was tested with Kruskal Wallis test, followed with Mann Whitney test.

Results showed that excessive vitamin A feeding resulted in descriptive increase of hepatic weight, although the increase was not statistically significant ( $p > 0.05$ ), and even there was a reduced hepatic weight in treatment group receiving 1/4LD<sub>50</sub>. However, there was a statistically significant change ( $p < 0.05$ ) in histological profile of hepatic (structure collagenous tissue) as observed from its fibrotic level (0-4). It can be concluded that excessive vitamin A feeding does not significantly increase hepatic weight, although the histological profile of hepatic may change significantly is increased structure collagenous tissue.

## ABSTRACT

### The Effect of Excessive Vitamin A Feeding on Histological Profile of Mice (*Mus musculus*) Liver

Anike

The objective of this study was to prove the effect of excessive vitamin A feeding on hepatic weight and histological profile of hepatic. This study used posttest only control group design involving 40 male mice (*BALB/C* strain *Mus musculus*) aged 3-4 weeks. Treatments were given as excessive vitamin A per oral in emulsion with the doses of (1) 1/8LD<sub>50</sub> (160.62iu)/grBW/day, (2) 1/6LD<sub>50</sub> (214.16iu)/grBW/day, (3) 1/4LD<sub>50</sub> (321.25iu)/grBW/day). Treatment was given daily in 9 days. One day after the end of treatment, animals were sacrificed for hepatic removal to be used as samples. Data on hepatic weight were analyzed using Anova with significance level of 95%, while data on histological profile of hepatic was tested with Kruskal Wallis test, followed with Mann Whitney test.

The first study showed that excessive vitamin A feeding resulted in a descriptive increase of hepatic weight in treatment groups 1/8LD<sub>50</sub> and 1/6LD<sub>50</sub>, although the increase was not statistically significant ( $p > 0.05$ ), and hepatic weight was even found to decrease in treatment group of 1/4LD<sub>50</sub>. The second study revealed a statistically significant change ( $p < 0.05$ ) in histological profile of hepatic based on its fibrotic level. Hyperplasia and proliferation of hepatic stellate cells could increase hepatic weight and collagen synthesis, resulting in fibrosis. Stellate cells hyperplasia occurs due to the activity of stellate cells resulting from the stimulation of TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*), PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), and lipid peroxidation, while stellate cells proliferation occurs due to the stimulation of PDGF, thrombin, ET-1 (*Endothelin-1*), and *insulin-like growth factor*.

It can be concluded that excessive vitamin A feeding does not significantly increase hepatic weight, although the histological profile of hepatic may change significantly is increased structure collagenous tissue.

**Keywords:** *excessive vitamin A, stellate cells, hepatic weight, collagenous*

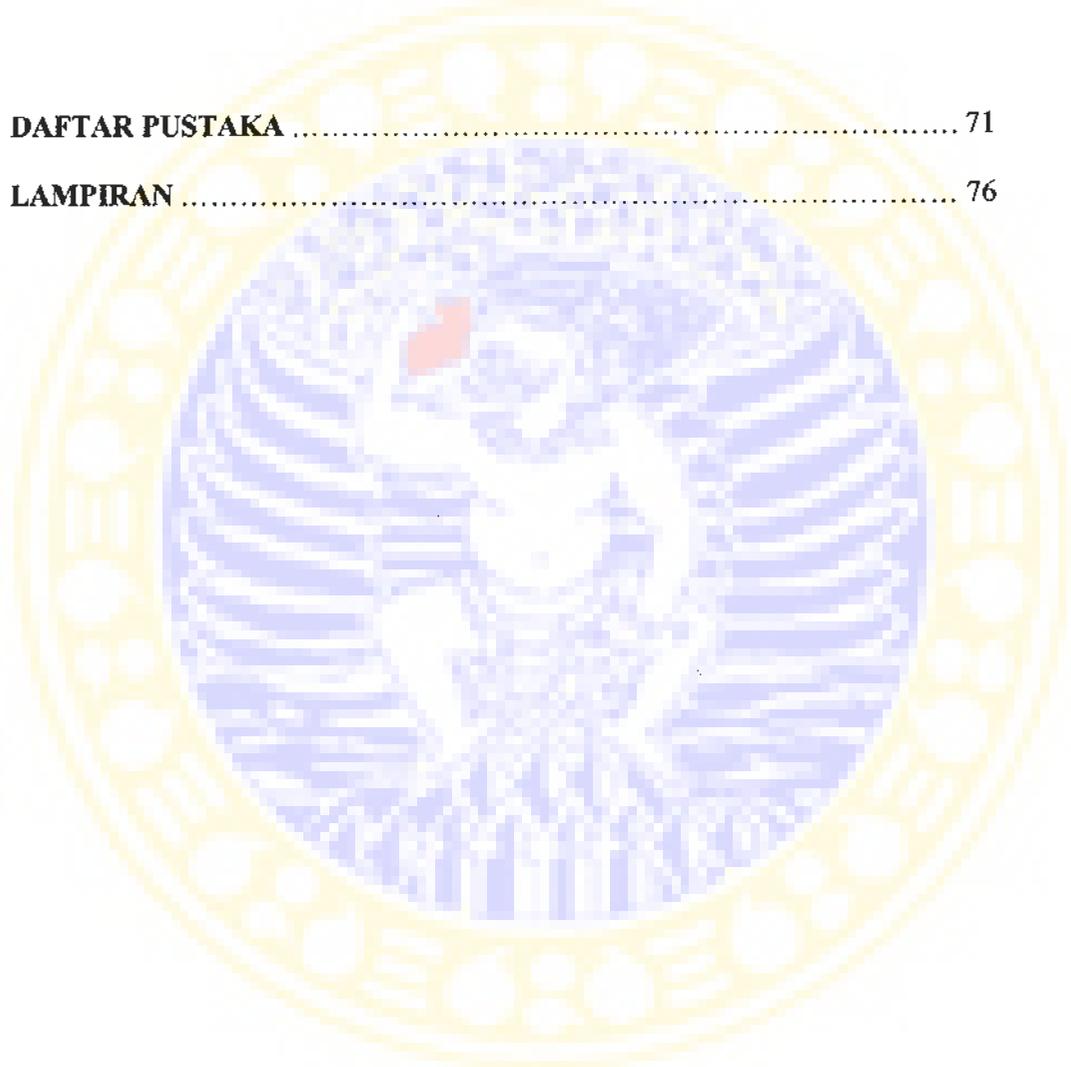
**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	ix
Summary .....	xi
Abstract .....	xii
Daftar Isi .....	xiii
Daftar Tabel .....	xvii
Daftar Gambar .....	xviii
Daftar Lampiran .....	xix
 <b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4

1.4.1 Manfaat akademik .....	4
1.4.2 Manfaat terapan .....	4
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Vitamin A.....	5
2.1.1 Fungsi Vitamin A .....	7
2.1.2 Sumber Vitamin A dan kebutuhan .....	10
2.1.3 Absorpsi, transportasi dan metabolisme vitamin A .....	13
2.2 Hepar .....	17
2.2.1 Anatomi fisiologi hepar .....	17
2.2.2 Histopatologi Hepar .....	20
2.2.3 Fibrogenesis .....	29
2.3 Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	36
2.4 Hipervitaminosis A .....	39
 <b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	43
3.2 Hipotesis Penelitian .....	46
 <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Rancangan penelitian .....	47
4.2 Sampel dan Besar Sampel .....	48
4.3 Variabel Penelitian .....	49
4.3.1 Klasifikasi variabel .....	49

4.3.2 Definisi operasional variabel .....	49
4.4 Bahan Penelitian .....	51
4.5 Alat Penelitian .....	51
4.6 Lokasi Penelitian .....	52
4.7 Persyaratan Etik .....	52
4.8 Prosedur Pengambilan Data .....	52
4.8.1 Penentuan dosis .....	52
4.8.2 Pemilihan hewan coba .....	54
4.8.3 Metode penelitian.....	54
4.9 Analisis Data .....	55
4.10 Kerangka operasional .....	56
 <b>BAB 5 ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN</b>	
5.1 Data Penelitian Berat Hepar .....	57
5.1.1 Analisis deskriptif .....	59
5.1.2 Analisis uji homogenitas .....	59
5.1.3 Analisis uji Anova .....	59
5.2 Data Penelitian Gambaran Histologik Hepar .....	60
5.2.1 Uji Kruskal-Wallis .....	60
5.2.2 Uji Mann Whitney .....	61
 <b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	
6.1 Pemberian Vitamin A Berlebihan Terhadap Berat Hepar .....	64

6.2 Pemberian Vitamin A Berlebihan Terhadap Gambaran Histologik Hepar .....	66
<b>BAB 7 PEMBAHASAN</b>	
7.1 Kesimpulan .....	69
7.2 Saran .....	69
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	71
<b>LAMPIRAN</b> .....	76



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 : Angka kecukupan gizi yang dianjurkan untuk vitamin A .....	13
Tabel 5.1 : Berat hepar secara deskriptif .....	57
Tabel 5.2 : Homogenitas varian berat hepar .....	59
Tabel 5.3 : Hasil berat hepar dengan uji Anova .....	60
Tabel 5.4 : Mean Rank gambaran histologik hepar tiap kelompok .....	60
Tabel 5.5 : Gambaran histologik hepar antar kelompok.....	61



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Struktur kimia dari Retinol, Retinal, Asam retinoat, $\beta$ - karoten .....	7
Gambar 2.2 : Diagram Parenkim hepar memperlihatkan sebagian lobulus dan sistem peredaran darah .....	21
Gambar 2.3 : Skema struktur hepar .....	23
Gambar 2.4 : Hepar normal .....	28
Gambar 2.5 : Fibrosis hepar .....	28
Gambar 2.6 : Mekanisma pembentukan jaringan penyambung normal dan abnormal TIMP, <i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases</i> ..	34
Gambar 2.7 : Aktivitas sel-sel stelate dan fibrogenesis.....	35
Gambar 3.1 : Skema kerangka konseptual .....	45
Gambar 5.1 : Histogram rata-rata berat hepar .....	58

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Pengolahan dan pengccatan jaringan .....	76
Lampiran 2 : Data berat hepar hewan coba .....	79
Lampiran 3 : Data gambaran histologik struktur hepar hewan coba .....	80
Lampiran 4 : Hasil pengolahan uji Anova dengan menggunakan program SPSS 10.0.....	81
Lampiran 5 : Hasil pengolahan uji Kruskal-Wallis dengan menggunakan program SPSS 10.0 .....	82
Lampiran 6 : Hasil Pengolahan uji Mann Whitney dengan menggunakan program SPSS 10.0 .....	83
Lampiran 7 : Dokumentasi penelitian .....	87

# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Vitamin A memiliki peranan penting dalam tubuh. Vitamin A berperan pada fungsi retina, diferensiasi jaringan epitel dan pertumbuhan tulang, reproduksi dan perkembangan embrio. Vitamin A dapat meningkatkan fungsi imunitas, mengurangi akibat dari beberapa penyakit infeksi dan melawan perkembangan khususnya keganasan. Hal ini penting bagi farmakolog dalam menggunakan retinoid sebagai profilaksis kanker dan untuk penanganan jenis-jenis pre-kanker. Oleh karena efek vitamin A pada jaringan epitel, sehingga retinoid dan analognya dapat digunakan untuk penanganan beberapa penyakit kulit, termasuk penyakit kulit akibat terpapar sinar matahari yang lama (Marcus, 1996).

Vitamin A dalam peranannya dapat bersifat toksik bilamana konsumsi vitamin A digunakan secara berlebihan, hal ini dapat disebabkan :

- a) Penggunaan vitamin dalam jumlah besar, baik untuk tujuan pencegahan maupun pengobatan penyakit yang tidak jelas berhubungan dengan defisiensi vitamin
- b) Penggunaan vitamin secara rutin dengan jumlah yang jauh melebihi AKG (Angka Kebutuhan Gizi) karena adanya anggapan bahwa vitamin dapat memberikan tambahan energi dan membuat seseorang lebih sehat dan
- c) Banyaknya sediaan yang mengandung satu macam vitamin atau beberapa macam vitamin (multivitamin) dalam jumlah besar yang dinyatakan

sebagai suplemen makanan dan dapat dibeli tanpa resep dokter (Dewoto, 2003).

Beberapa penelitian sehubungan dengan penggunaan vitamin A berlebihan, seperti: Morley (1994) melaporkan, memberi efek antitiroid dan ukuran tiroid berkurang pada hewan coba (tikus) dan dapat mengurangi beberapa gejala pada penderita hipertiroid. Soeradji (1982) melaporkan, terjadi teratogenik pada janin mencit (palatoschisis). Kiptiyah (2002) melaporkan, terjadi penurunan jumlah folikel saat ovulasi pada mencit betina dan teratogenik pada mencit betina hamil. Yohana (1991) melaporkan, terjadi nekrosis tubulus proksimal ginjal dan pelebaran spatium Bowman glomerulus ginjal mencit. Beberapa penelitian lain, misalnya pada kulit terjadi eritem, alopecia, iritasi kulit, keratinisasi berkurang; pada sistem muskuloskeletal terjadi deformitas, perdarahan, peningkatan aktifitas osteoklast, diameter tulang berkurang. Pada organ, seperti hepar terjadi perubahan secara makroskopik (berat hepar bertambah) dan mikroskopik, mata, testis dan sistim saraf pusat dapat rusak, anemia oleh karena eritropenia (defisiensi jumlah eritrosit), penurunan hemoglobin dan konsentrasi hematokrit (Robert, 1994).

Pemakaian vitamin A secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya akumulasi di dalam tubuh. Tubuh dapat menyimpan vitamin A, 90 % dari jumlah total vitamin A yang berlebih. Vitamin A yang diserap akan disimpan dalam bentuk palmitat atau ester asam lemak dari retinol di dalam hepar (Linder, 1992). Vitamin A ini ditemukan dalam *Fat cells (ito cells)* (Robert, 1994). Nama sel ini identik dengan *lipocytes* (sel-sel perisinusoidal) atau sel-sel stelate yang memiliki morfologi mirip fibroblast (Wisse, 1999). Bilamana terjadi

hipervitaminosis A sel ini (perisinusoidal) mengalami fibrosis yang mungkin disebabkan oleh peningkatan sintesis kolagen oleh *ito cells*. *Ito cells* mengalami hiperplasia. Perisinusidal fibrosis oleh hipervitaminosis A seringkali disertai dilatasi sinusoidal, bahkan dapat terjadi portal dan periportal fibrosis, yang dapat berkembang menjadi sirosis jika pemberian vitamin A berlanjut (Rizetto, 1999).

Sehubungan dengan kerusakan hepar akibat vitamin A berlebihan, pernah dilakukan percobaan pada hewan coba dan ditemukan berat hepar bertambah dan fibrosis hepatis (Robert, 1994) serta peningkatan proliferasi jaringan ikat kolagen hepar (Kusman, 1991).

## 1.2 Rumusan Masalah

Atas dasar latar belakang yang telah dikemukakan di atas, masalah yang diajukan adalah sebagai berikut :

- 1) Apakah pemberian vitamin A dosis berlebihan pada anak mencit jantan berpengaruh terhadap berat hepar?
- 2) Apakah pemberian vitamin A dosis berlebihan pada anak mencit jantan berpengaruh terhadap gambaran histologik hepar?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada hepar anak mencit jantan.

### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan terhadap berat hepar anak mencit jantan.
2. Membuktikan pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan terhadap gambaran histologik hepar anak mencit jantan.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat akademik

Menambah pengetahuan tentang pengaruh yang ditimbulkan akibat pemberian vitamin A dosis berlebihan terhadap hepar.

### 1.4.2. Manfaat terapan

Sebagai bahan masukan bagi perusahaan farmasi untuk mencantumkan komposisi dari setiap produk suplemen, bagi instansi terkait dalam hal ini Depertemen Kesehatan agar dalam pelaksanaan kegiatan "Penyuluhan Gizi" juga menginformasikan sisi buruk vitamin A bila dikonsumsi secara tidak benar dan bagi masyarakat agar tidak mengonsumsi suplemen vitamin A secara berlebihan tanpa ada rekomendasi yang jelas dari dokter .

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Vitamin A

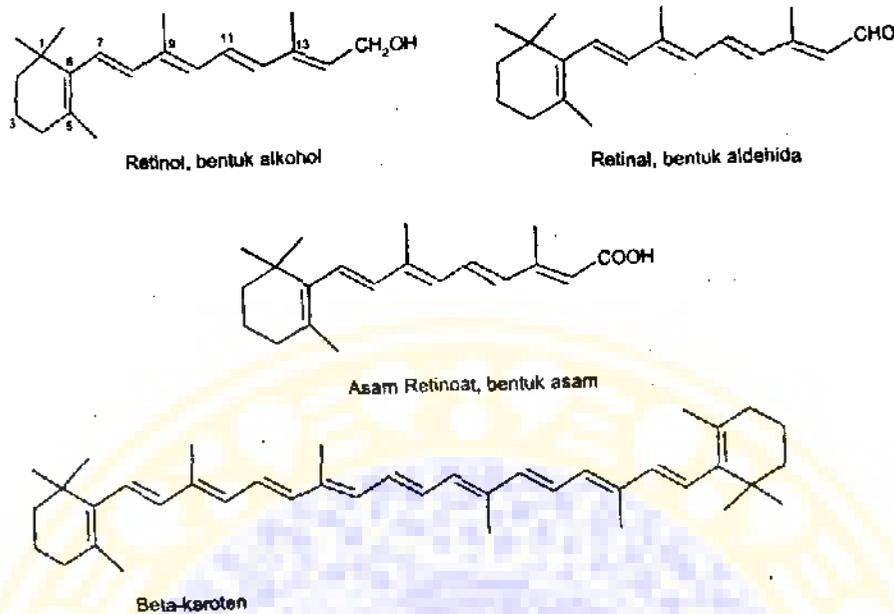
*Vitamin A* merupakan salah satu dari golongan zat gizi mikro. Golongan zat gizi mikro meliputi vitamin dan mineral, sementara golongan zat gizi makro meliputi protein, lemak dan karbohidrat. Berarti sebagai sumber gizi, vitamin A juga sebagai komponen pembangun tubuh manusia untuk pertumbuhan, mempertahankan dan memperbaiki jaringan tubuh, mengatur proses dalam tubuh dan menyediakan energi bagi fungsi tubuh (Harris, 1989).

Vitamin A adalah vitamin yang pertama kali ditemukan yang larut dalam lemak, merupakan suatu molekul apolar hidrofobik yaitu berupa senyawa polyisoprenoid yang mengandung cincin sikloheksional. Secara luas, vitamin A adalah nama generik yang menyatakan semua retinoid dan prekursor/provitamin A /karotenoid yang mempunyai aktivitas biologik sebagai retinol (Almatzier, 2003; Harper, 1993).

Vitamin A peka terhadap cahaya dan oksigen yang terbentuk pada dinding usus akibat pemecahan oksidatif karoten dengan bantuan molekul oksigen. Mula-mula akan terbentuk aldehidnya, dan senyawa alkohol ini akan disimpan terutama di dalam hepar dalam bentuk ester asam lemak. Jika dibutuhkan, senyawa ini akan dibebaskan dan masuk ke dalam plasma dan diedarkan dalam bentuk terikat dengan  $\alpha_1$ -globulin atau albumin, dengan bihidrolisis. Produk ekskresi antara lain retinoglukoronida dan asam yang bebas atau terkonjugasi (asam vitamin A, asam retinoat) (Mustchler, 1991).

Vitamin A juga merupakan suatu kristal alkohol berwarna kuning dan dalam makanan biasanya terdapat dalam bentuk *retinil ester*, yaitu terikat pada asam lemak rantai panjang. Di dalam tubuh, vitamin A berfungsi dalam beberapa bentuk ikatan kimia aktif yaitu: retinol, retinal dan asam retinoat. Retinol (bentuk alkohol, yaitu alkohol primer 20 karbon yang terdapat pada berbagai bentuk isomer, bentuk vitamin A<sub>1</sub> yang ditemukan pada mamalia, sebagian besar berasal dari makanan terdapat dalam bentuk ester). Retinal (aldehid retinol, berasal dari karotenoid yang diserap dari makanan atau ester-ester retinol dan memiliki aktivitas vitamin A). Retinoid /asam retinoat (bentuk asam, derivat oksidasi dari retinol yang dibentuk melalui karboksilasi terhadap gugus aldehid retinal, zat ini diyakini merupakan bentuk vitamin A yang berperan dalam perkembangan dan pertumbuhan tulang serta pemeliharaan struktur normal epitel). Retinol dan retinal dapat saling berubah oleh perubahan NAD (*nicotinamide adenine dinucleotida*) atau oleh NADP (*nicotinamide adenine dinucleotida phosphate*) dan membutuhkan dehydrogenase atau reduktase. Tetapi bentuk dari retinoid yaitu asam retinoat tidak dapat berubah kembali ke bentuk retinal atau retinol (Almatzier, 2003; Dorland, 2002).

