

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK AKAR GANTUNG  
POHON BERINGIN (*Ficus benjamina* L.) TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**YOHANA MARIA KARO**  
115130100111047



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK AKAR GANTUNG  
POHON BERINGIN(*Ficus benjamina* L.) TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**YOHANA MARIA KARO**  
**115130100111047**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) Terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok**

Oleh:

**YOHANA MARIA KARO**

**115130100111047**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 4 Maret 2016  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

**Dyah Kinasih W., S.Si., MP., M.Sc**

NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : YOHANA MARIA KARO

NIM : 115130100111047

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) Terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok

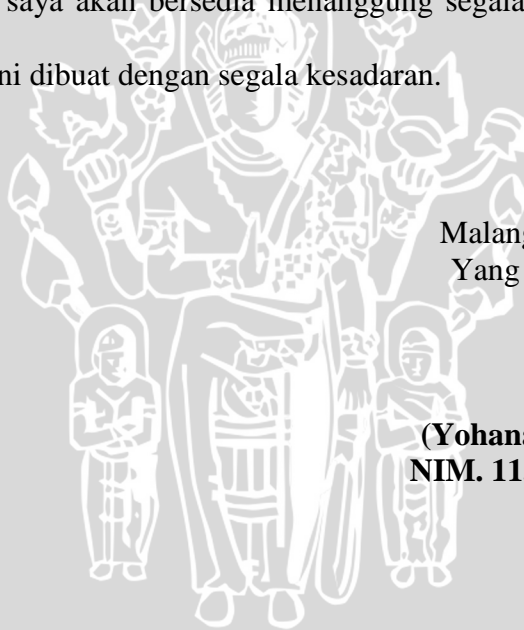
Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Maret 2016  
Yang menyatakan,

(Yohana Maria Karo)  
NIM. 115130100111047



repository.ub.ac.id

**Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) Terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok**

**ABSTRAK**

Asap rokok mengandung berbagai bahan kimia antara lain nikotin, karbon monoksida, dan tar yang merupakan radikal bebas penyebab kerusakan organ di antaranya hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap aktivitas protease dan perbaikan histopatologi hepar pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok 1 yaitu kelompok tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 (kontrol positif) tikus yang dipapar asap rokok, kelompok 3,4,5 tikus yang dipapar asap rokok dan diterapi dengan dosis 50 mg/kg BB, 75 mg/kg BB, 100 mg/kg BB. Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan metode spektrofotometri dan dihitung menurut rumus Walter, selanjutnya dianalisis dengan ragam ANOVA. Histopatologi sel hepar dilakukan dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin dan diamati secara mikroskopis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak akar gantung pohon beringin secara signifikan ( $p < 0,05$ ) memberi pengaruh terhadap penurunan aktivitas protease, dan terhadap perbaikan gambaran histopatologi hepar berdasarkan perbaikan hepatosit dan sinusoid. Semakin tinggi dosis terapi menyebabkan penurunan aktivitas protease semakin besar. Dosis efektif adalah 100 mg/kg BB dapat menurunkan aktivitas protease sebesar 51,02 % dan perbaikan histopatologi hepar. Disimpulkan bahwa terapi ekstrak akar gantung pohon beringin mampu menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki kerusakan hepar yang dipapar asap rokok.

**Kata Kunci** : Asap rokok, Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.), Aktivitas protease, Histopatologi hepar.

**The Therapeutic Effect of Hanging Roots of Banyan Tree (*Ficus benjamina* L.) Extract Against Protease Activity and Histopathology of Liver on Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Cigarette Smoke**

**ABSTRACT**

Cigarette smoke contained various chemicals include nicotine, carbon monoxide and tar as free radicals. Free radicals are unstable molecules that can damage various organs, including the liver. This research aimed to determine the effect of roots hanging banyan tree extract (*Ficus benjamina* L.) against protease activity and improvement of liver histopathology in rats (*Rattus norvegicus*). The Rats (*Rattus norvegicus*) that used in this research were male rats and 3 months old, divided into 5 groups: group 1 was the healthy rats (negative control), group 2 (positive control) were exposed to cigarette smoke, then 3,4,5 groups were exposed to cigarette smoke and treated with hanging roots of banyan tree (*Ficus benjamina* L.) extract with dose of 50 mg/kg BW, 75 mg/kg BW, 100 mg/kg BW. The activity of protease determined using spectrophotometry and measured according to Walter theory, then analyzed by ANOVA. The histopathological of liver used *hematoxylin eosin* (HE) staining and observed microscopically. The result showed that treatment hanging roots of banyan tree extract significantly ( $p < 0,05$ ) decreased protease activity. It also could improve liver histopathology showed by the hepatocytes and sinusoid repaired. The effective dose was 100 mg/kg BW which reduced protease activity to be 51.02%. In conclusion, therapy hanging roots of banyan tree extract was able to reduce the activity of protease and repair liver damage which exposed to cigarette smoke.

**Keywords:** Cigarette smoke, Hanging roots of banyan tree (*Ficus benjamina* L.), Protease activity, Liver histopathology.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas berkat Rahmat dan Anugrah-Nya, penulis dapat menyelesaikan hasil penelitian Skripsi yang berjudul **“Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) Terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok”**.

Skripsi ini merupakan bagian dari penelitian pengaruh terapi rebusan akar gantung beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok. Penelitian ini diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. Selama penulisan proposal penulis mendapatkan bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberikan bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan dukungan kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta motivasi kepada penulis.
3. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech sebagai penguji I yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan kepada penulis.
4. Dhita Evi Aryani, S. Farm, Apt selaku penguji II atas bantuan dan arahan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah memberikan bantuan dan fasilitas serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan skripsi.
6. DIKTI yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian (PKM-P) 2013.
7. Azizah N. Aurizza, Tari Cahyani, Rima M. Hardi dan Andita A. Aryoko selaku teman seperjuangan dalam penelitian ini.
8. Pihak Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya.

9. Keluarga besar penulis, Ayahanda dan Ibunda tercinta, Bapa Pater Kornelis Key SVD, Kakak Ersas, Adik Elis dan Ces tersayang yang selalu memberikan semangat, dukungan dan doa yang tiada henti.
10. Teman dan sahabat, Ervin, Bismi, Ratih, Caecilia, Priscilla, Marcell, Vina dan Sessy yang selalu memberikan semangat dan dukungan tiada henti.
11. Teman-teman angkatan 2011 B yang selalu semangat dalam berjuang bersama-sama dari awal masuk kuliah.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan hasil penelitian skripsi ini yang tidak mungkin disebutkan satu persatu.

Mengingat keterbatasan dan kemampuan yang dimiliki, penulis menyadari bahwa tulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis menerima kritik dan saran yang membangun.

Malang, Maret 2016

Penulis





## DAFTAR ISI

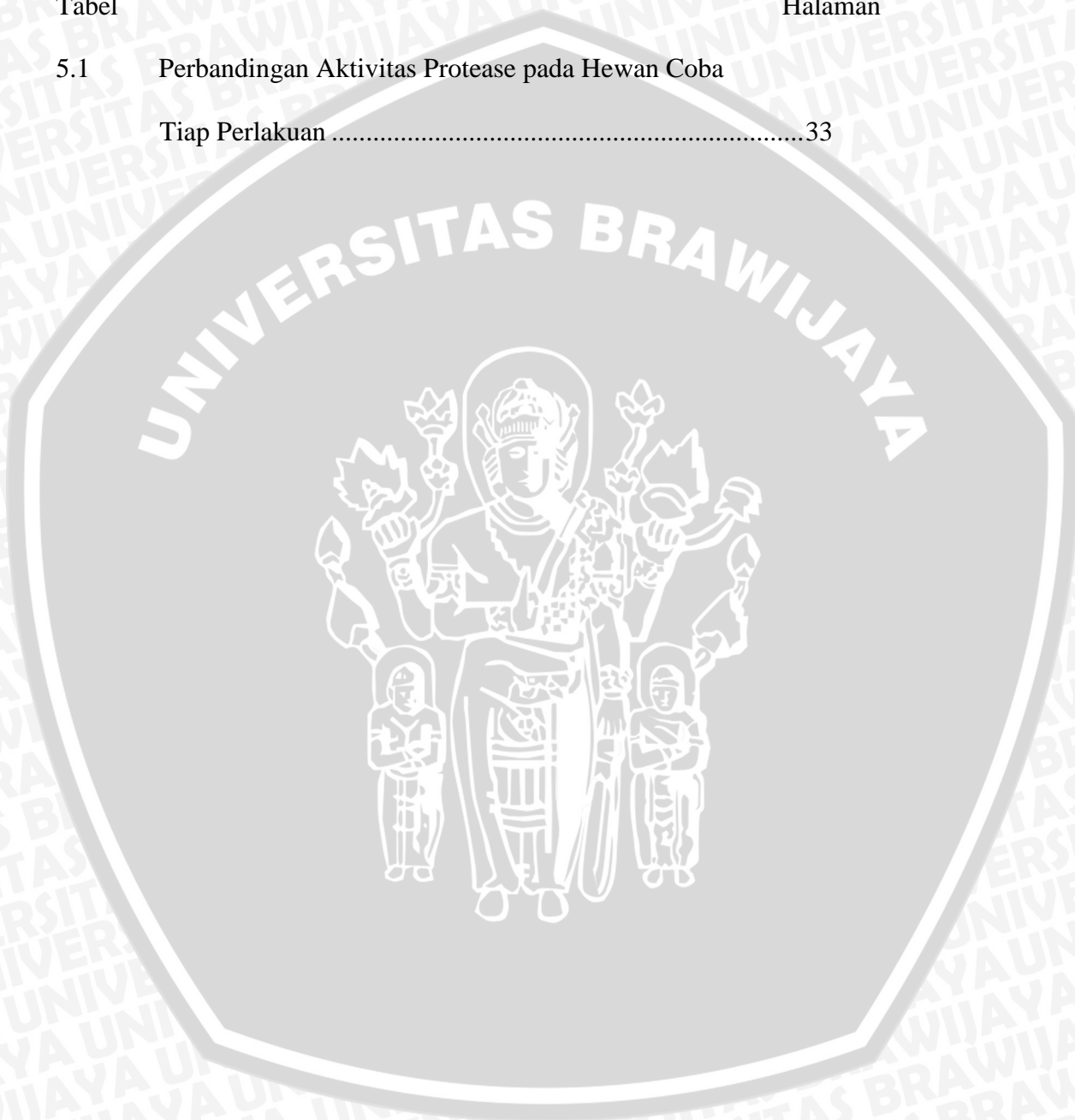
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Radikal Bebas, Oksidan dan Antioksidan .....	6
2.2 Asap Rokok .....	7
2.3 Struktur Hepar .....	10
2.4 Enzim Protease .....	14
2.5 Patomekanisme Pertahanan Hepar .....	15
2.6 Akar Gantung Pohon Beringin .....	16
2.7 Hewan Coba Tikus Putih .....	18
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b> .....	19
3.1 Kerangka Konsep .....	19
3.2 Hipotesis Penelitian .....	21
<b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	22
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	22
4.2 Sampel Penelitian .....	22
4.3 Rancangan Penelitian .....	23
4.4 Variabel Penelitian .....	23
4.5 Materi Penelitian .....	24
4.6 Tahapan Penelitian .....	25
4.7 Analisis Data .....	32
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	33
5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin ( <i>Ficus benjamina</i> L.) terhadap Aktivitas Protease Hepar Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar asap rokok .....	33
5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin ( <i>Ficus benjamina</i> L.) terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar asap rokok .....	38
<b>BAB 6. PENUTUP</b> .....	
6.1 Kesimpulan .....	47

6.2 Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>52</b>



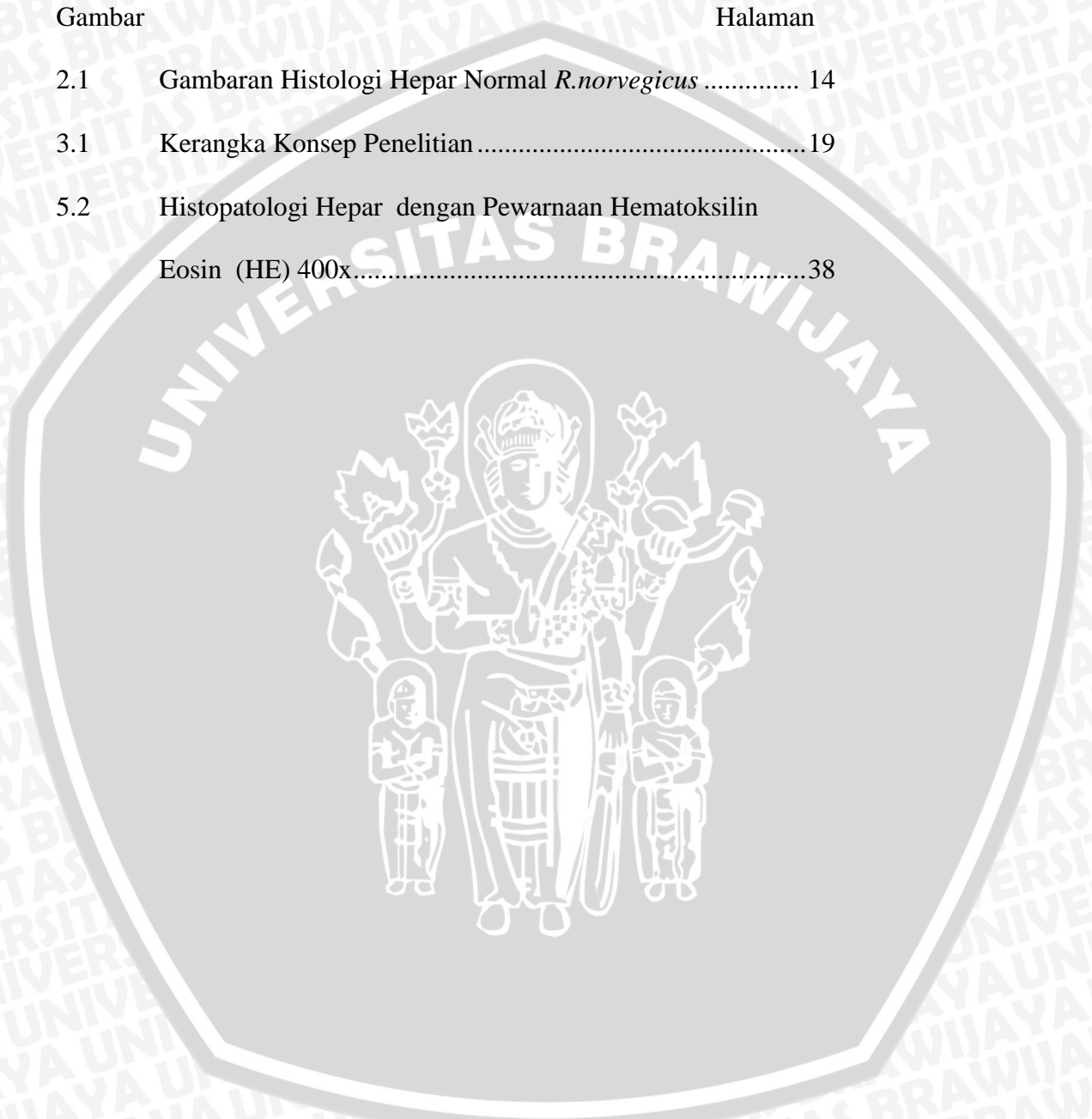
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Perbandingan Aktivitas Protease pada Hewan Coba Tiap Perlakuan .....	33



## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Gambaran Histologi Hepar Normal <i>R.norvegicus</i> .....	14
3.1	Kerangka Konsep Penelitian .....	19
5.2	Histopatologi Hepar dengan Pewarnaan Hematoksinilin Eosin (HE) 400x.....	38



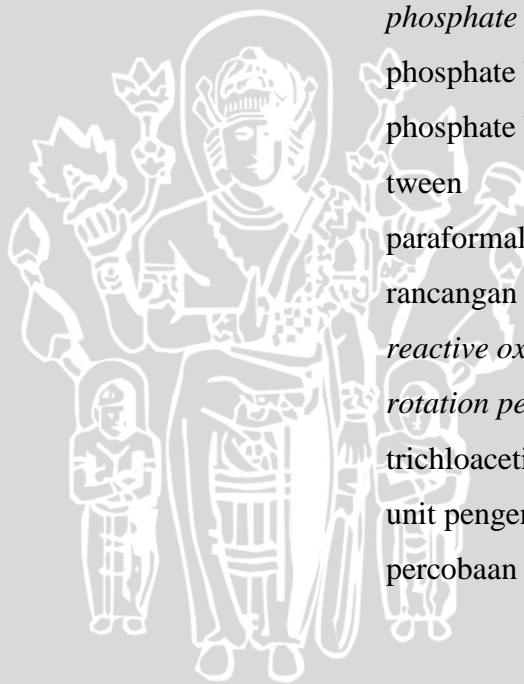
## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	50
2. Keterangan Identifikasi Akar Gantung Pohon Beringin.....	51
3. Skema Kerja Penelitian.....	52
4. Penyaringan Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin.....	53
5. Dosis Terapi Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin.....	56
6. Pembedahan Hewan Coba.....	57
7. Pengukuran Aktivitas Protease.....	58
8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin.....	62
9. Pembuatan Kurva Standar Tirosin.....	65
10. Perhitungan Aktivitas Protease.....	67
11. Data dan Uji Statistik Aktivitas Protease.....	70
12. Pembuatan Preparat Histologi.....	73



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
AIOH3	<i>aluminium hydroxide</i>
AOAC	<i>association of analytical communitieas</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
HB	hematoksin-eosin
NaCl	natrium clorida
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PBS-azida	phosphate buffer saline-azida
PBS-Tween	phosphate buffer saline-tween
PFA	paraformaldehid
RAL	rancangan acak lengkap
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpm	<i>rotation per minute</i>
TCA	trichloacetic acid
UPHP	unit pengembangan hewan percobaan



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Pet animals* atau hewan peliharaan, saat ini semakin banyak diminati oleh masyarakat. Jenisnya sangat beragam, mulai dari anjing, kucing, kelinci, hamster, reptil, dan lain sebagainya. Tanpa disadari seringkali pemilik hewan melakukan aktivitas yang dapat menyebabkan hewan peliharaannya berisiko terserang penyakit saluran pernafasan, salah satunya dapat disebabkan oleh kegiatan merokok. Merokok telah diketahui dapat menyebabkan gangguan kesehatan bahkan dapat mengakibatkan kematian pada manusia. Lebih dari 5 juta orang meninggal karena menghisap langsung rokok, sedangkan 600 ribu orang lebih meninggal karena terpapar asap rokok (WHO, 2013).

Kegiatan merokok menghasilkan asap rokok yang tidak hanya menyebabkan gangguan pernapasan pada manusia melainkan dapat menyebabkan gangguan pernapasan bagi hewan peliharaan di sekitarnya baik secara *secondhand* maupun *thirdhand*. Di Amerika Serikat telah tercatat bahwa sekitar seperlima dari pemilik hewan peliharaan adalah perokok (Milberger et al., 2009 : Matt et al., 2004) sedangkan di Indonesia belum diketahui data pemilik hewan berstatus perokok. Meskipun demikian perlu dilakukan pencegahan dan pengobatan pada *pet animals* sejak dini terhadap paparan asap rokok mengingat bahwa berdasarkan data WHO (2013), Indonesia merupakan salah satu negara dengan prevalensi perokok yang terbesar di dunia yang menempati urutan ketiga dengan jumlah perokok terbanyak setelah negara China dan India.

Asap rokok merupakan hasil pembakaran tembakau berupa gas yang mengandung berbagai bahan kimia antara lain nikotin dan karbon monoksida yang merupakan radikal bebas (Diken dkk., 2001). Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil yang dapat menyebabkan kerusakan berbagai organ tubuh, seperti paru-paru, hepar, dan jantung. Hepar merupakan salah satu organ utama tubuh yang sangat rentan karena berfungsi untuk detoksifikasi bahan-bahan toksik yang masuk ke dalam tubuh sehingga akumulasi bahan-bahan toksik di hepar lebih besar (Ganong, 2008). Apabila jumlah radikal bebas dari asap rokok masuk terlalu banyak ke dalam tubuh maka antioksidan akan menurun dan akan menimbulkan reaksi inflamasi sehingga hepar akan merespon adanya antigen dengan mensekresi protein yang akan menarik neutrofil untuk menghasilkan protease. Sekresi protease secara alami dapat dihambat oleh protease inhibitor, defisiensi protease inhibitor akan menyebabkan proteolisis pembentuk jaringan organ sehingga mengakibatkan kerusakan hepar (Kumar et al., 2007 : Pessione et al., 2001).

Di dalam tubuh sudah terdapat antioksidan alami yang dapat menangkal radikal bebas seperti superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH Px), katalase (CAT) dan glutathione-S-transferase (GST), namun bila jumlah radikal bebas berlebihan, tubuh memerlukan antioksidan dari luar atau untuk menangkal radikal bebas (Arivazhagan et al., 2000). Antioksidan dari luar atau yang disebut juga antioksidan eksogen berasal dari tanaman, salah satunya adalah pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) yang belum optimal digunakan sebagai bioaktif yang potensial untuk obat herbal dan terdapat banyak di daerah tropis. Akar



gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L) diketahui mengandung senyawa fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan (Fariyah, 2008).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) pada hewan coba yang dipapar asap rokok.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dapat menurunkan aktivitas protease pada organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok?
2. Apakah terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dapat memperbaiki kerusakan struktur hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 200 gram sebanyak 20 ekor. Tikus diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah mendapat sertifikat laik etik dari

Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 128-KEP-UB tahun 2013.

2. Asap rokok dipaparkan kepada setiap kelompok tikus sebanyak 2 batang rokok untuk 4 ekor tikus setiap hari selama 2 minggu dalam box pengasapan (Arkeman dan David, 2006).
3. Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) yang digunakan diambil dari Lingkungan Gedung C Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan telah mendapatkan keterangan determinasi dari Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi FMIPA UB No.0084/Takso.Identifikasi/03/2013.
4. Ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) menggunakan pelarut air kemudian dipanaskan, diberikan secara peroral (sonde) dengan dosis 50 mg/kg BB, 75 mg/kg BB, 100 mg/kg BB selama 2 minggu (Aurizza dkk., 2013).
5. Variabel yang diamati dari penelitian ini adalah aktivitas enzim protease yang dianalisis dengan ragam ANOVA dan gambaran histopatologi sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

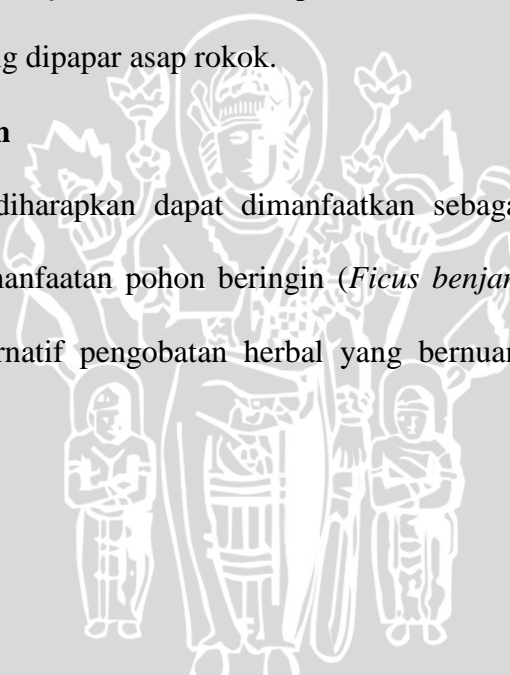
#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap aktivitas enzim protease pada organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap kerusakan sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam pemanfaatan pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dan dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan herbal yang bernuansa kearifan lokal, aman dan ekonomis.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Radikal Bebas, Oksidan dan Antioksidan

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya, sehingga menjadi komponen yang tidak stabil dan menjadi sangat reaktif. Suatu molekul bersifat stabil bila elektronnya berpasangan, tetapi bila tidak berpasangan molekul tersebut menjadi tidak stabil dan memiliki potensi untuk merusak. Bila molekul tidak stabil ini mengambil satu elektron dari senyawa lain maka molekul tersebut menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil berubah menjadi radikal dan memicu reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya (reaksi berantai) yang apabila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit (Pam-Huy *et al.*, 2008).

Radikal bebas yang diproduksi di dalam tubuh normal akan dinetralisir oleh antioksidan yang ada di dalam tubuh. Bila kadar radikal bebas terlalu tinggi, maka kemampuan dari antioksidan endogen tidak memadai untuk menetralkan radikal bebas sehingga terjadi keadaan yang tidak seimbang antara radikal bebas dengan antioksidan. Oksidan adalah bahan kimia elektrofil yang sangat reaktif dan dapat memindahkan elektron dari molekul lain dan menghasilkan oksidasi pada molekul tersebut. Oksidan yang dapat merusak sel berasal dari berbagai sumber yaitu (Finkel *et al.*, 2003) :

- 1) Berasal dari tubuh sendiri, berupa senyawa yang sebenarnya berasal dari proses biologi normal namun oleh suatu sebab terdapat dalam jumlah yang berlebihan.
- 2) Berasal dari luar tubuh yang berperan menimbulkan dampak negatif adalah asap rokok, NO, NO<sub>2</sub> dan ozon. Asap rokok merupakan substansi paling sering, karena menimbulkan berbagai perubahan biokimia dan fisiologi pada jaringan paru, jantung, hepar dan lain-lain. Oksidan yang dihasilkan tembakau menurunkan jumlah antioksidan intraseluler yang terdapat dalam sel paru, jantung maupun hepar.

Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel melawan radikal bebas, seperti oksigen singlet, superoksida, radikal peroksil, radikal hidroksil dan peroxyinitrite. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Ketidakseimbangan antara antioksidan dan hasil spesies oksigen reaktif dalam stres oksidatif menyebabkan kerusakan sel (Pam-Huy *et al.*, 2008).

## 2.2 Asap Rokok

Asap rokok mengandung sejumlah lebih dari 4000 jenis kandungan kimia, selain itu tiap gram rokok mengandung radikal bebas, senyawa berbahaya yang dapat bereaksi dengan sel tubuh dalam jumlah yang sangat besar. Setiap gram rokok mengandung  $10^{15}$  radikal bebas. Radikal bebas dalam jumlah kecil berfungsi dalam melawan sel mikroorganisme invasif. Apabila terjadi ketidakseimbangan jumlah antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh maka

terjadilah stres oksidatif, dimana radikal bebas bukan hanya bereaksi dengan sel mikroorganisme, tetapi juga sel tubuh sendiri dan menimbulkan banyak kerusakan yang sifatnya tidak hanya lokal (mulut dan saluran nafas) tetapi juga sistemik (melalui peredaran darah) (Sitepoe, 2004).

Asap rokok merupakan campuran kompleks toksik yang terdiri atas radikal bebas, aldehid, dan bahan karsinogenik lainnya seperti nitrosamin. Menurut strukturnya, asap rokok dapat dibagi menjadi dua bagian besar, yakni (El-Zayadi, 2006) :

1) Komponen gas (Fase gas)

Komponen ini mengandung kurang lebih  $10^{15}$  radikal bebas tiap hembusan, terutama tipe alkil dan peroksil. Fase ini merupakan bagian yang dapat melewati *filter fibre glass*, yang termasuk dalam komponen ini adalah karbon monoksida (CO), oksida nitrogen (NO), amonia, gas nitrosamin, hidrogen sianida, aldehid, asetaldehid, dan formal dehid. Komponen-komponen tadi dapat menyebabkan penurunan kadar GSH, suatu antioksidan alami yang diproduksi tubuh. Asap yang dihirup perokok pasif bisa mencapai  $10^{15}$  radikal NO dan  $\text{NO}_2$  dengan konsentrasi yang tinggi, yakni sekitar 500-1000 ppm. Nitrat yang ditambahkan ke dalam rokok untuk meningkatkan pembakaran, merupakan sumber nitrogen radikal.

2) Komponen padat (Fase partikulat)

Komponen ini bisa tersaring di dalam filter dan merupakan radikal yang stabil. Yang termasuk dalam komponen ini adalah radikal semiquinon, quinon, nikotin, tar, logam (nikel, besi, kadmium), benzipren, dan dibensokarbasol.

Berdasarkan toksikologinya, asap rokok dibagi menjadi 2 kategori, yaitu (Sitepoe, 2000) : *Mainstream smoke* (MS) dan *Sidestream smoke* (SS). *Mainstream smoke* adalah asap yang dihisap langsung oleh perokok aktif saat rokok dihisap. *Sidestream smoke* adalah asap pembakaran rokok antara dua hisapan. Perokok aktif terpapar asap *Mainstream smoke* maupun *Sidestream smoke*, sedangkan perokok pasif hanya terpapar asap *Sidestream smoke*, meskipun begitu komposisi kimia *Mainstream smoke* dan *Sidestream smoke* relatif sama. Perbedaan antara keduanya adalah temperatur *Mainstream smoke* yang lebih tinggi dari *Sidestream smoke*. Perbedaan temperatur ini tidak membuat asap *Sidestream smoke* menjadi lebih aman dibandingkan *Mainstream smoke*, tembakau yang terbakar pada temperatur lebih rendah (tidak sedang dihisap) menyebabkan pembakaran yang tidak sempurna dan asap rokok yang dihasilkannya lebih banyak mengandung bahan kimia. Perokok pasif berafaskan dengan udara yang mengandung asap rokok yang dikeluarkan perokok aktif atau disebut juga *Environment Tobacco Smoke* (ETS) dan asap *Sidestream smoke* (sisa pembakaran tembakau). Hal ini jelas sangat mengancam kesehatan para perokok pasif.

Hewan peliharaan seperti anjing dan kucing termasuk dalam perokok pasif yang dapat dengan mudah menderita kerusakan paru dan organ lainnya akibat asap rokok baik secara *secondhand* maupun *thirdhand*. *Secondhand* merupakan asap rokok yang keluar dari ujung rokok dan dihembuskan oleh perokok menyebar ke udara masuk melalui inhalasi ke paru-paru dan ke organ lain pada hewan, sedangkan asap rokok yang menempel pada karpet, rambut dan benda-

benda di sekitar hewan masuk ke dalam tubuh peroral seperti melalui jilatan disebut *thirdhand* (Tu, 2009).

### 2.3 Struktur Hepar

Hepar merupakan organ parenkim yang berukuran terbesar dan memegang peranan penting dalam proses metabolisme tubuh. Selain itu, hepar memiliki banyak fungsi antara lain untuk menyimpan dan menyaring darah, membentuk protein plasma seperti albumin, menghasilkan cairan empedu, sebagai tempat penyimpanan vitamin A dan besi, dan mampu mendetoksikasi berbagai obat dan toksik menjadi inaktif atau larut air (Christa, 2003).

