

PENGARUH PAPARAN BERULANG 0,5 ppm IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) BERFORMALIN PER ORAL SELAMA 3 BULAN TERHADAP APOPTOSIS SEL HATI MENCIT BETINA (*Mus musculus*)

LAPORAN SKRIPSI

TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

Oleh:

LATIFA LAINUFAR

NIM. 0410830048



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2008

PENGARUH PAPARAN BERULANG 0,5 ppm IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) BERFORMALIN PER ORAL SELAMA 3 BULAN TERHADAP APOPTOSIS SEL HATI MENCIT BETINA (*Mus musculus*)

Laporan Skripsi Disusun sebagai Salah Satu Syarat untuk Memenuhi Gelar Sarjana Perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang

Oleh:

LATIFA LAINUFAR

NIM. 0410830048

Dosen Penguji I

Ir. Sukoso, MSc. PhD

NIP. 131 857 373

Tanggal:

Dosen Penguji II

Ir. Dwi Setijawati, M.Kes

NIP. 131 759 606

Tanggal:



Menyetujui
Dosen Pembimbing I

Dr.Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 131 574 867

Tanggal:

Dosen Pembimbing II

Ir. Hartati Kartika Ningsih, MS

NIP. 131 839 366

Tanggal:

Mengetahui
Ketua Jurusan MSP

Ir. Maheno Sri Widodo, MS

NIP. 131 471 522

Tanggal:

LATIFA LAINUFAR. NIM 0410830048. Skripsi Tentang Pengaruh Paparan Berulang 0,5 *ppm* Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Berformalin Per Oral Selama 3 Bulan Terhadap Apoptosis Sel Hati Mencit Betina (*Mus musculus*) dibawah bimbingan **Dr.Ir. Happy Nursyam, MS dan Ir. Hartati Kartikaningsih, MS.**

Penelitian Pengaruh Paparan Berulang 0,5 *ppm* Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Berformalin Per Oral Selama 3 Bulan Terhadap Apoptosis Sel Hati Mencit Betina (*Mus musculus*) dilakukan di Labolatorium Biomolekuler Fakultas MIPA dan Laboratorium Biomedika Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Oktober sampai Maret 2008. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kronis paparan berulang 0,5 *ppm* ikan nila berformalin selama 3 bulan terhadap kematian sel hati mencit betina secara apoptosis.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Variabel dibedakan menjadi variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol nol; kontrol negatif (0,5 *ppm* ikan); kontrol positif (0,5 *ppm* formalin) dan 0,5 *ppm* ikan berformalin. Sedangkan variabel terikatnya adalah kematian sel hati mencit (apoptosis), kadar enzim SGPT, SGOT dan berat organ hati mencit. Analisa data menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL faktorial) dengan dua faktor perlakuan dan tiga kali ulangan. Pengolahan data statistik hasil penelitian menggunakan program bantu SPSS, menggunakan metode rancangan Analisis Ragam (ANOVA) dan analisa perbandingan menggunakan metode Tukey.

Ditinjau secara makroskopis, paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin menyebabkan pertambahan berat organ hati mencit secara nyata terhadap kontrol ($p<0,05$) namun lama pemaparan ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata ($p>0,05$) sehingga dapat terlihat bahwa perubahan jaringan hati yang terjadi setelah pemaparan ikan berformalin lebih ke arah mikroskopis.

Bila ditinjau pada tes fungsi hati dengan mengukur kadar enzim SGPT dan SGOT menunjukkan bahwa paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin menyebabkan peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT secara nyata terhadap kontrol nol ($p<0,05$). Lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT ($p>0,05$) namun menyebabkan penurunan kadar enzim SGOT dan SGPT. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan sel pada jaringan hati sudah semakin parah dan meluas sehingga kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim tersebut sudah berkurang.

Ditinjau secara mikroskopis, jenis pemaparan dan lama pemaparan ikan berformalin menyebabkan peningkatan apoptosis sel hati mencit ($p<0,05$). Oleh sebab itu penggunaan formalin sebagai bahan pengawet pada makanan tidak dianjurkan karena apabila terpajan terus menerus ke dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan organ dalam tubuh terutama hati.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, disarankan formalin tidak digunakan sebagai bahan pengawet dalam pengolahan ikan. Selain itu, perlunya penelitian lebih lanjut tentang efek paparan ikan berformalin terhadap mencit turunannya.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Laporan Skripsi. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana di Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.

Atas terselesaikannya Laporan Skripsi ini, penulis panjatkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr.Ir. Happy Nursyam, MS. dan Ir. Hartati Kartikaningsih, MS. selaku dosen pembimbing.
2. Bapak Kepala dan Staf Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
3. Semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu dalam penyusunan laporan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan laporan skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang sifatnya membangun. Penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang berminat dan memerlukan.

Malang, Juli 2008

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesa	4
1.5 Kegunaan Penelitian	4
1.6 Tempat dan Waktu	5

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nila (<i>Oreocromis niloticus</i>)	6
2.2 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	7
2.3 Formalin	8
2.3.1 Pengertian Formalin	8
2.3.2 Reaksi Formalin dan protein Ikan	9
2.3.3 Formalin Dalam Tubuh	11
2.3.4 Efek Paparan Formalin	12
2.4 Formalin Menyebabkan Apoptosis	13
2.5 Hati	15