Struktur kimia ke 3 bentuk Vitamin A seperti gambar di bawah ini:



Gambar 2.1 Struktur kimia dari Retinol, Retinal, Asam Retinoat, Beta-karoten (Almatzier, 2003)

Vitamin A dalam bahan makanan pada umumnya terdapat dalam bentuk *retinil ester*, akan tetapi sebelum direabsorpsi *retinil ester* tersebut dihidrolisis dahulu menjadi bentuk alkohol. Retinol ini akan memasuki dinding usus untuk kemudian diubah lagi menjadi *retinil ester* sebelum memasuki pembuluh limfe dan disalurkan ke hepar untuk disimpan. Sebagian besar vitamin A diserap oleh mukosa usus. Diperkirakan bahwa 90-95 % persediaan vitamin A dalam tubuh terdapat dalam bentuk *retinil ester* dalam sel-sel Kupffer hepar. Ginjal, anak ginjal, testis dan payudara juga mengandung vitamin A (Pudjadi, 2000).

#### 2.1.1 Fungsi vitamin A

Masing-masing retinoid mempunyai fungsi biologik yang unik. Retinol dalam kedudukan oksidasi rendah mungkin berperan sebagai hormon;

retinal sebagai prekursor pigmen penglihatan; asam retinoat dan metabolitnya mendukung kecepatan pertumbuhan dan diferensiasi sel tetapi tidak dapat mengambil fungsi dari retinal dalam peran penglihatan atau fungsi retinol dalam fungsi normal sistem reproduksi laki-laki atau wanita (Harper, 1993)

Ada 4 fungsi utama dari vitamin ini yaitu penglihatan (vision), diferensiasi sel-sel epitel, pertumbuhan dan reproduksi (Linder, 1992).

Peran utama vitamin A dalam penglihatan berkisar di sekitar fakta bahwa rod dari mata mengandung piringan-piringan membran (*membrane discs*) yang terdiri dari lipid dikelilingi terutama oleh 30.000 dalton protein; *opsin*, yang bersatu dengan *11-cis retinalaldehyde* membentuk rodopsin (*visual purple*), penerima langsung energi cahaya selama melihat dalam cahaya redup (*dim light*)/tidak berwarna (*grey-black-vision*); Rodopsin akan berisomerasi menjadi *all-trans* dan dibebaskan; setelah *retinal all-trans* dipecah membutuhkan waktu beberapa detik untuk proses rekombinasi opsin dengan *11-cis aldehyde* secara spontan. *Cone* (ujung sensor yang pendek dari retina) mata yang digunakan dalam penglihatan normal, juga mengandung beberapa *retinaldehyde*, bersama dengan *cone*, *opsin* membentuk *porfiropsin* yang menyerap cahaya berenergi rendah. Olehkarena itu defisiensi vitamin A lebih banyak berpengaruh pada penglihatan malam dan penurunan kemampuan ini merupakan tanda defisiensi vitamin A (Harper, 1993; Linder, 1992).

Peranan vitamin A (dalam hal ini asam retinoat) untuk perkembangan dan pemeliharaan fungsi sel-sel epitel, dewasa ini banyak dijadikan sebagai obyek penelitian, misalnya defisiensi vitamin ini menyebabkan sekresi sel mukosa dan terjadi pergantian sel-sel kolumnar epitel dengan lapisan tebal bertanduk, lapisan

epitel beberapa bagian tubuh mengalami keratinisasi, termasuk epitel kornea, paru-paru, kulit dan mukosa usus, dan sel goblet menurun secara drastis dalam kriptus usus dan pada permukaan vilus usus. Tingkat proliferasi sel-sel kolumnar dan perpindahannya di sepanjang vilus usus tidak berubah, tetapi sintesis glikoprotein tertentu dalam mukosa usus nampak tertekan. Pada beberapa kultur sel, terlihat pengaruh terhadap morfologi dan adhesi sel-sel tingkat pertumbuhan, terbentuk modulasi beberapa glikosaminoglikan; ini semua karena efek dari asam retinoat yaitu suatu bentuk dari vitamin A (Linder, 1992).

Fungsi vitamin A (asam retinoat dan mungkin retinol) dalam pertumbuhan terutama dalam memodulasi pertumbuhan tulang melalui proses remodeling (reorganisasi atau renovasi struktur lama), dalam hal ini remodeling tulang (terjadi absorpsi jaringan tulang dan deposisi simultan tulang baru; pada tulang normal kedua proses ini berada dalam keseimbangan dinamis). Vitamin A penting untuk aktivitas sel-sel dalam tulang rawan epifise harus menjadi suatu siklus pertumbuhan normal, maturasi dan degenerasi untuk memudahkan pertumbuhan tulang normal yang dikontrol oleh epifisis. Dalam keadaan defisiensi vitamin A, terjadi resorpsi tulang (suatu bentuk hilangnya tulang yang disebabkan oleh aktivitas osteoklast) (Dorland, 2002; Linder, 1992).

Vitamin A (alkohol atau aldehida) memegang peranan dalam fertilitas. Dalam keadaan defisiensi vitamin A, spermatogenesis berhenti pada level spermatid (ditemukan pada ayam, tikus, dan sapi); keadaan sebaliknya terjadi bila diberi vitamin A. Defisiensi juga mengganggu siklus estrus, perkembangan plasenta dan aspek lain reproduksi betina (pada tikus hamil dapat terjadi resorpsi fetus). Vitamin A memperlihatkan peranannya dalam pembentukan progesteron

adrenal. Progesteron adalah prekursor hormon steroid darimana steroid lainnya di sintesis, termasuk androgen dan estrogen. Beberapa bukti akhir-akhir ini juga menunjukkan bahwa ada pengaruh positif pemberian  $\beta$ -karoten terhadap fertilitas sapi dan korpus luteum dalam menyimpan dan memecah prekursor vitamin A (Linder, 1992).

Beberapa penelitian sehubungan dengan peran dari vitamin A seperti dikemukakan di atas: Shaken (1996) dalam suatu studi *case control* di Nepal, melaporkan anak-anak yang mengkonsumsi makanan rumah tangga yang kandungannya kurang vitamin A secara kronik dapat menyebabkan xerophthalmia. Duggan (1996) mendapatkan, keratinisasi metaplasia pada trakhea dan bronkus serta fibrosis pankreas pada fibrosis kistik eksaserbasi akut karena defisiensi vitamin A. Fawzi (1994) melaporkan, anak-anak dengan diet tinggi vitamin A sedikit berisiko terhadap mortalitas dibandingkan anak-anak dengan diet rendah vitamin A. Andrijono (1997) juga melaporkan, bahwa salah satu faktor resiko terjadinya molahidatidosa diduga oleh karena kadar vitamin A yang rendah.

#### 2.1.2 Sumber vitamin A dan kebutuhan

Vitamin A, dalam semua bahan makanan nabati dan sayuran berada dalam bentuk provitamin A terutama sebagai  $\beta$ -karoten yang membentuk 2 molekul vitamin A, tetapi ia tidak digunakan secara kuantitatif (maksimum sampai 50 %), ditemukan pada semua tanaman hijau, sebagian besar tanaman yang kuning jingga, banyak terdapat dalam jenis kol, bayam, wortel, daun singkong, daun kacang, kangkung, kacang panjang, buncis, tomat, jagung kuning, mangga, nangka masak, jeruk dan minyak kelapa sawit (Almatzier, 2003; Mutschler, 1991).

Pangan nabati mengandung karotenoid yang merupakan prekursor (provitamin) vitamin A. Di antara ratusan karotenoid yang terdapat di alam, hanya bentuk  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  serta kriptosatin yang berperan sebagai provitamin A. Karotenoid adalah bentuk provitamin A yang paling aktif, terdapat dalam kloroplas tanaman, dan berperan sebagai katalisator dalam fotosintesis yang dilakukan klorofil oleh karena itu karotenoid paling banyak terdapat dalam sayuran berwarna hijau (Gardner, 1982).

Karotenoid, mungkin adalah pigmen yang paling umum dalam dunia tumbuh-tumbuhan dan juga bertanggungjawab memberi warna kemerah-merahan dari daging salmon, kulit lobster dan bulu flamingo (Linder, 1992).

Sedangkan dari bahan makanan hewani (burung dan ikan), vitamin A aktif dalam bentuk *retinal ester* (Linder, 1992). Vitamin A hewani juga terdapat pada mentega, telur, hati dan daging dan terdapat dalam beberapa bentuk misalnya retinol ( $A_1$ ) dan dehidroretinol (vitamin  $A_2$ , bentuk vitamin A yang ditemukan dalam retina dan ikan air tawar, pada invertebrata tertentu dan amphibi, mempunyai suatu ikatan konjugasi ganda lebih dan mempunyai aktivitas biologis  $1/3$  retinol), asam retinoat (tretinoin, isotretinoin = 13-cis asam retinoat) merupakan hasil oksidasi alkohol dari retinol, juga terdapat dalam susu (di dalam lemaknya) (Almatzier, 2003; Dewoto, 2003)).

Kebutuhan harian orang dewasa sekitar 5000 IU = 1,5 mg (1 IU = 0,3  $\mu$ g), anak-anak sampai usia 10 tahun sehari membutuhkan 1500-3500 IU. Pada defisiensi vitamin A untuk terapi substitusi, dosis harian 25.000-50.000 IU. Dosis cukup tinggi dapat digunakan untuk ikhtiosis vulgaris dan berbagai hiperkeratosis dan diskeratosis (Mustchler, 1991).

Berdasarkan jenis kelamin, pria membutuhkan vitamin A 1000 µg ekuivalen retinol, sedangkan wanita 800 µg dan kebutuhannya meningkat selama kehamilan, terutama selama trimester ketiga dalam kehamilan sebanyak 1,3 mg retinol dialihkan dari ibu ke fetus (Almatzier, 2003; Mutschler, 1992).

Pemberian vitamin A, khususnya pada hewan coba mencit secara oral adalah 2570mg/KgBB (ini merupakan *Lethal Dose*); sementara dosis pada manusia secara oral, ratio amannya dengan LD50=Doses/50KgBB adalah 10-20mg (Thompson, 1993).

Untuk mencegah kekurangan vitamin A pada anak usia di bawah 5 tahun (balita) dianjurkan pemberian vitamin A takaran tinggi 200.000 IU selama 4-6 bulan sekali, oleh karena prevalensi menunjukkan defisiensi vitamin A adalah salah satu dari 4 masalah gizi utama. Sedangkan untuk anak-anak yang lebih tua dan orang dewasa, bila makanan sehari-hari seimbang, tidak perlu menambahkan suplemen vitamin A karena gejala klinis kekurangan vitamin A akan terlihat bila dalam dietnya selama 2-3 tahun tidak mengandung vitamin A (Almatzier, 2003; Pudjiadi, 2000).

AKG dari vitamin A yang diajarkan untuk berbagai golongan umur dan jenis kelamin untuk orang Indonesia dapat dilihat seperti pada tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2.1 AKG yang dianjurkan untuk vitamin A, adalah (Almaitzer, 2003):

Golongan Umur	AKG (RE)	Golongan Umur	AKG (RE)
0-6 bln	350	Wanita	
7-12 bln	350	10-12 th	500
1-3 thn	350	13-15 th	500
4-6 thn	360	16-19 th	500
7-9 thn	400	20-45 th	500
13-15 thn		46-59 th	500
		≥ 60	500
Pria		Hamil	+ 200
10-12 th	500	Menyusui	+ 350
13-15 th	600	0-6 bln	+ 300
16-19 th	700	7-12 bln	
20-45 th	700		
46-59 th	700		
≥ 60 th	600		

### 2.1.3 Absorpsi, transportasi dan metabolisme vitamin A

Vitamin A diabsorpsi sempurna melalui saluran cerna dan kadarnya dalam plasma mencapai puncak setelah 4 jam, tetapi absorpsi pada dosis berlebihan kurang efisien. Kadar normal vitamin A dalam plasma adalah 100-230 unit/100ml (Dewoto, 2003).

Bentuk awal vitamin A dalam makanan adalah *retinil ester*. Bagi beberapa orang sumber vitamin A aktif terbesar adalah provitamin A karotenoid. *Retinil ester* sebagai hasil hidrolisis retinol dari pankreas atau terletak pada *brush border* mukosa usus. Sama seperti karoten, *retinil ester* suatu hidrofobik. Agar *retinil ester* dapat terurai dalam lingkungan cair pada lumen usus halus, maka *retinil ester* tergantung pada *micellar solubilization* (partikel-partikel koloid yang terbentuk oleh agregasi molekul kecil yang mudah larut). Jalan masuk proses ini difasilitasi oleh *enzym solublehydrolytic* dari substratnya (yaitu *retinil ester*) yang kemudian menghasilkan retinol pada bagian permukaan mukosa usus yang bebas

dari retinol dan  $\beta$ -karoten berdifusi secara pasif ke sel epitel mukosa usus. Secara keseluruhan absorpsi dari vitamin A ester terlihat tinggi (seperti 80-90 %), tetapi proses ini dipengaruhi oleh level dan tipe diet lemak dan protein (dengan menggunakan pengaruh efek surfaktan), juga oleh kandungan vitamin A sendiri (misalnya absorpsi kurang efisien terjadi pada dosis vitamin A sangat tinggi (Combs, 1992).

*Retinil ester* adalah bentuk yang dikeluarkan oleh sel mukosa usus pada inti hidrofobik dari partikel kilomikron dimana absorpsi vitamin A dibawa ke hepar setelah melalui sirkulasi limfatik, dan akhirnya masuk ke plasma setelah melewati duktus torakikus. Vitamin A juga dapat diabsorpsi melalui jalan non limfatik (Combs, 1992).

*Retinil ester* yang baru diabsorpsi segera dibawa memasuki hepar bergabung dengan sisa kilomikron oleh *receptor mediated* secara endositosis (pengambilan bahan dari lingkungan oleh sebuah sel melalui invaginasi membran plasmanya, proses ini mencakup fagositosis dan pinositosis) pada sel parenkim hepar. *Retinil ester* yang diterima terhidrolisis menghasilkan retinol. Retinol ini dapat ditransfer dari sel-sel parenkim ke sel-sel stelate dimana retinol mengalami reesterifikasi. Cadangan utama vitamin A tersimpan di hepar (normalnya > 90 % dari total jumlah vitamin dalam tubuh) yang disimpan dalam sel-sel parenkim (sel-sel hepatosit, berisi *retinil ester* aktif terhidrolisis) dan pada sel-sel stelate (hanya 2 % dari total volume hepar) (Combs, 1992).

Vitamin A dimobilisasi dari penyimpanannya di hepar sebagai retinol, kemudian diangkut ke jaringan perifer setelah berikatan dengan protein spesifik

dalam plasma (*Retinol Binding Protein*, RBP). RBP ini terdiri dari ikatan tunggal polipeptida, RBP memiliki tempat ikatan tunggal untuk retinol (Combs, 1992).

Transportasi vitamin A di dalam darah dan sel (Robert, 1994), sebagai berikut :

- a. Retinol dilepaskan dari hati kemudian berikatan dengan *retinol binding protein* (RBP). Retinol dan RBP bergabung dengan *Trans-Thyretin* (TTR, juga mengikat tiroksin) di dalam sirkulasi darah dengan perbandingan 1:1:1 kompleks trimolekuler.
- b. Pada kelompok plasma normal retinol dipertahankan hingga vitamin A yang disimpan di dalam hepar habis.
- c. Retinol RBP kompleks diambil oleh sel pada saat retinol berikatan dengan *Cellular Binding Protein* (CRBP). Retinol dimasukkan ke dalam asam retinoat yang mengikat *Cellular Retinoic Acid Receptor* (RAR).

Metabolisme vitamin larut lemak sangat lambat, sehingga dosis berlebihan dapat menimbulkan efek toksik (Dewoto, 2003).

Metabolisme vitamin A terpusat di sekitar transportasi dari retinol dengan berbagai cara konversi meliputi esterifikasi, konjugasi, oksidasi dan isomerasi. Retinol diesterifikasi pada sel usus dan pada sebagian besar jaringan lainnya melalui enzim endoplasmik retikulum dengan menggunakan kelompok *acyl* dari fosfatidilkolin (*Lacitin Retinol Acyl Transferase*, LRAT), atau *acylated coenzym A* (*Acyl CoA, Retinol Acyl Transferase*, ARAT). Pada sistem ini terlihat tanda spesifik untuk asam lemak jenuh khususnya asam palmitat, yang kemudian menghasilkan retinil palmitat dalam jumlah yang banyak (Combs, 1992).

Retinol mungkin terkonjugasi dari salah satu cara ini. Cara pertama, memerlukan reaksi katalisis oleh *Retinol-UDP-Glukonidase*, yang ada dalam hepar dan mungkin juga dalam jaringan lain. Reaksi ini menghasilkan *retinil  $\beta$ -glukorinida* yaitu suatu metabolit yang diekskresikan ke dalam empedu. Cara kedua, konyugasi ATP yang tergantung pada fosforilasi, yang menghasilkan *retinil phosphate* yang dikatalis oleh *retinol phosphorilase*. Pada konjugasi dihasilkan *guanostn diphosphamannose* (GDP-Man) yang telah diubah menjadi *glikosida retinil phosphomannose*, dimana *glikosida retinil phosphomannose* akan membawa gula ke reseptor glikoprotein. Retinol yang dihasilkan melalui fosforilasi secara *invivo* jumlahnya sedikit. Secara fisiologi, reaksi melalui jalur ini belum jelas (Combs, 1992).

Retinol dapat dioksidasi kembali menjadi retinal oleh  $\text{NADH}^+$  atau  $\text{NADPH}^+$  tergantung pada *retinol dehidrogenase*. Aktifitas ini ditemukan pada beberapa jaringan namun yang terbesar pada jaringan testis. Retinol dapat bersifat ireversibel setelah mengalami oksidasi oleh retinol oksidase menjadi asam retinoat. Rentangan reaksi umumnya lebih besar pada retinol dehidrogenase, dengan rentangan reduksi retinal menjadi retinol yang relatif besar. Akibatnya, di dalam jaringan terdapat konsentrasi retinol yang sangat rendah (Combs, 1992).

Perubahan vitamin A bentuk *all-trans* dan *cis* terjadi pada mata berkaitan dengan fungsi penglihatan. Hal ini disebabkan oleh isomerisasi ikatan afinitas retinal pada pigmen opsin. Pada mata, cahaya menyebabkan perubahan *11 cis-retinal* menjadi *all-trans-retinal*. Perubahannya kembali menjadi bentuk *11 cis* dikatalisasi oleh enzim retinal isomerasi, enzim ini juga mengkatalis isomer analog *11- cis* dan *all-trans-retinol*.

Pada jaringan sitoplasma *Cellular Retinol Binding Protein* (CRBP) mengikat retinol dan mengatur metabolisme vitamin A di dalam sel. *Cellular Retinoic Acid Binding Protein* (CRABP) juga ditemukan di dalam sitoplasma yang fungsinya sama dengan asam retinoat. Retinol direesterifikasi menjadi retinaldehid (Linder, 1992).

Kira-kira 90% dari vitamin A dalam tubuh disimpan dalam hepar. Sisanya disimpan pada lapisan lemak, paru-paru dan ginjal. Terjadi akumulasi secara bertahap pada hepar, setelah hepar mendapat tambahan, yang mencapai puncaknya pada masa dewasa. Dengan memperhitungkan kapasitas penyimpanan dalam hepar, sebaiknya konsumsi vitamin A setiap hari diperhatikan (Mahan, 1996).

Dalam hepar, vitamin A tersimpan sebagai ester pada sel-sel liposit (*Perisinusoidal Stellate Cells*) mungkin sebagai lipoglikoprotein kompleks. Selama transportasi ke jaringan, *retinil ester* terhidrolisis dan retinol terikat pada *Apo-Retinol Binding Protein* (RBP menghasilkan halo-RBP sebagai proses dalam aparatus Golgi dan sisa dalam plasma). Retinil ester terbawa ke jaringan melalui reseptor yang terletak pada asam retinoat dan dibawa ke plasma setelah terikat pada albumin. Sekali lagi bagian dalam sel ekstrahepatik retinol terikat oleh *Cellular Retinol Binding Protein*, CRBP (Mayor, 2000).

## 2.2. Hepar

### 2.2.1 Anatomi fisiologi hepar

Hepar merupakan kelenjar terberat dan terbesar di dalam tubuh. Pada orang dewasa beratnya sekitar 1500gr atau lebih, yaitu sekitar 2% dari berat badan orang dewasa. Konsistensi hepar lunak dan terletak di bawah diafragma

dalam kuadran kanan atas rongga abdomen dan terbagi dalam empat lobus, dengan permukaan atas hepar membulat sesuai dengan kubah diafragma (Bloom, 2002).

Dalam keadaan segar warna hepar merah tua atau merah coklat, ini disebabkan darah yang amat banyak (70-80% berasal dari vena porta yang membawa darah dari saluran cerna yang kurang akan oksigen, hanya sebagian kecil atau kira-kira 25% dari arteri hepatica berasal dari sirkulasi umum yang kaya akan oksigen masuk ke hepar melalui jalur "*portal hepatic*"). Darah dari kedua sumber ini bercampur dalam sinusoid hepar, dimana bahan terlarut dapat langsung berhubungan dengan sel-sel hepar. Darah yang keluar dari organ ini dibawa melalui vena hepatica ke vena cava inferior.

Posisi hepar yang berada di antara saluran cerna dan sirkulasi umum memungkinkan hepar dapat menerima dan menampung semua bahan makanan yang diserap melalui usus kecuali lemak yang sebagian besar diangkut oleh sistem limfatik, mengubah dan memecahkannya menjadi molekul-molekul yang lebih kecil untuk dilepaskan kedalam sirkulasi umum untuk disebarkan ke jaringan dan organ lain dalam tubuh. Darah portal membawa bahan yang dicerna dan diserap, yang diasimilasi dan disimpan di hepar, juga membawa bahan toksik ke hepar kemudian didetoksifikasi atau diekskresikan oleh hepar. Oleh karena itu hepar mudah rusak oleh bahan-bahan toksik yang diserap (Bloom, 2002; Paparo, 2000).