Hepar tampak berpola heksagonal dengan ukuran bervariasi pada potongan melintang. Sel-sel parenkimnya tersusun radier terhadap vena sentral dan dipisahkan oleh sinusoid. Dinding sinusoid dilapisi selapis endotel yang tidak kontinyu sehingga memungkinkan plasma darah langsung berhubungan dengan sel-sel hepar, sehingga terjadi pertukaran metabolit antara darah dan parenkim hepar. Selain endotel, pada sinusoid juga terdapat sel Kupffer yang merupakan sel makrofag fagositik. Sel ini berfungsi memfagositosis eritrosit tua dan membersihkan darah dari basilus kolon (Christa, 2003).

Celah yang memisahkan sel-sel endotel dengan hepatosit disebut ruang perisinusoidal (ruang Disse), yang berisi mikrovili dari hepatosit. Ruang Disse ini terdapat sel stelata atau sel penimbun lemak (sel Ito) yang mampu menyimpan vitamin A yang diberikan dari luar. Sel Ito diduga berperan dalam pembentukan fibrosis hepar dengan cara sintesis kolagen (Nurdjaman, 2003).



Konsep terbaru dari unit fungsional hepar terkecil adalah asinus hepar yang terdiri atas sel-sel parenkim sekitar arterioli, venul dan duktus biliaris terminal serta terletak di antara dua vena sentralis. Konsep asiner ini dapat menjelaskan gangguan patofisiologis penyakit hepar. Tiga zona dalam asinus hepar adalah zona-1 (periportal), daerah elipsoid yang mengelilingi arterioli hepatis dan venul porta terminal; zona-2 (midzonal) di tengah; zona-3 (zona sentral), dekat vena sentral. Aktivitas metabolik sel-sel tersebut juga berbeda. Zona-1 banyak dijumpai enzim metabolisme oksidatif dan glukoneogenesis, zona-3 banyak terdapat enzim glikolisis, metabolisme obat dan lipid. Sedangkan pada zona-2 memiliki zona campuran. Sel-sel hepatosit dalam ketiga zona secara intrinsik memiliki potensi yang sama untuk mengubah struktur dan fungsinya sebagai respons atas perubahan lingkungan-mikronya. Susunan zona ini bertanggung jawab dalam kerusakan selektif hepatosit akibat berbagai agen toksik atau berbagai keadaan penyakit. Pada keadaan toksik, penimbunan lipid dimulai dari sel-sel hepatosit zona-3. Zona-3 juga merupakan daerah yang paling mudah terkena cedera akibat insufisiensi vaskuler sehingga terjadi nekrosis sel hepar (Kasno, 2003).

Kerusakan hepar akibat bahan kimia ditandai dengan lesi awal yaitu lesi biokimiawi, yang memberikan rangkaian perubahan fungsi dan struktur. Perubahan struktur hepar akibat obat yang dapat tampak pada pemeriksaan mikroskopis antara lain (Sarjadi, 2003) :

### 1. Radang

Radang bukan suatu penyakit namun reaksi pertahanan tubuh melawan berbagai jejas. Dengan mikroskop tampak kumpulan sel – sel fagosit berupa monosit dan polimorfonuklear.

### 2. Fibrosis

Fibrosis terjadi apabila kerusakan sel tanpa disertai regenerasi sel yang cukup. Kerusakan hepar secara makroskopis kemungkinan dapat berupa atrofi atau hipertrofi, tergantung kerusakan mikroskopis.

### 3. Degenerasi

Degenerasi dapat terjadi pada inti maupun sitoplasma. Degenerasi pada sitoplasma misalnya :

- a. Perlemakan, ditandai dengan adanya penimbunan lemak dalam parenkim hepar, dapat berupa bercak, zonal atau merata.. Pada pengecatan inti terlihat terdesak ke tepi rongga sel terlihat kosong diakibatkan butir lemak yang larut pada saat pemrosesan.
- b. Degenerasi Hidropik, terjadi karena adanya gangguan membran sel sehingga cairan masuk ke dalam sitoplasma, menimbulkan vakuola-vakuola kecil sampai besar. Terjadi akumulasi cairan karena sel yang sakit tidak dapat menyingkirkan cairan yang masuk.
- c. Degenerasi Hialin, termasuk degenerasi yang berat. Terjadi akumulasi material protein diantara jaringan ikat.
- d. Degenerasi Amiloid, yaitu penimbunan amiloid pada celah disse, sering terjadi akibat amiloidosis primer ataupun sekunder.

Degenerasi pada inti :

- e. Vakuolisasi, inti tampak membesar dan bergelembung, serta kromatinnya jarang, dan tidak eosinofilik.
- f. Inclusion bodies, terkadang terdapat pada inti sel hepar.

#### 4. Nekrosis

Nekrosis adalah kematian sel atau jaringan pada organisme hidup. Inti sel yang mati dapat terlihat lebih kecil, kromatin dan serabut retikuler menjadi berlipat-lipat. Inti menjadi lebih padat (piknotik) yang dapat hancur bersegmen-segmen (karioreksis) dan kemudian sel menjadi eosinofilik (kariolisis). Sel hepar yang mengalami nekrosis dapat meliputi daerah yang luas atau daerah yang kecil. Berdasarkan lokasi dan luas nekrosis dapat dibedakan menjadi berikut (Kasno dkk., 2003) :

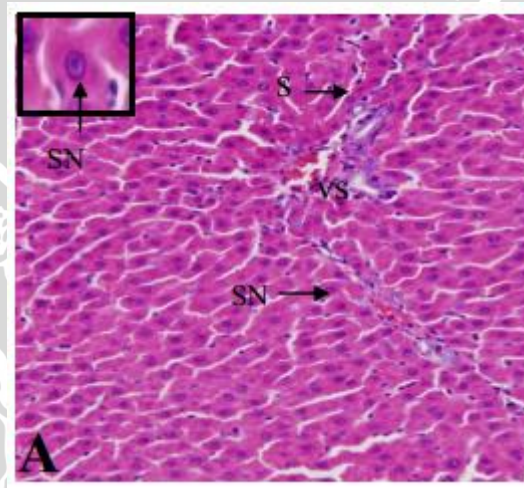
- a. Nekrosis fokal, adalah kematian sebuah sel atau kelompok kecil sel dalam satu lobus.
- b. Nekrosis zonal, adalah kerusakan sel hepar pada satu lobus. Nekrosis zonal dapat dibedakan menjadi nekrosis sentral, midzonal dan perifer.
- c. Nekrosis masif yaitu nekrosis yang terjadi pada daerah yang luas.

Sedangkan berdasarkan bentuknya nekrosis dapat digolongkan antara lain :

- a. Koagulative, terjadi akibat hilangnya fungsi sel secara mendadak yang diakibatkan hambatan kerja sebagian besar enzim.
- b. Nekrosis likuefaktif, terjadi karena pencairan jaringan akibat enzim hidrolitik yang dilepaskan sel yang mati.

- c. Nekrosis kaseosa, merupakan bentuk campuran dari likuefaktif dan koagulatif. Secara makroskopik teraba kenyal seperti keju. Mikroskopik terlihat masa amorf yang eosinofilik.

Struktur histologis hepar *R. norvegicus* yang normal ditunjukkan pada gambar 2.1 (Wulandari, 2012). Pada hepatosit bisa dijumpai adanya satu inti atau beberapa inti di tengah sel. Nukleus terlihat jelas struktur dan batasnya. Permukaan tiap hepatosit berhubungan dengan sinusoid atau hepatosit lain.



**Gambar 2.1** Gambaran histologi hepar *R. norvegicus* pada perbesaran HE 400 (Wulandari, 2012).

Keterangan : S: Sinusoid; SN: Sel normal VS: Vena Sentralis. Insert menunjukkan gambaran sel hepatosit yang diperbesar.

#### 2.4 Enzim Protease

Protease disebut juga peptidase, merupakan enzim golongan hidrolase yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang sederhana. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat essential dalam metabolisme protein. Selain itu,

enzim ini berperan dalam tubuh untuk membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, neurotransmitter, serta berperan dalam fungsi fisiologis misalnya respon imun dan inflamasi. Jika enzim protease dilepaskan maka menyebabkan kerusakan pada jaringan. Adanya peningkatan ROS yang berlebih pada hepar, secara tidak langsung juga memicu peningkatan aktivitas enzim protease yang berlebih sehingga mampu merusak dari kerja hepar melalui inflamasi pada hepar (Poliana, 2007)

Protease berperan dalam proses kesembuhan luka dan fagositosis mikroorganisme pada jaringan inflamasi. Aktivitas protease yang tidak terkontrol pada jaringan inflamasi akan menyebabkan kerusakan pada jaringan. Aktivitas protease yang dihasilkan neutrofil akan merusak sel melalui mekanisme fagolisosom mikroorganisme. Satu unit aktivitas enzim menurut persetujuan internasional didefinisikan pada kondisi optimal enzim protease (Hantoko dan Drajat, 2003).

## 2.5 Patomekanisme Pertahanan Hepar

*Reactive Oxygen Species* (ROS) dari asap rokok masuk ke dalam tubuh perinhalasi dan akan dikenali protektor sebagai antigen. Apabila jumlah radikal bebas ini masuk ke dalam tubuh terlalu banyak dan tidak diimbangi antioksidan dalam tubuh, maka akan menimbulkan reaksi inflamasi. Beberapa komponen inflamasi akan meningkatkan permeabilitas vaskular dan mengaktifkan sel-sel inflamasi seperti leukosit. Hepar akan merespon adanya antigen dengan mensekresi protein yang akan menarik neutrofil untuk menghasilkan protease.

Sekresi protease secara alami dapat dihambat oleh protease inhibitor. Protease inhibitor pada hepar berfungsi sebagai protektor hepar terhadap protease hasil fagositosis dan respon inflamasi dalam melawan antigen yang masuk ke hepar. Defisiensi protease inhibitor akan menyebabkan proteolisis pembentuk jaringan organ sehingga terjadi kerusakan jaringan (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.6 Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.)

Pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) merupakan tanaman yang tersebar luas di daerah beriklim tropis. Pohon beringin terdiri dari berbagai spesies yang tersebar luas di Indonesia. Salah satu spesies *Ficus* adalah (*Ficus benjamina* L.)

Klasifikasi pohon beringin adalah sebagai berikut (Starr *et al.*, 2003) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Ordo	: Urticales
Famili	: Moraceae
Genus	: <i>Ficus</i>
Spesies	: <i>Ficus benjamina</i> L.

Morfologi khas dari *Ficus benjamina* L. Adalah pohonnya kokoh berdiri dengan tinggi sekitar 20-25 m, memiliki percabangan simpodial, pada batang tumbuh akar gantung berwarna coklat kehitamana. Pohon beringin ini memiliki daun tunggal, lonjong, panjang 3-6 cm, lebar 2-4 cm, pertulangan menyirip, hijau. Bunga tunggal, di ketiak daun, kelopak dan putik halus, bentuk corong, benang sari dan mahkota bulat, kuning kehijauan, buah buni, bulat, panjang 0,5-1 cm. Biji bulat, keras, putih. Akar tunggang, berwarna coklat (Starr *et al.*, 2003).

Pohon beringin dapat digunakan sebagai antipiretik, antiinflamasi, dan sebagai diuretik. Pada daun pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) mengandung flavonoid, saponin (Fahirah, 2008). Flavonoid merupakan antioksidan yang potensial dan terdapat pada tumbuh-tumbuhan herbal karena kandungan kuersetin, antosianidin, dan prosianidin. Flavonoid dapat mengurangi adanya radikal bebas dalam tubuh dengan cara bertindak sebagai agen/reduksi dengan menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet (Kumaran dan Karunakaran, 2007). Bioaktif dari ekstrak akar gantung pohon beringin terdiri dari senyawa fenolik yang dapat menurunkan jumlah sel nekrosis dan memperbaiki kerusakan sel epitel pada penyakit bronkitis kronik (Aurizza dkk., 2013). Flavonoid juga dapat mengurangi ion metal sehingga mengurangi adanya radikal bebas dan menahan vitamin E pada partikel LDL sehingga melindungi oksidasi LDL (Soeharto, 2004).

### **2.7 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah tikus putih. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara baik, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang adaptif serta cocok untuk berbagai penelitian. Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia

Family : Muridae  
Subfamily : Murinae  
Genus : Rattus  
Spesies : *Rattus norvegicus*

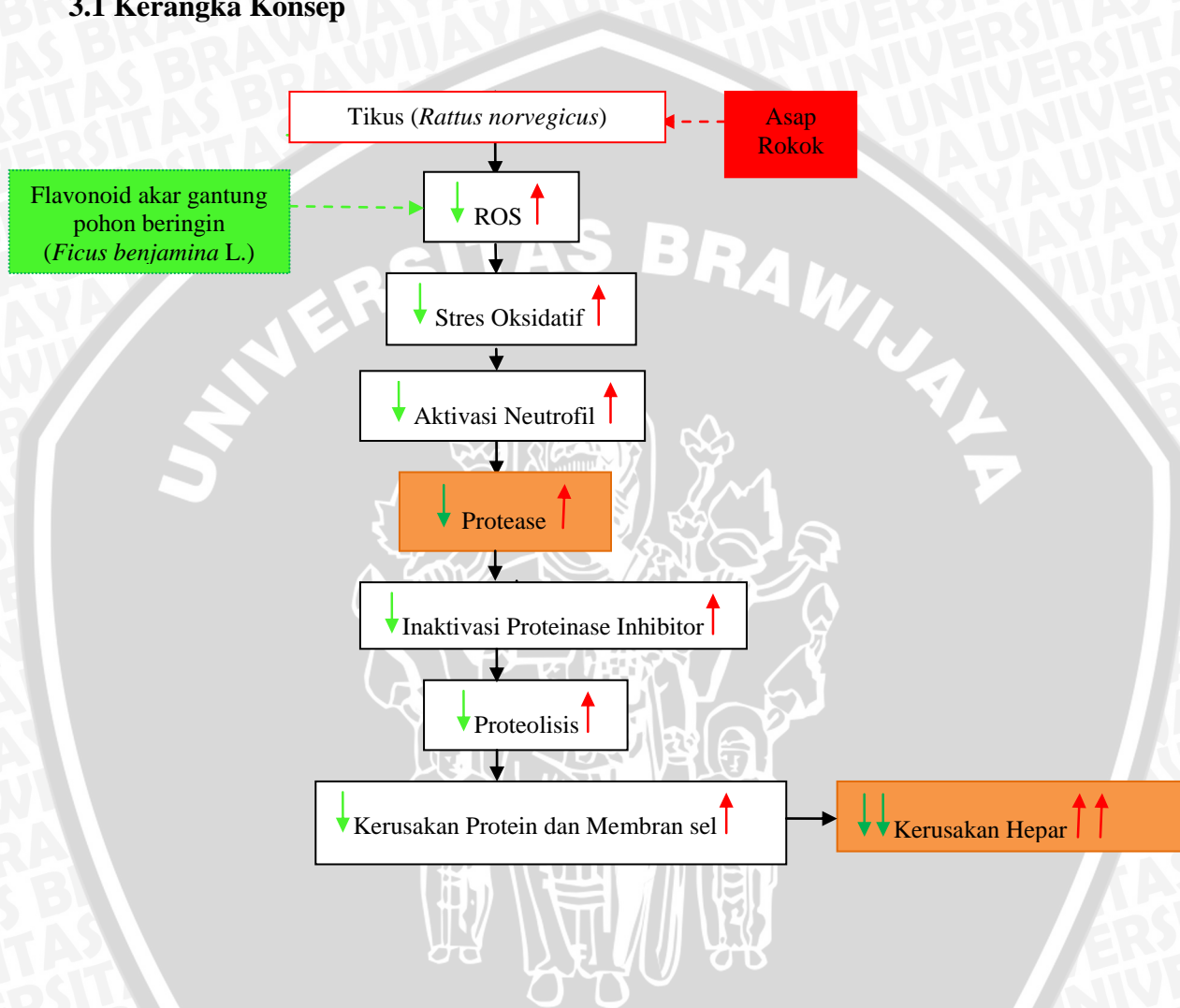
Morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki waktu 2,5-3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004).














## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- |   |                         |   |                      |
|---|-------------------------|---|----------------------|
|  | : Sel dan Mediator      |  | : Paparan Asap Rokok |
|  | : Variabel yang diamati |  | : Terapi             |
|  | : Peningkatan           |  | : Patomekanisme      |
|  | : Penurunan             |   |                      |
|  | : Terapi                |   |                      |
|  | : Paparan asap rokok    |   |                      |

Asap rokok merupakan hasil pembakaran tembakau berupa gas yang mengandung berbagai bahan kimia berbahaya bagi tubuh yang merupakan radikal bebas. Asap rokok dikelompokkan menjadi fase padat dan fase gas. Komponen yang termasuk dalam fase padat antara lain yaitu tar, benzena yang bersifat karsinogen dan nikotin yang menyebabkan kerusakan syaraf. Sedangkan komponen yang termasuk fase gas salah satunya karbon monoksida (CO). CO merupakan gas yang dihasilkan dari pembakaran yang kurang sempurna yang mengganggu aliran darah. Radikal bebas yang berasal dari asap rokok masuk ke dalam paru-paru melalui saluran nafas, kemudian langsung dibawa oleh aliran darah menuju ke jantung dan diedarkan ke seluruh tubuh, termasuk hepar. Hepar merupakan organ yang berperan penting dalam tubuh, sangat penting untuk mempertahankan fungsi hidup dan berperan dalam hampir setiap metabolisme tubuh, terutama fungsi detoksifikasi.

ROS yang tinggi di hepar dapat menyebabkan stress oksidatif sehingga sel-sel inflamasi hepar seperti sel kupffer dan neutrofil aktif dan terjadi pelepasan mediator inflamasi berupa protease. Keadaan ini menyebabkan terjadinya inaktivasi proteinase inhibitor dan protease diproduksi berlebihan sehingga terjadi inflamasi dan kerusakan jaringan. Tingginya aktivitas protease digunakan sebagai indikasi adanya inflamasi pada hepar hewan coba tikus yang dipapar asap rokok. Protease yang meningkat akibat paparan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepatosit dan pelebaran sinusoid hepar.

Hewan coba tikus yang dipapar asap rokok akan diterapi dengan ekstrak akar gantung pohon beringin yang diketahui mengandung senyawa fenolik berupa

flavonoid sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara menghambat pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas dari asap rokok yang terdapat di hepar sehingga tidak terjadi stres oksidatif dan senyawa menjadi stabil. Mekanisme ini akan memberikan efek perbaikan terhadap jaringan yang rusak akibat stress oksidatif. Aktivitas protease akan menurun menyebabkan berkurangnya inflamasi pada hepar dan perbaikan gambaran histopatologi hepar.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) menurunkan aktivitas enzim protease hepar tikus yang dipapar asap rokok.
2. Ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) memperbaiki kerusakan hepar berdasarkan gambaran histopatologi hepar dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014-April 2015 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 3 bulan. Berat badan tikus rata-rata 200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

$$5(n-1) \geq 5$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 perlakuan diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit atau ulangan sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang digunakan sebagai sampel adalah 20 ekor tikus.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol tikus sehat (-), kelompok kontrol tikus sakit sehat (+) dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 4 ekor tikus setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan, kelompok terapi 1 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 4 ekor tikus setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 50 mg/kg BB selama 2 minggu setelah pengasapan, kelompok terapi 2 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 4 ekor tikus setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 75 mg/kg BB, dan kelompok terapi 3 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 4 ekor tikus setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 100 mg/kg BB selama 2 minggu setelah pengasapan. Pada hari ke-29 tikus dibedah dan dikoleksi organ heparnya. Kelompok tikus sehat merupakan tikus tanpa perlakuan. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus sebagai ulangan.

### 4.4. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian paparan asap rokok dan bioaktif air ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.)

Variabel tergantung : Aktivitas enzim protease dan histopatologi hepar

Variabel kendali : Hewan coba strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan, minum, suhu kandang, kelembaban kandang.

#### 4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asap rokok, akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.), organ hepar, PBS, PFA 10 %, dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Germany), HCl (Merck), KCl (merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), NaCl (Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck), Tween-20 (Biorad),  $\text{NaN}_3$  (Biorad), Tris-HCl (Biomedical),  $\text{KmnO}_4$  (Merck), Poly Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) (Sigma),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck), NaOH (Merck), tirosin (Merck),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck), xilol, parafin, Tri Chloro acetic Acid (TCA) 4% (Sigma), akuades steril (Cahyani, 2014).

Alat yang digunakan yaitu bak plastik berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm yang ditutupi dengan penutup berbahan kawat sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas objek, labu takar, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas, gelas arloji, mortar mikro pipet, penangas air, waterbath, stirer, tabung polipropilen, pH meter (Inolab-WTW), penjepit, mikroskop, neraca analitik (sartoric basic P-160), seperangkat alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometer UV-VIS, mikroskop cahaya (Nikon), autoclave, tisu dan sarung tangan (Asrini, 2013).

#### 4.6 Tahapan Penelitian

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan berupa ransum basal standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) dengan komposisi karbohidrat, protein 10%, lemak 3 %,

mineral, vitamin dan air 12 %. Masing-masing kelompok perlakuan ditempatkan dalam kandang berupa bak plastik dengan penutup berbahan kawat berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5. kandang diletakkan pada ruangan yang bebas kegaduhan, polutan, berventilasi cukup dengan suhu optimum 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% (Asrini, 2013).

#### **4.6.2 Tatalaksana Induksi Asap Rokok**

Induksi asap rokok dilakukan pada kelompok tikus kontrol positif, kelompok terapi TI, TII, dan TIII. Pemaparan asap rokok dengan dosis 2 batang untuk 5 ekor tikus dilakukan setiap hari selama 2 minggu (Arkeman dan David, 2006) dalam box pengasapan (Mansour, 2013).

#### **4.6.3 Tatalaksana Ekstraksi Bioaktif Akar Gantung Pohon Beringin**

*(Ficus benjamina L.)*

Bioaktif akar gantung pohon beringin diekstraksi dengan metode ekstraksi dekoksi yakni ekstraksi yang dilakukan dengan ekstrak akar dengan memperhatikan suhu pelarut dan titik didih air dalam kurun waktu lebih dari 30 menit. Flavonoid dalam air ekstrak dapat diuji dengan Uji Fitokimia dan dikonfirmasi dengan Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Sari, 2013).

##### **a. Pembuatan Ekstrak**

Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) berdiameter 3-5 cm diambil dan diiris tipis. Irisan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) tersebut dicuci dan dikeringkan. Setelah kering ditimbang sesuai dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan atau terapi.

Kemudian direbus 100 ml aquadest dan irisan akar gantung pohon beringin itu pada suhu 79°C sampai air menyusut hingga 10 mL.

#### **b. Uji Fitokimia Bioaktif Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin**

*(Ficus benjamina L.)*

Uji fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk melihat keberadaan kandungan atau golongan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan terpenoid yang dapat digunakan sebagai obat herbal. Uji fitokimia dilakukan dengan disertai uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kromatografi lapis tipis dimanfaatkan untuk memisahkan senyawa dalam ekstrak. Uji konfirmasi kandungan bioaktif dilakukan dengan menggunakan pelarut yang terdiri dari 3 mL asam asetat, 4 ml etil asetat dan 4 ml dietil eter. Selanjutnya diteteskan pelarut tersebut pada plat KLT, diamati noda yang terbentuk di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm dan dianalisis menggunakan spektrofotometer infrared (IR) agar gugus-gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak akar gantung pohon beringin dapat diketahui (Shofia, 2013). Setiap noda dianalisis dengan perhitungan harga Rf (*retardation factor*) dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan noda dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan eluen dari tempat awal}}$$

#### **4.6.4 Tatalaksana Terapi**

Terapi dilakukan dengan penyondean bioaktif akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dalam air ekstrak sesuai dosis antar kelompok yang diinduksi asap rokok, yaitu :



Perlakuan I : kelompok kontrol (-), tikus sehat yang tidak dipapar asap rokok, pembedahan dilakukan pada hari ke 29.

Perlakuan II : kelompok kontrol (+), tikus sakit dipapar asap rokok, pembedahan dilakukan pada hari ke 29.

Perlakuan III : tikus dipapar asap rokok, disonde ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dilakukan dengan dosis 50 mg / kg BB , pembedahan dilakukan pada hari ke 29.

Perlakuan IV : tikus dipapar asap rokok, disonde ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dilakukan dengan dosis 75 mg / kg BB , pembedahan dilakukan pada hari ke 29.

Perlakuan V : tikus dipapar asap rokok, disonde ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dilakukan dengan dosis 100 mg / kg BB, pembedahan dilakukan pada hari ke 29.

#### 4.6.5 Pengambilan Organ Hepar

Pengambilan organ hepar pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-29. Langkah awal adalah dengan melakukan dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan dan organ hepar diisolasi. Organ hepar dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9 % dingin, kemudian hepar lainnya disimpan dalam larutan Phostapate Buffer Saline-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan disimpan dalam

refrigerator sebagai sampel isolasi enzim protease. Hepar dimasukkan dalam larutan PFA 10 % untuk pembuatan preparat histologi (Wati dkk., 2013).

#### **4.6.6 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease**

Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

##### **a. Isolasi Protease**

Organ hepar dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas blok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 2 ml dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan autoclave. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Cahyani, 2014).

##### **b. Pembuatan Kurva Baku Tirosin**

10 labu ukur masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 ml dengan konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm. Kemudian ditambah akuades hingga tanda batas selanjutnya selanjutnya

tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dihomogenkan. Setelah itu dilakukan pengukuran serapan pada masing-masing konsentrasi larutan baku dengan panjang gelombang maksimum yaitu 275 nm dengan akuades sebagai blanko (Cahyani, 2014).

### c. Pengukuran Aktivitas Protease

Menurut metode Walter, langkah awal yang harus dilakukan adalah dengan mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200, 300, larutan buffer fosfat pH 7 dan 100, enzim protease dan didiamkan 60 menit di dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 400 larutan TCA 4% didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar). Kemudian dihomogenkan dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 100 dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim (Cahyani, 2014).

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}] \times v}{\text{Mr. Tirosin} \times p \times q} \times f_p$$

Dimana :  $v$  = volume total sampel (mL)

$q$  = waktu inkubasi (mL)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

#### 4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Langkah-langkah dalam proses pembuatan preparat histopatologi berdasarkan Lemanepa (2005), yaitu:

##### a. Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan.

Jaringan hepar difiksasi dengan formalin buffer 4% selama 18-24 jam.

##### b. Dehidrasi

Dehidrasi proses pengeluaran air dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan dimasukkan dalam aquades selama 1 jam kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%, 50%, 70%, 90% sampai alkohol absolut.

##### c. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan (*Clearing*) merupakan proses mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Jaringan dimasukkan ke larutan alkohol xylol selama 1 jam, larutan xylol murni selama 2x2 jam.

##### d. *Embedding*

*Embedding* merupakan proses untuk mengeluarkan cairan *clearing* agent dari jaringan dan diganti dengan parafin. Jaringan hepar dicelupkan ke dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah hingga parafin memadat.

#### e. **Pemotongan (*Sectioning*) dan Penempelan pada Gelas Objek**

Jaringan dipotong dengan blok parafin dengan mikrotom setebal 4 mikron, secara cross section/melintang. Irisan diletakkan pada poly-1-lysin slide. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas hot plate 38-40°C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 39-40°C lalu siap diwarnai dengan Hematoksin-Eosin (HE).

#### 4.6.8 **Pewarnaan Hematoksin Eosin**

Pewarnaan HE ini terdiri dari zat warna yaitu hematoxylin dan eosin. Preparat dimasukkan dalam larutan xylol 1 dan 2 selama 5 menit, kemudian dimasukkan dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, 95%, 90%, 80%, dan 70% selama 5 menit. Jaringan kemudian direndam selama 5 menit. Preparat selanjutnya diwarnai dengan pewarna hematoksin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas akuades selama 5 menit. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas akuades selama 5 menit. Setelah preparat diwarnai, preparat dimasukkan pada alkohol dari 80%, 90%, dan 95% hingga alkohol absolut. Selanjutnya preparat dimasukkan ke dalam larutan xylol 1-3 selama 3 menit dan dikering anginkan. Terakhir, dilakukan perekatan menggunakan entelan serta ditutup menggunakan coverglass (Lemanepa, 2005).

#### 4.6.9 Pengamatan Preparat Histopatologi

Hasil pembuatan preparat histopatologi hepar menggunakan mikroskop Nikon perbesaran 400x untuk melihat adanya perubahan pada sel hepar.

#### 4.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil perlakuan aktivitas enzim protease dianalisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Tukey dengan  $\alpha = 0,05$  untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Data yang diperoleh dari hasil gambaran histopatologi dianalisis menggunakan analisis deskriptif.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap Aktivitas Protease Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Unit aktivitas protease merupakan banyaknya mikromol ( $\mu\text{mol}$ ) tirosin hasil hidrolisis ikatan peptide pada protein oleh protease dari organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan waktu inkubasi 60 menit. Hasil pengukuran aktivitas protease hewan coba (*Rattus norvegicus*) pada hepar yang telah dipapar asap rokok tertera dalam Tabel 5.1.

**Tabel 5.1** Perbandingan Aktivitas Protease pada hewan coba tiap perlakuan

Kelompok	Aktivitas protease ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ )	Aktivitas protease (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol (-)	$0,226 \pm 0,007^a$	-	-
Kontrol (+)	$0,392 \pm 0,009^d$	73,45	-
Terapi I (50 mg/kg BB)	$0,271 \pm 0,008^c$	-	30,86
Terapi II (75 mg/kg BB)	$0,233 \pm 0,027^b$	-	40,56
Terapi III (100 mg/kg BB)	$0,192 \pm 0,007^a$	-	51,02

Keterangan : Notasi a, b, c, d dan e menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan ( $P < 0,05$ )

Hasil analisa aktivitas protease secara statistika menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa terapi ekstrak akar gantung pohon beringin

memberikan pengaruh yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok (Tabel 5.1). Aktivitas protease organ hepar kelompok tikus kontrol positif berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi. Hal ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok yang mengandung molekul berbahaya dari fase padat dan fase gas meningkatkan aktivitas protease organ hepar. Aktivitas protease kelompok tikus terapi I, II dan III berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease organ hepar kelompok tikus kontrol positif. Pada penelitian ini belum teruji ekstrak akar gantung pohon beringin dapat menurunkan aktivitas protease, yaitu kecuali dosis terapi sampai 100 mg/kg BB dapat menurunkan aktivitas protease sebesar 51,02 %.

Kelompok tikus kontrol negatif memiliki aktivitas protease yaitu  $0,226 \pm 0,007 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ . Aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi akibat pengaruh perlakuan. Protease secara normal terdapat di dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan tubuh yaitu pemecahan protein asing yang masuk dalam tubuh (Pratiwi dkk., 2013).

