



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI POTENSI HEPATOPROTEKTIF SENYAWA DIMER
DARI ISOEUGENOL TERHADAP HISTOLOGI HATI
MENCIT (*MUS MUSCULUS*) JANTAN GALUR DDY**

SKRIPSI

**SRI DEWI KANIAWATI
0806453384**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI POTENSI HEPATOPROTEKTIF SENYAWA DIMER
DARI ISOEUGENOL TERHADAP HISTOLOGI HATI
MENCIT (*MUS MUSCULUS*) JANTAN GALUR DDY**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**SRI DEWI KANIAWATI
0806453384**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Sri Dewi Kaniawati

NPM : 0806453384

Tanda tangan : 

Tanggal : 19 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Sri Dewi Kaniawati
NPM : 0806453384
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Uji Potensi Hepatoprotektif Senyawa Dimer dari Isoeugenol Terhadap Histologi Hati Mencit (*Mus musculus*) Jantan Galur DDY.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Dadang Kusmana, M.Si. (.....)

Pembimbing II : Dra. Setiorini, M.Kes. (.....)

Penguji I : Dr. Abinawanto (.....)

Penguji II : Dr. Luthifiralda S., M.Biomed. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 19 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala anugrah, rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.Dadang Kusmana, M.Si. selaku pembimbing I dan Dra.Setiorini, M.Kes. selaku pembimbing II atas masukan, perhatian, kesabaran dan motivasi, serta sumbangan pikiran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Dr.Herry Cahyana atas konsultasi dan saran yang diberikan, serta penyediaan isoeugenol yang digunakan dalam penelitian.
3. Dr.Abinawanto dan Dr.Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed. selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Drs.Wisnu Wardhana, M.Si. selaku penasehat akademik atas perhatian dan dukungannya, Dr.Upi Chairunnisa atas motivasi dan saran yang diberikan.
5. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas bantuannya selama masa perkuliahan.
6. Bapak Arif yang sudah banyak membantu dan memberi masukan dalam proses pengerjaan prapenelitian hingga penelitian, Mba Asri atas bantuan peminjaman alat yang digunakan dalam proses penelitian, dan Bapak Surya, karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan saran yang diberikan selama penelitian.
7. Sembah sujud kepada kedua orang tuaku, atas doa, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat terselesaikan, juga kepada adikku Dhani Zul Adam atas dukungan semangat yang diberikan.

8. Rekan-rekan Biosentris, khususnya Winna dan Mita atas motivasi, saran, dan dukungan semangat yang telah diberikan. Terima kasih juga penulis sampaikan pada rekan-rekan kerja, Ka Nova dan Jill yang sudah banyak membantu penulis dalam proses jalannya penelitian dan diluar hal itu.
9. Rekan-rekan biologi dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu dan telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sri Dewi Kaniawati
NPM : 0806453384
Program Studi : S1 Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Uji Potensi Hepatoprotektif Senyawa Dimer dari Isoeugenol Terhadap Histologi Hati Mencit (*Mus musculus*) Jantan Galur DDY

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : 19 Juni 2012

Yang menyatakan



(Sri Dewi Kaniawati)

ABSTRAK

Nama : Sri Dewi Kaniawati
Program studi : Biologi
Judul : Uji Potensi Hepatoprotektif Senyawa Dimer dari Isoeugenol Terhadap Histologi Hati Mencit (*Mus musculus*) Jantan Galur DDY

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa dimer isoeugenol terhadap histologi hati mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY. Tiga puluh ekor mencit dibagi dalam 6 kelompok, terdiri atas kelompok kontrol normal, kelompok kontrol perlakuan, dan kelompok perlakuan yang diberikan senyawa dimer isoeugenol secara oral dengan dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb. Bahan uji diberikan setiap hari selama 7 hari berturut-turut. Kelompok kontrol perlakuan dan empat kelompok perlakuan diinduksi karbon tetraklorida pada waktu 2 jam setelah pemberian minyak zaitun atau senyawa dimer isoeugenol terakhir. Data persentase derajat kerusakan lobulus hati menunjukkan adanya perbedaan pada tiap kelompok perlakuan. Dosis 6 mg/kg bb diketahui dapat memberikan pengaruh hepatoprotektif terhadap histologi hati mencit. Hasil uji Anava 1-faktor menunjukkan tidak terdapat pengaruh pemberian dimer isoeugenol terhadap berat basah dan diameter vena sentralis hati mencit.

Kata kunci : dimer isoeugenol, hepatoprotektif, karbon tetraklorida (CCl₄), kerusakan hati.

xii + 79 halaman; 19 gambar; 10 lampiran; 4 tabel
Daftar Acuan : 60 (1953--2012)

ABSTRACT

Name : Sri Dewi Kaniawati
Study Programme : Biology
Title : Hepatoprotective Potency Study of Isoeugenol Dimer on
Liver Histology of DDY Strain Male Mice
(*Mus musculus*)

The aim of this study was to find hepatoprotective potency of isoeugenol dimer on liver histology of DDY strain male mice (*Mus musculus*). Thirty male mice were divided into 6 groups, consisting of normal control group, treatment control group, and four treatment groups. The treatment groups were administered with isoeugenol dimer orally at dose 2 mg/kg bw, 4 mg/kg bw, 6 mg/kg bw, and 8 mg/kg bw for 7 days in daily. Treatment control group and treatment groups were induced by carbon tetrachloride 2 hours after the last administration of olive oil or isoeugenol dimer. Data of the percentage damage degree of liver lobules showed that administration of isoeugenol dimer dose 6 mg/kg bw were given hepatoprotective effect on mice liver histology. Statistical analysis using 1-factor Anava showed that there were no hepatoprotective effect of isoeugenol dimer on gross weight and central vein diameters of mice liver.

Key words : isoeugenol dimer, hepatoprotective,
carbon tetrachloride (CCl₄), liver pathology.

xii + 79 pages; 10 appendices; 19 pictures; 4 tables
Bibliography : 60 (1953--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Isoeugenol.....	5
2.2 Sawi Hijau Sebagai Sumber Enzim Peroksidase.....	6
2.3 Dimer Isoeugenol.....	8
2.3.1 Karakteristik Umum.....	8
2.3.2 Reaksi Koping Oksidatif dari Isoeugenol.....	8
2.3.3 Sifat Biokimiawi Dimer Isoeugenol.....	9
2.3.3.1 Aktivitas Antioksidan dan Nilai IC ₅₀	9
2.3.3.2 Nilai LC ₅₀ dan Penentuan Toksisitas Dimer Isoeugenol.....	10
2.4 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	10
2.5 Hati.....	12
2.5.1 Fungsi Hati.....	12
2.5.2 Histologi Hati.....	13
2.5.2.1 Lobulus Hati.....	14
2.5.2.2 Sel Hati.....	15
2.5.2.3 Vena Sentralis.....	16
2.5.3 Patologi Hati.....	17
2.6 Karbon Tetraklorida.....	19
2 METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.2 Bahan.....	21
3.2.1 Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol.....	21
3.2.2 Hewan Uji.....	21
3.2.3 Makanan dan Minuman Mencit.....	22
3.2.4 Bahan Kimia yang Digunakan Selama Proses Pencekakan Hingga Pembuatan Preparat Histologi.....	23
3.3 Peralatan.....	
3.3.1 Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol.....	23
3.3.2 Pemeliharaan Mencit.....	23
3.3.3 Pemberian Senyawa Dimer Isoeugenol dan Injeksi Karbon Tetraklorida Secara Intraperitoneal.....	24

3.3.4	Pembedahan dan Pembuatan Sediaan Histologis Organ Hati...	24
3.3.5	Pengamatan Sediaan Histologis Organ Hati.....	24
3.4	Cara Kerja.....	25
3.4.1	Rancangan Penelitian.....	25
3.4.2	Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol.....	26
3.4.2.1	Isolasi Enzim Peroksidase.....	26
3.4.2.2	Isolasi Senyawa Hasil Reaksi Kopling Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim Peroksidase.....	27
3.4.3	Pemeliharaan Hewan Percobaan.....	29
3.4.4	Perlakuan Terhadap Mencit.....	29
3.4.5	Pembuatan Sediaan Histologis Organ Hati Dengan Metode Parafin.....	30
3.4.6	Parameter Penelitian serta Pengambilan Data.....	33
3.4.7	Analisis Data.....	34
3	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1	Hasil.....	35
4.1.1	Pengamatan Makroskopik Hati.....	35
4.1.2	Pengamatan Mikroskopik Hati.....	39
4.1.2.1	Pengamatan Kuantitatif Diameter Vena Sentralis.....	39
4.1.2.2	Pengamatan Semikuantitatif Persentase Derajat Kerusakan Hati.....	41
4.1.2.3	Pengamatan Gambaran Histologis Hati.....	44
4.2	Pembahasan.....	53
4.2.1	Pengamatan Makroskopik Hati.....	53
4.2.2	Pengamatan Mikroskopik Hati.....	55
4	KESIMPULAN DAN SARAN.....	63
5.1	Kesimpulan.....	63
5.2	Saran.....	63
	DAFTAR ACUAN.....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus Bangun Isoeugenol.....	5
Gambar 2.2	Sawi Hijau (<i>Brassica juncea</i>).....	7
Gambar 2.3.1	Rumus Bangun Dimer Isoeugenol (dehidrodiisoeugenol).....	8
Gambar 2.4	Mencit (<i>Mus musculus</i>) Jantan Galur DDY.....	11
Gambar 2.5.2	Gambaran Histologi Hati Normal.....	13
Gambar 2.5.2.1	Hubungan Antara Lobulus dan Asinus.....	14
Gambar 3.4.2.1	Tahapan Isolasi Enzim Peroksidase.....	27
Gambar 3.4.2.2	Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol.....	28

Gambar 4.1.1(1)	Diagram Batang Rata-rata Berat Basah Organ Hati Tiap Kelompok Perlakuan.....	37
Gambar 4.1.1(2)	Morfologi Organ Hati Tiap Kelompok Perlakuan.....	38
Gambar 4.1.2.1	Diagram Batang Rata-rata Diameter Vena Sentralis Tiap Kelompok Perlakuan.....	40
Gambar 4.1.2.2	Diagram Batang Persentase Rata-rata Lobulus Hati Normal dan Kerusakan Lobulus Hati Tiap Kelompok Perlakuan.....	43
Gambar 4.1.2.3(1)	Histologis Hati Kelompok Kontrol 1 (KK1).....	44
Gambar 4.1.2.3(2)	Perbandingan Histologis Hati KK1 & KK2.....	46
Gambar 4.1.2.3(3)	Perbandingan Histologis Hati KK1 & KP1.....	48
Gambar 4.1.2.3(4)	Perbandingan Histologis Hati KK1 & KP2.....	49
Gambar 4.1.2.3(5)	Perbandingan Histologis Hati KK1 & KP3.....	51
Gambar 4.1.2.3(6)	Perbandingan Histologis Hati KK1 & KP4.....	52
Gambar 4.2.2	Reaksi Antioksidan Dengan Radikal.....	61

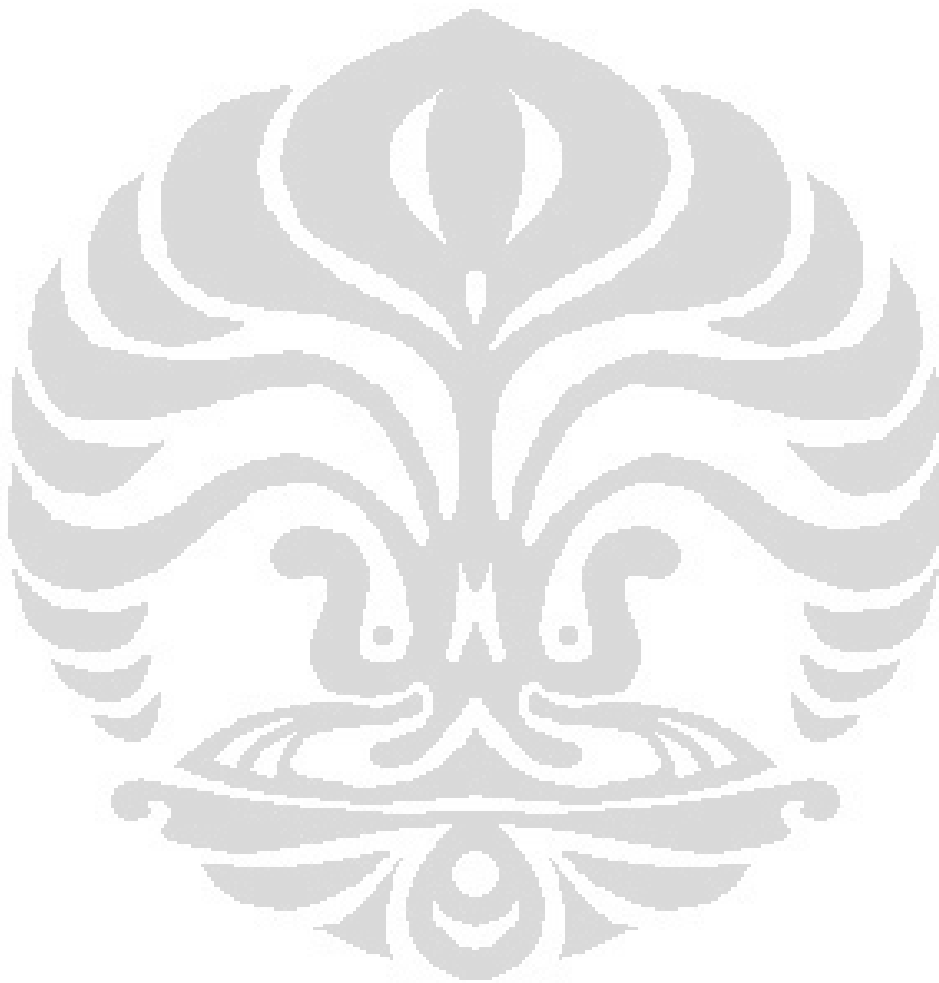
DAFTAR TABEL

Tabel 3.2.3	Bahan dan Komposisi Pakan Mencit.....	22
Tabel 4.1.1.1	Data Berat Basah Organ Hati pada Tiap Kelompok Perlakuan.....	36
Tabel 4.1.2.1	Data Rata-rata Diameter Vena Sentralis Tiap Kelompok Perlakuan.....	39
Tabel 4.1.2.2	Data Persentase Rata-rata Lobulus Hati Normal dan Derajat Kerusakan Lobulus Hati Tiap Kelompok Perlakuan.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Penentuan Dosis Dimer Isoeugenol untuk mencit.....	66
Lampiran 2	Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida Dosis 400 mg/kg bb.....	67
Lampiran 3	Cara Pengukuran Diameter Vena Sentralis.....	68
Lampiran 4	Uji Normalitas Shapiro-Wilk terhadap Berat Basah Organ Hati.....	69
Lampiran 5	Uji Homogenitas Levene terhadap Berat Basah Organ Hati.....	70
Lampiran 6	Uji Analisis Variansi (Anava) 1-faktor terhadap Berat Basah Organ Hati.....	71

Lampiran 7	Uji Normalitas Shapiro-Wilk terhadap Diameter Rata-rata Vena Sentralis.....	72
Lampiran 8	Uji Homogenitas Levene terhadap Diameter Rata-rata Vena Sentralis.....	73
Lampiran 9	Uji Analisis Variansi (Anava) 1-faktor terhadap Diameter Rata-rata Vena Sentralis.....	74
Lampiran 10	Standar Warna.....	75



BAB 1

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, tidak stabil, dan bersifat sangat reaktif. Molekul tersebut dapat berasal dari lingkungan maupun proses metabolisme fisiologis dan patofisiologis pada jaringan dan organ tubuh hewan (Rhodes 2000: 311). Radikal bebas dalam jumlah berlebih dapat menyebabkan sejumlah kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh inisiasi peroksidasi lipid pada membran plasma (Lu 1995: 372--373). Kerusakan oksidatif yang terjadi dapat menyebabkan sejumlah kondisi patologis, baik penyakit maupun efek toksik (Rhodes 2000: 311) seperti kanker, diabetes melitus, aterosklerosis, penyakit neurodegeneratif, rematik arthritis, iskemia, *sleep apnea* (Wulf 2002: 48), dan kerusakan serta berbagai penyakit pada hati (Lu 1995: 372--373).

Hati merupakan organ yang sangat penting karena berfungsi dalam berbagai proses biotransformasi dan detoksifikasi substansi endogen dan eksogen yang masuk ke tubuh. Organ tersebut berfungsi sebagai gerbang pertama yang menyaring darah dari berbagai organ seperti lambung, usus halus, usus besar, pankreas, limpa, dan paru-paru (Long & Scott 2005: 184). Darah dari berbagai organ tersebut dapat mengandung substansi berupa sari-sari makanan, obat-obatan, toksikan, serta bakteri (Corwin 2000: 560). Sebelum diedarkan ke sistem sirkulasi, substansi-substansi tersebut akan didetoksifikasi melalui suatu proses biotransformasi yang bertujuan untuk mengeliminasi zat-zat yang dapat membahayakan tubuh. Namun, proses biotransformasi tersebut tidak selalu menghasilkan produk akhir yang aman, terkadang proses biotransformasi malah menghasilkan substansi yang lebih toksik dibandingkan substansi awalnya. Hal tersebut menyebabkan hati menjadi rentan mengalami kerusakan dan penyakit (Lu 1995: 210).

Penyakit hati merupakan satu dari sepuluh penyebab utama kematian di berbagai negara. Penyakit tersebut dipicu terutama oleh obesitas, konsumsi alkohol, konsumsi obat-obatan (Long & Scott 2005: 184), dan pengaruh radikal

bebas (Lu 1995: 372--373). Berdasarkan data dari *American Liver Foundation*, di Amerika 27.000 orang meninggal setiap tahunnya akibat penyakit hati. Data lain menyebutkan bahwa Mesir menduduki posisi tertinggi untuk kematian akibat fibrosis dan sirosis pada hati (data tahun 2004) (Nation Master 2012: 1). Laju kematian akibat penyakit tersebut cenderung semakin meningkat dibandingkan penyakit pada sistem pencernaan lainnya (Long & Scott 2005: 184), yaitu sekitar 9,9 % setiap tahunnya (Murphy dkk. 2012: 1). Oleh karena itu, upaya perlindungan terhadap hati perlu dilakukan.

Upaya perlindungan terhadap hati dapat dilakukan melalui pemberian obat (Khadr dkk. 2007: 3909), bahan alam (Ahmad & Sharafatullah 2008: 59), ataupun senyawa kimia (Jing dkk. 2010: 1388) yang berfungsi sebagai hepatoprotektif (pelindung hati). Umumnya, senyawa hepatoprotektif memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Tinggi rendahnya aktivitas tersebut dapat dilihat dari nilai *Inhibitor Concentration 50%* (IC_{50}). Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi senyawa yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis linear (Myers 2004: 2). Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (Yuda 2007: 64).

Beberapa senyawa dengan aktivitas antioksidan tinggi dan telah terbukti sebagai agen hepatoprotektif yang potensial adalah senyawa *butanol fraction* (BuOH) ($IC_{50} = 0,521$ ppm) dan senyawa *acid-hydrolyzed BuOH fraction* ($IC_{50} = 0,021$ ppm) yang diisolasi dari tanaman *Anoectochilus formosanus* (Lin dkk. 2000: 87; Wang dkk. 2002: 1859). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa fenolik yang berasal dari golongan fenilpropanoid (NTP 2010: 7). Menurut Murakami dkk. (2005: 326), antioksidan fenolik banyak digunakan dalam bidang biomedis karena bersifat sebagai agen anti-inflamasi dan kemopreventif. Beberapa antioksidan fenolik lainnya yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi hingga moderat adalah *caffeic acid*, *ferulic acid*, luteolin (Zheng & Wang 2001: 5168), dimer isoeugenol, dan isoeugenol (Yuda 2007: 64).

Isoeugenol merupakan senyawa yang banyak digunakan sebagai perisa makanan dan pengharum dalam berbagai produk kosmetik dan rumah tangga. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan moderat ($IC_{50} = 12,073$ ppm)

(Yuda 2007: 64). Selain itu, senyawa tersebut juga terbukti berperan sebagai agen anti-inflamasi karena mampu menekan ekspresi gen iNOS yang berperan dalam reaksi inflamasi (Choi dkk. 2007: 151). Meskipun memiliki aktivitas antioksidan yang cukup kuat dan efek anti-inflamasi, namun isoeugenol juga merupakan *sensitizer* kulit yang kuat (Takeyoshi dkk. 2008:530), sehingga penggunaannya perlu dibatasi. Apabila dioksidasi, isoeugenol dapat berubah menjadi suatu radikal fenoksi yang dapat bergabung dengan sesamanya membentuk dimer isoeugenol (Puspita 2008: 14). Proses penggabungan tersebut dikatalis oleh enzim peroksidase yang diekstraksi dari batang sawi hijau (Yuda 2007: 42).

Dimer isoeugenol merupakan suatu senyawa fenolik yang juga berasal dari golongan senyawa turunan fenilpropanoid. Dimer tersebut bersifat lebih stabil dibandingkan monomernya (isoeugenol) karena strukturnya yang berbentuk dimer. Kestabilan struktur tersebut meningkatkan kemampuannya dalam menangkap radikal bebas, yang berarti aktivitas antioksidan yang dimiliki senyawa tersebut juga turut meningkat (Yuda 2007: 67). Berdasarkan klasifikasi yang dibuat oleh Qusti dkk. (2010: 42), aktivitas antioksidan dari dimer isoeugenol termasuk dalam kategori tinggi ($IC_{50} = 0,7608$ ppm) (Yuda 2007: 64). Selain itu, senyawa tersebut juga merupakan *sensitizer* yang lebih lemah dibandingkan monomernya (Takeyoshi dkk. 2008: 530), sehingga senyawa tersebut berpotensi untuk dimanfaatkan dalam bidang industri dan biomedis. Penelitian yang telah dilakukan, belum ada yang menguji potensi hepatoprotektif dari senyawa tersebut. Dengan demikian, penelitian untuk menguji potensi hepatoprotektif yang dimiliki oleh senyawa tersebut perlu dilakukan.

Uji hepatoprotektif dilakukan dengan memberikan terlebih dahulu zat uji yang diduga memiliki fungsi hepatoprotektif kepada hewan uji, kemudian hewan tersebut diinduksi kerusakan hatinya oleh suatu zat hepatotoksik, contohnya karbon tetraklorida (Heibatollah dkk. 2008: 141; Ilango & Chitra 2009: 361). Senyawa tersebut akan mengalami bioaktivasi di dalam hati dan menghasilkan suatu senyawa radikal yang menyebabkan kerusakan hepatoseluler dan jaringan hati (Lu 1995: 372--373).

Prapenelitian tentang uji potensi hepatoprotektif dari dimer isoeugenol terhadap histologi hati mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY telah dilakukan.