2.5.1 Fungsi Hati Dalam Metabolisme Tubuh	15
2.5.2 Kerusakan Hati	16
2.6 Apoptosis	16
2.6.1 Pengertian Apoptosis	16
2.6.2 Proses Apoptosis	17
2.6.2.1 Secara Morfologi	17
2.6.2.2 Secara Molekuler	18
2.6.3 Perbedaan dan Persamaan Morfologi Antara Apoptosis dan Nekrosis .	19
2.6.4 Faktor Yang Mempengaruhi Proses Apoptosis	19
METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	21
3.1.1 Alat Penelitian.....	21
3.1.2 Bahan Penelitian	21
3.2 Metode Penelitian	21
3.3 Variabel Penelitian	22
3.4 Rancangan Percobaan	22
3.5 Prosedur Penelitian	23
3.5.1 Persiapan Hewan Percobaan	23
3.5.2 Penyediaan 0,5 ppm Formalin.....	24
3.5.3 Penyediaan 0,5 ppm Ikan Nila Berformalin.....	24
3.5.4 Penyediaan 0,5 ppm Ikan	25
3.5.5 Perlakuan Induksi Oral Ikan Berformalin pada Mencit	25
3.5.6 Cara Pembuatan Jaringan Hepar dan Pengamatan Sel Apoptosis	25
3.5.6.1 Pembuatan Parafin Block Jaringan	25
3.5.6.2 Proses Deparafinisasi	26
3.5.6.3 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin	26
3.5.6.4 Pengamatan Sel Apoptosis dengan Teknik DNA Terfragmentasi (TUNEL)	26
3.5.7 Analisa Berat Hati Mencit	27
3.5.8 Tes Fungsi Hati	27

3.5.8.1 Uji SGOT (<i>Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase</i>)	27
3.5.8.2 Uji SGPT (<i>Serum Glutamic Piruvat Transaminase</i>)	28
3.5.9 Uji Asam Amino Menggunakan HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).....	28
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	29
4.1.1 Berat Organ Hati Mencit	29
4.1.2 Tes Fungsi Hati	29
4.1.2.1 SGOT (<i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>)	29
4.1.2.2 SGPT (<i>Serum Glutamic Piruvat Transaminase</i>)	30
4.1.3 Apoptosis Sel Hati Mencit	31
4.1.4 Asam Amino Daging Ikan	31
4.2 Pembahasan	32
4.2.1 Berat Organ Hati Mencit	32
4.2.2 Tes Fungsi Hati	34
4.2.2.1 SGOT (<i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>)	34
4.2.2.2 SGPT (<i>Serum Glutamic Piruvat Transaminase</i>)	36
4.2.3 Apoptosis Sel Hati Mencit	38
 5.KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	43
 DAFTAR PUSTAKA	44
 LAMPIRAN	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hematologi mencit	9
2. Perbedaan dan Persamaan Morfologi Antara Apoptosis dan Nekrosis	20
3. Berat Organ Hati Mencit	29
4. Kadar SGOT Dalam Darah (U/L)	30
5. Kadar SGPT Dalam Darah (U/L)	30
6. Jumlah Apoptosis Sel Hati Mencit	31
7. Kadar Asam Amino Ikan Nila Berformalin	32
8. Hasil Rerata Jenis Paparan Berat Organ Hati Mencit	32
9. Hasil Rerata Lama Paparan Berat Organ Hati Mencit	33
10. Hasil Rerata Jenis Paparan Kadar Enzim SGOT Mencit	34
11. Hasil Rerata Lama Paparan Kadar Enzim SGOT Mencit	34
12. Hasil Rerata Jenis Paparan Kadar Enzim SGPT Mencit	36
13. Hasil Rerata Lama Paparan Kadar Enzim SGPT Mencit	36
14. Hasil Rerata Jenis Paparan Apoptosis Sel Hati Mencit	38
15. Hasil Rerata Lama Paparan Apoptosis Sel Hati Mencit	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

- | | |
|--|----|
| 1. Reaksi Formaldehid Dengan Protein | 10 |
| 2. Degradasi Formaldehid Dalam Tubuh | 11 |



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan 0,5 <i>ppm</i> Ikan Nila Berformalin	47
2. Prosedur Pembuatan 0,5 <i>ppm</i> Ikan	49
3. Perhitungan Pemberian Volume Cekok.....	50
4. Uji SGOT dengan Metode Kolorimetri Reitman dan Frankle	51
5. Uji SGPT dengan Metode Kolorimetri Reitman dan Frankle	53
6. Gambar Sel Hati Mencit Setelah Perlakuan	55
7. Hasil Analisa Asam Amino Ikan Nila Berformalin	56
8. Analisa Statistik Berat Hati Mencit.....	59
9. Analisa Statistik Kadar SGOT Mencit	63
10. Analisa Statistik Kadar SGPT Mencit	67
11. Analisa Statistik Apoptosis Sel Hati Mencit	71
12. Perhitungan Persentase Jumlah Sel Apoptosis	75

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan merupakan bahan pangan yang mudah rusak (membusuk). Hanya dalam delapan jam sejak ikan ditangkap dan didaratkan sudah akan timbul proses perubahan yang mengarah pada kerusakan. Untuk itu perlu adanya pengolahan lebih lanjut pada ikan untuk mempertahankan kesegarannya (Adawayah, 2007).

Dalam mempertahankan kesegaran ikan biasanya para pengolah ikan menggunakan es sebagai bahan pengawet ikan. Akan tetapi akhir-akhir ini para pengolah ikan menyalahgunakan penggunaan formalin untuk mengawetkan ikan karena harganya lebih murah dan cara pemrosesannya lebih singkat dibanding dengan es.

Formalin adalah salah satu bahan pengawet yang telah resmi dilarang sebagai bahan pengawet makanan sejak oktober 1988 melalui Permenkes nomor 1168/Menkes/Per/X/1988. Penggunaan formalin sangat sulit dihindari meskipun telah diketahui bahwa formalin berbahaya bagi kesehatan. Menurut Fatimah (2006) dalam Irawati (2007), beberapa tahun terakhir ini BPOM mendekripsi peningkatan yang signifikan dalam penyalahgunaan formalin sebagai pengawet makanan yaitu bahwa ikan basah dan ikan kering di pulau jawa mengandung formalin sebesar 26,36%. Menurut Jahajuri (2007), dalam hasil penelitian lapang yang telah dilakukan menunjukkan kandungan formalin dalam daging ikan olahan sebesar 100 *ppm* hingga 10000 *ppm*. Kadar ini mendekati hasil perendaman ikan dengan formalin 5-20 % kurang dari 24 jam perendaman. Kondisi ini didukung dengan penjualan formalin di pasaran mulai dari konsentrasi 10 % - 40 %.