Hepar diliputi oleh simpai tipis berupa jaringan ikat fibrosa yang relatif padat dikenal sebagai kapsula *Glisson* dan dari sini membentuk septa jaringan ikat tipis masuk kedalam hepar di daerah porta hepatis dan membagi hepar dalam lobus dan lobulus. Pada porta hepatis, kapsula ini melanjutkan diri

dengan yang ada di sekitar kanal porta, berarti seluruh bagian organ ditembusi oleh kerangka jaringan ikat fibrous yang terdiri dari serat-serat kolagen dengan sel-sel relatif sedikit. Kapsula *Glisson* yang menebal di hilum yaitu tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hepar dan duktus hepaticus kiri dan kanan serta tempat keluarnya pembuluh limfe. Sebagian besar kapsula *Glisson* diliputi oleh peritonium yang langsung melekat pada diafragma dan visera pada dinding posterior abdomen (Geneser, 1994; Junqueira, 1998).

Hepar berkembang dari divertikulum (endoderm) ventralis pada daerah peralihan sebagai usus depan dan tengah, dan tumbuh ke depan ke dalam mesenkim septa transversum. Proliferasi sel-sel endoderm membentuk kolom-kolom dan lempeng-lempeng sel hepar. Sinusoid-sinusoid berkembang dari jaringan vaskuler, berhubungan dengan vena-vena vitelina, dan vena-vena vitelina sendiri membentuk vena porta. Mesenkim yang berhubungan dengan vena porta dan septa transversum berkembang menjadi jaringan ikat dan simpai hepar (Paparo, 2000; Tobing, 1978).

Hepar merupakan kelenjar eksokrin tubuler majemuk yang mensekresi empedu melalui duktus biliaris mencapai lumen duodenum, juga suatu organ dalam sistem retikuloendotel yang menyaring dan menyimpan darah, dan kumpulan sel dalam jumlah besar yang mensintesis dan melepas berbagai zat ke dalam aliran darah (Paparo, 2000).

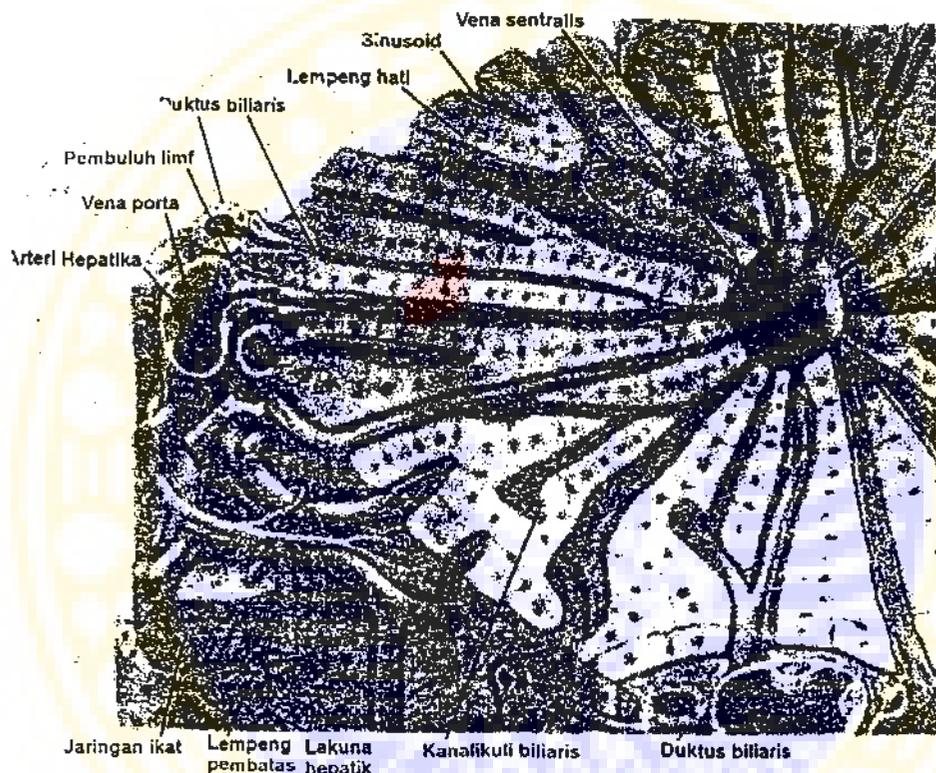
Hepar mempunyai fungsi bermacam-macam; untuk mempertahankan kadar gula dalam darah, sel mengambil gula darah dan menyimpannya sebagai glikogen; untuk metabolisme lipid, diangkut dalam darah sebagai lipoprotein (dibentuk dalam hepar); menyimpan vitamin A dan B<sub>12</sub> serta heparin (dihasilkan

dalam sel mast); mensekresi garam empedu sistim biliaris, dan albumin plasma ke dalam darah; mensintesis kolesterol, mengeluarkan pigmen empedu dari uraian hemoglobin sel darah merah yang rusak, dan menghasilkan urea (hasil sampingan metabolisme protein); menawarkan berbagai bahan toksik dalam peredaran darah, fagositosis bahan-bahan partikel oleh sel Kupffer, dan hemopoeisis pada fetus dan bayi yang baru lahir (Harper, 1993; Paparo, 2000).

### 2.2.2 Histopatologi hepar

Gambaran histologik hepar secara umum, dengan pembesaran kecil, hepar terlihat tersusun oleh massa epitel, sel-sel parenkim (hepatosit) yang tersusun berupa lempeng-lempeng yang saling berhubungan dan bercabang membentuk anyaman tiga dimensi. Di antara lempeng-lempeng ada sinusoid, struktur menyerupai kelenjar endokrin. Ada juga daerah portal atau kanal portal, masing-masing mengandung sedikit jaringan ikat, cabang-cabang vena porta, arteri hepatica dan duktus billiaris, kadang-kadang pembuluh limfe, tersusun seakan-akan membatasi lobulus hepar (*lobulus classic* atau lobulus hepar) mempunyai beberapa kanal portal di tepinya dan vena sentralis di tengah (cabang dari vena kafa inferior), dari sini lempeng-lempeng sel parenkim memancar seperti jeruji roda dengan sumbu di tengah. Pembuluh *afferent* (cabang vena porta dan arteri hepatica) di tepi lobulus dan pembuluh *efferent* (vena sentralis) di tengah lobulus, aliran darah dari tepi melalui sinusoid di antara lempeng sel hepar menuju vena sentralis. Sekresi empedu dari sel hepar masuk duktus biliaris kecil di tepi lobulus. Dengan pembesaran kuat nampak masing-masing lempeng sel hepar tersusun oleh satu atau dua deretan sel hepar, di antara sel tersebut ada saluran sempit '*kanakuli billiaris*' (merupakan suatu celah di antara dua sel hepar

yang berdekatan dan tidak dibatasi oleh epitel khusus) ruang sinusoid antara lempeng hepar dibatasi sel retikulum endotel yang terletak dalam anyaman serat retikulin halus. Jadi, di dalam lobulus hepar, ada sel-sel parenkim hepar yang membentuk dinding sinusoid hepar dan sel darah di dalam lumen sinusoid (Paparo, 2000).



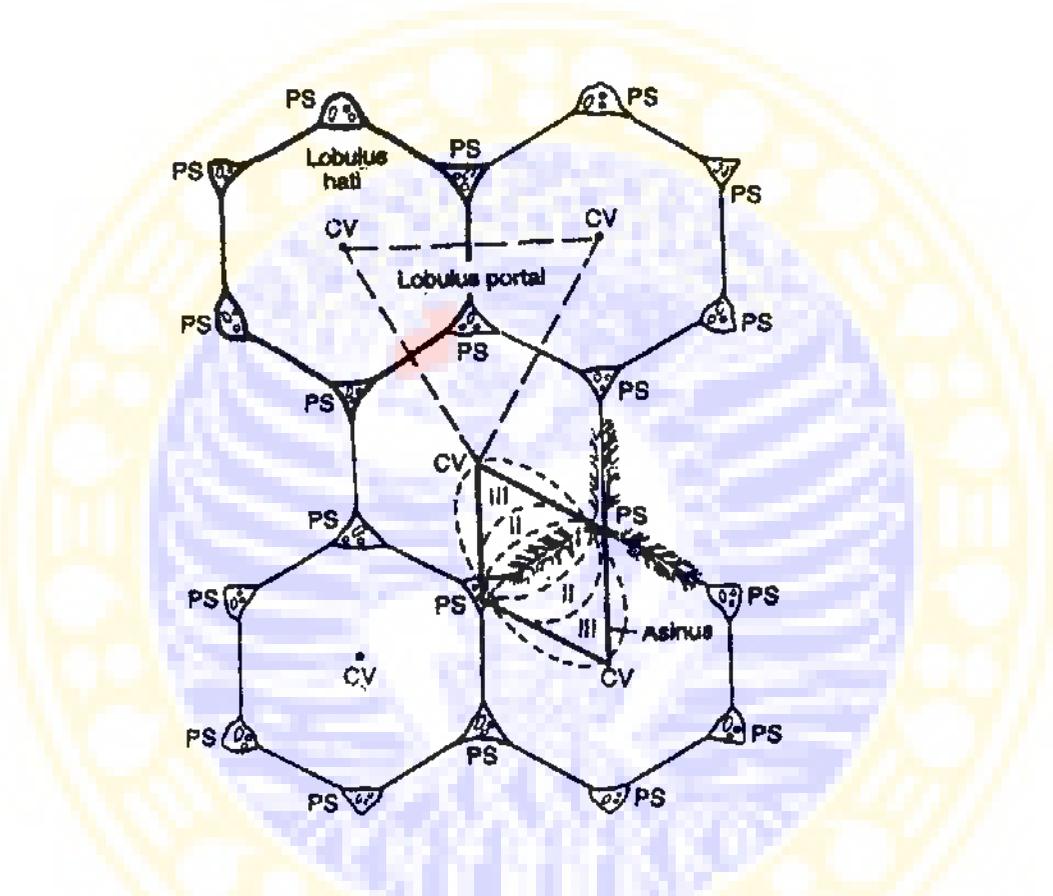
Gambar 2.2 Diagram parenkim hepar memperlihatkan sebagian lobulus dan sistem peredaran darah (Paparo,2000)

Sehubungan dengan fungsi hepar, ada sel-sel parenkim (hepatosit) yang membentuk plat-plat tipis atau lembaran-lembaran yang terpisah atau sinusoid-sinusoid, dan sel retikuloendotel yang fagositosis, membentuk selaput sinusoid. Sel-sel hepatosit terlibat dalam sintesis komponen-komponen sekresi

empedu; dalam penyerapan dan penimbunan zat-zat makanan; pembuangan obat-obatan, zat-zat racun dan senyawa-senyawa yang terbentuk secara alami seperti hormon; dalam sintesis dan pelepasan beberapa protein darah seperti albumin, pengangkutan globulin, dan protein-protein yang membekukan darah. Sel-sel fagosit terlibat dalam penyaringan darah sewaktu ia melalui sinusoid; berperan penting dalam memelihara respon pertahanan tubuh normal terhadap infeksi, penurunan kemampuan fagositosis oleh karena penyakit hepar mengakibatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi menurun.

Unsur utama struktur hepar adalah sel-sel hepar atau hepatosit (sel-sel parenkim). Sel-sel hepar berkelompok dalam susunan-susunan yang saling berhubungan sedemikian rupa membentuk suatu unit struktural disebut lobulus hepar. Struktur lobulus dikelompokkan dalam 3 golongan yang berbeda. Pertama yaitu **lobulus klasik**, bangunan berbentuk heksagonal dengan vena sentralis sebagai pusat. Kedua, **saluran portal**, bangunan berbentuk segitiga dengan vena sentralis sebagai sudut-sudutnya dan segitiga Kiernan atau saluran portal sebagai pusat. Ketiga, **asinus hepar**, unit terkecil hepar. Sel-sel pada asinus hepar berdasarkan sistem aliran darah di dalam lobulus dapat dibagi menjadi 3 zona. Sel-sel pada zona I; terdekat dengan pembuluh darah di daerah elipsoid yang tepat mengelilingi arteriol dan venul porta terminal, sel-sel zona I yang pertama dipengaruhi ataupun mengubah darah yang masuk, karena itu sel-sel ini kaya akan nutrien dan O<sub>2</sub> dan sedikit metabolit, pada zona ini paling banyak di jumpai enzim yang terlibat dalam metabolisme oksidatif dan glukoneogenesis. Sel-sel pada zona II; berada di tengah, menerima darah dengan kandungan nutrien dan O<sub>2</sub> yang tidak sebanyak zona I, memiliki unsur enzim campuran. Sedangkan sel-sel zona

III, dekat dengan ujung asinus dan paling dekat vena sentralis, sehingga sel-selnya mengandung sedikit nutrisi dan O<sub>2</sub> tetapi konsentrasi metabolitnya tinggi, akibatnya daerah sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan dibandingkan daerah perifer oleh karena sel-selnya banyak terlibat dalam proses glikolisis dan metabolisme obat (Bloom, 2002; Junquiera, 1998).



Gambar 2.3 Skema struktur hepar (Leeson,1970)

Struktur histologik hepar lainnya, adalah: sinusoid (6% dari lobus parenkim), merupakan suatu kapiler khusus yang terdiri atas: 1) Sel endotel, 2) makrofag (sel-sel Kupffer), 3) limfosit, ada yang besar 'granular limfosit' dan

4) sel-sel stelate yang menyimpan vitamin A. Sinusoid, sebenarnya tidak memiliki membran basal, sehingga memudahkan pertukaran antara aliran darah yang masuk dari hepatosit melalui "*Disse space*" (celah atau ruang Disse), sehingga mekanisme pertahanan imunitas atau kekebalan menjadi baik. Pengamatan dengan mikroskop cahaya sulit, tetapi oleh transmisi dan *scanning* mikroskop elektron dengan menggunakan metode imunohistokimia dapat terlihat dengan jelas (Sage, 1999).

Sel-sel endotel sebagai bentuk pertahanan sinusoid, memiliki karakteristik: 1) Proses penutupan area permukaan, ini sangat jarang (15% dari semua membran plasma hepar); 2) ada lubang dengan diameter rata-rata 100 nm, digolongkan dalam kelompok (*penyaring*), sebagai jalan molekul-molekul dengan diameter sangat kecil; 3) ada sejumlah vesikel pinositosis, sebagai indikasi tingginya kemampuan endositosis (pengambilan bahan dari lingkungan oleh sebuah sel melalui invaginasi membran plasmanya). Reaksi imunitas sel-sel endotel terlihat dengan *monoclonal antibody MS-1*, misalnya pada reseptor burung yaitu reseptor Fc Ig G dan juga molekul CD4. Dalam kapiler sinusoid, penetrasi sel endotel sinusoid berkurang bahkan hilang. Ada perubahan fenotip vaskuler tipe endotel; ekspresi dari faktor VIII-related antigen, *Ulex europaeus lectin*, molekul CD34 (Sage, 1999).

Sel-sel Kupffer, lebih berdempetan (banyak atau sedikit) pada permukaan luar dari dinding endotel, berbentuk bintang terlihat menggembung ke dalam lumen sinusoid. Jumlahnya lebih banyak pada zona I daripada zona 3, berisi beberapa lisosom (hampir setengah dari seluruh lisosom hepar). Sel-sel Kupffer dapat diidentifikasi dengan *monoclonal antibody* sebagai KPI (CD68).

Beberapa substansi fagositosis sel-sel Kupffer seperti partikel lateks, denaturasi albumin, bakteri, imunitas kompleks. Sel-sel Kupffer membawa koloid, pada pasien dengan penyakit hepatoselluler kronik sebagai petunjuk yang jelas dan baik sehubungan dengan sistem aliran darah portal. Oleh stimulasi *immunomodulator* (agen yang secara spesifik atau tidak spesifik meningkatkan atau mengurangi respons imun, misalnya ajuvan, imunostimulan atau imunosupresan), sel-sel Kupffer melepaskan mediator-mediator dan agen sitotoksik (Sage, 1999).

Jumlah limfosit sedikit sekali (1:10 sel-sel Kupffer). Perbandingan besarnya tipe-tipe limfosit tidak sama, yang besar adalah limfosit granular (*pit cells*) berada pada sel-sel luminal. Dalam berhubungan dengan sel-sel Kupffer atau sel endotel hepar, limfosit granular bergabung dengan limfosit dari daerah perifer (fenotip, aktivitas sitotoksik). Limfosit berperan dalam mekanisme pertahanan melawan tumor dan virus (Sage, 1999).

Sel-sel stelate hepar di sebut juga perisinusoidal (*ito cells, lipocyte, fat storing cell, pericyte*) berada dalam ruang Disse, dapat diidentifikasi pada interhepatosit dan sebagian besar berisi droplet vitamin A (tetapi 20 % dari sel-sel ini tidak mengandung lemak), berisi 40-70% retinoid dari penyimpanan tubuh, selnya panjang, dindingnya tipis, bersifat sitoplasmik, dan permukaannya berhubungan dengan mikrovilli hepatosit, sel-sel endotel dan serabut-serabut saraf, juga merupakan rumpun miofibroblas, dapat diidentifikasi secara imunositokemia pada hepar tikus oleh adanya desmin. Tetapi, desmin pada manusia tidak lama (hanya beberapa minggu). Tidak ada membran basal di sekitar sel-sel stelate hepar. Sel-sel stelate 5 -20 % / 100 hepatosit. Sel-sel stelate menyimpan vitamin A dan berperan pada sintesis dari matriks

ekstraseluler. Kemudian fungsi sel-sel stelate meningkat ketika diaktifkan dan ditransport memasuki *α-Smooth muscle actin positive cells*.

*Disse space* (ruang disse), ini terletak terutama di antara sel-sel stelate dan membran sinusoid dari hepatosit, dan ada 2 – 4% dari parenkim hepar. Pada bahan biopsi tidak normal dengan mikroskop cahaya standar pada ruang *disse*, komponen matriks ekstraseluler sebagai matriks jaringan penyambung tidak terlihat, ruang *disse* hanya dapat diidentifikasi secara imunositokimia, dapat dibedakan kolagen tipe I, III, dan IV (non fibril), proteoglikans (termasuk heparin sulfat) dan glikoprotein (termasuk fibronektin dan laminin), tetapi keberadaan laminin masih kontroversi. Pada hepar normal tipe kolagen yang terlihat hanya kolagen tipe IV. Seluruh jaringan ini dapat dilihat dengan pewarnaan perak atau *sirius red*. Peran dari matriks ekstraseluler adalah kompleks: melayani perlekatan sel, sehingga terjadi komunikasi interselular dan perbedaan pengaruh seluler (Friedman, 1999; Sage, 1999).

Hepar mudah mengalami trauma karena pengaruh yang merusak proses metabolik, toksik, mikroba, sirkulasi, dan neoplastik tertentu. Beberapa respon terbatas yang terjadi pada hepar adalah nekrosis, degenerasi, inflamasi, regenerasi, dan fibrosis (Robbins, 1996).

Nekrosis adalah suatu bentuk yang lebih umum setelah rangsangan eksogen oleh toksin atau reaksi imunologik dimana terjadi perubahan morfologik yang menyusul kematian sel pada jaringan atau organ hidup meliputi pembengkakan, denaturasi dan koagulasi protein, pecahnya organel sel, dan robeknya sel, dengan demikian jenis-jenis nekrosis dapat dibedakan atas: 1) nekrosis koagulativa terjadi pada miokard, ginjal, hati; 2) nekrosis mencair,

paling sering pada otak dan infeksi lokal (abses); 3) nekrosis perkijuan, khas pada lesi tuberkulosis; 4) nekrosis lemak, pada jaringan lemak. Lesi dapat bersifat fokal (tersebar di seluruh parenkim), zonal, submasif atau massif, atau geografik. Degenerasi merupakan pembengkakan dan edema hepatosit oleh karena terjadi penimbunan bahan spesifik misalnya deposisi pigmen empedu, besi, tembaga, dan partikel virus. Inflamasi (hepatitis), masuknya sel peradangan akut atau kronik, dimana granuloma dapat dicetuskan oleh benda asing, organisme dan obat-obatan. Regenerasi, terjadi pada semua penyakit hepar kecuali bentuk yang sangat fulminan, dapat mengakibatkan penebalan *hepatocyte cords*.

Hepar merupakan organ yang sel-selnya diperbaharui secara lambat, mempunyai daya regenerasi tinggi, sehingga meskipun secara patologi sebagian besar jaringan hepar rusak berat tetapi gejala-gejala klinis pada penderita tidak selalu dapat diamati. Hilangnya jaringan hepar oleh trauma, baik oleh tindakan bedah atau kerja substansi toksik memicu mekanisme yang merangsang sel-sel hepar membelah, sampai massa jaringan aslinya pulih kembali. Jaringan hepar yang diregenerasi umumnya serupa dengan jaringan yang hilang, tetapi bila kerusakan terjadi terus-menerus pada hepar, maka terbentuk banyak jaringan ikat kolagen fibrous bersamaan dengan regenerasi sel-sel hepar. Kelebihan jaringan ikat kolagen fibrous mengakibatkan struktur hepar menjadi rusak, suatu keadaan yang dikenal sebagai sirosis. Pada keadaan ini, fungsi hepar terganggu, dimana sebagian besar (70%) sel-sel parenkim atau hepatosit mengalami kerusakan, karena itu jaringan parut (kolagen) tidak hanya mengambil tempat hepatosit fungsional tetapi juga mengacaukan sistem vaskuler hepar dan sistem saluran empedu (Junqueira, 1998).