Bahan uji berupa dimer isoeugenol dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan secara oral pada mencit selama 7 hari berturut-turut. Dua jam setelah pencekukan terakhir, mencit diinjeksi secara intraperitoneal dengan karbon tetraklorida (CCl_4) dosis 400 mg/kg bb. Pemberian CCl_4 pada dosis tersebut sudah dapat menginduksi kerusakan sel hati (Ilyas 1999: 19). Mencit kemudian dibedah untuk diisolasi organ hatinya (48 jam setelah injeksi dengan CCl_4). Parameter penelitian yang digunakan adalah pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan secara makroskopik dilakukan dengan membandingkan berat basah dan warna organ hati antara kelompok perlakuan dan kontrol. Pengamatan secara mikroskopik dilakukan dengan mengamati derajat kerusakan lobulus hati (semikuantitatif) dan diameter vena sentralis (kuantitatif) (Afifah 2010: 29).

Penentuan dosis dimer isoeugenol pada prapenelitian didasarkan pada hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dilakukan oleh Yuda (2007: 61) yang memperoleh nilai *Lethality Concentration 50%* (LC_{50}) sebesar 8,175 ppm. Berdasarkan nilai tersebut, dosis dimer isoeugenol yang digunakan dalam prapenelitian sebesar 1 mg/kg bb, 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb. Hasil prapenelitian menunjukkan telah terjadi peningkatan efek hepatoprotektif dari senyawa dimer isoeugenol pada dosis 2 mg/kg bb ke dosis 4 mg/kg bb dan menurun pada dosis 8 mg/kg bb. Oleh karena itu, dosis dimer isoeugenol yang digunakan dalam penelitian menjadi dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb.

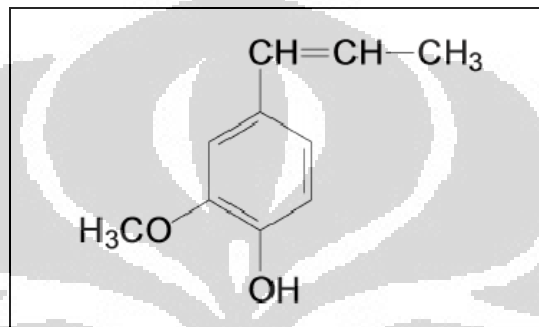
Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui potensi hepatoprotektif dari senyawa dimer isoeugenol yang diberikan secara oral dengan dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb terhadap histologi hati mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY selama 7 hari berturut-turut dengan induksi karbon tetraklorida secara intraperitoneal 2 jam setelah pencekukan terakhir. Hipotesis penelitian yang ingin diuji adalah pemberian ekstrak senyawa dimer isoeugenol secara oral selama 7 hari berturut-turut, dengan dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb dapat memberikan pengaruh hepatoprotektif terhadap histologi hati mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY yang diinduksi kerusakan hatinya menggunakan karbon tetraklorida setelah 2 jam pencekukan terakhir.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Isoeugenol

Rumus bangun, sifat kimia dan sifat fisika dari isoeugenol sebagai berikut:



Gambar 2.1. Rumus bangun isoeugenol
[Sumber: PubChem 2006: 1]

Nama trivial	: Cis-Isoeugenol
Nama IUPAC	: 2-Methoxy-4-(1-propenil) fenol
Nama lain	: phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)- (9CI); 4-hydroxy-3-methoxy-1-propenylbenzene; 4-(1-propenyl) guaiacol
Rumus molekul	: C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Titik didih	: 266°C
Titik leleh	: -10°C
Berat jenis	: 1,080 (pada suhu 25°C)
Kelarutan	: sangat larut dalam eter dan ethanol; tidak larut dalam air (PubChem 2006: 1; NTP 2010: 15).

Isoeugenol merupakan senyawa turunan fenilpropanoid yang mudah menguap (*volatile*). Senyawa tersebut banyak digunakan sebagai pengharum dalam berbagai produk di pasaran seperti parfum, produk perawatan kulit, deodorant, sabun, sampo, detergen, dan pembersih alat-alat rumah tangga (HERA 2005: 6). Isoeugenol juga banyak digunakan sebagai perisa makanan pada

minuman non-alkohol, makanan olahan yang dioven, dan permen karet (NTP 2010: 7). Rumus bangun isoeugenol dapat dilihat pada gambar 2.1.

Senyawa fenolik seperti isoeugenol dapat bergabung sesamanya membentuk dimer atau oligomer. Pembentukan senyawa dimer tersebut dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif yang melibatkan pembentukan radikal bebas. Dimer yang terbentuk umumnya bersifat lebih stabil dibandingkan isoeugenol, sehingga sifat biokimiawi dari dimer tersebut diharapkan lebih baik dari isoeugenol. Menurut Takeyoshi dkk. (2008: 530), isoeugenol merupakan *sensitizer* kulit yang kuat, namun dimernya merupakan suatu *sensitizer* yang lebih lemah, sehingga dimernya lebih potensial untuk digunakan sebagai bahan campuran kosmetik dan berbagai produk rumah tangga.

2.2 Sawi Hijau Sebagai Sumber Enzim Peroksidase

Sawi hijau merupakan tanaman yang berasal dari famili Brassicaceae, genus Brassica, dan spesies *Brassica juncea*. Tanaman tersebut diketahui mengandung enzim peroksidase. Menurut Magliano & Casal (1998: 1491--1492), pada batang tanaman sawi terdapat kandungan isoform enzim peroksidase a3 dan a4 yang lebih banyak dibandingkan dengan bagian lain organ sawi. Isoform-isoform tersebut diketahui berperan dalam katalis berbagai reaksi oksidasi dan polimerisasi pada tanaman tersebut. Oleh karena itu, enzim peroksidase yang diisolasi dari batang tanaman sawi paling cocok untuk digunakan sebagai katalis dalam reaksi oksidasi dan polimerisasi. Morfologi tanaman sawi hijau dapat dilihat pada gambar 2.2.

Tanaman sawi termasuk ke dalam golongan *horseradish*. Tanaman dari golongan tersebut umum digunakan sebagai sumber enzim peroksidase. Terdapat 73% dari sekuen peroksidase yang tercatat dalam PeroxiBase memiliki kode heme dalam sekuennya (Januari 2010). *Horseradish peroxidase* merupakan enzim heme peroksidase yang termasuk dalam superfamili *catalase-peroxidase* (Kelas III) (Torres & Ayala 2010: 17). Enzim tersebut mempunyai berat molekul 40 kDa dan pH optimum 7,0. Enzim tersebut banyak dimanfaatkan sebagai katalisator

reaksi oksidasi dari berbagai senyawa organik ataupun anorganik (Hudiyono 1998; lihat Yuda 2007: 1).

Salah satu reaksi oksidasi yang dapat dikatalis oleh *horseradish peroxidase* adalah reaksi polimerisasi secara radikal (reaksi kopling) dengan adanya H_2O_2 sebagai akseptor elektron. Reaksi polimerisasi tersebut akan menghasilkan suatu produk yang bersifat radikal. Produk tersebut selanjutnya akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang juga memiliki radikal (reaksi kopling) untuk menstabilkan dirinya. Apabila senyawa lain yang mengalami penggabungan berupa senyawa yang sama, maka reaksi kopling yang terjadi akan menghasilkan suatu dimer dari senyawa tersebut (Hudiyono 1998; lihat Yuda 2007: 1).

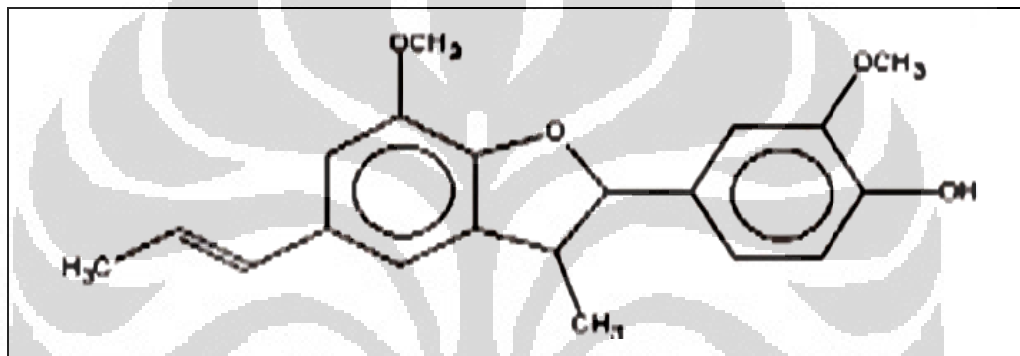


Gambar 2.2. Sawi hijau (*Brassica juncea*)
[Sumber: koleksi pribadi]

2.3 Dimer Isoeugenol

2.3.1 Karakteristik Umum

Dimer isoeugenol merupakan senyawa hasil polimerisasi isoeugenol melalui reaksi kopling dengan bantuan H_2O_2 sebagai akseptor hidrogen dan enzim peroksidase sebagai biokatalisator. Rumus bangun dimer isoeugenol dapat dilihat pada gambar 2.3.1.



Gambar 2.3.1. Rumus bangun dimer isoeugenol (dehidrodiisoeugenol)
[Sumber: Yuda 2007: 73]

Nama trivial	: Dimer isoeugenol/Dehidrodiisoeugenol
Nama IUPAC	: 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5-(1-propenyl)-2-benzofuran]-2-methoxy
Rumus molekul	: $C_{20}H_{24}O_4$
Bentuk fisik	: Kristal berwarna kuning

(Yuda 2007: 73).

2.3.2 Reaksi Kopling Oksidatif dari Isoeugenol

Reaksi kopling oksidatif adalah reaksi penggabungan dua molekul melalui reaksi oksidasi membentuk ikatan C-C atau C-O (Puspita 2008: 19). Dimer isoeugenol dihasilkan melalui reaksi kopling oksidatif dengan bantuan

H₂O₂ sebagai akseptor hidrogen dan enzim peroksidase sebagai biokatalisator (Yuda 2007: 45). Reaksi tersebut merupakan reaksi homokopling, karena terjadi penggabungan dua molekul sejenis membentuk dimer atau oligomernya (Puspita 2008: 19).

Pada reaksi pembentukan dimer isoeugenol, enzim peroksidase akan mengalami oksidasi, sedangkan H₂O₂ akan mengalami reduksi. Enzim peroksidase yang sudah teroksidasi selanjutnya menangkap atom hidrogen dari isoeugenol, sehingga isoeugenol teroksidasi menjadi radikal isoeugenol. Radikal tersebut akan mengalami resonansi pada cincin benzene dan pada gugus propenil, kemudian bergabung dengan radikal isoeugenol yang lain membentuk suatu dimer (Yuda 2007: 45, 57).

2.3.3 Sifat Biokimiawi Dimer Isoeugenol

2.3.3.1 Aktivitas Antioksidan dan Nilai IC₅₀

Efektivitas suatu antioksidan dapat dilihat dari nilai *Inhibitor Concentration 50%* (IC₅₀). Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi senyawa yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis linear (Myers 2004: 2). Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan daya antioksidan yang semakin kuat. Nilai IC₅₀ secara umum digunakan untuk menentukan kemampuan suatu obat-obatan (Yuda 2007: 64).

Qusti dkk. (2010: 42) membagi keefektivitasan antioksidan menjadi empat kategori berdasarkan nilai IC₅₀. Kategori pertama yaitu senyawa yang memiliki efek antioksidan sangat tinggi (IC₅₀ < 0,01 ppm), contohnya vitamin C (0,052 ppm) dan vitamin E (0,007 ppm); kategori kedua merupakan senyawa dengan efek antioksidan tinggi (IC₅₀ < 1 ppm); kategori ketiga merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan sedang (IC₅₀ < 7 ppm); dan kategori keempat yaitu senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan rendah (IC₅₀ > 7 ppm).

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode *radical scavenger* yang dilakukan oleh Yuda (2007: 64) menunjukkan bahwa dimer isoeugenol memiliki

nilai IC_{50} sebesar 0,7608 ppm. Berdasarkan klasifikasi yang dibuat oleh Qusti dkk.(2010: 42), nilai tersebut tergolong ke dalam kategori antioksidan yang memiliki aktivitas tinggi ($IC_{50} < 1$ ppm). Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan antioksidan kuat yang berpotensi untuk diteliti manfaatnya dalam bidang biomedis.

2.3.3.2 Nilai LC_{50} dan Penentuan Toksisitas Dimer Isoeugenol

Penentuan toksisitas dari dimer isoeugenol dilakukan berdasarkan hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dilakukan oleh Yuda (2007: 61). *Brine Shrimp Lethality Test* merupakan metode yang digunakan untuk menguji toksisitas suatu senyawa bioaktif dengan menggunakan larva udang sebagai hewan uji. Toksisitas ditentukan dengan melihat nilai LC_{50} yang dihitung berdasarkan analisis probit. *Lethal concentration 50%* (LC_{50}) merupakan rata-rata konsentrasi yang dapat mematikan 50% hewan uji pada waktu tertentu (Harmita & Radji 2004: 51, 88--89).

Hasil uji toksisitas dari senyawa dimer isoeugenol menggunakan metode BSLT menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki nilai LC_{50} sebesar 8,175 ppm (Yuda 2007: 61). Apabila dikonversi ke dalam satuan mg/kg berat badan, nilai tersebut menjadikan dimer isoeugenol termasuk ke dalam kategori substansi yang sangat toksik ($LD_{50} = 1--50$ mg/ kg berat badan). Namun, apabila akan dimanfaatkan sebagai obat, maka perlu dicari batas keamanan dari senyawa tersebut. Batas keamanan atau indeks terapeutik merupakan jarak antara dosis yang menimbulkan efek yang diharapkan ($ED = \text{Effective doses}$) dengan dosis yang menyebabkan kematian ($LD = \text{Lethality doses}$) (Ngatidjan 1991: 10).

2.4 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) memiliki beberapa karakteristik umum, yaitu aktif pada malam hari, berat individu dewasa (jantan: 25--40 g; betina: 20--40 g), dan suhu basal tubuh $37^{\circ}C$. Selain itu, mencit memiliki laju respirasi 95--165 tarikan nafas/menit dan denyut jantung 325--800 denyut/menit. Hewan tersebut

memiliki lama siklus estrus 4--5 hari dan periode gestasi 19--21 hari. Lama hidup mencit berkisar antara 1,5 hingga 3 tahun (UACC 2009: 2).



Gambar 2.4. Mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY
[Sumber: koleksi pribadi]

Mencit merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam penelitian biomedis dan kedokteran (Suckow dkk. 2006: 72). Hal tersebut disebabkan oleh beberapa alasan, yaitu mencit memiliki tingkat reproduksi yang tinggi dan periode gestasi yang pendek. Hewan tersebut juga merupakan model yang cukup representatif untuk berbagai model penyakit dan kelainan pada manusia. Selain itu, hewan tersebut mudah untuk ditangani, pemeliharaannya cukup murah, dan terdapat banyak literatur yang dapat digunakan berkaitan dengan hewan tersebut (UACC 2009: 2).

Mencit diklasifikasikan ke dalam famili Muridae dan genus Mus (Arctos 2011: 1). Terdapat banyak galur mencit yang dikembangkan dari spesies tersebut, salah satunya adalah galur DDY (*Deutchland, Denken, Yoken*). Kelebihan mencit dari galur tersebut yaitu tingkat reproduksinya tinggi dan memiliki pertumbuhan yang cepat. Oleh karena itu, mencit dari galur tersebut banyak digunakan dalam studi di bidang farmakologi, farmakokinetik, dan toksikologi (NIBIO 2012: 1). Morfologi mencit jantan galur DDY dapat dilihat pada gambar 2.4.

2.5 Hati

Hati (*hepar*) merupakan organ multifungsi yang berperan dalam berbagai fungsi metabolisme dalam tubuh (Dellmann & Brown 1992: 392). Organ tersebut terletak di bagian kanan atas rongga abdominal, tepatnya di bawah diafragma (Bevelander & Ramaley 1988: 287). Organ tersebut juga dilapisi oleh suatu lapisan tipis peritoneum (kapsula glisson) di sepanjang permukaannya, kecuali pada bagian yang menempel dengan diafragma (Greep 1953: 580). Hati menciit terdiri atas empat lobus utama, yaitu 1 lobus median, 2 lobus lateral (kanan dan kiri), dan 1 lobus kaudal. Lobus hati tersusun lagi oleh unit-unit kecil yang disebut lobulus (Little dkk. 1941: 124).

Darah dari lambung dan usus dialirkan terlebih dahulu ke hati melalui vena porta sebelum diedarkan ke sistem sirkulasi. Dengan demikian, hati menjadi organ pertama yang berhadapan dengan berbagai materi yang diingesti tubuh seperti sari-sari makanan, vitamin, logam, obat-obatan, dan toksikan yang berasal dari lingkungan. Serangkaian proses fisiologis yang terjadi di sel-sel hati mengekstraksi materi-materi tersebut dari darah untuk selanjutnya dikatabolisme, disimpan, atau dieksresikan melalui getah empedu (Corwin 2000: 560).

2.5.1 Fungsi Hati

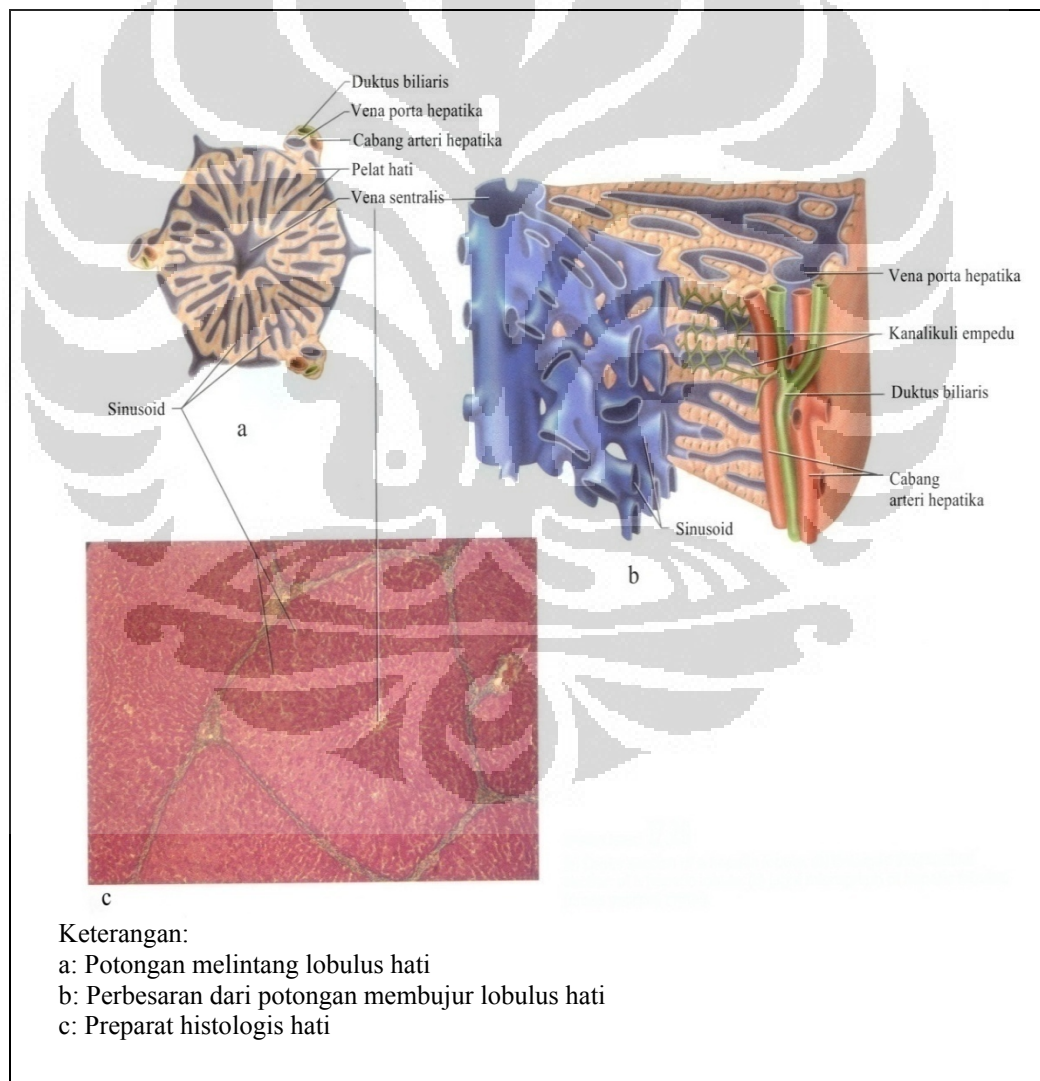
Hati memiliki berbagai fungsi fisiologis yang penting. Dalam sistem pencernaan, hati berperan sebagai kelenjar yang mensekresikan getah empedu yang berperan dalam digesti dan absorpsi lemak. Hati juga berperan dalam memetabolisme nutrien (karbohidrat, protein, dan lipid) setelah diabsorpsi oleh saluran pencernaan. Selain itu, hati juga berfungsi dalam proses detoksifikasi atau degradasi produk buangan tubuh, hormon, obat-obatan, dan berbagai xenobiotik yang masuk ke tubuh (Sherwood 2004: 618).

Fungsi lain hati adalah sebagai tempat penyimpanan glikogen, lemak, besi, tembaga, dan berbagai vitamin. Hati juga berperan mensekresikan protein plasma yang berperan dalam pembekuan darah, transpor (hormon steroid, thyroid, dan kolestrol) dalam darah. Selain itu, hati juga berperan dalam fagositosis

eritrosit yang rusak dan bakteri yang dilakukan oleh sel Kupffer (Sherwood 2004: 618--619).

2.5.2 Histologi Hati

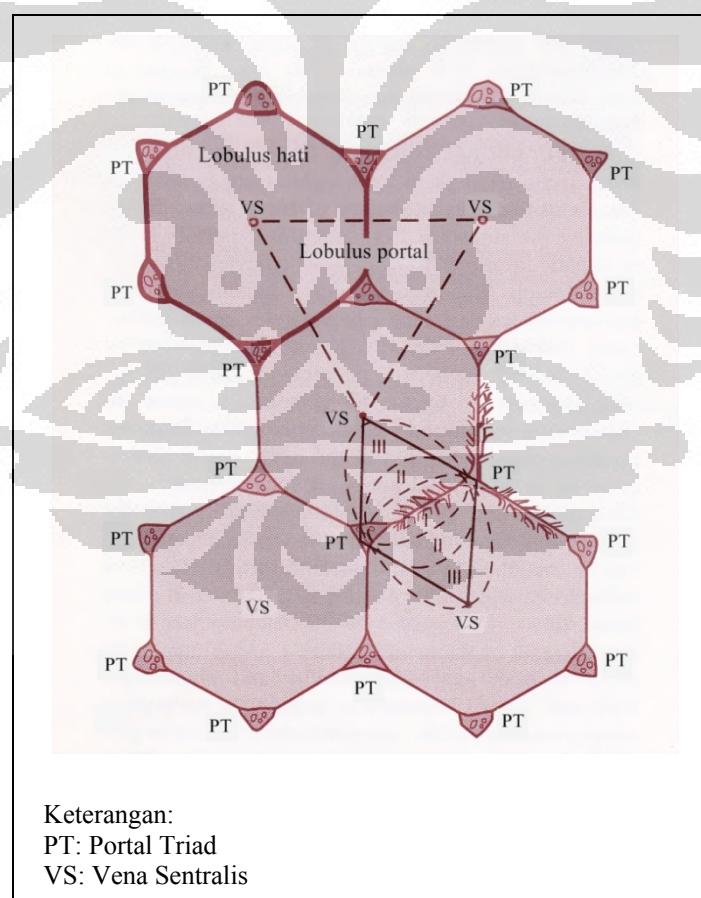
Secara histologis, hati tersusun atas lobulus-lobulus hati. Lobulus tersebut terdiri dari sel-sel hati (hepatosit) yang tersusun dalam suatu lempeng-lempeng (Corwin 2000: 560). Gambaran histologis hati normal dapat dilihat pada gambar 2.5.2.