Formalin yang terkandung dalam daging ikan sangat berbahaya apabila masuk ke dalam tubuh terutama pada organ hati. Menurut Laksono (2007), dalam penelitiannya menunjukkan bahwa tikus yang mengkonsumsi ransum berformalin pada konsentrasi (0% : 20%) selama 2 bulan menunjukkan laju pertumbuhan berat badan yang terendah dan memiliki resiko yang paling tinggi terhadap terjadinya kerusakan pada anatomi jaringan (hati, ginjal, limpa).

Paparan akut formalin pada hewan percobaan menyebabkan perlemakan hati dan degenerasi sel. Paparan kronis formalin menyebabkan menurunnya kadar elektrolit intra dan ekstrasel, disintegrasi sel, meningkatnya kekentalan darah, dan meningkatnya jumlah sel darah merah yang immatur, di mana kemampuannya dalam mengikat oksigen belum sempurna (Fatimah, 2006). Formalin yang masuk melalui saluran pencernaan diserap oleh epitel usus dan dibawa oleh vena porta menuju ke hati. hal ini menyebabkan terganggunya metabolisme sel dalam hati karena kekurangan oksigen sehingga menyebabkan iskemia.

Iskemia timbul saat pemasokan oksigen tidak mencukupi pada proses oksidasi dan menyebabkan gagalnya respirasi fosforilasi oksidatif di mitokondria. Selama terjadinya iskemia memang terjadi kekurangan oksigen sehingga terjadi kebocoran oksigen pada siklus respirasi. Iskemia menyebabkan gagalnya respirasi fosforilasi oksidatif di mitokondria sehingga pembentukan ATP menurun tajam. Penurunan ATP menyebabkan keluarnya ion Ca^{2+} sehingga ion Ca^{2+} meningkat masuk ke dalam sitoplasma (influks Ca^{2+}). Keseimbangan osmotik terganggu, mitokondria menjadi mengembang. Kerusakan mitokondria berhubungan dengan lolosnya sitokrom c dalam sitosol. Sitokrom c merupakan komponen integral dari rantai transport elektron dan dapat mencetuskan apoptosis (Baraas, 2006). Apoptosis ialah proses kematian sel yang terprogram atau

proses perusakan yang terkontrol terhadap diri sel itu sendiri yang mana proses tersebut melibatkan sinyal selular yang khusus atau spesifik (Nurlaila dan Hadi, 2007).

Dengan adanya pengaruh paparan berulang $0,5 \text{ ppm}$ ikan nila berformalin per oral selama tiga bulan, kita dapat mengetahui sejauh mana efek ikan berformalin terhadap kematian sel hati mencit secara apoptosis. Ikan nila berformalin dengan konsentrasi $0,5 \text{ ppm}$ dipakai sebagai pendekatan untuk mengetahui efek toksik paparan berulang ikan berformalin terhadap kematian sel hati mencit secara apoptosis. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina.

1.2 Rumusan Masalah

Hati merupakan organ tubuh yang paling sering menerima jejas. Hal ini karena hati merupakan pintu gerbang semua bahan yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna. Zat makanan, sebagian besar obat-obatan serta toksikan yang masuk ke tubuh melalui saluran cerna setelah diserap oleh epitel usus akan dibawa oleh vena porta ke hati. Oleh sebab itu, hati menjadi organ yang sangat potensial menderita keracunan lebih dahulu sebelum organ lain (Santoso dan Nurliani, 2006).

Formalin yang terkandung dalam daging ikan sangat berbahaya apabila masuk ke dalam tubuh terutama pada organ hati. Pernyataan ini dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan oleh Kusumaningtyas (2007), bahwa tikus yang mengkonsumsi ransum berformalin dengan konsentrasi 1,2 % selama 2 bulan menunjukkan laju pertumbuhan berat badan yang terendah dan memiliki resiko paling tinggi terhadap terjadinya kerusakan pada anatomi jaringan organ dalam (hati, ginjal, limpa).

Berdasarkan penelitian Efendi (2007), pemberian ikan nila berformalin $0,5 \text{ ppm}$ per oral selama 1 bulan berpengaruh nyata terhadap kondisi fisiologis mencit, observasi

makroskopis berat organ mencit dan kimia darah mencit. Efek Paparan formalin dalam penelitian tersebut diamati hanya secara makroskopis dan belum ada penelitian lebih lanjut tentang efek paparan formalin secara mikroskopis pada organ dalam terutama hati yaitu dengan melakukan pengamatan terhadap kematian sel secara apoptosis.

Berdasarkan uraian tersebut timbul suatu permasalahan apakah $0,5 \text{ ppm}$ ikan nila berformalin yang diberikan per oral selama 3 bulan berpengaruh terhadap apoptosis sel hati mencit (*Mus musculus*) betina.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan berulang $0,5 \text{ ppm}$ ikan nila berformalin selama 3 bulan terhadap kematian sel hati mencit betina secara apoptosis.

1.4 Hipotesa

Diduga apakah $0,5 \text{ ppm}$ ikan nila berformalin yang diberikan per oral selama 3 bulan berpengaruh terhadap apoptosis sel hati mencit (*Mus musculus*) betina.

1.5 Kegunaan

Kegunaan penelitian ini adalah (1) Sebagai dasar pertimbangan kepada pengusaha pengolahan ikan untuk memilih bahan pengawet ikan yang aman bagi kesehatan, (2) Sebagai informasi kepada masyarakat, lembaga, dan instansi lain mengenai efek toksikologi ikan berformalin, (3) Sebagai dasar pertimbangan untuk penelitian selanjutnya.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Oktober 2007 - Maret 2008.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nila

Ikan nila memiliki bentuk tubuh agak memanjang dan pipih ke samping, warnanya putih kehitam-hitaman, dan makin ke bagian perut makin terang. Pada bagian perut terdapat sepuluh buah garis vertikal berwarna hijau kebiru-biruan sedangkan pada sirip ekor terdapat delapan buah garis melintang yang ujungnya berwarna kemerah-merahan. Mata ikan nila tampak menonjol agak besar dan dipinggirnya berwarna kebiru-biruan. Mulut terminal, linea lateralis terputus menjadi dua bagian dan bentuk sirip stenoit. Dari kebiasaan makannya, ikan nila termasuk ikan omnivora yaitu pemakan segala (Murtidjo, 2001).