### 2.2.3 Fibrogenesis

Pada hepar, fibrosis adalah suatu respon berbentuk jaringan parut (kolagen), terjadinya sangat cepat pada bagian radang yang sangat berat. Fibrosis mendasari semua komplikasi dari tahap akhir beberapa penyakit hepar seperti hipertensi portal dan juga merupakan petunjuk terjadinya sirosis hepatis (suatu tahap ireversibel, dengan gambaran bentuk nodul, dan atrofi hepar). Pada semua kondisi, komposisi dari jaringan parut fibrosis hepar adalah sama, sel-sel dan faktor-faktor yang berperan pada respon hepar ini sama dengan radang pada parenkim ginjal, paru, ataupun kulit (Friedman, 1999).

Perubahan dari hepar normal ke hepar fibrosis dan akhirnya sirosis adalah proses kompleks yang melibatkan beberapa komponen penting, khususnya sel-sel stelate, sitokinase, proteinase dan inhibitorynya (Dooley dan Sherlock, 2002).

Jumlah dan komposisi dari matriks ekstraseluler berubah. Membran basal normal memiliki densitas rendah diganti oleh tipe jaringan penyambung interstisial densitas tinggi, yaitu kolagen fibrous. Perubahan ini memperlihatkan penurunan degradasi sebanyak peningkatan jaringan penyambung.

Ada interaksi antara sel-sel stelate dengan batas sinusoid dan sel-sel parenkim, sitokinase dan faktor-faktor pertumbuhan, protease dan inhibitorynya, dan matrik ekstraseluler. Pembentukan jaringan kolagen fibrous tergantung pada sintesis berlebihan dari matriks serta perubahan dalam pelepasannya sendiri, hal ini tergantung pada keseimbangan antara enzim-enzim matriks yang rendah dan inhibitorynya.

Pada trauma hepar, matriks ekstraseluler dapat meningkat 3-8 kali yang terdiri dari tipe interstisial densitas tinggi, yaitu fibrous- bentuk kolagen (tipe I dan III) dan juga fibronektin seluler, asam hialuronik dan matriks proteoglikans lainnya dan glikokonjugat. Hilangnya penetrasi dari sel endotel dan mikrovili hepatosit dan kapilarisasi dari sinusoid, mengganggu pertukaran metabolisme antara sel-sel hepar dan darah.

Sel stelate hepar (disebut juga *lipocyte, fat-storing cell, ito cell, pericyte*) adalah sel utama yang terlibat dalam fibrogenesis. Sel stelate memiliki kemampuan untuk aktifitas (Dooley dan Sherlock, 2002; Friedman, 1999).

Ketika berbatasan dengan trauma, sel-sel stelate beraktifitas oleh pelepasan beberapa faktor. Faktor-faktor itu meliputi; TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor- $\beta$ 1*) dari endotel, sel-sel Kupffer dan platelet, peroksidase lipid dari hepatosit, dan PDGF (*Platelet derived growth factor*) dan EGF (*Epidermal growth factor*) dari platelet. TGF- $\beta$ 1, berasal dari dua sumber yaitu *paracrine* (tipe-tipe fungsi hormon yang hormonnya disintesis pada sel endokrin dan dilepaskan dari sel endokrin yang menempel pada reseptornya dalam sel-sel dengan tipe yang berbeda didekatnya dan mempengaruhi fungsinya) dan *autocrine* (suatu model aktivasi hormon yang terikat terhadap reseptor dan mempengaruhi fungsi jenis sel yang dihasilkannya) yang paling potensial merangsang produksi kolagen tipe I. Oleh karena itu efek aktivitas *paracrine* nyata pada aktifitas *perpetuation/terus-menerus* (paling sedikit ada 7 perubahan pada lingkungan sel: proliferasi, kemotaksis, fibrogenesis, kontraktif, degradasi matriks, kehilangan retinoid, kemoatraktan sel darah merah, pelepasan sitokinase) sementara faktor-faktor *autocrine*, sebagian besar berasal dari sel-sel stelate hepar

sendiri. Faktor-faktor transkripsi meliputi NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa Binding*), dan STAT $_1$ , sebagai pengatur aktifitas (Dooley dan Sherlock, 2002; Friedman, 1999).

Aktifitas sel-sel stelate terjadi seiring dengan pelepasan droplet retinoid, proliferasi dan pembesaran sel, peningkatan retikulum endoplasmik dan ekspresi dari  *$\alpha$ -actin muscle smooth specific*. Sel-sel menjadi padat. Sel-sel stelate melepaskan sitokinase, faktor-faktor kemotaktik, matriks ekstraseluler dan enzim-enzim degradasi matriks. Selama aktifitas sel-sel stelate hepar berlangsung, sel jinak dari *protein prion* (PrP<sup>c</sup>) menginduksi sintesis dan ekspresi gen *protein prion* (suatu protein 33-35 kD (kilo Dalton) dengan fungsi yang tidak jelas, pada manusia di kode oleh gen pada lengan pendek kromosom 20). Ekspresi PrP<sup>c</sup> berada dalam hepar normal tetapi pada penyakit hepar kronik berhubungan dengan derajat inflamasi daripada fibrosis.

Produksi matriks ekstraseluler tidak aktif. Protein manusia yang memiliki daerah yang berhubungan dengan sel-sel stelate dan sel-sel lainnya melewati reseptor membran meliputi integrin. Efek mediator sel-sel stelate dan sel-sel lainnya ini melewati *cytoplasmic signaling pathway* yang dapat mempengaruhi sintesis kolagen dan aktifitas *metalloproteases*.

Proliferasi dari sel-sel stelate ditemukan pada trauma hepar. PDGF adalah mitogen paling potensial. Stimulasi proliferasi lainnya meliputi *endotelin* I (ET-1), trombin dan *Insulin-like growth factor* (IGF).

Sel-sel stelate berkumpul pada daerah trauma, setelah berproliferasi dan bermigrasi dari tempat lain, oleh respon pelepasan dari PDGF dan *monocyte chemotactic peptide 1* (MCP-1).

Walaupun sel-sel endotel memproduksi beberapa komponen dari matriks ekstraseluler setelah trauma hepar yaitu fibronectin dan kolagen tipe IV, ada yang istimewa dari ekspresi gen matriks sel-sel stelate yaitu sel-sel ini sebagai sumber utama yang meningkatkan matriks ekstraseluler. Produksi matriks fibrous oleh sel-sel stelate di stimulasi oleh TGF- $\beta$ 1, IL1 $\beta$ , TNF (*Tumor Necrosis Factor*), produksi dari lipid peroksidase, dan asetaldehid dari metabolisme alkohol.

Peningkatan matriks interstisial lebih lanjut distimulasi oleh aktifitas sel-sel stelate.

Ketidakeimbangan antara sintesis dan degradasi matriks memainkan peran utama dalam fibrogenesis hepar. Degradasi matriks di atas tergantung keseimbangan antara *matriks metalloproteinase* (MMPs), jaringan penghambat dari MMPs (TIMPs, *Tissue inhibitor matriks metalloproteinase*) dan perubahan enzim-enzim (MTI-MMP, *Monoclonal tissue inhibitor-matrks metalloproteinase* dan stromelysin). Tak jelas darimana asal semua ini, tetapi aktifitas dari sel-sel stelate sebagai sumber utama dari MMP-2 dan stromelysin, RNA ekspres dari TIMP-1 dan TIMP-2 dan produksi dari TIMP-1 dan MTI-MMP. Sel-sel Kupffer menyimpan kolagen tipe IV (MMP-9). Perubahan ini memberikan keuntungan selama trauma hepar dengan meningkatnya degradasi dari membran basal kolagen normal, dan pengurangan degradasi tipe kolagen interstisial. Kemudian dapat dijelaskan peningkatan relatif ekspresi TIMP-1 dan TIMP-2 pada MMP-1 (kolagen interstisial). Ekspresi berlebihan TIMP-1 manusia pada suatu contoh

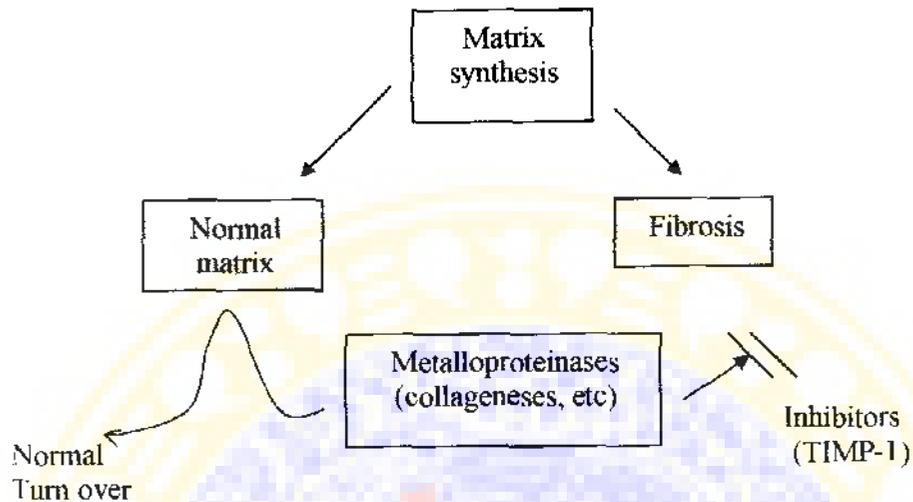
transgenik, tikus yang diinduksi oleh CC14 meningkatkan fibrosis hepar tujuh kali. Pada waktu resolusi dari percobaan trauma hepar, ekspresi TIMP-1 dan TIMP-2 berkurang dan aktifitas kolagen meningkat serta terjadi perpindahan matriks fibrosis.

Aktifitas sel-sel stelate (miofibroblas) terlihat terutama pada *smooth muscle* dan pada saat kontraksi. Sel-sel stelate dapat berkontak di tempat itu dan ini memberi peran dalam pengaturan aliran darah. Stimulasi untuk kontraksi meliputi ET-1, arginine dan vasopressin dan adrenomedullin. Sel-sel stelate memproduksi nitratoksida, suatu fisiologi antagonis untuk ET-1. Oleh karena itu kontraksi seharusnya mengurangi nitratoksida sebaik peningkatan ET-1.

Berdasarkan penyebabnya dan keseimbangan respon dari sel-sel stelate dan sel-sel Kupffer untuk sitokinase dan produksi faktor-faktor pertumbuhan, maka derajat fibrosis hepar mengikuti variasi trauma hepatoseluler. Dari fibrosis ringan ke bentuk nodul (sirosis) yang ireversibel terjadi perubahan jarak spektrum akibat pelepasan dari beberapa jaringan parut. Demikian pula, hipertensi portal memiliki unsur reversibel (kontraksi sel-sel stelate) atau seharusnya ireversibel kapiler sinusoid dan fibrosis stenosis sinusoid.

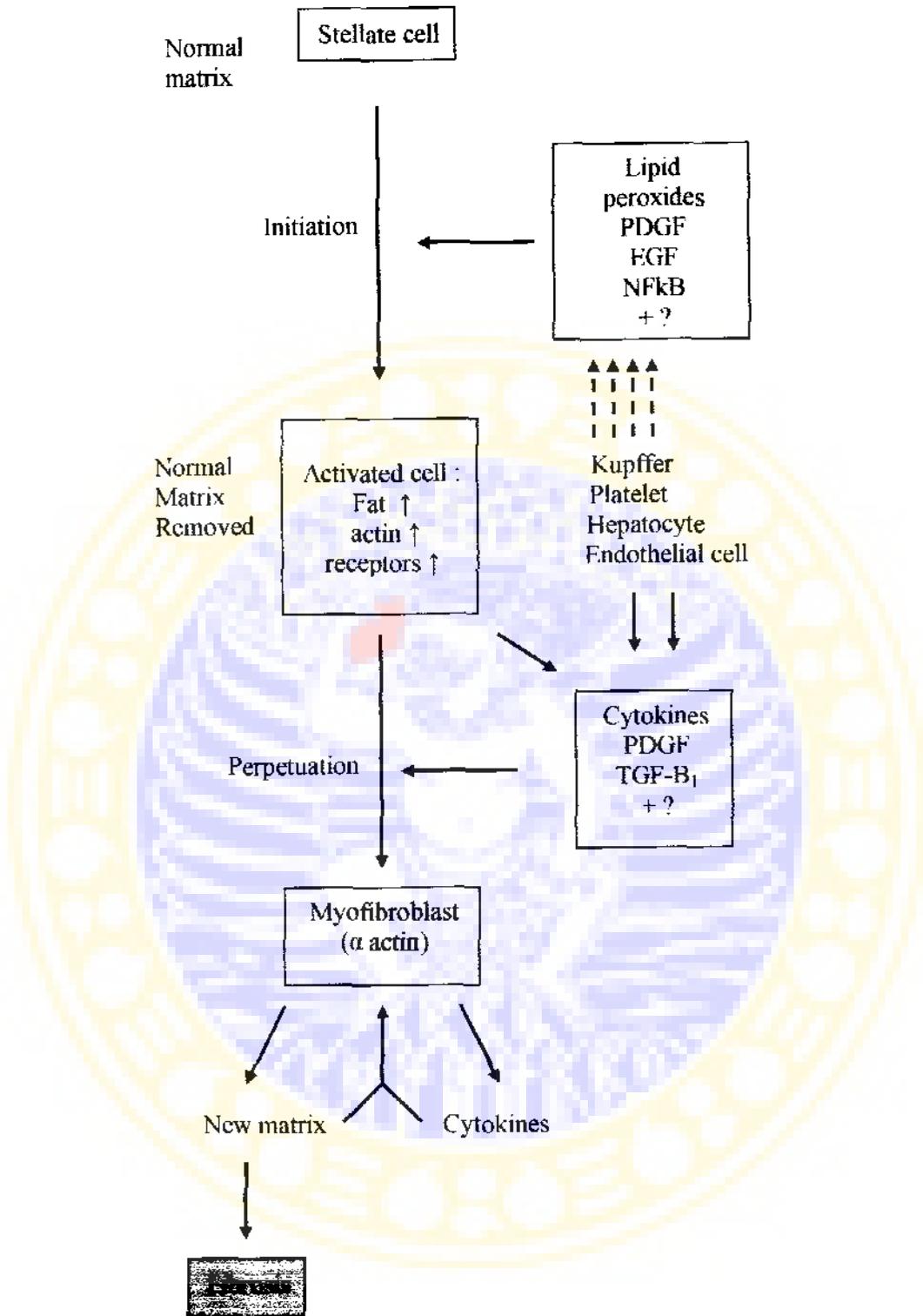
Penanganan di klinik dewasa ini secara langsung terpusat pada keduanya, yaitu dapat menghilangkan agen penyebab atau menekan inflamasi hepar dan inhibitor aktifitas sel-sel stelate atau aktifitas sel-sel stelate, ini merupakan suatu area penelitian intensif. Selama pemulihan apoptosis, gambaran aktifitas sel-sel stelate oleh peningkatan matriks ekstraseluler, penting sebagai sumber pemulihan.

Mekanisme pembentukan jaringan penyambung normal dan abnormal secara ringkas dapat diperlihatkan dengan gambar di bawah ini:



Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan jaringan penyambung normal dan abnormal. TIMP, *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases* (Dooley dan Sherlock, 2002).

Sementara Gambar 2.7 di bawah ini, memperlihatkan aktifitas sel-sel stelate hepar pada fibrogenesis. Miofibroblas, diduga memproduksi inhibitor kolagen, yang meningkatkan fibrogenesis (lihat gambar).



Gambar 2.7 Aktifitas sel-sel stelate dan fibrogenesis (Dooley dan Sherlok, 2002)

## 2.4 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit termasuk dalam genus *Mus*, sub famili *musinae*, famili *muridae*, ordo *rodentia*. Mencit laboratorium (mencit yang sudah dipelihara di laboratorium) sebenarnya masih satu famili dengan mencit liar. Adapun yang paling sering dipakai untuk penelitian biomedis adalah *Mus musculus*. Berbeda dengan hewan-hewan lainnya, mencit tidak memiliki kelenjar keringat. Pada umur 4 minggu berat badannya mencapai 18 – 20 gram. Jantung terdiri dari 4 ruang dengan dinding atrium yang tipis dan dinding ventrikel yang lebih tebal. Peningkatan temperatur tubuh tidak mempengaruhi tekanan darah, sedangkan frekuensi jantung, *cardiac output* berkaitan dengan ukuran tubuhnya. Hewan ini memiliki karakter yang lebih aktif di malam hari dibandingkan siang hari. Traktus respiratorius terdiri dari 3 bagian yaitu :

- Anterior : nostril, kavum nasalis
- Intermediate : larynx, trachea, bronchi
- Posterior : paru-paru kiri dan kanan, paru kiri terdiri dari 1 lobus dan paru kanan terdiri dari 4 lobus.

Di antara spesies hewan lain, mencit paling luas digunakan untuk tujuan penelitian medis (60 – 80 %), karena murah, mudah berkembang biak. Mencit memiliki 3 pasang kelenjar saliva yakni submaksilaris (submandibularis), parotid dan sublingualis yang terdapat di bagian ventral dari daerah leher, lambung terbagi dalam glandular dan non glandular, traktus urinaria terdiri dari ginjal, ureter, vesika urinaria dan uretra (Kusumawati, 2003).

Data normatif mencit, menurut Jacoby (1984) adalah:

Berat dewasa : laki-laki	: 20 – 40 gr
Perempuan	: 18 – 35 gr
Lama hidup : Umumnya	: 1 – 3 tahun
Maksimum	: 4 tahun
Luas permukaan tubuh	: 0,03 – 0,06 cm <sup>2</sup>
Jumlah kromosom (diploid)	: 40
Kebutuhan air	: 6,7 ml / usia 8 minggu
Kebutuhan makanan	: 5,0 gr / usia 8 minggu.
Temperatur tubuh	: 98,8 <sup>o</sup> - 99,3 <sup>o</sup> F
Puberitas L / P	: 28-49 hari
Musim kawin	: None
Lama kehamilan	: 19-21 hari
Jumlah anak lahir	: 4-12 bayi
Berat lahir	: 1,0-1,5 gr
Membuka mata	: 12-13 hari
Penyapihan	: 21 hari
Kecepatan jantung	: 310-840 denyut/menit
Tekanan darah :	
Sistolik	: 133-160 mmHg
Diastolik	: 102-110 mmHg
Volume darah :	
Plasma	: 3,15 ml/100 gr
Whole Blood	: 5,85 ml/100 gr
Frekuensi pernafasan	: 163/menit

Tidal volume : 0,18 (0,09-0,38) ml  
 Minute volume : 24 (11-36 ml)/menit  
 Stroke volume : 1,3-2,0 ml/denyut

Plasma :

PH : 7,2-7,4  
 CO<sub>2</sub> : 21,9 mol.es mM  
 CO<sub>2</sub> pressure : 40 + 5,4 mmHg

Hitung leukosit :

Total : 8,4 (5,1-11,6) x 10<sup>3</sup> / ul  
 Neutrophil : 17,9 (6,7-37,2) %  
 Limposit : 69 (63-75) %  
 Monosit : 1,2 (0,7-2,6) %  
 Eosinofil : 2,1 (0,9-9,8) %  
 Basofil : 0,5 (0-1,5) %

Platelets / keping darah : 600 (100-1000) x 10<sup>3</sup>/μl

Hematokrit/ packed cell volume : 44 (42-44) %

Sel darah merah : 8,7-10,5 x 10<sup>8</sup>/mm<sup>3</sup>

Hemoglobin : 13,4 (12,2-16,2) gr/dl

Volume maksimum darah : 5 ml/kg

Perdarahan tunggal :

Waktu bekuan : 2-10 mnt  
 PTT : 55-110 sec  
 Prothrombin time : 7-19 sec

Kebutuhan vitamin A mencit per kilogram berat badan untuk bahan-bahan makanan alam formula terbuka adalah 15.000 IU/kgBB (Knapka *et al*, 1974); makanan murni adalah 4.000 IU/kgBB (AIN 76, 1977); makanan murni adalah 1.100 IU/kgBB (Herley and Bell, 1974) dan serapan makanan kimiawi adalah 1.730 IU/kgBB (Pleasant *et al*, 1973; Jacoby, 1984).

## 2.5 Hipervitaminosis A

Pemberian vitamin A yang berlebihan akan merupakan racun bagi tubuh, keadaan ini disebut hipervitaminosis A atau vitamin A toksisitas. Hipervitaminosis A biasanya terjadi akibat penggunaan vitamin A lebih dari 700-3000 IU/kg BB/hari untuk beberapa bulan sampai beberapa tahun. Akan tetapi kerusakan hepar pada anak dapat timbul sebagai akibat penggunaan vitamin A dengan dosis 5 kali AKG selama 7-10 tahun (Marcus, 1996). Kelebihan vitamin A bisa terjadi bila memakan vitamin A sebagai suplemen dalam takaran tinggi dan berlebihan misalnya takaran 16.000 RE untuk jangka waktu yang lama atau 40.000-55.000 RE/hari (Almatzer, 2003).

