



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI TOKSISITAS ORALAKUT DAN SUBKRONIK PRODUK
PANGAN BPPT YANGIN VITRO MENINGKATKAN RESPON
IMUN TUBUH**

SKRIPSI

NATASYA PUSPITA TANRI

0806451486

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA

AGUSTUS 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI TOKSISITAS ORAL AKUT DAN SUBKRONIK PRODUK
PANGAN BPPT YANG IN VITRO MENINGKATKAN RESPON
IMUN TUBUH**

SKRIPSI

NATASYA PUSPITA TANRI

0806451486

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA

AGUSTUS 2011

Universitas Indonesia

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Natasya Puspita Tanri

NPM : 0806451486

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Agustus 2011

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Natasya Puspita Tanri

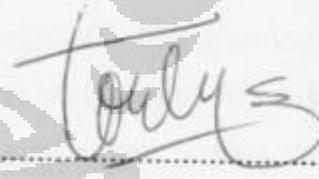
NPM : 0806451486

Program Studi : S1 Reguler Fakultas Kedokteran

Judul Skripsi : Uji Toksisitas Oral Akut Dan Subkronik Produk Pangan BPPT yang In Vitro Meningkatkan Respon Imun Tubuh

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Strata 1 Reguler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Dr. Purwastyastuti, Sp.FK (..........)

Penguji : Prof. DR. Dr. Rianto Setiabudy, Sp.FK (..........)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 11 Agustus 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan kesempatan kepada peneliti untuk menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Oral Akut Dan Subkronik Produk Pangan BPPT yang In Vitro Meningkatkan Respon Imun Tubuh” ini. Dalam menghadapi bencana alam yang akhir-akhir ini sering terjadi, pemerintah, dalam hal ini BPPT, hendak mengeluarkan suatu produk pangan baru yang berasal dari ekstrak buah delima yang mengandung zat aktif (polifenol) yang diduga mampu meningkatkan respon imun tubuh pada manusia. Untuk dapat mengaplikasikan produk pangan darurat BPPT ini, diperlukan suatu penelitian untuk menguji toksisitas produk tersebut. Adapun penelitian mengenai toksisitas perlu dilakukan dahulu pada hewan coba. Dalam kesempatan ini, peneliti ingin mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Dr. Purwastyastuti, Sp.FK, selaku pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaganya, Dr. Alida Roswita Harahap DMM, SpPK, PhD yang telah menyediakan informasi dan bimbingan mengenai imunologi, Azalea Arif, dra, MS yang telah menyediakan informasi, bimbingan mengenai toksikologi pada hewan coba serta memfasilitasi dalam melakukan penelitian, dr. Lisnawati SpPA(K) yang telah menyediakan informasi dan bimbingan mengenai histopatologi serta memfasilitasi dalam melakukan penelitian, dan segenap staf modul Riset Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih atas bantuan dan dukungan dari rekan peneliti (Atika, Jessica Octaviani, Lingga, Lina Linditya, Sari Purnama Hidayat), pihak keluarga dan rekan-rekan sejawat, serta pihak-pihak lain yang telah mendukung terlaksananya penelitian ini namun tidak dapat disebutkan satu per satu. Peneliti menyadari bahwa tak ada gading yang tak retak, demikian pula karya ini tidak luput dari kesalahan. Untuk itu, peneliti mengharapkan kritik dan saran yang membangun, demi kesempurnaan karya serupa di masa yang akan datang.

Jakarta, 11 Agustus 2011

Peneliti

Universitas Indonesia

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

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

Nama : Natasya Puspita Tanri

NPM : 0806451486

Departemen : Farmakologi

Fakultas : Kedokteran

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 Toksisitas Oral Akut dan Subkronik Produk Pangan BPPT yang In Vitro Meningkatkan Respon Imun Tubuh

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 memublikasikan 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 : Jakarta

Pada tanggal : 11 Agustus 2011

Yang menyatakan,



(Natasya Puspita Tanri)

Universitas Indonesia

ABSTRAK

Secara geografis Indonesia sangat berpotensi sekaligus rawan bencana alam. Beberapa dampak bencana alam yang ditimbulkan terhadap masyarakat adalah timbulnya cedera, depresi, dan penyakit. Ketiga hal tersebut berkaitan erat dengan sistem imun manusia. Untuk menanggulangi dampak bencana, pemerintah (BPPT) hendak mengeluarkan suatu produk pangan baru yang berasal dari ekstrak buah delima yang secara *in vitro* terbukti meningkatkan respon imun tubuh manusia. Diperlukan penelitian toksisitas oral akut dan subkronik produk pangan darurat BPPT tersebut. Penelitian ini menggunakan *true experimental design* dengan pemilihan sampel secara random alokasi. Pada uji toksisitas oral akut digunakan 5 ekor tikus jantan dengan pemberian dosis 9g/kg BB. Setelah 14 hari tidak terdapat efek toksik yang bermakna dan tikus yang mati sehingga nilai $LD_{50} > 9$ g/kg BB. Pada uji toksisitas oral subkronik digunakan 4 grup perlakuan (1 g/kg BB, 2 g/kg BB, 4 g/kg BB, kontrol) untuk tiap jenis kelamin dengan jumlah @10 ekor tikus. Pada setiap grup diberikan perlakuan, observasi, dan pengukuran berat badan secara berkala selama 90 hari. Pada akhir periode perlakuan dibandingkan hasil observasi makroskopik dan mikroskopik antar kelompok. Secara umum grup tikus dengan dosis 1 g/kg BB tidak menunjukkan tanda toksisitas yang bermakna, grup tikus dengan dosis 2 g/kg BB mulai menunjukkan gangguan pada fungsi organ, dan grup tikus dengan dosis 4g/kg BB telah mengalami kerusakan jaringan berdasarkan pemeriksaan histopatologi. Berdasarkan hasil tersebut maka NOEL (*No Observed Effect Level*) pada tikus jantan dan betina adalah 1 g/kg BB.

Kata Kunci: Bencana Alam, Respon Imun, Produk Pangan Darurat BPPT, Toksisitas Oral Akut, Toksisitas Oral Subkronik, LD_{50} , NOEL

ABSTRACT

Located in “The Pacific Ring of Fire”, it is irrefutable that Indonesia is vulnerable to natural disasters. Indeed, countless severe catastrophes result in the emergence of closely-related human immune system problems, such as: injury, depression and illness. To deal with the issues, the Government (BPPT) has been planning meticulously to launch a new food product derived from pomegranate fruit extracts that can improve the human immune response system. It is then necessary to have further research on acute oral toxicity and sub-chronic oral toxicity of BPPT’s emergency food product. The study employed true experimental design methodology as its principal and using randomize allocation sampling. A dose of 9 g/kg BB was given to five male rats in an acute oral toxicity test. After 14 days, there were no significant toxic effects and no rat died. As such, the value of the LD_{50} is > 9 g/kg BB. Another analysis was done in a sub-chronic oral toxicity test by using four treatment groups (1 g/kg BB, 2 g/kg BB, 4 g/kg BB, control) @ 10 rats for each sex. For each group, there were stringent monitoring as well as regular periodical body weight measurement within 90 days. At the end of the treatment period, the results gathered from macroscopic and microscopic measurements were compared among groups. In general, group 1 g/kg BB dose rats did not show significant signs of toxicity. Group 2 g/kg BB dose rats started to show interference with the organ functions. As for the group 4 g/kg BB dose rats, they had damaged tissue in histopathological examination. Based from these outcomes, it is clear that NOEL (*No Observed Effect Level*) in male and female rats is 1 g/kg BB.

Key Word: Natural Disasters, Human Immune Response System, BPPT’s Emergency Food Product, Acute Oral Toxicity, Sub-chronic Oral Toxicity, LD_{50} , NOEL

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Bagi Peneliti.....	5
1.4.2 Bagi Perguruan Tinggi.....	5
1.4.3 Bagi Masyarakat	5
1.4.4 Bagi Pemerintah.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karakteristik dari Paparan Racun	6
2.2 Jalur dan Tempat Pemaparan	6
2.2.1 Oral	6
2.3 Durasi dan Frekuensi Pemaparan.....	7
2.4 Hubungan Dosis-Respon/ Konsentrasi-Respon	9
2.5 Hubungan Dosis-Efek.....	12
2.6 Korelasi Tes Toksisitas pada Hewan dengan Pemaparan pada Manusia.....	13
2.7 Uji Toksisitas Oral Akut	14

2.8	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	15
2.9	Persiapan Hewan dan Substansi Tes	16
2.10	Hewan Percobaan.....	16
2.11	Pengukuran Dosis	17
2.12	Pemeriksaan Klinis	18
2.13	Pemeriksaan Patologi untuk Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	18
2.13.1	Pemeriksaan Makroskopik / Autopsi Kasar dan Histopatologi	19
2.13.2	Pemeriksaan Kimia Klinis (<i>Clinical Chemistry</i>).....	19
2.13.3	Pemeriksaan Hematologi	22
2.13.4	Imunotoksikologi	25
2.13.5	Gejala Klinis	25
2.13.6	Perubahan Histopatologi	26
2.14	Data dan Pelaporan	27
2.14.1	Uji Toksisitas Oral Akut	27
2.14.2	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	30
2.15	Produk Pangan Herbal BBPT	31
2.15.1	Polifenol.....	31
2.16	Kerangka Konsep.....	36
2.16.1	Uji Toksisitas Oral Akut	36
2.16.2	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	36
BAB II METODE		37
3.1	Desain Penelitian	37
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian.....	37
3.3	Sampel Penelitian.....	37
3.4	Pangan dan Dosis.....	38
3.5	Pengelolaan Kandang Hewan	39
3.6	Cara Kerja	39
3.6.1	Uji Toksisitas Oral Akut	39
3.6.2	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	40
3.7	Pemeriksaan pada Uji Toksisitas Subkronik.....	40
3.7.1	Pemeriksaan Makroskopik.....	40
3.7.2	Pemeriksaan Hematologi	40
3.7.3	Fungsi Hati.....	45

3.7.4	Fungsi Ginjal.....	47
3.6.5	Pemeriksaan Histopatologi	49
3.8	Identifikasi Variabel.....	49
3.8.1	Uji Toksisitas Oral Akut	49
3.8.2	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	49
3.9	Analisis Data.....	50
3.10	Definisi Operasional	51
3.11	Alur Penelitian	52
3.12	Etika Penelitian	53
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		54
4.1	Uji Toksisitas Oral Akut	54
4.1.1	Perkembangan Berat Badan	54
4.1.2	LD ₅₀	55
4.2	Uji Toksisitas Oral Subkronik.....	56
4.2.1	Berat Badan.....	56
4.2.2	Hati (per 100 g BB hari ke 90).....	60
4.2.3	Ginjal (per 100 g BB hari ke 90).....	68
4.2.4	Paru (per 100 g BB hari ke 90)	76
4.2.5	Limpa(per 100 g BB hari ke 90)	79
4.2.6	Jantung (per 100 g BB hari ke 90)	81
4.2.7	Otak (per 100 g BB hari ke 90).....	84
4.2.8	Usus (per 100 g BB hari ke 90).....	86
4.2.9	Hemoglobin (Hb)	89
4.2.10	Jumlah Leukosit.....	92
4.2.11	Hitung Jenis Leukosit.....	94
4.3	Keseluruhan Hasil pada Organ dan Darah	104
4.4	<i>No Observed Effect Level</i> (NOEL)	110
BAB V PENUTUP.....		113
5.1	Kesimpulan	113
5.2	Saran	113
DAFTAR PUSTAKA.....		115
LAMPIRAN <i>ETHICAL CLEARANCE</i>		121

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Klasifikasi Kerugian akibat Bencana	2
Gambar 2. Hubungan Antara Dosis dan Konsentrasi pada <i>Target Site</i> pada Dosis Frekuensi dan Tingkat Konsentrasi yang Berbeda.	8
Gambar 3. The Classic Dose–Response Curve.....	10
Gambar 4. Two Substances With The Same LD ₅₀ But Different Lower Lethal Thresholds ..	11
Gambar 5. Hubungan Antara Dosis dan Efek. (a) Substansi Esensial, (b) Substansi Non-Esensial	12
Gambar 6. Hubungan antara Dosis-Efek dan Dosis-Respon.	13
Gambar 7. Lokasi Enzim Hepatosit	20
Gambar 8. Kurva Hubungan Dosis-Respon menunjukkan derivasi percobaan estimasi dari LD ₅₀	29
Gambar 9. Distribusi Frekuensi Normal dari Perbandingan Frekuensi Mortalitas(%) dengan Dosis	29
Gambar 10. Rute Polifenol dalam Tubuh	33
Gambar 11. Kamar Hitung <i>improved</i> Neubaur	43
Gambar 12. Cara Pembuatan Sediaan Hapus Darah Tepi.....	44
Gambar 13. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus selama 14 hari	54
Gambar 14. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus Jantan selama 90 hari	56
Gambar 15. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus Betina selama 90 hari	58
Gambar 16. Diagram perbandingan Berat Hati Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	60
Gambar 17. Diagram perbandingan SGOT Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan.....	61
Gambar18. Diagram perbandingan SGPT Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	61
Gambar 19.Diagram perbandingan Berat Hati Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	63
Gambar 20. Diagram perbandingan SGOT Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	64
Gambar 21. Diagram perbandingan SGPT Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	65
Gambar 22. Grup dosis 4 g/kg BB (no.8) jantan - Hati	66
Gambar 23. Grup kontrol (no.1) jantan - Hati	67
Gambar 24. Diagram perbandingan Berat Ginjal Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	68
Gambar 25. Diagram perbandingan Kreatinin Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan.....	69
Gambar 26.Diagram perbandingan Ureum Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	70
Gambar 27. Diagram perbandingan Berat Ginjal Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	71
Gambar 28. Diagram perbandingan Kreatinin Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	72

Gambar 29. Diagram perbandingan Ureum Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	73
Gambar 30. Grup dosis 2 g/kg BB (no.1) jantan - Ginjal	74
Gambar 31. Grup dosis 1 g/kg BB (no.8) jantan - Ginjal	75
Gambar 32. Diagram perbandingan Berat Paru Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	76
Gambar 33. Diagram perbandingan Berat Paru Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	77
Gambar 34. Grup dosis 1 g/kg BB (no.2) betina – Paru-paru Oedema Pulmonum	78
Gambar 35. Diagram perbandingan Berat Limpa Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	80
Gambar 36. Diagram perbandingan Berat Limpa Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	80
Gambar 37. Diagram perbandingan Berat Jantung Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	82
Gambar 38. Diagram perbandingan Berat Jantung Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	83
Gambar 39. Diagram perbandingan Berat Otak Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan.....	85
Gambar 40. Diagram perbandingan Berat Otak Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	85
Gambar 41. Diagram perbandingan Berat Usus Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	87
Gambar 42. Diagram perbandingan Berat Usus Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	87
Gambar 43. Diagram perbandingan Hb Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	89
Gambar 44. Diagram perbandingan Hb Rata – Rata antar Grup Tikus Betina.....	90
Gambar 45. Diagram perbandingan Jumlah Leukosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan..	92
Gambar 46. Diagram perbandingan Jumlah Leukosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	93
Gambar 47. Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	94
Gambar 48. Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	95
Gambar 49. Diagram perbandingan Neutrofil Batang Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan .	96
Gambar 50. Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	97
Gambar 51. Diagram perbandingan Neutrofil Segmen Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	98
Gambar 52. Diagram perbandingan Neutrofil Segmen Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	99
Gambar 53. Diagram perbandingan Limfosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan	100
Gambar 54. Diagram perbandingan Limfosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	101
Gambar 55. Diagram perbandingan Monosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan.....	102
Gambar 56. Diagram perbandingan Monosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina	103

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Vehikulum (<i>Vehicles</i>) untuk Rute Oral.....	16
Tabel 2. Teknik Pengambilan Sampel Darah pada Penelitian Toksikologi.....	23
Tabel 3. Volume Darah yang Digunakan dari Hewan Coba pada Penelitian Toksikologi	23
Tabel 4. Parameter Hematologi dari Studi Subkronik dan Kronik – Petunjuk Standard.....	24
Tabel 5. Faktor yang dapat mempengaruhi Pengukuran Uji Kimia Klinis dan Hematologi .	24
Tabel 6 . Gejala Klinis dari Toksisitas.....	26
Tabel 7. Klasifikasi Zat berdasarkan Toksisitas Relatif.....	28
Tabel 8. Kadungan Bahan Herbal BPPT	31
Tabel 9. Efek Berbahaya dari Polifenol.....	35
Tabel 10. Histopatologi Organ Hati.....	66
Tabel 11. Histopatologi Organ Ginjal.....	73
Tabel 12. Histopatologi Organ Paru	78
Tabel 13. Histopatologi Organ Limpa	81
Tabel 14. Histopatologi Organ Jantung	83
Tabel 15. Histopatologi Organ Otak.....	86
Tabel 16. Histopatologi Organ Usus.....	88
Tabel 17. Hasil Perbandingan Indikator antar Grup Tikus Jantan dan Betina.....	110

BAB I

PENDAHULUAN

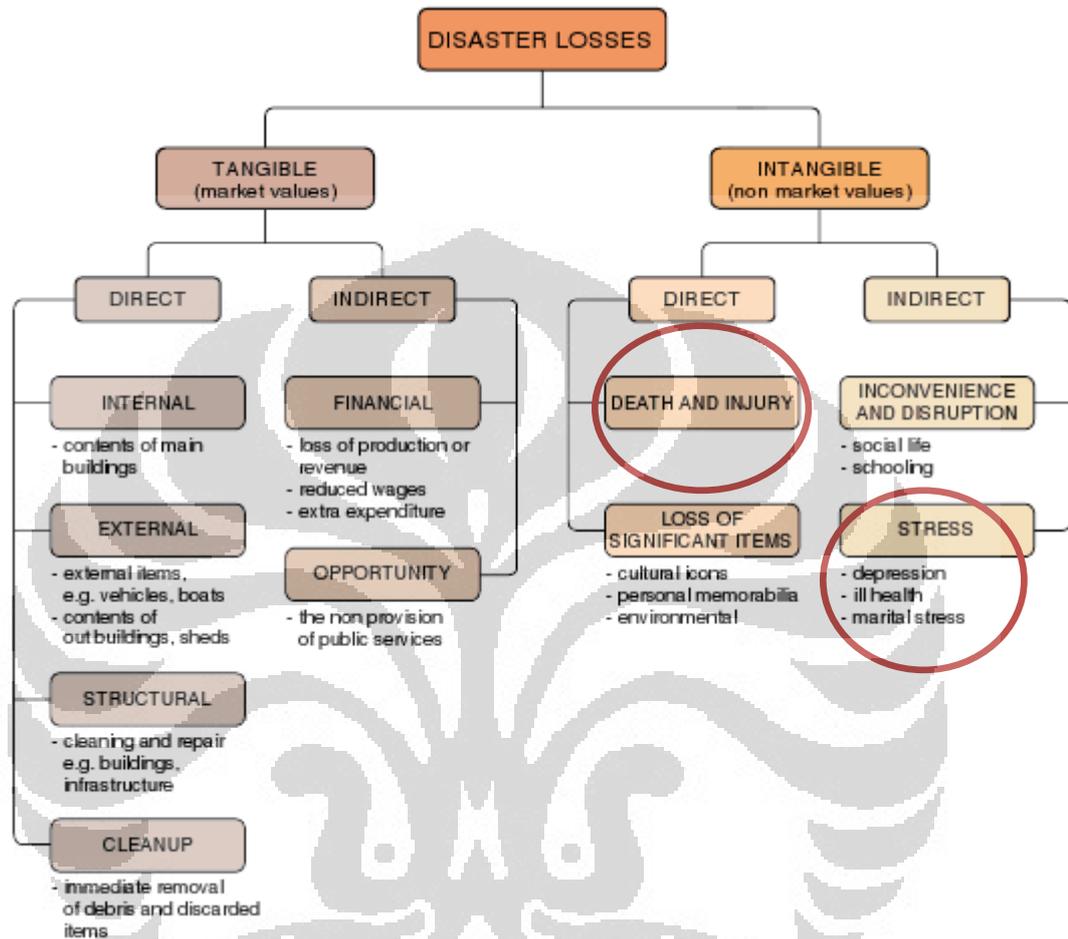
1.1 Latar Belakang

Secara geografis Indonesia merupakan negara kepulauan yang terletak pada pertemuan empat lempeng tektonik yaitu lempeng Benua Asia, Benua Australia, lempeng Samudera Hindia dan Samudera Pasifik. Pada bagian selatan dan timur Indonesia terdapat sabuk vulkanik (*volcanic arc*) yang memanjang dari Pulau Sumatera – Jawa - Nusa Tenggara – Sulawesi, yang sisinya berupa pegunungan vulkanik tua dan dataran rendah yang sebagian didominasi oleh rawa-rawa. Kondisi tersebut sangat berpotensi sekaligus rawan bencana seperti letusan gunung berapi, gempa bumi, tsunami, banjir dan tanah longsor. Data menunjukkan bahwa Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki tingkat kegempaan yang tinggi di dunia, lebih dari 10 kali lipat tingkat kegempaan di Amerika Serikat (Arnold, 1986).⁽¹⁾

Gempa bumi yang disebabkan karena interaksi lempeng tektonik dapat menimbulkan gelombang pasang apabila terjadi di samudera. Dengan wilayah yang sangat dipengaruhi oleh pergerakan lempeng tektonik ini, Indonesia sering mengalami tsunami. Wilayah pantai di Indonesia merupakan wilayah yang rawan terjadi bencana tsunami terutama pantai barat Sumatera, pantai selatan Pulau Jawa, pantai utara dan selatan pulau-pulau Nusa Tenggara, pulau-pulau di Maluku, pantai utara Irian Jaya dan hampir seluruh pantai di Sulawesi. Laut Maluku adalah daerah yang paling rawan tsunami. Wilayah Indonesia terletak di daerah iklim tropis dengan dua musim yaitu panas dan hujan dengan ciri-ciri adanya perubahan cuaca, suhu dan arah angin yang cukup ekstrim. Kondisi iklim seperti ini digabungkan dengan kondisi topografi permukaan dan batuan yang relatif beragam, baik secara fisik maupun kimiawi, menghasilkan kondisi tanah yang subur. Sebaliknya, kondisi itu dapat menimbulkan beberapa akibat buruk bagi manusia seperti terjadinya bencana hidrometeorologi seperti banjir, tanah longsor, kebakaran hutan dan kekeringan.⁽¹⁾

Bencana alam memiliki dampak yang cukup signifikan terhadap aspek ekonomi, sosial, lingkungan, dan politik dalam masyarakat. Beberapa dampak yang ditimbulkan terhadap masyarakat adalah timbulnya cedera, depresi, dan penyakit.

(Gambar 1).⁽²⁾ Ketiga hal tersebut berkaitan erat dengan penurunan sistem imun manusia.



Gambar 2 Klasifikasi Kerugian akibat Bencana²

Sistem imun adalah kemampuan tubuh untuk menahan atau mengeliminasi benda asing atau sel abnormal yang berbahaya bagi tubuh.⁽³⁾ Berdasarkan mekanismenya, sistem imun terdiri atas pertahanan nonspesifik dan pertahanan spesifik.^(3, 4)

Tidak setiap pajanan mikroorganisme pada tubuh akan menghasilkan kerusakan atau penyakit. Bila pejamu mempunyai kadar imunitas antimikroorganisme yang tinggi terhadap mikroorganisme tersebut, tidak akan terjadi kerusakan atau penyakit. Sebaliknya, bila pejamu mempunyai kadar imunitas antimikroorganisme tersebut dalam kadar rendah atau tidak punya sama sekali, terutama pada pejamu anak-anak, dapat terjadi kerusakan atau penyakit pada tubuh.

Berbagai upaya dapat ditempuh untuk meningkatkan kemampuan respon imun, seperti dengan melakukan imunisasi atau dengan mengusahakan imunopotensiasi.⁽⁴⁾

Dengan bekal pengetahuan mengenai sistem imun maka sesuai dengan Undang-undang no. 24 tahun 2007 tentang penanggulangan bencana maka pemerintah, dalam hal ini BPPT, hendak mengeluarkan suatu produk pangan baru yang di dalamnya terdapat zat aktif yang secara *in vitro* terbukti meningkatkan respon imun tubuh pada manusia. Untuk dapat mengaplikasikan produk pangan darurat BPPT ini, diperlukan suatu penelitian untuk menguji toksisitas produk tersebut pada hewan coba.

Setiap zat dapat menimbulkan efek toksik jika zat tersebut mencapai organ target yang sesuai dalam konsentrasi tertentu atau memiliki jangka waktu yang cukup untuk menghasilkan manifestasi klinis.⁽⁵⁾ Oleh karena itu walaupun produk pangan BPPT ini mengandung buah delima yang biasa dikonsumsi tetap perlu dilakukan uji toksitas karena bahan yang digunakan adalah ekstraknya yang mengandung polifenol.

Toksikologis membagi pemaparan dari hewan percobaan terhadap bahan kimia menjadi empat kategori yaitu akut, subakut, subkronik, dan kronik. Dalam mencari karakteristik toksik dari suatu agen kimia maka penting untuk mencari informasi tidak hanya melalui efek dosis tunggal (akut) dan jangka panjang (kronik) tetapi juga dari pemaparan dengan durasi menengah.⁽⁸⁾ Oleh karena itu pada percobaan ini dilakukan pemaparan subkronik yang disesuaikan dengan tujuan pembuatan produk pangan ini yaitu sebagai produk pangan darurat sementara.

Pemaparan akut didefinisikan sebagai pemaparan terhadap bahan kimia dalam jangka waktu 24 jam (pemberian tunggal atau diulang untuk agen dengan toksisitas rendah atau tidak ada) untuk mendapatkan LD₅₀ dan pemaparan subkronik diartikan sebagai pemaparan berulang terhadap agen kimia dalam jangka waktu 1-3 bulan untuk mendapatkan nilai NOEL (*No Observed Effect Level*).^(5, 6)

Berlandaskan uraian – uraian di atas dibuat penelitian dengan judul “Uji Toksisitas Oral Akut Dan Subkronik Produk Pangan BPPT yang *In Vitro* Meningkatkan Respon Imun Tubuh” dilakukan. Studi ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efek jangka pendek (akut) dan jangka panjang

(subkronik) terhadap organ target sehingga dapat ditentukan level dosis aman sesuai kriteria keselamatan untuk paparan pada manusia.⁽⁷⁾ Selain itu diharapkan pula melalui penelitian ini masyarakat mendapat pengetahuan mengenai perlunya uji toksisitas dan keamanan produk pangan tertentu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana gambaran keamanan pemakaian produk pangan darurat BPPT jangka pendek pada hewan coba dilihat dari LD_{50} ?
2. Bagaimana gambaran keamanan pemakaian produk pangan darurat BPPT jangka panjang pada hewan coba dilihat dari *No Observed EffectLevel (NOEL)*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui keamanan penggunaan produk pangan darurat BPPT pada penggunaan jangka pendek dan panjang.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Mengetahui dosis keamanan akut (LD_{50}) pada hewan coba dengan pemakaian produk pangan darurat BPPT.
2. Mengetahui dosis keamanan subkronik : *No Observed EffectLevel (NOEL)* pada hewan coba dengan pemakaian produk pangan darurat BPPT.
3. Mengetahui perbandingan variable – variable (berat badan, berat organ, tes fungsi hati, tes fungsi ginjal, hematologi) antar kelompok pada uji toksisitas subkronik.
4. Mengetahui gambaran histopatologik organ pada uji toksisitas subkronik

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

1. Memperoleh pengalaman belajar dan pengetahuan dalam menganalisis masalah kesehatan dan melakukan penelitian.
2. Mengembangkan daya nalar, analisis, minat, dan kemampuan dalam bidang penelitian.
3. Mengaplikasikan ilmu tentang penelitian yang didapat selama ini.

1.4.2 Bagi Perguruan Tinggi

1. Sebagai perwujudan Tri Dharma Perguruan Tinggi.
2. Mewujudkan Universitas Indonesia sebagai universitas riset.
3. Sarana dalam menjalin kerjasama antara staf pengajar, mahasiswa, pimpinan fakultas, dan universitas.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Menambahkan pengetahuan masyarakat tentang uji toksisitas dan keamanan produk pangan.

1.4.4 Bagi Pemerintah

Memberi saran pada pemerintah agar menyadarkan masyarakat luas akan pentingnya uji toksisitas pendahuluan terhadap suatu produk pangan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakteristik dari Paparan Racun

Dalam sistem biologi, efek toksik tidak akan dihasilkan oleh agen kimia kecuali agen atau hasil produk metabolisme agen tersebut mencapai tempat yang sesuai dalam konsentrasi tertentu atau memiliki jangka waktu yang cukup untuk menghasilkan manifestasi racun. Faktor agen kimia yang mempengaruhi munculnya efek toksik adalah karakteristik dari agen, kondisi paparan, bagaimana agen dimetabolisme oleh sistem tubuh, konsentrasi dari bentuk aktif agen pada *target site*, dan *susceptibility* dari sistem biologis tubuh terhadap agen. Selain faktor yang berasal dari agen kimia ada faktor lain yang berhubungan dengan kondisi paparan agen yang mempengaruhi munculnya efek toksik yaitu jalur dan tempat paparan, durasi paparan, dan frekuensi paparan.⁽⁵⁾

2.2 Jalur dan Tempat Paparan

Jalur utama tempat masuknya agen racun ke dalam tubuh adalah saluran pencernaan (*ingestion*), paru – paru (inhalasi), kulit (topical, perkutan, atau dermal), dan jalur lainnya. Jalur pemberian dapat mempengaruhi toksisitas agen. Sebagai contoh jika agen yang bekerja pada sistem saraf pusat jika diberikan melalui jalur oral maka agen akan melewati hati dan mengalami detoksifikasi sehingga berkurang toksisitasnya sebelum masuk ke dalam sistem sirkulasi dan kemudian ke sistem saraf pusat. Efek toksik yang ditimbulkan oleh berbagai jalur paparan dipengaruhi oleh agen konsentrasi, agen volume total, agen properti, dan tingkat di mana terjadi paparan.^(5, 6)

2.2.1 Oral⁽⁶⁾

Hingga saat ini pemberian obat dan toksin melalui jalur oral merupakan jalur yang paling terkenal sebagai jalur paparan. Pemberian secara oral melibatkan keberadaan beberapa barrier fisiologis yang harus ditembus untuk mendapatkan konsentrasi yang cukup dalam darah. Barrier – barrier tersebut adalah :

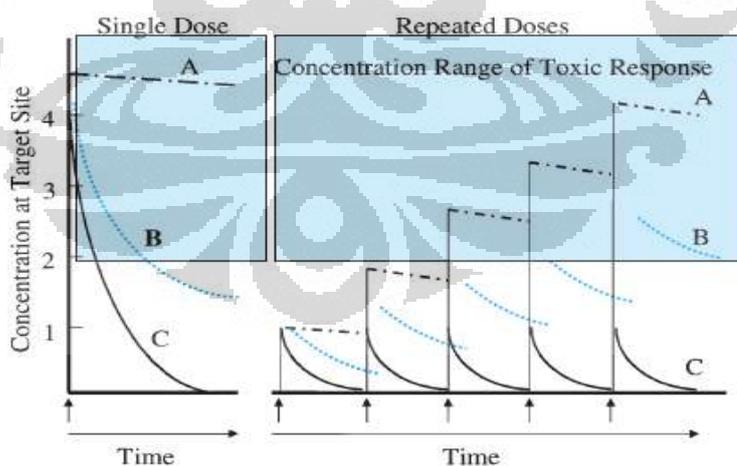
- a. Lapisan mukosa pada rongga mulut, faring, dan esofagus terdiri dari sel epitel berlapis yang berfungsi untuk melindungi bagian atas saluran pencernaan dari efek kontak dengan agen fisik dan kimia.
- b. Sel epitel kolumnar selapis yang terdapat pada lambung dan saluran usus halus berfungsi untuk pencernaan, sekresi, dan absorbs.
- c. Lapisan di bawah sel epitel adalah lamina propria yaitu lapisan mukosa yang kaya akan pembuluh darah, saraf dan *Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)* yang mengandung makrofag dan sel granulosit.
- d. Kelenjar air liur dan usus halus berkontribusi terhadap proses pencernaan dengan mensekresi *saliva* dan *digestive juices*.
- e. Sel enteroendokrin dan eksokrin pada saluran pencernaan mensekresi hormon dan pada lambung mensekresi asam dan lipase lambung.
- f. Fungsi utama dari lambung adalah pencernaan secara mekanik dan kimia dari makanan. Fungsi lainnya adalah absorpsi. Akibatnya, beberapa faktor yang mempengaruhi terhadap perpindahan dan stabilitas obat dalam lambung juga mempengaruhi waktu pengosongan lambung. Keberadaan makanan dan peningkatan pH relative dari lambung menyebabkan penundaan pengosongan lambung. Semakin lama waktu pengosongan lambung semakin besar durasi agen kimia di dalam lambung serta semakin mudah agen kimia untuk dicerna oleh enzim lambung serta asam hidrolisi. Selain itu jika waktu pengosongan lambung semakin panjang maka terjadi penundaan perpindahan ke dan absorpsi di saluran usus.

2.3 Durasi dan Frekuensi Pemaparan

Toksikologis membagi pemaparan dari hewan percobaan terhadap bahan kimia menjadi empat kategori yaitu akut, subakut, subkronik, dan kronik. Pemaparan akut didefinisikan sebagai pemaparan terhadap bahan kimia dalam jangka waktu 24 jam (pemberian tunggal atau diulang untuk agen dengan toksisitas rendah atau tidak ada) dan jalur yang digunakan adalah intraperitoneal, intravena, injeksi subkutan, intubasi oral, dan aplikasi dermal. Pemaparan subakut diartikan sebagai pemaparan berulang terhadap agen kimia dalam jangka waktu satu bulan, pemaparan subkronik dalam

jangka waktu 1-3 bulan, dan pemaparan kronik untuk jangka waktu lebih dari 3 bulan. Untuk ketiga kategori ini pemaparan dapat diberikan melalui berbagai jalur namun umumnya diberikan melalui jalur oral dengan memberikan agen kimia dalam diet. Dalam situasi manusia, frekuensi dan durasi dari pemaparan kurang jelas dibanding dengan studi pada hewan tetapi studi ini dapat memberikan gambaran umum dari kondisi pemaparan.^(5, 6)

Pada sebagian besar agen kimia, efek toksik yang muncul pada pemaparan tunggal berbeda dengan pemaparan berulang. Pemaparan akut terhadap agen kimia yang mudah diabsorpsi dalam menghasilkan efek toksik dengan cepat tetapi dapat juga menghasilkan efek toksik yang tertunda yang kemungkinan berbeda dengan efek pemaparan kronik. Pemaparan kronik terhadap agen kimia dapat juga memberikan efek langsung setiap kali pemberian agen sebagai tambahan dari efek jangka panjang. Dalam mencari karakteristik toksik dari suatu agen kimia maka penting untuk mencari informasi tidak hanya melalui efek dosis tunggal (akut) dan jangka panjang (kronik) tetapi juga dari pemaparan dengan durasi menengah. Faktor yang berhubungan dengan waktu yang penting dalam pemaparan berulang adalah frekuensi dari pemaparan. Hubungan antara frekuensi pemaparan dengan tingkat eliminasi dapat dilihat pada Gambar 2.⁽⁵⁾



Gambar 3 Hubungan antara dosis dan konsentrasi pada *target site* pada dosis frekuensi dan tingkat konsentrasi yang berbeda.⁽⁵⁾

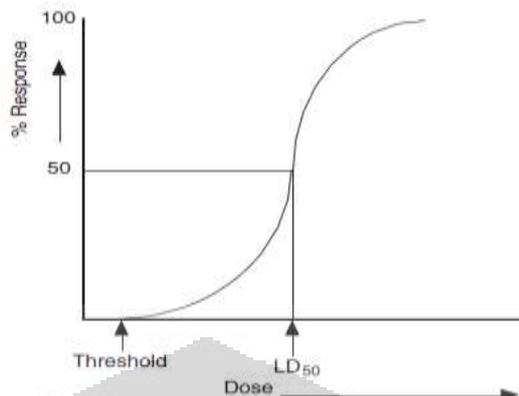
Garis A. Agen kimia dengan durasi eliminasi sangat lambat (sekitar setengah tahun). Garis B. Agen kimia dengan durasi eliminasi sama dengan frekuensi pemberian dosis (1 hari). Garis C. Durasi

eliminasi lebih cepat dari pada frekuensi pemberian dosis (5 jam). Area berwarna biru menandakan konsentrasi dari agen kimia pada *target site* yang dibutuhkan untuk menimbulkan respon toksik.