Ikan nila adalah salah satu komoditas budidaya yang memiliki prospek pasar yang cukup tinggi. Selain mempunyai spesifik rasa, padat dagingnya, mudah disajikan dalam berbagai menu, juga harganya relatif murah sehingga terjangkau oleh masyarakat luas. Terlebih kini *fillet* nila merupakan komoditas ekspor yang mulai diminati oleh negara-negara importir khususnya Amerika Serikat, sebagai alternatif sumber protein non-kelesterol (DKP, 2005). Menurut Sugiarto (1988) dalam Rustidja (1996), klasifikasi ikan nila adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Oetoichthys
Ordo	: Percomorphi
Subordo	: Percoidea
Famili	: Cichilidae

Genus	: <i>Oreochromis</i>
Species	: <i>Niloticus</i> sp
Nama latin	: <i>Oreochromis niloticus</i>
Nama Indonesia	: Nila

2.2 Mencit

Mencit termasuk dalam *genus Mus*, *subfamily Murinae*, *family Muridae*, *ordo Rodentia*. Berbeda dengan hewan-hewan lainnya, mencit tidak memiliki kelenjar keringat. Pada umur empat minggu berat badannya mencapai 18-20 g. Jantung terdiri dari empat ruang dengan dinding atrium yang tipis dan dinding ventrikel yang lebih tebal. Peningkatan temperatur tubuh tidak mempengaruhi tekanan darah, sedangkan frekuensi jantung, *cardiac output* berkaitan dengan ukuran tubuhnya. Diantara spesies-spesies hewan lainnya, mencitlah yang paling banyak digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80%) karena murah dan mudah berkembang biak (Kusumawati, 2004).

Sedangkan menurut Lu (1995), hewan ini digunakan karena mudah didapat, ukurannya kecil, mudah ditangani, dan data toksikologinya relatif lebih banyak. Selain itu penetapan toksisitas pada hati sering merupakan penelitian jangka pendek dan jangka panjang yang biasanya dilakukan pada mencit. Adapun data hematologi mencit terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data hematologi mencit

Keterangan	Jumlah
Eritrosit (RBC) x (10 ⁶ /mm ³)	6,86-11,7
Hemoglobin (g/dl)	10,7-11,5
MCV (μ l ³)	47,0-52,0
MCH (μ g)	11,1-12,7
MCHC (%)	22,3-31,2
Hematokrit (PCV) (%)	33,1-49,9
Leukosit (WBC) (x 10 ³ /mm ³)	12,1-15,9
Neutrofil (x 10 ³ /mm ³)	1,87-2,46
Eosinofil (x 10 ³ /mm ³)	0,29-0,41
Basofil (x 10 ³ /mm ³)	0,06-0,01
Limfosit (x 10 ³ /mm ³)	8,70-12,4
Monosit (x 10 ³ /mm ³)	0,30-0,55
Glukose (mg/dl)	62,8-176
BUN (mg/dl)	13,9-28,3
Kreatinine (mg/dl)	0,30-1,00
Bilirubin (mg/dl)	0,10-0,90
Kolesterol (mg/dl)	26,0-82,4
Total protein (g/dl)	4,00-8,62
Albumin (g/dl)	2,52-4,84
SGOT (IU/I)	23,2-48,4
SGPT (IU/I)	2,10-23,8
Alkaline fosfatase(IU/I)	10,5-27,6
Laktik dehidrogenase (IU/I)	75-185

Sumber : Mitruka (1981) dan Loeb (1989) dalam Kusumawati (2004)

2.3 Formalin

2.3.1 Pengertian Formalin

Formalin merupakan nama dagang dari formaldehid dengan rumus molekul CH₂O, mengandung kurang lebih 37% gas formaldehid dalam air. Biasanya ditambahkan 10-15% metal alkohol (methanol) sebagai stabilisator untuk memperlambat atau menghindari polimerisasi formaldehid menjadi paraformaldehid yang padat. Formalin merupakan cairan jernih yang tidak berwarna dengan bau yang menusuk, uapnya

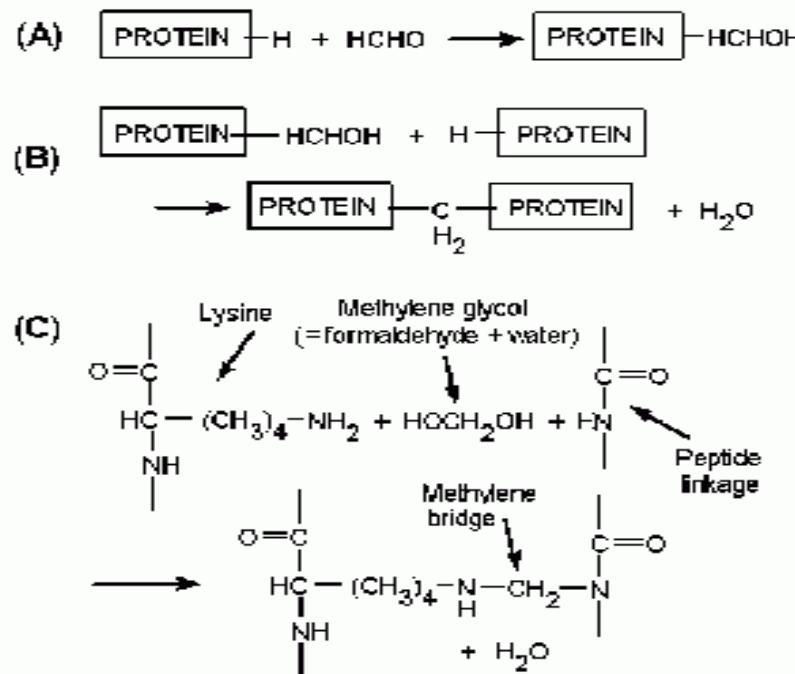
merangsang selaput lendir hidung dan tenggorokan dengan rasa yang membakar (Cahyadi, 2006).