Konsumsi vitamin A perhari selama beberapa bulan pada anak-anak 18.000 IU, pubertas 80.000 IU dan orang dewasa 100.000 IU dapat terjadi intosikasi kronik. Umumnya, konsumsi 3000 IU/kgBB/hari, ini cukup menyebabkan terjadi intoksikasi kronik (Mahoney, 1990).

Secara klinis, peningkatan hipervitaminosis A pada manusia sebagai hasil pengobatan diri sendiri dan terapi berlebihan (Mc Clarin, 1982). Vitamin A terakumulasi dalam hepar signifikan dengan pertambahan usia manusia. Anak-anak dan orang dewasa, diingatkan agar menggunakan RDA tahun 1980 sebagai

standar baku, konsumsi vitamin A berlebihan bilamana lebih dari 25.000 IU (Mc Dowell, 1989).

Terjadi peningkatan kasus hipervitaminosis vitamin A sejak beberapa bentuk sintesis dari vitamin A yang lebih potensial telah dibuat (Di Palma, 1971).

Pemberian diet yang dianjurkan untuk bayi adalah 1.500 IU/hari. Setelah pemberian dosis tunggal pada bayi secara berlebihan (350.000 IU), dapat memperlihatkan gejala-gejala toksisitas. Pada orang dewasa beberapa juta unit disuntikkan dapat menimbulkan gejala intoksikasi. Indeks terapi vitamin A sangat baik dan tidak ada gambaran gejala-gejala toksisitas sampai dosis lebih 1.000 IU, bilamana pemberian dosis ini direkomendasikan (Di Palma, 1971).

Dosis tunggal vitamin A kira-kira 2.000.000 IU untuk orang dewasa dan pada anak-anak 75.000 IU dapat menyebabkan intoksikasi akut (Mahoney, 1990).

Konsumsi vitamin A akut, misalnya dengan mengkonsumsi hati beruang es sangat besar, dapat menyebabkan meningkatnya tekanan intrakranial, sakit kepala, mual dan beberapa hari kemudian terjadi deskuamasi kulit (Tanner, 1991). Dosis berlebihan vitamin A pada binatang menimbulkan malformasi pada sistem saraf pusat, mata, palatum dan saluran kemih. Oleh karena itu dosis melebihi AKG tidak dianjurkan selama kehamilan normal oleh karena dapat terjadi deformitas pada bayi yang ibunya mendapat 25.000 IU vitamin A segera sebelum dan beberapa bulan pertama kehamilan (Dewoto, 1995).

Pernah dilaporkan, pemberian dosis besar dan tunggal (sekitar 100.000 µg) menyebabkan intoksikasi akut pada anak dan terjadi pemulihan secara spontan ketika konsumsi vitamin A dihentikan. Tidak ada kerusakan dan kematian yang

dilaporkan. Gejala intoksikasi jelas terlihat pada anak-anak dan bayi. Anak-anak dan bayi yang paling rentan terjadi hipervitaminosis setelah pemberian dosis tinggi ( $<20.000 \mu\text{g}/\text{hari}$ ) selama beberapa minggu (Mc Laren, 1991).

Tanda hipervitaminosis ditemukan bila vitamin A serum dalam keadaan puasa  $> 250 \mu\text{g}/100\text{ml}$ , bila pemberian cepat dihentikan, gejala hilang dalam waktu beberapa minggu (Pudjiadi, 2000).

Macam-macam gejala hipervitaminosis A pada manusia perlu dipertimbangkan tergantung pada usia subyek dan lama konsumsi vitamin A berlebihan (Mc Dowell, 1989).

Gejala keracunan akut pada anak yaitu gelisah, dengan tanda-tanda tekanan otak meningkat seperti pusing, muntah, kejang, dan tanda-tanda ini dapat menghilang jika pemberian dihentikan. Bila vitamin A berlebihan dilakukan tiap hari selama berminggu-minggu dapat terjadi hipervitaminosis kronik dengan gejala-gejala: rambut menjadi kering, dan rontok, kulit kering dan kasar, bibir pecah-pecah, rambut mata rontok; lalu berlanjut gejala-gejala hepatomegali, artralgia, pusing, pseudotumor serebrum, lemas-lemas (Pudjiadi, 2000). Gejala kronik lain yang dilaporkan yaitu tinitus, pelebaran sutura dan ubun-ubun menonjol, dermatitis eksfoliativa, pruritus, stomatitis angular, hiperostosis dan paronokia, dapat juga terjadi diplopia dan papil udem, lalu atrofi n.optikus dan akhirnya dapat terjadi kebutaan (Dewoto, 1995).

Pada bayi dapat terjadi pembesaran kepala dan mudah tersinggung, bila vitamin A dikonsumsi  $8.000 \text{ RE}/\text{hari}$  selama 30 hari (Almatzier, 2003).

Gejala hipervitaminosis pada orang dewasa antara lain sakit kepala, pusing, mual, rambut rontok, kulit mengering, tidak ada nafsu makan atau

anoreksia dan sakit pada tulang. Pada wanita, menstruasi dapat berhenti. (Almatzier, 2003).

Vitamin A disimpan pada *Fat-containing (ito cells)* hepar dan toksisitas kronik menyebabkan nekrosis hepatosit, fibrosis, dilatasi sinusoid, dan dapat menunjukkan hipertensi portal non sirrrosis (Mac Sween, 1993). Bagaimanapun juga masalah utama adalah pada tempat penyimpanannya sebab setiap hari dapat terjadi akumulasi pada tempat vitamin A ini disimpan sehingga dapat terjadi hipervitaminosis A (Di Palma, 1971).

Fibrosis perisinusoidal juga terjadi pada hipertaminosis A, mungkin disebabkan peningkatan sintesis kolagen oleh aktivitas *ito cells*. Dengan mikroskop elektron, *ito cells* nampak hiperplasia, akibat dari akumulasi vitamin A vesikel-vesikel menjadi besar. Terjadinya fibrosis perisinusoidal bersamaan dengan dilatasi sinusoid, lalu terjadi portal dan periportal fibrosis. Dan dapat berkembang menjadi sirosis bila pemberian vitamin A berlanjut. Ini terjadi pada dosis besar perhari (20.000 IU-1.200.000 IU) dengan lama perlakuan bervariasi (7 minggu sampai 30 tahun) (Rizetto, 1999).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

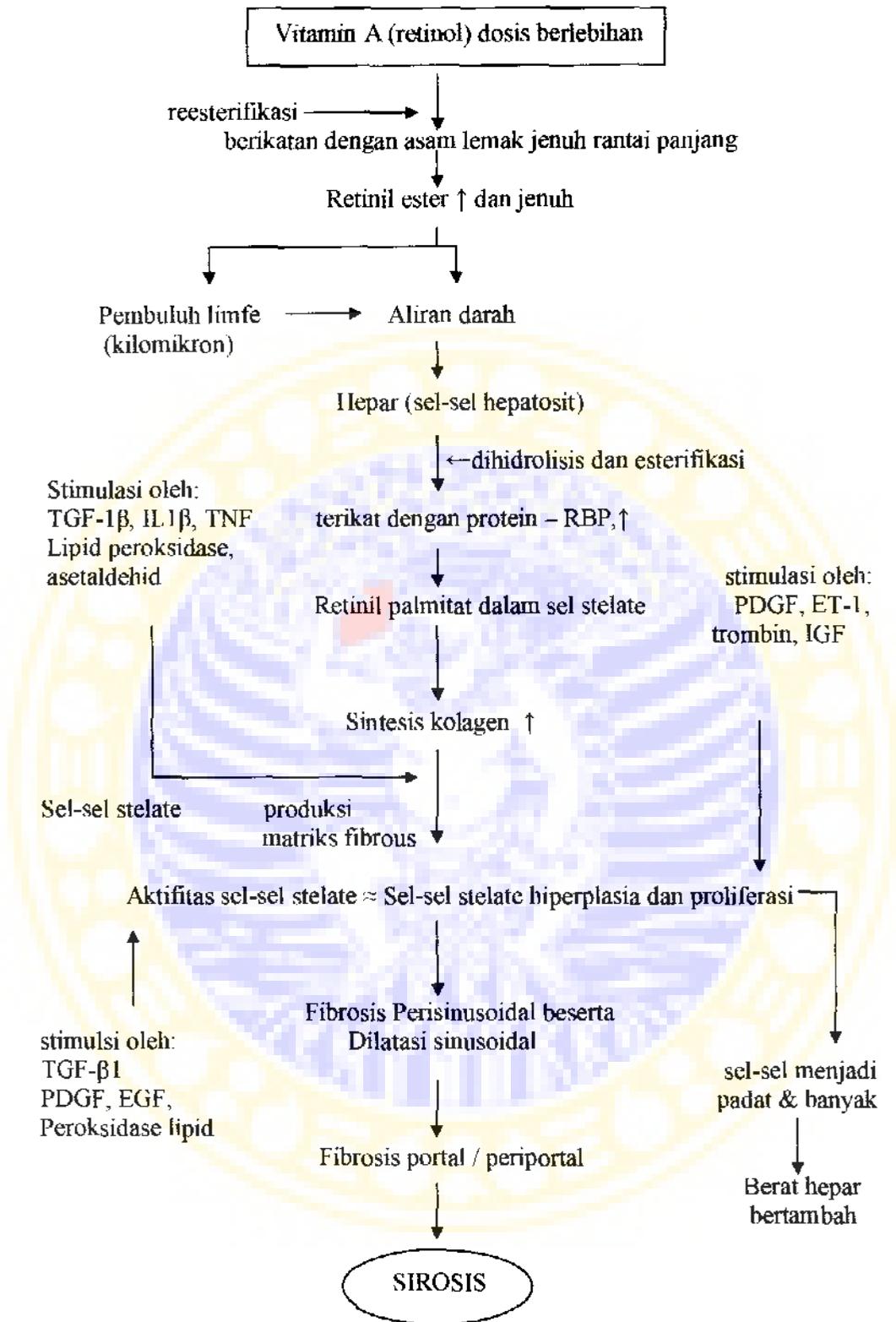
Vitamin A berperan dalam berbagai fungsi faali tubuh seperti: berfungsi dalam penglihatan normal pada cahaya redup; diferensiasi sel-sel tubuh yang dapat terjadi pada tiap tahap perkembangan tubuh seperti pada tahap pembentukan sperma dan sel telur, pembuahan, pembentukan struktur dan organ tubuh, pertumbuhan dan perkembangan janin, masa bayi, anak-anak, dewasa, dan masa tua (diduga vitamin A dalam bentuk asam retinoat/retinoid memegang peranan aktif dalam kegiatan inti sel); fungsi kekebalan dimana ditemukan bahwa: 1) ada hubungan kuat antara status vitamin A dan resiko terhadap penyakit infeksi pernafasan, 2) hubungan antara kekurangan vitamin A dan diare belum begitu jelas, 3) kekurangan vitamin A pada campak cenderung menimbulkan komplikasi yang dapat berakibat kematian; pertumbuhan dan perkembangan oleh karena vitamin A berpengaruh terhadap sintesis protein; vitamin A dalam bentuk retinol dan retinal berperan dalam reproduksi; berperan dalam pencegahan kanker dengan kemampuan retinoid/asam retinoat mempengaruhi perkembangan sel epitel dan kemampuan meningkatkan aktifitas sistem kekebalan; juga berperan dalam pencegahan dan pengobatan penyakit jantung (mekanismenya belum jelas); juga untuk penambah nafsu makan; pembentukan sel darah merah (vitamin A berinteraksi dengan besi).

Konsumsi vitamin A yang cukup tidak menimbulkan bahaya, tetapi dapat meningkatkan cadangan *retinil ester* di dalam hepar. Vitamin A akan

terakumulasi di dalam hepar, jika vitamin A dikonsumsi secara terus menerus karena dengan demikian jumlah *retinil ester* di dalam hepar menjadi berlebih.

Konsumsi vitamin A yang berlebihan dan secara terus menerus dapat menyebabkan akumulasi di dalam tubuh terutama di dalam hepar sebagai tempat penyimpanan cadangan vitamin A tubuh. Keadaan ini dimulai dengan kapasitas yang meningkat dan kejenuhan *retinil ester* (vitamin A yang telah di esterifikasi pada sel epitel lapisan dalam dari mukosa usus halus) lalu ditransfer dalam bentuk kilomikron melalui sistem biliaris aliran darah masuk ke hepar (sel-sel hepatosit), dari sini *retinil ester* dihidrolisis dan direesterifikasi menjadi retinil palmitat dan sebelum disimpan dalam sel-sel stelate, retinil palmitat berikatan dengan protein, RBP (*retinol binding protein*). Bilamana terjadi hipervitaminosis, sintesis kolagen oleh sel-sel stelate meningkat oleh karena adanya stimulasi TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor-beta*), IL1 $\beta$ , TNF, lipid peroksidase, asetaldehid pada sel-sel stelate untuk produksi fibrous matriks/jaringan ikat kolagen menyebabkan hiperplasia dan proliferasi sel-sel stelate. Proliferasi ini di stimulasi oleh PDGF (*Platelet derived growth factor*), ET-1 (*Endothelin 1*), trombin dan *Insulin-like growth factor* (IGF), seiring dengan ini sel-sel stelate beraktifitas oleh stimulasi TGF- $\beta$ 1 dari endotel, sel-sel Kupffer, dan platelet, stimulasi peroksidase lipid dari hepatosit, PDGF dan EGF (*Epidermal growth factor*) dari platelet; kemudian terjadi fibrosis perisinusoidal beserta dilatasi sinusoidal berlanjut menjadi fibrosis portal dan periportal, bahkan dapat terjadi sirosis bilamana pemberian vitamin A berlanjut.

Atas dasar kerangka konseptual yang telah dipaparkan maka dibuat bagan kerangka konseptual sebagai berikut :



Gambar 3.1 : Skema kerangka konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konseptual yang telah dipaparkan dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Pemberian vitamin A dosis berlebihan pada hepar anak mencit jantan dapat menyebabkan berat hepar bertambah.
2. Pemberian vitamin A dosis berlebihan pada hepar anak mencit jantan dapat menyebabkan perubahan gambaran histologik hepar.

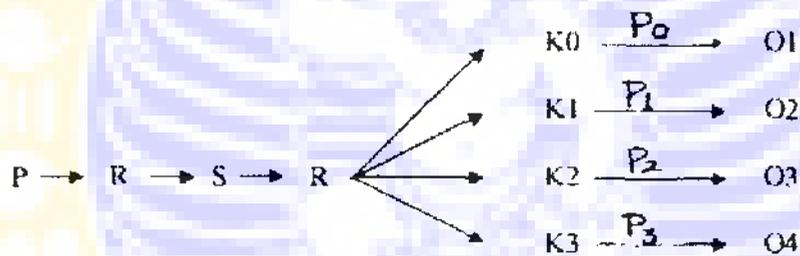


## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Experimental Murni (*True Experimental*) yakni dengan melakukan pengelompokan subyek berdasarkan tehnik random (*Random assignment*) oleh (Pratikya, 2001), rancangan ini biasanya disebut *The Posttest-only-control group design*, dimana pengukuran awal tidak dilakukan, oleh karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari populasi yang sama. Bentuk rancangan penelitian ini oleh Zainuddin (2000) dapat digambarkan seperti di bawah ini:



Keterangan :

P : Populasi

R : Randomisasi

S : Sampel

K0 : Kelompok kontrol dengan dosis 0 iu (pelarut sarbiton 0,25cc)

K1 : Kelompok dengan pemberian vitamin A dosis 1/8 LD50

K2 : Kelompok dengan pemberian vitamin A dosis 1/6 LD50

K3 : Kelompok dengan pemberian vitamin A dosis 1/4 LD50

P0 : Perlakuan kontrol dengan dosis 0 IU (pelarut sarbiton 0,25cc)

- P1 : Perlakuan 1 dengan pemberian vitamin A dosis 1/8 LD50
- P2 : Perlakuan 2 dengan pemberian vitamin A dosis 1/6 LD50
- P3 : Perlakuan 3 dengan pemberian vitamin A dosis 1/4 LD50
- O<sub>1</sub> : Data post test kelompok kontrol setelah pemberian selama 9 hari
- O<sub>2</sub> : Data post test kelompok 1 setelah pemberian selama 9 hari
- O<sub>3</sub> : Data post test kelompok 2 setelah pemberian selama 9 hari
- O<sub>4</sub> : Data post test kelompok 3 setelah pemberian selama 9 hari

#### 4.2 Sampel dan Besar Sampel

Dalam penelitian ini digunakan 40 ekor anak mencit jantan berumur 3-4 minggu dari *Strain BALB/C*, yang dipakai untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan terhadap berat hepar dan gambaran histologik hepar anak mencit jantan.

Mencit dipilih sebagai hewan coba, oleh karena selain murah, mencit juga paling luas digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80%).

Besar sampel minimal yang digunakan 10 ekor mencit untuk setiap kelompok perlakuan. Jadi besar sampel seluruhnya adalah 40 ekor. Jumlah sampel dalam penelitian ini berdasarkan rumus berikut (Snedecor, 1967) :

$$n = \sigma D^2 / \delta^2$$

bila berpasangan,  $\sigma D^2 / \delta^2 - 1$ , maka

$$n = (Z\alpha + Z\beta)^2$$

$$n = (1,65 + 1,28)^2$$

$$n = 8,41 \text{ dibulatkan menjadi } 9$$

**Keterangan:**

- n = besar sampel  
 $Z_{\alpha}$  = harga standar  $\alpha$  0,05 = 1,65  
 $Z_{\beta}$  = harga standar  $\beta$  0,1 = 1,28

**4.3 Variabel Penelitian****4.3.1 Klasifikasi variabel**

Variabel dalam penelitian ini adalah :

**1. Variabel bebas (*Independent Variable*)**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai dosis vitamin A yang diberikan pada anak mencit jantan.

**2. Variabel tergantung (*Dependent Variable*)**

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah berat hepar dan gambaran histologik hepar anak mencit jantan.

**3. Variabel Kendali**

Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi: gelas, pakan dan minuman, aliran udara, cahaya dan suhu ruangan, kandang perawatan yang diberikan pada hewan coba.

**4.3.2 Definisi operasional variabel**

- Dosis Vitamin A adalah jumlah vitamin A dalam bentuk emulsi vitamin A sebanyak 160,62 IU /gr BB/hari (Kelompok K1); 214,16 IU /gr BB/hari (Kelompok K2) dan 321,25 IU /gr BB/hari (Kelompok K3).
- Dan 0 iu/gr BB/hari atau diberi blanko basis emulsi cair sarbiton 0,25cc sebagai kelompok kontrol (Kelompok K0) dan diberikan peroral secara berturut-turut selama 9 hari.

- Berat hepar menciit, yaitu berat yang dinyatakan dalam gram dengan menggunakan timbangan analitik.
- Gambaran histologik hepar menciit, tingkatan fibrosisnya dibagi dalam lima tingkatan (stage) /  $S_0$  -  $S_4$  (Doolcy dan Sherlock; L Andriano):

$S_0$  : Tidak ada fibrosis, berarti tidak ada penambahan jaringan ikat kolagen

$S_1$  : Fibrosis ringan, penambahan jaringan ikat kolagen pada portal area

$S_2$  : Fibrosis sedang, penambahan jaringan ikat kolagen di antara portal area tetapi tidak merusak struktur lobulus.

$S_3$  : Fibrosis berat, penambahan jaringan ikat kolagen membentuk jembatan fibrotik antara portal area dan vena sentralis dengan portal area.

$S_4$  : Di samping perubahan  $S_3$  , ada bentukan "Pseudo lobulus" oleh penambahan jaringan ikat kolagen dan akhir dari stage / tingkatan ini adalah sirosis.

Setiap 1 sampel, pengamatan dilakukan pada 3 lapang pandang. Data yang diperoleh merupakan rata-rata dari ketiga lapang pandang. Berdasarkan stage di atas, maka data yang di peroleh diberikan skor seperti di bawah ini:

$S_0$  di berikan skor 0

$S_1$  di berikan skor 1

$S_2$  di berikan skor 2

$S_3$  di berikan skor 3

$S_4$  di berikan skor 4

#### 4.4 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini, bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Vitamin A sintetis (*all trans retinol palmitat*), yang mana setiap 1 mg mengandung 500.000 IU, dibuat emulsi minyak dalam air, dengan menggunakan emulgator derivat sarbiton.
2. Ether sebagai bahan untuk membius mencit pada saat akan dilakukan pembedahan
3. Bahan untuk pengolahan dan pengecatan preparat histologik hepar terdiri dari larutan Zenker's untuk menyimpan organ yang akan difiksasi; alkohol 80%, alkohol 95% dan alkohol absolut untuk proses dehidrasi; parafin untuk proses infiltrasi; *acid fuchsin* untuk tahap pengecatan; alkohol 95% untuk tahap diferensiasi; sodium thiosulfate 5% untuk penjernihan; balsam atau *permount* untuk tahap *mounting*. Beberapa bahan ini juga diperlukan dalam pengecatan jaringan adalah *phosphotungstic acid*, *xylene*, dan lugol, juga di butuhkan air leding, air mengalir dan air suling.