Agen kimia yang menimbulkan efek berat dengan dosis tunggal kemungkinan tidak menimbulkan efek jika diberikan dengan total dosis yang sama dalam beberapa interval. Untuk agen kimia yang digambarkan oleh garis B pada gambar 2, sebuah konsentrasi toksik secara teori tidak dapat dicapai sebelum dosis ke-4, di mana untuk garis A konsentrasi dicapai untuk 2 dosis, dan untuk garis C konsentrasi tidak dapat dicapai terlepas dari banyaknya dosis yang diberikan. Ada kemungkinan terjadinya kerusakan pada sel atau jaringan setiap pemberian dosis walaupun agen kimia tidak terakumulasi. Yang perlu diperhatikan adalah apakah waktu interval pemberian dosis cukup bagi tubuh untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi. Telah terbukti bahwa untuk pemaparan yang berulang, produksi dari efek toksik tergantung total pada frekuensi pemberian dosis dibanding durasi pemaparan.⁽⁵⁾

2.4 Hubungan Dosis-Respon/ Konsentrasi-Respon

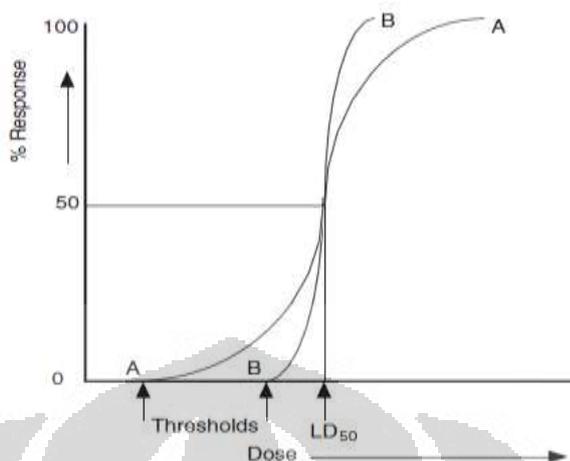
Suatu hubungan *dose-response*(*concentration-response*) didefinisikan sebagai suatu asosiasi antara dosis(konsentrasi) dan insiden efek biologi dalam suatu populasi yang terpapar, umumnya diekspresikan dalam persentase. Hingga saat ini efek yang dimaksud adalah kematian. Hubungan klasik antara dosis-respon atau konsentrasi-respon dapat dilihat melalui gambar 3. Gambar ini merupakan suatu kurva teoritis yang dalam prakteknya jarang ditemukan. Kurva dalam bentuk ini membentuk dasar dari penentuan LD_{50} (*Letal Dose 50*) atau LC_{50} (*Lethal Concentration 50*). LD_{50} dan LC_{50} merupakan kasus spesifik dari generalisasi nilai LD_n dan LC_n . LD_n adalah dosis toksik letal terhadap $n\%$ populasi percobaan. LC_n adalah konsentrasi pemaparan dari toksik letal terhadap $n\%$ dari populasi percobaan. Sehingga dapat diartikan bahwa LD_{50} merupakan dosis tunggal suatu agen kimia yang didapat secara statistik yang diduga menyebabkan kematian pada 50% populasi organisme dalam kondisi percobaan.^(6, 8) Sedangkan LC_{50} , merupakan konsentrasi pemaparan dari agen kimia yang diduga menimbulkan kematian dari 50% populasi organisme dalam kondisi percobaan.



Gambar 4 *The classic dose-response curve*⁹

Nilai lain yang didapat dari hubungan dosis-respon atau konsentrasi-respon adalah ambang batas dari dosis atau konsentrasi, contohnya : dosis atau konsentrasi minimum yang dibutuhkan untuk menghasilkan respon yang nampak pada populasi percobaan. Nilai ambang batas yang didapat tidak merupakan suatu nilai absolute sehingga digunakan level efek terendah yang dapat diobservasi (LOEL – *Lowest Observed Effect Level*) atau (NOEL – *No Observed Effect Level*) sebagai peraturan standard.⁽⁸⁾

Penggunaan dari LD₅₀ merupakan suatu panduan kasar mengenai toksisitas relatif. LD₅₀ tidak memberikan informasi mengenai toksisitas subletal, tidak menyediakan informasi mengenai efek mekanis atau organ target, dan tidak menyediakan jalur toksisitas komplementari atau selektif.^(6, 8) Metode ini juga dibatasi oleh jalur dan durasi dari pemaparan.⁽⁸⁾ Semua klasifikasi berdasarkan LD₅₀ valid hanya untuk populasi percobaan, kondisi dasar percobaan, dan jalur pemaparan yang digunakan. LD₅₀ tidak memberikan penjelasan mengenai bentuk kurva hubungan dosis-respon yang digunakan sebagai dasar sehingga dua agen kimia dapat memiliki toksisitas yang sejajar bila mereka memiliki LD₅₀ yang sama. Akan tetapi salah satu agen kimia mungkin memiliki ambang batas letal lebih rendah dan membunuh anggota populasi terpapar pada konsentrasi yang tidak memiliki efek pada anggota lain (Gambar 4).⁽⁸⁾



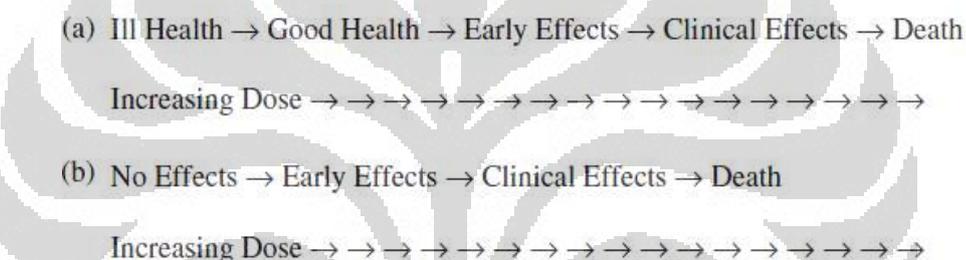
Gambar 5 *Two substances with the same LD₅₀ but different lower lethal thresholds⁽⁸⁾*

Dalam menentukan nilai LD₅₀ atau nilai toksikologi lainnya, *dosage* diekspresikan dalam mg/kg berat badan atau mg/cm² luas permukaan tubuh hewan percobaan sesuai dengan spesies mamalia yang digunakan sebagai pengganti manusia.⁽⁹⁾ Ada beberapa faktor yang mempengaruhi reabilitas dari penentuan LD₅₀, yaitu : penentuan spesies, jalur pemberian, waktu pemaparan, dan observasi. Secara umum, reproduktivitas dari LD₅₀ bergantung pada kriteria yang sama untuk setiap percobaan. Spesies hewan coba harus memiliki umur, kelamin, galur, berat, dan peternak yang sama. Jalur dan waktu pemberian sangat penting. Perawatan mengenai siklus terang dan gelap, pemberian makan, dan pembuangan sampah harus sama setiap kali kunjungan dalam jadwal. Perubahan dari LD₅₀ banyak terjadi karena adanya perubahan parameter antar percobaan.⁽⁶⁾

Telah banyak spesies hewan yang digunakan dalam percobaan akan tetapi pada awalnya uji toksisitas dilakukan pada hewan laboratorium untuk menentukan efek yang dapat muncul pada manusia yang telah terpapar oleh agen kimia dan bentuk hubungan dosis-respon. Berdasarkan berat badan, diasumsikan bahwa dalam perhitungan data toksisitas, manusia 10x lebih sensitif dibanding rodensia. Dengan mengetahui hubungan tersebut maka dapat diestimasi besar pemaparan agen kimia yang dapat ditoleransi oleh manusia.⁽⁸⁾

2.5 Hubungan Dosis-Efek⁽⁸⁾

Hubungan dosis-efek dipelajari oleh farmakologis untuk mendapatkan level dosis obat yang memberikan efek menguntungkan dan yang memberikan efek berbahaya bagi tubuh. Gambar 5 menunjukkan hubungan antara dosis dan efek yang berbeda – beda pada substansi yang esensial dan non-esensial. Perbedaan dari grup tersebut yaitu tidak adanya keuntungan yang akan didapat dari susbtansi - substansi non-esensial sehingga susbtansi –substansi tersebut diklasifikasikan sebagai toksik jika mereka berbahaya pada dosis rendah dan dilarang untuk dipergunakan. Hal ini tidak terjadi pada substansi esensial kecuali pada dosis tinggi. Gambar 5 menunjukkan tahap tidak ada efek, efek awal, dan efek klinis.



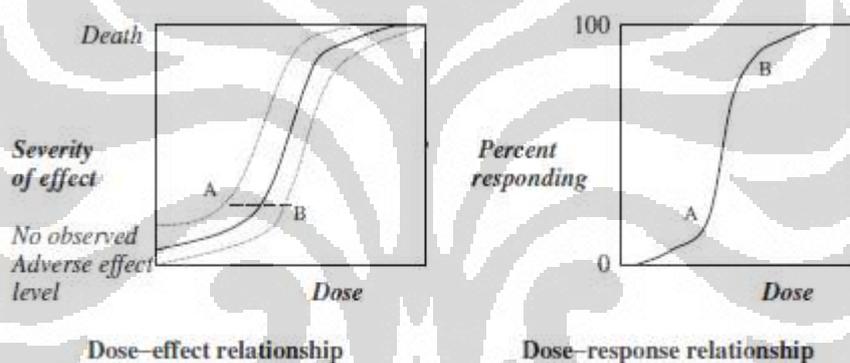
Gambar 6 Hubungan antara dosis dan efek. (a) Substansi esensial, (b) substansi non-esensial⁽⁸⁾

Dosis maksimum yang tidak menghasilkan perubahan dalam kondisi pemaparan dikenal sebagai *no effect level* (NEL). Tidaklah mudah untuk menentukan apakah suatu efek perlu dideteksi dalam kondisi percobaan dan apakah efek tersebut berarti. Oleh karena itu suatu pengukuran praktis digunakan *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL). NOAEL merupakan suatu efek awal atau efek pada dosis rendah yang bukan merupakan efek yang merugikan. Sehingga suatu NOAEL terletak di atas level yang menyebabkan efek awal (dosis rendah) tetapi di bawah level yang menyebabkan efek klinis.

Suatu efek merugikan akan memberikan perubahan pada morfologi, fisiologi, pertumbuhan, perkembangan, atau rentang hidup suatu organisme sebagai akibat dari gangguan pada kemampuan fungsional atau gangguan pada kemampuan untuk mengompensasi stress tambahan atau peningkatan kerentanan terhadap efek merugikan yang dipengaruhi lingkungan. Efek klinis umumnya merupakan efek yang merugikan, contohnya asma, tremor, polineuropati, dan gangguan fungsi ginjal serta

hati. Sangat jarang efek awal dan klinis yang disebabkan hanya oleh satu substansi. Oleh karena itu efek yang muncul dapat disebabkan oleh satu atau beberapa substansi yang saling berinteraksi sehingga menimbulkan efek toksik. Bentuk hubungan dosis-efek berbentuk S dan hubungan ini terjadi hampir diseluruh sistem organ kecuali kanker dan sistem imun.(Gambar 6)

Kurva hubungan dosis-respon mirip dengan hubungan dosis-efek. (Gambar 6) Respon merupakan reaksi dari organism atau bagian dari organism (seperti otot) terhadap stimulus. Definisi lain dari respon yaitu proporsi grup yang menunjukkan efek dalam jangka waktu dan tingkat dosis yang diberikan. Pada definisi ini hubungan dosis-respon menjadi berbeda dengan hubungan dosis-efek. Hubungan dosis-respon ini digunakan untuk mendeteksi grup sensitif.⁽⁸⁾



Gambar 7 Hubungan antara dosis-efek dan dosis-respon. Garis putus – putus mengindikasi 95% *confidence limits* dari hubungan dosis-efek; nilai ini dapat ditransformasi menjadi 5% dan 95% nilai dosis untuk kurva dosis-respon untuk level efek tertentu.⁽⁸⁾

2.6 Korelasi Tes Toksisitas pada Hewan dengan Pemaparan pada Manusia

Informasi yang didapat dari tes toksisitas deskriptif pada hewan berguna dalam menentukan potensi toksisitas suatu senyawa kepada manusia. Tujuan dari tes ini adalah untuk mengidentifikasi racun kimia pada tahap awal dari pengembangan agen kimia terutama jika substansi tersebut telah dipasarkan. Bersama dengan tes *in vitro*, tes ini diaplikasikan sebagai penanda biologis dari risiko terinduksi agen kimia baik yang terjadi secara sintetik maupun alami.⁽⁶⁾

Kemampuan untuk mempresiksi toksisitas pada manusia dengan tingkat keamanan yang dapat dipertanggungjawabkan merupakan kesimpulan yang

diinginkan dalam percobaan menggunakan hewan. Korelasi dari hasil percobaan toksisitas deskriptif pada hewan dengan pemaparan pada manusia membutuhkan pertimbangan parameter hewan percobaan yang matang, salah satunya yaitu pemilihan spesies yang memiliki fisiologi yang mirip. Variasi dari tes yang ada untuk mencapai kesimpulan yang valid harus dipilih secara sistematis berdasarkan pedoman yang ada.⁽⁶⁾

2.7 Uji Toksisitas Oral Akut

Dalam penilaian dan evaluasi dari karakteristik toksik sebuah substansi, determinasi dari *acute oral toxicity* merupakan suatu langkah awal. Hal tersebut juga menyediakan informasi mengenai bahaya kesehatan yang dapat muncul dari sebuah paparan jangka pendek melalui jalur oral. Studi tersebut juga menentukan aturan dosis pada studi subkronik dan studi lainnya.⁽⁶⁾

Prinsip dari uji toksisitas ini adalah suatu substansi tes diberikan secara oral dengan menggunakan alat bantu sonde dengan jarum intubasi dengan ukuran 3 inch dengan ujung bulat (*ball-tipped*) dalam dosis yang telah ditentukan pada beberapa grup dari hewan percobaan, satu dosis per grup.^(6, 9) Selanjutnya observasi selama 14 hari setelah pemberian untuk melihat efek toksik dan kematian. Hasil akhir tes akan didapatkan LD₅₀.⁽⁶⁾

Tingkat dosis diharuskan cukup dalam jumlahnya, minimal 3, dengan beda yang disesuaikan (dosis tidak memberi efek (*no-effect dose*) - dosis toksik) sehingga dapat menghasilkan grup tes dengan *range* efek toksik dan angka kematian yang bermakna. Data harus cukup sehingga dapat menghasilkan sebuah kurva *dose-response* dan jika memungkinkan dapat juga memastikan LD₅₀.^(9, 10) Jika sebuah tes pada satu level dosis untuk minimal 5000 mg/kg berat badan, menggunakan prosedur yang dipakai untuk studi ini, tidak menghasilkan *no compound-related mortality* maka studi menggunakan 3 level dosis mungkin tidak diperlukan, dosis tersebut disebut sebagai dosis limit.⁽⁹⁾

2.8 Uji Toksisitas Oral Subkronik

Dalam penilaian dan evaluasi dari karakteristik toksik sebuah substansi, determinasi dari *subchronic oral toxicity* menyediakan informasi mengenai bahaya kesehatan yang dapat muncul dari sebuah paparan terus menerus dalam jangka waktu tertentu. Studi ini dapat memberikan informasi mengenai organ target, kemungkinan terjadinya akumulasi, dan estimasi dari level yang tidak menimbulkan efek dari suatu paparan yang dapat digunakan untuk menentukan level dosis untuk studi kronik dan mendirikan kriteria keselamatan untuk paparan pada manusia.⁽⁶⁾

Prinsip dari uji toksisitas ini adalah suatu substansi tes diberikan secara oral dalam dosis berjangka yang telah ditentukan pada beberapa grup dari hewan percobaan, satu dosis per grup, dalam periode 90 hari dengan cara yang sama dengan pemberian pada tes akut. Selanjutnya selama periode pemberian substansi dilakukan observasi setiap hari untuk mengetahui adanya tanda – tanda toksisitas. Pada akhir tes hewan yang mati selama tes dan hewan yang bertahan hidup diautopsi untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi.⁽⁶⁾

Percobaan dibagi dalam 4 grup yaitu I (kontrol), II (dosis rendah), III (dosis sedang), dan IV (dosis tinggi). Tingkatan dosis yang dibuat dibagi dari dosis yang tidak memberi efek hingga memberi efek toksik tanpa mortalitas yang signifikan.⁽¹⁰⁾ Untuk substansi yang diberikan dengan menggunakan alat bantu maka dosis yang diberikan harus sesama mungkin untuk setiap hari dan disesuaikan dalam interval (setiap minggu atau setiap dua minggu) untuk menjaga level dosis konstan terhadap berat hewan. Jika sebuah tes pada satu level dosis untuk minimal 1000 mg/kg berat badan (jika akan disesuaikan untuk keperluan pada manusia maka level dosis lebih tinggi boleh diberikan), menggunakan prosedur yang dipakai untuk studi ini, tidak menghasilkan *no compound-related mortality* maka studi menggunakan 3 level dosis mungkin tidak diperlukan, dosis tersebut dikenal sebagai dosis limit.⁽⁷⁾ Pada akhir studi dapat diestimasi *Acceptable Daily Intake (ADI)*, *No Observed Effect Level (NOEL)*, atau *No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)*.⁽¹⁰⁾

2.9 Persiapan Hewan dan Substansi Tes

Hewan dewasa yang sehat diadaptasikan dengan kondisi laboratorium selama 5 hari sebelum pengacakan dan pemilihan hewan untuk dimasukkan ke dalam grup perlakuan. Substansi tes dilarutkan atau dipadatkan dalam sebuah wadah yang sesuai. Direkomendasikan untuk menggunakan larutan berupa air. Bila tidak ada, dapat diganti dengan menggunakan larutan lainnya (Tabel 1).^(7, 9, 10) Bila menggunakan larutan bukan air maka karakteristik toksik harus diketahui terlebih dahulu. Volume maksimum dari cairan yang dapat diberikan dalam satu kali tergantung dari ukuran hewan percobaan. Pada hewan rodensia, volume < 1ml/100 g berat tubuh, kecuali pada kasus yang menggunakan larutan air yaitu dapat memberikan 2 ml/100 g. Variasi volume pada percobaan harus diminimalisir dengan cara menyesuaikan konsentrasi untuk memastikan volume konstan untuk seluruh tingkat dosis.^(7, 9)

Tabel 1. Vehikulum (*Vehicles*) untuk Rute Oral⁽¹⁰⁾

Air
Metilselulosa atau karboksimetilselulosa (CMC), 0.5-5% suspensi cair
Minyak (jagung, kacang, wijen)

2.10 Hewan Percobaan

Dari seluruh spesies mamalia yang tersedia untuk tes agen toksisitas suatu agen kimia maka hewan rodensia merupakan pilihan yang paling berguna dan sesuai.^(2, 9) Di luar perbedaan ukuran dan anatomi minor, fisiologi hewan rodensia hampir indentik dengan manusia. Sehingga dikatakan bahwa rodensia merupakan spesies hewan yang dapat menggantikan manusia dalam tes toksisitas umum.^(6, 7, 9, 10) Keuntungan dari tikus untuk percobaan toksik adalah tikus tidak dapat muntah (*vomit*). Hal tersebut dikarenakan tikus memiliki pembatas kuat antara perut dan esophagus, tidak memiliki aktivitas kontraksi 2 otot pada diafragma, dan tidak memiliki hubungan saraf kompleks antara batang otak dan organ visceral yang mengkoordinasi otot. Tikus memiliki strategi lain untuk menghindari toksik dengan *super-sensitif food-avoidance learning*. Ada suatu mekanisme yang dilakukan oleh tikus yang mirip dengan muntah yaitu regurgitasi. Umumnya regurgitasi ini umum dilakukan tikus yang diberikan *bulky diets*.⁽¹¹⁾ Dianjurkan untuk memakai tikus yang

biasa digunakan di laboratorium (*laboratory strain*). Variasi berat dari hewan yang digunakan pada percobaan tidak boleh melebihi $\pm 20\%$ dari berat mean.^(7, 9)

Sprague Dawley

Nomenclature: Hsd:Sprague Dawley[®]SD[®], Hsd:SpragueDawley[®] (CD)[®]



Tikus Sprague Dawley merupakan tikus *multipurpose albino outbred* yang digunakan secara luas pada penelitian medis.⁽¹²⁾ Digunakan khususnya pada penelitian dibidang toksikologi, neurologi, reproduksi, aging, teratology, onkologi, nutrisi, dan obesitas. Kelebihan utamanya adalah ketenangan, jinak, dan kemudahan untuk perawatannya. Tikus jenis ini dihasilkan oleh peternakan *Sprague Dawley* di Madison, Wisconsin (*Sprague Dawley Animal Company*) pada tahun 1925. Jumlah tikus yang dihasilkan dalam sekali persalinan adalah 11.^(12, 13) Berat badan tikus deasa sekitar 250 – 300 g untuk betina dan 450 – 520 g untuk jantan. Umur hidupnya adalah 2.5 - 3.5 tahun.⁽¹²⁾

Jumlah dan Sex

Menurut OECD jumlah sampel untuk uji toksisitas akut lewat jalur oral menggunakan hewan rodensia, umumnya tikus atau mencit, adalah 5 ekor untuk tiap jenis kelamin untuk setiap tingkat dosis. Sedangkan jumlah sampel untuk uji toksisitas subkronik lewat jalur oral 5-10 ekor untuk tiap jenis kelamin untuk setiap tingkat dosis.^(6, 7, 9, 10) Untuk hewan betina harus belum pernah melahirkan dan tidak dalam kondisi hamil.^(7, 9)

2.11 Pengukuran Dosis⁽¹⁰⁾

1. Volume Dosis

Untuk menghitung volume dosis jika diketahui dosis dan konsentrasi :

$$\text{Volume Dosis (ml / kg berat badan)} = \frac{\text{dosis (mg/kg.b)}}{\text{konsentrasi (mg/ml)}}$$

2. Konsentrasi dari Campuran Pemberian Dosis

Untuk menghitung konsentrasi dosis jika diketahui dosis dan volume dosis yang diinginkan :

$$\text{Konsentrasi (mg/ml)} = \frac{\text{dosis (mg/kg.b.b)}}{\text{volumedosis (ml/kg.b.b)}}$$

3. Dosis setiap Hewan Percobaan

Untuk menghitung volume dosis zat yang akan diberikan sebagai cairan (*liquids*) kepada hewan (individual)

Volume dosis untuk hewan (ml) = volume dosis (ml/kg b.b) x berat badan hewan (kg)

Volume dosis yang dianjurkan untuk pemberian zat pada percobaan lewat jalur oral idealnya adalah 10 mL/kg (limit : 20-50 mL/kg). Ukuran jarum yang dianjurkan untuk sonde adalah jarum intubasi dengan ukuran 3 inch dengan ujung bulat (*ball-tipped*).

Singkatan : ml = milimeter; mg = miligram; g = gram (1000mg); kg = kilogram (1000g); b.b = berat badan (kg)

2.12 Pemeriksaan Klinis

Pemeriksaan klinis harus dilakukan minimal 1 kali sehari. Observasi yang harus dilakukan termasuk pengamatan terhadap perubahan pada kulit dan bulu, mata dan membrane mukosa, pernapasan, peredaran darah, sistem saraf autonomi dan pusat, aktivitas somatomotorik, dan pola perilaku. Perhatian khusus perlu diberikan untuk mengamati tremor, kejang, air liur, diare, letargi, tidur, dan koma. Waktu kematian harus dicatat setepat mungkin. Berat badan setiap hewan harus diukur sebelum pemberian substansi tes, setiap minggu setelah pemberian, dan ketika mati. Perubahan berat badan harus dikalkulasi dan dicatat ketika hewan mampu bertahan hidup lebih dari satu hari. Pada akhir percobaan semua hewan yang bertahan hidup harus ditimbang kemudian dikorbankan.^(7, 9, 10)

2.13 Pemeriksaan Patologi untuk Uji Toksisitas Oral Subkronik

Pemeriksaan Patologi yang dilakukan untuk uji toksisitas subkronik melalui jalur oral pada hewan percobaan rodensia adalah pemeriksaan autopsi kasar, histopatologi,

hematologi, kimia klinis (*clinical chemistry*), dan urinalisis setelah terminasi seluruh populasi hewan untuk tiap tingkatan dosis.^(7, 10)

2.13.1 Pemeriksaan Makroskopik / Autopsi Kasar dan Histopatologi^(7, 10)

Pemeriksaan autopsi kasar meliputi pemeriksaan permukaan luar tubuh, seluruh lubang, kranial, ruang toraks dan abdominal beserta isinya. Hati, ginjal, korteks adrenal, dan testis ditimbang basah segera setelah pembedahan untuk mencegah agar tidak mengering. Organ – organ yang telah diperiksa secara kasar disimpan kemudian diperiksa secara histopatologi terutama pada hewan dalam grup kontrol dan grup dosis tinggi.

2.13.2 Pemeriksaan Kimia Klinis (*Clinical Chemistry*)

Tes umum untuk pemeriksaan kimia klinis adalah keseimbangan elektrolit, metabolisme karbohidrat, fungsi hati dan ginjal. Penentuan lain yang berguna untuk evaluasi toksik adalah analisis dari lipid, hormone, keseimbangan asam/basa, metahemoglobin, dan aktivitas kolinesterase.^(7, 10, 14) Volume serum atau plasma dari darah yang dibutuhkan adalah 400-500 µl serum/plasma atau 1-1.2 ml *whole blood*.⁽¹⁰⁾

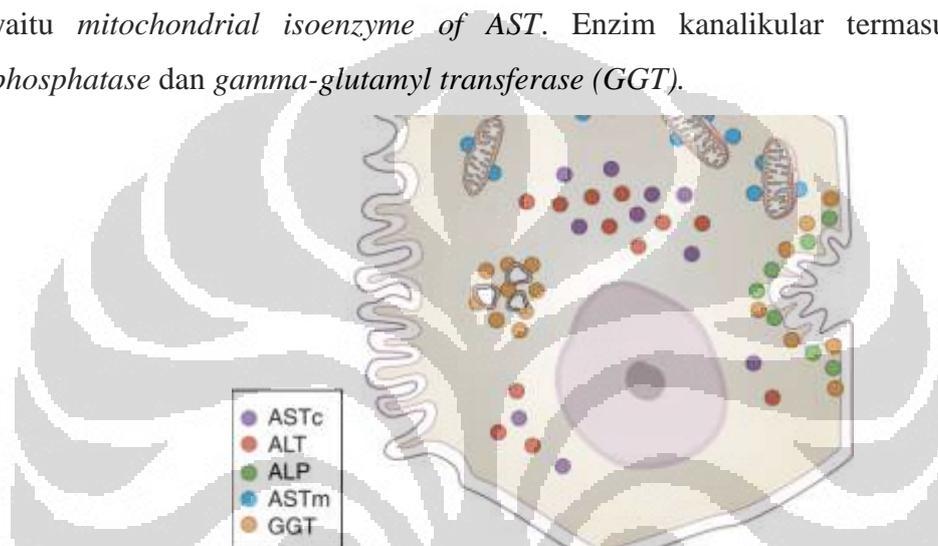
A. Fungsi Hati⁽¹⁵⁾

Hati terdiri dari 3 sistem yaitu sistem hepatosit yang berhubungan dengan reaksi metabolik dan makromolekular terutama protein, sintesis dan degradasi; sistem biliari yang berhubungan dengan metabolisme bilirubin dan garam empedu; dan sistem retikuloendotelial yang berhubungan dengan sistem imun dan produksi heme dan metabolit globin (bilirubin). Fungsi setiap sistem dapat diukur secara konvensional dan virtual non-invasif dengan menentukan tingkat serum dari analit spesifik yang dikenal sebagai tes profil fungsi hepar.

Tingkat Plasma Enzim

Sebagai sel kompleks metabolik, hepatosit mengandung banyak enzim dalam jumlah tinggi. Jika terjadi kerusakan hati maka enzim dapat bocor dan masuk

ke dalam plasma sehingga hal ini dapat menjadi indikasi mendiagnosis dan memonitor kerusakan hati. Di dalam hepatosit, enzim yang diukur terdapat pada lokasi – lokasi yang spesifik sehingga jenis kerusakan hati dapat menentukan pola perubahan enzim. Gambar 7 mengilustrasikan lokasi dari enzim hepatosit yang penting. Enzim sitoplasmik yaitu *lactate dehydrogenase (LD)*, *aspartate aminotransferase (AST)*, dan *alanine aminotransferase (ALT)*. Enzim mitokondria yaitu *mitochondrial isoenzyme of AST*. Enzim kanalikular termasuk *alkaline phosphatase* dan *gamma-glutamyl transferase (GGT)*.



Gambar 8. Lokasi Enzim Hepatosit⁽¹⁵⁾

Ada 2 enzim yang penting secara diagnosis dalam kategori ini yaitu *aspartate aminotransferase (AST)* yang disebut juga sebagai *serum glutamate oxaloacetate transaminase (SGOT)* dan *alanine aminotransferase (ALT)* yang disebut juga sebagai *serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT)*. Enzim – enzim ini mengkatalisis pemindahan grup amino (AST/ALT) menjadi alpha-ketoglutarate secara reversible untuk menghasilkan glutamate ditambah oleh *ketoacid* dari asam amino awal, seperti *oxaloacetate* atau *pyruvate*. Kedua enzim membutuhkan *pyridoxalphosphate* (vitamin B₆).

AST terdapat pada intra dan ekstrasitokondria sementara ALT hanya ekstrasitokondria. AST didistribusi ke seluruh jaringan tubuh termasuk jantung dan otot sedangkan ALT ditemukan terutama di hati walaupun secara signifikan ditemukan juga dalam ginjal. Total AST sitoplasma memiliki aktivitas tinggi dalam hepatosit dengan tingkat sel AST 7000 x dibanding dalam plasma. ALT juga

memiliki aktivitas tinggi dalam hepatosit dengan tingkat sel ALT 3000 x dibanding di dalam plasma.

Perubahan enzim yang terjadi dalam kerusakan hepar dapat dijelaskan dengan melihat perbedaan tingkat aktivitas hepar dan waktu paruh enzim. Pada kerusakan hepar akut, mula – mula AST menjadi lebih tinggi dari ALT. Dalam 24-48 jam kerusakan terus terjadi dan ALT menjadi lebih tinggi dari AST karena memiliki waktu paruh yang lebih lama. Pada kerusakan hepar kronik, ALT lebih meningkat dibanding AST akan tetapi setelah terjadi progres kerusakan aktivitas ALT berkurang sehingga rasio AST terhadap ALT meningkat sehingga pada akhirnya AST lebih tinggi dibanding ALT. Pada tahap akhir kronik tingkat kedua enzim tidak meningkat dan kemungkinan rendah karena kerusakan jaringan yang besar.

B. Fungsi Ginjal^(16, 17)

Volume dan komposisi normal dari elektrolit yang terkandung pada cairan tubuh yang bervariasi penting untuk menjaga kelangsungan hidup. Untuk menjaga volume dan komposisi normal dari elektrolit dibutuhkan partisipasi dari berbagai mekanisme kontrol terutama ginjal. Fungsi ginjal yang paling penting adalah mengeliminasi *waste product* dari metabolisme yang direpresentasikan oleh *glomerular filtration rate (GFR)*.

Mengukur Glomerular Filtration Rate (GFR)

GFR merupakan indikator terbaik untuk mengukur tingkat fungsi ginjal. Ada 2 cara yang telah dilakukan dalam pengukuran GFR yaitu dengan menggunakan substansi endogen dan menggunakan substansi eksogen. Perlu diperhatikan bahwa marker molekuler yang digunakan dalam menentukan GFR direabsorpsi dan disekresi seminimal mungkin oleh tubulus ginjal. Substansi endogen yang digunakan secara umum adalah nitrogen urea, kreatinin, dan sistatin C.

Kreatinin

Kreatinin merupakan substansi endogenus dengan berat molekul 113 Da yang dihasilkan oleh otot melalui keratin dan keratin fosfat dalam proses dehidrasi non-enzimatik, kecepatan produksinya tergantung dari massa otot, temperature, dan keasaman. Kreatinin merupakan GFR marker yang paling sering digunakan karena produksi yang konstan, tidak terikat protein plasma, filtrasi bebas oleh glomerulus, tidak direabsorpsi oleh tubulus ginjal, dan hanya sedikit yang disekresi oleh tubulus. Kreatinin juga memiliki kekurangan sebagai GFR marker yaitu variasi individual pada produksinya yang dipengaruhi oleh massa otot, didapat dari daging yang kromogen (endogenus dan eksogenus) dalam metode alkali picrate dapat mengganggu pengukuran, dan kreatinin yang sebagian disekresi oleh tubulus proksimal melalui jalur kation organik dapat dihambat oleh beberapa obat seperti *cimetidine, trimethoprim, pyrimethamine, and salicylate*.

Urea

Urea merupakan *waste* produk utama dalam tubuh yang mengandung nitrogen. Memiliki berat molekul 60 Da. Konsentrasi urea diekspresikan dalam jumlah nitrogen yang terdapat dalam urea sehingga lebih sering dikenal sebagai serum urea nitrogen. Serum urea digunakan secara luas dalam mengukur disfungsi ginjal tetapi jika digunakan untuk mengukur GFR kurang baik dengan alasan sebagai berikut : konsentrasi urea dalam serum tidak hanya dipengaruhi oleh fungsi ginjal tetapi juga oleh kecepatan produksi ginjal yang dipengaruhi oleh protein *intake* tiap individu, jumlah urea yang direabsorpsi di tubulus proksimal dipengaruhi volume vaskular yang efektif, dan jumlah urea yang direabsorpsi oleh medular internal dipengaruhi oleh kecepatan aliran urin. Jika fungsi ginjal normal tanpa depleksi volume yang berat maka *urea clearance* = 50% dari *creatinine clearance*.

2.13.3 Pemeriksaan Hematologi

Volume darah pada mamalia relative konstan dan umumnya merepresentasikan 5-9% berat badan, berbeda antar spesies. Pada saat pembunuhan hewan percobaan sekitar 50% dari total darah hewan coba dapat diambil dengan

menggunakan teknik tertentu(Tabel 2). Tabel 3 menunjukkan volume darah yang digunakan dalam uji toksikologi.^(10, 18, 19)

Tabel 2. Teknik Pengambilan Sampel Darah pada Penelitian Toksikologi⁽¹⁰⁾

Spesies	Tekhnik
Mencit	Sinus orbital <i>Cardiac Puncture</i>
Tikus	Sinus orbital Vena Jugularis <i>Cardiac Puncture</i> <i>Tail Vein</i> Aorta Vena kava

Tail venipuncture

Teknik ini dapat dilakukan dengan atau tanpa menggunakan anesthesia. Letakan tikus pada permukaan datar disinari oleh cahaya terang, terutama cahaya putih, kemudian rentangkan ekor dengan menggunakan ibu jari dan jari telunjuk. *Swab* ekor dengan menggunakan *xylol* dan disinfektan kemudian keringkan dengan *sponge*. *Syringe* 22– 24 *gauge*, dan jarum ½ - 1 *inchi* digunakan. Vena terletak pada lateral atau medial dari buntut. Digunakan pemanasan untuk mendilatasi vena, menurut Armin et al. (1960) dan Porter (1957) teknik pemanasan dilakukan dengan memasukan tikus dalam kandang hangat atau mencelupkan ekor pada air dengan suhu 40-50°C.⁽¹⁸⁾

Tabel 3. Volume Darah yang Digunakan dari Hewan Coba pada Penelitian Toksikologi⁽¹⁰⁾

Spesies	Berat Badan (kg)	Volume Darah (ml)			
		Volume Total (ml)	Sampel per mgg	Sampel per bln	Nekropsi
Mencit	0.03	2	0.075	0.2	1
Tikus	0.3	20	1	2	10

Volume darah sampel 20-50 µl dengan menggunakan antikoagulan seperti EDTA cukup untuk digunakan pada uji hematologi : hitung leukosit (WBC), hitung

eritrosit (RBC), konsentrasi hemoglobin (Hb), mean volume korpuskular (MCV), dan hitung platelet. Dari pengukuran ini variabel berikut dapat dikalkulasi yaitu : hematokrit, mean Hb korpuskular (MCH), dan mean konsentrasi Hb korpuskular (MCHC). Untuk hitung jenis leukosit dan hitung retikulosit dibutuhkan darah sebanyak 50 µl. Sehingga dapat diperkirakan total 300-400 µl yang disimpan dengan EDTA cukup untuk mengukur hematologi rutin untuk uji toksikologi.^(10, 19)

Tabel 4. Parameter Hematologi dari Studi Subkronik dan Kronik – Petunjuk Standard⁽¹⁰⁾

Hitung Eritrosit (<i>Erythrocyte count</i>)
Hematokrit
Konsentrasi Hemoglobin
Hitung Leukosit (<i>Leukocyte count</i>)
Total
Jenis
Pengukuran fungsi pembekuan darah
Waktu Pembekuan (<i>Clotting time</i>)
Hitung platelet (<i>Platelet count</i>)
Waktu Prothrombin (<i>Prothrombin Time</i>)
Waktu aktivasi sebagian thromboplastin (<i>Activated partial thromboplastin time</i>)

Hemoglobin (Hb) menggunakan metode Sahli yaitu Hb diubah menjadi hematin asam, kemudian warna yang terjadi dibandingkan secara visual dengan standard dalam hemoglobinometer.^(14, 19, 20) Menghitung Jumlah Leukosit Total menggunakan metode manual.^(14, 19, 21) Menghitung *Differential Leucocyte* membuat dan mewarnai sediaan hapus darah tepi dengan pewarnaan Wright.^(14, 19, 22)

Tabel 5. Faktor yang dapat mempengaruhi Pengukuran Uji Kimia Klinis dan Hematologi⁽¹⁰⁾

Biologi	Metodelogi
Spesies	Tempat pengambilan darah
Sex	Penggunaan anesthesia
Usia	Instrumen
Kondisi puasa	Kondisi assay, cth : temperatur, konsentrasi substrat
Diet	

2.13.4 Imunotoksikologi

Imunotoksitas mengarah pada efek merugikan dari berbagai substansi yang mendesak sistem imun. Agen yang dapat menimbulkan imunotoksitas adalah obat, logam, protein, dan agen kimia organik dan inorganik. Gejala utama yang disebabkan oleh agen imunotoksik adalah hipersensitivitas, autoimun, peningkatan imun, dan supresi imun. Peningkatan imun menyebabkan stimulasi berlebih dari respon imun dan dapat menimbulkan *gross inflammation* dan kerusakan jaringan. Supresi imun menurunkan aktivitas dari sistem imun termasuk pengawasan, seperti eliminasi sel tumor. Respon jenis ini dapat meningkatkan keparahan dari infeksi dan pertumbuhan sel tumor. Respon autoimun dan hipersensitivitas dapat muncul akibat kehilangan toleransi atau sensitivitas yang terinduksi. Hipersensitivitas obat dapat menyebabkan morbiditas dan penurunan mortalitas. Semua obat baru diuji potensi imunotoksitasnya pada hewan rodensia tetapi interpretasi dari hasil mungkin cukup sulit. Pemicu imunotoksitas bervariasi dan dapat disebabkan oleh hubungan aktivitas/struktur, lama pemaparan, atau jumlah obat yang diberikan. Gejala yang berhubungan dengan imunotoksitas bervariasi tergantung pada bagian sistem imun yang teraktivasi/tersupresi. Model pada hewan tidak selalu mengindikasikan bahwa suatu substansi bersifat imunotoksik pada manusia. Gejala yang timbul dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan genetic.⁽⁸⁾

2.13.5 Gejala Klinis

Gejala klinis yang dapat timbul selama observasi dapat dilihat melalui tabel 6.