Menurut Widjaja (2006), di pasaran, formalin dapat diperoleh dalam bentuk sudah diencerkan, yaitu dengan kadar formaldehidnya 40, 30, 20 dan 10 persen serta dalam bentuk tablet yang beratnya masing-masing sekitar 5 gram. Formalin merupakan bahan beracun dan berbahaya bagi kesehatan manusia. Jika kandungannya dalam tubuh tinggi, akan bereaksi secara kimia dengan hampir semua zat di dalam sel sehingga menekan fungsi sel dan menyebabkan kematian sel yang menyebabkan keracunan pada tubuh

2.3.2 Reaksi Formalin dan Protein Ikan

Selama ikan direndam dalam formalin, maka formalin akan masuk kedalam daging ikan, yaitu pada bagian miomer dari daging ikan karena miomer adalah segmen-segmen yang merupakan penyusun dari jaringan pengikat yang terlihat pada permukaan luar badan ikan. Pada bagian miomer dari daging ikan terdapat protein yang dinamakan stroma, protein inilah yang akan berikatan dengan formalin sehingga membentuk ikatan methylene (Hadiwiyoto, 1993).

Kelompok formaldeid dapat bergabung dengan nitrogen dan beberapa atom protein lainnya yang berdekatan. Mereka dapat membentuk ikatan silang -CH₂- yang disebut *Jembatan Methylene*. Pembentukan jembatan methylene inilah yang menyebabkan terjadinya efek pengerasan pada protein oleh formaldeid. Ikatan silang pada protein dapat dilihat pada Gambar 1.



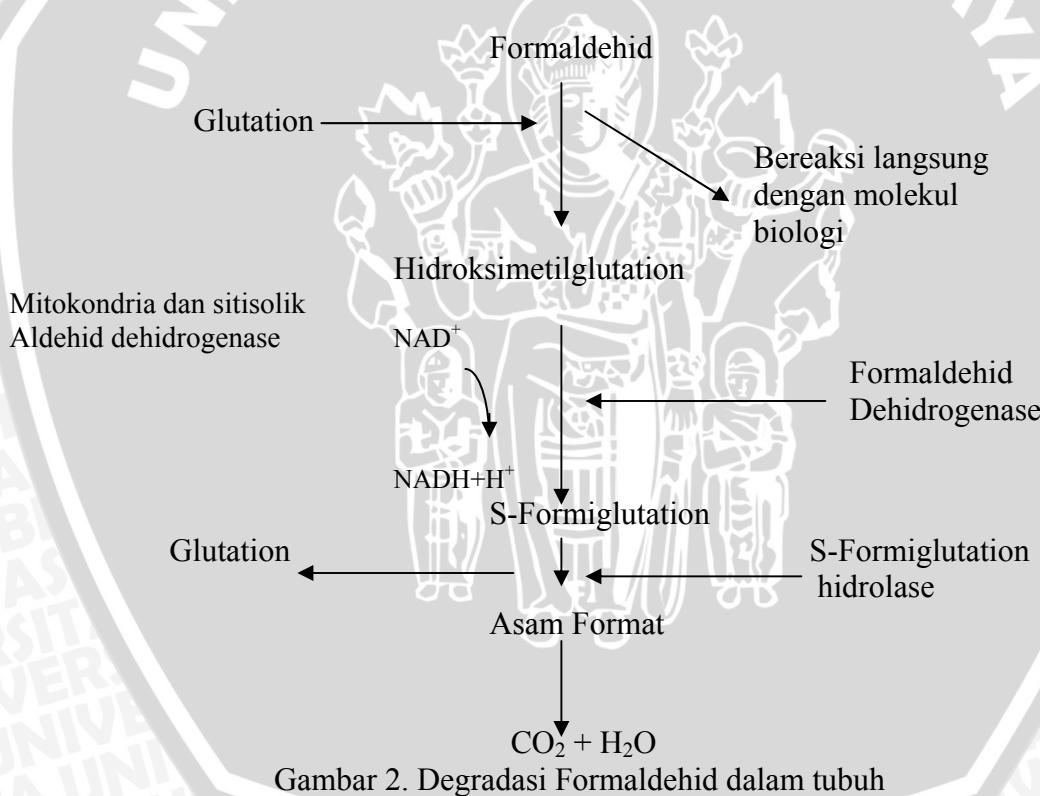
Gambar 1. Reaksi formaldehid dengan protein (Kiernan, 2000)

Keterangan gambar A. menjelaskan tentang penambahan molekul formaldehid pada protein, gambar B. menjelaskan reaksi yang terbentuk antara formaldehid dengan molekul protein yang lain sehingga membentuk ikatan silang methylene, gambar C menggambarkan secara lebih detail tentang ikatan silang lisin pada sisi atom nitrogen. Sebagian besar ikatan silang sering dibentuk oleh susunan formaldehid dalam atom nitrogen yang terakhir dari lisin, atom nitrogen dari ikatan peptida. Susunan tersebut membuat lapisan luar keras sebanding dengan kerasnya jaringan akibat dari fiksatif. Fiksasi formaldehid mungkin akan bereaksi dengan protein. Awal formalin mengikat sebagian besar protein akan sempurna dalam waktu 24 jam tetapi proses ikatan jembatan methylene berjalan lambat (Kiernan, 2000).

2.3.3 Formalin Dalam Tubuh

Menurut Nurachman (2005), perendaman dalam formaldehide menyebabkan sebagian besar protein sitoplasma sel terkoagulasi. Protein yang berikatan dengan formaldehide menyebabkan kualitas protein menurun dan bila dikonsumsi, ada sebagian kecil formaldeide bebas yang akan terikut dengan metabolisme tubuh.

Metabolisme formaldehid menjadi asam format terjadi pada semua jaringan tubuh. Formaldehid akan dioksidasi menjadi asam format, asam format dioksidasi lebih lanjut menjadi CO_2 dan H_2O . Asam format juga dikeluarkan melalui urin. Degradasi formaldehid dalam tubuh dapat dilihat pada gambar 2.