Gambar 2.5.2. Gambaran histologi hati normal
[Sumber: Shier dkk. 2002: 711, diterjemahkan sesuai aslinya]

2.5.2.1 Lobulus Hati

Hati terbagi atas dua unit operasional, yaitu lobulus dan asinus. Istilah lobulus lebih sering dipergunakan untuk menjelaskan bagian parenkim hati yang mengalami kerusakan secara patologi (Klassen & Watkins III 1999: 13). Lobulus tersebut terdiri dari sel-sel hati (hepatosit) yang tersusun dalam suatu lempeng-lempeng (Corwin 2000: 560). Asinus merupakan istilah yang digunakan untuk menyebut bagian fungsional pada hati. Bagian fungsional tersebut terbagi atas tiga zona, yaitu zona 1 (zona yang terdekat dengan pembuluh darah), zona 2 (zona intermediet), dan zona 3 (zona yang paling dekat dengan vena sentralis) (Klassen & Watkins III 1999: 13--14). Hubungan antara lobulus dan asinus dapat dilihat pada gambar 2.5.2.1.



Gambar 2.5.2.1. Hubungan antara lobulus dan asinus
 [Sumber: McPhee dkk. 2000: 330, diterjemahkan sesuai aslinya]

2.5.2.2 Sel Hati

Sel hati (hepatosit) berbentuk polihedral dengan inti bulat dan terletak di tengah (Dellmann & Brown 1992: 399). Hepatosit tersusun secara radial dari tepi lobulus hingga ke vena sentralis. Sel-sel tersebut beranastomosa dan berbatasan dengan sinusoid-sinusoid yang berisi darah (Bevelander & Ramaley 1988: 289). Dinding sinusoid memiliki pori yang cukup besar (*fenestrae*) dan tidak memiliki membran dasar (*basement membrane*), sehingga materi xenobiotik yang terkandung dalam darah dapat masuk ke hepatosit. Sebaliknya, hepatosit juga dapat mensekresikan substansi berupa protein plasma dan getah empedu ke dalam darah yang mengalir di sinusoid (Sherwood 2004: 618).

Hepatosit berfungsi memetabolisme dan melakukan biotransformasi materi-materi xenobiotik yang terkandung dalam darah. Berdasarkan pembagian zona asinus, hepatosit pada setiap zona berbeda akan mendapat pengaruh berbeda dan memberikan perlakuan yang berbeda pula terhadap materi-materi tersebut. Dalam kondisi terpajan toksikan, perbedaan tersebut dapat menyebabkan kondisi kerusakan hepatosit dan penyakit hati yang berbeda pada setiap zona asinus hati (Junguiera & Carneiro 1980: 345).

Hepatosit pada zona 1 menerima darah yang kaya akan oksigen dan nutrisi, sehingga sel-sel pada zona tersebut akan mampu bertahan lebih baik ketika terpajan toksikan. Pertahanan tersebut diwujudkan melalui mekanisme regenerasi hepatosit dengan laju regenerasi yang tinggi. Hal tersebut disebabkan faktor penunjang pertumbuhan sel yang dibutuhkan untuk melakukan regenerasi tersedia dalam jumlah yang cukup (Telford & Bridman 1990: 382).

Sel-sel hati pada zona 2 akan merespon produk hasil metabolisme dari zona 1 berupa darah dengan kandungan oksigen dan nutrisi yang lebih rendah dibandingkan zona 1. Selain itu, hepatosit pada zona 2 juga akan menerima produk-produk hasil metabolit yang disekresikan oleh hepatosit pada zona 1. Hal tersebut menyebabkan hepatosit pada zona 2 lebih rentan mengalami kerusakan. Selain itu, laju regenerasi hepatosit pada zona tersebut akan lebih rendah dibandingkan zona 1 (Telford & Bridman 1990: 382).

Hepatosit pada zona 3 selanjutnya akan menerima darah hasil metabolisme dari zona 1 dan zona 2. Darah tersebut memiliki kandungan oksigen dan nutrisi yang rendah. Hal tersebut menyebabkan hepatosit pada zona 3 rentan mengalami *hypoxia* dan nekrosis (Telford & Bridman 1990: 382).

Untuk mengatasi berbagai potensi kerusakan yang dapat terjadi, hepatosit memiliki kemampuan regenerasi yang cepat sebagai mekanisme untuk memperbaiki jaringan hati yang rusak (Corwin 2000: 560). Apabila terjadi suatu kerusakan pada sel-sel hati yang disebabkan oleh toksikan misalnya kloroform, maka sel hati akan langsung mengadakan mitosis besar-besaran di daerah yang terjadi kerusakan. Pengambilan jaringan hati melalui operasi (hepatektomi) juga akan menyebabkan regenerasi besar-besaran pada sel hati. Penelitian hepatektomi yang dilakukan dengan mengambil dua per tiga bagian organ hati pada anjing dan tikus, menemukan bahwa regenerasi sel-sel hati akan sempurna tiga minggu kemudian setelah proses hepatektomi (Greep 1953: 596).

2.5.2.3 Vena Sentralis

Vena sentralis merupakan bagian tengah dari lobulus hati yang dikelilingi oleh sel-sel hati dan sinusoid yang beranastomosa secara radial (Little dkk. 1941: 125). Vena sentralis menerima darah yang berasal dari vena porta dan arteri hepatica melalui sinusoid-sinusoid yang mengelilinginya (Corwin 2000: 560). Aliran darah ke vena sentralis tersebut mengalir melalui sinusoid-sinusoid dari bagian tepi lobulus ke bagian tengah lobulus (dari zona 1 ke zona 3 asinus hati). Aliran tersebut menyebabkan bagian perifer lobulus menerima asupan oksigen dan konsentrasi bahan makanan yang lebih tinggi dibandingkan bagian tengah lobulus. Selain itu, daerah tengah lobulus lebih banyak menerima substansi toksik dari sel-sel di bagian perifer. Hal tersebut menyebabkan bagian tengah lobulus rentan mengalami *hypoxia* dan kerusakan (Greep 1953: 593).

2.5.3 Patologi Hati

Hati merupakan gerbang pertama yang menyaring darah dari berbagai organ seperti lambung, usus halus, usus besar, pankreas, limpa, dan paru-paru sebelum darah tersebut diedarkan ke sistem sirkulasi (Long & Scott 2005: 184). Darah tersebut dapat mengandung materi-materi xenobiotik seperti obat-obatan, toksikan, dan molekul aktif biologis lainnya. Materi-materi tersebut akan dibersihkan dari darah dengan cara:

1. Eksresi senyawa tersebut melalui getah empedu,
2. Fagositosis oleh sel Kupffer yang terdapat pada dinding sinusoid, dan
3. Biotransformasi xenobiotik didalam hepatosit

(Fox 2009: 631).

Biotransformasi xenobiotik bertujuan untuk mengubah senyawa tersebut menjadi senyawa yang hidrofilik. Semakin hidrofil suatu senyawa, maka eliminasinya melalui ginjal akan semakin mudah. Terdapat dua tahap reaksi konversi senyawa xenobiotik menjadi senyawa yang hidrofil, yaitu reaksi tahap I dan reaksi tahap II (Rhoades & Tanner 1995: 573).

Pada reaksi tahap I, senyawa parental mengalami biotransformasi menjadi senyawa yang lebih polar. Proses tersebut dilakukan melalui penambahan satu atau lebih gugus polar seperti gugus hidroksil (-OH) atau karboksil (-COOH) pada senyawa parental melalui reaksi oksidasi. Enzim yang berperan dalam reaksi tahap I adalah enzim *NADPH-cytochrome c reductase* dan suatu seri protein yang disebut sitokrom p-450 (Rhoades & Tanner 1995: 573).

Produk hasil reaksi tahap I akan masuk ke reaksi tahap II. Pada reaksi tahap II, produk tersebut akan mengalami konjugasi dengan sejumlah senyawa seperti asam glukoronat, glisin, taurin, dan sulfat. Tujuan proses tersebut adalah membuat senyawa produk agar lebih hidrofilik. Enzim yang berperan dalam reaksi tahap II adalah enzim *glucoronyltransferase* (Rhoades & Tanner 1995: 573).

Beberapa proses biotransformasi tidak selalu menghasilkan produk hasil reaksi yang aman dan dapat dengan mudah dieliminasi dari tubuh.

Biotransformasi senyawa karbon tetraklorida (CCl₄) oleh sitokrom p-450

menghasilkan suatu radikal bebas yang menyerang atom hidrogen dari asam lemak tidak jenuh pada membran fosfolipid (Klassen & Watkins III 1999: 320). Hal tersebut menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel hati, sehingga menyebabkan sejumlah kerusakan dan penyakit. Terdapat beberapa jenis kerusakan hati, antara lain: perlemakan, nekrosis, dan sirosis (Lu 1995: 210).

Perlemakan hati (*steatosis*) adalah keadaan hati yang mengandung lipid dengan berat lebih dari 5% berat hati. Mekanisme yang dapat menyebabkan perlemakan yaitu:

1. Penghambatan sintesis unit protein yang membentuk lipoprotein. Contoh toksikan: karbon tetraklorida, etionin.
2. Penekanan yang terjadi pada proses konjugasi trigliserida dengan lipoprotein. Contoh toksikan: karbon tetraklorida.
3. Gangguan transfer VLDL (lipoprotein yang berdensitas sangat rendah) melalui membran sel akibat hilangnya kalium dari hepatosit. Contoh toksikan: etionin.
4. Gangguan pada oksidasi lipid di mitokondria. Contoh toksikan: etanol.
5. Penghambatan sintesis fosfolipid yang merupakan komponen penting VLDL. (Lu 1995: 210).

Perlemakan pada hati dapat menyebabkan lesi yang dapat bersifat akut maupun kronis (Lu 1995: 210). Pengamatan perlemakan hati secara histologi menunjukkan hepatosit yang mengandung banyak lemak, terlihat sebagai vesikel kosong yang berbentuk bulat. Suatu preparat beku organ hati yang mengalami perlemakan membuktikan bahwa isi vesikel-vesikel tersebut adalah lemak (Klaassen & Watkins III 1999: 316).

Nekrosis hati adalah kematian sel-sel hati. Nekrosis dapat bersifat fokal (sentral, pertengahan, perifer) atau masif. Nekrosis umumnya terjadi karena kerusakan akut akibat toksikan. Mekanisme kerusakan yang terjadi dapat disebabkan oleh peroksidasi lipid, pengikatan terhadap makromolekul sel, kerusakan mitokondria, gangguan transpor pada sistem sitoskeleton, dan influks kalsium (Klassen & Watkins III 1999: 317). Terdapat beberapa perubahan morfologik awal yang menandai nekrosis pada hati, yaitu edema sitoplasma, dilatasi retikulum endoplasma, disagregasi polisom, dan akumulasi trigliserida sebagai butiran lemak dalam sel. Proses selanjutnya yaitu pembengkakan

mitokondria yang progresif dengan kerusakan krista, pembengkakan sitoplasma, penghancuran organel dan inti, dan diakhiri dengan pecahnya membran plasma. Toksikant yang sering teramati menyebabkan nekrosis yaitu karbon tetraklorida, kloroform, tetrakloroetan, karbon tetrabromida, fosfor, bromobenzene, isoniazid, dan iproniazid (Lu 1995: 210--212).

Sirosis adalah keadaan hati yang diisi oleh septa kolagen (Lu 1995: 213). Kumpulan sel-sel hati dipisahkan oleh suatu serat kolagen sehingga membatasi difusi materi yang berasal dari sinusoid (Klaassen & Watkins III 1999: 318). Pemberian karbon tetraklorida dan senyawa karsinogenik lainnya untuk jangka waktu yang lama dapat menyebabkan sirosis pada hewan. Pada manusia, penyebab sirosis yang utama adalah konsumsi alkohol jangka panjang (Lu 1995: 213).

2.6 Karbon Tetraklorida

Karbon tetraklorida (CCl_4) adalah suatu senyawa yang mudah menguap (*volatile*), tidak berwarna, dan memiliki aroma yang manis. Karbon tetraklorida larut dengan baik dalam pelarut alifatik, namun sukar larut dalam air. Senyawa tersebut bersifat stabil dan tidak mudah terbakar (WHO 1999: 7).

Karbon tetraklorida diabsorpsi dengan baik oleh sistem gastrointestinal dan sistem respirasi pada hewan dan manusia. Absorpsi karbon tetraklorida yang berbentuk liquid pada kulit mungkin terjadi, namun absorpsi senyawa tersebut dalam bentuk uap akan sangat lambat. Karbon tetraklorida didistribusikan ke seluruh tubuh dan akan terkonsentrasi pada jaringan dan organ. Konsentrasi tertinggi dari senyawa tersebut terdapat pada hati, otak, ginjal, otot, lemak, dan darah. Eliminasi karbon tetraklorida, sebagian besar berupa senyawa induk primer melalui udara yang diekshalasi, sedangkan sebagian kecilnya akan dikeluarkan melalui feses dan urin (WHO 1999: 38--42).

Tahap awal biotransformasi karbon tetraklorida terjadi di hati. Proses tersebut dikatalis oleh enzim sitokrom p-450. Enzim tersebut mengkatalis reaksi oksidatif yang bertujuan mengeliminasi karbon tetraklorida. Namun, hasil biotransformasi tersebut malah menghasilkan radikal triklorometil (CCl_3) yang

lebih reaktif (WHO 1999: 43). Radikal triklorometil yang terbentuk menyebabkan peroksidasi lemak tak jenuh pada membran fosfolipid. Senyawa tersebut berikatan secara kovalen pada protein dan lemak tak jenuh. Pengikatan radikal tersebut menyebabkan perubahan kimia dalam membran sel, sehingga menyebabkan pecahnya sel, bahkan dapat menyebabkan kematian sel (Lu 1995: 37).

Karbon tetraklorida banyak digunakan dalam penelitian toksikologi sebagai senyawa hepatotoksik karena senyawa tersebut memiliki kemampuan untuk menginduksi kerusakan hati. Pemberian karbon tetraklorida pada hewan percobaan menyebabkan perubahan biokimia pada organ, darah, dan juga data histologi organ. Perubahan biokimia pada organ yang dapat teramati, khususnya pada hati yaitu penurunan kadar protein, glukosa, fosfolipid, konsentrasi DNA dan RNA. Selain itu, terjadi pula peningkatan kadar trigliserida, glikogen, dan konsentrasi kolestrol bebas maupun kolestrol yang sudah mengalami esterisasi. Perubahan biokimiawi yang dapat diamati pada darah yaitu peningkatan aktivitas serum aspartat aminotransferase (ASAT), peningkatan konsentrasi kolestrol yang sudah mengalami esterisasi, dan penurunan kadar glukosa darah. Perubahan histologis mencatat banyaknya nekrosis yang terjadi pada lobulus hati, mulai dari bagian sentrolobular, midzonal, hingga bagian periportal (WHO 1999: 52).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Perkembangan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. Penelitian dilaksanakan selama 8 bulan, mulai dari bulan Juli 2011 hingga Februari 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol

Bahan yang digunakan adalah batang tanaman sawi hijau (*Brassica juncea*) segar pada usia panen (\pm 2 bulan) yang diperoleh dari Pasar Tradisional Kemiri Muka, Depok; bahan-bahan kimia seperti: etil asetat, isoeugenol 5,93 M, larutan H₂O₂ 30%, Na₂SO₄ anhidrat, buffer K-Fosfat pH 7,0 yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia; dan bahan-bahan lain seperti aquades dan es batu.

3.2.2 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY sebanyak 24 ekor, yang berumur sekitar 2--3 bulan dengan berat 25--40 g. Hewan tersebut diperoleh dari Bagian Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Jawa Barat.

3.2.3 Makanan dan Minuman Mencit

Makanan mencit berupa pelet yang diperoleh dari CV.Kasman, Komplek Departemen Kesehatan Blok C1/8, Sunter Jaya, Jakarta Utara. Bahan dan komposisi pakan mencit dapat dilihat pada tabel 3.2.3. Minuman mencit berupa air mineral [VIT] yang diberikan melalui botol gelas minuman.

Tabel 3.2.3. Bahan dan komposisi pakan mencit

Bahan dasar pakan mencit	
Bungkil Kedelai	
Bungkil kelapa	
Tepung ikan	
Jagung	
Dedak	
Tapioka	
Menir	
Tepung rumput	
Minyak kelapa	

Analisis proksimat pakan mencit	Persentase setiap 100 g (%)
Protein	20--22
Lemak	2--4
Serat kasar	4
Kadar abu	7--9

[Sumber: CV. Kasman, Komplek Depkes Blok C1/8 Sunter Jaya, Jakarta Utara]

3.2.4 Bahan Kimia yang Digunakan Selama Proses PENCEKOKAN Hingga Pembuatan Preparat Histologi

Bahan yang digunakan adalah karbon tetraklorida (CCl_4) [MERCK], minyak zaitun [LE RICHE], larutan natrium klorida (NaCl) 0,9%, larutan Bouin, larutan alkohol 70% [MERCK], larutan benzil benzoat [MERCK], larutan benzil alkohol [MERCK], paraffin, spirtus, albumin Meyer, aquades, larutan xylol, larutan Hematoksin Bohmer 1%, larutan asam klorida (HCl) 1%, larutan Eosin Y 1%, dan entelan [MERCK].

3.3 Peralatan

3.3.1 Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol

Peralatan yang digunakan adalah tabung reaksi, blender [NATIONAL], *beaker glass*, termometer, gelas ukur, alat sentrifugasi, corong biasa, corong pisah, *magnetic stirrer* [COLE PARMER], dan kaca arloji.

3.3.2 Pemeliharaan Mencit

Peralatan yang digunakan adalah kandang mencit berupa bak plastik berukuran $(40 \times 30 \times 10) \text{ cm}^3$ yang diberi serbuk kayu sebagai alas, tutup kandang terbuat dari anyaman kawat dengan jarak anyaman 1 cm, timbangan mencit [OHAUST GT 4000], lampu 20 Watt [PHILIPS], *exhaust fan* [PHILIPS], higrotermometer [BARINGO], pengatur cahaya lampu otomatis, tempat makan, dan botol minuman.

3.3.3 Pemberian Senyawa Dimer Isoeugenol dan Injeksi Karbon Tetraklorida Secara Intraperitoneal

Peralatan yang digunakan adalah sonde lambung (*gavage needle*), *disposable syringe* 1 ml [TERUMO], dan jarum suntik 27 gauge [TERUMO].

3.3.4 Pembedahan dan Pembuatan Sediaan Histologis Organ Hati

Peralatan yang digunakan adalah papan bedah, *dissecting set*, botol film, silet [GOAL], kertas tisu, inkubator [SAKURA], oven [LAB. LINE INSTRUMENT], lampu spiritus, kayu, kotak paraffin, kuas kecil, mikrotom putar [AMERICAN OPTICAL], *paraffin stretcher* [SAKURA], gelas obyek [SAIL BRAND], kaca penutup [ASSISTANT], *staining jar* [AHT Co.], lemari pendingin [BAUKNECHT], dan rak preparat yang terbuat dari kayu.

3.3.5 Pengamatan Sediaan Histologis Organ Hati

Peralatan yang digunakan adalah mikroskop cahaya [NIKON], mikroprojektor [KEN A VISION], kamera digital [OLYMPUS FE-5030], penggaris [BUTTERFLY], dan alat tulis.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental. Oleh karena itu, rancangan eksperimen yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 6 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok tersebut terdiri atas 5 ulangan (5 ekor mencit untuk setiap kelompok perlakuan). Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus Freederer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan t jumlah perlakuan dan n jumlah ulangan (*lihat Afifah 2006: 20*). Kelompok-kelompok perlakuan yang akan digunakan dalam penelitian adalah:

- a. Kelompok kontrol 1 (KK1), yaitu kelompok mencit yang diberi minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian minyak zaitun terakhir, hewan tersebut diinjeksi minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi minyak zaitun dan diisolasi organ hatinya.
- b. Kelompok kontrol 2 (KK2), yaitu kelompok mencit yang diberi minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian minyak zaitun terakhir, hewan tersebut diinjeksi karbon tetraklorida (CCl₄) dosis tunggal 400 mg/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi CCl₄ dan diisolasi organ hatinya.
- c. Kelompok perlakuan 1 (KP1), yaitu kelompok mencit yang diberi ekstrak senyawa dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb yang dilarutkan dalam minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian ekstrak senyawa dimer isoeugenol terakhir, hewan tersebut diinjeksi karbon tetraklorida (CCl₄) dosis tunggal 400 mg/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi CCl₄ dan diisolasi organ hatinya.
- d. Kelompok perlakuan 2 (KP2), yaitu kelompok mencit yang diberi ekstrak senyawa dimer isoeugenol dosis 4 mg/kg bb yang dilarutkan dalam minyak

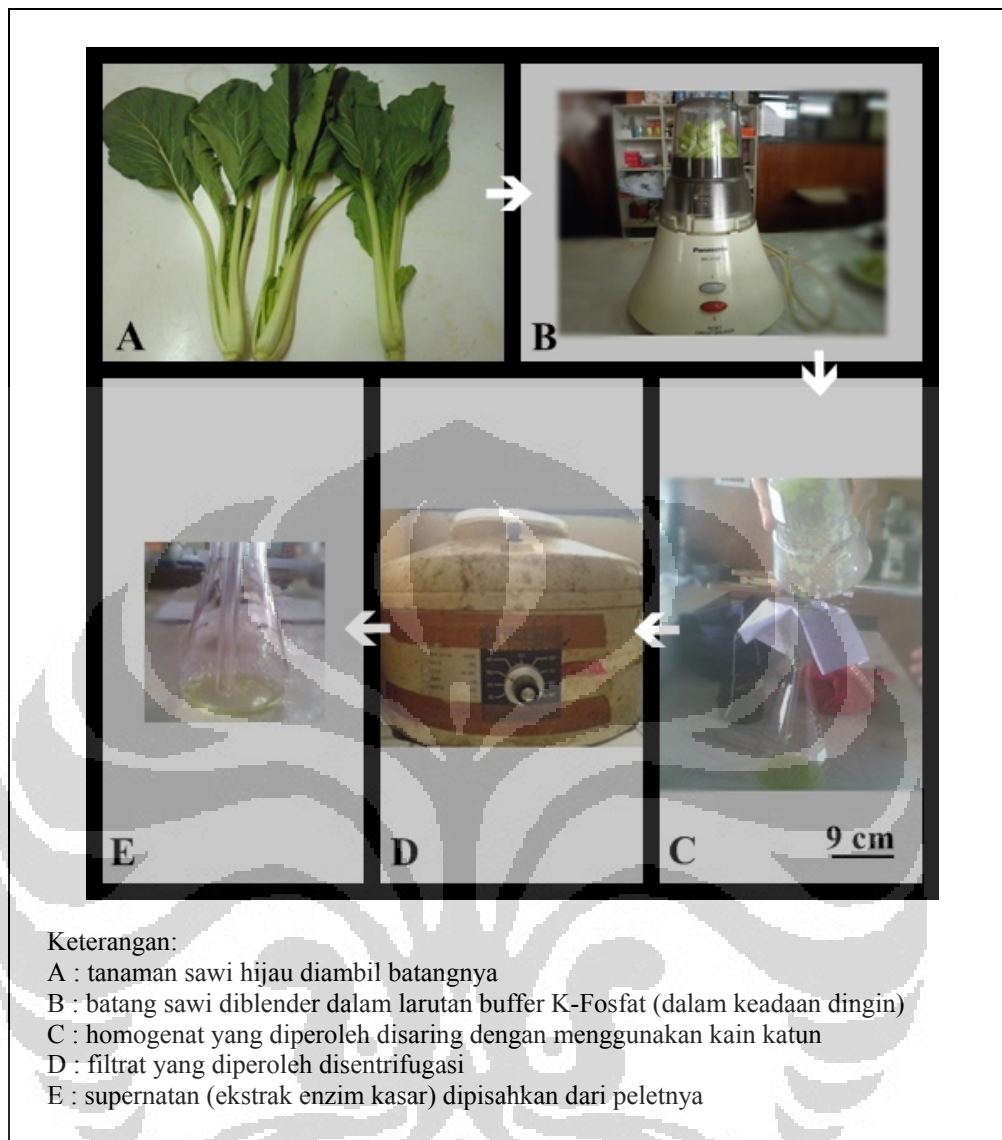
zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian ekstrak senyawa dimer isoeugenol terakhir, hewan tersebut diinjeksi karbon tetraklorida (CCl_4) dosis tunggal 400 mg/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi CCl_4 dan diisolasi organ hatinya.