Tabel 6 . Gejala Klinis dari Toksisitas⁽¹⁰⁾

Observasi Klinik	Gejala Muncul
1 Pernafasan : sumbatan Pada nostril, perubahan frekuensi dan kedalaman nafas, perubahan warna permukaan tubuh	A. Dispnea : kesulitan bernafas, gasping, frekuensi pernafasan rendah B. Apnea : penghentian sementara dari bernafas diikuti respirasi paksa C. Sianosis : Kebiruan pada daerah mulut, telapak kaki pantat D. Takipnea : respirasi yang cepat dan dangkal E. Nostril discharges : merah atau tak berwarna

Observasi Klinik	Gejala Muncul
2 Perubahan pada frekuensi dan sifat	A. Motorik spontan dan pergerakan B. Somnolens C. Kehilangan reflek perbaikan D. Anestesia E. Katalepsi : hewan cenderung mempertahankan posisi tubuhnya F. Prostrasi : immobile dan diam dalam posisi telungkup I. Tremor : gemeteran alat gerak atau tubuh
3 Kardiovaskular	Vasodilatasi : kemerahan pada kulit, ekor, lidah, telinga, telapak kaki, konjungtiva
4 Saliva	Pengeluaran berlebihan : bulu basah pada mulut
5 Tonus otot	A. Hipotonia : penurunan tonus otot B. Hipertonia : peningkatan tonus otot
6 Gastrointestinal	
Feses	A. Padat, keras, sedikit B. Kehilangan air, feses basah
Emesis	Muntah
Diuresis	Urin merah (Hematuria)
7 Kulit	A. Edema : pembengkakan jaringan berisi cairan B. Eritema : kemerahan kulit

2.13.6 Perubahan Histopatologi⁽¹⁰⁾

Pada percobaan laboratorium tikus perubahan yang umum terjadi pada organ – organ berikut yaitu :

1. Kelenjar adrenal
 - a. Korteks : kondensasi sel pada zona glomerulosa, karioklasis pada sel epitelial pada zona fasikulata dan zona retikularis
 - b. Medula : kondensasi nucleus dan piknosis, peningkatan vakuolisasi sitoplasma
2. Otak : peningkatan ruang jernih di sekitar oligodendroglia pada medula, formasi dari ruang jernih di sekitar astrosit korteks, meningkatkan neuron hiperkromatik yang menyusut, piknosis dari oligodendroglia pada korpus

calosum, piknosis sel pada lapisan granular serebelum, atau peningkatan sitoplasma bervakuol pada neuron korteks.

3. Jantung : kondensasi dan penggelapan warna nucleus endotel atau formasi ruang jernih inter-serat pada otot.
4. Usus Besar (Cecum dan Kolon) :hilangnya sel epitelial superficial, saprofitik basilis atau hilangnya lamina propria, formasi ruang jernih antar serat dan piknosis dari nucleus miofiber, atau kerusakan atau hilangnya epithelium kriptas.
5. Usus Halus (Duodenum,Ileum, Jejunum) : hilangnya epithelium vilar, formasi ruang jernih antar serat dan piknosis dari nucleus miofiber, hilangnya sel pada vili lamina propria, pemisahan lateral pada epithelium kriptas, hilangnya epithelium dari kriptas, hilangnya sel dari lamina propria, atau hilangnya epithelium mukosa.
6. Ginjal : piknosis dan sitoplasma bervakuol dari epithelium tubular distal, piknosis nucleus sel tubulus Henle *ascending* dan *descending* pada kortikomedular *junction*, kontraksi dari nucleus dan peningkatan granularitas sitoplasma epithelium tubulus proksimal, pemisahan dan kerusakan dari uretelium pelvis, piknosis nucleus sel glomerulus, pembentukan ruang jernih disekitar loop Henle dalam di medula, piknosis nucleus di epithelium korteks *collecting tubule*.
7. Hati : akumulasi darah, terdapat sakrofilik basili
8. Paru : akumulasi darah parenkim, pemisahan epithelium bronkiolus dari lamina propria, adanya cairan protein pada ruang alveolar, piknosis sel alveolar, piknosis dan kerusakan epithelium bronkiolus.

2.14 Data dan Pelaporan

2.14.1 Uji Toksisitas Oral Akut

LD₅₀ ditentukan dengan metode Thompsom-Weil.LD₅₀ dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Log (LD50)} = \log \text{Da} + d(f+1)$$

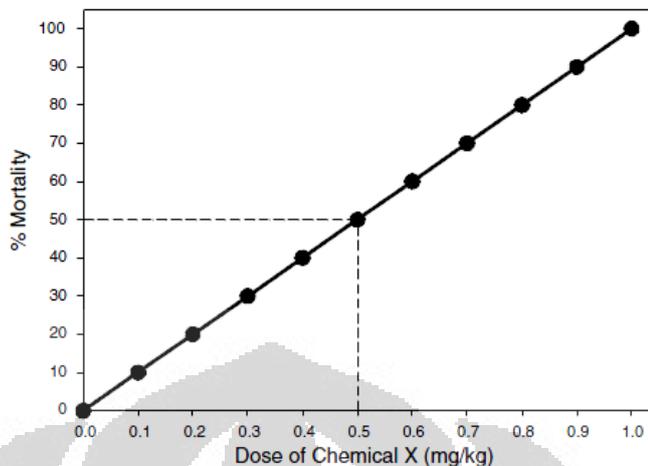
Da adalah dosis terendah, f adalah faktor yang diperoleh dari tabel Thompson dan Weil, dan d adalah logaritma kelipatan dosis.

Tingkat dosis diharuskan cukup dalam jumlahnya, minimal 3, dengan beda yang disesuaikan (dosis tidak memberi efek (*no-effect dose*) - dosis toksik) sehingga dapat menghasilkan grup tes dengan *range* efek toksik dan angka kematian yang bermakna. Data harus cukup sehingga dapat menghasilkan sebuah kurva *dose-response* dan jika memungkinkan dapat juga memastikan LD₅₀. Akan tetapi jika sebuah tes pada satu level dosis untuk minimal 5g/kg berat badan tidak menghasilkan *no compound-related mortality* maka studi menggunakan 3 level dosis mungkin tidak diperlukan, dosis tersebut disebut sebagai dosis limit.^(9, 10) Nilai LD₅₀ merupakan sebuah ukuran relatif yang kasar, berguna hanya sebagai nilai referensi untuk tujuan pengklasifikasian dan penandaan potensi letal dari substansi tes jika diberikan melalui jalur pencernaan. Sebuah evaluasi mencakup hubungan antara paparan substansi dengan hewan dan insiden dengan keparahan dari abnormalitas termasuk abnormalitas perilaku dan klinis, lesi kasar, perubahan berat badan, efek pada mortalitas, dan efek toksik lainnya.^(6, 9) Eksplorasi dari hasil studi toksisitas akut dan nilai oral LD₅₀ pada hewan ke manusia valid hanya untuk degree yang terbatas.^(6, 9, 10)

Berikut ini pada tabel 7 terdapat klasifikasi dari LD₅₀ berdasarkan toksisitas relatif.

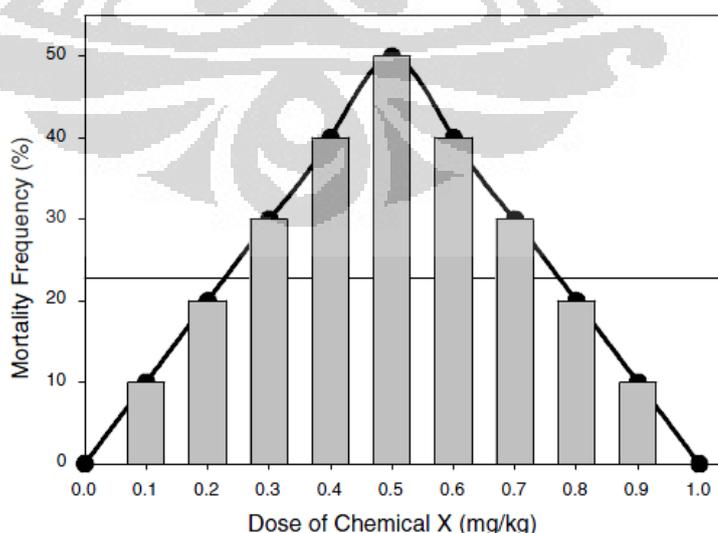
Tabel 7. Klasifikasi Zat berdasarkan Toksisitas Relatif⁽¹⁴⁾

Kategori	LD ₅₀
Supertoxic	< 5 mg/kg
Extremely toxic	5-50 mg/kg
Highly toxic	50-500 mg/kg
Moderately toxic	0.5-5 g/kg
Slightly toxic	5-15 g/kg
Practically non-toxic	> 15 g/kg



Gambar 9 Kurva Hubungan Dosis-Respon menunjukkan derivasi percobaan estimasi dari LD_{50} ⁽⁶⁾

Sebagai alternative, pengetesan agen kimia untuk efek biologis terkadang membutuhkan data bahwa respon terhadap agen kimia terdistribusi secara normal, contoh : sebagian besar responden berkumpul pada jangkauan dosis tengah. Gambar 8 menunjukkan suatu distribusi frekuensi normal yang dicapai dengan meningkatnya dosis dari agen kimia disbanding dengan persentasi kumulatif mortalitas. Batang pada Gambar 9 mewakili persentasi hewan yang mati untuk setiap dosis dikurangi dengan persentasi hewan yang mati pada dosis yang lebih rendah. Ditunjukkan pula bahwa dalam distribusi normal maka persentasi terkecil hewan yang mati terdapat tingkat dosis terendah dan tertinggi, persentase tersebut muncul akibat adanya variasi biologik (perbandingan hewan hipersensivitas dan resisten).⁽⁶⁾



Gambar 10. Distribusi Frekuensi Normal dari Perbandingan Frekuensi Mortalitas(%) dengan Dosis⁽⁶⁾

2.14.2 Uji Toksisitas Oral Subkronik

Evaluasi hubungan antara dosis dari substansi tes dengan keberadaan insiden dan keparah dari abnormalitas (abnormalitas perilaku dan klinis), lesi kasar, organ target yang teridentifikasi, perubahan berat badan hewan, efek terhadap mortalitas, dan efek lainnya yang berhubungan dengan toksisitas. Tes subkronik yang dilakukan sesuai prosedur dapat menentukan suatu *no-effect level*. Jika pada studi tidak ditemukan efek toksik maka perlu dilakukan investigasi lanjut pada absorpsi dan bioavailabilitas dari substansi tes.^(6, 7)

Studi toksisitas subkronik oral akan memberikan informasi mengenai efek dari paparan oral yang berulang dari sebuah substansi. Eksplorasi dari hasil studi terhadap manusia berlaku dalam derajat yang terbatas akan tetapi dapat memberikan informasi yang berguna mengenai *no-effect level* (NEL) atau *no observed effect level* (NOEL) dan paparan terhadap manusia yang diperbolehkan.^(6, 7, 10, 14)

NOEL yang didapat melalui data hewan dapat diaplikasikan pada manusia melalui *safety factor*. Pertama faktor ini menoleransi perbedaan sensitivitas antara spesies hewan dan manusia karena berdasarkan aturan yang ada manusia lebih *susceptible* dibanding hewan terutama jika dosis diekspresikan dalam mg/kg berat badan. Selain itu dosis yang digunakan dalam uji toksisitas umumnya lebih besar dibanding dosis yang akan diaplikasikan pada manusia hal ini disebabkan adanya ekspektasi bahwa dosis tinggi dapat memfasilitasi identifikasi organ target dan mengurangi kebutuhan penggunaan jumlah hewan yang banyak. Kedua faktor ini menoleransi variasi sensitivitas antar populasi manusia, dan jumlah hewan coba yang digunakan jauh lebih kecil dibanding populasi manusia yang kemungkinan terekspos. *Safety factor* yang dianjurkan oleh WHO adalah 100 dengan *range* 10 - 2000, akan tetapi dapat pula dimodifikasi sesuai dengan kondisi seperti contohnya jika jumlah atau kualitas dari informasi toksikologi terbatas maka *safety factor* yang digunakan dapat lebih besar.^(14, 23)

Oleh EPA dikenalkan *no observed adverse effect level* (NOAEL) yang dihitung dengan *safety factor* x NOEL. *Safety factor* besarnya ditentukan berdasarkan 10 untuk faktor tak tentu, 10 untuk ekstrapolasi dari hewan ke manusia, 10 untuk NOAEL yang berasal dari data uji toksisitas subkronik, dan faktor

tambahan 1-10 di mana *lowest observed adverse effect level* (LOAEL) digunakan sebagai pengganti NOAEL.⁽²³⁾

2.15 Produk Pangan Herbal BBPT

Pada tabel 8 dapat dilihat substansi yang terkandung dalam bahan herbal BPPT.

Tabel 8. Kadungan Bahan Herbal BPPT

1.	Protein	7.1%
2.	Karbohidrat	66.6%
3.	Lemak	15.8%
4.	Abu	4.5%
5.	Serat	3.12%
6.	Polifenol	8.32 mg/gram
7.	Energi	437 kal/100 gr

2.15.1 Polifenol

Polifenol merupakan antioksidan terbanyak yang ada dalam makanan seperti buah-buahan, sayur-sayuran, sereal, minyak zaitun, polong – polongan, coklat, teh, kopi, dan wine.^(24, 25) Sebagai antioksidan polifenol melindungi sel terhadap kerusakan oksidatif. Sehingga polifenol mampu mengurangi risiko penyakit degeneratif yang berhubungan dengan stress oksidatif seperti penyakit kardiovaskular, diabetes melitus tipe 2, dan kanker.⁽²⁴⁾

Pada manusia konsumsi total ~ 1 gr/hari pada 25 tahun yang lalu akan tetapi hingga kini masih belum ada kepastian berapa jumlah dari polifenol yang dianjurkan untuk dikonsumsi. Konsentrasi maksimum dalam plasma jarang melebihi μM setelah konsumsi 10 – 100 mg polifenol. Akan tetapi konsentrasi total dari fenol dapat lebih tinggi karena keberadaan dari metabolit yang dibentuk oleh jaringan atau mikroflora dalam usus.⁽²⁶⁾ Kadar polifenol dalam plasma dan jaringan lebih rendah dibandingkan dengan antioksidan lain seperti asam askorbat dan α -tocopherol.⁽²⁴⁾ Selain kadar dalam tubuh yang rendah, polifenol memiliki toksisitas yang rendah dan sedikit efek samping buruk sehingga memiliki potensi baik sebagai agen terapeutik.⁽²⁷⁾

Terdapat berbagai kelas polifenol di alam. Struktur dari kelas polifenol tersebut akan mempengaruhi : bioavailabilitas, aktivitas antioksidan, interaksi

spesifik dengan sel reseptor dan enzim. Kelas utama dari polifenol ditentukan oleh rantai karbonnya menjadi asam fenolat, flavonoid, stilbenes, dan lignans.⁽²⁶⁾

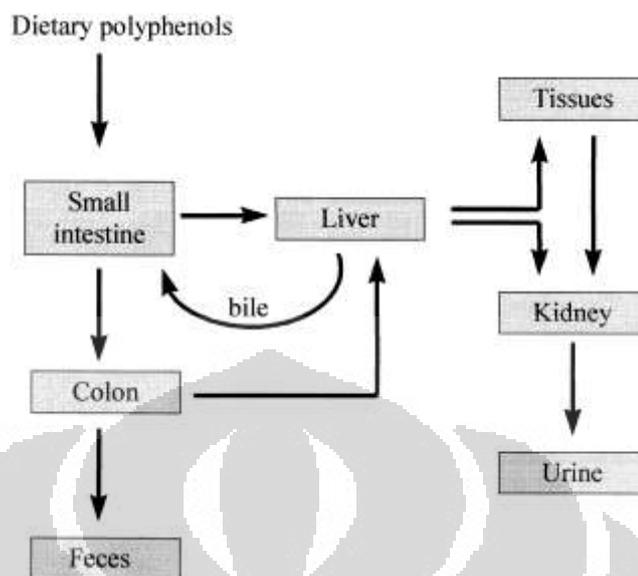
Metabolisme Polifenol

Dosis polifenol menentukan tempat primer untuk metabolisme. Dosis besar dimetabolisme terutama di hati sedangkan dosis kecil dimetabolisme oleh mukosa usus dan hati hanya berperan untuk memodifikasi konjugasi polifenol. Sebagai contoh tikus yang diberikan polifenol secara oral sebesar 10 mg akan diglukoronidasi saat absorpsi di usus dan disulfasilasi serta metilasi di hati.⁽²⁸⁾

Sekitar 75-99% dari polifenol tidak ditemukan dalam urin. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan zat tersebut tidak diabsorpsi melalui barrier di usus, diabsorpsi dan dieksresi dalam empedu, atau dimetabolisme oleh mikroflora usus atau jaringan tubuh.⁽²⁶⁾

Setelah dihidrolisis di usus polifenol dikonjugasi di hati secara metilasi, sulfasi, glukoronidasi, atau kombinasi dari ketiganya. Tahap – tahap tersebut dikontrol oleh spesifisitas dan distribusi enzim yang mengkatalase reaksi.⁽²⁸⁾

Polifenol yang tidak diabsorpsi oleh lambung atau usus halus akan diteruskan ke usus besar (Gambar 10). Polifenol yang diabsorpsi dimetabolisme di dalam hati dan dieksresi dalam empedu atau langsung dari enterosit kembali ke usus halus yang kemudian menuju usus besar tetapi dalam bentuk kimia berbeda. Di usus halus terdapat sekitar 10^{12} mikroorganisme / cm^3 yang memiliki potensi katalitik dan hidrolitik untuk memetabolisme polifenol tersebut.^(26, 28) Konsentrasi polifenol dalam usus besar lebih tinggi dari pada dalam plasma sehingga hal tersebut berkontribusi terhadap efek antikarsinogenik.^(26, 28)



Gambar 11. Rute Polifenol dalam Tubuh⁽²⁶⁾

Kadar polifenol dalam plasma dan jaringan lebih rendah dibandingkan dengan antioksidan lain seperti asam askorbat dan α -tocopherol.⁽²⁴⁾ Polifenol memiliki toksisitas yang rendah dan sedikit efek samping buruk sehingga memiliki potensi baik sebagai agen terapeutik.^(26, 27)

Fungsi Polifenol

Polifenol dan metabolitnya berfungsi sebagai antioksidan, antitrombotik, anti-inflamatori, dan antikarsinogenik.⁽²⁹⁾ Polifenol berfungsi sebagai antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif yang merusak biomolekul besar seperti protein, DNA, dan lemak yang dapat memperburuk perjalanan penyakit.^(24, 26) Sehingga polifenol mampu mengurangi risiko penyakit degeneratif yang berhubungan dengan stress oksidatif seperti penyakit kardiovaskular, diabetes melitus tipe 2, dan kanker.⁽²⁴⁾

Dosis polifenol (antioksidan) memiliki peran penting dalam pengaruhnya terhadap tubuh karena jumlah antioksidan yang berlebihan dapat mengganggu fungsi imun bahkan berpotensi menjadi prooksidan. Selain dosis hal yang mempengaruhi efeknya terhadap tubuh adalah ukuran, polaritas, dan solubilitas kandungan polifenol dalam produk pangan.⁽²⁶⁾

Pada sifatnya sebagai antitrombotik dapatkan berdasarkan penelitian in vitro

dan ex vivo bahwa polifenol dapat meningkatkan produksi NO, aktivitas inhibisi platelets, dan vasodilator.⁽²⁹⁾ Suatu penelitian yang dilakukan oleh Hogson et al mendapatkan bahwa dengan mengonsumsi polifenol dalam teh terjadi perbaikan bioaktivitas nitrit oksida (NO) pada otot polos pembuluh darah. Hal – hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya dilatasi pembuluh darah yang meningkatkan aliran darah.⁽³⁰⁾

Selain vitamin, selenium, dan zink terdapat zat non-nutrisi yang dikenal sebagai fitokimia yang berpengaruh terhadap respon imun.⁽²⁶⁾ Polifenol memiliki potensi sebagai imunomodulator dengan menghambat produksi dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh granulosit dan limfosit aktif. Polifenol juga mampu menghambat proliferasi sel mononukleosit perifer, produksi Ig, dan interleukin-2 (IL-2) yang terstimulasi oleh mitogen serta menghambat penempelan sel imun dengan sel endotel.^(29, 31, 32) Polifenol yang didapat dari sayuran dan tanaman yaitu flavonoid mampu mencegah proliferasi limfosit dan produksi IL-2. Potensi dari efek – efek inhibitor dari polifenol dapat digunakan sebagai materi anti-inflamasi.^(31, 32)

D'Archivio et al dari penelitiannya menemukan bahwa kandungan polifenol dalam makanan memiliki kemampuan sebagai agen kemopreventif dan kemoterapeutik yang sangat efektif. Polifenol mampu mempengaruhi keseluruhan proses karsinogenesis dengan mensupresi ekspresi yang berlebihan dari enzim pro-oksidan. Supresi tersebut terjadi akibat kemampuan untuk menghambat gen target yang berperan dalam proliferasi sel serta kemampuan menginduksi apoptosis. Polifenol juga menghambat *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sehingga mencegah terjadinya angiogenesis. Efek ini dipengaruhi oleh konsentrasi dari polifenol, sistem sel, umur sel, dan tipe atau fase dari proses degeneratif. Nampak dari penelitian yang ada bahwa efek – efek ini lebih bermakna pada sel kanker dibanding sel normal.⁽²⁷⁾

Toksisitas Polifenol⁽³³⁾

Berdasarkan beberapa studi dan diskusi pada *1st International Conference on Polyphenols and Health* disimpulkan bahwa polifenol memiliki beberapa efek buruk terhadap kesehatan. Dalam tabel 9 dipaparkan beberapa efek tersebut.

Tabel 9. Efek Berbahaya dari Polifenol⁽³³⁾

Carcinogenicity/genotoxicity

Thyroid toxicity

Estrogenic activity of isoflavones

Antinutritional effects - inhibits nonheme iron absorption

Interactions with pharmaceuticals

Beberapa polifenol memiliki efek karsinogenik atau genotoksik pada dosis/konsentrasi tinggi contohnya :

- a. Asam kafeik (2% dalam diet) menginduksi tumor lambung dan ginjal
- b. Kategoestrogen dapat memodulasi induksi tumor ginjal oleh estradiol
- c. Quercetin meningkatkan siklus redoks dari kategoestrogen dan tumorigenesis terinduksi estradiol
- d. Katekin dalam teh hijau (1% atau 0.1% dalam diet) meningkatkan perkembangan tumor kolon pada tikus

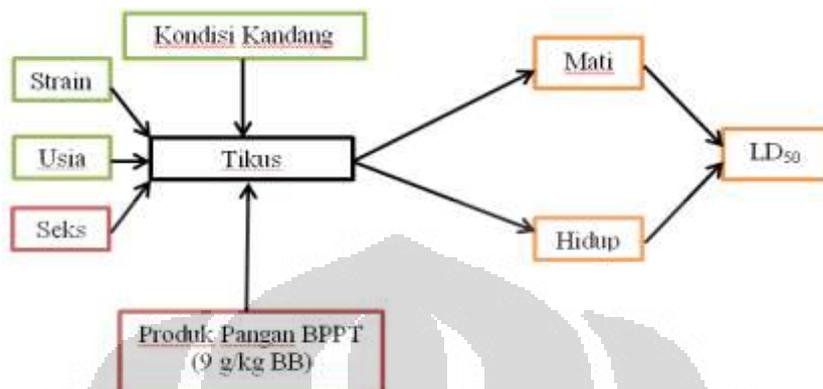
Beberapa flavonoid dapat menghambat tiroid peroksidase dan mengganggu biosintesis hormone tiroid (iodinasi radikal bebas). Dalam suatu percobaan pada tikus mengalami defisiensi tiroid sehingga didapatkan berat organ tiroid meningkat dan jumlah hormon tiroid dalam plasma menurun.

Isoflavon merupakan anggota dari polifenol yang memiliki aktivitas mirip estrogen. Isoflavon memiliki efek antiandrogenik sehingga jika dikonsumsi dalam jumlah besar mampu mempengaruhi fertilitas pria dan wanita, perkembangan seksual dalam kandungan dan setelah lahir, dan menginduksi atrofi testis.

Polifenol juga memiliki efek antinutrisional karena dapat menghambat absorpsi besi nonheme sehingga dapat menyebabkan risiko defisiensi besi pada populasi dengan status besi rendah. Perlu diperhatikan bahwa sumber – sumber polifenol utama seperti kopi, teh, dan wine dikonsumsi pada saat makan tidak mengandung vitamin C yang mampu meningkatkan absorpsi besi nonheme. Polifenol juga dapat mempengaruhi bioavailabilitas dan farmakokinetik beberapa obat seperti benzodiazepine dan terfenadine.

2.16 Kerangka Konsep

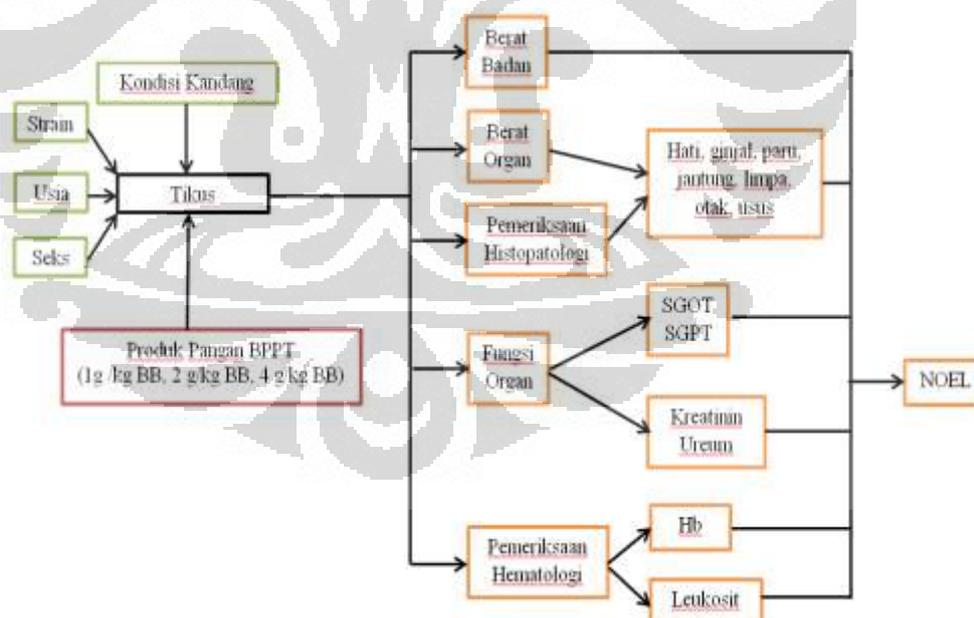
2.16.1 Uji Toksisitas Oral Akut



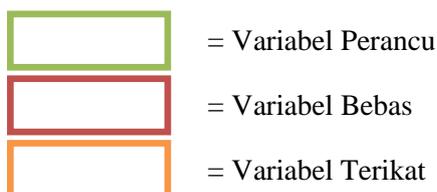
Keterangan :



2.16.2 Uji Toksisitas Oral Subkronik



Keterangan :



BAB III

METODE

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental pada hewan coba tikus (*rat*), yaitu dengan *true experimental design*. Pada desain penelitian ini, untuk mengetahui efek toksisitas akut, dilakukan satu kali perlakuan dalam 24 jam dan observasi dalam jangka waktu 14 hari. Kemudian pada akhir periode penelitian dihitung jumlah tikus yang mati. Untuk mengetahui efek toksisitas subkronik, dilakukan perlakuan, observasi, dan pengukuran berat badan secara berkala dalam jangka waktu 90 hari. Kemudian pada akhir periode perlakuan maka semua tikus yang mati selama percobaan dan yang bertahan harus dikorbankan untuk melihat keadaan organ secara makroskopik dan mikroskopik. Kelompok perlakuan secara langsung dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan demikian berdasarkan data yang didapat pada uji toksisitas akut akan didapat LD₅₀ dan berdasarkan data yang didapat pada uji toksisitas subkronik akan didapat dosis *no observed effect level* (NOEL).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Oktober tahun 2009 hingga bulan Maret tahun 2010 di *Animal House*, Laboratorium Departemen Farmakologi, Ruang Praktikum Patologi Anatomi dan Ruang Praktikum Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, serta Lembaga Eijkman.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus strain *Sprague dawley*, jantan dan betina, yang berusia \pm 8 minggu. Strain tikus ini selain memiliki usia yang relatif sama, juga memiliki berat badan yang relatif sama pula, sekitar 120-150 gram. Pengambilan sampel dilakukan secara random alokasi untuk setiap perlakuan. Besar sampel hewan coba mencit diperoleh sesuai dengan protocol OECD yaitu:

- a. Uji toksisitas akut menggunakan 5 ekor tikus jantan.⁽⁹⁾

- b. Uji toksisitas subkronik menggunakan 10 ekor tikus jantan dan 10 ekor tikus betina untuk setiap perlakuan.⁽⁷⁾ Karena terdapat 4 kelompok perlakuan untuk setiap jenis kelamin, maka besar sampel yang digunakan untuk 8 kelompok perlakuan adalah 80 ekor.

Sebelum dilaksanakan percobaan terdapat periode aklimatisasi tikus selama \pm 1 minggu. Pada periode tersebut tikus dibiasakan hidup dalam kandang di *Animal House* FKUI dan diberi pangan biasa dan minum secara ad libitum.^(7, 9, 10)

3.4 Pangan dan Dosis

Pangan biasa yang digunakan pada penelitian ini adalah pangan ayam berupa pellet. Pangan uji pada percobaan ini adalah produk pangan BPPT yang mengandung :

1. Protein	7.1%
2. Karbohidrat	66.6%
3. Lemak	15.8%
4. Abu	4.5%
5. Serat	3.12%
6. Polifenol*	8.32 mg/gram
7. Energi	437 kal/100 gr

Keterangan : bahan aktif

Untuk uji toksisitas oral akut dosis yang digunakan adalah 9 g/kg BB yang merupakan dosis maksimal yang dapat diberikan pada tikus. Penentuan dosis tersebut merupakan pengukuran berdasarkan pengalaman di *Animal House* FKUI. Dosis tersebut diambil sesuai dengan aturan jika sebuah tes pada satu level dosis untuk minimal 5g/kg berat badan tidak menghasilkan *no compound-related mortality* maka studi menggunakan 3 level dosis mungkin tidak diperlukan, dosis tersebut disebut sebagai dosis limit.^(9,10) Hal ini dikarenakan peneliti telah mengamsumsi bahwa produk pangan ini tidak toksik.

Uji toksisitas oral subkronik menggunakan 3 tingkat dosis yaitu dosis rendah, sedang, dan tinggi. Dosis tinggi didapat \pm $\frac{1}{2}$ LD₅₀, dosis sedang $\frac{1}{2}$ dari dosis tinggi, dan dosis rendah $\frac{1}{2}$ dari dosis sedang sehingga didapatkan 1g/kg BB untuk dosis rendah, 2 g/kg BB untuk dosis sedang, dan 4g/kg BB untuk dosis tinggi.

Substansi tes dilarutkan atau dipadatkan dalam sebuah wadah yang sesuai. Direkomendasikan untuk menggunakan larutan berupa air kemudian bila tidak ada dapat diganti dengan Metilselulosa atau karboksimetilselulosa (CMC), 0.5-5% suspensi cair. Pada penelitian ini digunakan CMC sebagai pelarut. Volume maksimum dari cairan yang dapat diberikan dalam satu kali tergantung dari ukuran hewan percobaan. Pada hewan rodensia, volume tidak boleh melebihi 1ml/100 g berat tubuh, kecuali pada kasus yang menggunakan larutan air yaitu dapat memberikan 2 ml/100 g. Variasi volume pada percobaan harus diminimalisir dengan cara menyesuaikan konsentrasi untuk memastikan volume konstan untuk seluruh tingkat dosis.^(7, 9, 10)

3.5 Pengelolaan Kandang Hewan

Suhu ruangan tempat merawat hewan percobaan 25-27°C. Hewan coba dibagi dalam grup berdasarkan seks, dengan jumlah hewan dua ekor dalam setiap kandang agar tidak mengganggu observasi. Untuk membedakan hewan satu sama lain dalam kandang yang sama setiap hewan diberikan tanda warna kuning dengan cat pada bagian kepala yang menandakan hewan tersebut merupakan hewan nomor ganjil, contoh dalam kandang 1 maka yang diberi warna adalah nomor 1 dan dalam kandang 2 yang diberi warna adalah nomor 3. Untuk mengetahui kadang hewan tiap dosis maka dibuat susunan tetap dalam rak kandang sebagai berikut dari atas ke bawah: rak kandang dosis tinggi, dosis sedang, dosis rendah, dan kontrol. Cahaya yang digunakan adalah cahaya *artificial*.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Uji Toksisitas Oral Akut

Tikus *strain Sprague dawley* yang berusia \pm 8 minggu, berat \pm 150 gram, dan homogen akan dibuat menderita lapar dengan berpuasa selama 12 jam (satu malam). Tikus kemudian akan diberikan pangan BPPT per oral dengan dosis yang ditentukan dengan menggunakan sonde. Pemberian produk pangan BPPT dengan dosis 4.5g/kg BB dilakukan sebanyak 2 kali dengan interval 4 jam dalam jangka waktu 1

harisehingga dosis totalnya adalah 9g/kg BB. Dilakukan observasi selama 14 hari untuk mengetahui apakah ada tikus yang mati.

3.6.2 Uji Toksisitas OralSubkronik

Tikus *strain Sprague dawley* yang berusia \pm 8 minggu, berat 120-150 gram, baik jantan maupun betina. Tikus perlakuan diberikan produk pangan BPPT per oral dengan dosis yang ditentukan (1g/kg BB, 2g/kg BB, 4 g/kg BB) dan tikus kontrol diberi CMC 3ml/kg BB dengan menggunakan sonde setiap hari satu kali pemberian pada pukul 12.00 siang. Selang waktu 2 jam kemudian tikus diberi pangan biasa dan minum ad libitum hingga waktu pemberian produk pangan BPPT esok harinya. Dalam jangka waktu 90 hari, dilakukan observasi berupa jumlah tikus yang mati, perilaku, warna kulit, kondisi bulu, dan berat badan setiap tikus pada setiap level dosis. Kemudian pada akhir periode uji semua tikus baik yang mati maupun hidup dikorbankan untuk diautopsi dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis, mikroskopis, hematologi, dan klinis kimiawi (*clinical chemistry*). Hasilnya dibandingkan antara kelompok tikus yang diberi produk pangan BPPT dengan kelompok kontrol untuk setiap level dosis.