Menurut Heck dan Casanova (1984), glutation diperlukan untuk mengoksidasi formaldehid menjadi asam format. Formaldehid dehidrogenase adalah enzim yang berperan dalam degradasi formaldehid. Enzim ini tersebar diseluruh jaringan, khususnya pada mukosa nasal hewan uji. Formaldehid dehidrogenase adalah enzim yang berperan

dalam degradasi formaldehid. Enzim ini tersebar dalam semua jaringan, khususnya pada mukosa . Formaldehyde dehydrogenase dapat dideteksi keberadaannya pada liver, sel darah merah dan sejumlah jaringan respiratori, epitel okfaktori, ginjal dan otak (IARC, 2005).

2.3.4 Efek Paparan Formalin

Uap formalin dapat membuat mata pedih dan menyebabkan lantakan atau pengeluaran air mata yang berlebih. Menghisap uap ini pada kadar rendah sekitar 1 ppm menyebabkan rasa tidak enak dan iritasi pada selaput lendir saluran nafas. Sedangkan paparan uap formalin pada kadar yang lebih tinggi menyebabkan sakit kepala, mual, rasa lemah, pupil mata melebar, sesak nafas, rasa terbakar di kerongkongan, bronkhitis, pembengkakan paru-paru, infeksi paru-paru, dan kematian. Bila zat ini termakan akan menyebabkan rasa terbakar di mulut dan tenggorokan, mual, muntah, sakit perut hebat, diare, vertigo, tidak bisa buang air kecil atau buang air kecil berdarah, penurunan kesadaran, kegagalan fungsi hati yang menyebabkan kuning pada kulit, kegagalan fungsi ginjal menyebabkan turunnya kadar protein albumin, keasaman darah meningkat, dan kejang (Fatimah, 2006).

Formalin ini sangat mudah diserap melalui saluran pernafasan dan pencernaan. Penggunaan formalin dalam jangka panjang dapat berakibat buruk pada organ tubuh, seperti kerusakan hati dan ginjal (Indra, 2007). Menurut Judarwanto (2006), formalin merupakan zat yang bersifat karsinogenik atau bisa menyebabkan kanker. Beberapa penelitian terhadap tikus dan anjing pemberian formalin dalam dosis tertentu jangka panjang secara bermakna mengakibatkan kanker saluran cerna seperti adenocarcinoma pylorus, preneoplastic hyperplasia pylorus dan adenocarcinoma duodenum.. Dalam

jumlah sedikit, formalin akan larut dalam air, serta akan dibuang ke luar bersama cairan tubuh. Sehingga formalin sulit dideteksi keberadaannya di dalam darah.

2.4 Formalin Menyebabkan Apoptosis

Sebagian besar obat-obatan serta toksikan yang masuk ke tubuh melalui saluran cerna setelah diserap oleh epitel usus akan dibawa oleh vena porta ke hati. Oleh sebab itu, hati menjadi organ yang sangat potensial menderita keracunan lebih dahulu sebelum organ lain (Santoso dan Nurliani, 2006). Secara intrasel, paparan akut formalin pada hewan percobaan menyebabkan perlakuan hati dan degenerasi sel. Sedangkan paparan kronis menyebabkan menurunnya kadar elektrolit intra dan ekstrasel, disintegrasi sel, meningkatnya kekentalan darah, dan meningkatnya jumlah sel darah merah yang immatur, di mana kemampuannya dalam mengikat oksigen belum sempurna (Fatimah, 2006).

Menurut Baraas (2006), oksigen merupakan komponen paling utama dalam proses metabolisme sel. Apabila sel tidak dapat mengikat oksigen dengan sempurna, maka terjadi iskemia pada sel. Iskemia timbul saat pemasokan oksigen tidak mencukupi pada proses oksidasi dan menyebabkan gagalnya respirasi fosforilasi oksidatif di mitokondria. Selama terjadinya iskemia memang terjadi kekurangan oksigen sehingga terjadi kebocoran oksigen pada siklus respirasi. sehingga terbentuk berbagai radikal bebas oksigen sebagai produk antara dalam sistem metabolisme intra sel. Radikal bebas merupakan mediator penting dari kerusakan jaringan dan hal ini dihubungkan dengan respon inflamasi, iskemik pada organ (Sargowo, 1993).

Jika pada fase iskemia terjadi deplesi ATP menjadi adenosin dan hipoxantin maka akan terjadi fase reperfusi dimana terjadi oksidasi hipoxantin menjadi xantin serta

terbentuk radikal bebas superoksid melalui katalisasi enzim xantin oksidasi. Penurunan ATP menyebabkan keluarnya ion Ca^{2+} sehingga terjadi degradasi fosfolipid membran sel dan disfungsi kanal-kanal ion (Baraas, 2006). Menurut Kurniasih dan Wijaya (2002), penurunan ATP akan mengakibatkan penurunan aktivitas pompa Na^+ , K^+ -ATP ase. Kegagalan pada sistem tansport aktif akibat penurunan kadar ATP ini akan menyebabkan natrium terakumulasi dalam sel disertai dengan difusi kalium keluar dari sel. Hal tersebut selanjutnya menyebabkan pembengkakan sel dan dilatasi retikulum endoplasmic. Ditambahkan pula oleh Baraas (2006), masuknya ion Na^+ selalu disertai oleh H_2O , retikulum endoplasmik, mitokondria dan sistem intrasel yang lain mengalami dilatasi, dengan fungsi yang makin menurun. Sintesis protein dan enzim-enzim intrasel pun menurun. Kanal ion Ca^{2+} juga mengalami gangguan, sehingga ion Ca^{2+} meningkat masuk ke dalam sitoplasma (influks Ca^{2+}). Keseimbangan osmotik terganggu, mitokondria menjadi mengembang. Kerusakan mitokondria berhubungan dengan lolosnya sitokrom c dalam sitosol. Sitokrom c merupakan komponen integral dari rantai transport electron dan dapat mencetuskan apoptosis.