Aktivitas protease pada kelompok kontrol positif yaitu lebih besar dari kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan oleh molekul berbahaya dalam asap rokok berupa fase padat dan fase gas yang dipaparkan pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*). Asap rokok fase padat memiliki kandungan  $>10^{17}$  radikal bebas/g, dan  $>10^{15}$  radikal bebas/kali isapan. Komponen yang termasuk dalam fase padat di antaranya adalah tar yang diketahui mengandung sekitar empat puluh



bahan kimia yang dapat menyebabkan kanker karena bersifat karsinogen, benzopiren merupakan sejenis hidrokarbon aromatik polisiklik sebagai bahan pencetus kanker, dan nikotin yang merupakan penyebab utama timbulnya serangan jantung dan stroke. Radikal bebas dari fase padat memiliki waktu paruh lebih lama (beberapa jam sampai bulan), sedangkan radikal dari asap fase gas hanya memiliki waktu paruh beberapa detik. Komponen yang termasuk dalam fase gas salah satunya ialah karbon monoksida (CO). CO adalah gas beracun yang biasanya dihasilkan pada pembakaran yang kurang sempurna, sering dikeluarkan oleh kendaraan bermotor. Gas ini menggagalkan pasokan ke sel-sel di jaringan, dapat menyebabkan kematian bila kadarnya di dalam tubuh cukup tinggi. Gas CO memiliki kemampuan yang lebih kuat untuk berikatan dengan hemoglobin dalam sel-sel darah merah daripada oksigen.

Radikal bebas yang berasal dari asap rokok masuk ke dalam paru-paru melalui saluran nafas, kemudian langsung dibawa oleh aliran darah menuju ke jantung dan diedarkan ke seluruh tubuh, termasuk hepar. Hepar merupakan organ yang berperan penting dalam tubuh, sangat penting untuk mempertahankan fungsi hidup dan berperan dalam hampir setiap metabolisme tubuh. Fungsi detoksifikasi sangat penting dan dilakukan oleh enzim hepar melalui oksidasi, reduksi, hidrolisis, atau konjugasi zat yang dapat berbahaya dan mengubahnya menjadi zat yang secara fisiologis tidak aktif. ROS dari asap rokok yang tinggi di dalam tubuh dapat mengganggu proses metabolisme dan detoksifikasi oleh hepar. Hal ini dapat menyebabkan proses inflamasi pada hepar hewan coba, sehingga akan mengaktifkan sel-sel inflamasi hepar seperti sel kupffer dan neutrofil yang

teraktivasi dan akan melepaskan protease. Radikal bebas yang tinggi dapat mengganggu struktur dan fungsi protein maupun DNA (Arief, 2007). Senyawa radikal bebas tersebut dapat menyebabkan peningkatan proteolitik dari enzim protease sehingga dapat merusak protein, matriks ekstraseluler, dan meningkatkan kadar protease di dalam organ hepar (Baratawidjaya dan Rengganis, 2013). Radikal bebas asap rokok akan menekan sistem imun tubuh dan melepaskan protease ke dalam sel dan jaringan sebagai bentuk respon seluler (Havelaar *et al.*, 2001). Hal tersebut sesuai dengan nilai aktivitas protease yang tinggi pada kelompok kontrol positif hewan coba yang dipapar asap rokok.

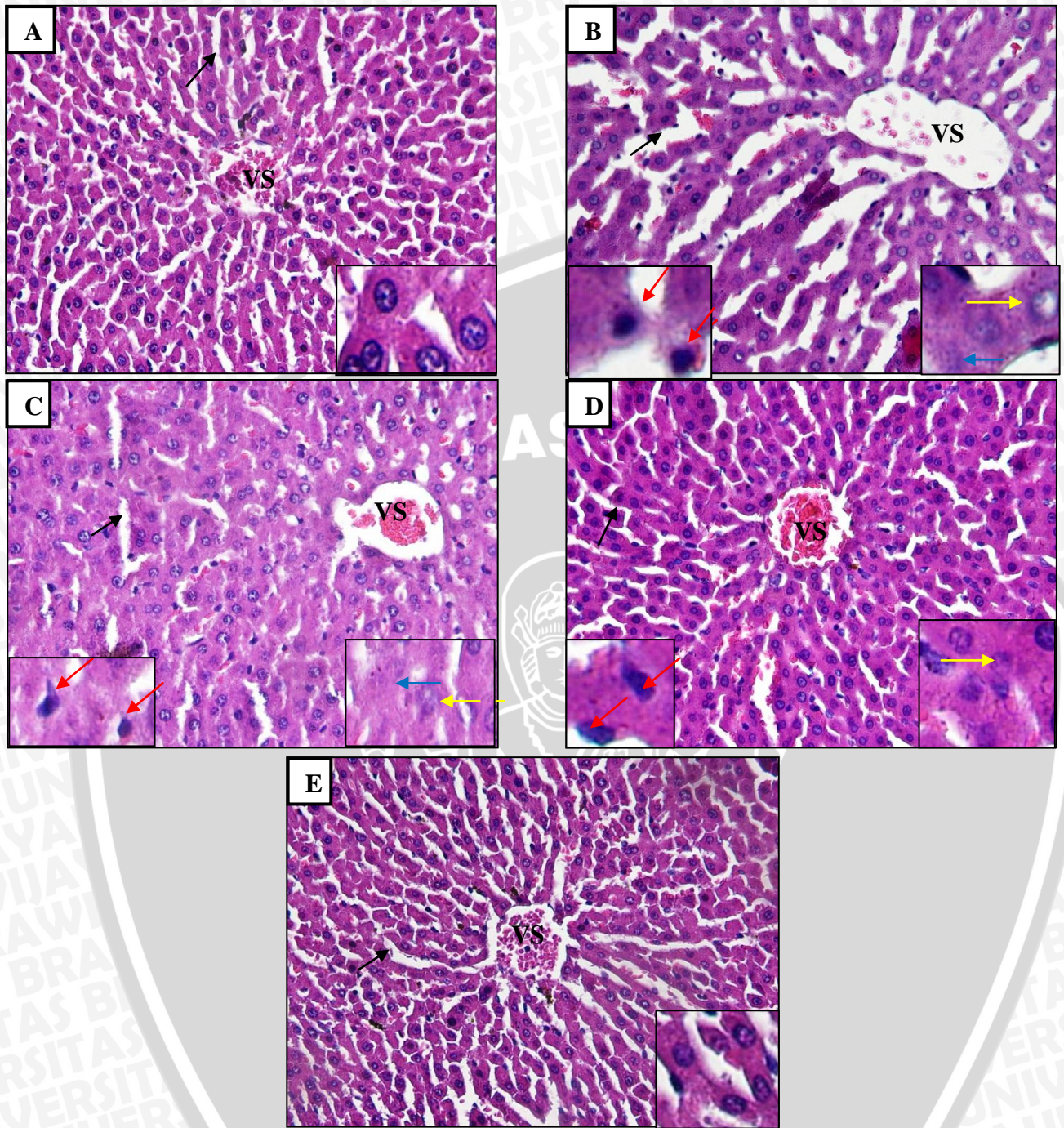
Aktivitas protease pada semua kelompok terapi mengalami penurunan dari kelompok kontrol positif. Penurunan aktivitas protease dalam penelitian ini diyakini karena kandungan flavonoid dalam akar gantung pohon beringin (Lampiran 4). Flavonoid berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan sehingga mampu menghambat pelepasan protease sebagai mediator inflamasi. Kandungan flavonoid pada akar gantung pohon beringin dapat diketahui melalui uji fitokimia (Pratiwi, 2013). Uji fitokimia yang telah dilakukan pada ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) menunjukkan hasil positif senyawa flavonoid yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning coklat setelah penambahan NaOH dan berubah menjadi lebih bening setelah penambahan HCl encer. Hasil tersebut dikonfirmasi dengan melakukan pemisahan senyawa dalam ekstrak menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) yang kemudian dianalisis dengan menggunakan *infra red* (IR) dan didapatkan 3 spot (Lampiran 4).

Radikal bebas asap rokok menyerang membran plasma yang terdiri dari komponen lipid dan komponen protein. Komponen lipid akan mengalami peroksidasi dengan cara menarik atom hidrogen (H) dari rantai samping PUFA, menghasilkan radikal karbon. Kemudian radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen menjadi radikal peroksil, dan menyerang ulang rantai samping PUFA menghasilkan radikal karbon baru dan peroksida lipid. Reaksi ini akan berlangsung terus secara berantai dan berakhir bila diberi antioksidan.

Flavonoid pada akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) bersifat antiinflamasi dan antioksidan bekerja dengan cara menangkap radikal bebas dari asap rokok, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan mengikat oksigen singlet. Hal tersebut menyebabkan *chain reaction* terhenti sehingga oksidan dan antioksidan kembali menjadi stabil. Keseimbangan tersebut akan menghambat aktivasi mediator inflamasi seperti sel kupffer dan neutrofil yang melepaskan protease dan mengurangi terjadinya proteolisis, sehingga terjadi penurunan aktivitas protease di dalam hepar tikus pada kelompok terapi I, terapi II dan terapi III.

## 5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Pengaruh pemberian ekstrak akar gantung pohon beringin terhadap hepar tikus yang dipapar asap rokok dapat diamati dengan gambaran histopatologi hepar yang diamati dengan perbesaran 400 kali untuk mengamati perubahan struktur hepar dan nekrosis. Hasil penelitian pengaruh terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap gambaran histopatologi hepar menggunakan pewarnaan Hemaktosilin-Eosin (HE) ditunjukkan pada Gambar 5.1. Gambaran histopatologi pada kelompok kontrol negatif menunjukkan gambaran histologi organ hepar normal (Gambar 5.1A). Gambar tersebut terlihat sinusoid memancar secara sentrifugal dari vena sentralis. Sel hepatosit normal terlihat memiliki satu nukleus, namun ada juga yang memiliki lebih dari satu nukleus (binukleat) yang terdapat di tengah sel. Menurut Lumongga (2008) bahwa dalam keadaan normal dapat dijumpai sel hepatosit yang memiliki inti lebih dari satu. Histologi kelompok kontrol negatif dapat dijadikan patokan adanya kerusakan maupun perbaikan yang terjadi pada kelompok perlakuan lainnya.



**Gambar 5.1** Histopatologi Hepar dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) (400x)

Keterangan : **A:** Tikus kontrol negatif, **B:** Tikus kontrol positif, **C:** Tikus terapi 50 mg/kg BB, **D:** Tikus terapi 75 mg/kg BB, **E:** Tikus terapi 100 mg/kg BB, (→) : Sinusoid, **VS:** Vena Sentralis, **DS:** Dilatasi Sinusoid, (↔): kariorekrosis inti hepatosit (nekrosis), (↔): kariolisis inti hepatosit, (→):neutrofil, Insert menunjukkan gambaran sel hepatosit yang diperbesar.

Pada kelompok kontrol positif (Gambar 5.1B) dapat dilihat adanya sel nekrosis yang ditandai dengan terjadinya karioreksis dan kariolisis inti sel hepatosit dan sinusoid terlihat tidak beraturan. Kerusakan sel yang terjadi membuktikan bahwa radikal bebas dari paparan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan pada hepar. Penelitian oleh Muliarta, dkk (2009) menyatakan bahwa pada hewan coba tikus yang dipapar asap rokok, diketahui adanya nekrosis pada sel hepatosit.

Radikal bebas dari asap rokok masuk ke dalam paru melalui saluran nafas, kemudian dibawa oleh aliran darah menuju ke jantung dan diedarkan ke seluruh tubuh, termasuk hepar. Radikal bebas menyerang membran plasma yang terdiri dari komponen lipid dan komponen protein. Komponen lipid akan mengalami peroksidasi dengan cara menarik atom H dari rantai samping PUFA, menghasilkan radikal karbon. Kemudian radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen menjadi radikal peroksil, inilah yang menyerang ulang rantai samping PUFA menghasilkan radikal karbon baru dan peroksida lipid. Reaksi ini akan berlangsung terus secara berantai dan menyebabkan kerusakan komponen protein sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi pada hepar. Peningkatan ROS menyebabkan terjadinya inflamasi sehingga meningkatkan proses fagositosis dari neutrofil dan makrofag di hepar. Makrofag di hepar dinamakan sel kupffer. Makrofag dan sel kupffer teraktivasi akan meningkatkan mekanisme *killing* terhadap radikal bebas dari asap rokok. ROS yang berlebih mengakibatkan aktivitas protease juga meningkat (Mastroeni, 2003).

Hasil pengamatan histopatologi kelompok kontrol positif, terlihat adanya perubahan gambaran histopatologi hepar terjadi pada bagian sekitar vena sentralis atau disebut dengan vena zona ventral. Perubahan gambaran histopatologi hepar tersebut dikarenakan adanya zat berbahaya asap rokok yang mengaktifkan beberapa mediator inflamasi dan peningkatan sitokin proinflamasi. Hepar memiliki 3 zona yaitu periportal, midzonal dan ventral. Zona ventral merupakan daerah yang paling sensitif terhadap kerusakan sel hepatosit dikarenakan letaknya yang dekat dengan vena sentralis sehingga memiliki cadangan oksigen yang minim dibanding zona lainnya. Di zona ventral ini aktivitas dari sel hepatosit rendah dan akan aktif bila kebutuhan meningkat sehingga ketika aktivitas sel hepatosit meningkat memungkinkan terjadinya perubahan dari hepatosit (Rescanti, 2009).

Sinusoid mengalami dilatasi dan menjadi tidak beraturan diakibatkan aktivitas inflamasi oleh mediator inflamasi yang dimulai dengan dilatasi pembuluh darah. Sel kupffer akan mengaktifkan mediator inflamasi yang terdiri dari vasoaktif amina (histamine dan serotonin), protease plasma (kinin, leukotriene dan prostaglandin), dan sitokin menyebabkan dilatasi vena sentralis. Plasma protease diproduksi di dalam sel hepar salah satunya kinin. Adanya aktivasi system kinin menyebabkan pembentukan bradikinin yang berefek peningkatan permeabilitas pembuluh darah (dilatasi). Mediator inflamasi juga menyebabkan aliran darah melambat sehingga leukosit bergerak (marginasi) dan menempel ke dinding pembuluh darah (adhesi). Adanya dilatasi dan sel inflamasi di dalam vena sentralis kelompok tikus yang dipapar asap rokok (kontrol positif)

menyebabkan vena sentralis lebih besar dibandingkan dengan vena sentralis kelompok kontrol. Kerusakan jaringan yang terjadi pada saat inflamasi dikarenakan oleh pelepasan protease dari neutrofil. Aktivitas protease yang berlebihan pada hepar menyebabkan kerusakan sel maupun jaringan pada hepar (Tala *et al.*, 2015).

Reaksi zat berbahaya dari fase padat dan fase gas asap rokok yang mengaktifkan sel kupffer dan neutrofil yang melepaskan protease mengakibatkan kerusakan pada membran sel sehingga mengganggu struktur dan fungsi protein dan matriks ekstraseluler, hal ini mengakibatkan terganggunya aktivitas organel-organel sel, salah satunya adalah mitokondria yang berfungsi untuk pompa natrium yang memerlukan ATP untuk mengatur keluar masuknya ion-ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  dari dan keluar hepatosit dengan cara transport aktif terhambat. Mitokondria juga berfungsi sebagai respirasi seluler, bila mitokondria mengalami kerusakan maka enzim-enzim yang berperan dalam siklus transfer elektron akan keluar dari mitokondria. Selanjutnya respirasi seluler tidak dapat berlangsung dan terjadi penurunan energi yang diperlukan untuk aktivitas hepatosit. Hal ini menyebabkan hepatosit mengalami nekrosis yang dapat mengganggu fungsi hepar (Cheville, 2006). Karioreksis adalah salah satu jenis nekrosis dimana inti sel hancur, membentuk fragmen kromatin yang menyebar, dimana membran inti sel telah mengalami lisis sehingga tidak dapat lagi terlihat batas inti sel, sedangkan kariolisis adalah keadaan nekrosis dengan inti sel hilang dan tidak bisa diwarnai sehingga berwarna pucat (Arimbi, dkk., 2015).