3.7 Pemeriksaan pada Uji Toksisitas Subkronik

3.7.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan melihat lesi dan menimbang berat organ-organ vital, seperti paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, otak, dan usus. Untuk itu tikus harus dikorbankan dengan dengan cara eunatasia dengan metode anestesi (dengan eter) dan dekapitasi menggunakan gunting.

3.7.2 Pemeriksaan Hematologi

Untuk pemeriksaan hematologi, dilakukan pengambilan darah sebanyak 4-5 ml dengan teknik *tail venipuncture* dan dimasukkan ke dalam tabung berisi antikoagulan K₂EDTA. Pemeriksaan hematologi yang dilakukan berupa:

Hemoglobin (Hb)

Menggunakan metode Sahli. Cara pengukuran:

- a. Masukkan 5 tetes HCl 0,1 n ke dalam tabung pengencer hemometer.
- b. Isaplah darah (kapiler, EDTA atau oxalat) dengan pipet hemoglobin sampai garis tanda 20 ul.
- c. Hapuslah darah yang melekat pada sebelah luar ujung pipet.
- d. Catatlah waktunya dan segeralah alirkan darah dari pipet ke dalam dasar tabung pengencer yang berisi HCl itu. Hati – hati jangan sampai terjadi gelembung udara.
- e. Angkatlah pipet itu sedikit, lalu isap asam HCl yang jernih itu ke dalam pipet 2 atau 3 kali untuk membersihkan darah yang masih tinggal dalam pipet.
- f. Campurlah isi tabung itu supaya darah dan asam bersenyawa; warna campuran menjadi cokelat tua.
- g. Tambahkan air setetes demi setetes, tiap kali diaduk dengan batang pengaduk yang tersedia. Persamaan warna campuran dan batang standard harus dicapai dalam waktu 3-5 menit setelah saat darah dan HCl dicampur. Pada usaha mempersamakan warna hendaknya tabung diputar sedemikian sehingga garis bagi tidak terlihat.
- h. Bacalah kadar hemoglobin dengan gram/100 ml darah.

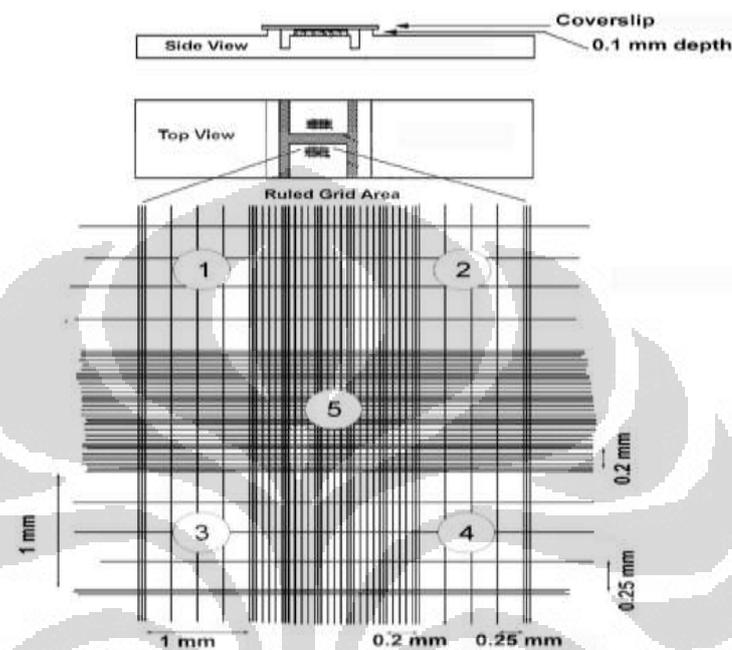
Menghitung Jumlah Leukosit Total

Menggunakan metode manual

- a. Alat :
 - Pipet 20 ul
 - Pipet volumetrik 0,5 ml, 2 ml, dan 4 ml
 - Tabung ukuran 75 x 12 mm
 - Kamar hitung *improved Neubauer* yang dilengkapi dengan kaca penutup yang khusus
 - Pipet Pasteur
 - Mikroskop cahaya.

- b. Reagen: larutan Turk yaitu larutan Asam Asetat 2% ditambah Gentian Violet 1% sebanyak 1 ml.
- c. Bahan pemeriksaan : darah EDTA dengan kadar 2 mg Na₂EDTA/K₂EDTA untuk 2 ml darah.
- d. Cara kerja :
- Membuat pengenceran 1 : 20, dengan langkah sebagai berikut:
 - Larutan pengencer sebanyak 0.38 ml dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetric 0,5 ml ke dalam tabung ukuran 75 x 10 mm.
 - Tambahkan 20 ul darah EDTA ke dalam tabung tersebut sehingga darah diencerkan 1 : 20. Pada waktu mengambil 20 ul darah EDTA jangan lupa mengocok botol darah dengan baik agar darah di dalam botol menjadi homogen. Sebelum memasukan 20 ul darah ke dalam larutan pengencer, hapuslah kelebihan darah yang ada di luar pipet.
 - Darah yang tersisa di dalam pipet dibilas dengan mengisap dan mengeluarkan larutan pengencer sebanyak 3 kali.
 - Tabung tersebut ditutup dengan parafilm dan dicampur hingga homogen selama 1 menit.
 - Mengisi kamar hitung
 - Kaca penutup kamar hitung diletakkan pada tempatnya. Kamar hitung harus dalam keadaan bersih dan kering.
 - Isilah kamar hitung dengan darah yang sudah diencerkan tadi dengan menggunakan pipet Pasteur.
 - Untuk hitung leukosit kamar hitung setelah diisi dibiarkan selama 3 menit.
 - Menghitung jumlah sel
 - Letakkan kamar hitung dengan hati – hati di bawah mikroskop dalam keadaan rata air. Perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan lensa obyektif 10 kali dan lensa okuler 10 kali (10x10).
 - Perlu dihitung minimal 100 sel. Hal ini dapat dicapai dengan menghitung semua leukosit yang ada pada ke 4 bidang besar yang masing – masing luasnya 1 mm² yaitu bidang 1, 2, 3, 4 (Gambar 10) dengan volume dihitung sebesar 4 x 1 x 0,1 ul = 0,4 ul. Atau bila jumlah leukosit dalam 2 buah

bidang besar telah melebihi jumlah 100 sel maka dapat dilakukan perhitungan jumlah leukosit dengan catatan bahwa volume yang dihitung sebesar $2 \times 1 \times 0,1 = 0,2 \text{ ul}$.



Gambar 12. Kamar Hitung *improved* Neubaur.²¹

○ Perhitungan

- Jumlah leukosit yang dihitung = jumlah leukosit/volume yang dihitung (ul) x faktor pengenceran
- Bila jumlah leukosit dalam ke 4 bidang besar adalah N, maka :
- Jumlah leukosit = $N/0,4 \times 20/\text{ul} = 50N/\text{ul}$ darah tau $0.05 N \times 10^9/L$

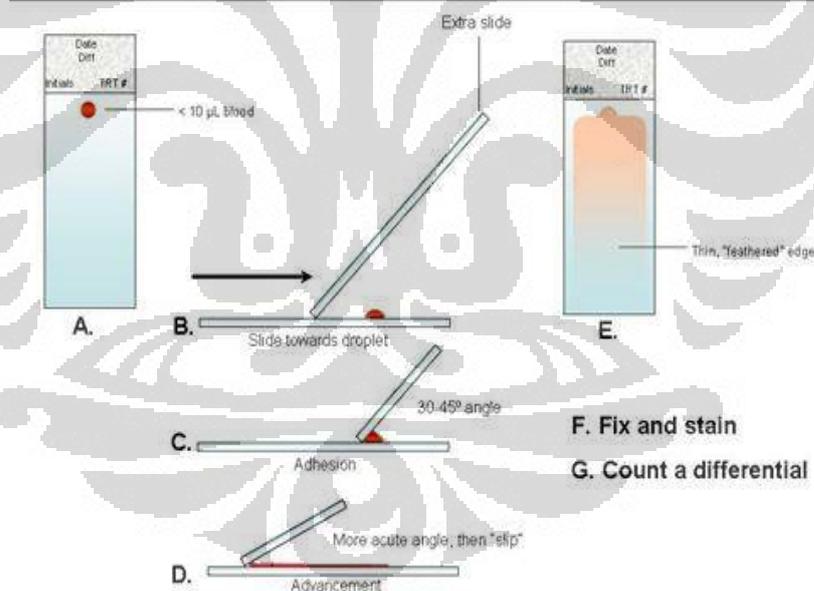
Menghitung *Differential Leucocyte*

Membuat dan mewarnai sediaan hapus darah tepi

- a. Bahan : darah segar yang berasal dari vena yang dihapuskan pada kaca objek.
- b. Alat :
 - Kaca objek ukuran 25 x 75 mm
 - Batang gelas
 - Rak kaca objek
 - Pipet Pasteur
- c. Reagen : zat warna Wright 1 g dan metabol absolute 600 ml

d. Cara membuat sediaan hapus:

1. Pilihlah kaca objek yang bertepi rata sebagai “kaca penghapus”.
2. Letakkan satu tetes kecil darah, pada $\pm 2-3$ mm dari ujung kaca objek. Letakkan kaca penghapus dengan sudut $30-45^\circ$ terhadap kaca objek di depan tetes darah.
3. Tarik kaca penghapus ke belakang sehingga menyentuh tetes darah, tunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut.
4. Dengan gerak yang mentab doronglah kaca penghapus sehingga terbentuk hapusan darah sepanjang 3-4 cm pada kaca objek (Gambar12). Darah harus habis sebelum kaca penghapus mencapai ujung lain kaca objek.
5. Biarkan hapusan darah mengering di udara dan segera difiksasi dengan methanol absolute selama 2-3 menit. Tuliskan identitas tikus pada bagian tebal hapusan dengan pensil.



Gambar 13. Cara Pembuatan Sediaan Hapus Darah Tepi.²²

Cara mewarnai sediaan hapus menggunakan pewarnaan Wright:

1. Letakkan sediaan hapus yang telah difiksasi pada dua batang gelas di atas bak tempat pewarnaan.
2. Genangi sediaan hapus dengan zat warna Wright. Biarkan selama 3-5 menit.

3. Tambahkan larutan dapar dalam jumlah yang sama dengan zat warna. Tiup agar larutan dapar tercampur rata dengan zat warna. Biarkan selama 5-10 menit.
4. Bilas dengan air ledeng, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat. Kemudian biarkan sediaan mengering.

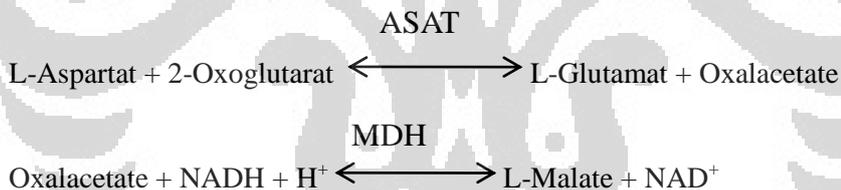
Cara memeriksa: letakkan satu tetes minyak imersi pada bagian sediaan hapus yang baik untuk diperiksa dan tutup dengan kaca tutup. Lihat dengan pembesaran lemah (10x10) untuk mendapatkan gambaran menyeluruh. Selanjutnya lihat dengan lensa objektif 40x.

3.7.3 Fungsi Hati¹⁵

A. SGOT

Metode : *Optimized UV-test* menurut IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

Prinsip :



ASAT : Aspartate Aminostransferase

Tambahan piridoxal-5-fosfat (P-5-P) menstabilkan transaminase dan menghindari nilai salah yang rendah dalam sampel yang mengandung P-5-P endogen yang kurang.

Reagen

R1	:	TRIS	pH 7.65	110 mmol/L
		L-Aspartate		320 mmol/L
		MDH (malate dehidrogenase)		≥ 8000 U/L
		LDH (laktat dehidrogenase)		≥ 1200 U/L
R2	:	2-Oxoglutarat		65 mmol/L
		NADH		1 mmol/L
Piridoksal-5-Fosfat FS				
		Good's buffer	pH 9.6	100 mmol/L
		Piridoksal-5-Fosfat		13 mmol/L

Prosedur Assay

Sample start (tanpa P-5-P)

Campur 4 bagian R1 + 1 bagian R2 = mono-reagent

Mono-reagent harus dilindungi dari cahaya.

Sample/Calibrator	100 µL
Monoreagent	1000 µL
Campur, baca absorban setelah 1 menit dan jalankan stopwatch. Baca absorban lagi 1,2,3 menit setelahnya.	

Perhitungan SGOT

Dengan faktor

Dari hasil bacaan absorban hitung $\Delta A/\text{menit}$ dan *multiply* dengan factor koresponding dari table berikut :

$\Delta A/\text{menit} \times \text{factor} = \text{aktivitas SGPT [U/L]}$

	Substrate Start	Sample Start
340 nm	2143	1745
334 nm	2184	1780
365 nm	3971	3235

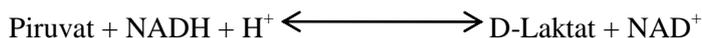
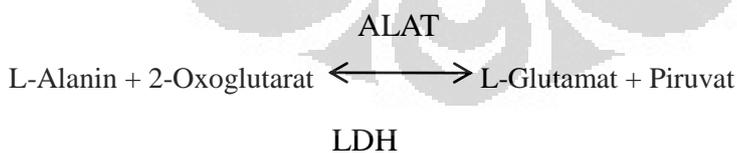
Dengan kalibrator

$$\text{SGOT [U/L]} = \frac{\Delta A/\text{menit Sample}}{\Delta A/\text{menit Calibrator}} \times \text{Conc. Calibrator [U/L]}$$

B. SGPT

Metode : *Optimized UV-test* menurut IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

Prinsip :



ALAT : Alanin aminotransferase

Tambahan piridoxal-5-fosfat (P-5-P) menstabilkan transaminase dan menghindari nilai salah yang rendah dalam sampel yang mengandung P-5-P endogen yang kurang.

Reagen

R1 : TRIS pH 7.15 140 mmol/L

	L-Alanin	700 mmol/L
	LDH (laktat dehidrogenase)	≥ 2300 U/L
R2	: 2-Oxoglutarat	85 mmol/L
	NADH	1 mmol/L
	Piridoksal-5-Fosfat FS	
	Good's buffer pH 9.6	100 mmol/L
	Piridoksal-5-Fosfat	13 mmol/L

Prosedur Assay

Sample start (tanpa P-5-P)

Campur 4 bagian R1 + 1 bagian R2 = mono-reagent

Mono-reagent harus dilindungi dari cahaya.

Sample/Calibrator	100 μ L
Monoreagent	1000 μ L
Campur, baca absorban setelah 1 menit dan jalankan stopwatch.	
Baca absorban lagi 1,2,3 menit setelahnya.	

Perhitungan SGPT

Dengan faktor

Dari hasil bacaan absorban hitung $\Delta A/\text{menit}$ dan *multiply* dengan factor koresponding dari table berikut :

$\Delta A/\text{menit} \times \text{factor} = \text{aktivitas SGPT [U/L]}$

	Substrate Start	Sample Start
340 nm	2143	1745
334 nm	2184	1780
365 nm	3971	3235

Dengan kalibrator

$$\text{SGPT [U/L]} = \frac{\Delta A/\text{menit Sample}}{\Delta A/\text{menit Calibrator}} \times \text{Conc. Calibrator [U/L]}$$

3.7.4 Fungsi Ginjal^{16,17}

A. Kreatin

Metode : Tes kinetic tanpa deproteinisasi sesuai metode Jaffé.

Prinsip : Kreatin + asam Picric \rightarrow kompleks kreatin picrate

Reagen :

R1 : Sodium hidroksida	0.2 mol/L
R2 : Asam picric	20 mmol/L
Standard :	2 mg/dL (177 μ mol/L)
NaCl <i>solution</i>	9 g/L

Penyimpanan Kit : Stabil dalam suhu 2-25° dan tidak boleh dibekukan.

Spesimen : serum, heparin plasma, urine

Prosedur Assay

Sample start :

Campur 4 bagian R1 + 1 bagian R2 = mono-reagent

	Blank	Sample / Standard
Sample/Standard	-	50 μ L
Dist. Water	50 μ L	-
	1000	
Monoreagen	μ L	1000 μ L

Campur dan baca absorban A1 setelah 60 detik,
baca absorban A2 setelah 120 detik

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ sampel / standard}$$

Perhitungan Serum/Plasma

$$\text{Kreatinin (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std/ Cal}} \times \text{Conc. Std/Cal [mg/dl]} \times 50$$

B. Ureum

Metode : Urase – GLDH = Tes UV enzimatik

Prinsip :

GLDH : Glutamat dehidrogenase

Reagen :

R1 : TRIS	pH 7.8	120 mmol/L
2- Oxoglutarat		7 mmol/L
ADP		0.6 mmol/L
Urease		≥ 6 kU/L
GLDH		≥ 1 kU/L

R2 : NADH	0.25 mmol/L
Standard :	50 mg/dL (8.33 mmol/L)

Prosedur Assay

Sample start

Campur 4 bagian R1 + 1 bagian R2 = mono-reagent

Diamkan mono-reagent selama 30 menit pada suhu 15-24°C sebelum digunakan.

	Blank	Sample / Standard
Sample/Standard	-	10 µL
Monoreagen	1000 µL	1000 µL
Campur, inkubasi selama 60 s pada 25/30°C atau 30-40 s pada 37°C . Kemudian baca absorban A1 dan baca absorban A2 setelah 60 detik.		

$$\Delta A = [(A2-A1) \text{ sampel / standard}] - [(A1-A2) \text{ blank}]$$

Perhitungan Ureum

$$\text{Urea [mg/dl]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std/ Cal}} \times \text{Conc. Std/Cal [mg/dl]}$$

3.7.5 Pemeriksaan Histopatologi

Preparat slide histopatologi organ-organ vital yaitu paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, otak, dan usus didapat dari IPB (Institut Pertanian Bogor). Kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya.

3.8 Identifikasi Variabel

3.8.1 Uji Toksisitas Oral Akut

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah dosis produk pangan BPPT dan seks. Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah tikus yang mati (LD₅₀). Variabel perancu pada penelitian ini adalah usia, strain, dan kondisi kandang.

3.8.2 Uji Toksisitas Oral Subkronik

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah dosis produk pangan BPPT. Variabel terikat pada penelitian ini adalah *no-effect observed level* (NOEL), berat badan, berat organ, pengukuran hematologi (jumlah leukosit dan hitung jenis), pengukuran fungsi hati (SGOT, SGPT), pengukuran fungsi ginjal

(ureum, kreatinin), dan gambaran histopatologi. Variabel perancu usia, strain, seks dan kondisi kandang.

3.9 Analisis Data

Dari masing-masing kelompok tikus yang diteliti, data akan dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam bentuk tabel. Melalui tabel tersebut akan dicari LD₅₀ untuk toksisitas oral akut dan dosis *no observed effect level*(NOEL) untuk toksisitas oral subkronik.

- a. Perhitungan LD₅₀ berupa LD₅₀ semu yang mengambil *dose limit* karena dosis yang digunakan hanya 1 dan itu merupakan dosis maksimal.
- b. Penentuan dosis *no observed effect level* (NOEL) yaitu tingkat dosis maksimum yang tidak menginduksi atau menunjukkan efek yang terobservasi pada spesies hewan coba yang paling *susceptible* dan sesuai dengan menggunakan indikator toksisitas paling sensitif. Pada percobaan ini indikator efek berupa kematian, pemeriksaan makroskopik (berat badan dan berat organ), pemeriksaan hematologi, fungsi hati, fungsi ginjal, dan pemeriksaan histopatologi.

Uji statistik yang akan dipakai adalah SPSS Statistics 17.0

- a. Uji *Friedman Test* memberikan hasil ada peningkatan berat badan yang bermakna selama 14 hari, kemudian dilanjutkan uji *post hoc Wilcoxon Test* untuk melihat peningkatan bermakna tersebut terletak pada pada hari ke berapa.
- b. Untuk data dengan distribusi normal : uji *one way Anova* untuk membuktikan ada perbedaan bermakna antar grup tikus, kemudian dilanjutkan uji *post hoc LSD* untuk melihat di mana letak perbedaan bermakna tersebut.
- c. Untuk data dengan distribusi tidak normal : uji *Kruskal-Wallis* untuk membuktikan ada perbedaan bermakna antar grup tikus, kemudian dilanjutkan uji *post hoc Mann-Whitney* untuk melihat di mana letak perbedaan bermakna tersebut.

3.10 Definisi Operasional

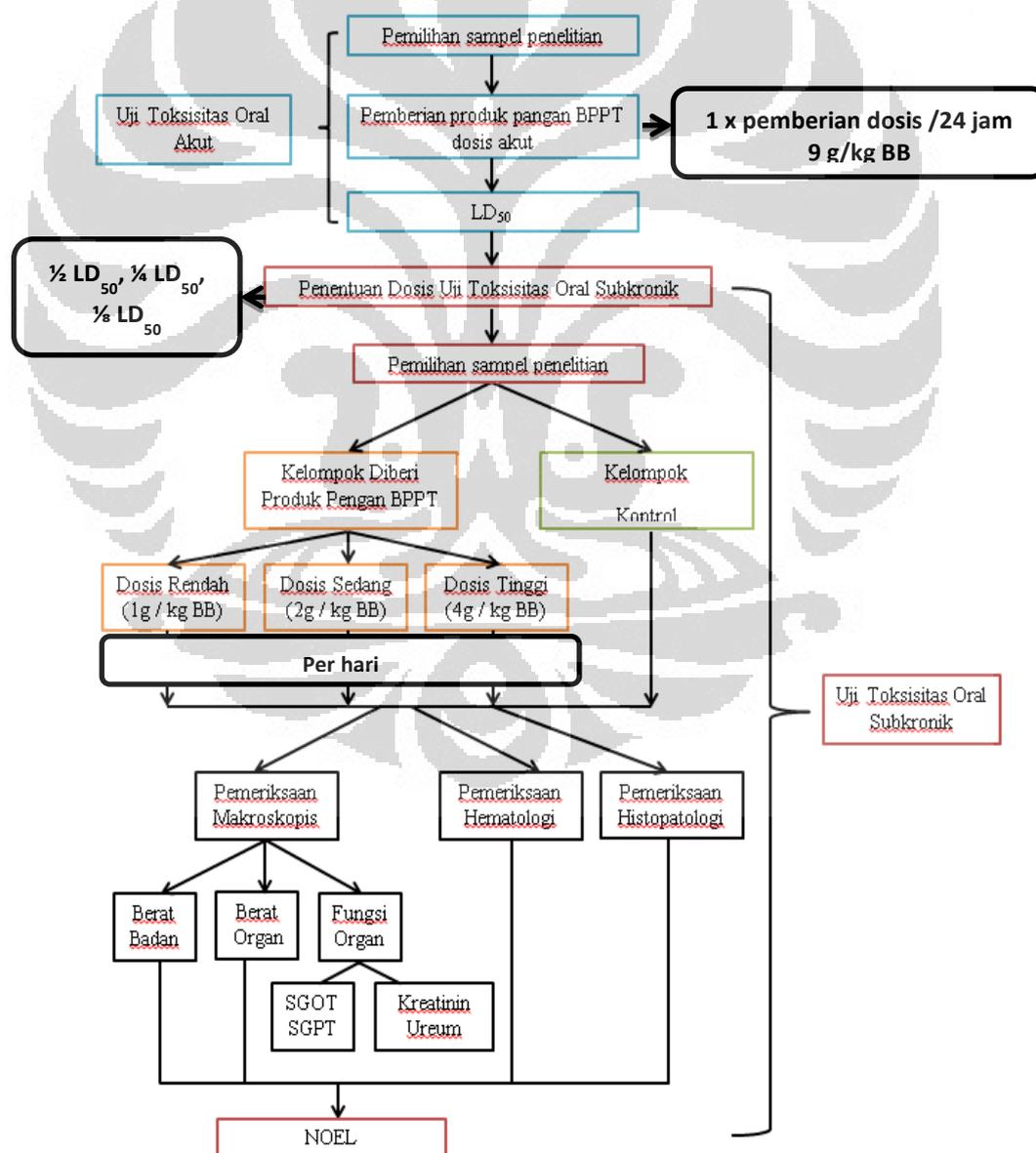
Dalam penelitian, peneliti menggunakan istilah-istilah yang dapat didefinisikan sebagai berikut:

1. **Tikus** yang digunakan adalah tikus strain *Sprague Dawley* yang berusia \pm 8 minggu, berat 120 - 150 gram.
2. **Produk pangan BPPT** adalah suatu campuran zat herbal yang juga mengandung suatu zat aktif (polifenol) yang sedang dikembangkan sebagai produk pangan darurat korban bencana oleh BPPT.
3. **Toksisitas Oral Akut** adalah efek merugikan yang muncul dalam jangka waktu pendek setelah pemberian secara oral sebuah substansi dengan dosis tunggal atau beberapa dosis yang diberikan dalam jangka waktu 24. Efek tersebut diobservasi selama 14 hari pasca pemberian zat.
4. **Toksisitas Oral Subkronik** adalah efek merugikan yang muncul dalam akibat dari pemberian dosis suatu bahan kimia secara berulang setiap hari kepada hewan percobaan selama jangka waktu tertentu dalam hidupnya (tidak boleh lebih dari 10%)
5. **Dosis** adalah jumlah dari substansi tes yang diberikan. Dosis dinyatakan dalam berat (g,mg) atau berat substansi tes per unit berat dari hewan percobaan (contoh mg/kg BB).
6. **Dosis rendah** adalah dosis produk pangan BPPT sebesar 1 g/kg BB tikus.
7. **Dosis sedang** adalah dosis produk pangan BPPT sebesar 2 g/kg BB tikus.
8. **Dosis tinggi** adalah dosis produk pangan BPPT sebesar 4 g/kg BB tikus.
9. **Dosage** adalah sebuah term general yang berhubungan dengan dosis, yaitu merupakan frekuensi dan durasi dari pemberian dosis (aturan pemberian dosis).
10. **Dose-response** adalah hubungan antara dosis dan proporsi sebuah populasi sample yang menunjukkan sebuah efek yang terdefinisi.
11. **Dose-effect** adalah hubungan antara dosis dan magnitude dari efek biologis yang terdefinisi pada sample individual maupun sample populasi.
12. **LD₅₀(median lethal dose)** adalah dosis tunggal yang telah dihitung secara statistik dari sebuah substansi yang diperkirakan dapat menyebabkan kematian dari 50%

dari jumlah hewan ketika diberikan secara oral. Nilai dari LD₅₀ dinyatakan dalam berat dari substansi tes per unit berat dari hewan percobaan (mg/kg).

13. *No observed effect level (NOEL)* adalah dosis maksimum yang tidak menginduksi atau menunjukkan efek yang terobservasi pada spesies hewan coba yang paling *susceptible* dan sesuai dengan menggunakan indikator toksisitas paling sensitif. Dinyatakan dalam berat dari substansi tes yang diberikan setiap hari per berat unit hewan coba (mg/kg).

3.11 Alur Penelitian



3.12 Etika Penelitian

Agar penelitian ini dapat dilaksanakan sesuai dengan etika yang berlaku peneliti melakukan antara lain:

1. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan jumlah hewan coba yang sesuai dengan protocol OECD dan hewan dikorbankan dengan cara dekapitasi dalam anestesi eter.
2. Proposal penelitian ini telah diajukan kepada tim modul Riset FKUI dan telah mendapatkan izin untuk melaksanakan uji toksisitas terhadap hewan coba (tikus) di Animal House FKUI.
3. Proposal penelitian ini telah diajukan kepada komisi etik FKUI untuk mendapatkan persetujuan etik, sehingga peneliti mendapatkan legitimasi etik dan penelitian dapat dipertanggungjawabkan secara etika.



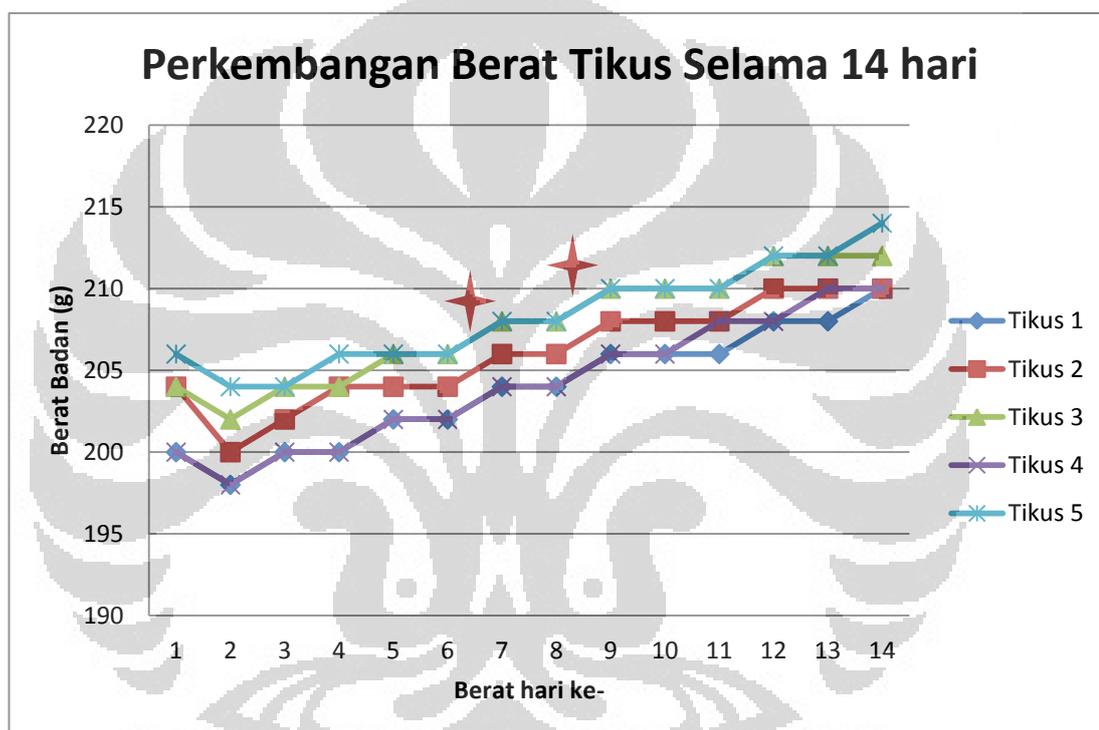
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Toksisitas Oral Akut

4.1.1 Perkembangan Berat Badan

Berat kelima tikus jantan pada hari ke 1 – 13 memiliki data dengan distribusi normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$) sedangkan pada hari ke-14 memiliki data dengan distribusi tidak normal ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$)

Gambar 14. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus selama 14 hari

Terlihat bahwa peningkatan berat badan antar tikus berbeda secara signifikan dari hari ke hari selama 14 hari pengamatan. Pengolahan data secara statistik dengan menggunakan *Friedman Test* memberikan hasil adanya perbedaan bermakna antara berat badan selama 14 hari ($p < 0.05$). Dengan analisis *Post Hoc Wilcoxon Test* didapatkan kenaikan bermakna terutama pada hari ke 6-7 dan 8 – 9 ($p = 0.025$).

Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa dosis tunggal oral 9 g/kg BB produk pangan BPPT berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan berat badan tikus selama 14 hari pengamatan. Terjadinya penurunan bobot badan dalam

sehari (hari ke-1-2) yang tidak mencapai 5 % tanpa menunjukkan pengaruh perilaku pada hewan uji, adalah umum terjadi akibat perlakuan (tikus belum beradaptasi).⁽³⁴⁾

4.1.2 LD₅₀

Pemberian dosis tunggal oral produk pangan BPPT adalah 9 g/kg BB pada setiap tikus jantan. Dosis tersebut diambil sesuai dengan aturan jika sebuah tes pada satu level dosis untuk minimal 5g/kg berat badan tidak menghasilkan *no compound-related mortality* maka studi menggunakan 3 level dosis mungkin tidak diperlukan, dosis tersebut disebut sebagai dosis limit.⁽⁹⁾ Hal ini dikarenakan peneliti telah mengamsumsi bahwa produk pangan ini tidak toksik.

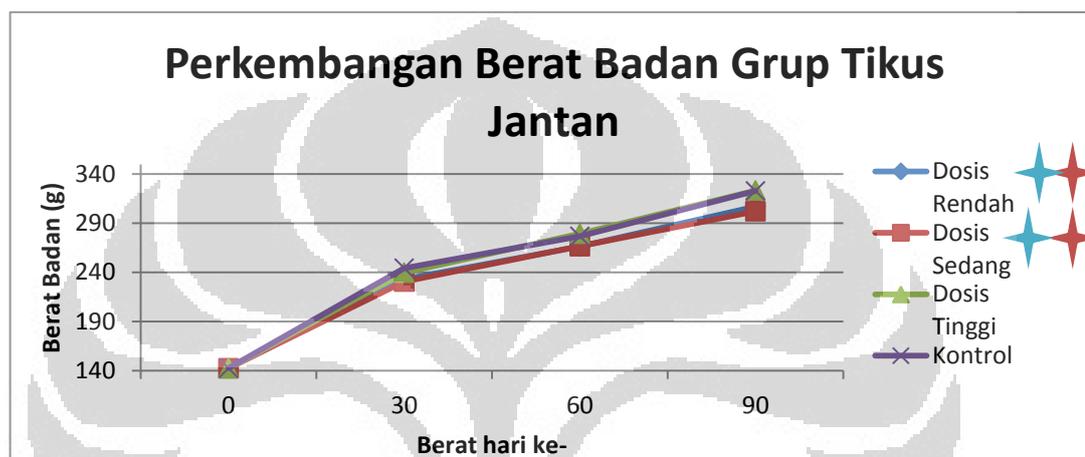
Pemberian dosis tersebut tidak mempengaruhi perilaku (profil farmakologi) tikus selama pengamatan intensif setiap 1 jam setelah pemberian sediaan uji. Profil farmakologi diamati dari pernafasan, aktivitas motorik, refleks spinal, tonus otot, urinasi dan defikasi. Observasi dan penimbangan berat badan dilanjutkan hingga 14 hari dan tidak ditemukan kematian. Sehingga nilai LD₅₀ dari dosis tunggal oral produk pangan BPPT tidak dapat dihitung. Hal itu disebabkan bahwa untuk menghitung LD₅₀ harus ada hewan uji yang mati.^(34, 35) Sehingga hanya dapat dinyatakan nilai LD₅₀ semu produk pangan BPPT > 9 g/kg BB tikus jantan.

4.2 Uji Toksisitas Oral Subkronik

4.2.1 Berat Badan

Jantan

Berat tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$) kecuali berat pada hari 0 ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan dosis tinggi

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan kontrol

Gambar 15. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus Jantan selama 90 hari

Dari grafik pertumbuhan nampak bahwa perkembangan berat badan selama 90 hari pada grup kontrol terlihat sedikit lebih tinggi dari grup dosis tinggi pada hari ke 30 dan kemudian mengalami penambahan berat badan yang sama hingga hari ke 90. Dibandingkan dengan grup dosis rendah dan sedang, grup kontrol dan dosis tinggi mengalami penambahan berat badan cukup tinggi. Penambahan berat badan grup dosis rendah dan sedang tidak jauh berbeda.

Dari pengolahan data secara statistik digunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil bahwa pertambahan berat badan antar dosis pada hari ke 0 - 90 bermakna ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* untuk dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan berat badan. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis rendah ($p = 0.034$) dan grup dosis sedang ($p = 0.006$)
- grup dosis tinggi dengan grup dosis rendah ($p = 0.028$) dan dosis sedang ($p = 0.006$)

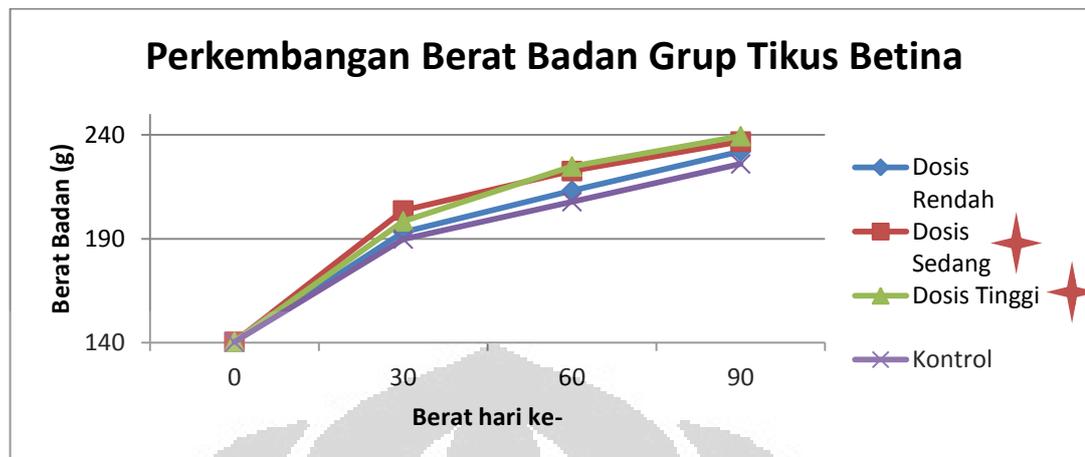
Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi tidak bermakna dalam meningkatkan penambahan berat badan lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan berat badan pada hewan berhubungan dengan besar dosis yang diberikan karena terlihat bahwa pada tikus grup dosis rendah dan sedang justru peningkatan berat badannya tidak sebesar kontrol.