Menurut Zulhaidah dan Tjahyono (2002), sitokrom c yang dilepaskan akan mengaktifkan Apaf-1, yang pada gilirannya akan mengaktifkan caspase -9 dan -3. Pada keadaan ini, konsumsi oksigen dan produksi ATP dapat terus berlangsung sementara itu kaspase melepaskan serangannya pada substrat-substrat sitosilik dan inti, yang mengakibatkan apoptosis.

Formaldehid juga menyebabkan kerusakan DNA pada sel dan melalui kerusakan DNA formaldehid dapat mencetuskan apoptosis. Menurut Quevryn dan Zhikovich (2000), bahwa pemaparan formaldehid pada sel menyebabkan pembentukan ikatan silang DNA-protein sebagai bentuk utama dari kerusakan DNA. Pembentukan dari

ikatan silang DNA dan histone dimulai melalui reaksi awal ikatan formaldehid dan histone diikuti oleh konjugasi dengan gugus amino DNA. Struktur umum dari formaldehid dapat menyebabkan ikatan silang DNA-protein adalah histone-NH-CH₂-NH-DNA. Ditambahkan oleh Yusuf (2001), Kerusakan DNA akan mengaktifkan gen p53. p53 adalah gen supresor tumor yang diaktifasi oleh kerusakan DNA dan gen yang paling sering bermutasi pada tumor manusia. Pada pengaktifan p53, sel dapat mengalami baik penghentian pertumbuhan maupun apoptosis.

Gen p53 pada sel-sel normal berperan sebagai regulator transkripsi, mencegah sel memasuki siklus pembelahannya dan juga menginduksi apoptosis. Bila terjadi kerusakan DNA, maka protein p53 normal akan mengaktivasi gen-gen downstream seperti p21, mdm-2, gadd45, Bax, IGF-BP dan cyclin-G untuk memperbaiki DNA yang rusak atau Memberi sinyal molekuler yang menegaskan telah terjadi kerusakan DNA yang berat dan meneruskan pada program kematian sel (Krause *et al.*, (2000) dalam Ahda dan Suhana (2002).

2.5 Hati

2.5.1 Fungsi Hati dalam Metabolisme Tubuh

Liver atau hati merupakan organ vital yang memiliki peran besar dalam sistem pencernaan, biosintesis, metabolisme energi, pembersihan sampah tubuh, dan pengatur sistem kekebalan tubuh (Susanto, 2005). Menurut Gips dan Wilson (1989), fungsi hati dapat dibagi secara lebih rinci dalam beberapa bagian yaitu mengatur kadar berbagai zat makanan yang diserap oleh usus, mengatur kadar berbagai substansi yang terdapat dalam darah, mengeliminasi sampah metabolismik yang berasal dari berbagai zat "tubuh sendiri" maupun sampah metabolisme yang berasal dari benda-benda asing.

2.5.2 Kerusakan Hati

Toksikan dapat menyebabkan berbagai jenis efek toksik pada berbagai organel dalam sel hati dan mengakibatkan berbagai jenis kerusakan hati. Menurut Lu (1995) kerusakan hati dibagi menjadi enam yaitu, perlemakan hati (Steatosis) yaitu hati yang mengandung berat lipid lebih dari 5%. Mekanisme yang mendasari adalah rusaknya pelepasan trigliserida hati ke dalam plasma, nekrosis hati yaitu kematian hepatosit, kolestasis yaitu berkurangnya aktivitas ekskresi empedu pada membran kanalikulus, ANIT (α -naftilisosianat) mengubah permeabilitas sel duktulus, sirosis ditandai oleh adanya septa kolagen yang tersebar di sebagian besar hati, hepatitis yang mirip hepatitis virus dan karsinogenesis.

2.6 Apoptosis

2.6.1 Pengertian Apoptosis

Istilah apoptosis berasal dari bahasa yunani yang berarti “gugur atau rontok”. Istilah ini dipakai untuk menunjukkan bentuk morfologi kematian sel yang berbeda dengan kematian sel karena nekrosis. Proses ini terjadi tanpa kebocoran atau tumpahnya komponen sitosol ke jaringan ekstra seluler, sehingga tidak menimbulkan reaksi inflamasi. Proses kematian sel terprogram ini terjadi melalui proses dimana inti sel menjadi padat, ukuran sel mengecil dan kemudian badan sel mengkerut. Sel yang mati ini cepat sekali difagositosis baik oleh makrofag maupun oleh sel parenkim yang berada disekitarnya. Proses kematian yang terprogram ini tampak terjadi selama masa pertumbuhan (embriogenesis, organogenesis), juga terlihat pada sel dewasa dalam beberapa proses fisiologis ataupun patologis (Jalal, 1999).

Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang didefinisikan berdasarkan mekanisme, urut-urutan peristiwa, bokimia, dan morfologi. Apoptosis merupakan program kematian sel yang dipicu oleh sinyal-sinyal fisiologis atau abnormal. Apoptosis atau kematian sel yang terprogram penting bagi perkembangan, regulasi seluler dan pemeliharaan jaringan. Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram, aktif, dan sangat selektif memungkinkan pembuangan atau pembersihan sel yang berlebihan yang atau banyak mengalami kerusakan. Berbagai stimuli yang berbeda dapat merangsang terjadinya apoptosis antara lain kerusakan DNA, kerusakan intraseluler, toksin dan sinyal-sinyal ekstraseluler (Zulhaidah dan Tjahjono, 2002).