#### 4.5 Alat Penelitian

Pada penelitian ini digunakan peralatan seperti berikut ini. Kandang individual dari bak plastik ukuran 23 cm x 17 cm x 9,5 cm sebagai tempat pemeliharaan mencit. Sistem kandang, yang paling penting diperhatikan adalah memenuhi persyaratan fisiologis meliputi; menjaga lingkungan tetap kering dan bersih, suhu yang memadai dan memberi ruang cukup untuk bergerak dengan bebas dalam berbagai posisi, harus di lengkapi makanan dan minuman yang mudah dicapai oleh hewan coba dan kandang tidak boleh diisi sampai berdesak-

desakan agar hewan dapat bergerak bebas (Smith BJ, 1988). Kawat kasa sebagai tutup kandang individual. Sonde lambung untuk pemberian vitamin A per oral, seperangkat peralatan bedah minor, papan seksi untuk memfiksasi mencit yang akan dibedah, stoples kecil dan tutupnya sebagai tempat penyimpanan organ. Seperangkat peralatan untuk pembuatan preparat histologik hepar, serta timbangan analitik dan mikroskop cahaya.

#### 4.6 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia pada Bagian Biokimia dan di Laboratorium Histologi pada Bagian Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### 4.7 Persyaratan Etik

Implikasi etik pada mencit sebagai hewan coba mengikuti *Animals Ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain; perawatan mencit dalam kandang, pemberian makanan dan minuman, aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.

#### 4.8 Prosedur Pengambilan Data

##### 4.8.1 Penentuan dosis

Berdasarkan LD50 yang sudah diketahui = 2570 Mg/Kg BB untuk mencit yang diberikan secara oral menurut (Kamm, 1982 cit Robert, 1994),

dengan demikian dapat dilakukan penentuan dosis teratogenik terhadap mencit (*mus musculus*) sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{LD50 Vitamin A} &= 2570 \text{ Mg / Kg BB} \\ &= 2,57 \text{ gr / Kg BB} \end{aligned}$$

karena dalam 1 gr Vitamin A mengandung 500.000 IU, maka :

$$\begin{aligned} &= 2,57 \text{ gr / kg BB} \times 500.000 \text{ IU} \\ &= 1.285.000 \text{ IU / kg BB} \\ &= 1.285 \text{ IU / gr berat badan (dosis letal)} \end{aligned}$$

Dalam penelitian ini ada 3 kelompok perlakuan yang diberi vitamin A dengan dosis berbeda, yaitu:

Kelompok K1 : 1/8 LD50 → 60,62 IU/gr BB.

Kelompok K2 : 1/6 LD50 → 214,16 IU/gr BB.

Kelompok K3 : 1/4 LD50 → 321,25 IU/gr BB.

Diketahui bahwa volume maksimal lambung mencit dengan berat badan 20-30gr adalah 1 ml (Kusumawati, 2003). Agar sediaan serbuk ini dapat diberikan secara oral pada hewan coba maka bentuk sediaan ini di buat dalam bentuk emulsi. Untuk pembuatan emulsi digunakan berat badan terbesar (30gr), dengan menggunakan dosis kelompok 1/4LD 50, maka didapatkan 9.637,5 IU/ml. Jadi atas dasar inilah dapat dihitung berapa besar kebutuhan Vitamin A (emulsi dalam ml) untuk setiap hewan coba pada setiap kelompok perlakuan. Sebagai contoh hewan coba kelompok K1 dengan BB 20gr, maka besar emulsi yang diperlukan adalah  $20 \times 60,62 \text{ IU} / 9.637,5 / \text{ml} = 1,26 \text{ ml}$ .

#### 4.8.2 Pemilihan hewan coba

Anak mencit jantan berumur 3-4 minggu, berat badannya ditimbang, kemudian mencit ini diberi nomor dengan mengecat bagian tubuh tertentu misalnya: daun telinga dan salah satu jari, kemudian dicatat tanggal pemberian vitamin A dan tanggal saat akan dikorbankan.

#### 4.8.3 Metode penelitian

Anak mencit jantan dibagi dalam 4 kelompok, diberi vitamin A (bentuk emulsi) selama 9 hari berturut-turut dengan dosis perhari 160,62 IU /gr BB (K1); 214,16 IU /gr BB (K2); 321,25 IU /gr BB (K3) & 0 IU atau di beri pelarut sebanyak 0,25cc (K0) sebagai kontrol. Satu hari setelah pemberian vitamin A terakhir, semua mencit dikorbankan dan dilakukan pembedahan. Pembedahan diawali dengan pembiusan menggunakan ether, kemudian hewan coba di terlentangkan di atas papan seksi dan mulai dilakukan pembedahan. Pembedahan secara laparatomi dengan menggunakan gunting kecil. Selanjutnya hepar dikeluarkan lalu ditimbang, kemudian difiksasi untuk pembuatan preparat histologis (Pengolahan jaringan dan pengecatan preparat histologik hepar tercantum pada lampiran1), kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 x10 atau 10 x 40 untuk melihat gambaran histologik hepar yaitu dengan melihat jaringan ikat kolagen dengan memberi skor (0-4).

#### 4.9 Analisis Data

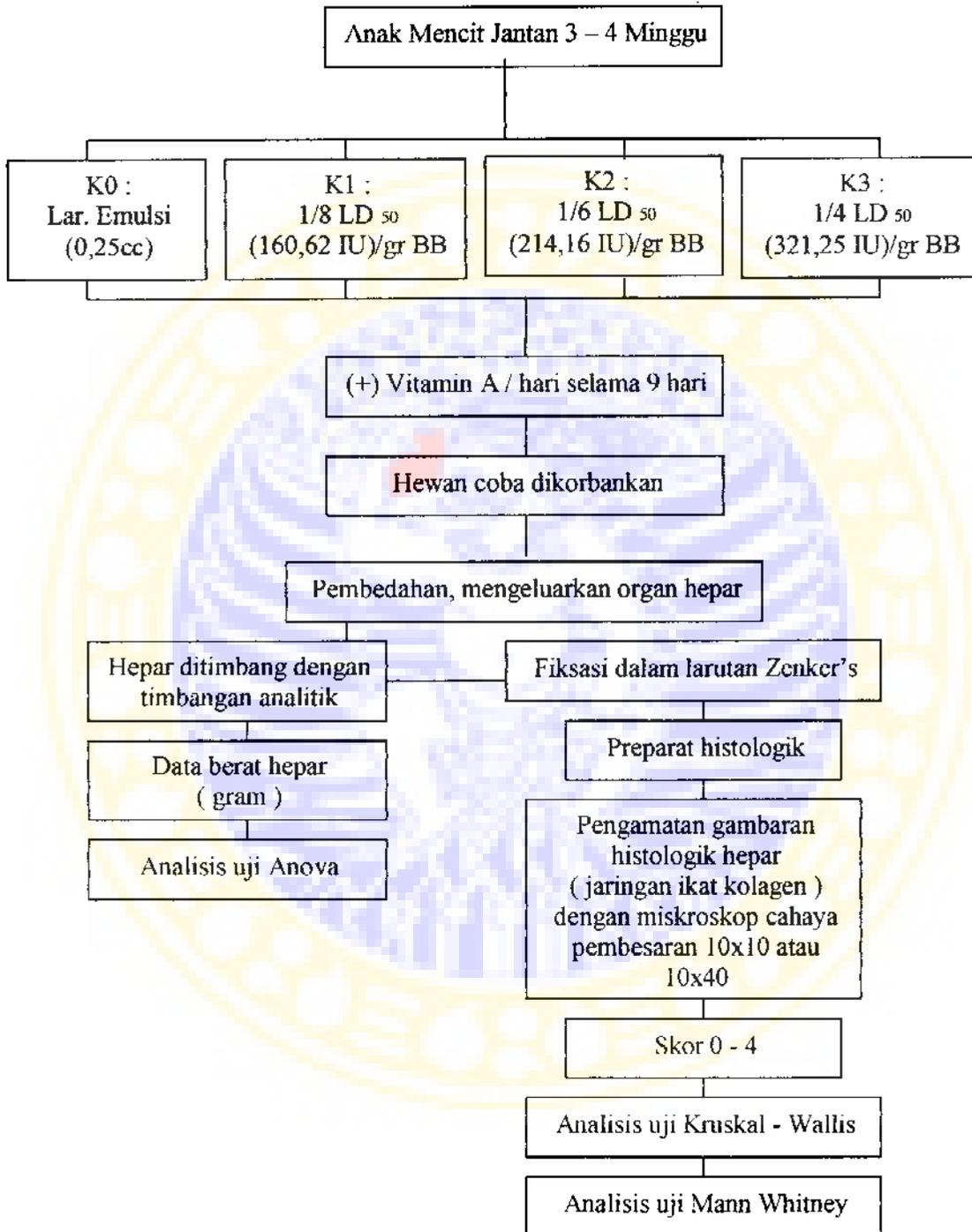
Hasil penimbangan berat hepar mencit (data berat hepar) dianalisis dengan menggunakan *analisis Varians* (Anova) satu jalur pada taraf signifikansi 0,05 (Steel dan Torrie, 1991 dan Sastrosocpadi, 1995).

Data gambaran histologik hepar dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan bila perlakuan memberikan perbedaan nyata maka akan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* (Daniel, 1989).



#### 4.10 Kerangka Operasional

Secara singkat metode penelitian ini dapat di gambarkan dalam bentuk kerangka operasional.



## BAB 5

### ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN

Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa berat hepar hewan coba yang dinyatakan dalam (gr) pada lampiran 2 dan gambaran histologik hepar yaitu dengan melihat jaringan ikat kolagen untuk menentukan tingkat fibrosis hepar dengan memberi skor (0-4), selengkapnya lihat lampiran 3.

Terhadap data berat hepar tersebut dilakukan uji Anova dengan terlebih dulu melakukan analisis deskriptif dan uji homogenitas varian; sedangkan terhadap gambaran histologik hepar (tingkat fibrosis) dilakukan uji *Kruskal-Wallis* kemudian di lanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Besarnya taraf signifikansi ditetapkan 5% dan seluruh data diolah dengan program SPSS 10.0.

#### 5.1 Data Penelitian Berat Hepar

Secara deskriptif setelah dilakukan penimbangan terhadap berat hepar untuk setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel berikut:

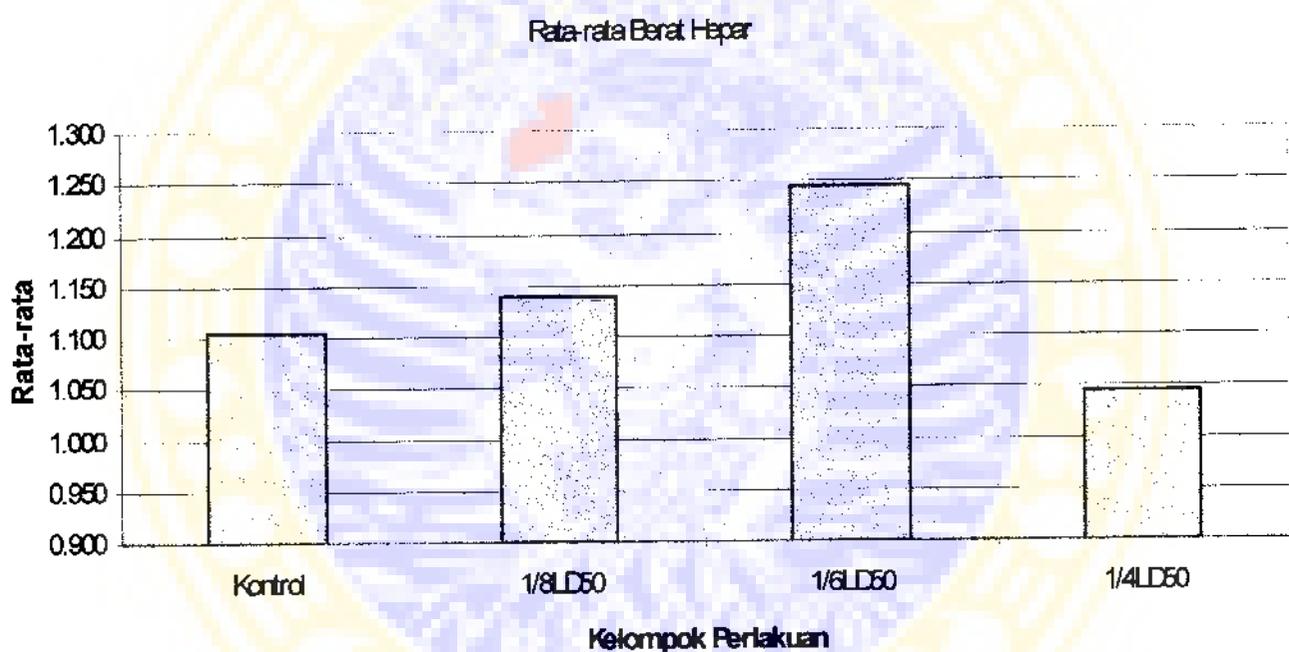
Tabel 5.1 Data deskriptif berat hepar

Kelompok	Ulangan	Rerata $\pm$ SD
0	10	1,10630 $\pm$ 0,24742
1	10	1,13950 $\pm$ 0,20930
2	10	1,24540 $\pm$ 0,29176
3	10	1,03160 $\pm$ 0,38078

**Keterangan:**

- 0 – Kelompok Kontrol
- 1 – Kelompok  $1/8 LD_{50}$
- 2 – Kelompok  $1/6 LD_{50}$
- 3 – Kelompok  $1/4 LD_{50}$
- SD – Standart Deviasi

Untuk lebih jelasnya rata-rata berat hepar pada tiap kelompok perlakuan dapat digambarkan dengan histogram, seperti di bawah ini:



Gambar 5.1 Histogram rata-rata berat hepar setelah pemberian vitamin A berlebihan

Dari histogram ini terlihat rata-rata berat hepar ada yang bertambah bila kelompok kontrol dibanding dengan kelompok perlakuan (K1,  $1/8 LD_{50}$  dan K2,  $1/6 LD_{50}$ ), tetapi pada kelompok perlakuan (K3,  $1/4 LD_{50}$ ) berkurang.

Data terhadap berat hepar yang telah diolah dengan program SPSS 10.0, selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4. Dari hasil pengolahan ini didapatkan:

#### 5.1.1 Analisis deskriptif

Dari lampiran 4, pada bagian *descriptives*, terlihat ringkasan statistik dari keempat kelompok sampel. Terlihat adanya perbedaan berat hepar antar masing-masing kelompok, ada yang bertambah (kelompok perlakuan K1, 1/8 LD<sub>50</sub> dan kelompok perlakuan K2, 1/6 LD<sub>50</sub>) dan ada yang berkurang (kelompok perlakuan K3, 1/4 LD<sub>50</sub>) di bandingkan dengan kelompok kontrol K0, tetapi perbedaan ini tidak cukup besar, sebagai contoh antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan K2 (1/8 LD<sub>50</sub>), rerata berat hepar adalah 0,03320 gr.

#### 5.1.2 Analisis uji homogenitas

Dari Lampiran 4, pada bagian *Test Homogeneity of Variances*, terlihat nilai probabilitas *Levene Statistic* adalah 0,191 > 0,05, berarti Ho diterima, ini berarti keempat kelompok perlakuan memiliki varian yang sama, seperti diperlihatkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.2 Uji homogenitas varian berat hepar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,669	3	36	0,191

#### 5.1.3 Analisis uji Anova

Dari lampiran 4, pada bagian ANOVA (*Analysis of Variance*) terlihat bahwa F hitung adalah 1,356 dengan probabilitas 0,272 > 0,05 berarti Ho

diterima, dengan demikian tidak ada perbedaan rata-rata kelompok perlakuan. Hasil ini dapat di perlihatkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.3 Hasil berat hepar dengan uji Anova

Berat Hepar	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	0,341	3	0,114	1.356	0,272
Within Groups	3,016	36	8,378E-02		

## 5.2 Data Penelitian Gambaran Histologik Hepar

Data gambaran histologik hepar dapat dilihat pada lampiran 3, sedangkan analisis data gambaran histologik hepar dengan menggunakan program SPSS 10.0 dan dapat dilihat pada lampiran 5.

### 5.2.1 Uji Kruskal-Wallis

Untuk menilai uji ini, maka perlu mengetahui *Mean Rank* dari setiap kelompok perlakuan, seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.4 *Mean rank* gambaran histologik hepar tiap kelompok perlakuan

Kelompok	Ulangan	<i>Mean Rank</i>
Kontrol	10	5,50
1/8LD50	10	16,10
1/6LD50	10	25,50
1/4LD50	10	34,90

Dari tabel di atas jelas terlihat ada perbedaan rata-rata gambaran histologik hepar yang cukup besar untuk setiap kelompok perlakuan dan setelah diolah dengan program SPSS 10.0 didapatkan  $p < 0,05$  berarti  $H_0$  ditolak berarti

ada perbedaan perlakuan, itu berarti gambaran histologik hepar pada setiap kelompok perlakuan signifikan atau bermakna (pada lampiran 5).

### 5.2.2 Uji Mann Whitney.

Hasil selengkapnya dari uji ini dapat dilihat pada lampiran 6. Secara ringkasnya dapat dilihat seperti tabel di bawah ini:

Tabel 5.5 Gambaran histologik hepar antar kelompok perlakuan

Kelompok	Ulangan	Mean Rank	Sig
Kontrol-1/8LD <sub>50</sub>	10-10	5,50-15,50	0,000
Kontrol-1/6LD <sub>50</sub>	10-10	5,50-15,50	0,000
Kontrol-1/4LD <sub>50</sub>	10-10	5,50-15,50	0,000
1/8LD <sub>50</sub> -1/6LD <sub>50</sub>	10-10	6,10-14,90	0,000
1/8LD <sub>50</sub> -1/4LD <sub>50</sub>	10-10	5,50-15,50	0,000
1/6LD <sub>50</sub> -1/4LD <sub>50</sub>	10-10	6,10-14,90	0,000

Dari tabel di atas terlihat ada perbedaan gambaran histologik hepar antar setiap kelompok perlakuan dengan kelompok perlakuan lainnya, dengan  $p < 0,05$  berarti  $H_0$  di tolak (signifikan atau bermakna).

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Vitamin A adalah golongan vitamin larut lemak yang pertama kali ditemukan, merupakan suatu kristal alkohol yang berwarna kuning yang peka terhadap cahaya dan oksigen (Almatzier, 2003). Dalam bahan makanan, vitamin A umumnya dalam bentuk ester dan sekitar 90-95% disimpan sebagai *retinil ester* dalam sel-sel Kupffer hepar (Pudjiadi, 2000) dan hanya 2% dari ini tersimpan dalam sel-sel stelate hepar (Combs, 1992). Vitamin A berperan utama dalam penglihatan dan juga berfungsi dalam diferensiasi sel-sel, pertumbuhan dan reproduksi (Linder, 1992). Namun bilamana penggunaannya secara tidak tepat (berlebihan) dapat menyebabkan terjadinya toksisitas baik itu secara akut maupun kronik (Dewoto, 2000).

Hepar sebagai organ penyimpanan terbesar vitamin A, oleh Blomhoff dkk (1991) mendapatkan, pada hepar hewan yang mati oleh vitamin A berlebihan ada perubahan secara makroskopis dan mikroskopis. Nieman dan Obbink (1954) melaporkan, terjadi hepatomegali dan perlemakan hepar pada tikus. Demikian pula oleh Kamm (1982) mendapatkan; adanya peningkatan berat hepar, nampak pucat dan bercoreng-coreng pada tikus (Combs, 1992).

Penyimpanan vitamin dalam sel-sel stelate hepar, dan transportasi vitamin A dari hepatosit melalui RBP (Retinol Binding Protein) ke dalam stelate sel telah dilaporkan oleh Blomhoff (1987); sementara oleh Senoo dan Wake (1984), telah meneliti secara *invitro* ada keterkaitan antara sel-sel stelate dalam proses fibrosis; demikian pula, Weiner dkk melaporkan, bahwa sel-sel stelate

dapat memproduksi kolagen tipe I, III, IV dan beberapa percobaan secara *in vivo*, antara lain: induksi fibrosis pada tikus oleh Kent (1976) dan sirosis alkoholik oleh Mark 1985, menunjukkan adanya transformasi sel-sel stelate yang mengandung vitamin A tersebut menjadi sel miofibroblas yang mempunyai ciri-ciri antara sel fibroblas dan sel otot polos yang diduga menghasilkan serabut kolagen (Wahyuni, 1991). Dooley dan Sherlock, mengatakan sel-sel stelate sebagai sel utama yang terlibat dalam fibrogenesis. Menurut Rizetto, 1999 sel-sel stelate memberikan peran utama dalam memproduksi komponen jaringan penyambung pada hepar normal dan juga selama fibrosis dan sirosis. Tetapi Vitamin A dapat bekerja sebagai penghambat fibrogenesis bersama dengan Vitamin E pada hepar menciit yang telah diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) (Kusman, 1991).

Sintesis kolagen telah dipelajari terutama pada fibroblas, tetapi prosesnya mungkin sama pada jenis sel lain yang juga dapat menghasilkan kolagen. Mula-mula rantai alfa polipeptida (lebih panjang daripada rantai alfa dari kolagen yang matang/*mature*) dirakit pada gabungan poliribosim dari retikulum endoplasma, kemudian dipindahkan ke dalam sisterna. Sebelum rantai alfa polipeptida rampung dalam sisterna, terjadi hidroksilasi dari prolin dan lisin. Hal ini penting untuk pilinan tiga dan untuk stabilisasi dari mata rantai silang di antara rantai-rantai berikutnya (*the future cross links*). Rakitan prokolagen mungkin di mulai dalam sisterna dan molekul prokolagen kemudian dipindahkan ke dalam kompleks Golgi kemudian ke vakuol sekresi, lalu menyatu dengan membran plasma untuk melepaskan molekul prekursor. Di luar sel suatu protease khusus, yaitu prokolagen peptidase, memutuskan kelebihan panjang peptide untuk membentuk tropokolagen dari prokolagen. Molekul-molekul tropokolagen

kemudian bergabung dengan cara tertentu membentuk satuan serat kolagen (Paparo, 2000).