Sehubungan dengan hasil tersebut penelitian terakhir yang dilakukan oleh Bjornsson dan Olsson 2007; Bonkovsky 2006; Gloro et al. 2005; Javaid dan Bonkovsky 2006; Jimenez-Saenz dan Martinez-Sanchez 2007; Jimenez-Saenz dan Martinez-Sanchez Mdel 2006; Molinari et al. 2006 membuktikan bahwa polifenol yang terkandung produk pangan BPPT memiliki kemampuan menurunkan berat badan.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾

Hal tersebut didukung oleh Manzano S, Williamson G. yang meneliti bahwa konsumsi polifenol dapat menurunkan uptake glukosa, menginhibisi transport glukosa dari lumen usus ke dalam sel serta menginhibisi transport glukosa yang difasilitasi oleh GLUT 2 pada membran usus halus.⁽⁴¹⁾ Bukti lain ditemukan oleh Cathy A. Welsch yaitu polifenol juga menginhibisi enzim hidrolitik di *brush border* usus, pankreas amilase, lipase, tripsin, zimogen, pepsinogen, dan tripsinogen.⁽⁴²⁾ Hal – hal tersebut menyebabkan adanya gangguan absorbs serta pencernaan glukosa dalam tubuh sehingga dapat mengganggu pertumbuhan terutama berat badan.

Betina

Berat tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal pada berat hari ke 30 dan 60 berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

Gambar 15. Grafik Perkembangan Berat Badan Tikus Betina selama 90 hari

Dari grafik pertumbuhan nampak bahwa perkembangan berat badan selama 90 hari pada grup kontrol mengalami pertambahan berat badan yang paling kecil dibanding grup tikus yang diberikan produk pangan BPPT. Pada hari ke 90 didapatkan berat badan paling tinggi pada grup dosis tinggi yaitu 239,4 g sedangkan terendah pada grup kontrol 226 g.

Untuk mengetahui apakah peningkatan berat badan antara grup dosis tikus betina tersebut memiliki arti yang bermakna maka dilakukan pengolahan data secara statistik. Data peningkatan berat badan hari 0 – 90 antar grup tikus betina memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p < 0.05$ sehingga dilakukan pengubahan data dengan bentuk transformasi berupa *reciprocal* ($1/n$). Dengan menggunakan uji *one way Anova* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($P < 0.05$) sehingga dilakukan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup kontrol dengan grup dosis sedang ($p = 0.005$) dan dosis tinggi ($p = 0.002$)

Berdasarkan uji tersebut didapatkan adanya perbedaan bermakna dalam peningkatan berat badan antar grup tikus betina dari hari ke 0 – 90 antara grup kontrol dengan grup dosis sedang dan tinggi. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa pemberian produk pangan BPPT dapat meningkatkan penambahan berat badan lebih baik dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian mengenai polifenol (terkandung dalam produk pangan BPPT) yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic et al pada anjing didapatkan pula peningkatan berat badan dan beberapa organ.⁽⁴³⁾ Perlu diingat bahwa dosis polifenol (antioksidan) memiliki peran penting dalam pengaruhnya terhadap tubuh karena jumlah antioksidan yang berlebihan dapat mengganggu fungsi imun bahkan dapat berpotensi menjadi prooksidan.⁽²⁶⁾ Dengan meningkatnya prooksidan maka tingkat stress oksidatif dalam tubuh juga dapat meningkat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh R. Scott Rector et al pada tahun 2007 dan Poonam C. Mittal pada tahun 2009 didapatkan bahwa peningkatan stress oksidatif dalam tubuh dapat meningkatkan berat badan.^(44, 45)

Stress oksidatif ini dapat merusak biomolekul besar seperti protein, DNA, dan lemak.⁽²⁶⁾ Pada proses kerusakan tersebut timbulah suatu reaksi inflamasi dalam tubuh. Reaksi inflamasi berhubungan dengan berat badan. Jika suatu reaksi inflamasi merupakan reaksi akut yang berat maka tubuh akan memecah jaringan otot dan lemak sehingga menurunkan berat badan. Tetapi sebaliknya jika reaksi inflamasi yang terjadi merupakan reaksi kronik yang ringan maka hal tersebut mengganggu kerja leptin, insulin, dan kortisol sehingga metabolisme tubuh akan terganggu. Dengan terganggunya metabolisme glukosa dan lemak akan terjadi penumpukan cadangan lemak yang menimbulkan peningkatan berat badan bahkan obesitas.⁽⁴⁶⁾

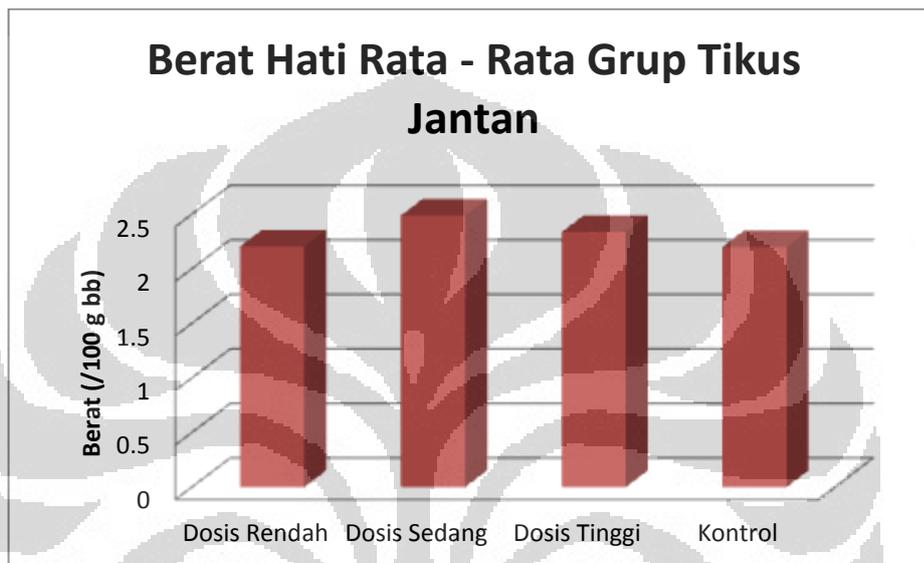
Selain itu penting diingat bahwa dalam produk pangan BPPT terdapat kandungan – kandungan lain berupa nutrisi dan non-nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak, abu, serat yang tidak dapat disingkarkan pengaruhnya terhadap peningkatan berat badan.⁽²⁶⁾

Produk pangan BPPT memberikan efek terhadap berat badan yang berbeda antara tikus jantan dan betina. Produk pangan BPPT dalam dosis sedang – tinggi hanya dapat meningkatkan berat badan pada grup tikus betina sedangkan pada grup tikus jantan tidak memberikan efek.

4.2.2 Hati (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

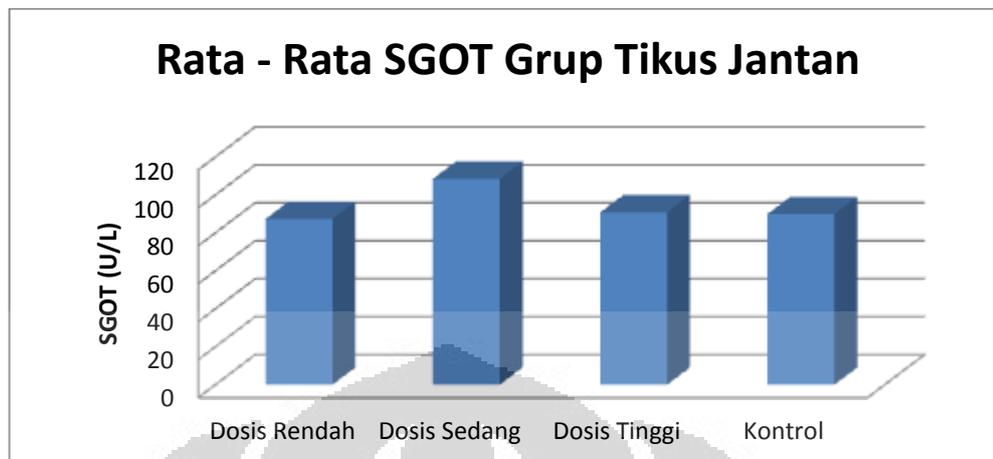
Berat organ hati tikus jantan dari masing – masing grup ada yang memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



Gambar 16. Diagram perbandingan Berat Hati Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ hati tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (2.49g) dan paling rendah dari grup kontrol (2.2g). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

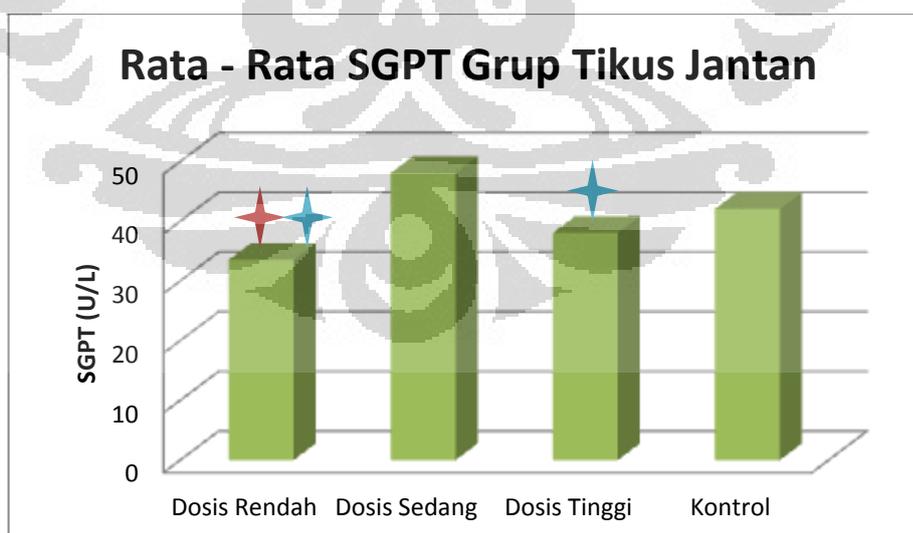
SGOT tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$) setelah dilakukan perubahan data dengan memberi log.



Gambar 17. Diagram perbandingan SGOT Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata SGOT tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (108.48 U/L) dan paling rendah dari grup dosis rendah (87.36 U/L). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

SGPT tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis sedang

Gambar 18. Diagram perbandingan SGPT Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

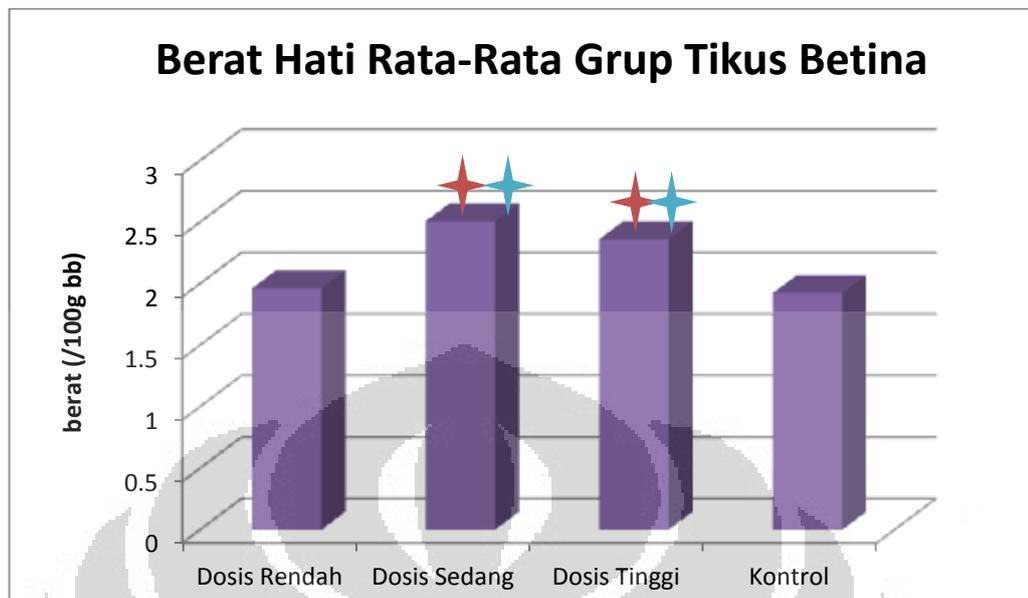
Dari diagram didapatkan bahwa SGPT tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (48.10 U/L) dan paling rendah dari grup dosis rendah (33.54 U/L). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p < 0.05$ sehingga dilakukan pengubahan data dengan bentuk transformasi berupa *reciprocal* ($1/n$). Dengan menggunakan uji *one way Anova* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$) sehingga dilakukan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup dosis rendah dengan grup kontrol ($p = 0.001$)
- grup dosis sedang dengan grup dosis rendah ($p = 0.000$) dan dosis tinggi ($p = 0.002$)

Berdasar data tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis sedang dan tinggi tidak meningkatkan SGPT secara bermakna dibandingkan kontrol. Adanya penurunan nilai secara bermakna pada dosis rendah dibanding dengan kontrol menunjukkan adanya dugaan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis rendah justru dapat memperbaiki fungsi hati. Hal tersebut didukung dengan fakta bahwa polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT merupakan zat fitokimia yang dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif dalam penyakit kronik.^(24, 26)

Betina

Berat organ hati tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis rendah

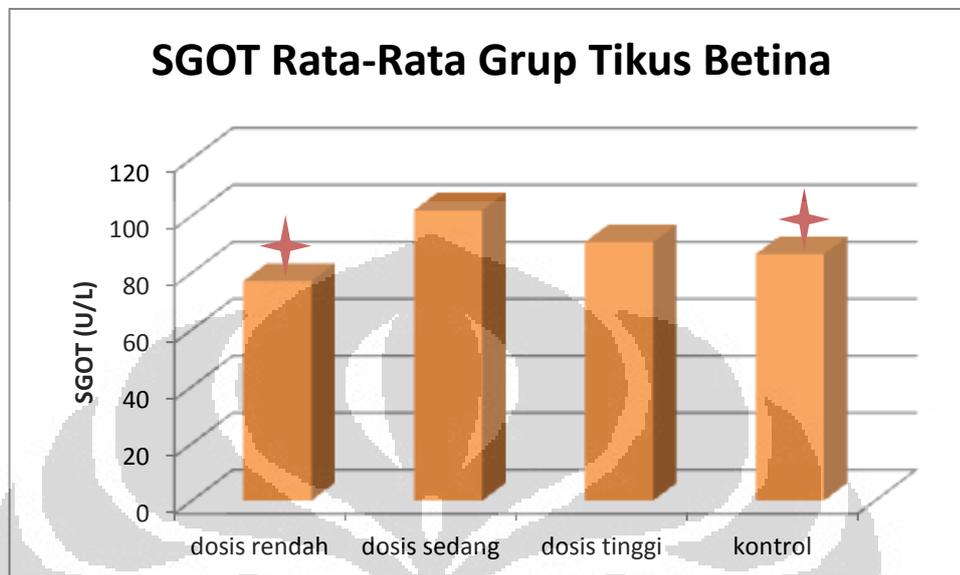
Gambar 19. Diagram perbandingan Berat Hati Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ hati tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (2.51g) dan paling rendah dari grup kontrol (1.92g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup kontrol dengan dosis sedang ($p = 0.000$) dan dosis tinggi ($p = 0.000$)
- grup dosis rendah dengan dosis sedang ($p = 0.000$) dan dosis tinggi ($p = 0.001$)

Berdasarkan hasil tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dari dosis sedang telah dapat meningkatkan berat organ hati secara bermakna dibandingkan kontrol. Seiring penambahan dosis produk pangan BPPT dari terjadi peningkatan berat organ hati secara bermakna. Hal tersebut sejalan dengan penelitian lain yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic et al pada anjing pada tahun 2009 yang mendapatkan peningkatan berat organ hati dengan memberikan polifenol (zat aktif dalam produk pangan BPPT).⁽⁴²⁾

SGOT tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan dosis sedang

Gambar 20. Diagram perbandingan SGOT Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata SGOT tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (101.903 U/L) dan paling rendah dari grup dosis rendah (76.992 U/L). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap SGOT. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

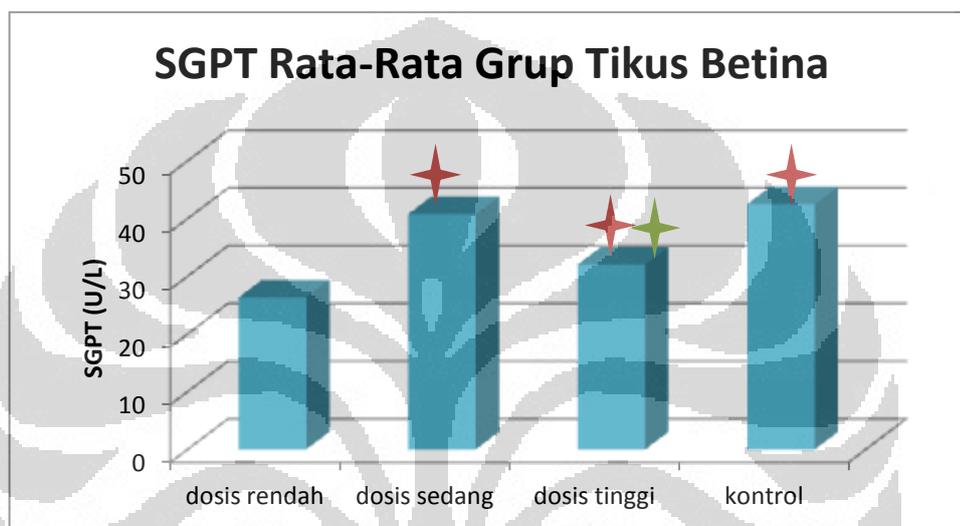
- grup dosis sedang dengan kontrol ($p = 0.025$) dan grup dosis rendah ($p = 0.000$)

Berdasarkan hasil didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT pada dosis sedang dapat meningkatkan SGOT secara bermakna dibandingkan dengan kontrol dan dosis rendah.

Menurut penelitian terakhir yang dilakukan oleh Bjornsson dan Olsson 2007; Bonkovsky 2006; Gloro et al. 2005; Javid dan Bonkovsky 2006; Jimenez-Saenz dan Martinez-Sanchez 2007; Jimenez-Saenz dan Martinez-Sanchez Mdel 2006; Molinari et al. 2006 terbukti bahwa polifenol dapat menimbulkan efek buruk berupa gagal hati. Diduga mekanisme yang mendasarinya adalah aktivitas antioksidannya.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾ Dosis polifenol (antioksidan) memiliki peran penting dalam pengaruhnya terhadap

tubuh karena jumlah antioksidan yang berlebihan dapat berpotensi menjadi prooksidan.⁽²⁶⁾ Pada penelitian ini dosis polifenol dalam produk pangan BPPT dosis sedang telah menjadi prooksidan yang merusak jaringan hati.

SGPT tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis rendah ($p < 0.05$)

* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis sedang ($p < 0.05$)

Gambar 21. Diagram perbandingan SGPT Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata SGPT tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (42.487 U/L) dan paling rendah dari grup dosis rendah (26.311 U/L).

Dengan perhitungan statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap SGPT. Didapatkan terdapat perbedaan bermakna dalam hasil SGPT antara :

- grup kontrol ($p = 0.001$), grup dosis sedang ($p = 0.000$), dan grup dosis tinggi ($p = 0.034$) dengan grup dosis rendah
- grup dosis sedang dengan dosis tinggi ($p = 0.009$)

Berdasarkan hasil didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis rendah didapatkan penurunan SGPT secara bermakna dibandingkan dosis

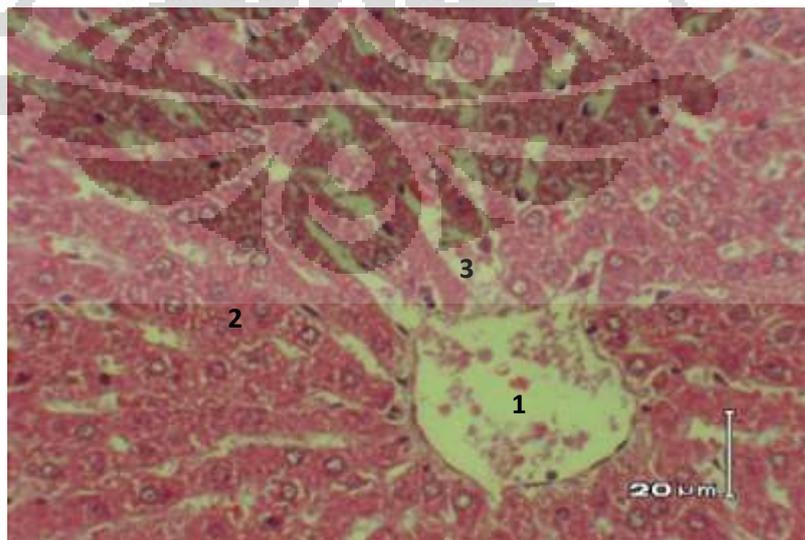
lainnya. Pemberian dosis sedang dan dosis tinggi tidak memberikan perbedaan nilai yang bermakna dibandingkan kontrol. Penurunan nilai SGPT secara bermakna pada dosis rendah dibanding dengan kontrol menunjukkan adanya dugaan bahwa dengan pemberian bahan BPPT dosis rendah justru dapat memperbaiki fungsi hati. Hal tersebut didukung dengan fakta bahwa polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT merupakan zatfitokimia yang dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif.^(25, 26)

Tabel 10. Histopatologi Organ Hati

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Hati	TAKS	TAKS
II.	2 g/kg BB		TAKS	TAKS
III.	4 g/kg BB		Degenerasi sel hati dan dilatasi sinusoid	Degenerasi hati dan dilatasi sinusoid Akumulasi hemosiderin
IV.	Kontrol		TAKS	TAKS

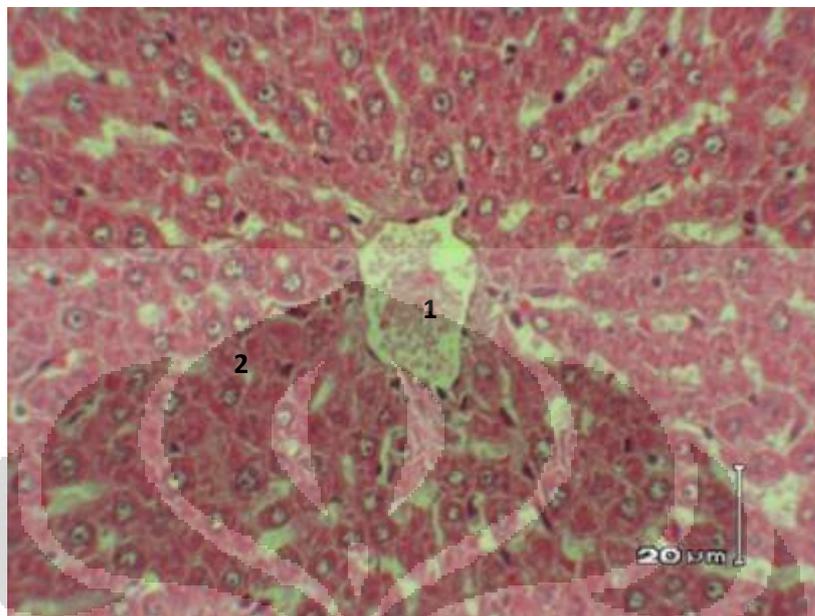
Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan mulai timbul adanya kerusakan pada sel hati dengan pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi. Kelainan yang dialami oleh grup jantan hanya berupa degenerasi sel hati dan dilatasi sinusoid sedangkan pada grup betina ditemukan pula adanya akumulasi hemosiderin.



Gambar 22. Grup dosis 4 g/kg BB (no.8) jantan - Hati

Degenerasi hati. (1) vena centralis. (2) sel epitel hati. (3) dilatasi sinusoid. HE. 200x.



Gambar 23. Grup kontrol (no.1) jantan - Hati

Tidak ada kelainan spesifik. (1) vena centralis. (2) sel epitel hati. HE. 400x.

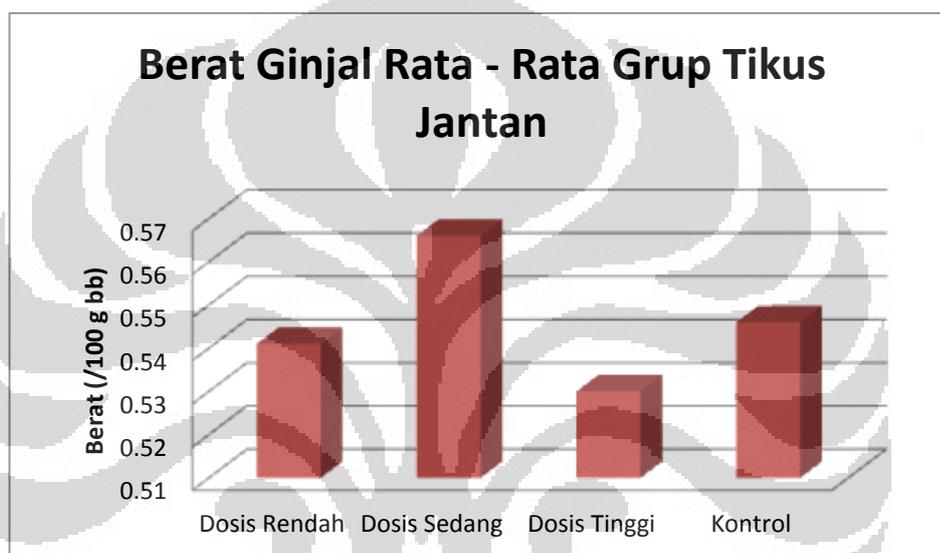
Dari hasil pemeriksaan berat, fungsi, dan histopatologi hati dapat dibandingkan antar efek produk pangan BPPT pada grup tikus jantan dan betina. Pada grup tikus jantan tidak didapatkan efek pada berat hati sedangkan pada betina pada pemberian dosis sedang dan tinggi didapatkan peningkatan berat hati secara bermakna. Pada pemeriksaan fungsi hati SGOT pada grup tikus jantan tidak ditemukan adanya pengaruh sedangkan pada grup tikus betina didapatkan peningkatan nilai SGOT dari dosis sedang yang berbeda bermakna dibanding kontrol yang menunjukkan indikasi terganggunya fungsi hati secara akut. Pada pemeriksaan fungsi hati SGPT ditemukan adanya penurunan nilai pada grup tikus dosis rendah secara bermakna dibandingkan kontrol baik pada tikus jantan maupun betina. Efek produk pangan BPPT didukung melalui penemuan secara histopatologi yaitu mulai ditemukan kerusakan sel hati baik pada grup jantan maupun betina dengan pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi. Peningkatan SGOT pada dosis sedang mulai menandakan adanya gangguan pada sel hati tetapi belum menimbulkan kerusakan pada sel hati tikus. Sehingga dapat disimpulkan bahwa efek produk pangan BPPT mulai memberikan pengaruh pada dosis sedang kepada organ hati

yaitu berupa gangguan fungsi dan pada dosis tinggi berupa kerusakan sel hati. Tikus betina lebih rentan untuk mengalami gangguan dibandingkan tikus jantan.

4.2.3 Ginjal (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

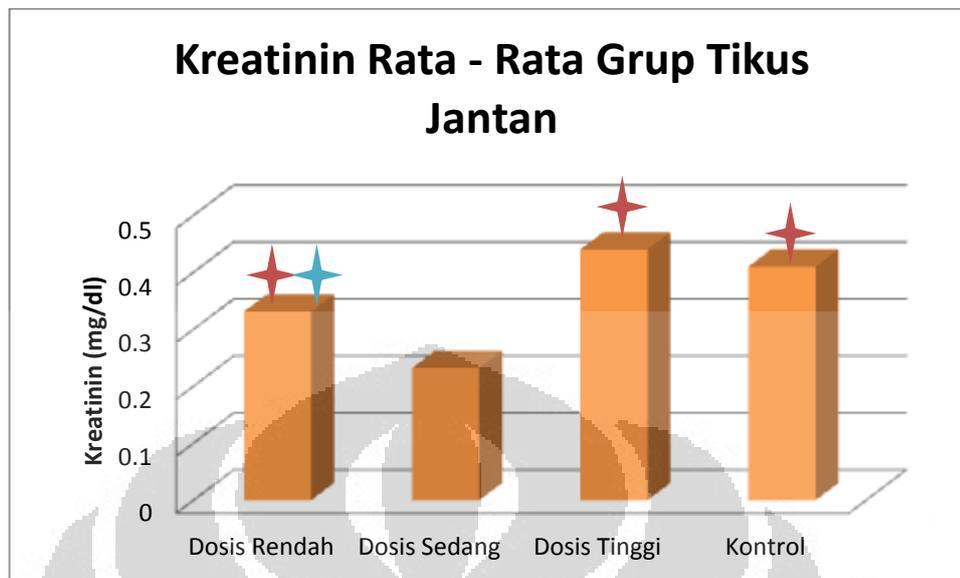
Berat ginjal tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p>0.05$).



Gambar 24. Diagram perbandingan Berat Ginjal Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ ginjal tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.57g) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (0.53g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p>0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p>0.05$).

Kreatinin tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p<0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis sedang

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis tinggi

Gambar 25. Diagram perbandingan Kreatinin Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa kreatinin tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (0.44g) dan paling rendah dari grup sedang (0.23g). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap kreatinin. Didapatkan perbedaan bermakna anatar :

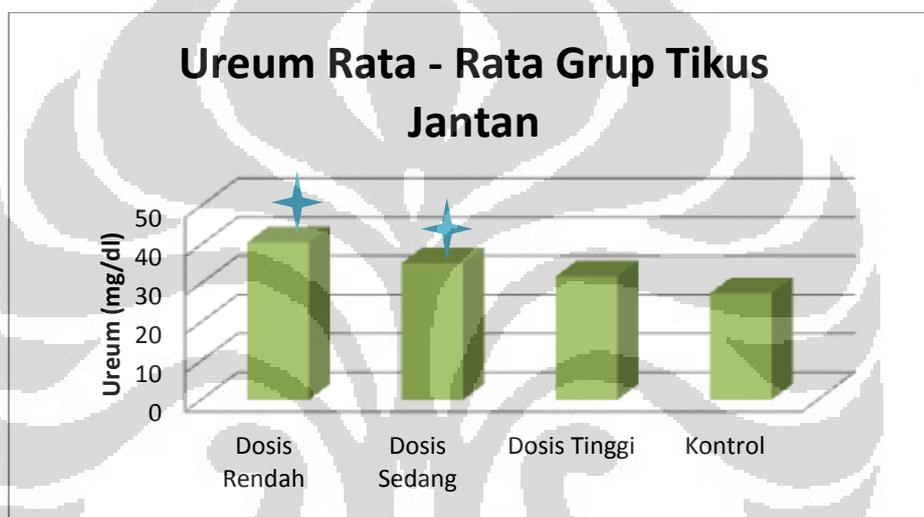
- grup dosis sedang dengan grup kontrol ($p = 0.001$), dosis rendah ($p = 0.039$), dan dosis tinggi ($p = 0.009$).
- grup dosis rendah dengan dosis tinggi ($p = 0.048$)

Berdasar data tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT tidak meningkatkan kreatinin secara bermakna dibandingkan kontrol. Justru didapatkan adanya penurunan kreatinin yang bermakna dengan pemberian dosis sedang dibandingkan grup lainnya.

Tidak adanya perbedaan bermakna dalam parameter kreatinin dapat dijelaskan bahwa peningkatan kadar kreatinin maupun BUN secara bermakna hanya terjadi jika fungsi ginjal sudah mengalami penurunan sekitar 50 – 70 %.^(47, 48) Penelitian sebelumnya dalam sebuah jurnal menyebutkan bahwa penggunaan serum

kreatinin sebagai biomarker mengukur fungsi ginjal merupakan *delayed marker* yang bersifat nonspesifik dan tidak sensitif dalam mendiagnosis dini terjadinya gagal ginjal akut (saat ginjal belum mengalami kematian sel berupa apoptosis maupun nekrosis). Biomarker yang dapat digunakan pada tahap awal antara lain : Cystatin C, Microalbumin, NAG.^(49, 50)

Ureum tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

Gambar 26. Diagram perbandingan Ureum Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa ureum tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (40.57 mg/dl) dan paling rendah dari grup kontrol (27.41 mg/dl). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p < 0.05$ sehingga dilakukan pengubahan data dengan bentuk transformasi berupa *reciprocal* ($1/n$). Dengan menggunakan uji *one way Anova* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($P < 0.05$) sehingga dilakukan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

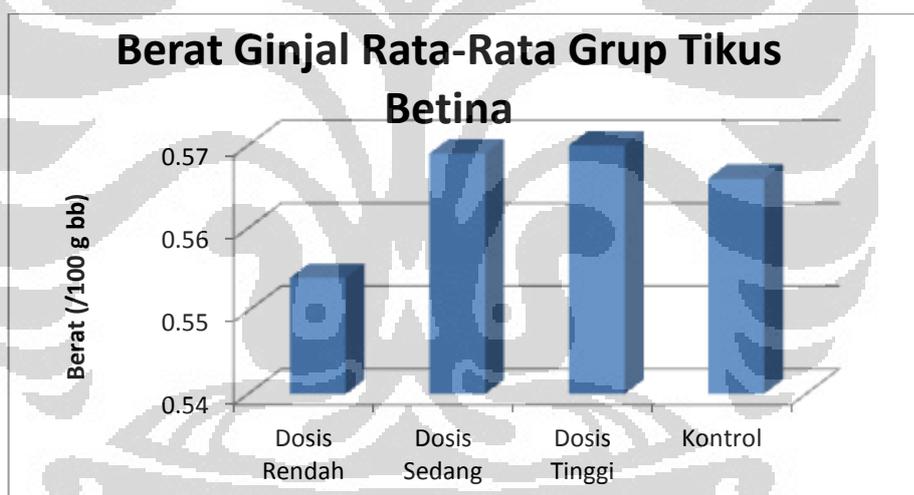
- grup kontrol dengan dosis rendah ($p = 0.008$) dan dosis sedang ($p = 0.033$)

Dengan data tersebut dapat dikatakan bahwa dengan pemberian produk pangan BPTT dosis rendah sudah dapat meningkatkan jumlah ureum grup tikus jantan secara bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Konsentrasi urea dalam serum tidak hanya dipengaruhi oleh fungsi ginjal tetapi juga oleh beberapa faktor lainnya. Faktor – faktor tersebut adalah kecepatan produksi ginjal yang dipengaruhi oleh protein *intake* tiap individu, jumlah urea yang direabsorpsi di tubulus proksimal yang dipengaruhi volume vaskular yang efektif, dan jumlah urea yang direabsorpsi oleh medular internal yang dipengaruhi oleh kecepatan aliran urin.^(16, 17) Sehingga peningkatan urea yang terjadi pada penelitian ini diduga disebabkan oleh adanya peningkatan asupan jumlah protein yang berasal dari produk pangan BPPT.

Betina

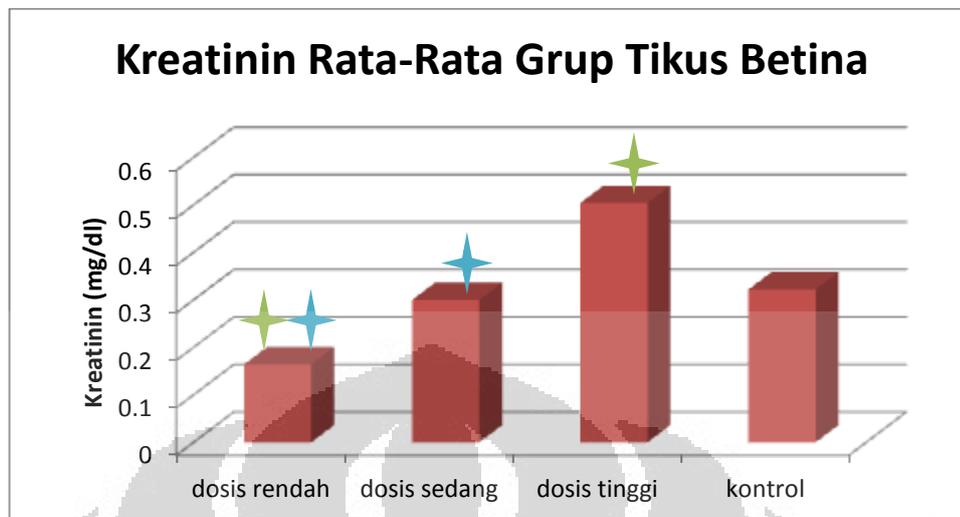
Berat organ ginjal tikus betina dari masing – masing grup ada yang memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



Gambar 27. Diagram perbandingan Berat Ginjal Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ ginjal tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (0.57g) dan paling rendah dari grup rendah (0.55g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Kreatinin tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup kontrol ($p < 0.05$)

* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis tinggi ($p < 0.05$)

Gambar 28. Diagram perbandingan Kreatinin Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa kreatinin tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (0.50 mg/dl) dan paling rendah dari grup rendah (0.16 mg/dl). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap kreatinin. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis rendah ($p = 0.019$) dan dosis tinggi ($p = 0.011$)
- grup dosis tinggi dengan grup dosis rendah ($p = 0.005$) dan dosis sedang ($p = 0.005$)

Berdasarkan hasil didapatkan bahwa pemberian produk pangan BPPT dengan dosis rendah dapat menurunkan kreatinin secara bermakna dibandingkan dengan kontrol hal tersebut menunjukkan adanya dugaan bahwa dengan pemberian bahan BPPT dosis rendah justru dapat memperbaiki fungsi ginjal. Hal tersebut didukung dengan fakta bahwa polifenol merupakan zat fitokimia yang bersifat antioksidan sehingga dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif dalam penyakit kronik.^(25, 26)

Seiring bertambahnya dosis nampak adanya kenaikan nilai kreatinin. Nilai kreatinin dosis sedang tidak berbeda bermakna dengan kontrol sedangkan dosis tinggi kenaikannya cukup bermakna dibandingkan kontrol dan dosis lainnya.