- e. Kelompok perlakuan 3 (KP3), yaitu kelompok mencit yang diberi ekstrak senyawa dimer isoeugenol dosis 6 mg/kg bb yang dilarutkan dalam minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian ekstrak senyawa dimer isoeugenol terakhir, hewan tersebut diinjeksi karbon tetraklorida (CCl_4) dosis tunggal 400 mg/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi CCl_4 dan diisolasi organ hatinya.
- f. Kelompok perlakuan 4 (KP4), yaitu kelompok mencit yang diberi ekstrak senyawa dimer isoeugenol dosis 8 mg/kg bb yang dilarutkan dalam minyak zaitun sebanyak 10 ml/kg bb secara oral selama 7 hari berturut-turut, kemudian 2 jam setelah pemberian ekstrak senyawa dimer isoeugenol terakhir, hewan tersebut diinjeksi karbon tetraklorida (CCl_4) dosis tunggal 400 mg/kg bb secara intraperitoneal. Hewan tersebut selanjutnya dibedah 48 jam setelah injeksi CCl_4 dan diisolasi organ hatinya.

3.4.2 Pembuatan Senyawa Dimer Isoeugenol

3.4.2.1 Isolasi Enzim Peroksidase

Sebanyak 250 gram potongan batang tanaman sawi hijau (*Brassica juncea*) segar dihancurkan dengan menggunakan blender dalam larutan buffer K-Fosfat pH 7,0 dalam keadaan dingin ($0\text{--}5^\circ\text{C}$). Homogenat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kain katun, kemudian filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan molekul enzim kasar (supernatan) dan serpihan sel. Tahapan isolasi enzim peroksidase dapat dilihat pada gambar 3.4.2.1.

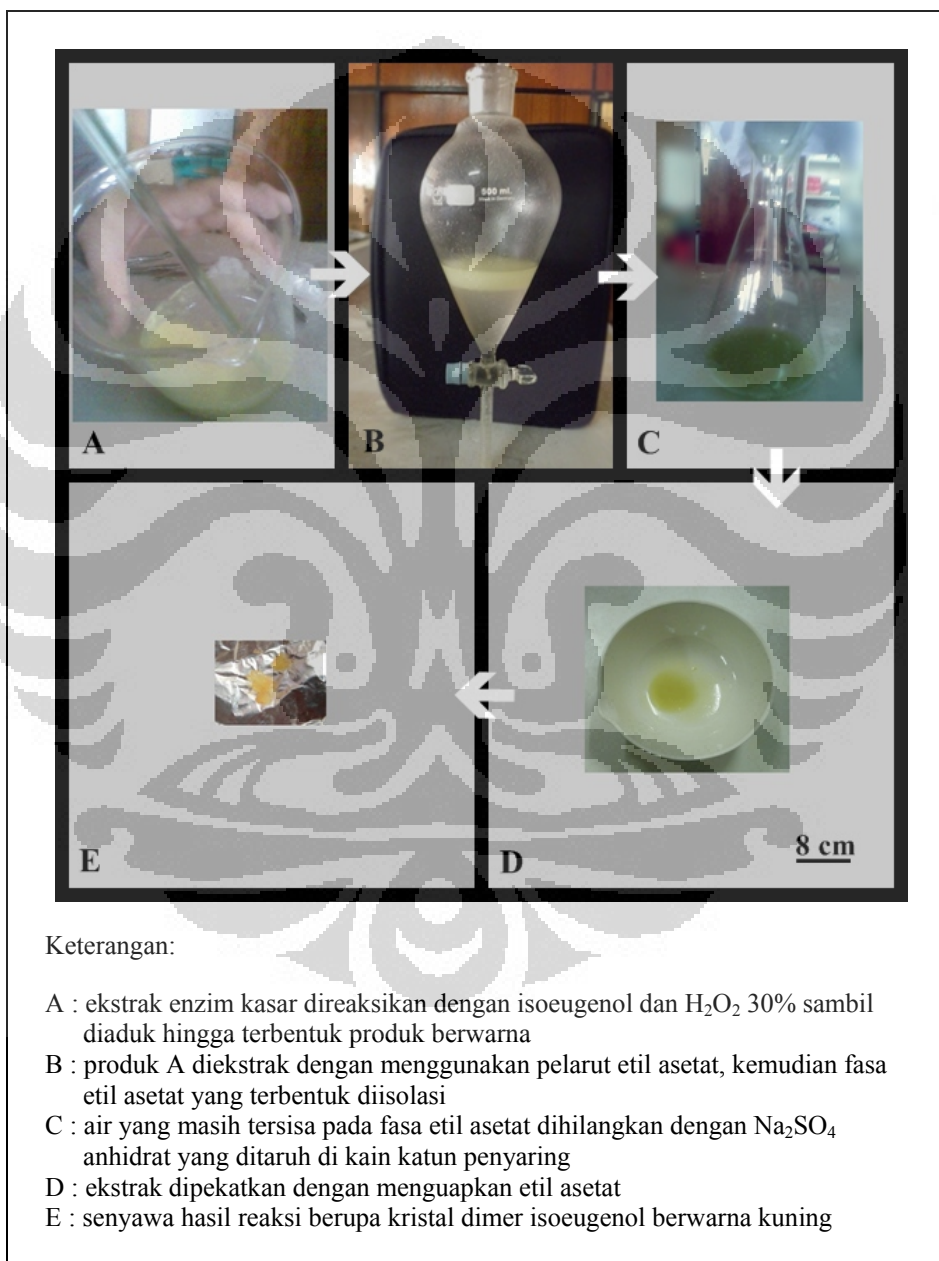


Gambar 3.4.2.1. Tahapan isolasi enzim peroksidase
 [Sumber: koleksi pribadi]

3.4.2.2 Isolasi Senyawa Hasil Reaksi Kopling Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim Peroksidase

Ekstrak enzim kasar sebanyak 300 ml direaksikan dengan 30 ml (32,67 g) isoeugenol 5,93 M, kemudian ditambahkan 10 ml H₂O₂ 30%. Reaksi dibantu dengan pengadukan selama 30 menit hingga terbentuk produk berwarna. Produk berwarna tersebut kemudian diekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat,

hasilnya berupa fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat kemudian dipisahkan dengan fasa air. Air yang masih tersisa dalam fasa etil asetat dihilangkan dengan menambahkan Na_2SO_4 anhidrat. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Senyawa hasil reaksi kemudian ditimbang. Tahapan pembuatan senyawa isoeugenol dapat dilihat pada gambar 3.4.2.2.



Gambar 3.4.2.2. Pembuatan senyawa dimer isoeugenol
[Sumber: koleksi pribadi]

3.4.3 Pemeliharaan Hewan Percobaan

Mencit dipelihara di dalam kandang. Kandang hewan tersebut berupa bak plastik berukuran (30 x 20 x 10) cm³ yang diberi alas berupa serbuk kayu sebagai alas tidur dan untuk menyerap kotorannya. Kandang plastik tersebut diletakkan pada rak-rak dalam Rumah Hewan FMIPA-UI. Tiap kandang berisi 6 ekor mencit yang mewakili 6 kelompok perlakuan, yaitu KK1, KK2, KP1, KP2, KP3, dan KP4. Mencit pada setiap kelompok perlakuan diberi tanda pada bagian tubuh yang berbeda menggunakan larutan pikrat 10%.

Makanan dan minuman mencit diberikan secara *ad libitum* (tanpa batas). Makanan berupa pelet disediakan dalam wadah plastik yang diletakkan di dalam kandang. Minuman berupa air mineral disediakan dalam botol gelas dan diletakkan di atas tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat. Kandang dibersihkan 3 kali sehari dengan cara merendam kandang selama 15 menit dalam larutan desinfektan, kemudian kandang dicuci menggunakan sabun hingga bersih.

3.4.4 Perlakuan Terhadap Mencit

Mencit yang akan digunakan dalam penelitian diadaptasikan terlebih dahulu dalam ruang kandang selama 7 hari atau hingga berat badannya konstan. Apabila telah beradaptasi, hewan tersebut kemudian diberi perlakuan sesuai dengan rancangan eksperimen yang telah disusun sebelumnya. Ekstrak senyawa dimer isoeugenol dan karbon tetraklorida (CCl₄) yang diberikan pada hewan tersebut sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu dalam minyak zaitun. Berdasarkan literatur, volume ekstrak yang diberikan pada kelompok perlakuan setiap kali pengekokan disesuaikan dengan berat badan mencit, yaitu 1 ml untuk setiap 100 g berat badan (Ngatidjan 1991: 152).

3.4.5 Pembuatan Sediaan Histologis Organ Hati Dengan Metode Parafin

Mencit dikorbankan dengan cara dislokasi *vertebrae cervicalis*. Proses tersebut dilakukan 48 jam setelah pencekakan terakhir. Mencit kemudian dibedah dengan menggunakan *dissecting set* untuk mengisolasi organ hati. Hati yang telah diisolasi dibersihkan dengan larutan natrium klorida (NaCl) 0,9% kemudian ditimbang dan diamati morfologinya. Organ yang telah ditimbang kemudian diambil satu lobusnya (lobus kanan), lalu dipotong menjadi bagian yang lebih kecil lagi untuk mempermudah penyayatan ketika proses pembuatan preparat. Organ tersebut selanjutnya diproses ke tahap pembuatan preparat dengan metode parafin dan pewarnaan dengan HE (Hematoksin-Eosin).

Tahap pembuatan sediaan histologi dengan metode parafin, yaitu:

a. Fiksasi

Organ hati yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam botol film yang berisi larutan fiksatif berupa larutan Bouin selama 24 jam. Setelah 24 jam, organ tersebut kemudian dipindahkan ke botol film yang berisi larutan alkohol 70% (Ngatidjan 1991: 265).

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi dilakukan dengan merendam organ hati di dalam larutan alkohol berturut-turut dari konsentrasi rendah makin naik ke absolut. Perendaman dalam seri alkohol yang digunakan yaitu, dimulai dari alkohol 70% selama 3 jam, lalu alkohol 96% sebanyak 2 kali ulangan masing-masing selama 1 jam, dan alkohol 100% sebanyak 2 kali ulangan masing-masing selama 1 jam (Ngatidjan 1991: 268--269). Proses perendaman tersebut dilakukan secara bergantian dengan membuang larutan alkohol yang pertama lalu diganti dengan larutan alkohol berikutnya.

c. Penjernihan

Proses penjernihan dilakukan dengan merendam organ hati dalam larutan benzil benzoat selama 24 jam, kemudian organ tersebut dimasukkan dalam larutan

benzol sebanyak 2 kali ulangan masing-masing selama 15 menit (Junguiera & Carneiro 1980:1).

d. Infiltrasi

Proses infiltrasi dilakukan dengan merendam organ hati dalam parafin cair. Proses tersebut dilakukan di dalam inkubator dengan suhu tetap (72°C). Sebelumnya, parafin dicairkan terlebih dahulu dalam oven (titik leleh $58\text{--}72^{\circ}\text{C}$). Organ hati kemudian diletakkan dalam botol film berisi parafin cair sebanyak 2 kali ulangan masing-masing selama 2 jam (Ngatidjan 1991: 270).

e. Penanaman (*embedding*)

Proses penanaman (*embedding*) dilakukan dengan merendam organ hati dalam cetakan blok parafin. Proses tersebut diawali dengan menyiapkan cetakan untuk mencetak blok parafin. Sebelumnya, parafin dicairkan terlebih dahulu dalam oven (titik leleh $58\text{--}72^{\circ}\text{C}$). Potongan-potongan organ diletakkan dalam cetakan blok parafin yang sudah diisi parafin cair. Potongan organ hati diletakkan melintang agar sesuai dengan bidang pemotongan yang diinginkan. Parafin lalu dibiarkan hingga dingin dan mengeras (Suntoro 1983: 63--64). Blok berisi organ hati tersebut kemudian diberi label dan siap disayat dengan menggunakan mikrotom (Ngatidjan 1991: 270).

f. Penyayatan

Penyayatan dilakukan dengan mikrotom putar untuk mengiris blok-blok parafin (Ngatidjan 1991: 271). Parafin sebelumnya direkatkan terlebih dahulu pada kayu pemegang agar tidak lepas ketika dipasang pada mikrotom putar. Penyayatan dilakukan dengan ukuran ketebalan $7\ \mu\text{m}$ hingga terbentuk pita-pita yang dapat merepresentasikan histologi organ (Junguiera & Carneiro 1980: 3).

g. Penempelan

Pita-pita hasil sayatan organ kemudian dilekatkan pada gelas obyek atau *object glass* yang sebelumnya diolesi dengan putih telur-gliserin (albumin Meyer) dan diberi air beberapa tetes (Ngatidjan 1991: 273). Gelas obyek tersebut lalu

dipanaskan diatas *hot plate* pada suhu 46°C hingga jaringan mengembang (Suntoro 1983: 66--68). Sisa air yang terdapat pada gelas obyek kemudian diserap dengan menggunakan kertas tisu.

h. Deparafinisasi

Preparat yang sudah ditempel pada gelas obyek, kemudian di hilangkan kandungan parafinnya (deparafinisasi) (Ngatidjan 1991: 273). Proses deparafinisasi dilakukan dengan merendam gelas obyek dalam larutan xylol sebanyak 2 kali ulangan, masing-masing selama 5 menit (Suntoro 1983: 69).

i. Hidrasi

Proses hidrasi dilakukan dengan merendam preparat yang sudah dideparafinisasi secara bergantian dalam seri larutan alkohol yaitu, dimulai dari alkohol 100%, alkohol 96%, dan alkohol 70% masing-masing selama 3 menit (Ngatidjan 1991: 268).

j. Pewarnaan

Preparat organ hati kemudian diwarnai menggunakan larutan Hematoksilin dan larutan Eosin. Proses pewarnaan dilakukan dalam *staining jar*. Proses pewarnaan dimulai dengan merendam preparat dalam larutan Hematoksilin Bohmer 1% selama 4 menit, kemudian preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir. Preparat selanjutnya direndam dalam larutan Eosin 1% selama 4 menit (Suntoro 1983: 71--72).

k. Dehidrasi

Proses dehidrasi dilakukan dengan merendam preparat yang sudah diwarnai secara bergantian dalam seri larutan alkohol yaitu, dimulai dari alkohol 70%, alkohol 96%, dan alkohol 100% masing-masing selama 3 menit (Ngatidjan 1991: 268).

l. Penjernihan

Preparat yang sudah didehidrasi kemudian direndam dalam larutan xylol sebanyak 2 kali ulangan, masing-masing selama 3 menit (Suntoro 1983: 72).

m. Penutupan

Penutupan dilakukan dengan menutup sayatan organ yang telah diwarnai dengan menggunakan gelas penutup (*cover glass*). Sebelumnya kotoran dan sisa-sisa zat dari proses penjernihan dibersihkan dengan menggunakan kertas tisu, kemudian sayatan yang dikehendaki ditetesi dengan entelan secukupnya (1--2 tetes). Gelembung udara yang mungkin terbentuk pada kaca penutup dapat dihilangkan dengan cara menekan kaca penutup dengan sonde. Preparat selanjutnya dibiarkan mengering pada suhu kamar (Suntoro 1983: 72).

3.3.6 Parameter Penelitian serta Pengambilan Data

Parameter penelitian yang digunakan adalah pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik organ hati. Pengamatan secara makroskopik adalah dengan membandingkan berat basah dan warna organ hati antara kelompok perlakuan dan kontrol. Pengamatan secara mikroskopik meliputi pengamatan secara semikuantitatif dan kuantitatif. Pengamatan tersebut dilakukan terhadap sediaan histologis organ hati. Pengamatan secara semikuantitatif dilakukan dengan mengamati tiga parameter, yaitu lobulus hati, vena sentralis, dan sel-sel hepatosit hati dari 30 lobulus hati dari tiga preparat untuk setiap kelompok perlakuan. Hasil dari pengamatan tersebut disajikan dalam bentuk data derajat kerusakan lobulus hati (meliputi vena sentralis dan jaringan parenkim).

Menurut Afiati (2009: 43), derajat kerusakan hati terbagi dalam tiga tingkatan, yaitu derajat kerusakan 1 (kerusakan ringan), derajat kerusakan 2 (kerusakan sedang), dan derajat kerusakan 3 (kerusakan berat). Derajat kerusakan 1 memiliki kriteria kerusakan di daerah sentrolobulus (kerusakan <20% luas lobulus). Derajat kerusakan 2 memiliki kriteria pada daerah vena sentralis dan sel-sel parenkim di sekitar vena sentralis (kerusakan 20--40% dari luas lobulus).

Derajat kerusakan 3 memiliki kriteria kerusakan vena sentralis dan sel-sel parenkim yang lebih luas pada jaringan hati (kerusakan >40% luas lobulus).

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan pengukuran diameter vena sentralis pada 50 lobulus hati dari tiga preparat untuk setiap kelompok perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan bantuan mikroproyektor yang telah dikalibrasi sebelumnya. Pengukuran diameter vena sentralis dilakukan dengan menggunakan penggaris.

3.3.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode statistik. Data berat basah dan diameter vena sentralis hati mencit diolah dengan menggunakan program komputer *Statistical Package for Social Science (SPSS) 16.0 for windows*. Data tersebut diuji dengan menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan dengan uji normalitas Shapiro-Wilk, sedangkan uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Data parametrik yang diperoleh selanjutnya diuji dengan menggunakan uji Analisis Variansi (ANAVA). Uji tersebut digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh pemberian senyawa dimer isoeugenol terhadap histologi hati mencit.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Pengamatan Makroskopik Hati

Pengamatan makroskopik yang dilakukan terdiri atas pengamatan terhadap warna hati dan pengamatan terhadap berat basah hati. Pengamatan berat basah organ hati dilakukan dengan menimbang organ hati yang masih segar pada timbangan digital. Hasil pengamatan terhadap berat basah hati menunjukkan bahwa nilai rata-rata berat hati pada kelompok kontrol normal (KK1) menunjukkan nilai terkecil yaitu 1,68 g. Nilai rata-rata berat basah hati pada kelompok perlakuan KP1, KP2, KP3, dan KP4 berturut-turut adalah 1,84 g; 2,22 g; 1,78 g; dan 1,96 g. Nilai rata-rata berat basah dari kelompok perlakuan yang paling mendekati nilai rata-rata berat basah KK1 adalah nilai yang dimiliki oleh KP3, yaitu 1,78 g. Data berat basah organ hati pada tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.1.1 dan gambar 4.1.1(1).

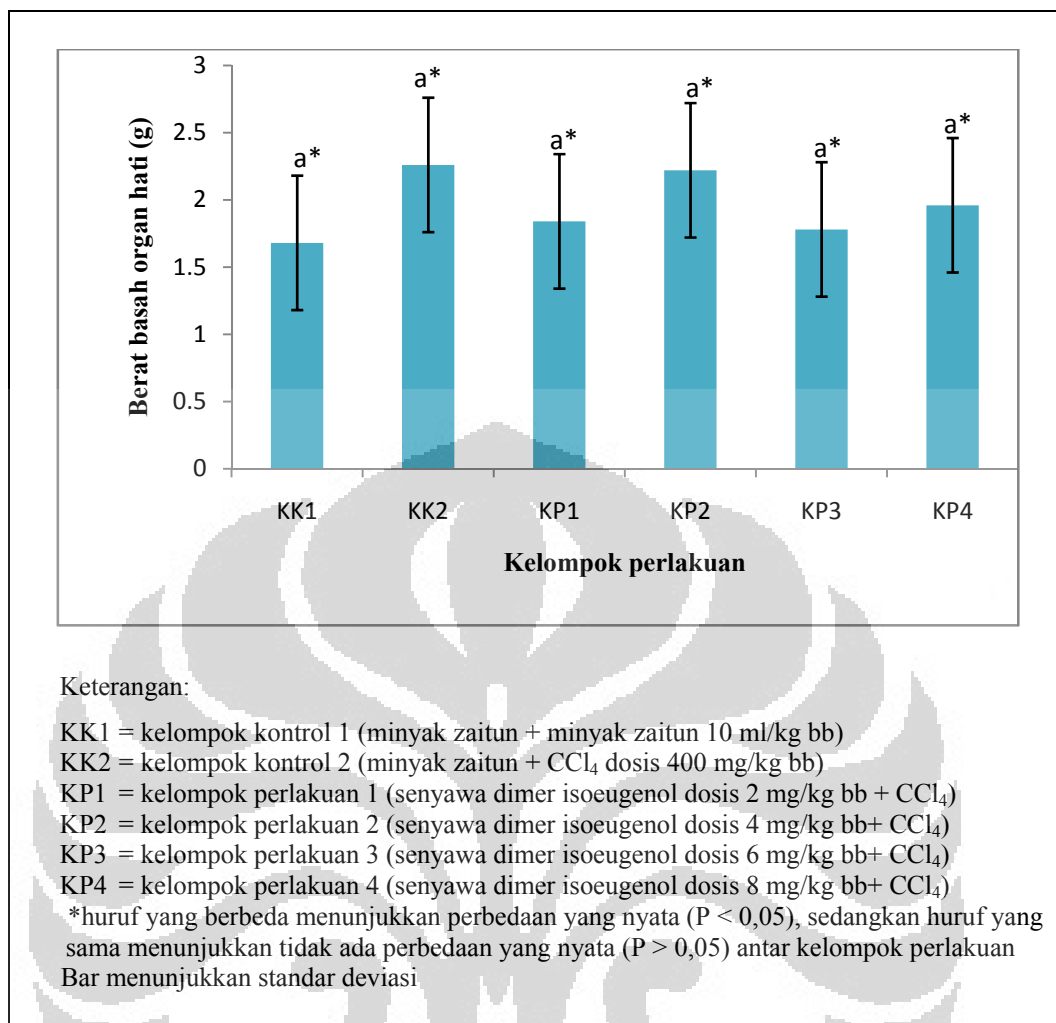
Data berat basah hati dianalisis dengan menggunakan uji homogenitas Levene dan uji normalitas Shapiro-Wilk. Hasil kedua uji tersebut menunjukkan nilai probabilitas (P) yang lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data berat basah hati berdistribusi normal dan bervariasi homogen (Lampiran 4 dan 5). Data berat basah tersebut selanjutnya diuji menggunakan uji anava (analisis variansi) satu faktor. Hasil uji anava menunjukkan nilai probabilitas (P) yang lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan tidak adanya pengaruh pemberian senyawa dimer isoeugenol terhadap berat basah hati mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Lampiran 6).