Pada penelitian ini difokuskan pada pengaruh pemberian vitamin A secara berlebihan terhadap berat hepar dan gambaran histologik hepar dalam hal ini jaringan ikat kolagen untuk menilai tingkat fibrosis pada anak mencit jantan dengan lama pemberian 9 hari dan di berikan secara oral dalam bentuk emulsi. Pengamatan dilakukan satu hari dari waktu pemberian terakhir dengan tujuan vitamin A telah terabsorpsi dengan sempurna, yaitu dengan menimbang organ hepar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan menggunakan timbangan analitik, hasil penimbangan ini pada lampiran 2. Sementara pengamatan terhadap gambaran histologik hepar dibuat preparat permanen jaringan hepar dengan menggunakan pewarnaan MA (*Mallory-Azan*). Hasil pengamatan terhadap gambaran histologik hepar pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada lampiran 3

### **6.1 Pemberian Vitamin A Berlebihan terhadap Berat Hepar**

Hasil penelitian ini dengan pemberian vitamin A secara berlebihan terhadap berat hepar, secara deskriptif menunjukkan pertambahan berat hepar pada kelompok perlakuan K1 (kelompok dosis  $1/81LD_{50}$ ) demikian pula kelompok perlakuan K2 (kelompok dosis  $1/6LD_{50}$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, K0 (kelompok dosis 0 IU/ 0,25cc/hari), sementara antara kelompok kontrol K0 dengan kelompok perlakuan K3 (kelompok dosis  $1/4LD_{50}$ ) ada penurunan berat hepar secara deskriptif (lihat tabel 5.1). Setelah dilakukan uji Anova pertambahan ini tidak signifikan ( $p>0,05$ ) pada tabel 5.3, meskipun dengan

uji Homogenitas diketahui bahwa keempat kelompok sampel mempunyai varian yang sama (tabel 5.2), dan ini salah satu asumsi untuk melakukan uji Anova (Santoso S, 2004). Uji Anova sendiri di maksudkan untuk menguji apakah keempat kelompok sampel mempunyai rata-rata (mean) yang sama. Dan hasil dari uji Anova ini ternyata tidak signifikan, selengkapnya pada lampiran 4.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini tidak seperti yang kemukakan pada penelitian sebelumnya bahwa pemberian vitamin A dapat meningkatkan berat hepar. Hal ini mungkin dapat di sebabkan oleh faktor dosis yang tidak sesuai dan lamanya waktu pemberian. Diduga dosis yang sangat besar dengan waktu pemberian yang terlalu lama menyebabkan sel-sel stelate yang mensintesis kolagen sangat banyak, sehingga terjadi pembentukan jaringan parut kolagen sangat cepat pula. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut misalnya dengan variasi waktu yang berbeda tetapi dengan dosis yang sama atau dengan variasi dosis dan waktu yang berbeda.

Terjadinya peningkatan berat hepar pada pemberian vitamin A berlebihan dapat terjadi oleh karena sel-sel stelate sebagai sel yang menyimpan vitamin A menjadi hiperplasia oleh karena sintesis kolagen yang meningkat dari sel-sel stelate akibat stimulasi dari TGF- $\beta$ 1, IL1 $\beta$ , TNF, produk dari peroksidase lipid dan asetaldehid (Dooley dan Sherlock, 2002) dan aktifitasnya dapat semakin meningkat dengan terjadinya proliferasi dari sel-sel stelate (Rizetto, 1999). Proliferasi dari sel-sel stelate di stimulasi oleh kerja dari PDGF, ET-1, trombin, dan IGF, sehingga sel-sel stelate menjadi padat dan banyak. Jadi pada tahap inilah terjadi pertambahan berat hepar, seperti terlihat pada kelompok perlakuan 1/8LD<sub>50</sub> dan 1/6LD<sub>50</sub> ada peningkatan secara deskriptif, namun tidak signifikan

secara statistik; sementara pada kelompok perlakuan  $1/4LD_{50}$  tidak terjadi peningkatan berat hepar, tetapi sebaliknya terjadi penurunan berat hepar. Mungkin saja pada kelompok perlakuan  $1/4LD_{50}$  telah memasuki tahap sirosis yaitu suatu keadaan dimana terjadi fibrosis yang ireversibel, terbentuk nodul-nodul akibat regenerasi dari hepatosit, terjadi kerusakan susunan parenkim seluruh hepar dan akhirnya hepar menjadi atrofi (Robbins, 1996).

## 6.2 Pemberian Vitamin A Berlebihan terhadap Gambaran Histologi Hepar

Hepar mudah mengalami trauma, termasuk oleh pemberian vitamin A secara berlebihan (toksik) dan berespons terhadap trauma dalam bentuk nekrosis, degenerasi, inflamasi, regenerasi, dan fibrosis (Robbins, 1996). Namun dalam penelitian ini dibatasi pada pengamatan gambaran histologi hepar dengan melihat jaringan ikat kolagen untuk menilai tingkat fibrosisnya (skor 0-4).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa pemberian vitamin A berlebihan selama 9 hari berturut-turut dengan menggunakan dosis  $1/8LD_{50}$ ,  $1/6LD_{50}$ ,  $1/4LD_{50}$  terlihat rata-rata ada perubahan gambaran histologi hepar (jaringan ikat kolagen) dengan untuk menentukan tingkat fibrosis dibandingkan dengan kontrol (tabel 5.4), yang setelah di uji dengan uji Kruskal- Wallis didapatkan dengan signifikan  $p < 0,05$ , lebih lengkapnya pada lampiran 5 yang dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan maksud apakah ada perbedaan antar kelompok perlakuan baik dengan kontrol maupun dengan sesama kelompok perlakuan (Santoso S, 2003). Secara ringkas dapat di lihat pada (tabel 5.5) dan dari uji ini ternyata ada perbedaan yang signifikan untuk setiap kelompok yang diperbandingkan, dengan  $p < 0,05$ , selengkapnya lihat lampiran 6.

Seperti telah dijelaskan di atas bahwa saat terjadi trauma hepar, matriks ekstraseluler yang terdiri dari tipe interstisial densitas tinggi, antara lain meliputi fibrous bentuk kolagen tipe I dan III dapat meningkat 3-8 kali lipat, yang mana peningkatannya akibat stimulasi dari sel-sel stelate. Dan diketahui pula sel-sel stelate sebagai sel penyimpan vitamin A pada keadaan hipervitaminosis A, sel-sel ini dapat menjadi hiperplasia dan proliferasi maka dengan demikian produksi fibrous matriks juga semakin meningkat, sehingga terjadi ketidakseimbangan antara sintesis dan degradasi matriks yang berperan dalam fibrogenesis hepar (Dooley dan Sherlock, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan derajat fibrosis, dimana pada kelompok perlakuan  $1/8LD_{50}$  terlihat didominasi oleh  $S_1$  (skor 1), kelompok perlakuan  $1/6LD_{50}$  antara  $S_2$  dan  $S_3$  (skor 2 dan 3) hampir seimbang, sementara pada kelompok perlakuan  $1/4LD_{50}$  didominasi oleh  $S_4$  (skor 4) (lampiran 3), dan setelah dilakukan peringkat oleh uji Kruskal-Wallis maka hasil mean ranknya terlihat adanya rata-rata derajat fibrosis setiap kelompok perlakuan seperti (tabel 5.2.1).

Produksi jaringan ikat kolagen yang berlangsung terus menerus dan sangat banyak poleh karena aktivitas dari sel-sel stelate, seperti dijelaskan di atas sehingga terjadi ketidakseimbangan antara sintesis kolagen dan degradasi matriks, yang pada akhirnya terjadi suatu keadaan yang disebut fibrosis yaitu suatu respon yang dapat reversibel. Tetapi bilamana keadaan fibrosis ini berlanjut (terjadi trauma terus menerus, dalam hal ini oleh vitamin A berlebihan), dimana jumlah jaringan fibrous berkembang sangat hebat yang pada akhirnya berkontraksi di sekitar pembuluh darah dan akibatnya dapat menghambat darah portal melalui

hepar, sehingga terjadilah apa yang di sebut sirosis (Guyton, 1997). Sirosis, merupakan suatu keadaan yang ireversibel (Robbins, 1996). Dalam penelitian ini dapat dilihat pada kelompok perlakuan 1/4LD<sub>50</sub> (lihat lampiran 3).

Pada lampiran 7 (dokumentasi penelitian) pada gambar 3-10 terlihat gambaran sediaan hepar nampak warna jaringan ikat kolagen tidak begitu jelas, dimana seharusnya jaringan ikat kolagen berwarna biru dan inti sel hepatosit berwarna ungu dengan pewarnaan MA. Hal ini dimungkinkan zat warna (*Mallory*) tidak menyerap sempurna oleh karena waktu yang digunakan saat pewarnaan sangat singkat. Terlihat juga, sediaan berwarna kekuningan, ini disebabkan oleh *potassium dichromate* (salah satu unsur fiksasi larutan Zenker's) dan untuk menghilangkan warna kekuningan ini, seharusnya jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1,5-24jam (Liben,1992). Beberapa artifak juga terlihat, ini dapat disebabkan oleh macam-macam zat kimia bahan tehnik histologi yang digunakan menyebabkan terjadinya penyusutan jaringan, tetapi dapat juga disebabkan oleh pemotongan yang mengakibatkan lipatan atau kerutan jaringan serta dapat juga disebabkan oleh karena mata pisau yang tidak sempurna (Paparo, 2000).

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisis data yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan:

1. Pemberian Vitamin A berlebihan dengan dosis  $1/8LD_{50}$ ,  $1/6LD_{50}$ ,  $1/4LD_{50}$  pada anak mencit jantan selama 9 hari berturut-turut secara oral terhadap berat hepar, ternyata pada kelompok perlakuan  $1/8LD_{50}$  dan  $1/6LD_{50}$  terjadi peningkatan tetapi tidak signifikan, sementara kelompok perlakuan  $1/4LD_{50}$  terjadi penurunan, dengan ( $p>0,05$ ).
2. Pemberian Vitamin A berlebihan dengan dosis  $1/8LD_{50}$ ,  $1/6LD_{50}$ ,  $1/4LD_{50}$  pada anak mencit jantan selama 9 hari berturut-turut secara oral terhadap gambaran histologik hepar, ternyata ada perubahan gambaran histologik hepar yaitu bertambahnya jaringan ikat kolagen dengan menilai tingkat fibrosis (0-4) dan pertambahan ini signifikan dengan ( $p<0,05$ ).

#### 7.2 Saran

Untuk memperluas khasanah penelitian vitamin A berlebihan maka disarankan untuk melakukan penelitian- penelitian seperti.

1. Pengaruh vitamin A berlebihan terhadap berat hepar dengan dosis yang lebih variatif.
2. Pengaruh vitamin A berlebihan terhadap berat hepar dengan lama perlakuan yang variatif.

3. Pengaruh vitamin A berlebihan terhadap korelasi antara berat hepar dengan gambaran histologik hepar.
4. Pengaruh vitamin A berlebihan terhadap kadar SGOT dan SGPT serta korelasinya terhadap gambaran histologik hepar.
5. Pengaruh vitamin A berlebihan terhadap stuktur hepar lainnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Almatzier, Sunita, 2003. Vitamin dan Vitamin Larut Lemak. Dalam Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Edisi 3, Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama, hlm 158-167.
- Andrijono, Kukung Kurnia, Nur Asikin, 1997. A Case-control study of Vitamin A level in Hydatidiform Mole. Medical Journal Indonesia, Volume 6 No.3: 153 – 157.
- Bloom and Fawcett, 2002. Hati dan Kandung empedu. Dalam Buku Ajar Histologi. Edisi 12, Jakarta: EGC, hlm 583-613.
- Combs GF, 1992. Vitamin A. In The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. San Diego, New York : Academic Press, Inc. pp 123-135.
- Daniel WY, 1989. Statistik Nonparametrik Terapan. Terjemahan, Alex Tri Kantjoro W. PT Gramedia: Jakarta.
- Dewoto HR, BPS Wardini, 2003. Vitamin dan mineral. Dalam Farmakologi dan Terapi, Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru, Hlm 724-727.
- Di Palma Joseph R, 1971. The Vitamins and Other Nutritional Factors. In Drill's Pharmacology in Medicine, 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw – Hill Book Company, pp 1296.
- Dooley J and Sherlock S, 2002. Disease of The Liver and Biliary System. 8<sup>th</sup> ed, Kondon: Blackwell Publishing, pp 365-367.
- Dorland, 2002. Kamus Kedokteran Dorland. Edisi 29. Jakarta. PT Gramedia.
- Duggan C, Colin AA, Agil A, Higgins L, Rifai N, 1996. Vitamin A status in Acute Exacerbations of Cytic Fibrosis. American Jurnal Clinic Nutrition, Vol 64: 635 – 639.
- Fawzi W, Harrera MG, Willett WC, Nestel P, El Amin A, Lipsitz S, Mohammed KA, 1994. Dietary Vitamin A Intake and the risk of Mortality among Children. American Journal Clinical Nutrition, vol 59: hlm 401-408.
- Friedman, Scott L, 1999. Hepatic Fibrosis in Diases of The Liver, Vol 1, 8<sup>th</sup> ed, Philadelphia: Lippincott William dan Wilkins, pp 371-388.
- Gardner J, 1982. What You Should Know About Vitamin. In Eat Better, Live Better. New York: Printed in The United States of America, pp 32-3.
- Geneser F, 1994. Buku Text Histologi. Terjemahan F. Arifin Gunawijaya. Jakarta: Binarupa Aksara, Hlm 157-173.

- Gridley MF, 1960. *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. Amerika, pp 60.
- Guyton, 1997. *Fisiologi Gastrointestinal dalam Fisiologi Kedokteran*, Edisi 9 Jakarta: EGC, halaman 1104.
- Hafez E, 1970. *Reproduction and Breeding Techniques For Laboratory Animal*. Philadelphia. pp 305-311.
- Harper HA, 1993. *Review of Physiological Chemistry*. Edisi 4<sup>th</sup>. Asian: Ed Lang Medical Publication Maruzen. pp 375-385.
- Harris RS, Karmas E, 1989. *Evaluasi Gizi Pada Pengolahan Pangan Edisi 2*. Bandung: ITB, hlm 7.
- Jacoby RO, Fox FG, 1984. *Biology and Disease of Mice*. In (Fox Gohen BJ, Loew FM, eds). *Laboratory Animal Medicine*. San Diego, California : Academic Press Inc, pp 36-44.
- Junqueira C, Carneiro J, Kelly RO, 1998. *Histologi Dasar*. Terjemahan Jan Tamboyang. Jakarta: EGC, Hlm 317-335.
- Kiptiyah, 2002. *Efek Teratogenik Vitamin A Pada Mencit (*Mus musculus*) betina*. Tesis. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusumawati D, 2003. *Biologi Hewan Coba*. Dalam Bahan Ajar tentang Hewan Coba, Universitas Airlangga. Surabaya, hlm 5-7.
- Adriano L, 2003. *What is Liver Fibrosis and How is it Different From Shirrhosis*. hbv\_research\_list. Owners @mail\_list.com
- Liben P, 1992. *Pengertian Teknik Laboratorium*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 36-41.
- Linder MC, 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis*. Terjemahan: A. Parakkasi, cetakan I. Jakarta: Universitas Indonesia Press, hlm 181-191.
- Loomis TA, 1978. *Toksikologi dasar*. Ed. 3 Semarang: IKIP Semarang, hlm 243-248.
- Mac Sween RNM, 1993. *Nutritional Disorders*. In Muir's textbook of Pathology, 13<sup>th</sup> edition. London: Edward Arnold, pp 354.
- Mahan LK, Escott-Stump S, 1996. *Food, Nutrition dan Diet Therapy*. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: W.B. Sauders Company, pp 78.

- Mahoney CP. 1990. Vitamins A and D and their Analogues. In (Lester M, James F Haddad) 3<sup>th</sup> edition. *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. New York: W.B Saunders Company. pp 1441.
- Mallory F.B. 1942. *Pathological Technique*. W.B. saunders CO, Philadelphia. pp 153
- Marcus R and Coulstan AM. 1996. Fat-Soluble Vitamins. In (Goldman and Gilman's, eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> edition pp 1557
- Mayor PA. 2000. Structure and Function of the Lipid - Soluble Vitamin. In. *Harper's Biochemistry*, 25<sup>th</sup> edition. Toronto, USA: Pleton dan Lange. pp 642-652.
- Mc Dowell LR. 1989. Vitamins In Animal Nutrition Comperative Aspects to Human Nutrition. San Diego, California: Academic Press, Inc., pp 53-54.
- Mc Laren DS, Thurnham DL. 1991. Vitamin Deficiency and Toxicity. In McLaren DS, Burman D, Beiton NR, Williams AF, eds). *Textbook of Paediatric Nutrition*, 3<sup>th</sup> edition. London: Churchill Livingstone. pp 396-397
- Mertey JE, Melmed S, Read A, Kasson BG, Levin SR, Perkary E, and Hersman JM. 1994. Effect of Vitamin A on the Hypothalomo-Pituitary-Thyroid axis. *American Journal of Physiologi cell Physiology* Vol 35, No: 5-6: E174 - E179
- Mustahler Ernst. 1991. Vitamin. Dalam *Dinamika Obat, Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi*, edisi 5. Bandung: ITB, hlm 596-597.
- Purpara Leeson Leeson. 1990. Histologi Saluran Cerna. Dalam *Buku Ajar Histologi* Terjemahan: Ian Tambajong, Sugito Wonodirekso. edisi 5 Jakarta. Penerbit buku Kedokteran EGC, Hlm 383-396.
- Praukya AW. 2001. Rancangan Penelitian Experimental Pola Umum Dalam *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*, Edisi 1 cerakan ke 4 Jakarta: PT. Raja Grafindo Persana, hlm 129-130.
- Prijanti, Soehni. 2000. *Vitamin Dalam Ilmu Gizi Anak*, Edisi 4. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, hlm 157-159
- Tizero Mario 1999. Drug Induced Liver Injury. In (Johannes Bircher, Jea, PB, Neil M, Mario R, Juan R). 2<sup>th</sup> edition. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* Oxford, New York: Oxford University Press, pp 1301.
- Verrens CK. 1996. *Dasar Patologi Penyakit*. Edisi 5. ECG: Jakarta. hlm 9-11. p 10-512

- Robert BA, 1994. Toxicology of Retinoids. In (Goodman Dewitt's), 2<sup>th</sup> edition. The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. New York Raven Press, pp 545-572.
- Sage - PB, Le Bail B, Balabaud C, 1999. Liver and Biliary - Tractus Histology. In (Johannes B, Jean-PB, Neil M, Mario R, Juan R, eds), 2<sup>th</sup> edition. Oxford, Textbook of Clinical Hepatology. Oxford, New York: Oxford University Press, pp 16-18.
- Santoso S, 2003. Statistik Non Parametrik. Edisi 2. Jakarta: PT Gramedia, Hal. 172-179, 118-126.
- Santoso S, 2004. Statistika Parametrik. Edisi 4. Jakarta: PT Gramedia, Hal.108-125.
- Sastrosoepadi A, 1995. Rancangan Percobaan Praktis untuk Bidang Pertanian. Yogyakarta: Kanisus, Hlm 19, 38, 51, dan 193-199.
- Scheffler WC, 1999. Statistika Untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu yang bertautan. Edisi 2. Bandung, ITB. Hlm 170-182.
- Shaken AV, West Jr KP, Gittelsohn J, Katz J, and Pradhan R, 1996. Chronic Low intakes of Vitamin A - rich foods in households with xerophthalmic children: a case - control study in Nepal. American Journal Clinical Nutrition, vol 64: 242 - 248.
- Smith BJ, Mangkoewidjojo S, 1988. Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Coba di Daerah Tropis. Universitas Indonesia Press, Jakarta. hlm 14.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1967. Statistical Methods. 6<sup>th</sup> ed. The Low a State. University Press - USA, pp 113.
- Soeradji BY, 1982. Pengaruh Pemberian Vitamin A secara berlebihan Dalam Menimbulkan Palatoshisis pada janin mencit. Tesis. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Stell RGD, Torrie Jlt, 1991, Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Bentuk Pendekatan Biometrik. Terjemahan: B. Sumantri. Edisi 2. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Sudiana. Tehnik Praktis untuk Jaringan Sel. CV. Dharma Shandi: Bali, Indonesia, pp 7-19.
- Tanner MS, Lama M, 1991. Nutrition and Liver Disease. In (McLaren D, Burma D, Belton NR, Williams AF, eds), 3<sup>th</sup> edition. Text book of Paediatric Nutrition. London: Churchill Livingstone, pp 186.