Peningkatan kadar kreatinin bermakna tersebut menunjukkan penurunan fungsi ginjal sekitar 50 – 70 %.^(47, 48) Dosis polifenol (antioksidan) memiliki peran penting dalam pengaruhnya terhadap tubuh karena jumlah antioksidan yang berlebihan dapat mengganggu fungsi imun bahkan berpotensi menjadi prooksidan.⁽²⁶⁾ Pada penelitian ini dosis polifenol dalam produk pangan BPPT dosis tinggi telah menjadi prooksidan yang merusak jaringan ginjal.

Ureum tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



Gambar 29. Diagram perbandingan Ureum Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

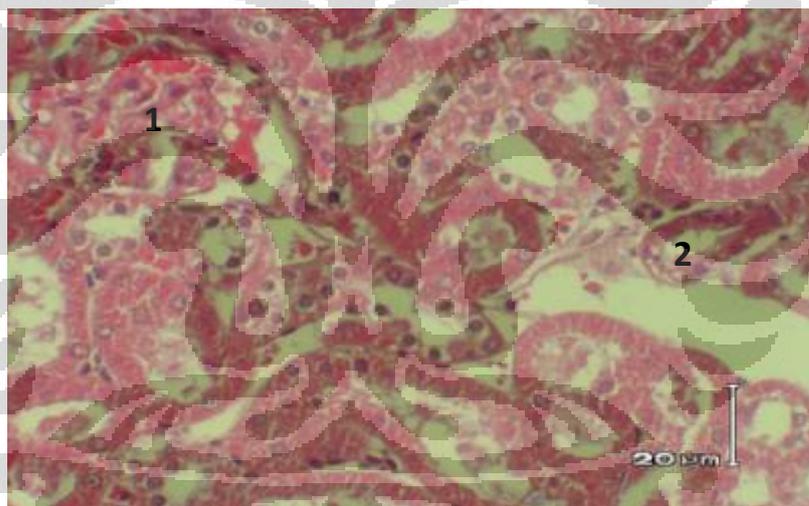
Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata Ureum tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (42.4 mg/dl) dan paling rendah dari grup kontrol (35.927 mg/dl). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Tabel 11. Histopatologi Organ Ginjal

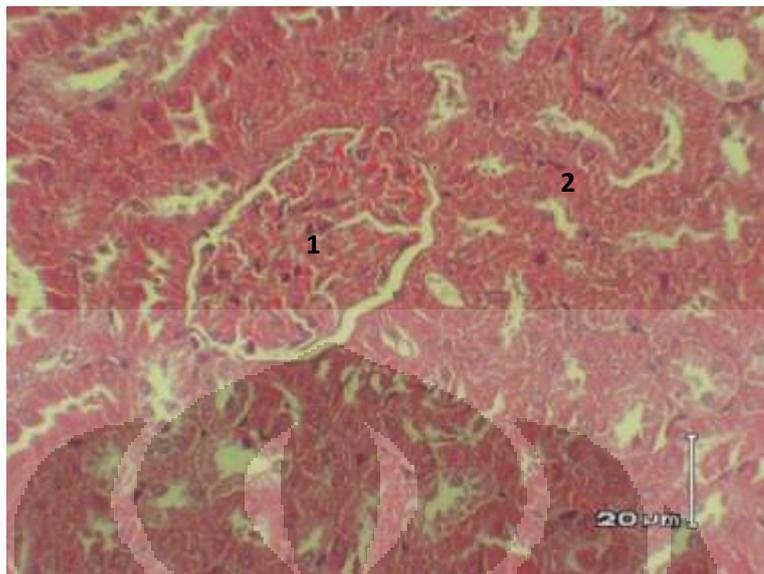
Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Ginjal	TAKS	TAKS
II.	2 g/kg BB		TAKS	TAKS
III.	4 g/kg BB		Degenerasi ringan tubulus proximalis	Nekrosis tubulus proximalis
IV.	Kontrol		TAKS	TAKS

Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Pemeriksaan histopatologi menunjukkan mulai ditemukan kerusakan pada sel tubulus ginjal pada dosis tinggi produk pangan BPPT baik pada grup tikus jantan maupun grup tikus betina. Kelainan pada tikus jantan lebih ringan dari pada tikus betina yaitu berupa degenerasi dari tubulus proksimal sedangkan pada tikus betina berupa nekrosis tubulus proksimal. Penelitian lain yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic yang memberikan ekstrak polifenol (zat aktif dalam produk pangan BPPT) pada anjing menemukan hal yang sama.⁽⁴³⁾ Kerusakan tersebut sesuai dengan peningkatan nilai kreatinin tikus betina grup dosis tinggi yang berbeda bermakna dengan grup kontrol. Nilai kreatinin grup tikus jantan juga mengalami peningkatan pada dosis tinggi tetapi tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Hal tersebut diduga karena kerusakan ginjal yang disebabkan oleh produk pangan BPPT pada tikus jantan tidak seberat yang dialami oleh tikus betina.



Gambar 30. Grup dosis 2 g/kg BB (no.1) jantan - Ginjal
Nekrosis tubulus. (1) glomerulus. (2) nekrosis tubulus proximalis. HE. 200x.



Gambar 31. Grup dosis 1 g/kg BB (no.8) jantan - Ginjal

Tidak ada kelainan spesifik. (1) glomerulus. (2) tubulus proximalis. HE. 200x.

Berdasarkan pemeriksaan berat, fungsi, dan histopatologi ginjal didapatkan efek produk pangan BPPT terhadap grup tikus jantan dan betina. Pada hasil penimbangan berat ginjal tidak didapatkan perbedaan berat yang bermakna antara grup baik pada grup tikus jantan maupun betina. Pada pemeriksaan fungsi ginjal didapatkan sedikit perbedaan hasil pada tikus jantan dan betina. Pada jantan tidak didapatkan hasil penurunan fungsi ginjal sedangkan pada betina ditemukan penurunan fungsi ginjal pada pemberian dosis tinggi yang ditandai dengan kenaikan kreatinin. Pada pemberian dosis rendah pada tikus jantan dan dosis sedang pada tikus betina didapatkan nilai kreatinin yang lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kontrol yang mengindikasikan bahwa dosis tersebut dapat memperbaiki fungsi ginjal. Hasil dari pemeriksaan penurunan fungsi ginjal pada dosis tinggi didukung dengan hasil histopatologi yang menunjukkan adanya kerusakan pada sel tubulus proksimal ginjal pada pemberian dosis tinggi.

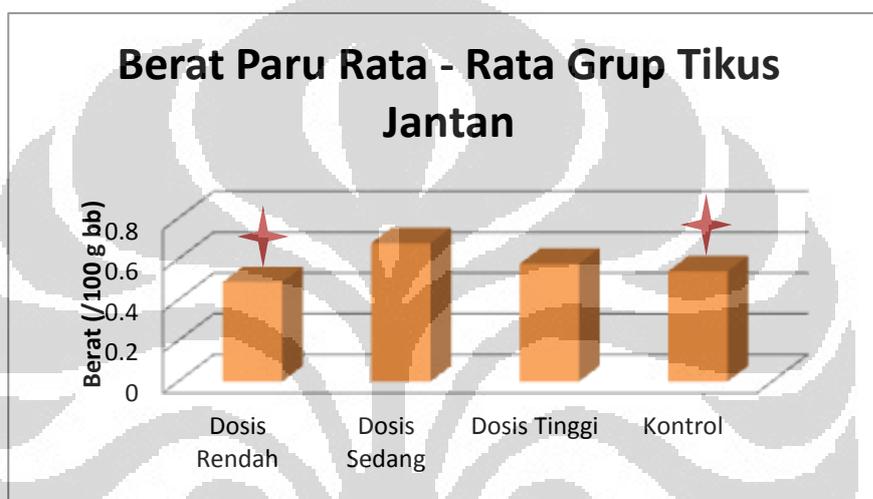
Hasil – hasil yang didapat sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Isbrucker et al pada tahun 2006 dan Lambert et al tahun 2007 menemukan bahwa polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT dapat menginduksi toksisitas

pada organ ginjal. Dikatakan bahwa kerusakan tersebut berhubungan dengan bioavailabilitas dari polifenol.^(51, 52)

4.2.4 Paru (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

Berat organ paru tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis sedang

Gambar 32. Diagram perbandingan Berat Paru Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

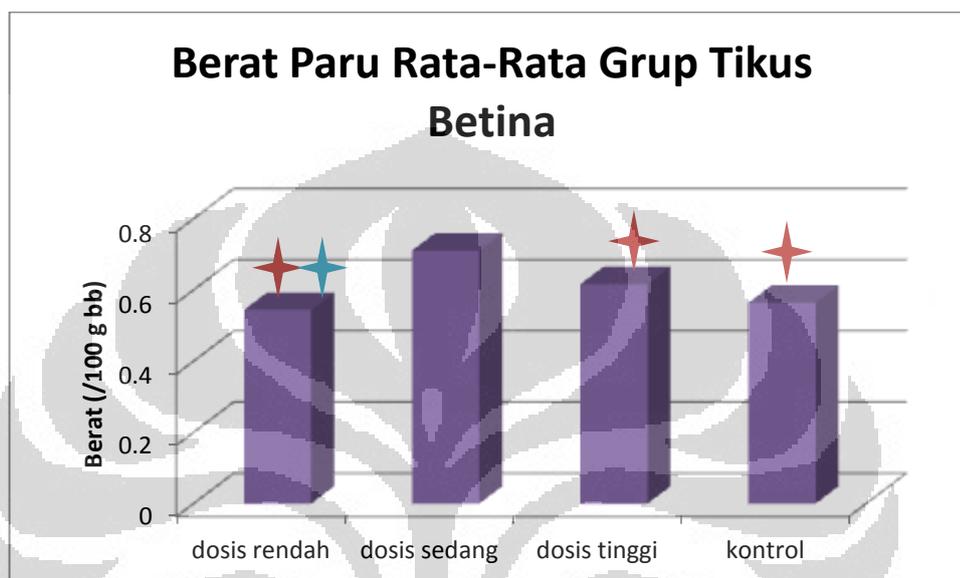
Dari diagram didapatkan bahwa berat organ paru tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.68g) dan paling rendah dari grup dosis rendah (0.49g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup dosis sedang dengan grup kontrol ($p = 0,038$) dan dosis rendah ($p = 0.005$)

Berdasarkan data tersebut maka dapat dikatakan bahwa dengan pemberian produk pangan BPTT dosis sedang dapat meningkatkan berat organ paru secara bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Betina

Berat paru tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p>0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p<0.05$) dengan grup dosis sedang

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p<0.05$) dengan grup dosis tinggi

Gambar 33. Diagram perbandingan Berat Paru Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ paru tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.71g) dan paling rendah dari grup dosis rendah (0.54g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p>0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p<0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup dosis sedang dengan grup kontrol ($p=0,000$), dosis rendah ($p=0.000$), dan dosis tinggi ($p=0.002$)
- grup dosis rendah dengan grup dosis tinggi ($p=0.013$)

Berdasarkan hasil tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis sedang akan meningkatkan berat organ paru secara signifikan dibandingkan dengan kontrol dan dosis lainnya. Selain itu didapatkan bahwa

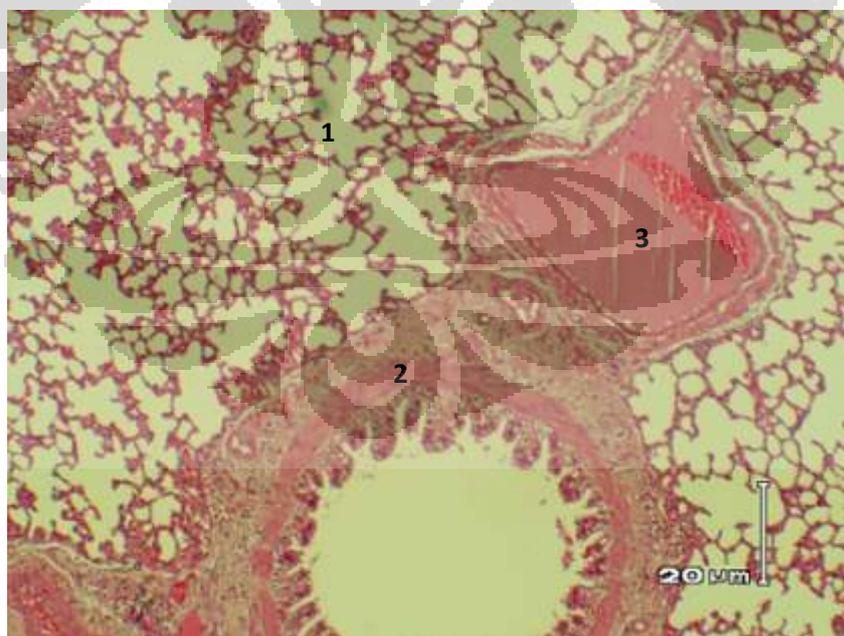
penambahan dosis produk pangan BPPT juga sebanding dengan penambahan berat organ paru secara bermakna.

Tabel 12. Histopatologi Organ Paru

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Paru-paru	TAKS	Fokal haemorrhagi Oedema ringan
II.	2 g/kg BB		TAKS	TAKS
III.	4 g/kg BB		TAKS	Infiltrasi sel mononuklear (limfosit) di sekitar broncheolus
IV.	Kontrol		TAKS	TAKS

Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Pemeriksaan histopatologi paru menunjukkan perbedaan yang signifikan antara efek produk pangan BPPT pada tikus jantan dan betina. Pada tikus jantan tidak ditemukan kelainan pada jaringan paru. Pada tikus betina didapatkan adanya kerusakan ringan pada dosis rendah berupa pendarahan fokal yang disertai edema ringan dan infiltrasi limfosit di sekitar bronkeolus pada dosis tinggi. Penemuan kelainan pada dosis rendah diduga merupakan suatu kebetulan karena sampel yang diambil hanya dari satu tikus sebagai perwakilan.



Gambar 34. Grup dosis 1 g/kg BB (no.2) betina – Paru-paru Oedema pulmonum. (1) alveolus. (2) broncheolus dengan dilatasi interstitialis. (3) cairan oedema. HE. 100x.

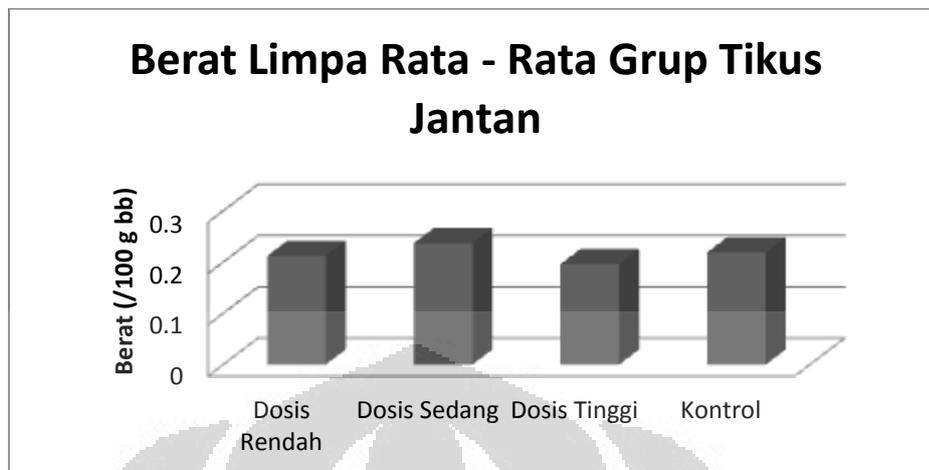
Berdasarkan penimbangan berat paru pada grup tikus jantan dan betina didapatkan peningkatan berat dengan pemberian produk pangan BPPT pada dosis sedang. Akan tetapi menurut penelitian yang dilakukan oleh Marice Sihombing dan Raflizar pada tikus putih didapatkan bahwa peningkatan berat organ paru pada tikus putih sesuai dengan bertambahnya umur hewan tersebut.⁽⁵³⁾ Selain itu penting diingat bahwa dalam produk pangan BPPT terdapat kandungan – kandungan lain berupa nutrisi dan non-nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak, abu, serat yang tidak dapat disingkarkan pengaruhnya terhadap peningkatan berat badan.⁽²⁶⁾ Sehingga penambahan berat badan ini bisa saja disebabkan oleh berbagai faktor lain tidak hanya oleh kandungan polifenol dalam produk pangan BPPT.

Penurunan berat paru pada dosis tinggi dibandingkan dosis sedang yang bermakna pada tikus betina sesuai dengan ditemukan adanya infiltrasi limfosit pada daerah bronkiolus. Hal tersebut dapat mengganggu oksigenasi dan aliran darah pada jaringan paru sehingga mengganggu proses penghantaran nutrisi dan penghasilan energi. Dosis polifenol (antioksidan) memiliki peran penting dalam pengaruhnya terhadap tubuh karena jumlah antioksidan yang berlebihan dapat mengganggu fungsi imun bahkan berpotensi menjadi prooksidan.⁽²⁶⁾ Pada penelitian ini dosis polifenol dalam produk pangan BPPT dosis tinggi telah menjadi prooksidan yang merusak jaringan paru.

4.2.5 Limpa (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

Berat organ limpa tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).

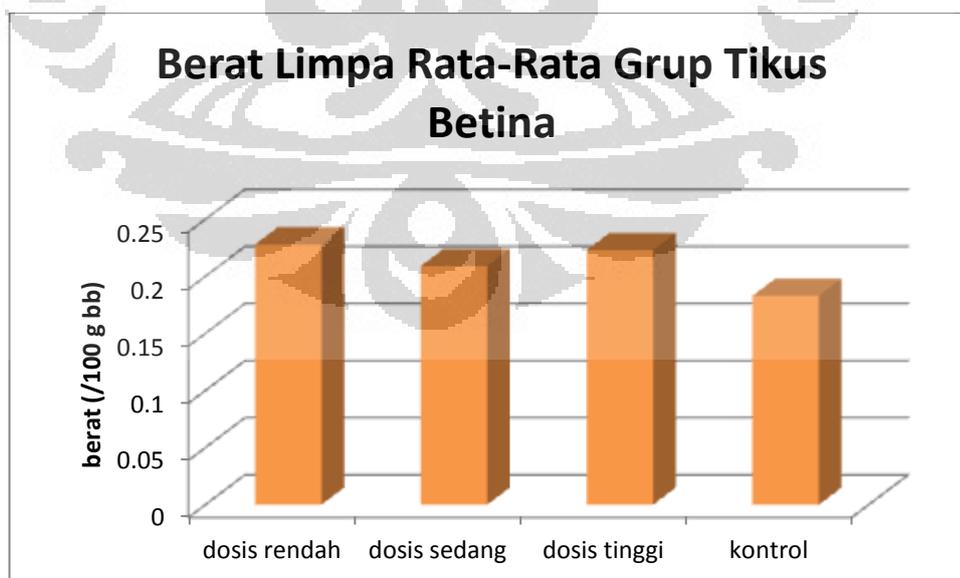


Gambar 35. Diagram perbandingan Berat Limpa Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ limpa tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.24g) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (0.20g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Betina

Berat organ limpa tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



Gambar 36. Diagram perbandingan Berat Limpa Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ limpa tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (0.23g) dan paling rendah dari grup dosis kontrol (0.18g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$)

Tabel 13. Histopatologi Organ Limpa

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Limpa	Pucat, deplesia pulpa merah dan akumulasi hemosiderin	Akumulasi hemosiderin
II.	2 g/kg BB		Akumulasi hemosiderin	TAKS
III.	4 g/kg BB		Akumulasi hemosiderin	Akumulasi hemosiderin
IV.	Kontrol		Akumulasi hemosiderin dan pucat	Akumulasi hemosiderin

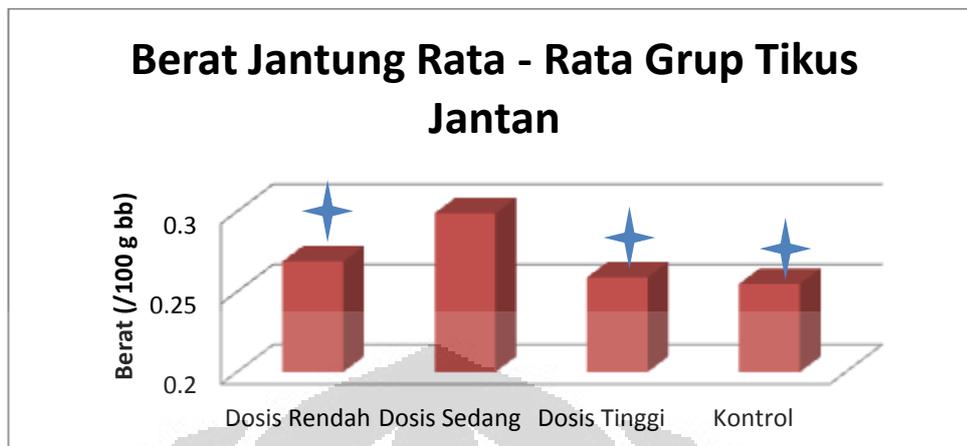
Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Pemeriksaan histopatologi pada limpa menunjukkan adanya akumulasi dari hemosiderin pada semua grup tikus jantan dan betina. Penumpukan hemosiderin ini merupakan hasil lisisnya sel eritrosit yang disimpan dalam limpa. Hal tersebut dikatakan merupakan kelainan degeneratif pada hewan yang berhubungan dengan usia.⁽⁵⁴⁾ Penimbangan berat limpa pada grup tikus jantan dan betina tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kontrol. Sehingga berdasarkan kedua pemeriksaan tersebut dapat disimpulkan produk pangan BPPT tidak memberi efek pada organ limpa.

4.2.6 Jantung (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

Berat organ jantung tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis sedang

Gambar 37. Diagram perbandingan Berat Jantung Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

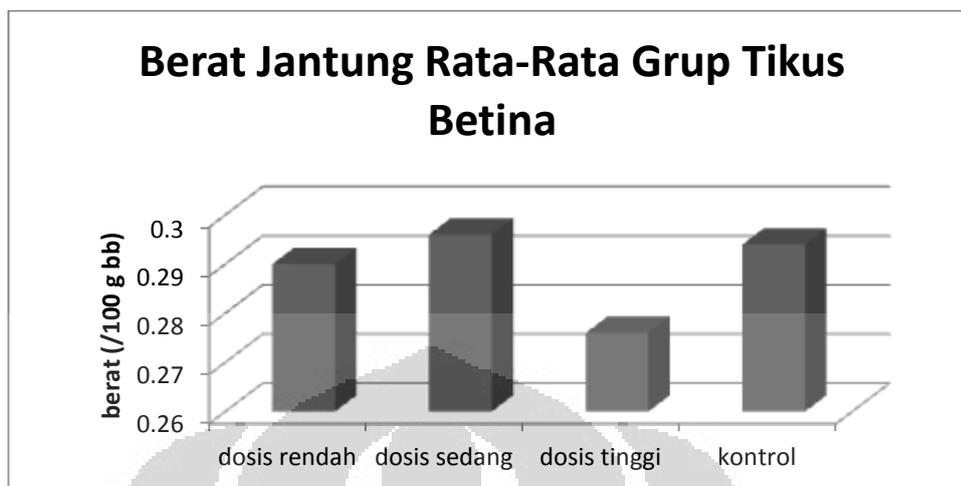
Dari diagram didapatkan bahwa berat organ jantung tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.30g) dan paling rendah dari grup kontrol (0.26g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup dosis sedang dengan grup kontrol ($p = 0.000$), dosis rendah ($p = 0.009$), dan dosis tinggi ($p = 0.001$)

Berdasarkan data tersebut maka dapat dikatakan bahwa dengan pemberian produk pangan BPTT dosis sedang dapat meningkatkan berat organ jantung secara bermakna dibandingkan dengan kontrol dan grup dosis lainnya.

Betina

Berat organ jantung tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



Gambar 38. Diagram perbandingan Berat Jantung Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ jantung tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang(0.30g) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (0.28g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$)

Tabel 14. Histopatologi Organ Jantung

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Jantung	Fokal nekrosis pada serabut otot	Degenerasi serabut otot
II.	2 g/kg BB		TAKS	TAKS
III.	4 g/kg BB		Fokal nekrosis serabut otot dan fragmentasi serabut otot	Nekrosis dan fragmentasi serabut otot, serta dilatasi jaringan interstitialis
IV.	Kontrol		TAKS	TAKS

Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Pemeriksaan histopatologi jantung menunjukkan adanya kelainan pada dosis rendah dan tinggi. Pada tikus jantan kelainan yang ditemukan pada dosis rendah lebih berat yaitu nekrosis fokal pada serabut otot sedangkan pada tikus betina kelainannya yaitu degenerasi serabut otot. Penemuan kelainan pada dosis rendah ini hanya berasal dari satu sampel tikus sehingga kelainan tersebut kurang menggambarkan kondisi tikus secara keseluruhan. Kelainan pada dosis tinggi sama untuk tikus jantan dan betina. Penelitian lain yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic

yang memberikan polifenol (bahan aktif dalam produk pangan BPPT) pada anjing menemukan adanya lesi fokus pada serabut otot jantung.⁽⁴³⁾

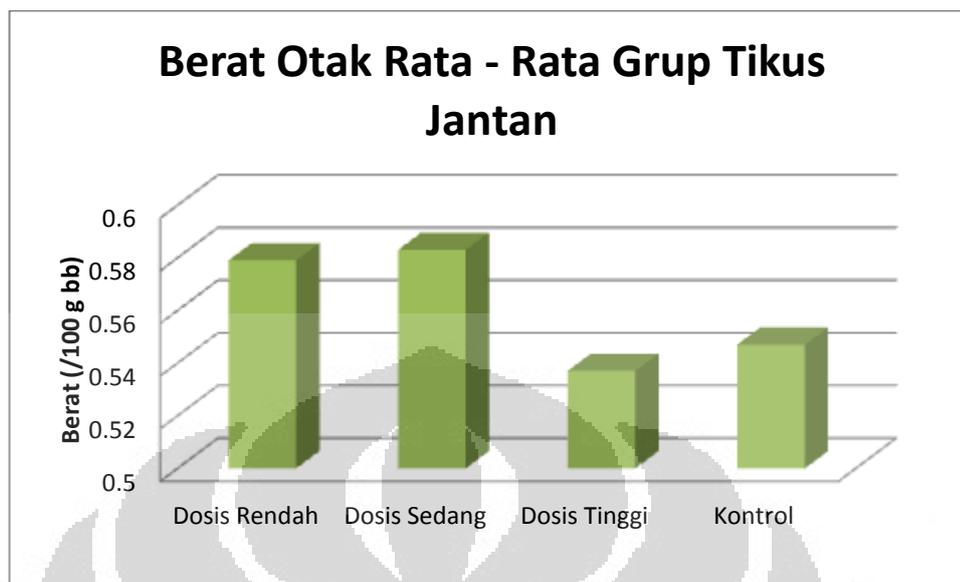
Hasil penimbangan berat jantung sesuai dengan hasil pemeriksaan histopatologi. Pada grup tikus jantan dosis sedang didapatkan berat paling tinggi bermakna dibandingkan grup lainnya yang didukung dengan hasil pemeriksaan histopatologi yaitu tidak ditemukannya kelainan. Pola tersebut didapatkan pula pada grup tikus betina walaupun berat jantung pada dosis sedang tidak berbeda bermakna dengan grup lainnya. Vita JA meneliti bahwa terdapat peningkatan fungsi endotel terhadap konsumsi polifenol dalam jangka pendek dan jangka panjang.⁽³²⁾ Penelitian lain yang dilakukan oleh Hogson et al mendapatkan bahwa dengan mengonsumsi polifenol dalam teh terjadi perbaikan bioaktivitas nitrit oksida (NO) pada otot polos pembuluh darah.⁽³⁰⁾ Hal – hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya dilatasi pembuluh darah yang meningkatkan aliran darah. Pada penelitian ini pada dosis sedang efek polifenol dalam produk pangan BPPT tersebut baru muncul.

Berat jantung terendah didapatkan pada grup dosis tinggi baik pada tikus jantan maupun betina mungkin disebabkan oleh adanya nekrosis dan fragmentasi dari serabut otot jantung. Kerusakan tersebut kemungkinan merupakan efek toksik dari polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT karena penelitian yang dilakukan oleh Sang et al pada tahun 2005 dan Lambert et al pada tahun 2007 mendapatkan bahwa polifenol dapat menjadi prooksidan yang menginduksi stress oksidatif secara *in vivo*.^(52, 55)

4.2.7 Otak (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

Berat organ otak tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).

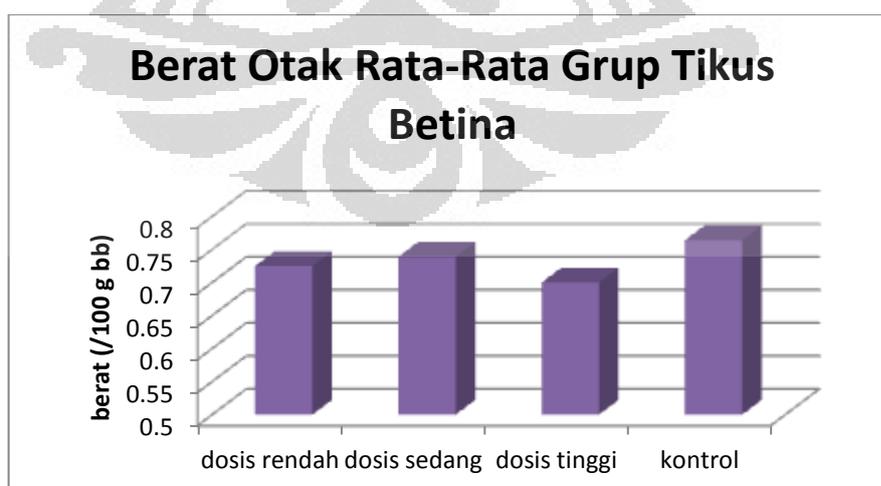


Gambar 39. Diagram perbandingan Berat Otak Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ otak tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (0.58g) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (0.54g). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Betina

Berat organ otak tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



Gambar 40. Diagram perbandingan Berat Otak Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ otak tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (0.76g) paling rendah dari grup tinggi (0.70g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$)

Tabel 15. Histopatologi Organ Otak

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Otak	TAKS	TAKS
II.	2 g/kg BB		TAKS	TAKS
III.	4 g/kg BB		Fokal haemorrhagi	Nekrosis yang bersifat lokal
IV.	Kontrol		TAKS	TAKS

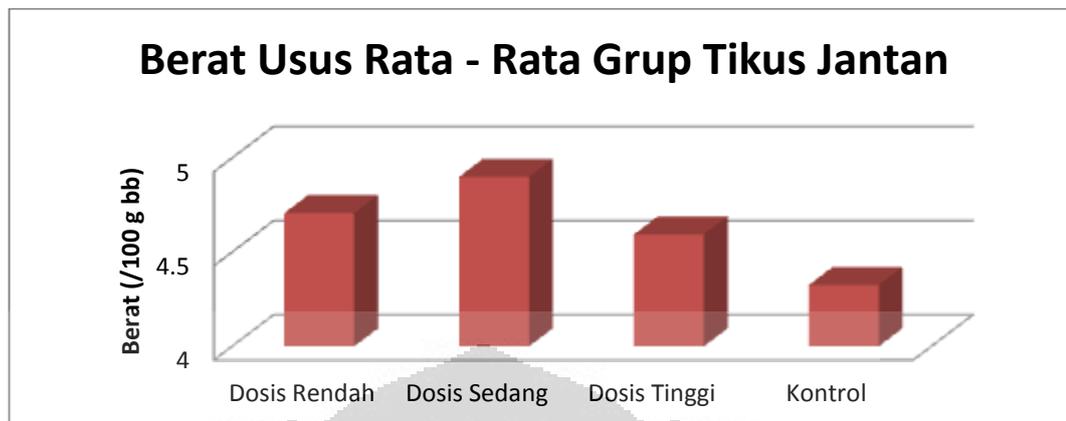
Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Berdasarkan pemeriksaan histopatologi didapatkan kelainan pada otak muncul pada grup dosis tinggi. Kelainan yang ditemukan pada tikus betina lebih berat dibandingkan tikus jantan. Pada tikus jantan didapatkan perdarahan fokal sedangkan pada tikus betina telah didapatkan nekrosis yang bersifat fokal. Pemeriksaan histopatologi tersebut mendukung hasil berat organ otak pada grup tikus jantan dan betina di mana pada dosis tinggi didapatkan pola penurunan berat dibanding grup lainnya walaupun tidak berbeda bermakna.

4.2.8 Usus (per 100 g BB hari ke 90)

Jantan

Berat usus tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).

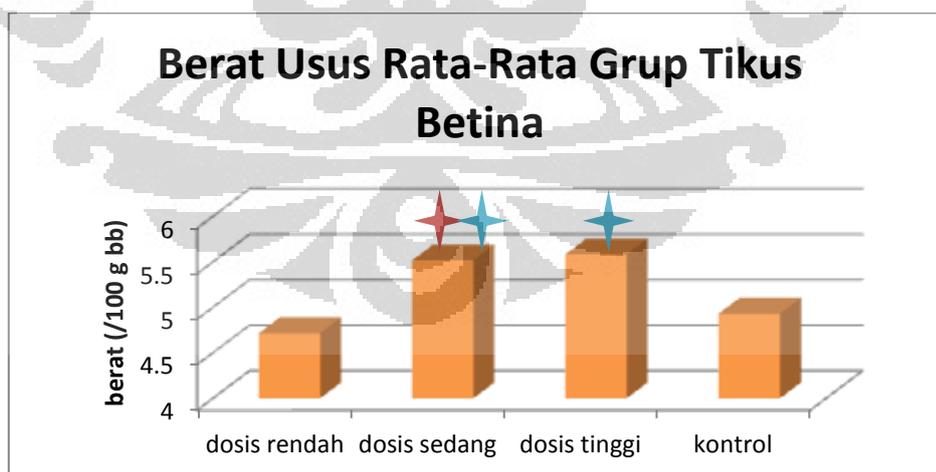


Gambar 41. Diagram perbandingan Berat Usus Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ usus tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (4.9g) dan paling rendah dari grup kontrol (4.3g). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p > 0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Betina

Berat organ usus tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis rendah

Gambar 42. Diagram perbandingan Berat Usus Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa berat organ usus tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang (5.6g) dan paling rendah dari grup dosis rendah (4.7g). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap berat usus. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis sedang ($p = 0.008$)
- grup dosis rendah dengan dosis sedang ($p = 0.007$) dan dosis tinggi ($p = 0.004$)

Berdasarkan hasil tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dari dosis sedang telah dapat meningkatkan berat organ usus secara bermakna dibandingkan kontrol. Penambahan dosis produk pangan BPPT sebanding dengan peningkatan berat organ usus secara signifikan.