Tabel 4.1.1. Data berat basah organ hati tiap kelompok perlakuan

Ulangan	Berat basah hati mencit (g)					
	KK1	KK2	KP1	KP2	KP3	KP4
I	2,4	2,5	2,2	1,5	1,3	2,2
II	1,6	2,1	2,6	2,4	2,7	1,5
III	1,5	2,8	0,9	2,2	1,3	2,1
IV	1,3	1,3	2,1	2,5	1,7	2,2
V	1,6	2,6	1,4	2,5	1,9	1,8
$\sum X$	8,4	11,3	9,2	11,1	8,9	9,8
X	1,68	2,26	1,84	2,22	1,78	1,96
SD	0,42	0,59	0,68	0,42	0,58	0,30

Keterangan:

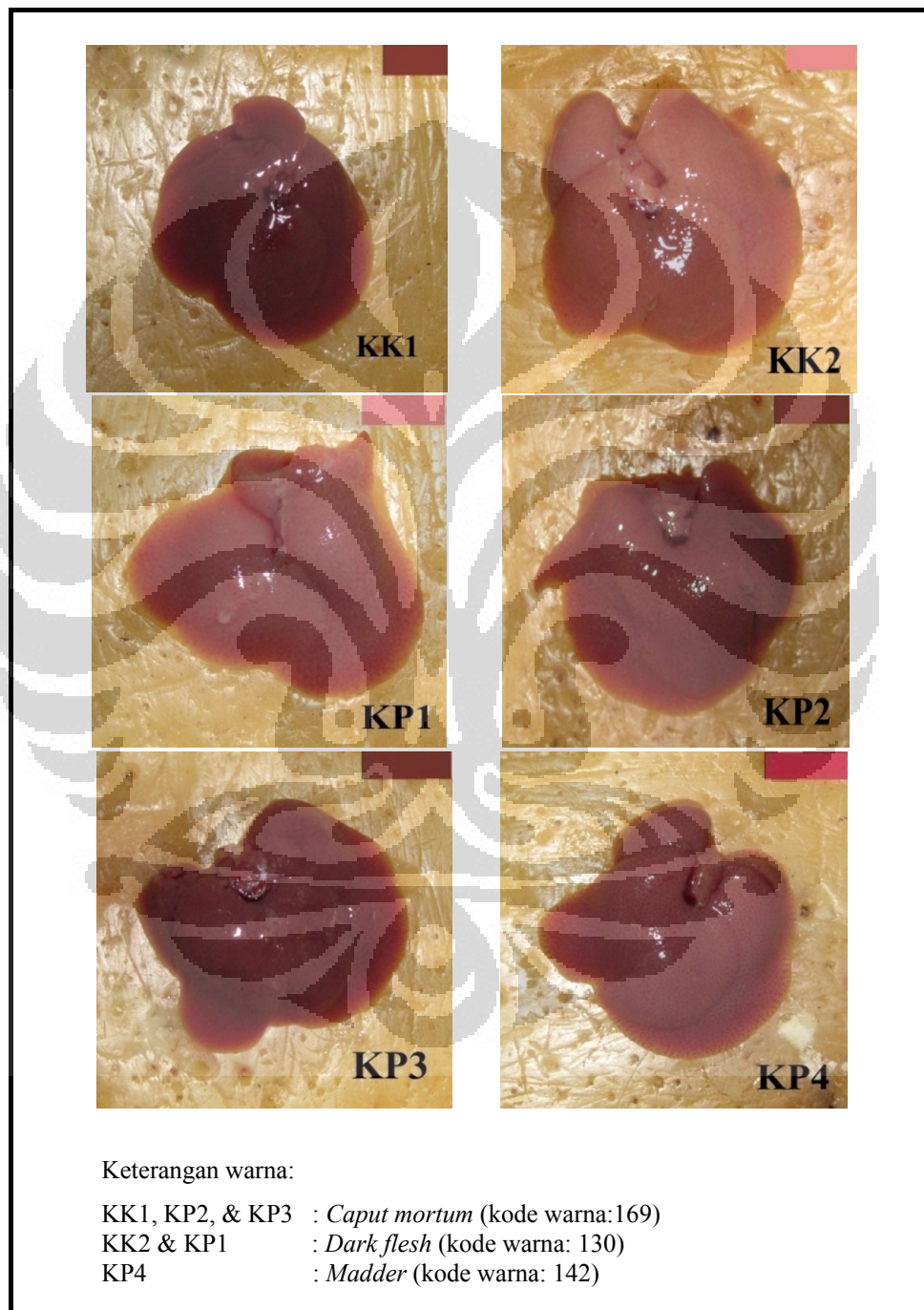
- KK1 = kelompok kontrol 1 (minyak zaitun + minyak zaitun 10 ml/kg bb)
 KK2 = kelompok kontrol 2 (minyak zaitun + CCl₄ dosis 400 mg/kg bb)
 KP1 = kelompok perlakuan 1 (senyawa dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb + CCl₄)
 KP2 = kelompok perlakuan 2 (senyawa dimer isoeugenol dosis 4 mg/kg bb+ CCl₄)
 KP3 = kelompok perlakuan 3 (senyawa dimer isoeugenol dosis 6 mg/kg bb+ CCl₄)
 KP4 = kelompok perlakuan 4 (senyawa dimer isoeugenol dosis 8 mg/kg bb+ CCl₄)
 $\sum X$ = jumlah nilai diameter vena sentralis
 X = nilai rata-rata diameter vena sentralis
 SD = standar deviasi



Gambar 4.1.1(1). Diagram batang rata-rata berat basah organ hati tiap kelompok perlakuan

Pengamatan makroskopik selanjutnya yang dilakukan terhadap hati adalah pengamatan warna hati. Pengamatan tersebut dilakukan dengan membandingkan warna hati yang masih segar dengan warna yang ada pada standar warna Faber Castell (Lampiran 12). Hasil pengamatan tersebut menunjukkan adanya perbedaan warna hati antar kelompok perlakuan. Hati kelompok kontrol 1 (KK1) berwarna merah kecoklatan (*caput mortum*, kode warna: 169), sedangkan hati kelompok kontrol 2 (KK2) berwarna merah pucat (*dark flesh*, kode warna: 130). Hasil pengamatan warna hati pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 2 (KP2) dan kelompok perlakuan 3 (KP3) memiliki warna hati yang sama dengan hati KK1. Kelompok perlakuan 1 (KP1) memiliki warna

hati yang sama dengan KK2 (*dark flesh*, kode warna: 130). Kelompok perlakuan 4 (KP4) (*madder*, kode warna: 142) memiliki hati yang berwarna merah lebih pucat jika dibandingkan dengan warna hati KK1, namun lebih kemerahan jika dibandingkan dengan KK2. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 4.1.1(2).



Gambar 4.1.1(2). Morfologi organ hati tiap kelompok perlakuan [Sumber standar warna: Faber Castell 2012: 1]

4.1.2 Pengamatan Mikroskopik Hati

4.1.2.1 Pengamatan Kuantitatif Diameter Vena Sentralis

Hasil pengamatan terhadap diameter vena sentralis pada kelompok kontrol normal (KK1), kelompok kontrol positif (KK2), kelompok perlakuan 1 (KP1), kelompok perlakuan 2 (KP2), kelompok perlakuan 3 (KP3), dan kelompok perlakuan 4 (KP4) dapat dilihat pada tabel 4.1.2.1 dan gambar 4.1.2.1. Data rata-rata diameter vena sentralis menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Diameter vena sentralis rata-rata pada KK1, KK2, KP1, KP2, KP3, dan KP4 secara berturut-turut adalah 90,88 μm ; 96,01 μm ; 95,27 μm ; 91,84 μm ; 91,32 μm ; dan 94,57 μm .

Tabel 4.1.2.1. Data rata-rata diameter vena sentralis tiap kelompok perlakuan

Ulangan	Diameter vena sentralis (μm)					
	KK1	KK2	KP1	KP2	KP3	KP4
I	82,85	102,74	99,12	94,97	95,08	94,87
II	94,73	94,51	98,63	96,24	95,80	115,31
III	96,59	109,25	97,17	99,34	84,20	98,41
IV	87,79	93,10	94,65	80,40	91,50	73,85
V	92,43	80,44	86,81	88,23	90	90,44
ΣX	454,40	480,04	476,37	459,18	456,59	472,88
X	90,88	96,01	95,27	91,84	91,32	94,57
SD	5,57	10,88	5,04	7,57	4,65	14,91

Keterangan:

KK1 = kelompok kontrol 1 (minyak zaitun + minyak zaitun 10 ml/kg bb)

KK2 = kelompok kontrol 2 (minyak zaitun + CCl_4 dosis 400 mg/kg bb)

KP1 = kelompok perlakuan 1 (senyawa dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb + CCl_4)

KP2 = kelompok perlakuan 2 (senyawa dimer isoeugenol dosis 4 mg/kg bb + CCl_4)

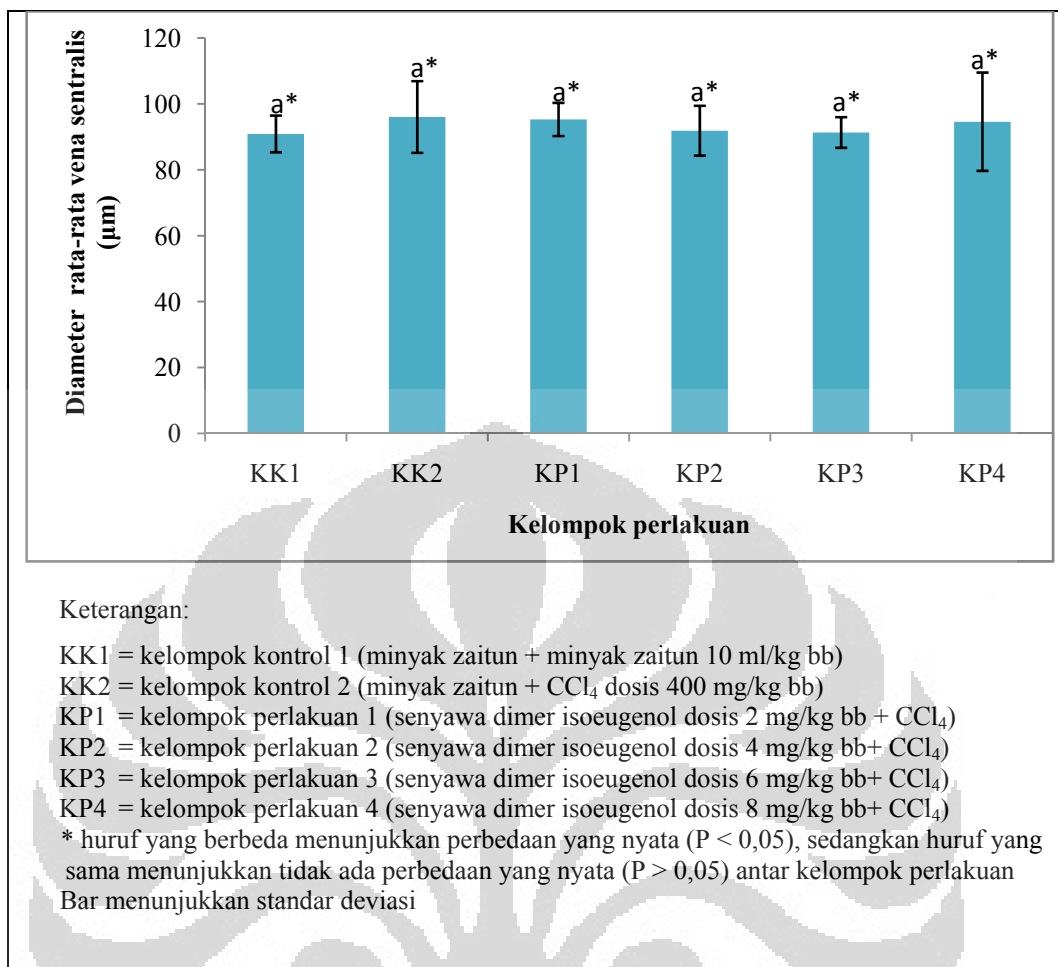
KP3 = kelompok perlakuan 3 (senyawa dimer isoeugenol dosis 6 mg/kg bb + CCl_4)

KP4 = kelompok perlakuan 4 (senyawa dimer isoeugenol dosis 8 mg/kg bb + CCl_4)

ΣX = jumlah nilai diameter vena sentralis

X = nilai rata-rata diameter vena sentralis

SD = standar deviasi



Gambar 4.1.2.1. Diagram batang rata-rata diameter vena sentralis tiap kelompok perlakuan

Data diameter vena sentralis dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji homogenitas Levene dan uji normalitas Shapiro-Wilk. Hasil kedua uji tersebut menunjukkan nilai probabilitas (P) yang lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter vena sentralis pada semua kelompok kontrol dan perlakuan berdistribusi normal dan bervariansi homogen (Lampiran 8 dan 9). Data diameter vena sentralis selanjutnya diuji menggunakan uji anava. Hasil uji anava menunjukkan nilai probabilitas (P) yang lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan tidak terdapat pengaruh pemberian senyawa dimer isoeugenol terhadap diameter vena sentralis hati mencit (Lampiran 10).

4.1.2.2 Pengamatan Semikuantitatif terhadap Kerusakan Lobulus Hati

Pengamatan semikuantitatif terhadap kerusakan lobulus hati dilakukan dengan mengamati derajat kerusakan lobulus hati. Derajat kerusakan lobulus hati dibagi dalam 4 kriteria tingkat kerusakan, yaitu tidak ada kerusakan (derajat kerusakan 0), kerusakan ringan (derajat kerusakan 1), kerusakan sedang (derajat kerusakan 2), dan kerusakan berat (derajat kerusakan 3). Data persentase derajat kerusakan hati pada tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.1.2.2 dan gambar 4.1.2.2. Data tersebut diperoleh dari pengamatan sediaan histologi tiap kelompok perlakuan.

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati menunjukkan pada KK1, nilai persentase lobulus hati normal sebesar 100% dan persentase derajat kerusakan hati pada derajat 1, 2, dan 3 sebesar 0%. Pada KK2, nilai persentase lobulus hati normal sebesar 0% dan persentase derajat kerusakan lobulus hati dengan tingkat kerusakan ringan sebesar 50%; tingkat kerusakan sedang sebesar 39%; dan tingkat kerusakan berat sebesar 11%. Data tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar hati KK2 mengalami kerusakan sebesar 10--40% dari luas lobulusnya.

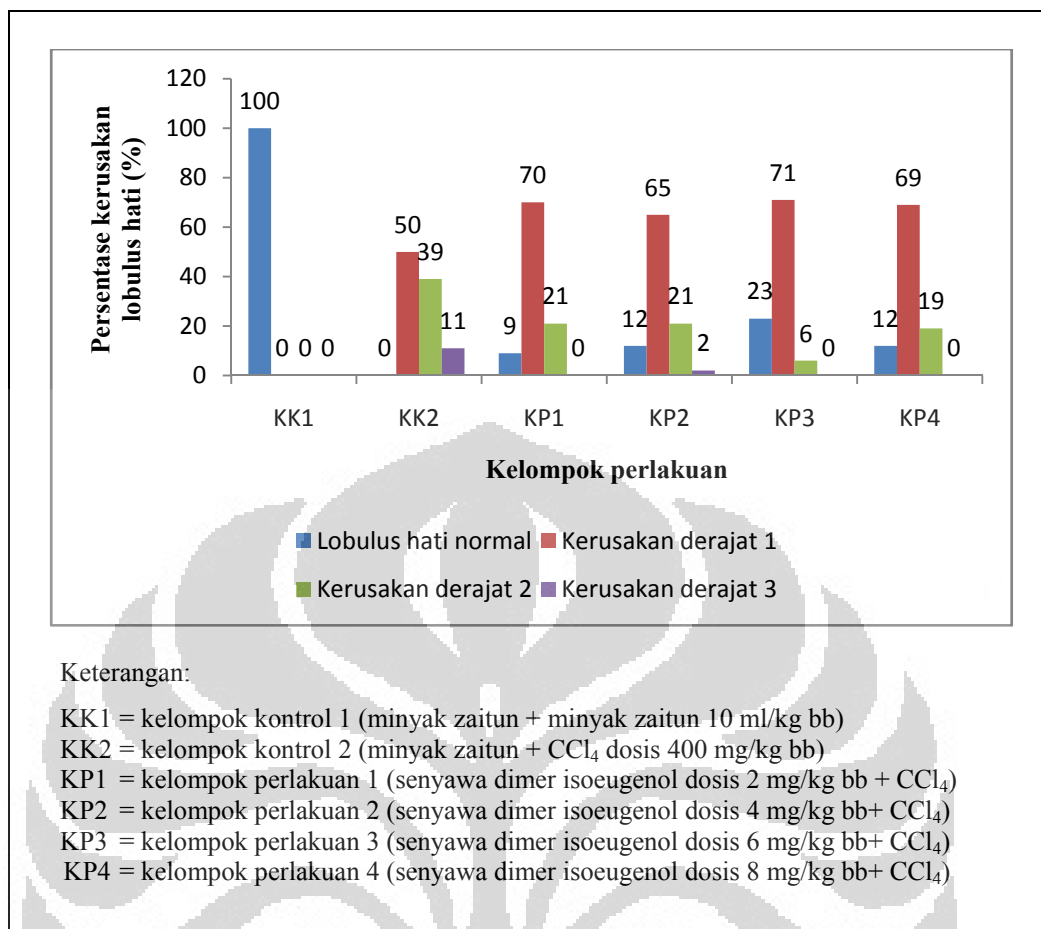
Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui pula bahwa nilai persentase lobulus hati normal yang paling mendekati KK1 adalah nilai yang dimiliki oleh KP3 (23%). Persentase derajat kerusakan menunjukkan bahwa kerusakan yang terjadi pada kelompok tersebut berupa kerusakan ringan yang terjadi pada kurang dari 20% luas lobulus hati. Data pengamatan pada KP1, KP2, dan KP4 menunjukkan nilai persentase lobulus hati normal pada KP1 sebesar 9%; pada KP2 dan KP4 sebesar 12%. Persentase derajat kerusakan menunjukkan bahwa sebagian besar kerusakan pada ketiga kelompok perlakuan tersebut berupa kerusakan ringan yang terjadi pada kurang dari 20% luas lobulus hati.