- Thompson M, 20 Juli 1993, 08:13:30 GMT. LD50's for Various Substances  
Marsthom @ qedbbs.com
- Tobing H dan Sinotang J, 1979. Kelenjar – kelenjar yang bertalian dengan Saluran pencernaan. Dalam *Essential of Histology*, edisi 8. Terjemahan Gunarso Wisnu, Jakarta: PT. Gelora Aksara Pratama, hlm 287 - 288.
- Wisse, Eddie, Braet F, Luo D, Vermijlen D, Eddouks M, Empsen C, Spapen H, and De Zanger RB, 1999. Sinusoidal Liver Cells. In (Johannes B, Jean, PB, Neil M, Mario R, Juan R, eds), 2<sup>th</sup> edition. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford, New York: Oxford University Press: pp 41.
- W. Kusman, A Christine, 1991. Pengaruh Pemberian Vitamin A yang diberikan bersamaan dengan Vitamin E sebagai Penghambat Fibrogenesis hepar, Konas VII PAAI.
- Yohana W, 1991. Pengaruh Vitamin A Berlebih terhadap Gambaran Histologis Jaringan Ginjal. Konas VII PAAI.
- Zainuddin M, 2000. Rancangan Penelitian Eksperimental. Dalam *Metodologi Penelitian*, Universitas Airlangga: Surabaya, hlm 53-54.

## Lampiran 1

### Pengolahan dan pengecatan Jaringan

#### Pengolahan Jaringan

Setelah di lakukan pembedahan, organ hepar dikeluarkan lalu di timbang, kemudian dilakukan pengolahan terhadap organ tersebut (Sudiana) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Fiksasi hepar dengan menggunakan larutan Zenker's selama 8-18 jam, pencucian dengan air mengalir selama 1,5-24 jam.
2. Dehidrasi, dilakukan dengan menggunakan alkohol yang bertahap, dengan kadar 80%, 95% dan alkohol absolut masing-masing selama 1 jam.
3. Embedding (Pengeblokan), parafin murni (cair) dimasukkan kedalam 2 logam berbentuk huruf L hingga penuh kemudian dimasukkan jaringan yang telah disiapkan.
4. Infiltrasi Parafin, memasukkan jaringan ke dalam parafin dengan temperatur parafin cair sekitar 5-10° C di atas titik cairnya, dengan memasukkan ke dalam oven dengan suhu kurang lebih 56° C
5. Sectiva (Penyayatan), dari 1 hepar diambil 1 potongan melintang, kira-kira 0,5 cm dengan ketebalan 4 - 6 mikron dengan menggunakan mikrotom.
6. Penempelan, jaringan diapungkan dalam water bath dengan temperatur 50 -55 °C lalu ditempelkan ke kaca obyek dan dimasukkan dalam oven agar jaringan lekat kuat pada kaca obyek tersebut

7. Staining (pewarnaan) dengan menggunakan pengecatan *Mallory Azan* (*Mallory's Aniline Blue*).

### Pengecatan Jaringan

Pengecatan jaringan diperlukan untuk membeda-bedakan struktur jaringan yang ada. Setiap macam cara pengecatan jaringan mempunyai kelebihan dan kekurangannya masing-masing (Liben, 1992).

Pada penelitian ini digunakan pengecatan *Mallory's Aniline Blue* (*Mallory Azan*), yang bertujuan untuk melihat serabut kolagen (Gridley, MF, 1960). Beberapa hal di bawah ini perlu di perhatikan sebelum melakukan prosedur pengecatan (Liben, 1992), yaitu:

Fiksasi : Dianjurkan dengan larutan Zenker's

Tehnik : Sayatan parafin 6 mikron

Larutan :

1. Larutan Acid Fuchin (Mallory A)

Acid Fuchsin.....0,5g

Airsuling..... 100,0ml

2. Larutan Aniline Blue- Orange G (Mallory B):

Aniline blue,larut dalam air 0,5g

Orange G 2,0g

Phosphotungstic acid 1,0g

Air suling 100,0ml

### Prosedur Pengecatan

Prosedur pengecatan ini berdasarkan (Gridley, MF, 1960; Mallory,

FB, 1942), adalah, sebagai berikut:

1. Sayatan di-deparafinisasi melalui 2 perubahan xyelen, alkohol absolut, alkohol 95% dan sampai air suling secara rutin.
2. Hilangkan endapan merkuri dengan menempatkannya dalam larutan lugol (larutan yodium dalam alkohol) selama 5-10 menit.
3. Cuci dengan air leding.
4. Bersihkan yodium dalam larutan sodium thiosulfate 5% (hypo) selama 5 menit.
5. Cuci dengan air mengalir selama 10-20 menit.
6. Cuci dengan air suling.
7. Cat sayatan dengan larutan acid fuchsin selama 1-5 menit. Pengecatan dengan larutan *acid fuchsin* dapat ditiadakan bila diinginkan serabut kolagen tampak lebih tajam.
8. Pindahkan langsung kedalam larutan analine blue- orange G selama 30-60 menit atau lebih.
9. Pindahkan langsung ke dalam alkohol 95% dengan beberapa penggantian.
10. Dehidrasikan dengan 2 perubahan alkohol absolut, bersihkan dengan 2-3 perubahan dan tutup dengan Permount atau balsam.

**Lampiran 2****Data berat hepar hewan coba**

BERAT HEPAR (gr)

No	Kontrol	1/8LD50	1/6LD50	1/4LD50
1	0.659	1.316	1.245	0.936
2	1.200	1.083	1.005	0.944
3	1.103	0.772	0.864	0.737
4	1.374	1.554	1.525	0.656
5	0.933	0.945	1.592	1.435
6	0.821	1.061	1.273	0.657
7	1.197	1.195	1.703	0.474
8	1.357	1.111	1.303	1.430
9	1.392	1.211	0.944	1.611
10	1.027	1.147	1.000	1.586

**Lampiran 3****Data gambaran histologis struktur hepar**

GAMBARAN HISTOLOGIS HEPAR (SKOR 0-4)

No	Kontrol	1/8LD50	1/6LD50	1/4LD50
1	0	1	2	4
2	0	2	2	4
3	0	2	2	4
4	0	1	2	4
5	0	1	3	3
6	0	1	3	4
7	0	1	3	4
8	0	1	3	3
9	0	2	3	4
10	0	1	3	4

## Lampiran 4

## Hasil uji Anova

## Descriptives

Berat Hepar (gr)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	10	1.10630	.24742	7.82E-02	.92931	1.28329	.659	1.392
1/8LD50	10	1.13950	.20930	6.62E-02	.98977	1.28923	.772	1.554
1/6LD50	10	1.24540	.29176	9.23E-02	1.03669	1.45411	.864	1.703
1/4LD50	10	.98680	.38078	.12041	.71421	1.25899	.474	1.586
Total	40	1.11945	.29339	4.64E-02	1.02562	1.21328	.474	1.703

## Test of Homogeneity of Variances

Berat Hepar (gr)

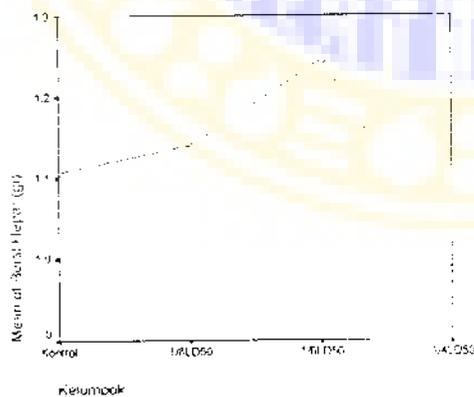
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.669	3	36	.191

## ANOVA

Berat Hepar (gr)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.341	3	.114	1.356	.272
Within Groups	3.016	36	8.378E-02		
Total	3.357	39			

## Means Plots



## Lampiran 5

## Hasil uji Kruskal- Wallis

## NPar Tests

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Gambaran Histologis Hepar	40	1.93	1.49	0	4
Kelompok	40	2.50	1.13	1	4

## Kruskal-Wallis Test

## Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
Gambaran Histologis Hepar	Kontrol	10	5.50
	1/8LD50	10	16.10
	1/6LD50	10	25.50
	1/4LD50	10	34.90
	Total	40	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Gambaran Histologis Hepar
Chi-Square	36.402
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

## Lampiran 6

## Hasil uji Mann Whitney

NPar Tests  
Mann-Whitney Test

## Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran	Kontrol	10	5.50	55.00
Histologis Hepar	1/8LD50	10	15.50	155.00
	Total	20		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.147
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Keiompok

NPar Tests  
Mann-Whitney Test

## Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran	Kontrol	10	5.50	55.00
Histologis Hepar	1/6LD50	10	15.50	155.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.119
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**NPar Tests****Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran Histologis Hepar	Kontrol	10	5.50	55.00
	1/4LD50	10	15.50	155.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.194
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**NPar Tests****Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran Histologis Hepar	1/8LD50	10	6.10	61.00
	1/6LD50	10	14.90	149.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	61.000
Z	-3.527
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

### NPar Tests Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran	1/8LD50	10	5.50	55.00
Histologis Hepar	1/4LD50	10	15.50	155.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.004
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gambaran	1/6LD50	10	6.10	61.00
Histologis Hepar	1/4LD50	10	14.90	149.00
	Total	20		

#### Test Statistics<sup>a</sup>

	Gambaran Histologis Hepar
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	61.000
Z	-3.574
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

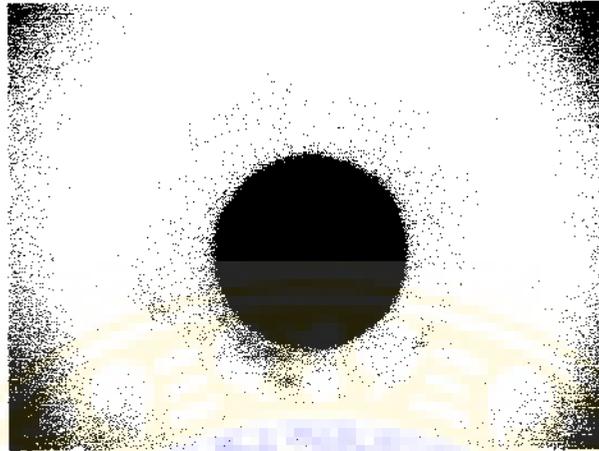
b. Grouping Variable: Kelompok

**Lampiran 7**

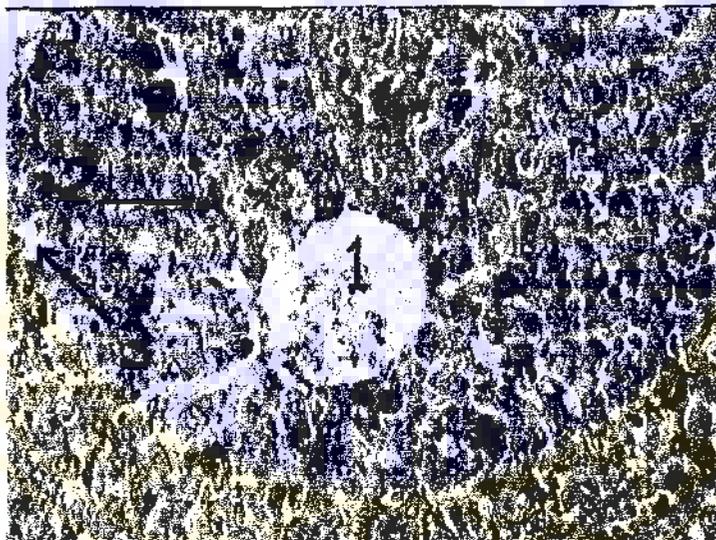
**Dokumentasi Penelitian**



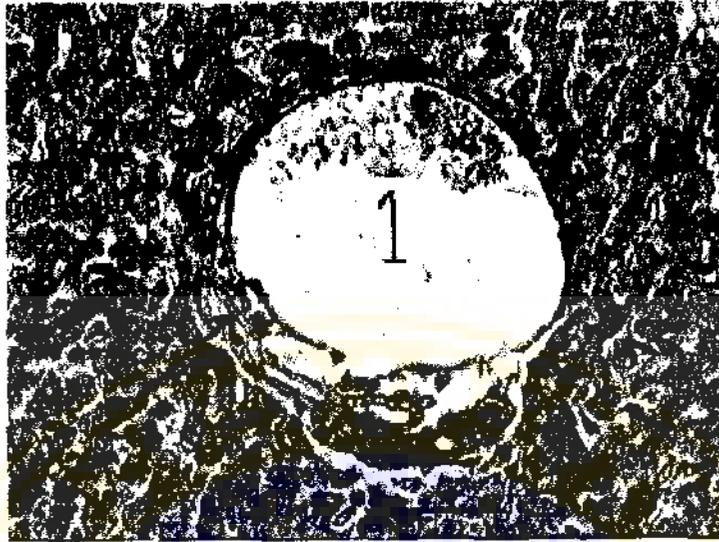
Gambar 1. Mencit



Gambar 2: Hepar mencit dalam fiksasi larutan Zenker's

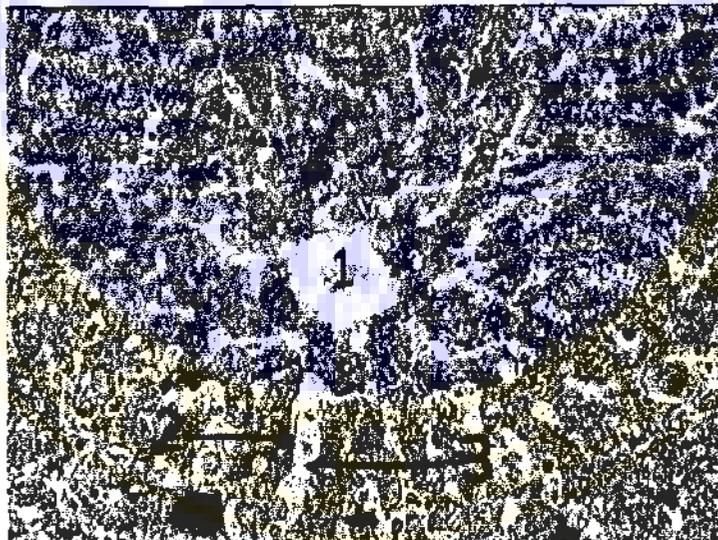


Gbr. 3 Sediaan hepar kelompok K0 (larutan sarbiton 0,25cc/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x  
Keterangan gambar: 1. Vena sentralis, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



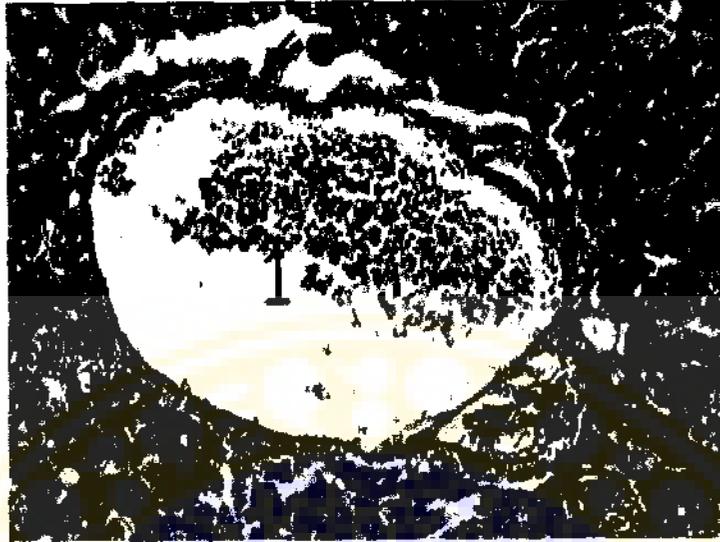
Gbr. 4 Sediaan hepar kelompok K0 (larutan sarbiton 0,25cc/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. Segitiga Kiernan, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



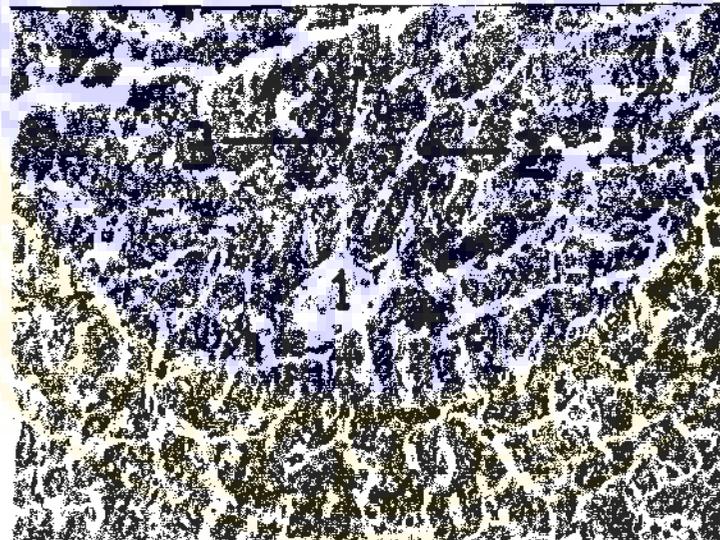
Gbr. 5 Sediaan hepar kelompok K1 (1/8LD<sub>50</sub>/gr BB/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. vena sentralis, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



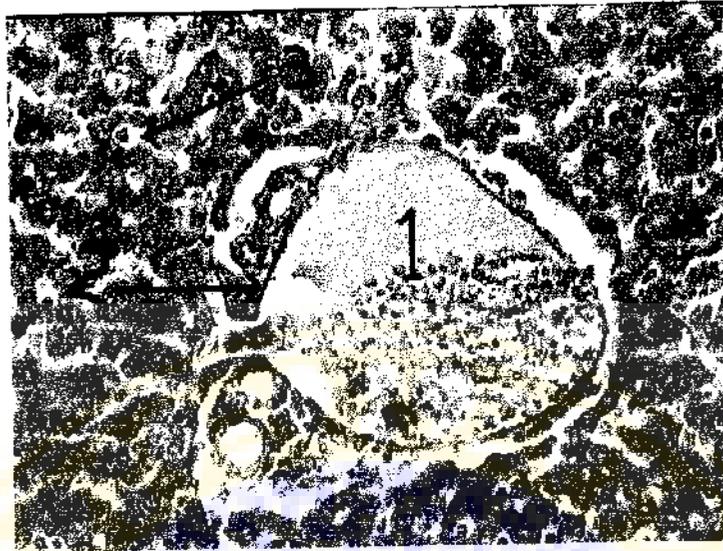
Gbr. 6 Sediaan hepar kelompok K1 ( $1/8LD_{50}/gr$  BB/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. Segitiga Kiernan, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



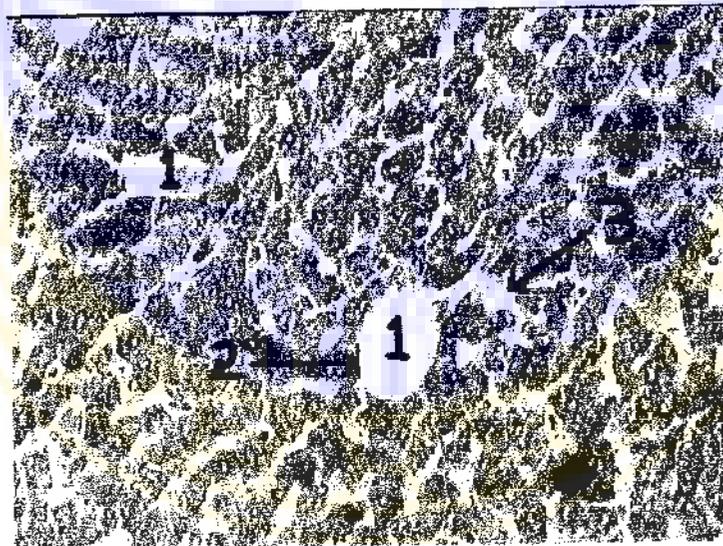
Gbr. 7 Sediaan hepar kelompok K2 ( $1/6LD_{50}/gr$  BB/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. vena sentrlis, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



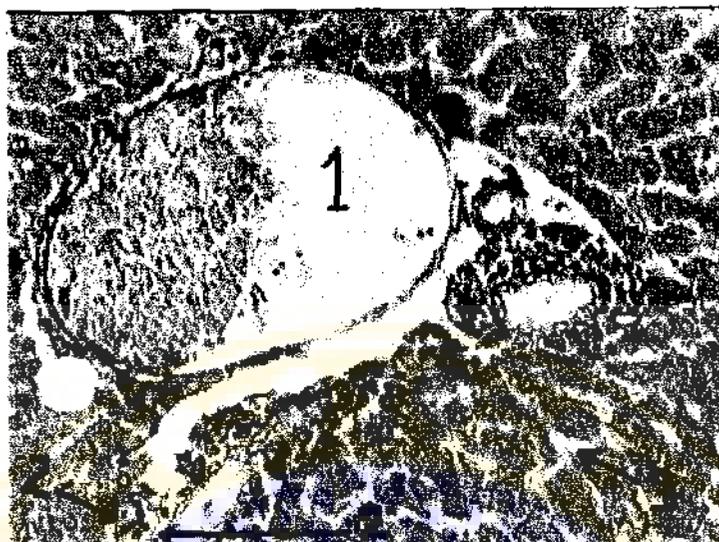
Gbr. 8 Sediaan hepar kelompok K2 (1/6LD<sub>50</sub>/gr BB/hr)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. Segitiga Kiernan, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



Gbr. 9 Sediaan hepar kelompok K3 (1/4LD<sub>50</sub>/gr BB/hari)  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x

Keterangan gambar: 1. vena sentrlis, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid



Gbr. 10 Sediaan hepar kelompok K3(1/4LD<sub>50</sub>/gr BB/hari)/  
Pewarnaan MA dengan pembesaran 200x  
Keterangan gambar: 1. Segitiga Kiernan, 2. jaringan ikat kolagen, 3. sinusoid