Tabel 16. Histopatologi Organ Usus

Kel.	Dosis	Organ	Kelainan jaringan pada tikus	
			♂	♀
I.	1 g/kg BB	Usus	Nekrosis dan desquamasi sel epitel villi mukosa, infiltrasi sel plasma dan nekrosis tunika muskularis	Nekrosis dan desquamasi sel epitel villi mukosa, nekrosis tunika muskularis, dan infiltrasi sel neutrofil
II.	2 g/kg BB		Nekrosis & desquamasi villi mukosa, infiltrasi sel neutrofil dan limfosit dan nekrosis tunika muskularis	Nekrosis, vakuolisasi dan desquamasi sel epitel villi mukosa, infiltrasi sel limfosit neutrofil dan eosinofil, nekrosis tunika muskularis dan dilatasi submukosa
III.	4 g/kg BB		Nekrosis sel epitel villi mukosa, nekrosis tunika muskularis dan infiltrasi sel neutrofil	Nekrosis, vakuolisasi dan desquamasi sel epitel villi mukosa, infiltrasi eosinofil dan nekrosis tunika muskularis
IV.	Kontrol		Nekrosis, vakuolisasi & desquamasi sel epitel villi mukosa, nekrosis tunika muskularis	Nekrosis dan desquamasi sel epitel villi mukosa, infiltrasi sel neutrofil, nekrosis tunika muskularis

Catatan : TAKS = Tidak Ada Kelainan Spesifik

Pemeriksaan histopatologi usus menemukan adanya kelainan pada seluruh grup baik pada tikus jantan maupun betina. Kelainan yang dialami pun sama yaitu adanya nekrosis pada sel epitel vili dan tunika muskularis yang disertai dengan

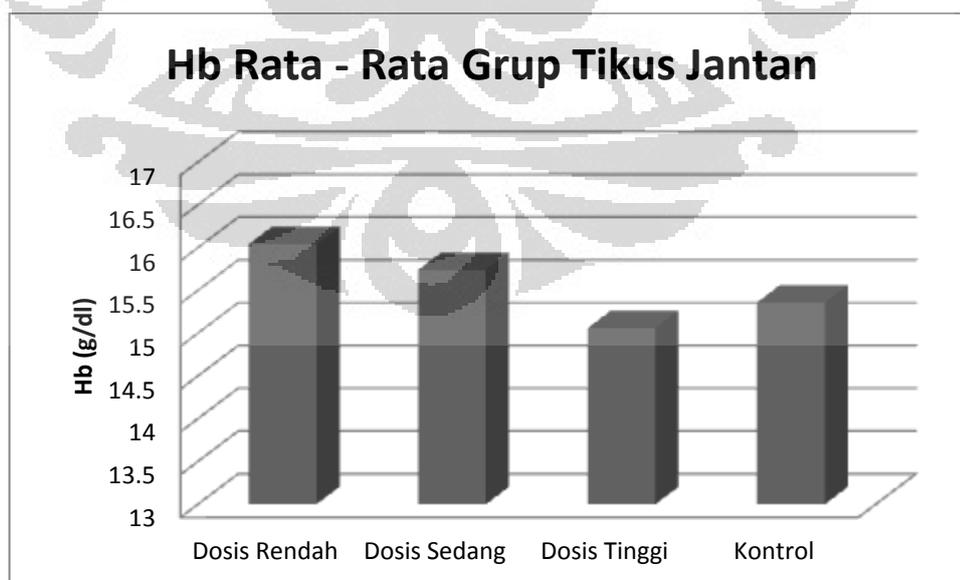
infiltrasi sel leukosit. Kelainan tersebut mengindikasikan adanya proses inflamasi yang terjadi yang tidak disebabkan oleh produk pangan BPPT.

Adanya nekrosis dan infiltrasi sel leukosit seperti neutrofil pada jaringan usus dapat disebabkan karena kondisi makanan, minuman, dan kadangan yang tidak bersih sehingga banyak mikroorganisme patogen yang masuk ke dalam saluran gastrointestinal dan menimbulkan inflamasi. Kerusakan pada jaringan usus tersebut dapat mempengaruhi kemampuan absorpsi nutrisi sehingga mempengaruhi berat. Penelitian yang dilakukan oleh Alvarez P menemukan bahwa polifenol yang dimetabolisme oleh mikroflora di dalam usus yang dapat memberikan proteksi imun dalam sistem gastrointestinal.⁽²⁶⁾ Penemuan tersebut sesuai dengan hasil yang didapat pada percobaan ini di mana berat usus dari grup tikus yang diberi produk pangan BPPT (mengandung polifenol) pada dosis sedang memiliki berat lebih tinggi secara bermakna dibandingkan grup kontrol baik pada tikus jantan maupun betina.

4.2.9 Hemoglobin (Hb)

Jantan

Hemoglobin tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).

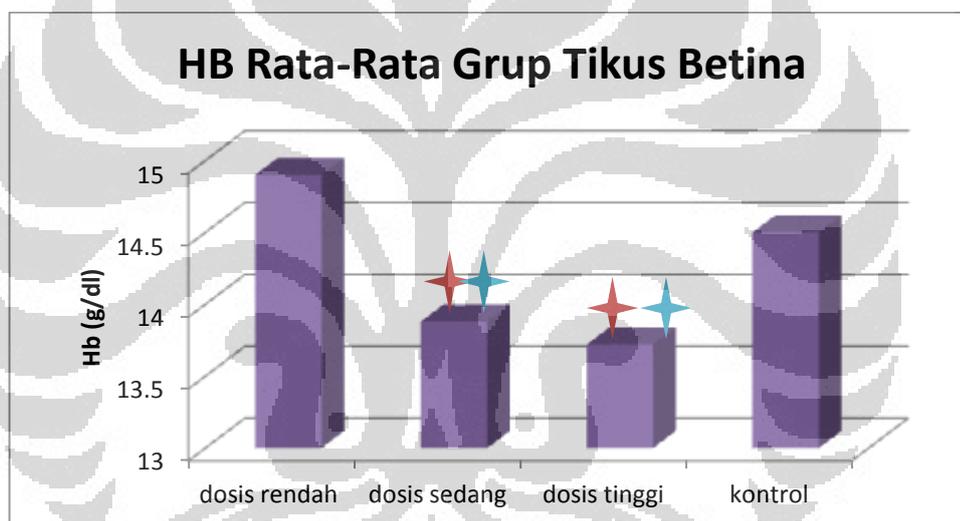


Gambar 43. Diagram perbandingan Hb Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata Hb tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (16,04 g/dl) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (15,06 g/dl). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p < 0.05$ sehingga dilakukan pengubahan data dengan bentuk transformasi berupa *square* (n^2). Dengan menggunakan uji *one way Anova* didapatkan perbedaan tidak bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Betina

Hemoglobin tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup kontrol ($p < 0.05$)

* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis rendah ($p < 0.05$)

Gambar 44. Diagram perbandingan Hb Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata Hb tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (14,90 U/L) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (13,72 U/L). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap Hb. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis sedang ($p = 0.044$) dosis tinggi ($p = 0.039$)
- grup dosis rendah dengan dosis sedang ($p = 0.004$) dan dosis tinggi ($p = 0.004$)

Berdasarkan pemeriksaan tersebut didapatkan pada grup tikus betina nilai Hb yang rendah secara bermakna pada grup dosis sedang dan tinggi dibandingkan grup kontrol.

Pemeriksaan Hb dengan metode Sahli didapatkan pola yang mirip antara tikus jantan dan betina yaitu adanya penurunan nilai Hb dari grup dosis rendah – dosis tinggi. Polifenol dalam produk pangan BPPT yang diberikan pada hewan percobaan secara oral akan memasuki traktus digestif menuju sistemik dan dapat mempengaruhi karakteristik hematologi. Perubahan ini dapat berupa penurunan kadar sel darah. Polifenol sama halnya dengan zat kimia lain dapat berpotensi toksik pada sel darah.^(56, 57) Pengukuran kadar hemoglobin (Hb) dan hematokrit (Ht) digunakan bersama untuk identifikasi adanya anemia. Idealnya untuk menilai anemia selain pengukuran kadar Hb dibutuhkan penilaian terhadap kapasitas oksigen, tapi pada praktiknya sulit menerapkan pemeriksaan ini dalam pemeriksaan darah rutin.⁽⁵⁸⁾

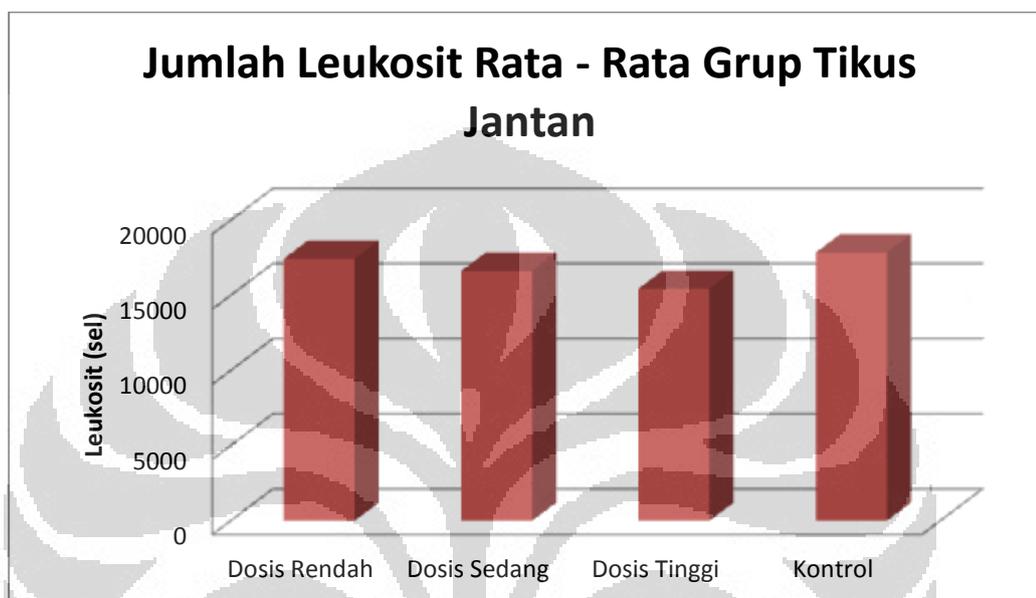
Besi merupakan zat yang dibutuhkan dalam pembentukan heme untuk menyusun hemoglobin. Gangguan dalam absorpsi besi yang disebabkan oleh polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT akan mengakibatkan kurangnya besi dalam peredaran darah sehingga menurunkan jumlah hemoglobin. Teori tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Gaffney S, et al yang mendapatkan bahwa absorpsi besi dipengaruhi secara signifikan oleh polifenol yang berikatan dengan besi sehingga mengurangi bioavailabilitasnya.⁽⁵⁹⁾

Ada beberapa hipotesis mekanisme polifenol dalam menurunkan Hb. Penelitian yang dilakukan oleh I.M Kapetanovic menemukan adanya anemia berdasarkan pemeriksaan hematologi (RBC, Hb, Ht rendah, retikulositosis) yang diduga disebabkan oleh *immune-mediated hemolysis*.⁽⁴³⁾ Penelitian lain yang dilakukan oleh Navarro-Peran et al pada tahun 2005 mendapatkan bahwa polifenol secara *in vitro* memiliki aktivitas antifolat yang dapat menyebabkan anemia.⁽⁶⁰⁾

4.2.10 Jumlah Leukosit

Jantan

Jumlah leukosit tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).

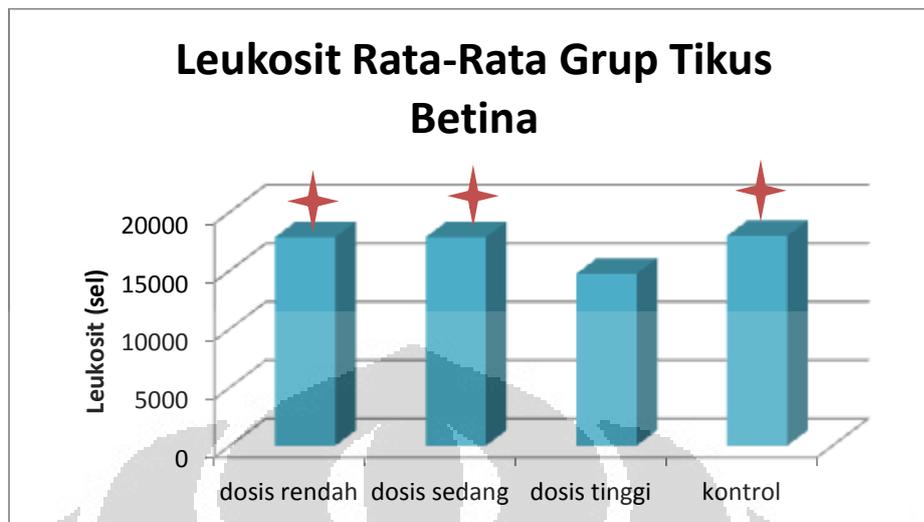


Gambar 45. Diagram perbandingan Jumlah Leukosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata jumlah leukosit tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (17860 sel) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (15450 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan tidak bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Betina

Jumlah leukosit tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p > 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis tinggi ($p < 0.05$)

Gambar 46. Diagram perbandingan Jumlah Leukosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata jumlah leukosit tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (17950 sel) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (14720 sel). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p < 0.05$ sehingga dilakukan pengubahan data dengan bentuk transformasi berupa *square* ($n \times n$). Dengan menggunakan uji *one way Anova* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$) sehingga dilakukan analisis *Post Hoc LSD*. Didapatkan perbedaan yang bermakna antara :

- grup dosis tinggi dengan kontrol ($p = 0.000$), dosis rendah ($p = 0.000$), dan dosis sedang ($p = 0.000$)

Berdasarkan hasil didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi terdapat penurunan jumlah leukosit yang bermakna dibandingkan dengan kontrol dan grup dosis lainnya.

Pemeriksaan jumlah total leukosit dalam darah pada grup tikus jantan dan betina memberikan pola yang sama yaitu adanya kecenderungan penurunan jumlah seiring bertambahnya dosis produk pangan BPPT. Pada tikus jantan penurunan tersebut tidak bermakna sedangkan pada tikus betina bermakna. Hal tersebut sejalan dengan kemampuan polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT sebagai imunomodulator. Polifenol mampu menginhibisi proliferasi limfosit, mononukleosit perifer, produksi Ig, interleukin-2 (IL-2), dan produksi dari Reactive Oxygen Species

(ROS) oleh granulosit dan limfosit aktif.^(31, 32) Potensi – potensi tersebut membuat polifenol digunakan sebagai materi anti-inflamasi.^(29, 31, 32)

4.2.11 Hitung Jenis Leukosit

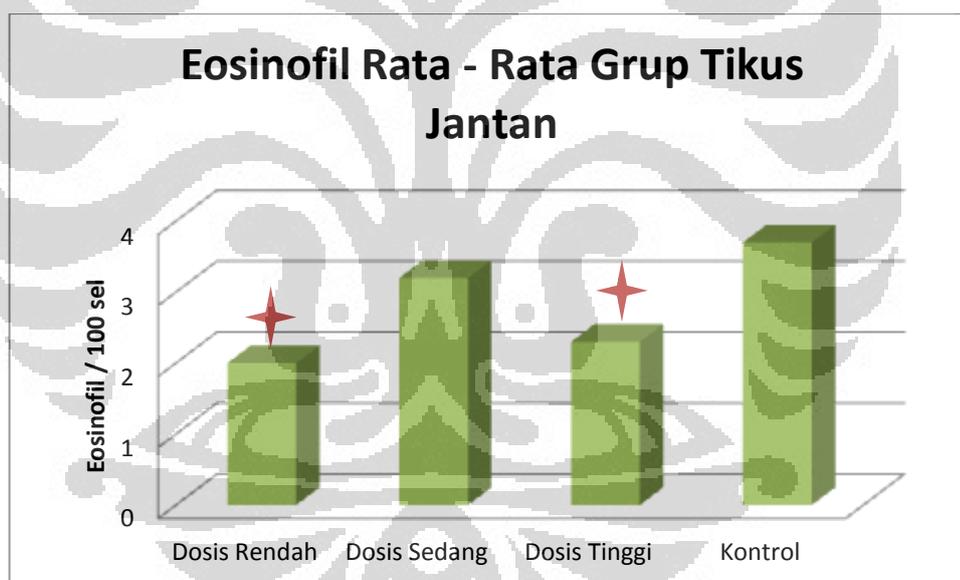
Basofil

Basofil tikus jantan dan tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang konstan untuk setiap grup yaitu 0.

Eosinofil

Jantan

Eosinofil tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

Gambar 47. Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

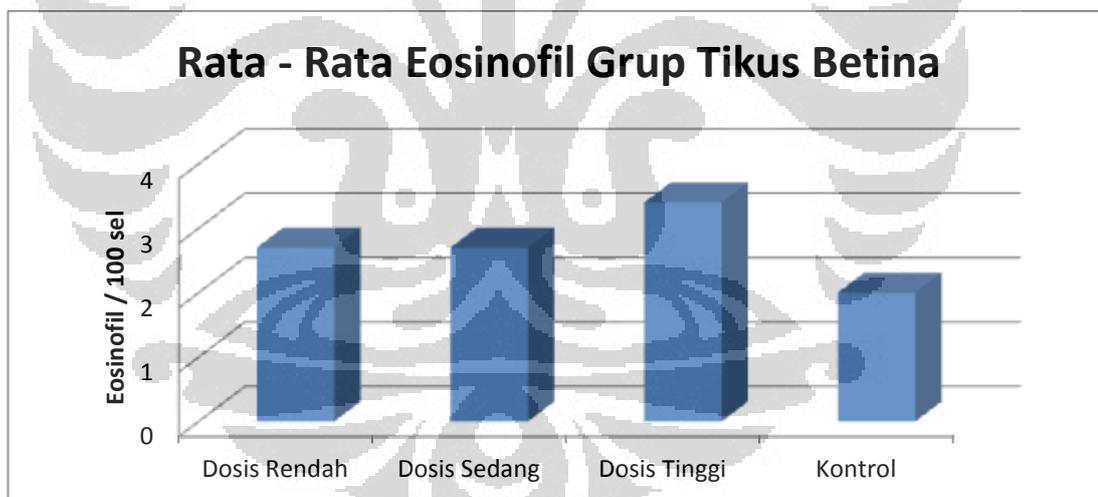
Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata eosinofil tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (4 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup dosis rendah (2 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap jumlah eosinofil. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup kontrol dengan grup dosis rendah ($p= 0.006$) dan grup dosis tinggi ($p=0.017$)

Berdasarkan data tersebut didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPTT terdapat penurunan jumlah eosinofil secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Eosinofil merupakan penanda adanya suatu reaksi inflamasi dalam tubuh yang umumnya akibat alergi atau infeksi parasit. Jika nilainya rendah di luar karena kurangnya ketelitian pemeriksaan manual oleh manusia kondisi tersebut menunjukkan kondisi tubuh dari tikus jantan sehat.⁽⁶¹⁾ Polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT dapat berperan dalam proses tersebut dengan sifatnya sebagai imunoinhibitor sehingga menimbulkan efek anti-inflamasi.⁽³¹⁾

Betina

Eosinofil tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p<0.05$).



Gambar 48.Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata eosinofil tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (3 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup kontrol (2 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan tidak bermakna antar grup ($p>0.05$).

Pada percobaan kali memang tidak didapatkan peningkatan jumlah eosinofil secara bermakna pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT dibandingkan kontrol akan tetapi dari grafik dapat dilihat adanya pola peningkatan sesuai

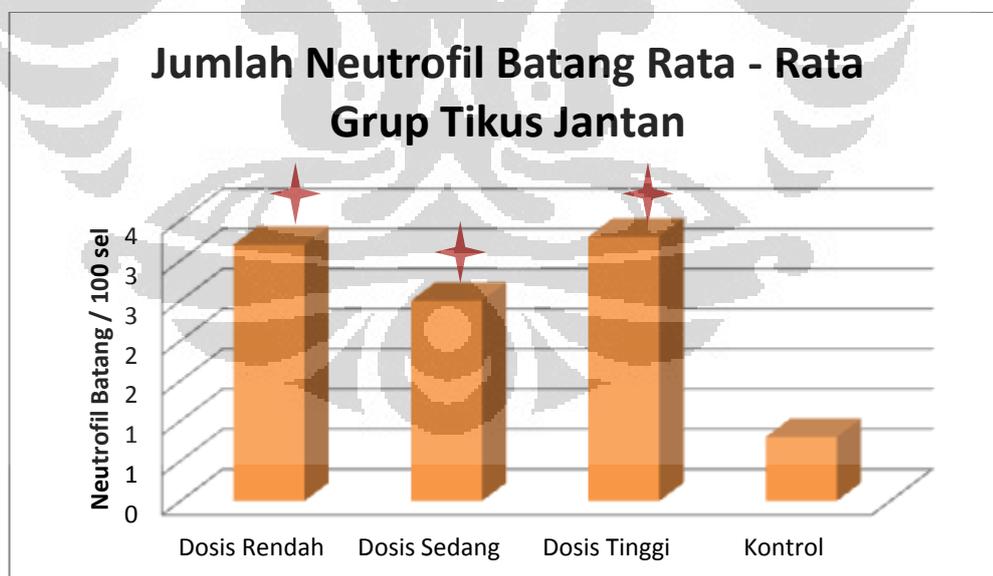
peningkatan dosis. Pola tersebut diduga disebabkan oleh polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT karena menurut penelitian yang dilakukan oleh Shirai et al pada tahun 1997 dan 2003, terbukti bahwa polifenol dalam teh hijau dapat menginduksi pelepasan histamin. Histamin tersebut dapat merekrut eosinofil sehingga hasilnya meningkat.^(62, 63)

Pemeriksaan hitung jenis eosinofil menunjukkan hasil yang berbeda antara grup tikus jantan dan betina. Pada grup tikus jantan didapatkan jumlah eosinofil yang rendah dibandingkan kontrol sedangkan grup tikus betina didapatkan jumlah eosinofil yang tinggi dibandingkan kontrol. Perbedaan efek polifenol yang ditimbulkan adalah pada tikus jantan sebagai anti-inflamasi sedangkan pada tikus betina pro-inflamasi (reaksi hipersensitivitas).

Neutrofil Batang

Jantan

Neutrofil batang tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

Gambar 49. Diagram perbandingan Neutrofil Batang Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata neutrofil batang tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (3 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup

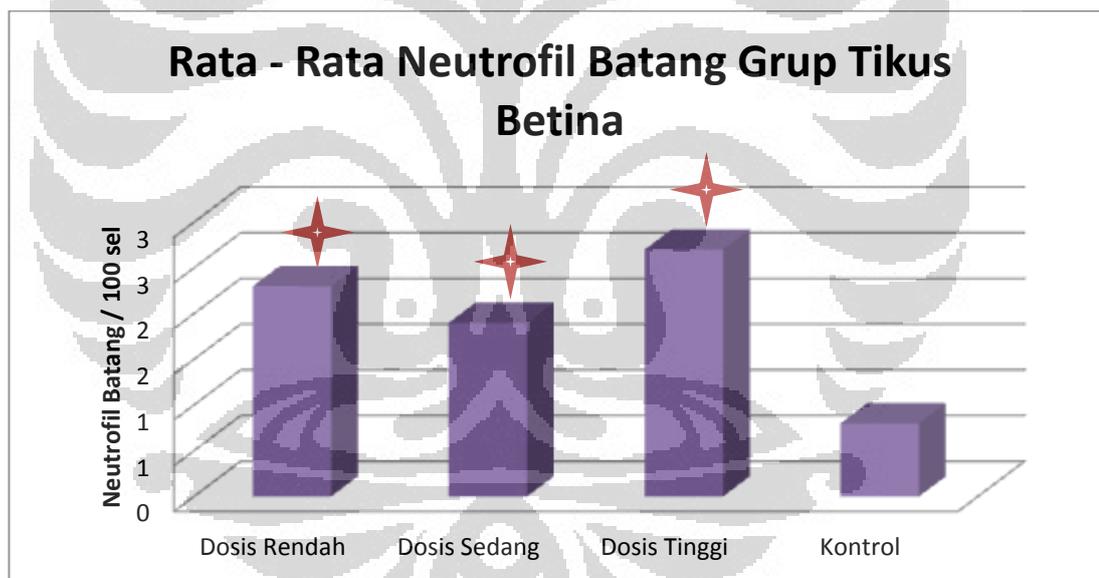
kontrol (1 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap jumlah neutrofil batang. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup kontrol dengan grup dosis rendah ($p = 0.001$), grup dosis sedang ($p = 0.013$), dan grup dosis tinggi ($p = 0.000$)

Dengan demikian didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dapat meningkatkan jumlah neutrofil batang secara bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Betina

Neutrofil batang tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup kontrol ($p < 0.05$)

Gambar 50. Diagram perbandingan Eosinofil Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata eosinofil tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (3 se/100 sel) dan paling rendah dari grup kontrol (1 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji statistik dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh pada neutrofil batang. Didapatkan hasil berbeda bermakna antara :

- grup kontrol dengan dosis rendah ($p=0.023$), dosis sedang ($p=0.016$), dan dosis tinggi ($p=0.003$)

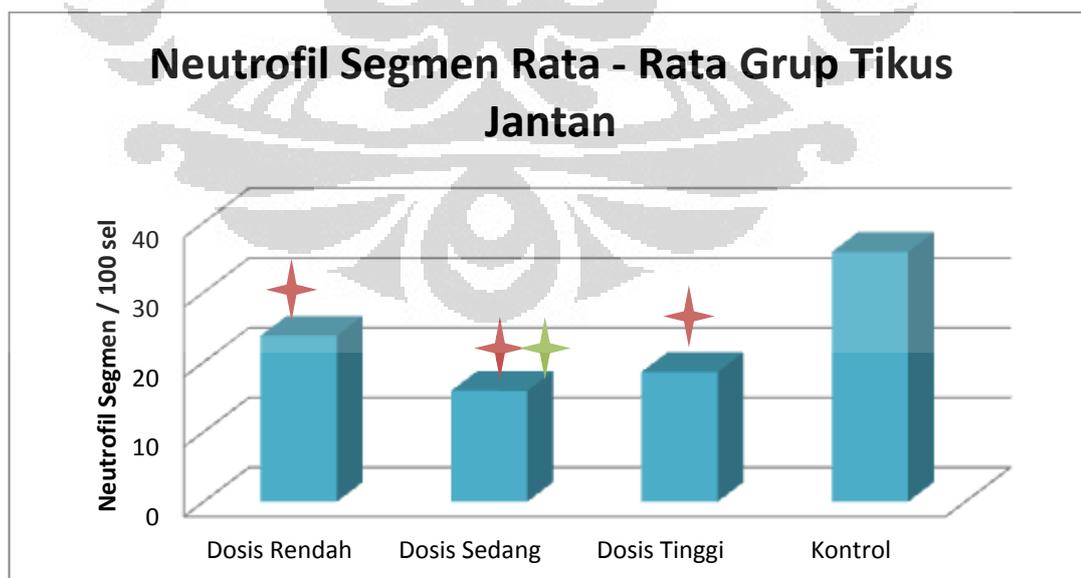
Sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT terdapat peningkatan jumlah neutrofil batang yang bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Pemeriksaan hitung jenis neutrofil batang pada tikus jantan dan betina menunjukkan pola yang sama yaitu jumlah neutrofil batang pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT lebih banyak secara bermakna dibandingkan kontrol. Penelitian lain yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic et al mendapatkan pula peningkatan jumlah neutrofil dalam pemeriksaan hematologi. Selain itu ditemukannya pergeseran ke kiri (lebih banyak sel darah putih yang imatur). Dikatakan bahwa kedua hal tersebut berhubungan dengan adanya reaksi inflamasi dan nekrosis pada jaringan organ – organ serta efek polifenol terhadap eritropoesis.⁽⁴³⁾

Neutrofil Segmen

Jantan

Neutrofil segmen tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p<0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p<0.05$) dengan grup kontrol

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p<0.05$) dengan grup dosis rendah

Gambar 51. Diagram perbandingan Neutrofil Segmen Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

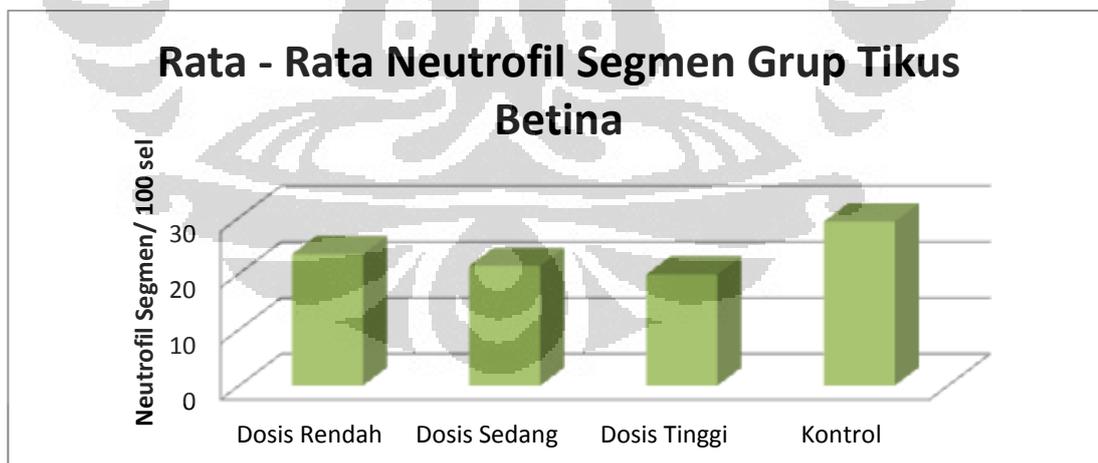
Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata neutrofil segmen tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (36 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup dosis sedang (16 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post HocMann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap jumlahneutrofil segmen.Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- grup kontrol dengan grup dosis rendah ($p = 0.001$), grup dosis sedang ($p = 0.000$), dan grup dosis tinggi ($p = 0.001$)
- grup dosis rendah dengan grup dosis sedang ($p = 0.034$)

Dengan demikian didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dapat menurunkan jumlah neutrofil segmen secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Selain itu dengan penambahan dosis dari dosis rendah menjadi dosis sedang didapatkan penurunan jumlah neutrophil segmen yang bermakna.

Betina

Neutrofil segmen tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



Gambar 52.Diagram perbandingan Neutrofil Segmen Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata neutrofil segmen tertinggi didapatkan dari grup tikus kontrol (29 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup tikus dosis tinggi (20 sel/100 sel).Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan tidak bermakna antar grup ($p > 0.05$).

Berdasarkan uji statistik penurunan jumlah neutrofil segmen grup tikus yang diberi produk pangan BPPT dibanding grup kontrol memang tidak bermakna.

Pemeriksaan hitung jenis neutrofil segmen menunjukkan pola yang mirip antara tikus jantan dan betina yaitu adanya penurunan jumlah neutrofil segmen pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT dibandingkan kontrol. Penurunan tersebut sejalan dengan teori bahwa polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT dapat menyebabkan pergeseran ke kiri (lebih banyak sel darah putih yang imatur) pada sel leukosit akibat adanya proses inflamasi serta efek dari polifenol terhadap eritropoesis.⁽⁴³⁾

Limfosit

Jantan

Limfosit tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

Gambar 53. Diagram perbandingan Limfosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata limfosit tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis sedang dan tinggi (71 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup kontrol (55 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan dengan analisi *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap jumlah limfosit. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis rendah ($p=0.013$), grup dosis sedang ($p=0.001$), dan grup dosis tinggi ($p=0.001$)

Dengan demikian didapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dapat meningkatkan jumlah limfosit secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. I.M. Kapetanovic pada penelitiannya mendapatkan peningkatan limfosit yang berhubungan dengan adanya reaksi inflamasi dan nekrosis pada jaringan organ – organ.⁽⁴³⁾ Selain reaksi inflamasi dan nekrosis penyebab lain tingginya jumlah limfosit adalah adanya infeksi.⁽⁶⁴⁾ Infeksi yang terjadi dapat dipicu melalui kondisi lingkungan kadang, makanan, dan minuman yang tidak bersih.

Betina

Limfosit tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p>0.05$).



Gambar 54. Diagram perbandingan Limfosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

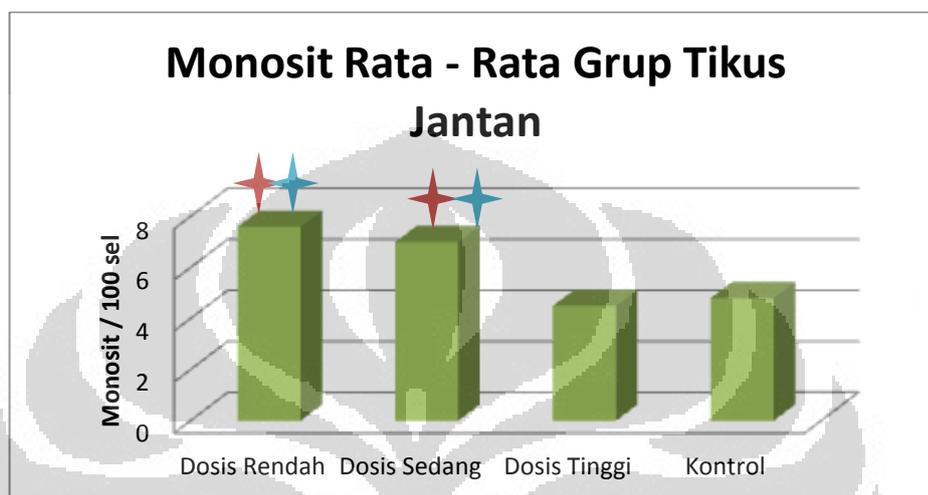
Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata neutrofil segmen tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis tinggi (69 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup tikus kontrol (64 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik didapat *Test of Homogeneity of Variances* $p>0.05$ sehingga dapat menggunakan uji *one way Anova* yang hasilnya tidak didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p>0.05$).

Nampak perbedaan hasil hitung jenis limfosit antara tikus jantan dan betina di mana pada tikus jantan di dapatkan peningkatan jumlah limfosit secara bermakna dibandingkan kontrol sedangkan tikus betina tidak.

Monosit

Jantan

Monosit tikus jantan dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup kontrol

* Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$) dengan grup dosis tinggi

Gambar 55. Diagram perbandingan Monosit Rata – Rata antar Grup Tikus Jantan

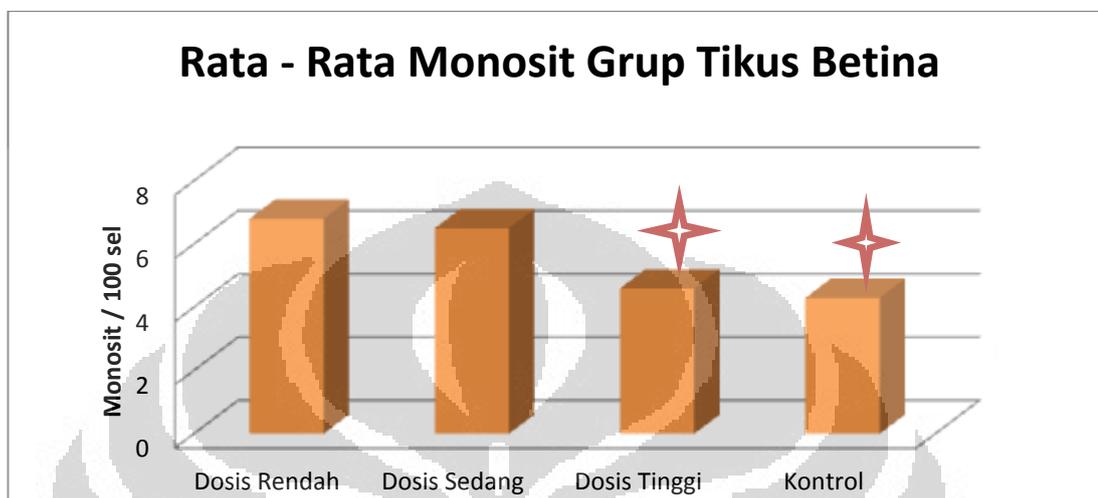
Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata monosit tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (8 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup dosis tinggi (5 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh terhadap jumlah monosit. Didapatkan perbedaan bermakna antara :

- kontrol dengan grup dosis rendah ($p = 0.047$) dan grup dosis sedang ($p = 0.020$)
- grup dosis tinggi dengan grup dosis rendah ($p = 0.038$) dan grup dosis sedang ($p = 0.013$)

Dengan demikian didapatkan bahwa pemberian produk pangan BPPT dengan dosis rendah dan sedang dapat meningkatkan jumlah monosit secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Selain itu dengan pemberian dosis tinggi justru akan menurunkan jumlah monosit secara signifikan dibandingkan dengan dosis rendah dan sedang.

Betina

Monosit tikus betina dari masing – masing grup memiliki distribusi data yang tidak normal berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* ($p < 0.05$).



* Didapatkan perbedaan bermakna dengan grup dosis rendah ($p < 0.05$)

Gambar 56. Diagram perbandingan Monosit Rata – Rata antar Grup Tikus Betina

Dari diagram didapatkan bahwa rata – rata neutrofil segmen tertinggi didapatkan dari grup tikus dosis rendah (7 sel/100 sel) dan paling rendah dari grup tikus kontrol (4 sel/100 sel). Dengan perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan bermakna antar grup ($p < 0.05$). Uji statistik dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Mann-Whitney* dicari grup mana yang paling memberikan pengaruh pada monosit. Didapatkan hasil berbeda bermakna antara :

- grup dosis rendah dengan grup kontrol ($p = 0.008$) dan grup dosis tinggi ($p = 0.009$)

Berdasarkan data tersebut nampak bahwa dengan pemberian produk pangan BPPT dosis rendah pada tikus grup betina memberikan peningkatan jumlah monosit yang bermakna dibandingkan dengan kontrol. Seiring bertambahnya dosis didapatkan penurunan jumlah monosit yang bermakna dari dosis rendah ke dosis tinggi.