Tabel 4.1.2.2. Data persentase rata-rata lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati tiap kelompok perlakuan

Ulangan	Persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati (%)																							
	KK1				KK2				KP1				KP2				KP3				KP4			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
I	100	0	0	0	0	26	30	43	0	63	37	0	3	70	23	3	23	60	17	0	10	57	33	0
II	100	0	0	0	0	66	33	0	43	50	7	0	10	20	60	10	57	43	0	0	0	77	23	0
III	100	0	0	0	0	53	47	0	0	100	0	0	20	60	20	0	0	100	0	0	40	27	30	0
IV	100	0	0	0	0	50	43	7	0	40	60	0	3	97	0	0	0	87	13	0	7	93	7	0
V	100	0	0	0	0	53	40	7	0	100	0	0	23	77	0	0	33	67	0	0	3	93	3	0
ΣX	500	0	0	0	0	250	193	57	43	353	104	0	59	324	103	13	113	357	30	0	60	347	97	0
X	100	0	0	0	0	50	39	11	9	70	21	0	12	65	21	2	23	71	6	0	12	69	19	0

Keterangan:

- KK1 = kelompok kontrol 1 (minyak zaitun + minyak zaitun 10 ml/kg bb)
- KK2 = kelompok kontrol 2 (minyak zaitun + CCl₄ dosis 400 mg/kg bb)
- KP1 = kelompok perlakuan 1 (senyawa dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb + CCl₄)
- KP2 = kelompok perlakuan 2 (senyawa dimer isoeugenol dosis 4 mg/kg bb+ CCl₄)
- KP3 = kelompok perlakuan 3 (senyawa dimer isoeugenol dosis 6 mg/kg bb+ CCl₄)
- KP4 = kelompok perlakuan 4 (senyawa dimer isoeugenol dosis 8 mg/kg bb+ CCl₄)
- 0 = lobulus hati normal
- 1 = derajat 1 (kerusakan ringan = kerusakan < 20% luas lobulus)
- 2 = derajat 2 (kerusakan sedang = kerusakan 20%--40% luas lobulus)
- 3 = derajat 3 (kerusakan berat = kerusakan >40% luas lobulus)
- ΣX = jumlah nilai persentase derajat kerusakan hepatosit
- X = nilai rata-rata persentase derajat kerusakan hepatosit

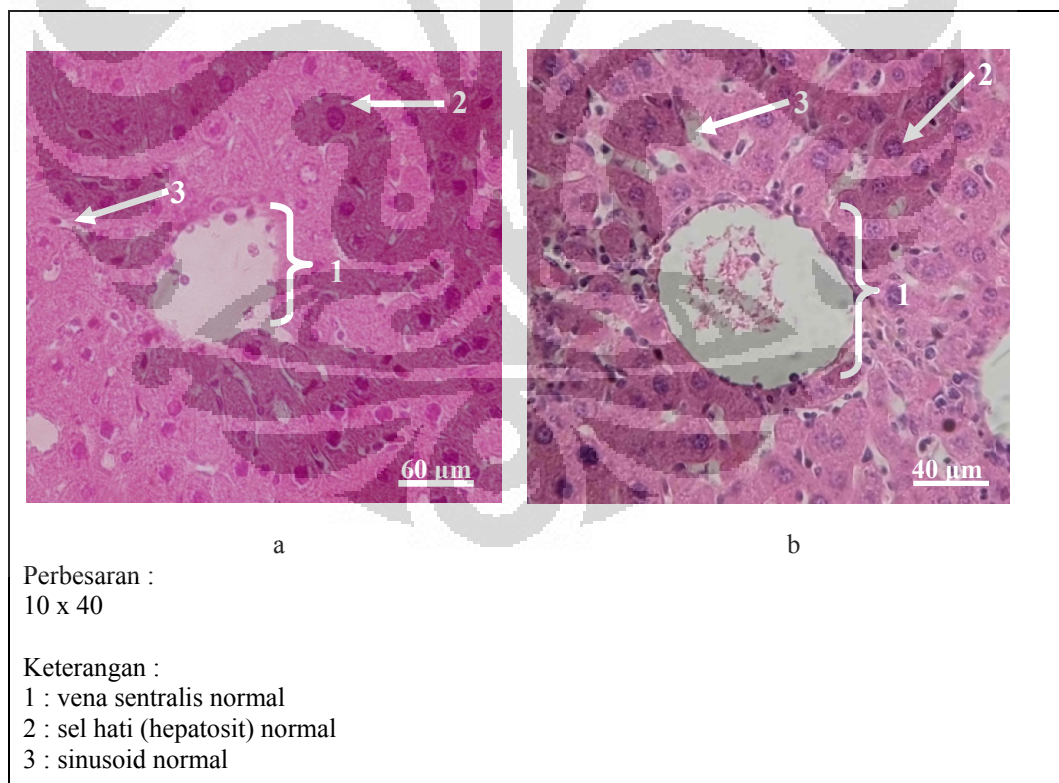


Gambar 4.1.2.2. Diagram batang persentase rata-rata lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati tiap kelompok perlakuan

4.1.2.3 Pengamatan Gambaran Histologis Hati

Gambaran histologis hati diamati menggunakan mikroskop cahaya. Pengamatan tersebut dilakukan untuk melihat keadaan dan berbagai jenis kerusakan yang terjadi pada histologi hati kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

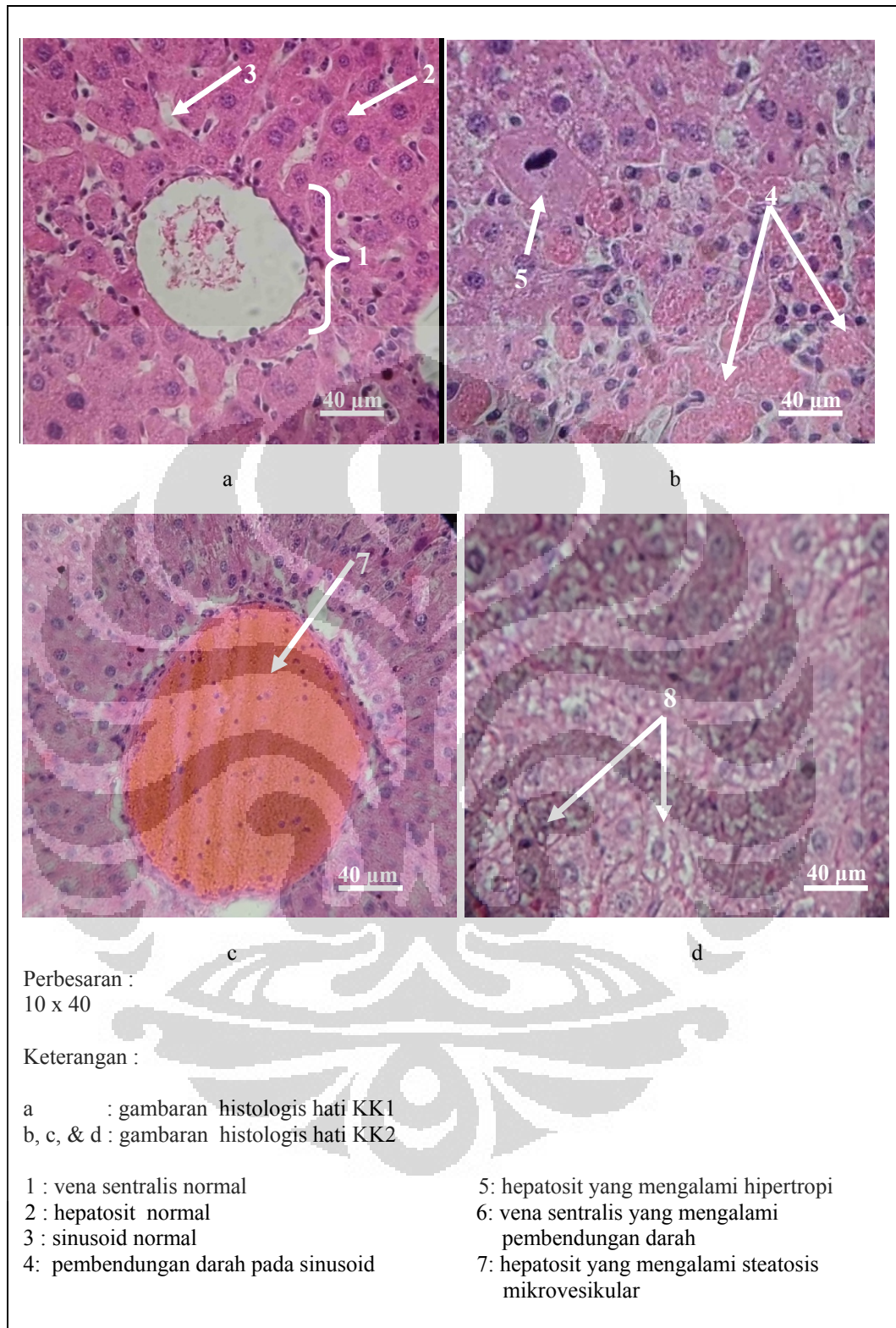
Gambaran histologis hati kelompok kontrol 1 (KK1) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(1). Keadaan histologis hati pada kelompok tersebut menunjukkan gambaran hepatosit normal yang tersusun secara radial pada lobulus hati. Hepatosit- hepatosit tersebut terlihat beranastomosa dengan sinusoid-sinusoid tempat mengalirnya darah yang akan bermuara di vena sentralis. Vena sentralis merupakan pembuluh darah yang terletak di bagian tengah lobulus atau pada zona sentrolobular (zona III asinus). Keadaan tersebut menunjukkan bahwa histologi hati KK1 normal (Dellmann & Brown 1992: 399).



Gambar 4.1.2.3(1). Histologis hati kelompok kontrol 1 (KK1)

Gambaran histologis hati kelompok kontrol 2 (KK2) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(2). Keadaan histologis hati pada kelompok tersebut tidak normal jika dibandingkan dengan KK1 (Gambar 4.1.2.3(2)a). Pada gambar 4.1.2.3(2)b terdapat hepatosit yang mengalami hipertropi. Sel tersebut memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan hepatosit normal. Dari gambaran histologis tersebut ditemukan pula sinusoid-sinusoid yang terisi oleh sel-sel darah. Sel-sel tersebut terlihat berwarna merah terang dan mengisi sinusoid-sinusoid hati.

Pada gambar 4.1.2.3(2)c, terdapat vena sentralis yang mengalami pembendungan darah. Pembendungan tersebut ditandai oleh adanya massa yang berwarna merah yang menutupi lumen vena sentralis. Pada gambar 4.1.2.3(2)d terdapat hepatosit yang mengalami perlemakan (steatosis). Sel-sel tersebut terlihat sebagai vesikel-vesikel kosong yang tadinya berisi lemak, namun karena proses pembuatan dan pewarnaan preparat, lemak tersebut larut dalam alkohol, sehingga yang tersisa hanya vesikel-vesikel kosong (Klaassen & Watkins III 1999: 316). Pada steatosis tersebut inti sel masih dapat dilihat, sehingga perlemakan yang terjadi pada hepatosit KK2 digolongkan sebagai steatosis mikrovesikular (Kumar dkk. 2005: 880). Selain dari jenis kerusakan yang dapat dilihat pada gambar ini, pada KK2 juga ditemukan kerusakan berupa fibrosis yang tidak nampak disini.

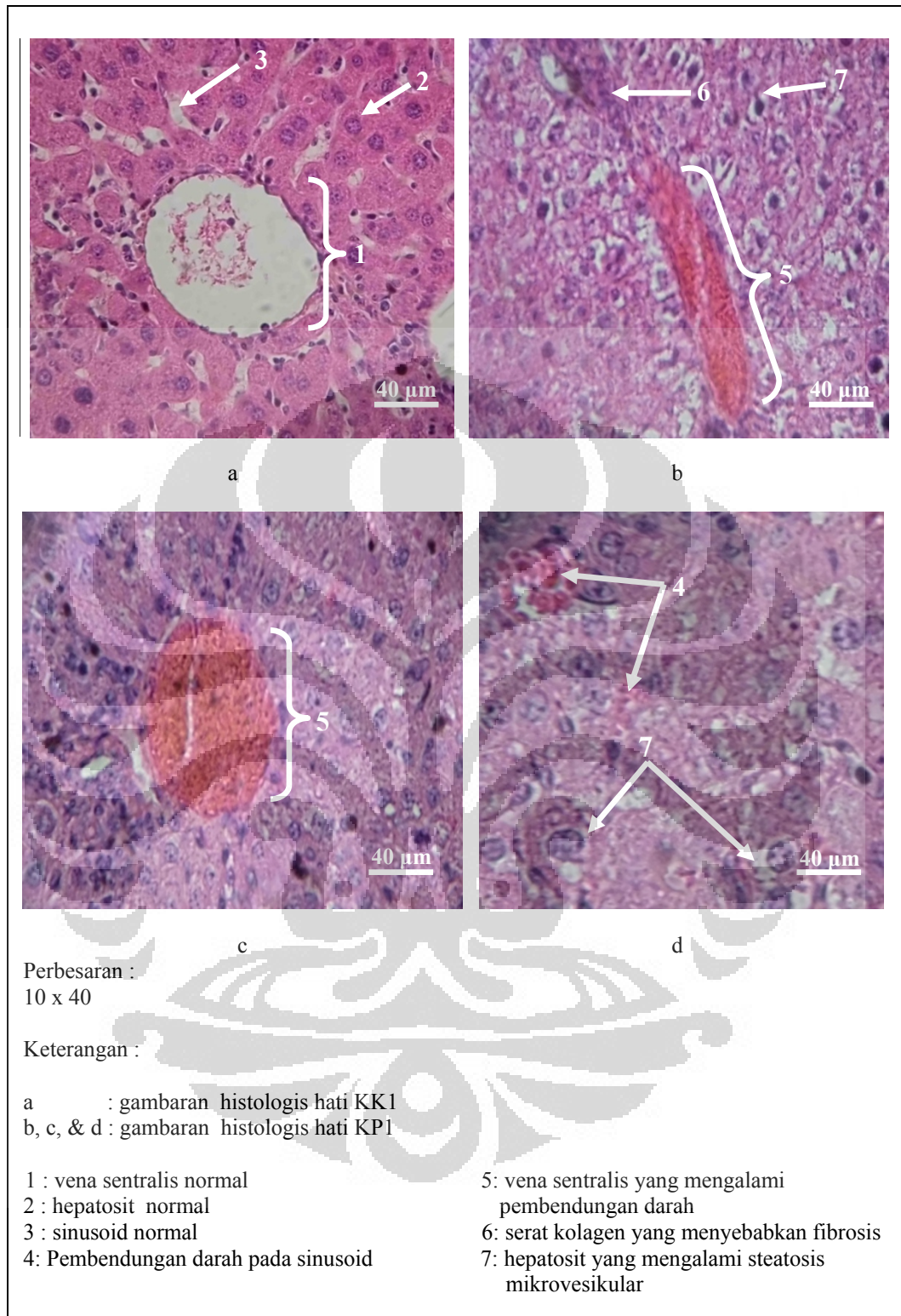


Gambar 4.1.2.3(2). Perbandingan histologis hati KK1 & KK2

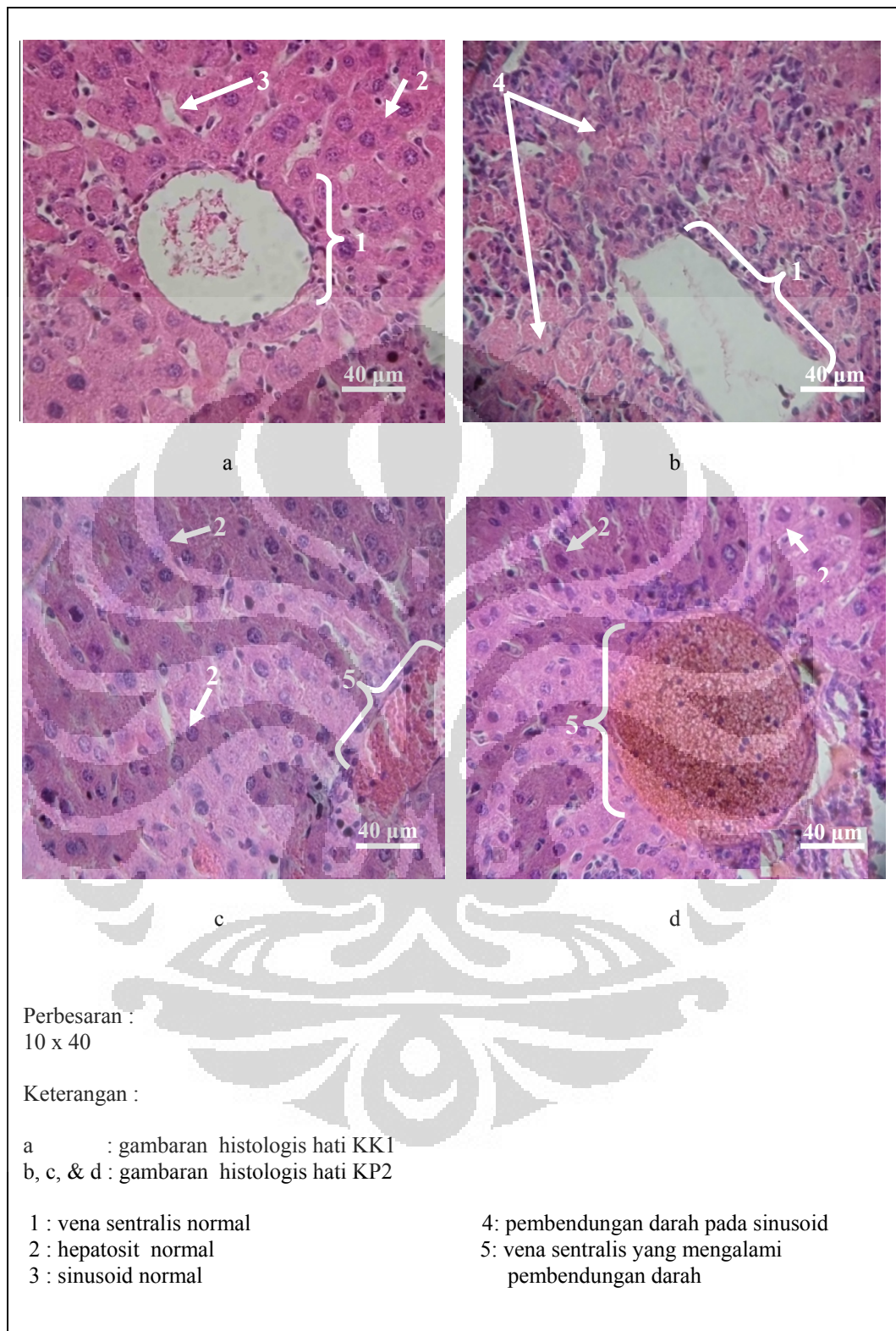
Gambaran histologis kelompok perlakuan 1 (KP1) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(3). Keadaan histologis hati pada kelompok tersebut menunjukkan gambaran sel-sel hati yang tidak normal jika dibandingkan dengan KK1 (Gambar 4.1.2.3(3)a). Pada gambar 4.1.2.3(3)b dan gambar 4.1.2.3(3)d terdapat sel-sel hati yang mengalami perlemakan (steatosis). Berdasarkan gambar tersebut, perlemakan yang terjadi pada KP1 tergolong sebagai steatosis mikrovesikular (sama dengan steatosis yang terjadi pada KK2) karena inti dari sel-sel tersebut masih terlihat utuh dan belum tergantikan oleh lemak (Kumar dkk. 2005: 880). Selain itu, terdapat pula pita berwarna keunguan yang merupakan serat kolagen yang terbentuk dari sel fibroblas yang menyebabkan fibrosis pada hati (Lu 1995: 213).

Dari gambaran histologis KP1 terdapat pula vena sentralis yang mengalami pembendungan darah (Gambar 4.1.2.3(3)b dan Gambar 4.1.2.3(3)c). Pembendungan tersebut berupa massa berwarna merah yang merupakan darah yang membendung lumen vena sentralis. Pada gambar 4.1.2.3(3)d terdapat pula adanya pembendungan pada sinusoid-sinusoid hati.

Gambaran histologis hati kelompok perlakuan 2 (KP2) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(4). Berdasarkan gambaran tersebut, hepatosit pada kedua gambar (Gambar 4.1.2.3(4)c&d) menunjukkan morfologi hepatosit normal yang menyerupai keadaan hepatosit pada KK1. Namun, keadaan histologis hati pada kelompok tersebut juga menunjukkan adanya pembendungan darah pada sinusoid-sinusoid hepatosit (Gambar 4.1.2.3(4)b dan juga pada vena sentralis (Gambar 4.1.2.3(4)c&d). Pembendungan darah di sinusoid, pada gambar terlihat sebagai sel-sel darah berwarna merah terang yang mengisi sinusoid-sinusoid hati, sedangkan pembendungan pada vena sentralis terlihat sebagai massa berwarna merah yang merupakan darah yang membendung lumen vena sentralis. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa histologi KP2 belum tergolong normal jika dibandingkan dengan KK1 (Gambar 4.1.2.3(4)a).



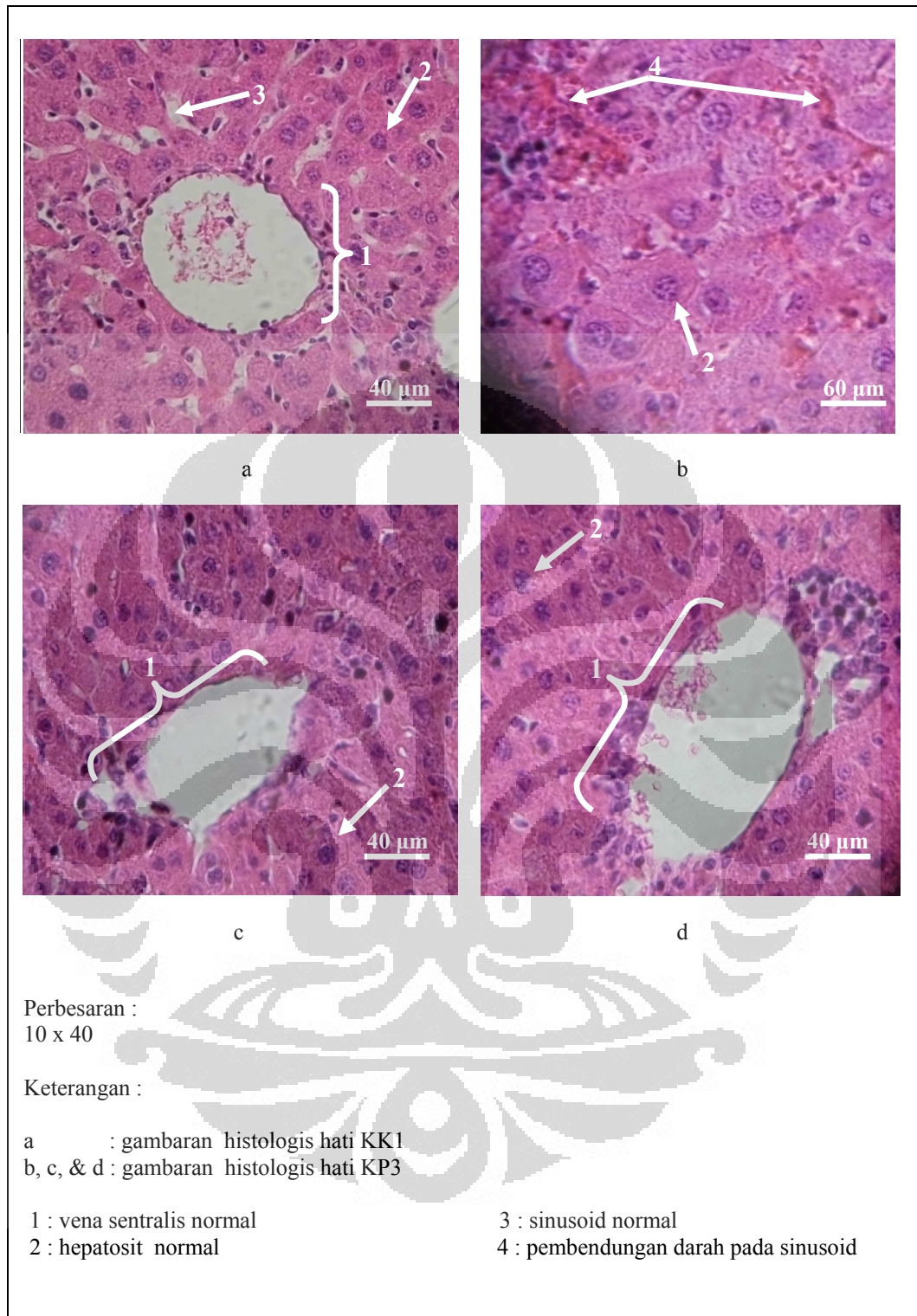
Gambar 4.1.2.3(3). Perbandingan histologis hati KK1 & KP1



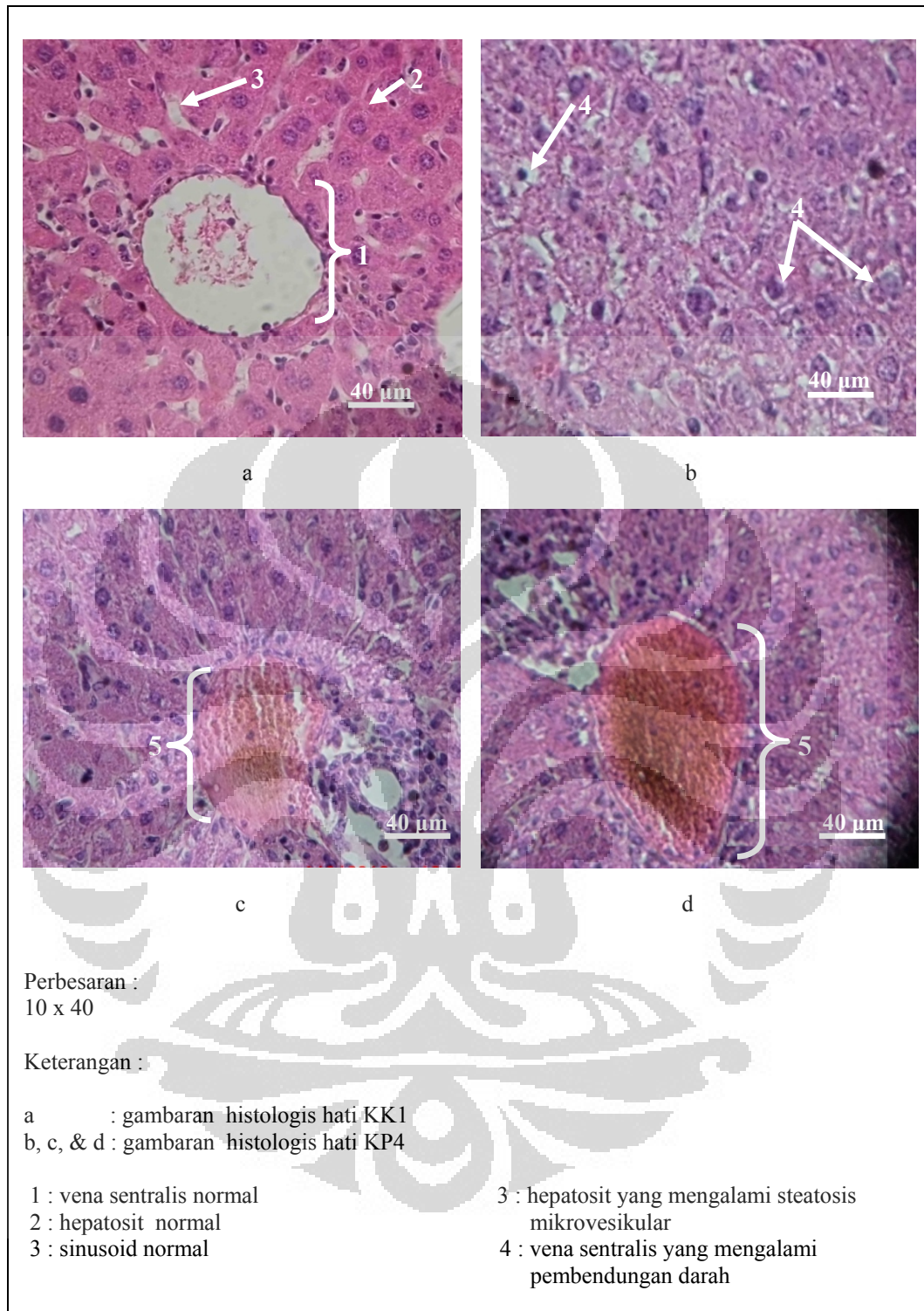
Gambar 4.1.2.3(4). Perbandingan histologis hati KK1 & KP2

Gambaran histologis hati kelompok perlakuan 3 (KP3) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(5). Keadaan histologis hati pada kelompok tersebut menunjukkan gambaran hepatosit yang hampir mendekati keadaan hepatosit normal pada KK1 (Gambar 4.1.2.3(5)a), meskipun masih ditemukan adanya hepatosit yang mengalami pembendungan darah pada sinusoid-sinusoidnya (Gambar 4.1.2.3(5)b). Pembendungan tersebut terlihat sebagai sel-sel darah berwarna merah terang yang mengisi sinusoid-sinusoid hati. Berdasarkan gambaran histologis KP3, terdapat pula hepatosit-hepatosit dan vena sentralis yang menunjukkan kondisi normal berdasarkan perbandingan dengan KK1 (Gambar 4.1.2.3(5)b,c,&d).