Hasil pengamatan histopatologi hepar tikus yang dipapar asap rokok dengan terapi ekstrak akar gantung pohon beringin dosis 50 mg/kg BB (Gambar 5.1C) menunjukkan sedikit perubahan yaitu dilatasi sinusoid yang mengecil dibandingkan dengan gambaran histopatologi hepar tikus kelompok kontrol positif, masih terdapat nekrosis yang ditunjukkan dengan karioreksis dan kariolisis inti sel hepar tikus. Sedangkan hasil pengamatan histopatologi hepar tikus yang dipapar asap rokok dengan terapi ekstrak akar gantung pohon beringin dosis 75mg/kg BB (Gambar 5.1D) menunjukkan perubahan yaitu batas inti sel yang sedikit terlihat jelas, dilatasi sinusoid yang mengecil dan masih terdapat nekrosis yang ditunjukkan dengan karioreksis pada inti sel, namun sudah tidak terdapat kariolisis inti sel. Hal ini dapat diketahui bahwa dosis terapi 50mg/kg dan 75mg/kg BB yang diberikan masih belum bisa memberikan terapi yang maksimal.

Pada dosis terapi ekstrak akar gantung beringin 100mg/kg BB (Gambar 5.1E) menunjukkan gambaran histopatologi menyerupai kelompok A (kontrol negatif), sel hepatosit dan sinusoid terlihat normal tanpa adanya nekrosis hepatosit. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 100mg/kg BB merupakan dosis efektif yang mampu memberikan perbaikan maksimal. Perbaikan pada jaringan hepar ini dikarenakan oleh pengaruh flavonoid pada ekstrak akar gantung pohon beringin yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara menghambat pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas dari asap rokok yang terdapat di hepar sehingga tidak terjadi stres oksidatif dan senyawa menjadi

stabil. Ketika radikal bebas dihentikan maka aktivasi sel-sel dan mediator inflamasi terhambat sehingga mengurangi terjadinya respon inflamasi. Hal tersebut dapat mempercepat proses perbaikan sel hepar sehingga tidak semakin parah. Selain itu, hepar mempunyai kemampuan regenerasi yang tinggi, hilangnya jaringan hepar memacu mekanisme pembelahan sel yaitu pembelahan mitosis dan terus berlangsung sampai perbaikan masa jaringan tercapai. Pembelahan mitosis adalah proses pembelahan inti sel menjadi dua inti sel baru melalui tahap-tahap tertentu dan menghasilkan sel anak dengan jumlah dan jenis kromosom yang sama dengan sel induknya. Dari satu sel lalu menjadi dua sel anak identik, masing-masing sel anak mewarisi kromosom yang sama banyak dengan kromosom induknya. Mula-mulai bagian inti sel membelah, setelah diikuti pembelahan sitoplasma (Junqueira *et al.*, 2005).

Tahap-tahap pembelahan mitosis terdiri dari profase, metafase, anafase, dan telofase. Profase merupakan fase pertama pembelahan, fase ini ditandai dengan benang-benang kromonema menjadi pendek dan bertambah tebal membentuk kromosom homolog dengan duplikatnya sehingga menjadikan kromosom menjadi 2, nukleous dan membran inti menghilang, Sentirol membelah 2 dan bergerak berlawanan kearah dua kutub yang berlawanan pula, Setiap sentirol menuju ke benang spinder. Metafase adalah fase kedua pembelahan, pada fase ini membran inti melebur. Kromosom berkumpul di bidang ekuator yang ada di tengah sel. Kromosom memperbanyak diri maka setiap kromosom terdiri dari dua kromatid. Pada saat ini dapat dikatakan bahwa sel memiliki  $4n$  kromosom. Pada anafase setiap kromosom memisahkan diri menjadi dua bagian yang sama,

masing-masing bergerak menuju ke arah kutub sel yang saling berlawanan, jadi  $2n$  kromosom bergerak ke kutub yang satu, dan  $2n$  kromosom bergerak ke kutub yang lain. Pada telofase kromosom sampai di kutub masing-masing kemudian terbentuk membran inti yang mengelilingi kelompok kromosom. Setiap kedua inti yang baru terbentuk itu, muncul membran pemisah yang memisahkan kedua sel anak tersebut. Mulai terlihat membran inti sel dan nukleolus (Junqueira *et al.*, 2005).

Jaringan yang mengalami nekrosis akan dihancurkan dan dihilangkan oleh makrofag dan neutrofil dengan tujuan untuk mengawali proses perbaikan jaringan. Inflamasi merupakan suatu respon protektif yang digunakan untuk menghilangkan penyebab awal dari jejas sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel. Tujuan dari inflamasi yaitu menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera agar dapat mengisolasi, menghancurkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Proses selanjutnya yaitu terjadinya regenerasi sel, yaitu proses pembentukan, pembaharuan, atau pertumbuhan sel yang baru untuk menggantikan sel yang telah mati atau rusak (Dorland, 2002).

Terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) menunjukkan efek yang baik pada gambaran histopatologi hepar yaitu memperbaiki sel-sel hepar yang rusak akibat zat kimia berbahaya dari fase padat dan fase gas asap rokok. Perbaikan ditunjukkan dengan adanya perbaikan sel hepatosit dan sinusoid. Hasil terbaik ditunjukkan pada kelompok tikus hasil paparan asap rokok terapi III dengan dosis 100mg/kg BB (Gambar 5.1E) yang

mengalami perbaikan sel hepatosit dan sinusoid mendekati normal. Hal tersebut juga didukung oleh perhitungan nilai aktivitas protease yang menurun pada kelompok tikus hasil paparan asap rokok terapi III.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak akar gantung pohon beringin yang mengandung senyawa flavonoid mampu menurunkan aktivitas protease dan perbaikan histopatologi hepar. Flavonoid berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan melalui gugus OH dengan bekerja terhadap enzim prooksidan yang menghambat produksi ROS.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

- 1) Terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dengan dosis 50 mg/kg BB, 75 mg/kg BB dan 100 mg/kg dapat menurunkan aktivitas enzim protease pada organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok. Dosis 100 mg/kg BB adalah dosis efektif terapi terhadap aktivitas protease.
- 2) Terapi ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) dengan dosis 50 mg/kg BB, 75 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB dapat memperbaiki kerusakan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok yang ditunjukkan dengan perbaikan sel hepatosit dan sinusoid hepar. Dosis 100 mg/kg BB adalah dosis efektif terapi terhadap kerusakan hepar.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui spesifikasi flavonoid dan efek bahan aktif akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina* L.) untuk terapi pada manusia maupun hewan peliharaan yang terpapar asap rokok.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. International. 2005. *Officials Methods Of Analysis Of AOAC International. 2 vols. 16 edition.* Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Arief S. 2007. *Radikal Bebas. Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo Surabaya.* Hlm. 1.
- Arimbi, Azmijah A, Darsono R, Plumeriastuti H, Widiyatno T, Legowo D. 2013. *Buku Ajar Patologi Umum Veteriner.* Airlangga University Press.
- Arivazhagan, P., T. Thilakavathy, and C. Panneerselvam. 2000. *Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats.* J. Nutr. Biochem. 11:122-127.2000.
- Arkeman dan David. 2006. *Efek Vitamin C Dan E Terhadap Sel Goblet Saluran Nafas Pada Tikus Akibat Pajanan Asap Rokok.* Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti. Jakarta. *Universa Medicina* April-Juni 2006, Vol.25 No.2
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus.* Animal Diversity Web Online .at://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus norvegicus/ [28 April 2015]
- Aurizza, A.N., A. A. Aryoko., Y. M. Karo., R. M. Hardi., dan T. Cahyani. 2013. *Bioaktif Air Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin (Ficus benjamina L.) untuk Terapi Penyakit Bronkitis Kronik pada Pet Animals.*<http://simlitabmas.dikti.go.id/>. Malang [28 April 2015]
- Asrini, R. 2013. *Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal pada Tikus (Rattus norvegicus) Fribrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase [SKRIPSI].* Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. PKHUB. Malang
- Baratawidjaja, K.G dan I. Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar.* Edisi ke sepuluh. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: Jakarta.
- Cahyani, T. 2014. *Potensi Bioaktif Akar Gantung Pohon Beringin (Ficus benjamina L.) terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Sel Alveoli pada Tikus (Rattus norvegicus) yang Dipapar Asap Rokok.* [SKRIPSI]. Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. PKHUB. Malang
- Cheville NF. 2006. *Introduction to Veterinary Pathology.* Ed ke 3. Oxford: Blackwell Publishing. 147-150.
- Christa, T. M. 2003. *Organ physiology from phenomenological point of view.* Driebergen. Louis Bolk Instituut ; (3): 30

- Diken, H., M. Kelle., C. Tomer., B. Denuz., Y. Baylan., and A. Permet. 2001. *Effects of Cigarette Smoking On Blood Antioxidant Status in Short-Therm and Long-Therm Smokers*. Turk J Med Sci. (31):553-57
- Dorland, W.A.N. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29, Jakarta:EGC, 1765.
- El -Zayadi AR. 2006. *Heavy smoking and liver*. World J Gastroentero ; 12(38): 6098-6101
- Fariyah, F. 2008. *Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus benjamina L terhadap Artemia salina Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis*. [SKRIPSI]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Finkel, T. 2003. *Oxidant Signals and Oxidative Stres*. Current Opinion in Cell Biology Volume 15, Issue 2, April 2003, Pages 247–254
- Ganong W.F. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Ed 20*. Andrianto P penerjemah. Jakarta. EGC. Terjemahan dari Review of Medical Physiology.
- Hantoko, S., dan R.S, Drajat. 2003. *Manfaat Pemberian Gelombang Ultrasonik Intensitas Rendah untuk Mempercepat Pembentukan Kalus Fraktur Tibia*. *Maj. Kedok. Unibraw*, 19(2) : 8-13
- Junqueira, L.C. and J. Carneiro. 2005. *Basic Histology: text and atlas*. 11st Edition. McGraw-Hill's Acces Medicine.
- Kasno, P. A. 2003. *Patologi Hepar dan Saluran Empedu Ekstra Hepatik*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Kumar, V., R.S Cotran dan S.L. Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi Edisi 7*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kumaran, A., and R. J. Karunakaran. 2007. *In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India*. LWT 40. Hlm 344-352.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan*. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 14-20.
- Lemanepa. 2005. *Perbandingan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Perasan Pare dengan Diet Statin*. Magister Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mansour, N. A. A. 2013. *Antioxidant Activity of Crude Extract from Mangosteen (Garcinia mangostana Linn) Pericarp on The Lung Rat Wich Exposure by Cigarette* [Thesis]. Master of Agriculture Product Technology. Faculty of Agricultural Technology. Brawijaya University
- Mastroeni P, and N. Meneger. 2003. *Development of acquired immunity to Salmonella*. J Med Microbiol;52:453-59
- Matt, G.E., P. J. Quintana., M. F Hovell., J. T Bernert., S. Song., N. Novianti., T Juarez., J. Floro., C. Gehrman., M. Garcia., and S. Larson. 2004.

- Households contaminated by environmental tobacco smoke: Sources of infant exposures.* Tobacco Control. 13(29): p. 8.
- Milberger, S.M., R. M Davis., and A. L. Holm. 2009. *Pet owners' attitudes and behaviours related to smoking and second-hand smoke: A pilot study.* Tobacco Control. 18(2): p. 2
- Muliarta, I. K. G., E. Sriwahyuni., dan Yuliawati. 2009. *Pemberian Kombinasi Vitamin C dan E Peroral Memperbaiki Kerusakan Hepar Akibat Paparan Rokok Kretek Sub Kronik.* Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Mulyono A., N. Ristiyanto., dan H Soesanti. 2009. *Karakteristik Hepar Tikus Got Rattus norvegicus Infektif Leptospira sp.* Ejournal Litbang Depkes Vol 1. No 2
- Nurdjaman., Soejoto., Soetedjo., SMH Faradz., B. Witjahyo., dan N. Susilaningsih. 2001. *Histologi II.* Semarang : Balai Penerbit FK UNDIP.
- Pessione F., M. J. Ramond., C. Njapoum., V. Duchatelle., C. Degott., S. Erlinger., B. Rueff., D. C. Valla., and F. Degos. 2001. *Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C.* Hepatology ; 34: 121-125
- Pham-Huy L. A. P., H. He., and C. Pham-Huy. 2008. *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health.* Int J Biomed Sci. 4:89-96.
- Pratiwi, A.D., Aulanni'am, dan Sutrisno. 2013. *Aktivitas Protease dan Profil Protein pada Hepar Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A.* Kimia Student Journal. Vol. 1. No. 1, pp.105-111.
- Rescanti, D. 2009. Pengaruh Pemberian Jus Stroberi terhadap Kerusakan Histologis Hepatosit Mencit Akibat Pemberian Asetaminifen [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
- Sari, A. R., Aulanni'am., dan S. Prasetyawan. 2013. *Potensi Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassumprismaticum) untuk Meningkatkan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histologi Jaringan Hepar pada Tikus (Rattus norvegicus) Diabetes Melitus Tipe 1.* Kimia Student Journal Vol 2, No 1
- Sarjadi. 2003. *Patologi Umum.* Semarang : Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Shofia, V., Aulanni.am., dan C. Mahdi. 2013. *Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum prismaticum) terhadap Profil Malondialdehid dan Gambaran Histologis Ginjal pada Tikus (Rattus novergicus) Diabetes Militus Tipe I.* Kimia Student Journal Vol. 1. No.1 pp. 119-125
- Setipoe, M. 2000. *Kekhususan Rokok Indonesia.* Jakarta: Grasindo
- Soeharto, I. 2004. *Penyakit Jantung Koroner dan Serangan Jantung.* Ed. 2. Gramedia. Jakarta. hlm 279.



Starr F., Kim Starr., and L. Loope. 2003. *Ficus benjamina*. United States Geological Survey--Biological Resources Division. Haleakala Field Station, Maui, Hawai'i.

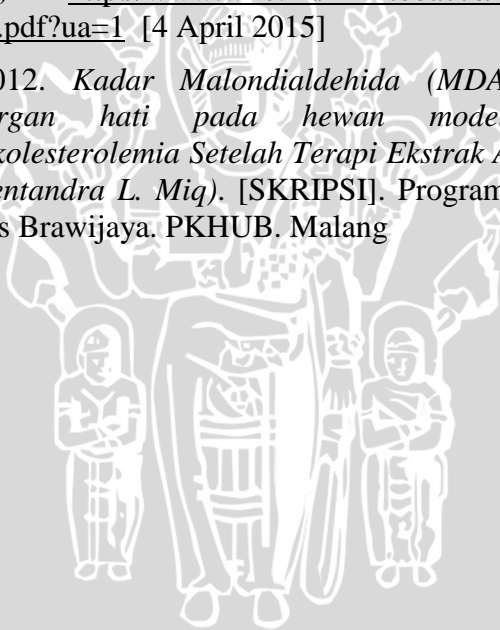
Tala, D. S., D. Gatsing, K. Fabrice, and Djimli, N. M. 2015. In vivo anti salmonella activity of aqueous extract of Euphorbia prostrata Aiton (Euphorbiaceae) and It's toxicological evaluation. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol 5 (4): 310-318.