Pemeriksaan hitung jenis monosit pada tikus jantan dan betina menunjukkan pola yang sama yaitu adanya penurunan jumlah monosit dari dosis rendah – tinggi dan dibandingkan dengan kontrol secara bermakna. Pola penurunan tersebut diduga

disebabkan oleh polifenol dalam produk pangan BPPT. Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Vinardell MP dan Vita JA mengenai efek imunomodulatori dari polifenol. Polifenol memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel mononukleosit perifer sehingga jumlahnya menurun.^(31, 32)

Sebaliknya menurut penelitian yang dilakukan oleh I.M. Kapetanovic justru didapatkan peningkatan jumlah monosit dalam pemberian polifenol yang berhubungan dengan adanya reaksi inflamasi dan nekrosis pada jaringan organ – organ.⁽⁴³⁾ Pada percobaan kali ini peningkatan ada pada dosis rendah dengan diduga bahwa pada dosis tersebut kemampuan inhibisi proliferasi monosit polifenol belum tercapai. Seiring dengan penambahan dosis kemampuan inhibisi polifenol meningkat sehingga walaupun terdapat inflamasi jumlah monosit tetap rendah.

4.3 Keseluruhan Hasil pada Organ dan Darah

Setelah dilakukan penelitian uji toksitas akut selama 14 hari pada 5 sampel tikus jantan didapatkan $LD_{50} > 9\text{g/kg BB}$. Berdasarkan nilai tersebut dilakukan uji toksitas subkronik pada tikus jantan dan tikus betina dengan membagi grup menjadi 3 dosis yaitu 1 g/kg BB, 2g/kg BB, dan 4g/kg BB. Ketiga grup tersebut dibandingkan dengan grup kontrol. Setiap grup diwakili oleh 10 tikus jantan dan 10 tikus betina.

Hasil penimbangan berat badan selama 90 hari menunjukkan adanya perbedaan efek produk pangan BPPT terhadap tikus jantan dan betina. Pada tikus jantan berat badan tikus yang diberikan produk pangan BPPT pada dosis rendah dan sedang lebih ringan dibandingkan kontrol sedangkan pada grup tikus betina terjadi sebaliknya.

Penurunan berat badan pada tikus jantan diduga disebabkan oleh kandungan polifenol dalam produk pangan BPPT yang menimbulkan adanya gangguan absorpsi serta pencernaan glukosa dalam tubuh. Hal tersebut menyebabkan tubuh kekurangan nutrisi sehingga mengganggu pertumbuhan berupa penurunan berat badan.

Berat badan tikus betina yang diberikan produk pangan BPPT dosis sedang dan tinggi lebih berat dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan tersebut diduga karena pengaruh dosis polifenol dalam produk pangan BPPT yang telah menjadi

prooksidan. Menurut penelitian yang dilakukan R Scott Rector et al dan Poonam C.Mittal prooksidan terbukti dapat memicu peningkatan berat badan.^(44, 45)

Selain itu penting diingat bahwa dalam produk pangan BPPT terdapat kandungan – kandungan lain seperti protein, karbohidrat, lemak, abu, serat yang tidak dapat disingkirkan pengaruhnya terhadap peningkatan berat badan.⁽²⁶⁾

Penilaian kedua terhadap efek produk pangan BPPT dilakukan dengan mengukur berat, mengukur fungsi, dan menilai histopatologi organ – organ tubuh.

Hati merupakan organ yang penting dalam menilai toksisitas suatu zat karena pada organ tersebut merupakan tempat proses metabolisme dan entoksikasi racun yang masuk dalam tubuh.⁽¹⁵⁾ Penimbangan berat hati tikus jantan tidak menunjukkan adanya perbedaan nilai yang bermakna antara tikus yang diberi produk pangan BPPT dengan kontrol. Sedangkan pada tikus betina yang diberikan produk pangan BPPT dosis sedang dan tinggi didapatkan peningkatan berat hati secara bermakna.

Menurut Noer (1996), aktivitas enzim SGPT dan SGOT dipilih sebagai tolak ukur kemungkinan terjadinya kelainan hati karena peningkatan aktivitas enzim-enzim tersebut merupakan indikator yang kuat dan peka terhadap adanya kelainan sel-sel hati.⁽⁶⁵⁾ Pada pemeriksaan fungsi hati SGOT pada grup tikus jantan tidak ditemukan adanya pengaruh pemberian produk pangan BPPT sedangkan pada grup tikus betina didapatkan peningkatan bermakna nilai SGOT grup dosis sedang dibanding kontrol. Peningkatan SGOT tersebut menunjukkan indikasi terganggunya fungsi hati secara akut yang diduga disebabkan oleh polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT.

Kerusakan pada organ hati tidak ditemukan pada tikus jantan karena dosis tertinggi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis $\frac{1}{2}$ dari LD₅₀ semu sehingga masih dalam batas dosis cukup aman. Selain dosis, hal yang mempengaruhi efeknya terhadap tubuh adalah ukuran, polaritas, dan solubilitas kandungan polifenol dalam produk pangan.⁽²⁶⁾ Faktor perbedaan jenis kelamin diduga memberikan kontribusi terhadap perbedaan tersebut.

Efek produk pangan BPPT pada fungsi hati didukung melalui penemuan secara histopatologi yaitu mulai ditemukan kerusakan sel hati baik pada grup jantan maupun betina dengan pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi. Peningkatan SGOT pada

tikus betina grup dosis sedang mulai menandakan adanya gangguan pada sel hati tetapi belum menimbulkan kerusakan pada sel hati tikus. Sehingga dapat disimpulkan bahwa efek produk pangan BPPT mulai memberikan pengaruh toksik pada dosis sedang kepada organ hati.

Organ lain yang dinilai adalah ginjal. Penimbangan berat ginjal pada tikus jantan dan betina tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar grup. Fungsi ginjal yang dinilai adalah kreatinin dan ureum (BUN). Pada pemeriksaan kreatinin didapatkan nilai kreatinin yang tinggi bermakna dibandingkan kontrol pada tikus betina grup dosis tinggi. Peningkatan kadar kreatinin bermakna tersebut menunjukkan penurunan fungsi ginjal sekitar 50 – 70 %.^(47, 48) Pada tikus jantan grup dosis sedang didapatkan nilai kreatinin yang rendah bermakna dibandingkan kontrol. Hal tersebut juga ditemukan pada tikus betina grup dosis rendah.

Kemampuan produk pangan BPPT dalam menurunkan nilai SGPT dan kreatinin memunculkan dugaan bahwa produk pangan BPPT pada dosis rendah mampu memperbaiki fungsi organ hati dan ginjal. Hal tersebut didukung dengan fakta bahwa polifenol yang terkandung dalam bahan pangan BPPT merupakan zat fitokimia yang bersifat antioksidan sehingga dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif.^(25, 26)

Kenaikan nilai kreatinin pada tikus betina grup dosis tinggi sesuai dengan pemeriksaan histopatologi yang menunjukkan mulai ditemukan kerusakan berupa nekrosis tubulus proksimal pada grup tikus dosis tinggi. Kelainan yang dialami tikus jantan lebih ringan dari pada tikus betina yaitu berupa degenerasi dari tubulus proksimal. Nilai kreatinin pada tikus jantan grup dosis tinggi tidak tinggi bermakna diduga karena kerusakan jaringan ginjal yang terjadi tidak parah.

Pemeriksaan ureum yang didapat tidak cukup bermakna dan sensitif karena konsentrasi urea dalam serum tidak hanya dipengaruhi oleh fungsi ginjal tetapi juga oleh beberapa faktor lainnya seperti protein *intake* tiap individu, jumlah urea yang direabsorpsi di tubulus proksimal yang dipengaruhi volume vaskular yang efektif serta kecepatan aliran urin.^(16, 17)

Penimbangan berat paru pada grup tikus jantan dan betina mendapatkan peningkatan berat pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT dosis sedang.

Penurunan berat paru pada dosis tinggi dibandingkan dosis sedang yang bermakna pada tikus betina sesuai dengan ditemukan adanya infiltrasi limfosit pada daerah bronkiolus. Kelainan itu dapat mengganggu oksigenasi dan aliran darah pada jaringan paru sehingga mengganggu proses penghantaran nutrisi dan penghasilan energi.

Penimbangan berat limpa pada grup tikus jantan dan betina tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kontrol. Pemeriksaan histopatologi pada limpa menunjukkan adanya akumulasi dari hemosiderin pada semua grup tikus jantan dan betina. Penumpukan hemosiderin ini merupakan hasil lisisnya sel eritrosit yang disimpan dalam limpa. Hal tersebut dikatakan merupakan kelainan degeneratif pada hewan yang berhubungan dengan usia.⁽⁵⁴⁾ Sehingga berdasarkan kedua pemeriksaan tersebut dapat disimpulkan produk pangan BPPT tidak memberi efek pada organ limpa.

Hasil penimbangan berat jantung sesuai dengan hasil pemeriksaan histopatologi. Pada tikus jantan grup dosis sedang didapatkan berat paling tinggi bermakna dibandingkan grup lainnya. Pengukuran ini didukung dengan hasil pemeriksaan histopatologi yang tidak menemukan adanya kelainan spesifik. Pola tersebut didapatkan pula pada tikus betina walaupun berat badan pada grup dosis sedang tidak berbeda bermakna dengan grup lainnya. Pada penelitian ini diduga pada dosis sedang efek polifenol dalam bahan BPPT muncul sebagai antioksidan yang dapat memperbaiki aliran darah menuju organ. Grup dosis tinggi memiliki berat badan paling rendah. Selain itu ditemukan pula adanya nekrosis dan fragmentasi dari serabut otot jantung pada pemeriksaan histopatologi. Kerusakan tersebut diduga disebabkan oleh efek toksik polifenol yang telah menjadi prooksidan pada pemberian produk pangan BPPT dosis tinggi.

Berdasarkan pemeriksaan histopatologi otak didapatkan kelainan pada grup dosis tinggi. Kelainan yang ditemukan pada tikus betina lebih berat dibandingkan tikus jantan. Pada tikus jantan didapatkan perdarahan fokal sedangkan pada tikus betina telah didapatkan nekrosis yang bersifat fokal. Pemeriksaan histopatologi tersebut mendukung hasil penimbangan berat organ otak tikus jantan dan betina di mana pada dosis tinggi didapatkan pola penurunan berat dibanding grup lainnya walaupun tidak berbeda bermakna.

Pemeriksaan histopatologi usus menemukan adanya kelainan pada seluruh grup baik pada tikus jantan maupun betina. Kelainan yang dialami pun sama yaitu adanya nekrosis pada sel epitel vili dan tunika muskularis yang disertai dengan infiltrasi sel leukosit. Kelainan tersebut mengindikasikan bahwa proses inflamasi yang terjadi tidak disebabkan oleh produk pangan BPPT. Adanya nekrosis dan infiltrasi sel leukosit seperti neutrofil pada jaringan usus dapat disebabkan karena kondisi makanan, minuman, dan kadangan yang tidak bersih sehingga banyak mikroorganisme patogen yang masuk ke dalam saluran gastrointestinal dan menimbulkan adanya proses inflamasi. Kerusakan pada jaringan usus tersebut dapat mempengaruhi kemampuan absorpsi nutrisi sehingga mempengaruhi berat usus.

Polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT mampu memberi usus proteksi terhadap kerusakan yang disebabkan oleh patogen. Hal tersebut terbukti dalam penelitian ini yaitu berat usus dari grup tikus jantan serta betina yang diberi produk pangan BPPT terutama pada dosis sedang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan grup kontrol. Hal ini juga dapat dihubungkan dengan hasil pengukuran berat badan pada tikus betina grup dosis tinggi yang memiliki berat paling tinggi.

Berat – berat organ yang naik dengan pemberian produk pangan BPPT dapat disebabkan oleh kandungan ekstrak polifenol. Vita JA dan Hogson et al meneliti bahwa polifenol dapat meningkatkan fungsi endotel dalam pembuluh darah.^(30, 32) Hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya dilatasi pembuluh darah yang meningkatkan aliran darah. Dengan meningkatnya aliran darah ke organ – organ maka organ akan mendapat asupan gizi yang lebih baik sehingga terjadi peningkatan berat organ - organ tersebut.

Selain itu penting diingat bahwa faktor umur dan kandungan – kandungan lain berupa protein, karbohidrat, lemak, abu, serat dalam produk pangan BPPT tidak dapat disingkirkan pengaruhnya terhadap peningkatan berat organ.⁽²⁶⁾ Sehingga penambahan berat badan ini bisa saja disebabkan oleh berbagai faktor lain tidak hanya oleh kandungan polifenol dalam produk pangan BPPT.

Polifenol dalam produk pangan BPPT yang diberikan pada hewan percobaan secara oral akan memasuki traktus digestif kemudian menuju ke sistemik sehingga dapat mempengaruhi karakteristik hematologi. Perubahan ini dapat berupa

peningkatan/penurunan kadar seldarah. Polifenol sama halnya dengan zat kimia lain dapat berpotensi toksik padasel darah.^(56, 57)

Pengukuran kadar hemoglobin (Hb) digunakan untuk mengidentifikasi identifikasi adanya anemia. Pemeriksaan Hb dengan metode Sahli mendapatkan pola yang mirip antara tikus jantan dan betina yaitu adanya penurunan nilai Hb seiring bertambahnya dosis. Penurunan tersebut diduga merupakan efek dari polifenol yang terkandung dalam produk pangan BPPT yang mampu mempengaruhi pembentukan Hb.

Pemeriksaan hematologi lain yang dilakukan ada hitung total leukosit dan hitung jenis leukosit. Pemeriksaan jumlah total leukosit dalam darah pada grup tikus jantan dan betina memberikan pola yang sama yaitu adanya kecenderungan penurunan jumlah leukosit seiring bertambahnya dosis produk pangan BPPT. Pada tikus jantan penurunan tersebut tidak bermakna sedangkan pada tikus betina bermakna. Pola tersebut ditemukan pula pada pemeriksaan hitung jenis monosit secara bermakna. Hal tersebut sejalan dengan kemampuan polifenol dalam produk pangan BPPT sebagai imunomodulator.

Pemeriksaan hitung jenis eosinofil pada tikus jantan mendapatkan bahwa dengan pemberian produk pangan BPTT terjadi penurunan jumlah eosinofil secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Sebaliknya pada tikus betina didapatkan peningkatan jumlah eosinofil pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT walaupun tidak bermakna. Perbedaan tersebut diduga disebabkan oleh polifenol yang terkandung dalam bahan pangan BPPT di mana pada tikus jantan berperan sebagai anti-inflamasi sedangkan pada tikus betina telah beerperan sebagai pro-inflamasi (reaksi hipersensitivitas).

Pola hasil pemeriksaan neutrofil batang dan neutrofil segmen sama untuk tikus jantan dan betina. Pemeriksaan hitung jenis neutrofil batang mendapatkan jumlah neutrofil batang pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT lebih banyak secara bermakna dibandingkan kontrol. Pemeriksaan hitung jenis neutrofil segmen mendapatkan penurunan jumlah neutrofil segmen pada grup tikus yang diberi produk pangan BPPT dibandingkan kontrol. Pola tersebut menunjukkan terjadi suatu kondisi *shift to the left* (lebih banyak sel darah putih yang imatur).

Peningkatan jumlah limfosit pada grup tikus dosis tinggi dalam penelitian ini diduga akibat reaksi inflamasi dan nekrosis pada organ hati, ginjal, paru, jantung, otak, dan usus tikus. Selain reaksi inflamasi dan nekrosis penyebab lain tingginya jumlah limfosit adalah adanya infeksi.⁽⁶⁴⁾ Infeksi yang terjadi dapat dipicu melalui kondisi lingkungan kadang, makanan, dan minuman yang tidak bersih.

Perbedaan – perbedaan hasil pemeriksaan berat badan, berat organ, fungsi organ, dan histopatologi antara tikus jantan dan betina diduga oleh karena respon imunotoksitas sangat bervariasi. Respon tersebut dipengaruhi oleh aktivitas/struktur agen, lama pemaparan, atau jumlah obat yang diberikan. Selain faktor – faktor tersebut faktor lingkungan dan genetik serta jenis kelamin hewan coba juga berperan.⁽⁸⁾ Pada percobaan didapatkan tikus betina lebih rentan untuk mengalami efek toksik produk pangan BPPT dibandingkan tikus jantan.

4.4 *No Observed Effect Level (NOEL)*

Dosis *no observed effect level (NOEL)* adalah tingkat dosis maksimum yang tidak menginduksi atau menunjukkan efek yang terobservasi pada spesies hewan coba yang paling *susceptible* dan sesuai dengan menggunakan indikator toksisitas paling sensitif.^(6, 7, 10, 14) Pada percobaan ini indikator efek tersebut adalah kematian, pemeriksaan makroskopik (berat badan dan berat organ), pemeriksaan hematologi, fungsi hati, fungsi ginjal, dan pemeriksaan histopatologi.

Tabel 17. Hasil Perbandingan Indikator antar Grup Tikus Jantan dan Betina

Parameter	Indikasi Toksik (dibanding kontrol)	Dosis Rendah (1g/kg BB)		Dosis Sedang (2g/kg BB)		Dosis Tinggi (4g/kg BB)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Berat Organ	↓	-	-	↑	↑	↓	↓
SGOT	↑	-	-	-	↑	-	-
SGPT	↑	↓	↓	-	-	-	-
Kreatinin	↑	-	↓	↓	-	-	↑
Ureum	↑	↑	-	↑	-	-	-
Histo patologi	Ada kelainan	-	-	-	-	+	+

Keterangan :
 ↑ : peningkatan
 ↓ : penurunan
 ↑ / ↓ : toksik

Lanjutan

Parameter	Indikasi Toksik (dibanding kontrol)	Dosis Rendah (1g/kg BB)		Dosis Sedang (2g/kg BB)		Dosis Tinggi (4g/kg BB)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Hb	↓ (anemia)	-	-	-	↓	-	↓
Jumlah Leukosit	↑ (inflamasi)	-	-	-	-	↓	-
Eosinofil	↑ (hipersensitivitas)	↓	-	-	-	↓	-
Neutrofil	↑ (inflamasi)	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Limfosit	↑ (inflamasi)	↑	-	↑	-	↑	-
Monosit	↑ (inflamasi)	↑	↑	↑	-	-	-

Keterangan:

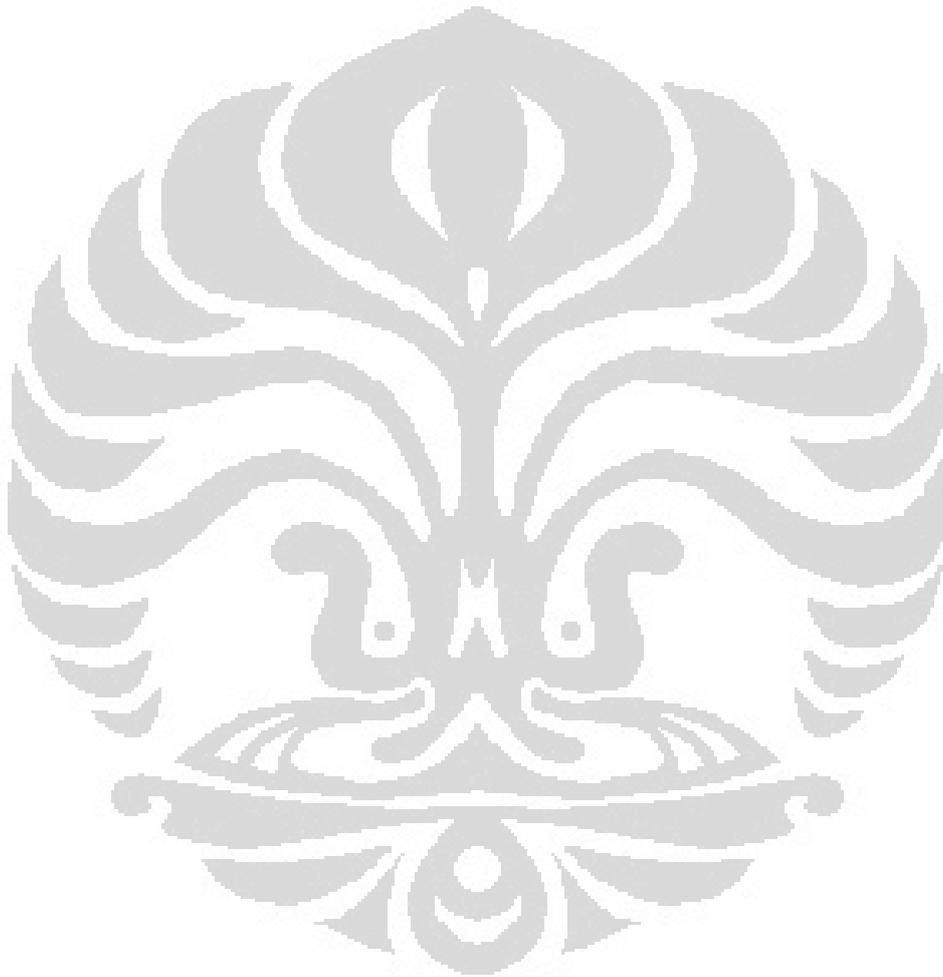
↑ : peningkatan

↓ : penurunan

↑/↓ : toksik

Berdasarkan hasil yang didapat pada Tabel 17 didapatkan bahwa tanda toksik muncul pada produk pangan BPPT dosis sedang dan dosis tinggi. Pada dosis rendah didapatkan peningkatan ureum yang sesuai indikator merupakan tanda toksik akan tetapi indikator ureum cukup diragukan sebagai indikator untuk kerusakan fungsi ginjal karena jumlahnya dalam tubuh dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti asupan protein dari makanan sehingga kenaikan tersebut disimpulkan bukan sebagai tanda toksik. Selain itu Pada hasil hematologi didapatkan pula peningkatan jumlah neutrofil, limfosit, dan monosit yang sesuai dengan indikator merupakan tanda toksik. Pada penelitian ini peneliti tidak menganggap hal tersebut sebagai suatu tanda toksik karena peningkatan tersebut masih diragukan merupakan suatu tanda imunotoksisitas atau justru merupakan efek imunomodulator dari bahan aktif polifenol dalam produk pangan BPPT yang secara invitro terbukti meningkatkan respon imun tubuh. Pada penelitian lain peningkatan sel neutrofil, limfosit, dan monosit disebabkan oleh adanya inflamasi dan nekrosis dari jaringan organ sedangkan pada grup tikus dosis rendah dan sedang dalam penelitian ini peningkatan sel – sel tersebut tidak didukung oleh hasil pemeriksaan histopatologis yang mendapatkan hasil normal pada setiap organ yang diperiksa. Sehingga disimpulkan bahwa peningkatan tersebut bukan merupakan tanda toksik akibat dari produk

pangan BPPT. Sesuai dengan indikator – indikator yang terdapat dalam tabel 17 dapat disimpulkan bahwa NOEL pada penelitian ini adalah 1 g/kg BB karena pada dosis tersebut tidak ditemukan adanya tanda toksik untuk setiap indikator.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Uji toksisitas oral akut tidak menemukan tikus yang mati setelah diobservasi selama 14 hari sehingga didapatkan $LD_{50} > 9\text{g/kg BB}$.
2. Uji toksisitas oral subkronik yang dilakukan pada tikus jantan dan betina dalam 4 grup (1 g/kg BB, 2 g/kg BB, 4 g/kg BB, kontrol) mendapatkan nilai *No Observed Effect Level* (NOEL) 1 g/kg BB.
3. Pengukuran berat badan pada uji toksisitas oral subkronik mendapatkan perbedaan efek produk pangan BPPT antara tikus jantan dan tikus betina.
4. Pemeriksaan berat organ pada uji toksisitas oral subkronik mendapatkan peningkatan berat pada dosis sedang dan penurunan berat pada dosis tinggi.
5. Pemeriksaan fungsi organ pada uji toksisitas oral subkronik mulai menunjukkan tanda toksik pada dosis sedang.
6. Pemeriksaan hematologi pada uji toksisitas oral subkronik menunjukkan bahwa produk pangan BPPT berpengaruh terhadap Hb, jumlah leukosit total, eosinofil, neutrophil, limfosit, dan monosit tikus jantan serta betina.
7. Pemeriksaan histopatologi organ pada uji toksisitas oral subkronik mulai menemukan kerusakan jaringan pada grup tikus jantan dan betina yang diberi produk pangan BPPT dosis tinggi.
8. Pada penelitian didapatkan tikus betina lebih rentan untuk mengalami efek toksik produk pangan BPPT dibandingkan tikus jantan.
9. Dosis sedang memberikan pengaruh positif terhadap berat badan, berat organ hati, jantung, paru, usus tikus tetapi memberi pengaruh negatif (toksik) terhadap fungsi hati dan profil hematologi sehingga dianjurkan menggunakan dosis yang lebih rendah.

5.2 Saran

1. Penelitian ini menggunakan ruangan sebagai kandang tikus yang cukup gelap, lembab, dan kotor sehingga banyak faktor lingkungan yang

mempengaruhi kondisi kesehatan dari tikus. Hendaknya penelitian yang serupa atau penelitian yang selanjutnya (uji toksisitas kronik) mempersiapkan ruangan yang terpelihara kebersihannya serta memiliki ventilasi dan pencahayaan yang baik.

2. Alat pengukur berat badan tikus dalam penelitian ini berupa timbangan berat dengan alat penunjuk jarum sehingga jika tikus bergerak sulit untuk memastikan berat absolut tikus tersebut. Dianjurkan untuk penelitian yang serupa atau selanjutnya (uji toksisitas kronik) digunakan timbangan berat badan digital.
3. Pada penelitian ini indikator yang digunakan dalam menentukan pengaruh produk pangan BPPT terhadap fungsi ginjal adalah kreatinin. Peningkatan kreatinin yang menunjukkan gangguan fungsi ginjal baru muncul setelah terjadi kerusakan fungsi $\geq 50\%$ sehingga kurang sensitif terhadap kerusakan dini. Dianjurkan bahwa indikator yang digunakan adalah Cystatin C, Microalbumin, dan NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase).
3. Pemeriksaan Hb pada penelitian ini menggunakan metode Sahli. Metode tersebut memiliki nilai keakuratan yang rendah karena bersifat subjektif terhadap pemeriksa sehingga hendaknya penelitian yang serupa ataupun yang selanjutnya (uji toksisitas kronik) sebaiknya menggunakan metode pemeriksaan Hb dengan menggunakan metode Hemiglobincyanide (Hemoglobinometry).
4. Sampel pemeriksaan histopatologi pada penelitian ini hanya satu perwakilan untuk setiap jenis kelamin dalam satu dosis sehingga hasil dari pemeriksaan tersebut kurang dapat mewakili kondisi secara keseluruhan dalam dosis tersebut. Hendaknya untuk penelitian yang sama atau selanjutnya (uji toksisitas kronik) sebaiknya seluruh sampel dibuat slide untuk pemeriksaan histopatologi atau minimal setengah dari jumlah populasi sampel dalam setiap dosis.

DAFTAR PUSTAKA

1. BNPB. Potensi Ancaman Bencana. [cited 2010 25 November]; Available from: http://www.bnpb.go.id/irw/benc_m.asp?bid=2.
2. Government A. Natural Hazards in Australia - Chapter Two : Impact of Natural Disasters. [cited 2010 25 November]; Available from: www.ga.gov.au/servlet/BigObjFileManager?bigobjid=GA10819.
3. Sherwood L. Human physiology: from cells to system. VI ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole; 2007.
4. Matondang C. Buku ajar alergi imunologi. In: Akib A, Munasir Z, Kurniati N, editors. Perkembangan sistem imun. II ed. Jakarta: IDAI; 2008. p. 7-13.
5. Casarett, Doull's. In: D.Klassen C, editor. Toxicology : The Basic Science of Poisons. VII ed. United State of America: TheMcGraw-Hill Companies; 2008.
6. Barile F. Clinical toxicology: principles and mechanisms. .Washington DC: CRC Press; 2005.
7. OECD. Subchronic Oral Toxicity-Rodent: 90-day study. Guideline for testing of chemicals. 1981;408.
8. Duffus J, Worth H. Fundamental Toxicology for Chemists. United Kingdom The Royal Society of Chemistry; 2006.
9. OECD. Acute Oral Toxicity. Guideline for testing of chemicals. 1981;401.
10. Derelanko M. Handbook of Toxicology. II ed. New York CRC Press; 2002.
11. Ratbehavior. Rat Biology: Why rats can't vomit. [cited 2009 17 Oktober]; Available from: <http://www.ratbehavior.org/vomit.htm>.
12. Rgd. Strain Data : Sprague Dawley. [cited 2009 17 Oktober]; Available from: http://rgd.mcw.edu/tools/strains/strains_view.cgi?id=1566440
13. Harlan™, Dawley®™ S. Outbred Rats. [cited 2009 17 Oktober]; Available from: http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/outbred_rats/sprague_dawley_sd.hl.

14. Lu, Frank C. Basic Toxicology : Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment – Chapter 6 Conventional Toxicity Studies. II ed. Washington: Hemisphere Publishing Corporation; 1991. p. 77-83.
15. Henry, John B. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods : CHAPTER 21 Evaluation of Liver Function : Tests of Liver Injury. In: Richard A, McPherson, Matthew RP, editors. XXI ed. China: Elsevier Inc; 2006.
16. Henry, John B. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods : Chapter 14 Evaluation of Renal Function, Water, Electrolytes and Acid–Base Balance : Measurement of Renal Function. In: Richard A, McPherson, Matthew RP, editors. XXI ed. China: Elsevier Inc; 2006.
17. Provan, Drew. Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigations : Chapter 10 Renal Medicine. II ed. London Oxford University Press; 2005.
18. Bleicher, Norman, dkk. Methods of Animal Experimentation. In: William IG, editor. New York dan London: Academic Press; 1965. p. 13-5.
19. Henry, John B. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods : CHAPTER 29 Basic Examination of Blood and Bone Marrow : Hematology Principles and Procedures. In: Richard A, McPherson, Matthew RP, editors. XXI ed. China: Elsevier Inc; 2006.
20. Gandasoebrata R. Penuntun Laboratorium Klinik. Jakarta Dian Rakyat; 1989. p. 13-5.
21. Wirawan, Riadi, Silman E. Pemeriksaan Laboratorium : Hematologi Sederhana. . II ed. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2000. p. 15-23.
22. Wirawan, Riadi, Silman E. Pemeriksaan Laboratorium : Hematologi Sederhana. . II ed. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2000. p. 31-6.
23. Lu, Frank C. Basic Toxicology : Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment – Chapter 22 Toxicology Evaluation : Assesment of Safety Risk. II ed. Washington: Hemisphere Publishing Corporation; 1991. p. 329-34.
24. Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005;16(10):577-86.

25. Augustin S, G W. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2000;130:2073-85.
26. Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, Fuente M. Diet Supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *Eur J Nutr*. 2006 11 October;10(45):428-38.
27. D'Archivio M, Santangelo C, Scaccocchio, Vari R. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *Int J Mol Sci*. 2008 Feb 28;9:213-28.
28. Piskula M, Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*. 1998;128:1172-8.
29. Simopoulos A. *World Review of Nutrition and Dietetics : Nutrition and Fitness*. Switzerland: Karger; 2005.
30. Hodgson J, Puddey I, Burke V, Watts G, Beilin L. Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:195-201.
31. Vinardell M, Mitjans M. Immunomodulatory Effects of Polyphenols. *EJEAFChe*. 2008;7(8):3356-62.
32. Vita J. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):292-7.
33. Mennen L, Walker R, Pelissero C, Scalbert A. Risk and Safety of Polyphenol Consumption. *Dietary Polyphenols and Health : Proceedings of the 1st International Conference on Polyphenols and Health*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):326-9.
34. Angelina M, Hartati S, Dewijanti I, Banjarnahor S, Meilawati L. Penentuan LD50 Daun Cinco (*Cyclea barbata* Miers) Pada Mencit. *Makara Sains*. 2008 April;12(1):23-6.
35. Kram J, Keller K. *Toxicology Testing Handbook*. Washington DC Ork Basel; 2001.
36. Bjornsson E, Olsson R. Serious adverse liver reactions associated with herbal weight-loss supplements. *J Hepat*. 2007;47:295-7.

37. Bonkovsky H. Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese green tea (*Camellia sinensis*) *Ann of Internal Med.* 2006;144:68-71.
38. Hourmand-Ollivier, Mosquet B, Mosquet L, Rousselot P, Salame E, Piquet M, et al. Fulminant hepatitis during self-medication with hydroalcoholic extract of green tea. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:1135-7.
39. Javaid A, Bonkovsky H. Hepatotoxicity due to extracts of Chinese green tea (*Camellia sinensis*): a growing concern. *J Hepatol.* 2006;45:334-5.
40. Watt M, Kruszyna T, Nelson R, Walsh M, Huang W, Nashan B, et al. Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. *Liver Transpl.* 2006;12:1892-5.
41. Manzano S, Williamson G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Dec;54(12):1773-80.
42. Welsch CA, Lachance PA, Wasserman BP. Effects of Native and Oxidized Phenolic Compounds on Sucrase Activity in Rat Brush Border Membrane Vesicles. *American Institute of Nutrition.* 1989 8 May 1989;3:0022-3166.
43. Kapetanovic IM, Crowell JA, Krishnara R, Zakharov A, Lindeblad M, Lyubimovb A. Exposure and Toxicity of Green Tea Polyphenols in Fasted and Non-Fasted Dogs. *Toxicology.* 2009 June 16;260(1-3):28-36.
44. Rector RS, Warner SO, Liu Y, Hinton PS, Sun GY, Cox RH, et al. Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 1 May;293:500-6.
45. Mittal PC, Kanta R. Correlation of increased oxidative stress to body weight in disease-free post menopausal women. *Clinical Biochemistry.* 2009 July;42(10-11):1007-11.
46. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* 2006 December 28;2007:95974.
47. Schnellmann R. Toxic responses of the kidney. In: Klassen C, editor. *Casarett and doull's toxicology the basic science of poisons.* Kansas: McGraw Hill; 2001. p. 491-510.

48. Wijaya I, Miranti I. Patologi ginjal dan saluran kemih. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 2005.
49. Sennang N, Sulina, Badji A, Hardjoeno. Laju filtrasi glomerulus pada orang dewasa berdasarkan tes klirens kreatinin menggunakan persamaan cockroftgault dan modification of diet in renal disease. *J Med Nus* 2005 June;24(2):17.
50. Vishal S, Vaidya, Michael A, Ferguson, Joseph V, Bonventre. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463-93.
51. Isbrucker R, Edwards J, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:636-50.
52. Lambert J, Sang S, Yang C. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem Res Toxicol*. 2007;20:583-5.
53. Sihombing M, Raflizar. Status Gizi dan Fungsi Hati Mencit (Galur CBS-Swiss) dan Tikus Putih (Galur Wistar) di Laboratorium Hewan Percobaan Puslitbang Biomedis dan Farmasi. *Media Litbang Kesehatan*. 2010;XX(1):33-40.
54. Information VM. Patologi Organ Limforetikular. 2011 [cited 2011 27 July]; Available from: <http://www.myvetmed.info/2011/01/patologi-organ-limforetikular.html>.
55. Sang S, Lambert J, Hong J, Tian S, Lee M, Stark R, et al. Synthesis and Structure Identification of Thiol Conjugates of (-)-Epigallocatechin Gallate and Their Urinary Levels in Mice. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:1762-9.
56. Klaassen C. Casaree and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons. 6th ed. USA: Th McGraw-Hill Companies, Inc; 2001.
57. Hoffman R. Hematology : Basic Principles and Practice. Pennsylvania: Elsevier; 2005.
58. Lewis S, Bain B, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology. Philadelphia Elsevier Ltd; 2006.
59. Gaffney S, Williams V, Flynn P, Carlino R, Mowry C, Dierenfeld E. Tannin/Polyphenol effects on iron solubilization in vitro. *Bios*. 2004 May;75(2):43-52.

60. Navarro-Peran E, Cabezas-Herrera J, Garcia-Canovas F, Durrant M, Thorneley R, Rodriguez-Lopez J. The antifolate activity of tea catechins. *Cancer Res.* 2005;65:2059-64.
61. Fraser T. White Cells. *Complete Blood Count in Primary Care.* Dunedin: bpacnz; 2008. p. 12.
62. Shirai T, Sato A, Chida K, Hayakawa H, Akiyama J, Iwata M, et al. Epigallocatechin gallate-induced histamine release in patients with green tea-induced asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79:65-9.
63. Shirai T, Reshad K, Yoshitomi A, Chida K, Nakamura H, Taniguchi M. Green tea-induced asthma: relationship between immunological reactivity, specific and non-specific bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1252-5.
64. Fraser T. White Cells. *Complete Blood Count in Primary Care.* Dunedin: bpacnz; 2008. p. 9-10.
65. Noer S. *Ilmu Penyakit Dalam.* 3 ed. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1996.