Gambaran histologis hati kelompok perlakuan 4 (KP4) dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(6). Keadaan histologis hati pada kelompok tersebut menunjukkan gambaran hepatosit yang kerusakannya lebih parah jika dibandingkan dengan KP3 dan menunjukkan keadaan yang tidak normal jika dibandingkan dengan KK1 (Gambar 4.1.2.3(6)a). Pada hasil pengamatan yang dapat dilihat pada gambar 4.1.2.3(6)b, terdapat hepatosit yang mengalami steatosis mikrovesikular (Kumar dkk. 2005: 880). Selain itu terdapat pula vena sentralis yang mengalami pembendungan darah yang terlihat sebagai lumen vena sentralis yang tertutup oleh massa yang berwarna merah yang merupakan darah yang membendung pembuluh tersebut. Pada KP4 terdapat pula kerusakan berupa fibrosis dan hipertropi yang tidak nampak pada gambar ini.



Gambar 4.1.2.3(5). Perbandingan histologis hati KK1 & KP3



Gambar 4.1.2.3(6). Perbandingan histologis hati KK1 & KP4

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pengamatan Makroskopik Hati

Pengamatan makroskopik hati dilakukan dengan mengamati warna dan berat basah organ hati. Pengamatan warna hati dilakukan dengan membandingkan warna hati yang masih segar dengan warna yang ada pada standar warna Faber Castell (2012: 1). Pengamatan berat basah organ hati dilakukan dengan menimbang organ hati yang masih segar pada timbangan digital.

Hasil pengamatan terhadap warna hati menunjukkan bahwa warna hati kelompok kontrol 1 (KK1) berwarna merah kecoklatan (*caput mortum*, kode warna: 169) dalam keadaan segar (Gambar 4.1.1(2)). Warna tersebut menunjukkan bahwa terdapat banyak aliran darah pada hati, sehingga organ tersebut terlihat berwarna merah kecoklatan. Aliran darah tersebut difasilitasi oleh banyaknya pembuluh darah yang terdapat pada hati. Menurut Shier dkk. (2002: 709), vaskularisasi yang tinggi pada hati menyebabkan organ tersebut memiliki aliran darah yang banyak, sehingga organ tersebut terlihat berwarna merah kecoklatan dalam keadaan segar.

Darah pada hati mengalir dengan laju aliran 84 ml/menit/100 g jaringan hati (Greep 1953: 587). Darah tersebut terlihat berwarna merah, karena tersusun dari elemen bentukan (*formed elements*) yang 99,9%-nya adalah sel darah merah (Martini 1995: 654). Masing-masing sel darah merah mengandung \pm 280 juta molekul hemoglobin. Molekul tersebut mengandung heme, yaitu molekul berpigmen merah yang mengandung besi.

Hasil pengamatan warna organ hati kelompok kontrol 2 (KK2) menunjukkan bahwa organ hati segar pada kelompok tersebut berwarna merah pucat (*dark flesh*, kode warna: 130) pada keadaan segar (Gambar 4.1.1(2)). Warna tersebut menunjukkan bahwa aliran darah pada hati kelompok tersebut terganggu, sehingga warna segar hati terlihat berwarna merah pucat. Gangguan aliran darah tersebut dapat disebabkan oleh pemberian CCl_4 yang bersifat hepatotoksik (Lu 1995: 210). Menurut Heibatollah dkk. (2008: 143), CCl_4 akan

dimetabolisme di hati melalui suatu reaksi oksidasi yang dikatalis oleh enzim sitokrom p-450. Hasil metabolisme tersebut akan menghasilkan produk radikal bebas berupa radikal triklorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) atau radikal trikloroperoksil ($\text{CCl}_3 \cdot \text{O}_3$) yang akan berikatan secara kovalen dengan makromolekul di dalam sel dan menginisiasi peroksidasi lipid pada membran sel. Peroksidasi lipid tersebut akan menyebabkan kerusakan hepatoseluler dan pembentukan jaringan fibrosa pada hati. Pembentukan jaringan fibrosa akan menyebabkan deposit kolagen pada lobulus hati, sehingga mengganggu pola aliran darah hati. Hal tersebut diduga merupakan penyebab pucatnya warna hati KK2.

Hasil pengamatan warna hati yang dilakukan pada kelompok perlakuan pemberian dimer isoeugenol menunjukkan bahwa warna hati kelompok perlakuan 2 (KP1) dan kelompok perlakuan 3 (KP3) menyerupai warna hati kelompok kontrol 1 (KK1) yaitu berwarna merah kecoklatan (*caput mortum*, kode warna: 169) pada keadaan segar (Gambar 4.1.1(2)). Warna tersebut menunjukkan adanya aliran darah yang banyak pada hati kedua kelompok tersebut. Menurut Lesson dkk. (1996: 383), aliran darah yang banyak pada hati menyebabkan organ tersebut berwarna merah kecoklatan dalam keadaan segar. Hasil pengamatan warna hati pada kedua kelompok tersebut juga menunjukkan bahwa ada kemungkinan pengaruh hepatoprotektif pemberian dimer isoeugenol terhadap warna hati KP2 dan KP3.

Pengamatan warna hati kelompok perlakuan 1 (KP1) (*dark flesh*, kode warna: 130) menunjukkan bahwa warna hati kelompok tersebut sama dengan warna hati KK2. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada organ hati kelompok tersebut juga terjadi gangguan aliran darah pada hati yang menyebabkan warna hati kelompok tersebut pucat. Gangguan aliran darah tersebut dapat disebabkan oleh pemberian CCl_4 yang bersifat hepatotoksik (Lu 1995: 210) dan belum memadainya dosis dimer isoeugenol yang diberikan untuk melindungi hati.

Pengamatan warna hati pada kelompok perlakuan 4 (KP4) (*madder*, kode warna: 142) menunjukkan bahwa warna hati kelompok tersebut cenderung lebih pucat dibandingkan warna hati KK1, dan jauh lebih kemerahan dibandingkan warna hati KK2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terjadi gangguan pada aliran darah hati kelompok tersebut, namun gangguan aliran darah tersebut tidak separah

pada KK2. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, gangguan aliran darah tersebut dapat disebabkan oleh pengaruh hepatotoksik dari pemberian CCl_4 (Lu 1995: 210).

Data berat basah organ hati dianalisis dengan menggunakan program statistik. Hasil analisis menggunakan uji anava menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh pemberian dimer isoeugenol terhadap berat basah hati. Menurut Lu (1995: 210), toksisitas yang disebabkan oleh CCl_4 menyebabkan terjadinya perlemakan pada hati. Berat lemak yang ditimbun dalam sel-sel hati diduga sebanding dengan berat sitoplasma sel-sel hati yang digantikan oleh lemak tersebut, sehingga berat basah antar kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Selain itu, Lu (1995: 210) juga mengatakan bahwa CCl_4 menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel. Menurut Greep (1953: 595) hal tersebut menyebabkan sel-sel yang menyusun jaringan hati rusak dan terjadi penimbunan lemak tak jenuh pada hati.

4.2.2 Pengamatan Mikroskopik Hati

Data diameter vena sentralis dianalisis dengan menggunakan program statistik. Hasil analisis menggunakan anava menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh pemberian dimer isoeugenol terhadap diameter vena sentralis. Menurut Martini (1995: 721), vena sentralis merupakan suatu venula yang tersusun dari selapis sel endotel dan tunika eksterna. Tunika eksterna tersusun dari jaringan ikat yang mengandung serat kolagen dan otot polos. Komponen penyusun tunika eksterna tersebutlah yang berperan dalam mengatur diameter vena sentralis. Perlakuan yang diberikan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diduga tidak memberikan pengaruh terhadap komponen penyusun tunika eksterna, sehingga diameter vena sentralis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda secara statistik. Meskipun pemberian dimer isoeugenol secara oral dan injeksi CCl_4 secara intraperitoneal tidak menunjukkan pengaruh terhadap diameter vena sentralis, namun jika dilihat dari data persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus serta hasil gambaran histologis masing-masing kelompok perlakuan, terdapat pengaruh pemberian dimer isoeugenol

secara oral maupun CCl_4 secara intraperitoneal terhadap lobulus hati mencit (Gambar 4.1.2.3(1)--Gambar 4.1.2.3(6)).

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati menunjukkan pada KK1, nilai persentase lobulus hati normal sebesar 100% dan persentase derajat kerusakan hati pada derajat 1, 2, dan 3 sebesar 0%. Data tersebut menunjukkan bahwa organ hati kelompok tersebut normal. Data tersebut didukung oleh data pengamatan gambaran histologis hati kelompok tersebut (Gambar 4.1.2.3(1)). Data gambaran histologis tersebut menunjukkan bahwa hepatosit KK1 berbentuk polihedral dan tersusun secara radial disekitar sinusoid hati. Menurut Bevelander & Ramaley (1988: 289), hepatosit normal tersusun secara radial dari tepi lobulus hingga ke vena sentralis. Sel-sel tersebut berbentuk polihedral dengan inti bulat dan terletak di tengah. Sel-sel tersebut juga beranastomosa dan berbatasan dengan sinusoid-sinusoid yang berisi darah (Dellmann & Brown 1992: 399).

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati pada KK2 menunjukkan nilai persentase lobulus hati normal sebesar 0% dan persentase derajat kerusakan lobulus hati dengan tingkat kerusakan ringan sebesar 50%; tingkat kerusakan sedang sebesar 39%; dan tingkat kerusakan berat sebesar 11%. Data tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar hati KK2 mengalami kerusakan pada 10--40% dari luas lobulusnya. Kerusakan sel-sel hati dapat menyebabkan metabolisme senyawa endogen dan eksogen terganggu. Hal tersebut dapat menyebabkan sejumlah efek berupa penyakit yang terjadi pada hati, contohnya penyakit kuning, hipertensi portal, hingga gagal hati (Copstead & Banasik 2000: 853). Data tersebut didukung oleh gambaran histologis hati dari kelompok tersebut (Gambar 4.1.2.3(2)).

Kerusakan hati pada KK2 dapat disebabkan oleh pemberian CCl_4 . Di dalam hati, CCl_4 akan mengalami suatu proses metabolisme yang bertujuan mengurangi efek toksik senyawa tersebut dan untuk mempermudah eliminasi senyawa tersebut dari tubuh. Proses tersebut dilakukan melalui reaksi biotransformasi tahap I dan tahap II. Pada reaksi tahap I, CCl_4 akan mengalami biotransformasi menjadi senyawa yang lebih polar. Proses tersebut dilakukan melalui penambahan satu atau lebih gugus polar seperti gugus hidroksil (-OH)

atau karboksil (-COOH) reaksi oksidasi. Enzim yang berperan dalam reaksi tersebut adalah enzim sitokrom p-450 (Rhoades & Tanner 1995: 573).

Hasil katalisis oleh enzim tersebut malah menghasilkan suatu produk radikal berupa radikal triklorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) dan radikal trikloroperoksil ($\text{CCl}_3 \cdot\text{O}_3$) yang lebih reaktif (WHO 1999: 43). Produk radikal tersebut menyebabkan peroksidasi lemak tak jenuh pada membran fosfolipid dengan cara berikatan secara kovalen pada protein dan lemak tak jenuh dari membran sel. Pengikatan radikal tersebut menyebabkan perubahan kimia dalam membran sel, sehingga menyebabkan pecahnya sel, bahkan dapat menyebabkan kematian sel (Lu 1995: 37).

Data gambaran histologis KK2 menunjukkan terdapat hepatosit yang mengalami hipertropi. Menurut Greep (1953: 596), hipertropi merupakan peningkatan ukuran hepatosit yang mencakup peningkatan volume dan massa sel tersebut. Keadaan tersebut merupakan respon dari kerusakan yang terjadi pada hepatosit. Kerusakan tersebut diduga disebabkan oleh pemberian CCl_4 yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran hepatosit, sehingga menyebabkan kerusakan pada hepatosit dan memicu terjadinya hipertropi.

Berdasarkan gambaran histologis pada KK2 ditemukan pula adanya perlemakan berupa steatosis mikrovesikular, yaitu penggantian sitoplasma sel oleh lemak (Kumar dkk. 2005: 880). Selain itu, terdapat pula adanya pembendungan darah pada sinusoids-sinusoid hati. Menurut Greep (1953: 595), sebagian sinusoid hati berfungsi sebagai tempat mengalirnya darah yang bermuara di vena sentralis, namun sebagian lainnya inaktif dan dijadikan sebagai tempat menampung darah. Paparan toksikan dapat meningkatkan penampungan darah pada pembuluh tersebut, sehingga menyebabkan banyaknya darah yang tertampung pada pembuluh tersebut.

Selain pembendungan pada sinusoid-sinusoid hati, pada KK2 ditemukan pula pembendungan pada vena sentralis. Vena sentralis merupakan suatu venula yang tersusun oleh selapit sel endotelium dan tunika eksterna. Di dalam tunika eksterna tersebut terdapat suatu katup yang mencegah darah kembali ke sinusoid-sinusoid hati (Fox 2009: 401). Paparan toksikan dapat merusak mekanisme penutupan oleh katup tersebut, sehingga menyebabkan terjadinya pembendungan darah pada vena sentralis. Selain kerusakan yang tampak pada gambar 4.1.2.3(2),

pada KK2 juga ditemukan kerusakan lain berupa fibrosis yang tidak nampak pada gambar tersebut.

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal menunjukkan adanya pengaruh hepatoprotektif dari dimer isoeugenol yang diberikan terhadap histologi hati mencit pada kelompok perlakuan. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa terjadi kenaikan nilai persentase lobulus hati normal dari kelompok perlakuan mendekati nilai KK1. Nilai yang paling mendekati adalah nilai persentase lobulus hati normal dari KP3 yaitu sebesar 23% dan disusul oleh KP2 dan KP4 sebesar 12%. Nilai persentase lobulus hati normal terendah pada kelompok perlakuan terdapat pada KP1, yaitu sebesar 9%. Lobulus hati normal ditandai oleh adanya hepatosit normal berbentuk polihedral dan tersusun secara radial dari tepi lobulus hingga ke bagian tengah lobulus hati. Sel-sel tersebut beranastomosa dan berbatasan dengan sinusoid-sinusoid yang berisi darah (Dellmann & Brown 1992: 399).

Data pengamatan pada KP1, KP2, dan KP4 menunjukkan nilai persentase lobulus hati normal pada KP1 sebesar 9%; pada KP2 dan KP4 sebesar 12%. Nilai persentase derajat kerusakan lobulus hati menunjukkan sebagian besar kerusakan pada ketiga kelompok perlakuan tersebut berupa kerusakan ringan yang terjadi pada kurang dari 20% luas lobulus hati. Dibandingkan dengan KK2, keadaan hati pada ketiga kelompok perlakuan tersebut dapat dikatakan lebih rendah tingkat kerusakannya dan menunjukkan keadaan histologis yang semakin membaik mendekati keadaan histologis KK1. Hal tersebut diduga merupakan efek hepatoprotektif yang diberikan oleh dimer isoeugenol. Efek tersebut berasal dari kemampuan *radical scavenger* dan aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh dimer isoeugenol (Yuda 2007: 64).

Berdasarkan hasil pengamatan gambaran histologis hati dari KP1, KP2, dan KP4 diketahui terdapat sejumlah kerusakan seperti pembendungan darah pada sinusoid-sinusoid hati dan juga pada vena sentralis, perlemakan (steatosis), dan fibrosis. Menurut Wiggers (1955: 928), perlemakan dapat terjadi akibat pajanan toksikan yang menyebabkan terganggunya metabolisme lemak, sehingga lemak dalam jumlah banyak didepositkan di dalam jaringan. Toksikan seperti CCl₄ dapat menyebabkan gangguan pada metabolisme lemak, seperti penghambatan

sintesis unit protein yang membentuk lipoprotein dan gangguan pada proses konjugasi trigliserida dengan lipoprotein (Lu 1995: 210). Hal tersebut menyebabkan terjadinya penimbunan lemak yang tidak dimetabolisme pada hepatosit. Perlemakan yang terjadi pada KP1 dan KP2 berupa steatosis mikrovesikular, yaitu penggantian sitoplasma sel oleh lemak. Apabila perlemakan tersebut terus terjadi dalam jangka panjang, maka dapat terjadi steatosis makrovesikular, yaitu penggantian inti sel dan sitoplasma hepatosit oleh lemak. Keadaan tersebut dapat menyebabkan kematian sel-sel hati (Kumar dkk. 2005: 880).

Kematian pada hepatosit akan memicu mekanisme regenerasi sel-sel tersebut. Menurut Sherwood (2004: 623), apabila terjadi kerusakan pada bagian tertentu hati, maka akan terjadi peningkatan laju pembelahan sel pada hati untuk menggantikan bagian yang rusak. Namun, jika hepatosit terpajan oleh suatu toksikan dan mekanisme regenerasi hepatosit belum sempat mengganti bagian yang rusak tersebut, maka fibroblas akan mengalami peningkatan produksi yang melebar dan mengisi bagian hati yang rusak. Hal tersebut menyebabkan terjadinya fibrosis pada hati.

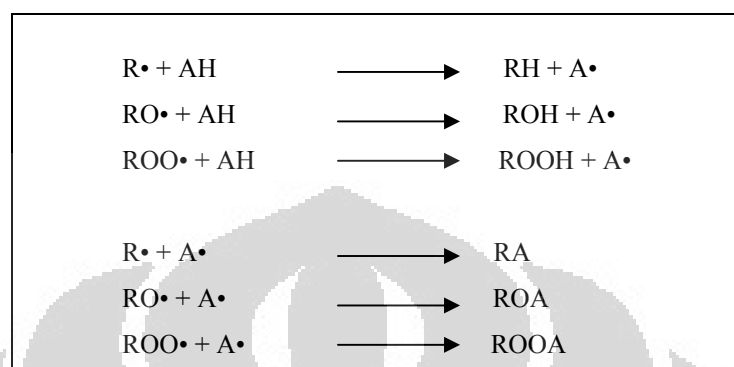
Mekanisme pembentukan fibrosis pada hati melibatkan mekanisme *clotting* yang terjadi pada pembuluh darah yang rusak atau cedera, akibat pajanan toksikan (Fox 2009: 401). Proses *clotting* tersebut diawali oleh sinyal intrinsik berupa zat-zat kimia yang dikirim oleh jaringan yang luka, sehingga menyebabkan terjadinya agregasi platelet disekitar pembuluh darah yang rusak. Platelet yang beragregasi mensekresi zat-zat kimia yang berperan dalam invasi fibroblas, sehingga terbentuk jaringan ikat disekitar area pembuluh yang rusak. Celah yang ditimbulkan oleh sejumlah hepatosit yang rusak dimanfaatkan oleh sel-sel fibroblas tersebut, sehingga terbentuklah jaringan parut disekitar lobulus hati yang mengalami kerusakan (Sherwood 2006: 406).

Berdasarkan data pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus, dapat diketahui pula nilai persentase lobulus hati normal yang paling tinggi adalah nilai yang dimiliki oleh KP3 (23%). Persentase derajat kerusakan menunjukkan bahwa kerusakan yang terjadi pada kelompok tersebut berupa kerusakan ringan yang terjadi pada kurang dari 20% luas lobulus hati.