Tu, A. 2009. *Smoking and Pets*. Pets are Wondeful Support (PAWS) Education Department San Fransisco. <http://www.pawssf.org/Document.Doc?id=12> [15 Mei 2015]

Wati, I.P., Aulanni'am dan C. Mahdi. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. *Kimia Student Journal* Vol.1. No.2. pp 257-263

World Health Organization. 2013. *WHO Report On The Global Tobacco Epidemic, 2013*, [http://www.who.int/tobacco/surveillance/policy/country\\_profile/idn.pdf?ua=1](http://www.who.int/tobacco/surveillance/policy/country_profile/idn.pdf?ua=1) [4 April 2015]

Wulandari, D. Y. 2012. *Kadar Malondialdehida (MDA) dan gambaran histopatologi organ hati pada hewan model tikus (Rattus norvegicus) Hiperkolesterolemia Setelah Terapi Ekstrak Air Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra L. Miq)*. [SKRIPSI]. Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. PKHUB. Malang



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"

No: 128-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

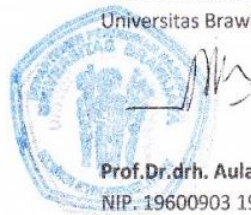
PENELITIAN BERJUDUL : BIOAKTIF AIR REBUSAN AKAR GANTUNG POHON  
BERINGIN ( *Ficus benjamina* L) UNTUK TERAPI  
PENYAKIT BRONKITIS KRONIK PADA PET ANIMALS

PENELITI : AZIZAH NOYA AURIZZA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 April 2013  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Keterangan Identifikasi Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L)



LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN  
PERKEMBANGAN TUMBUHAN  
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
JALAN VETERAN, MALANG 65145  
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0084/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Azizah Noya Aurizza (NIM. 115130101111061)  
Rima Malysa Hardi (NIM. 105130101111030)  
Tari Cahyani (NIM. 105130101111014)  
Andita Ariestika A (NIM. 105130101111047)  
Yohana Maria Karo (NIM. 1151301001111047)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 24, diidentifikasi sebagai:

**Familia** : **Moraceae**  
**Genus** : ***Ficus***  
**Species** : ***Ficus benjamina* L.**

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 27 Maret 2013

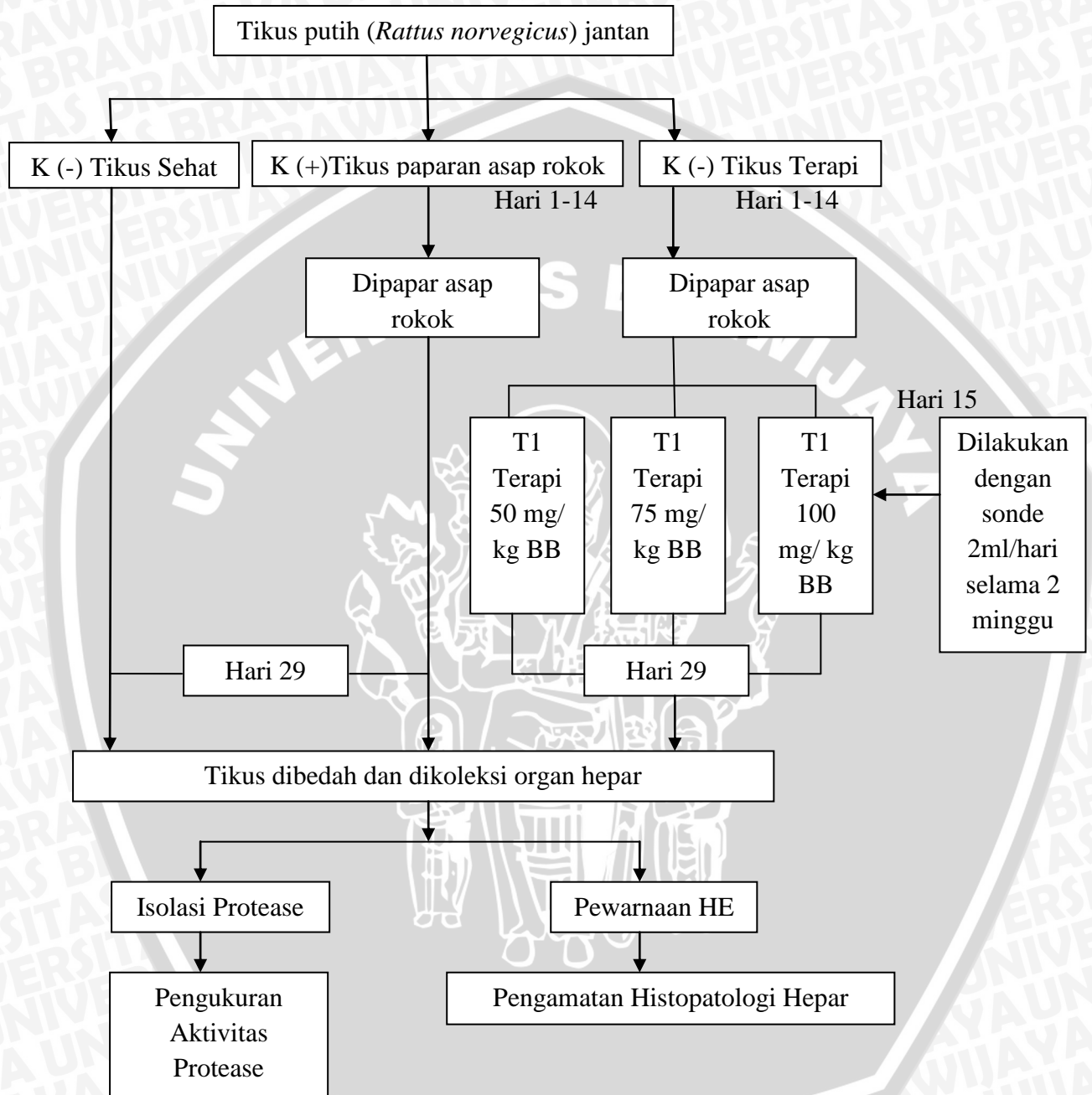
Kepala Laboratorium  
Taksonomi, Struktur dan  
Perkembangan Tumbuhan,



Dr. Serafina Indriyani, M.Si.  
NIP. 19630909 198802 2 001



Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian



**Lampiran 4.** Penyaringan Air Esktrak Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.)

4.1 Pembuatan Ekstrak Akar Gantung

Akar Gantung Pohon Beringin dengan dengan diameter 3-5

- Diiris tipis-tipis
- Dicuci dengan air mengalir
- Dikeringanginkan
- Ditimbang sesuai dosis
- Ditambah aquades 100 mL
- Dipanaskan pada suhu 79°C
- Diuapkan hingga volumenya 10 mL

Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin

4.2 Uji Fitokimia Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin

a. Uji Flavonoid

4 mL ekstrak akar gantung pohon beringin

- ditambahkan larutan NaOH 10%

Larutan berwarna kuning

- ditambahkan larutan HCl encer

Larutan berwarna bening



Flavonoid

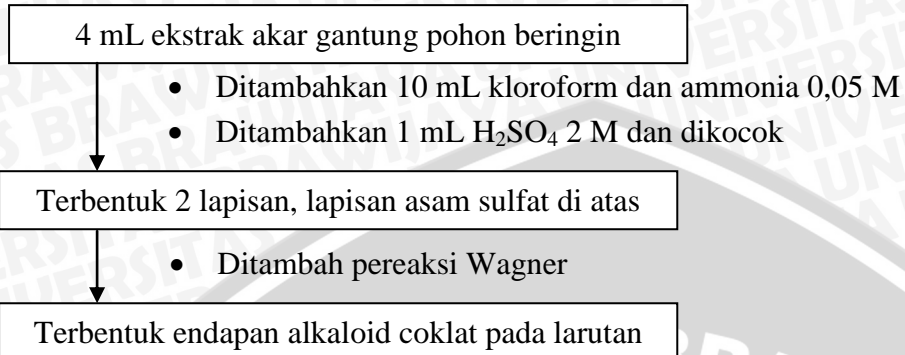
b. Uji Terpenoid

4 mL ekstrak akar gantung pohon beringin

- Ditambahkan 2 mL klorofom
- Ditambahkan 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan dikocok

Larutan berwarna merah coklat pada antar 2 muka lapisan

c. Uji Alkaloid



d. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Tabel Interpretasi Serapan Infra Merah (IR) Sampel dan Standar

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )					Interpretasi
	Spot A	Spot B	Spot C	Standar Asam Galat	Referensi	
1.	3.436,91	3.495,86	3.481,27	3.407,05 3.554,50	3200-365	O-H (alkohol, fenol)
2.	-	-	-	2.960,40 2.931,51 2.865,75	2.850-3.000	C-H alifatic
3.	1.731,96	1.733,89	1.731,96	-	1.705-1.750	C=O aldehid, keton, asam karboksilat dan ester
4.	1.631,67		1.650,95	1.639,70	1.600-1.680	C=C alkena
5.		1.635,52	1.636,52	1.509,58	1.475-1.600	C=C aromatik
6.		1.558,38	1.566,09	1.420,99	1.370-1.465	C-H alifatik
7.	1.099,35	1.095,49	1.417,58 1.091,63	1.153,78 1.097,08	1.000-1.300 1020-1150	C-O (alkohol, eter, ester, dan asam karboksilat) C-N amina
8.	806,19	806,19	804,26	777,58 763,13	690-900	C-H aromatik

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa akar gantung pohon beringin mengandung senyawa fenolik berupa flavonoid yang ditandai dengan adanya gugus OH.

**Lampiran 5.** Dosis Terapi Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.)

**Kelompok Terapi 1 (50 mg/kg BB)**

$$\begin{aligned} \text{❖ Dosis per ekor} &= \frac{50 \text{ mg} \times 200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \\ &= 10 \text{ mg} \end{aligned}$$

- ❖ Pembuatan ekstrak akar gantung *Ficus benjamina* L.

$$= (10 \text{ mg simplisia} \times 5) + 100 \text{ mL aquades, diuapkan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

$$= 50 \text{ mg} + 100 \text{ mL dan dipanaskan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

Pemberian ekstrak akar *Ficus benjamina* L. sebanyak 2 mL per ekor

**Kelompok Terapi 2 (75 mg/kg BB)**

$$\begin{aligned} \text{❖ Dosis per ekor} &= \frac{75 \text{ mg} \times 200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \\ &= 15 \text{ mg} \end{aligned}$$

- ❖ Pembuatan ekstrak akar gantung *Ficus benjamina* L.

$$= (15 \text{ mg simplisia} \times 5) + 100 \text{ mL aquades, diuapkan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

$$= 75 \text{ mg} + 100 \text{ mL dan dipanaskan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

Pemberian ekstrak akar *Ficus benjamina* L. sebanyak 2 mL per ekor

**Kelompok Terapi 3 (100 mg/kg BB)**

$$\begin{aligned} \text{❖ Dosis per ekor} &= \frac{100 \text{ mg} \times 200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \\ &= 20 \text{ mg} \end{aligned}$$

- ❖ Pembuatan ekstrak akar gantung *Ficus benjamina* L.

$$= (20 \text{ mg simplisia} \times 5) + 100 \text{ mL aquades, diuapkan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

$$= 100 \text{ mg} + 100 \text{ mL dan dipanaskan hingga tersisa } 10 \text{ mL}$$

Pemberian ekstrak akar *Ficus benjamina* L. sebanyak 2 mL per ekor

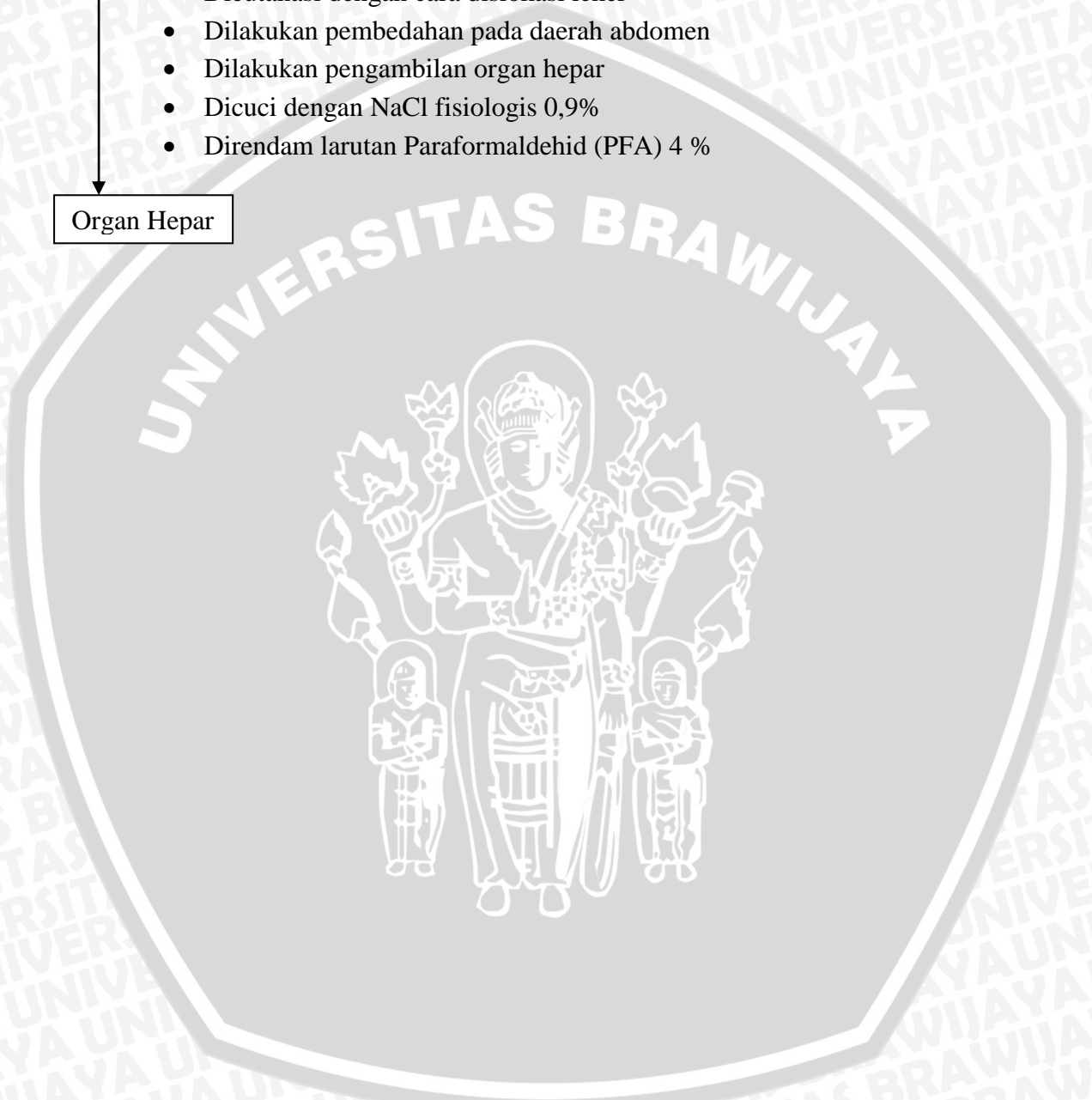


## Lampiran 6. Pembedahan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 3 bulan

- Dieutanasi dengan cara dislokasi leher
- Dilakukan pembedahan pada daerah abdomen
- Dilakukan pengambilan organ hepar
- Dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%
- Direndam larutan Paraformaldehid (PFA) 4 %

Organ Hepar



## Lampiran 7. Pengukuran Aktivitas Protease

### 7.1 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

0,025 g tirosin

- Dilarutkan dengan 25 ml akuades
- Diaduk dengan pengaduk magnetik
- Dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- Diencerkan hingga tanda batas

Larutan stok tirosin 500 ppm

### 7.2 Pembuatan Larutan Baku Tirosin

4 ml larutan baku tirosin 500 ppm

- Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml
- Diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

- Dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL
- Dimasukkan masing-masing larutan ke dalam labu ukur 10 mL
- Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

### 7.3 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- Diukur absorbansinya pada lamda maksimum tirosin

Panjang Gelombang Maksimum

### 7.4 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

- Dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam eppendorf
- Diukur absorbansinya pada (lamda) maksimum tirosin 200-300 nm.

Kurva Baku Tirosin

### 7.5 Pembuatan Larutan Kasein

0,025 g kasein

- Dilarutkan dengan 25 ml akuades
- Diaduk dengan pengaduk magnetik
- Dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas

Larutan stok Kasein 500 ppm

### 7.6 Isolasi Enzim

Organ Hepar

- Dipotong kecil-kecil
- Ditambah larutan PBST-PMSF sebanyak 5x volume sampel
- Ditambah sedikit pasir kuarsa
- Dihaluskan dengan mortar dalam kondisi dingin

Homogenat

- Dimasukkan dalam tabung polipropilen steril
- Digetarkan dengan vorteks selama 10 menit
- Disonikasi dengan sonikator selama 10 menit
- Disentrifus dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm)

Supernatan

- Ditambah etanol absolut dengan perbandingan 1:1
- Dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan
- Disentrifuse dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm)

Endapan

- Dikeringkan di udara bebas hingga bau etanol hilang
- Ditambah buffer Tris-HCl dengan 20 mM dengan perbandingan 1:1

Ekstrak kasar protein

Pellet

### 7.7 Pembuatan Larutan Blanko

Akuades steril

- Dipipet 200 (mikroliter)
- Dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambah 300 (mikroliter) larutan buffer fosfat pH 7
- Ditambah 100 (mikroliter) ekstrak kasar protein
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- Ditambah 400 (mikroliter) larutan TCA 4 %
- Didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- Disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

Supernatan

- Dipipet 100 (mikroliter)
- Ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- Diukur serapannya pada ( $\lambda$ ) maksimum tirosin 200-300 nm

Hasil

## 7.8 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- Dipipet 200 (mikroliter)
- Dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambah 300 (mikroliter) larutan buffer fosfat pH 7
- Ditambah 100 (mikroliter) ekstrak kasar protein
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- Ditambah 400 (mikroliter) larutan TCA 4 %
- Didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- Disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

Supernatan

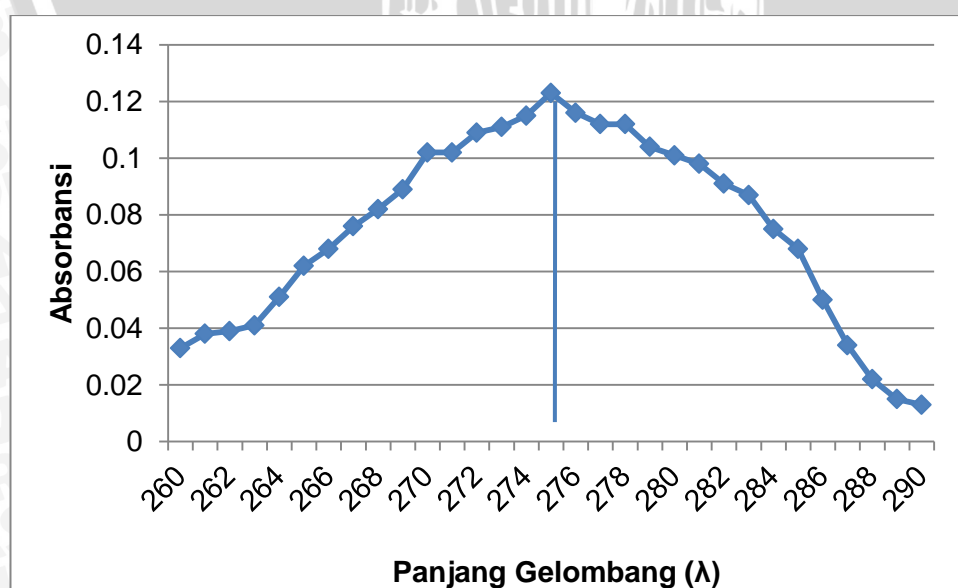
- Dipipet 100 (mikroliter)
- Ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel diukur serapannya pada ( $\lambda$ ) maksimum tirosin 200-300 nm.

Hasil

**Lampiran 8.** Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

**Tabel 8.1** Absorbansi Larutan Standar Tirosin pada  $\lambda$

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
260	0.033	275	0.123
261	0.038	276	0.116
262	0.039	277	0.112
263	0.041	278	0.112
264	0.051	279	0.104
265	0.062	280	0.101
266	0.068	281	0.098
267	0.076	282	0.091
268	0.082	283	0.087
269	0.089	284	0.075
270	0.102	285	0.068
271	0.102	286	0.05
272	0.109	287	0.034
273	0.111	288	0.022
274	0.115	289	0.015

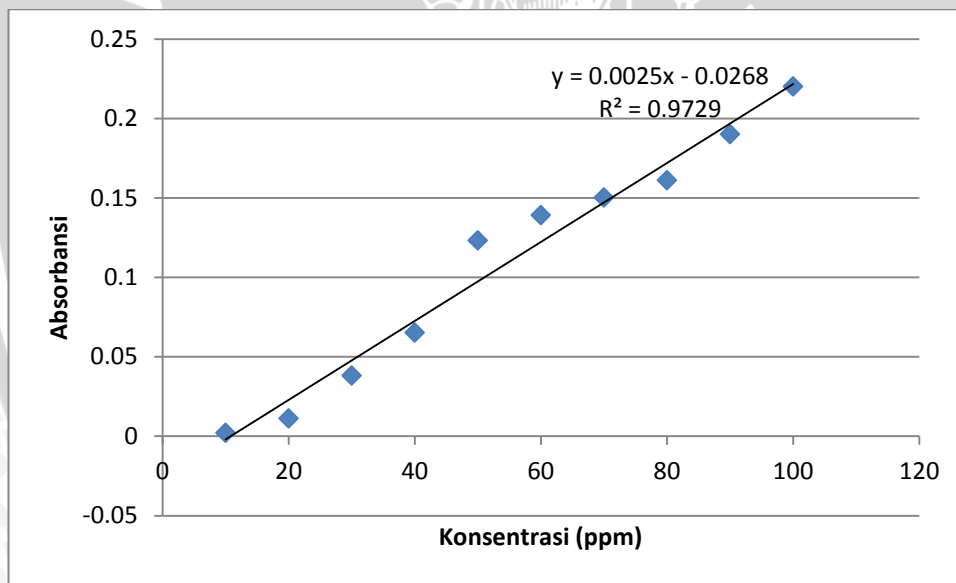


**Gambar 8.1** Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

**Lampiran 9.** Pembuatan Kurva Standar Tirosin

**Table 9.1** Absorbansi larutan standar tirosin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,002
20	0,011
30	0,038
40	0,065
50	0,123
60	0,139
70	0,15
80	0,161
90	0,19
100	0,22



**Gambar 9.1** Kurva standar tirosin

**Tabel 9.2** Data absorbansi tirosin

Kelompok	Absorbansi Tirosin			
Kelompok A (kontrol negatif)	0,05	0,053	0,056	0,057
Kelompok B (Kontrol positif)	0,139	0,143	0,147	0,148
Kelompok C (terapi 50 mg/kg BB)	0,087	0,091	0,093	0,096
Kelompok D (terapi 75 mg/kg BB)	0,065	0,069	0,092	0,075
Kelompok E (terapi 100 mg/kg BB)	0,053	0,057	0,059	0,06



## Lampiran 10. Perhitungan Aktivitas Protease

### 10.1 Rumus perhitungan

Misal : pengukuran aktivitas protease kontrol dengan waktu inkubasi 60 menit dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku tirosin :  $y = 0,002x - 0,026$

Dimana  $x$  = konsentrasi tirosin

Maka :

$$y = 0,002x - 0,026$$

$$0,05 = 0,002x - 0,026$$

$$X = (0,05 + 0,026) / 0,002$$

$$x = 2,92 \mu\text{g/mL}$$

Nilai  $x$  merupakan banyaknya tirosin yang terbentuk oleh enzim protease.

Untuk menentukan aktivitas enzim protease digunakan rumus persamaan :

$$\frac{(\text{Tirosin})}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

keterangan :

$v$  : volume total sampel (mL)

$p$  : jumlah enzim (mL)

$q$  : waktu inkubasi (menit)

$fp$  : faktor pengenceran

$Mr$  : berat molekul tirosin 181  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{2,92}{181 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5$$

$$= 0,016 \times 0,167 \times 5 = \mu\text{mol/mL.menit}$$

$$= 0,013 \mu\text{mol/mL.menit}$$

$$= 0,013 \text{ Unit}$$

Satu unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol tirosin yang terbentuk oleh 1 mL protease per menit dengan substrat kasein.

**Tabel 10.1** Data Aktivitas Protease

Kelompok perlakuan	Aktivitas protease	Rata rata	SD
Sehat 1	0,175	0,22698	0,007279645
Sehat 2	0,189		
Sehat 3	0,182		
Sehat 4	0,191		
Sakit 1	0,398	0,392	0,009468203
Sakit 2	0,389		
Sakit 3	0,401		
Sakit 4	0,380		
Terapi 50 mg/kg BB 1	0,269	0,271	0,008689957
Terapi 50 mg/kg BB 2	0,260		
Terapi 50 mg/kg BB 3	0,274		
Terapi 50 mg/kg BB 4	0,281		
Terapi 75 mg/kg BB 1	0,219	0,233	0,027391527
Terapi 75 mg/kg BB 2	0,209		
Terapi 75 mg/kg BB 3	0,272		
Terapi 75 mg/kg BB 4	0,233		
Terapi 100 mg/kg BB 1	0,182	0,192	0,007126372
Terapi 100 mg/kg BB 2	0,196		
Terapi 100 mg/kg BB 3	0,198		
Terapi 100 mg/kg BB 4	0,191		

**Presentasi aktivitas protease sebagai berikut:**

**Kelompok B (Paparan asap rokok)**

$$\begin{aligned}\text{Peningkatan aktivitas protease} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kontrol}}{\text{rataan kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,392 - 0,226}{0,226} \times 100\% \\ &= 73,45 \%\end{aligned}$$

**Kelompok C (Paparan asap rokok+terapi 50mg/kg BB)**

$$\begin{aligned}\text{Penurunan aktivitas protease} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kelompok C}}{\text{rataan kelompok B}} \times 100\% \\ &= \frac{0,392 - 0,271}{0,392} \times 100\% \\ &= 30,86 \%\end{aligned}$$

**Kelompok D (Paparan asap rokok + terapi 75mg/kg BB)**

$$\begin{aligned}\text{Penurunan aktivitas protease} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kelompok D}}{\text{rataan kelompok B}} \times 100\% \\ &= \frac{0,392 - 0,233}{0,392} \times 100\% \\ &= 40,56 \%\end{aligned}$$

**Kelompok E (Paparan asap rokok + terapi 100mg/kg BB)**

$$\begin{aligned}\text{Penurunan aktivitas protease} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kelompok E}}{\text{rataan kelompok B}} \times 100\% \\ &= \frac{0,392 - 0,192}{0,392} \times 100\% \\ &= 51,02 \%\end{aligned}$$

**Lampiran 11.** Data Dan Uji Statistik Aktivitas Protease

**Tabel 11.1.** Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		aktivitas protease
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.25215
	Std. Deviation	.078645
Most Extreme Differences	Absolute	.196
	Positive	.196
	Negative	-.163
Kolmogorov-Smirnov Z		.877
Asymp. Sig. (2-tailed)		.425

**Tabel 11.2** Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
aktivitas protease			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.175	4	15	.121

**Tabel 11.3** Uji statistik ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,114	4	,029	137,550	,000
Within Groups	,003	15	,000		
Total	,117	19			

P < 0,05

**Tabel 11.4** Uji lanjutan BNJ

**Multiple Comparisons**

Aktivitas

Protease

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.20775*	.018018	.000	-.2392	-.1763
	3	-.08675*	.018018	.000	-.1182	-.0553
	4	-.04900	.018018	.002	-.0804	-.0176
	5	-.00750	.018018	.944	-.0389	-.0239
2	1	-.20775*	.018018	.000	.1763	.2392
	3	-.12100*	.018018	.000	.0896	.1524
	4	-.15875*	.018018	.000	.1273	.1902
	5	-.20025*	.018018	.000	.1688	.2317
3	1	.08675*	.018018	.000	.0553	.1182
	2	-.12100*	.018018	.000	-.1524	-.0896
	4	.03375*	.018018	.015	.0063	.0692
	5	.07925*	.018018	.000	.0478	.1107
4	1	.04900*	.018018	.002	.0176	.0804
	2	-.15875*	.018018	.000	-.1902	-.1273
	3	-.03775*	.018018	.015	-.0692	-.0063
	5	.04150*	.018018	.007	.0101	.0729
5	1	.00750*	.018018	.944	-.0239	.0389
	2	-.20025*	.018018	.000	-.2317	-.1688
	3	-.07925*	.018018	.000	-.1107	-.0478
	4	.04150*	.018018	.007	-.0729	.0101



**Tabel 11.5** Pemberian notasi pada uji BNJ

kelompok perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
sehat	4	.1843			
terapi_3	4	.1918			
terapi_2	4		.2332		
terapi_1	4			.2710	
sakit	4				.3920
Sig.		.944	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



## Lampiran 12. Pembuatan Preparat Histologi

### 11.1 Embedding Hepar

#### Hepar dalam PFA 4%

- Diambil dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dimasukkan pada etanol 80% selama 2 jam
- Dimasukkan pada etanol 90% selama 20 menit
- Dimasukkan pada etanol 95% selama 20 menit
- Dipindahkan dalam etanol absolut selama 3 x 20 menit

#### Hepar hasil dehidrasi

- dimasukkan dalam larutan xylol 1 selama 20 menit pada suhu ruang
- dimasukkan dalam larutan xylol 2 selama 20 menit pada suhu ruang
- dimasukkan dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah 3x30 menit pada suhu 56-58oC, kemudian paraffin akan memadat.
- Didinginkan pada suhu 4°C

#### Hepar dalam blok parafin

### 11.2 Pembuatan Preparat Hepar

#### Hepar dalam blok parafin

- Diiris seukuran 5 (mikrometer)
- Didinginkan pada suhu ruang
- Dimasukkan dalam air pada suhu 38-40°C
- Diletakkan pada objek gelas
- Dikeringkan di atas hot plate dengan suhu 38-40°C selama 24 jam

#### Preparat Hepar disimpan pada suhu ruang

### 11.3 Pewarnaan Hematosilin-Eosin

#### Preparat Hepar

- Dideparafinasi dengan xylol selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- Direndam dalam akuades steril selama 5 menit

#### Preparat Hepar

- Diwarnai dengan hematoksilin selama 10 menit atau sampai diperoleh hasil terbaik
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- Diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- Dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit
- Dicuci air dengan akuades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol absolut 3x2 menit
- Dimasukkan dalam larutan xylol 3x3 menit
- Dikering anginkan dan ditutup dengan cover glas
- Dimounting dengan menggunakan entellan
- Ditutup dengan cover glass

#### Preparat Hematoksilin Eosin