Meskipun luas kerusakan pada KP3 sama dengan KP1, KP2, dan KP4, namun kerusakan yang ditemukan pada KP3 berupa kerusakan yang tidak terlalu parah yaitu hanya pembendungan pada sinusoid-sinusoid hati. Menurut Greep (1953: 595), sebagian sinusoid hati berfungsi sebagai tempat mengalirnya darah yang bermuara di vena sentralis, namun sebagian lainnya inaktif dan dijadikan sebagai tempat menampung darah. Paparan toksikan dapat meningkatkan penampungan darah pada pembuluh tersebut, sehingga menyebabkan banyaknya darah yang tertampung pada pembuluh tersebut. Gambaran histologis tersebut juga menunjukkan cedera yang dialami oleh hepatosit pada KP3 tidak begitu parah karena tidak ditemukan fibrosis atau sirosis yang parah pada preparat histologis kelompok tersebut. Cedera yang tidak begitu parah tersebut dapat disebabkan oleh efek hepatoprotektif yang dimiliki oleh dimer isoeugenol. Efek perlindungan tersebut berkaitan dengan kemampuan *radical scavenger* dan aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh senyawa dimer isoeugenol dosis 6 mg/kg berat badan yang diberikan pada kelompok tersebut. Menurut Yuda (2007: 64), dimer isoeugenol memiliki nilai IC_{50} sebesar 0,7608 ppm. Nilai tersebut menggolongkan dimer isoeugenol ke dalam kategori antioksidan tinggi berdasarkan klasifikasi yang dibuat oleh Qusti dkk.(2010: 42). Aktivitas antioksidan tersebut berupa kemampuan menangkap radikal bebas (*radical scavenger*) dengan cara menyediakan elektron yang dibutuhkan oleh radikal tersebut untuk menjadi stabil (Yuda 2007: 64).

Pada toksisitas yang dihasilkan oleh CCl_4 , terjadi kerusakan pada lapisan fosfolipid dari membran sel. Menurut Savoure dkk. (1999: 387), lipid sangat sensitif terhadap radikal peroksil, sehingga apabila terjadi reaksi peroksidasi lipid oleh radikal bebas, maka integritas membran akan terganggu dan menyebabkan lepasnya ion intraseluler yang terus berlanjut pada rusaknya sel. Dalam hal tersebut, antioksidan (AH) yang dimiliki oleh dimer isoeugenol berperan sebagai penghambat pembentukan radikal bebas $\cdot OH$ dengan cara menyediakan elektron yang dibutuhkan oleh radikal bebas tersebut untuk menjadi stabil. Selain itu, turunan antioksidan radikal ($A\cdot$) yang dihasilkan dari proses penyumbangan elektron tersebut akan beresonansi, kemudian menstabilkan dirinya atau berikatan juga dengan radikal bebas, lalu membentuk senyawa baru yang stabil. Semakin

banyak radikal bebas yang dapat dibuat stabil, maka semakin minim serangan radikal yang menyerang membran sel. Reaksi antioksidan dengan radikal dapat dilihat pada gambar 4.2.2.



Gambar 4.2.2. Reaksi antioksidan dengan radikal
[Sumber: Arifin 2008: 17]

Tingginya aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh dimer isoeugenol terbukti mampu memberikan efek hepatoprotektif pada sel hati. Hal tersebut dibuktikan oleh hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati pada kelompok perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan persentase lobulus hati normal yang semakin meningkat jika dibandingkan dengan KK2 dan persentase derajat kerusakan yang semakin menurun jika dibandingkan dengan KK2. Dengan demikian, berdasarkan hasil yang diperoleh dari pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus dapat diketahui bahwa dosis yang efektif untuk digunakan sebagai hepatoprotektif adalah dosis 6 mg/kg bb (KP3).

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui potensi hepatoprotektif dari dimer isoeugenol terhadap kadar enzim *Aspartat aminotransferase* (AST), *Alanine transferase* (ALT), serum *Alkaline phosphatase* (SALP), dan *Lactate dehydrogenase* (LDH) (Harmita & Radji 2004: 66). Menurut Lu (1995: 216--217), enzim-enzim tersebut merupakan indikator biokimia yang umum digunakan untuk mengetahui kerusakan pada hati. Kadar enzim-enzim tersebut dalam darah akan meningkat apabila terjadi kerusakan pada hati. Hal tersebut disebabkan, apabila terjadi kerusakan pada hati, enzim-enzim

seperti ALT, AST, SALP, dan LDH akan dilepaskan ke dalam darah dari sitosol dan organel-organel subselular seperti mitokondria, lisosom, dan nukleus. Oleh karena itu, peningkatan atau penurunan kadar enzim-enzim tersebut dalam darah akan sangat berguna untuk dijadikan sebagai indikator kerusakan pada hati.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil penelitian uji hepatoprotektif dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb yang diberikan secara oral kepada mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY memberikan pengaruh yang berbeda terhadap histologi hati.
2. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada pengaruh pemberian dimer isoeugenol dosis 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, 6 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb yang diberikan secara oral kepada mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY terhadap rata-rata berat basah organ hati dan diameter vena sentralis.
3. Potensi hepatoprotektif tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan yang diberikan dosis 6 mg/kg bb dilihat dari data persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati tiap kelompok perlakuan.

5.2 Saran

1. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui potensi hepatoprotektif dari senyawa dimer isoeugenol melalui pengamatan terhadap kadar enzim *Aspartat aminotransferase* (AST), *Alanine transferase* (ALT), serum *Alkaline phosphatase* (SALP), dan *Lactate dehydrogenase* (LDH).
2. Uji keamanan perlu dilakukan untuk mengetahui dosis pemberian dimer isoeugenol yang dapat menimbulkan efek toksik pada hati dan ginjal.

DAFTAR ACUAN

- Afiati, L. 2009. Uji potensi hepatoprotektif infus simplisia *Hippocampus kuda* Bleeker (kuda laut) terhadap histologi hati *Mus musculus* L. (mencit) jantan galur DDY. Skripsi Sarjana S1 Departemen Biologi FMIPA UI. Depok: i + 96 hlm.
- Afifah. 2006. Uji potensi antihepatotoksik ekstrak rimpang *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. (Temu putih) terhadap organ hati *Rattus norvegicus* L. (Tikus putih) galur spraque dawley. Skripsi Sarjana S1 Departemen Biologi FMIPA UI. Depok: xi + 98 hlm.
- Ahmad, U., & Sharafatullah, T. 2008. Hepato-protective natural compounds. *Pak J Pharmacol* **25**(2): 59-68.
- Arctos. 2011. *Mus musculus taxonomy*. Arctos Museum Database. <http://arctos.database.museum/name/Mus%20musculus%20musculus>. 9 Oktober 2011, Pk. 10.00 WIB.
- Arifin, Z.M. 2008. Pembentukan dimer eugenol dengan katalisis enzim lakase dan aktivitasnya sebagai antioksidan. Skripsi Sarjana S1 Departemen Kimia FMIPA UI. Depok: xi + 56 hlm.
- Bevelander, G. & Ramaley, J.A. 1988. *Dasar-dasar histologi*. Terj. dari *Basics histology* oleh Gunarso, W. Penerbit Erlangga, Jakarta: 460 hlm.
- Choi, C.Y., Park, K.Y., Lee, J.H., Jeon, Y.J. Liu, K.H., Oh, S.T., Kim, D.E., & Sung, S.Y. 2007. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase. *EJP* **576**: 151-159.
- Copstead, L.C., & Banasik, J.L. 2000. *Pathophysiology: Biological and behavioural perspectives*. 2nd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia: xxi + 1337 hlm.
- Corwin, E.Z. 2000. *Buku saku patofisiologi*. Terj. dari *Handbook of patophysiology* oleh Brahm, U. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: xxix + 696 hlm.

- Dellmann, H.D. & Brown E.M. 1992. *Buku teks histologi veteriner II*. Terj. dari *Textbook of veterinary histology* oleh Hartono, R. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press), Jakarta: x + 718 hlm.
- Faber Castell. 2012. Faber Castell Colour Chart.
<http://www.studioarts.co.uk/links/hintsandtips/fabercastellcolours.htm>. 10 Mei 2012, Pk. 17.30 WIB.
- Fox, S.I. 2009. *Human physiology*. 11th ed. McGraw Hill Companies, Inc., New York: xxv + 726 hlm.
- Greep, R.O., 1953. *Histology*. The Blackiston Company, Inc., New York: xi + 953 hlm.
- Harmita, & Radji, M. 2004. Buku ajar analisis hayati. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: vii + 185 hlm.
- Heibatollah, S., Reza, N.M., Izadpanah, G. & Sohailla, S. 2008. Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl₄-induced liver damage in rats. *AJBR* 2(6): 141-144.
- HERA (=Human and Environmental Risk Assesment on Ingredients of Household Cleaning Product). 2005. Isoeugenol. European Flavour & Fragrance Association (EFFA), Eropa: 117 hlm.
- Ilango, K. & Chitra, G. 2009. Antioxidant and hepatoprotective activities of fruit pulps of *Limonia acidissima* Linn. *IJHR* 2(4): 361-367.
- Ilyas, E. 1991. Pemeriksaan efek temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* roxb.) terhadap kerusakan hati oleh karbon tetraklorida pada tikus. Skripsi Sarjana S1 Departemen Farmasi. FMIPA UI, Depok: vii + 74 hlm.
- Jing, Y.X., Yuan, Y.S., Jin, S.C., Shu, X.L., Ruili, L., Wen, X.L., Guo, T.X., & Qing, N.L. 2010. Protective effects of fullerenol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon* 48: 1388–1396.
- Junguiera, L.C. & Caerheiro J. 1980. *Basic histology*. Huntsmen Offset Printing Pte Ltd., Singapore: 504 hlm.
- Khadr, M.N., Mahdy, K.A., El-Shamy, K.A. Morsy, F.A., El-Zayat, S.R., & Abd-Allah, A.A. 2007. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of

- black seed, honey and sylimarin on experimental liver injuries induced by CCl₄ in rats. *J Appl Sci* **24**: 3909-3917.
- Klaassen, C.D. & Watkins III, J.B. 1999. *Cassaret & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill Companies, Inc., USA: vii + 861 hlm.
- Kumar, V., Abbas, A.K., & Fausto, N. 2005. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. Elsevier, Inc., Philadelphia: xxvii + 2776 hlm.
- Lesson, C.R., Lesson, T.T., & Paparo, A.A. 1996. *Buku ajar histologi*. 5th ed. Terj. dari *Textbook of histology*, oleh Siswono, S.K., Tambajong, J., Wonodirekso, S., Suryoono, I.A., Tanzil, R., Soeharto, R., Roewijoko, S., Goeritnoko, I., & Martoprawiro, H.M. Penerbit buku kedokteran EGC, Jakarta: v + 622 hlm.
- Lin, C.C., Huang, P.C. & Lin, J.M. 2000. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am J Chin Med*. **28**: 87-96.
- Little, C.C., Snell, G.D., Bittner, J.J., Cloudman, A.M., Fekete, F., Heston, W.E., Russell, W.L., Woollet, G.W. & Dingle, J.H. 1941. *Biology of the laboratory mouse*. The Blakiston Company, Philadelphia: viii + 497 hlm.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi dasar: Asas, organ sasaran, dan penilaian risiko*. Terj. dari *Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assesment* oleh Nugroho, E. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press), Jakarta: xv + 429 hlm.
- Long, R.G., & Scott, B.B. 2005. *Specialist training in gastroenterology and liver disease*. Elsevier Mosby, Philadelphia: xxvii + 1786 hlm.
- Magliano, T.M.A., & Casal, J.J. 1998. In vitro cross-linking of extensin precursors by mustard extracellular isoforms of peroxidase that respond either to phytochrome or to wounding. *JXB*. **49**(326): 1491-1499.
- Martini, F.H. 1995. *Fundamental of anatomy and physiology*. Prentice-Hall International, inc., New Jersey: xxxviii + 1109 hlm.
- McPhee, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F., & Lange, J.D. 2000. *Pathophysiology of disease*. 3rd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., USA: x + 662 hlm.

- Murakami, Y., Shoji, M., Hirata, A., Tanaka, S., Yokoe, I., & Fujisawa, S. 2005. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa β activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**: 326-332.
- Murphy, S.L., Xu, Jiaquan, Kenneth, B., & Kochanek, M.A. 2012. *National vital statistics reports*. www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr60/nvsr60_04.pdf. 25 April 2012, Pk. 15.00 WIB.
- Myers, R.L. 2004. The IC50 ratings for antioxidant effectiveness. *E bytes Issue*: **8**: 1-3.
- NIBIO (= National Institute of Biomedical Innovation). 2012. *Mice DDY*. http://animal.nibio.go.jp/e_ddys.html. 17 April 2012, Pk. 15.50 WIB.
- NTP (=National Toxicology Program). 2010. *Toxicology and carcinogenesis study of isoeugenol in F344/N rats and B6C3F1 mice*. U.S. Departement of Health and Human Services, Rockville: 180 hlm.
- Nation Master. 2012. *Alcoholic liver diseases statistics*. http://www.nationmaster.com/graph/mor_alc_liv_dis-mortality-alcoholic-liver-disease. 25 April 2012, Pk. 15.00 WIB.
- Ngatidjan. 1991. *Petunjuk laboratorium: Metode laboratorium dalam toksikologi*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta: x + 283 hlm.
- PubChem. 2006. *Isoeugenol-Compound Summary*. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=853433&loc=ec_rcs: 5 Oktober 2011, Pk. 22.00 WIB.
- Puspita, R.L. 2008. Identifikasi senyawa produk oksidatif kopling isoeugenol yang dikatalis enzim lakase dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan. Skripsi Sarjana S1 Departemen Kimia FMIPA UI. Depok: xi + 78 hlm.
- Qusti, S.Y., Abo-Khatwa, A.N. & Mona A. 2010. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *EJBS* **2**(1): 40-51.
- Rhoades, R.A., & Tanner, G.A. 1995. *Medical physiology*. 1st ed. Little, Brown and Company, USA: x + 839 hlm.

- Rhodes, J.B. (Peny.). 2000. *Toxicology of the human environment: The critical role of free radicals*. Taylor and Francis Group, London: x + 494 hlm.
- Savoure, Thorin, A.D., Davey, M., Hau, X., Mauro, S., Montagu, V., Inze, D., & Verbruggen, M. 1999. NaCl and CuSO₄ treatment trigger distinct oxidative defense mechanism in *Nicotiana Plumbaginifolia* L. *Plant cell and Environ* **22**: 387-396.
- Sherwood, L. 2004. *Human physiology*. Thomson Learning, Inc., USA: xvii + 760 hlm.
- Shier, D., Butler, J., & Lewis, R. 2002. *Hole's human anatomy and physiology*. 9th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York: xxvi + 1094 hlm.
- Silverthorn, D.E. 2010. *Human physiology: An integrated approach*. Pearson Education, Inc., USA: xxxiv + 867 hlm.
- Suckow, M.A., S.H. Weisbroth, & C.L. Franklin. 2006. *Rats as laboratory animals*. Elsevier, Inc., London: xv + 885 hlm.
- Suntoro, H. 1983. *Metode pewarnaan*. Penerbit Bhratara Karya Aksara, Jakarta: viii + 395 hlm.
- Takeyoshi, M., Iida, K., Suzuki, K., & Yamazaki, S. 2008. Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J Appl Toxicol* **28**: 530-534.
- Telford, I.R., & Bridman, C.F. 1990. *Introduction to functional histology*. Harper & Row publisher, New York: xxi + 598 hlm.
- Torres, E., & Ayala, M. 2010. *Biocatalysis based on heme peroxidases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York: xii + 358 hlm.
- UACC (=University Animal Care Committee). 2009. *The laboratory mouse: Handling and restrains*. University Animal Care Committee. 21 hlm.
- Wang, S.H., Kuo, Y.H., Chang, H.N., Kang, P.L., Tsay H.S., Lin, K.F., Yang N.S., & Shyur, L.F. 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J Agric Food Chem* **50**: 1859-1865.
- Wiggers, C. J. 1955. *Physiology in health and disease*. Lea & Febriger, Philadelphia: 1242 hlm.

- WHO (=World Health Organization). 1999. *Environment health criteria 208: Carbon tetrachloride*. WHO. Geneva: xviii +180 hlm.
- Wulf, D. 2002. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95.
- Yuda, A. 2007. Bioaktivitas senyawa dimer dari isoeugenol dengan enzim peroksidase dari tanaman sawi. Skripsi Sarjana S1 Departemen Kimia, FMIPA, UI. Depok: 82 hlm.
- Zheng, W., & Wang, S.H. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **49**(11): 5165-5170.

Lampiran 1
Penentuan Dosis Dimer Isoeugenol untuk Mencit

Diketahui:

Nilai LC_{50} hasil BSLT dimer isoeugenol = 8,175 ppm

mg/kg bb \approx ppm

Konversi ke LD_{50} \rightarrow Nilai LD_{50} = 8,175 mg/kg bb

Ditanya:

Dosis untuk mencit

Penentuan dosis:

Berdasarkan deret hitung, maka dosis dimer isoeugenol yang digunakan dalam prapenelitian adalah dosis yang berada dibawah nilai toksisitasnya (8,175 mg/kg bb), yaitu dosis 1 mg/kg bb, 2 mg/kg bb, 4 mg/kg bb, dan 8 mg/kg bb.

Lampiran 2

Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida dosis 400 mg/kg bb**Diketahui:**

Berat jenis CCl ₄	= 1,59 g/ml
Dosis yang digunakan	= 400 mg/kg bb
Berat mencit standar yang disuntik CCl ₄	= 100 gr
Volume akhir yang dikehendaki	= 10 ml
Volume maksimal injeksi ke mencit	= 1 ml (per 100 g bb)

Ditanya:

Volume CCl₄ yang dibutuhkan

Perhitungan:

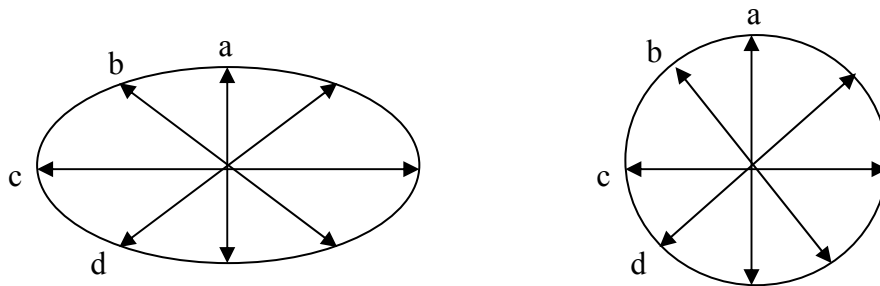
Dosis 400 mg/kg bb = 0,4 mg/g bb

0,4 mg/g bb x 100 g = 40 mg/ml = 0,04 g/ml

Volume CCl₄ yang dibutuhkan = $\frac{0,04 \frac{g}{ml} \times 10 ml}{1,59 \frac{g}{ml}}$
= 0,251 ml

(Ilyas 1991: 19)

Lampiran 3
Cara Pengukuran Diameter Vena Sentralis



Misalkan kedua gambar diatas adalah 2 bentuk (elips dan lingkaran) penampang vena sentralis yang terlihat pada mikroyektor. Diameter vena sentralis diukur dengan cara menjumlahkan panjang garis a (vertikal), c (horizontal), b dan d (diagonal), kemudian jumlah tersebut dibagi 4.

$$d = \frac{a + b + c + d}{4}$$

(lihat Afifah 2006: 89)

Lampiran 4

Uji Normalitas Shapiro-Wilk terhadap Data Berat Basah Organ Hati

Tujuan:

Untuk mengetahui normalitas distribusi data berat basah organ hati

Hipotesis:

H_0 : Data berat basah organ hati berdistribusi normal

H_1 : Data berat basah organ hati tidak berdistribusi normal

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

Perlakuan	Shapiro-Wilk		
	Statistik	db	Probabilitas (P)
KK1	0,806	5	0,090
KK2	0,885	5	0,331
KP1	0,945	5	0,702
KP2	0,867	5	0,254
KP3	0,871	5	0,269
KP4	0,871	5	0,269

Kesimpulan:

Data berat basah organ hati secara keseluruhan berdistribusi normal.

Lampiran 5

 Uji Homogenitas Levene terhadap Data Berat Basah Organ Hati

Tujuan:

Untuk mengetahui homogenita variansi data berat basah organ hati

Hipotesis:

H_0 : Data berat basah organ hati bervariasi homogen

H_1 : Data berat basah organ hati tidak bervariasi homogen

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

F_{hit}	db1	db2	Probabilitas (P)
1,015	5	24	0,431

Kesimpulan:

Data berat basah organ hati secara keseluruhan bervariasi homogen.

Lampiran 6

Uji Analisis Variansi (ANOVA) 1-faktor Terhadap Data Berat Basah Organ Hati

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh faktor perlakuan terhadap berat basah organ hati antara kelompok perlakuan

Hipotesis:

H_0 : Tidak ada pengaruh faktor perlakuan terhadap berat basah organ hati antara kelompok perlakuan

H_1 : Ada pengaruh faktor perlakuan terhadap berat basah organ hati antara kelompok perlakuan

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

Keragaman	Jumlah kuadrat	db	Kuadrat tengah	Fhit	Probabilitas (P)
Antara kelompok	1,015	5	0,203	0,714	0,619
Dalam kelompok	6,820	24	0,284		
Total	7,835	29			

Kesimpulan:

Tidak ada pengaruh faktor perlakuan terhadap berat basah organ hati antara kelompok perlakuan.

Lampiran 7

Uji Normalitas Shapiro-Wilk terhadap Data Diameter Vena Sentralis

Tujuan:

Untuk mengetahui normalitas distribusi data diameter vena sentralis

Hipotesis:

H_0 : Data diameter vena sentralis berdistribusi normal

H_1 : Data diameter vena sentralis tidak berdistribusi normal

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

Perlakuan	Shapiro-Wilk		
	Statistik	db	Probabilitas (P)
KK1	0,943	5	0,687
KK2	0,973	5	0,897
KP1	0,822	5	0,121
KP2	0,920	5	0,527
KP3	0,921	5	0,538
KP4	0,975	5	0,906

Kesimpulan:

Data diameter vena sentralis secara keseluruhan berdistribusi normal.

Lampiran 8

 Uji Homogenitas Levene terhadap Data Diameter Vena Sentralis

Tujuan:

Untuk mengetahui homogenita variansi data berat basah organ hati

Hipotesis:

H_0 : Data diameter vena sentralis bervariasi homogen

H_1 : Data diameter vena sentralis tidak bervariasi homogen

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

F_{hit}	db1	db2	Probabilitas (P)
1,195	5	24	0,341

Kesimpulan:

Data diameter vena sentralis secara keseluruhan bervariasi homogen.

Lampiran 9

Uji Analisis Variansi (ANOVA) 1-faktor terhadap Diameter Vena Sentralis

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh faktor perlakuan terhadap diameter vena sentralis antara kelompok perlakuan

Hipotesis:

H_0 : Tidak ada pengaruh faktor perlakuan terhadap diameter vena sentralis antara kelompok perlakuan

H_1 : Ada pengaruh faktor perlakuan terhadap diameter vena sentralis antara kelompok perlakuan

Taraf nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

Keragaman	Jumlah kuadrat	db	Kuadrat tengah	Fhit	Probabilitas (P)
Antara kelompok	124,052	5	24,810	0,312	0,901
Dalam kelompok	1906,617	24	79442		
Total	2030,669	29			

Kesimpulan:

Tidak ada pengaruh faktor perlakuan terhadap diameter vena sentralis antara kelompok perlakuan.

Lampiran 10 Standar Warna



[Sumber standar warna: Faber-Castell 2012: 1]