2.6.2 Proses Apoptosis

2.6.2.1 Secara Morfologi

Menurut Jalal (1999), sel yang sedang mengalami apoptosis memperlihatkan karakteristik morfologik yaitu tahap pertama terjadi pengertian sel. Ukuran sel menjadi lebih kecil, sitoplasma lebih padat dan organel sitoplasma meskipun masih utuh akan tetapi tersusun lebih padat. Tahap kedua terjadi kondensasi kromatin. Hal ini adalah gambaran apoptosis yang paling karakteristik. Terjadi agregasi kromatin di pinggir nukleus di bawah membran inti, membentuk massa berbatas jelas dengan berbagai bentuk dan ukuran. Kemudian inti dapat pecah menjadi beberapa bagian. Tahap ketiga terjadi pembentukan gelembung apoptotik dan badan apoptosis. Sel apoptotik mulai memperlihatkan pembentukan gelembung-gelembung sitoplasma dan kemudian terbagi-bagi menjadi gelembung-gelembung kecil terbungkus oleh membran sitoplasma yang disebut badan apoptotik, yang terisi sitoplasma dengan organel yang tersusun rapat, baik disertai dengan fragmen nukleus atau tidak dan tahap keempat terjadi fagositosis sel

atau badan apoptotik oleh sel didekatnya, baik oleh sel parenkim maupun oleh makrofag. Badan apoptotik segera diuraikan di dalam lisosom, dan sel yang berada di sekitar segera bermigrasi mengisi tempat yang kosong.

2.6.2.2 Secara Molekuler

Mekanisme kematian sel secara apoptosis sesungguhnya memang berada di dalam inti sel, berupa gen *ced-3* dan *ced-4* (*ced*, cell death). Gen pro-apoptosis ini mengkode sintesis berbagai protease yang disebut sebagai *caspases* (*cysteine-dependent aspartatespecific protease*) - besar peranannya dalam proses *cascade of proteases* (proteolitik intrasel) pada waktu terjadinya apoptosis. Caspases berada dalam sel dalam bentuk enzim zomogen yang tidak aktif, tetapi sewaktu-waktu dapat diaktifasi menjadi aktif dan menyebabkan proteolitik intrasel. Pada sel manusia, sudah dapat diidentifikasi sekitar 14 enzim caspases; sebagian bersifat sebagai inisiator proapoptotik dan sebagian lagi sebagai inhibitor yang bersifat anti-apoptotik. Protein *ced-3* dan *ced-4* yang dibentuk oleh gen *ced-3* dan *ced-4*, merupakan efektor terakhir yang akan menstimulasi proses apoptosis. Proses apoptosis dapat teraktifasi melalui jalur ekstrinsik (reseptor TNF dan Fas), dapat pula melalui jalur intrinsik (cytochrome-c mitokondria). Melalui jalur ekstrinsik, berbagai sinyal intrasel – seperti protein *death domains* (DD) dan *death effector domains* (DED) - akan mengaktifasi caspase-8, selanjutnya sampai pada caspase-4 dan mengaktifasi caspase-3 sebagai efektor proses apoptosis. Jalur intrinsik akan meneruskan sinyal cytochrome-c yang keluar dari mitokondria melalui protein sinyal intrasel Bcl-2 yang bersifat antiapoptosis atau melalui protein sinyal Bax yang bersifat proapoptosis untuk mengaktifasi caspase-9. Apabila Bcl-2 lebih dominan dari Bax, maka caspase-9 yang diaktifasi akan berikatan dengan caspase-4, sehingga

mencegah aktifasi caspase-3 dan proses apoptosis pun tidak terjadi. Tetapi apabila protein Bax lebih dominan, maka sinyal apoptotik akan diteruskan melalui caspase-9 yang akan mengaktifasi langsung caspase-3 sebagai efektor apoptosis (Baraas, 2006).

2.6.3 Perbedaan dan Persamaan Morfologi Antara Apoptosis dan Nekrosis

Apoptosis dan nekrosis adalah dua jenis kematian sel yang berbeda secara morfologis. Perbedaan dan Persamaan Morfologi Antara Apoptosis dan Nekrosis berdasarkan pada perubahan-perubahan jaringan hepar yang iskemik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbedaan dan Persamaan Morfologi Antara Apoptosis dan Nekrosis.

	APOPTOSIS	NEKROSIS
1. Morfologi	Volume berkurang, kondensasi kromatin, lisosom tetap utuh	Peningkatan volume, inti utuh sampai terakhir, lisosom mengalami kebocoran
2. Membran plasma	Tetap utuh	Mengalami kerusakan di awal proses
3. Kerusakan DNA	Formasi DNA berbentuk oligonukleosomal yang memanjang	DNA mengalami proses digesti secara acak
4. Mekanisme kerusakan DNA	Gen diaktifkan, enzim endonuklease	Injury acak, penurunan ATP
5. Reaksi jaringan	Tak ada keradangan, fagositosis	Terdapat respon keradangan
6. Regulasi	Diregulasi oleh gen	Tak diregulasi

Sumber: (Zulhaidah dan Tjahjono, 2002) dan (Sahara, 2000).

2.6.4 Faktor Yang Menyebabkan Apoptosis

Proses apoptosis merupakan bagian dari proses pertumbuhan yang integral dan proses homeostatis pada jaringan sel muda maupun dewasa. Ada 2 macam faktor yang mampu menyebabkan proses apoptosis yaitu faktor fisiologis dan patologis. Contoh faktor patologis pemicu apoptosis adalah pemaparan radiasi, hipertemia, calcium

influks, glukokortikoid, agent cytotoxic, radikal bebas oksigen seperti H_2O_2 dan HO^- yang banyak dihasilkan saat terjadi iskemia atau reperfusi, inflamasi, radiasi dan penuaan. Apoptosis juga dapat dicetuskan oleh oksidatif stress yang banyak terjadi pada proses pengobatan fisis / khemis dan oleh agent peroksida (Mathieu *et al*, 1995 dalam Sahara, 2000).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan nila, larutan PBS 3-5 x, formalin 10 %, aquadest, hewan percobaan mencit betina yang terpapar ikan nila berformalin selama 3 bulan. Pemeliharaan dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Pakan standar dan air minum berupa air ledeng diberikan secara ad libitum.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan adalah kandang pemeliharaan dan botol minum mencit. Sedangkan alat yang digunakan untuk analisa adalah rotary microtome, gelas objek, tap water, sonde, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volume, bola hisap, *cover glass*, mikroskop elektron.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Suryasubrata, 1989). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir, 1988). Menurut Singarimbun dan Effendi (1983), penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap

dapat tersedia dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel merupakan segala sesuatu yang akan menjadi obyek penelitian. Variabel dibedakan menjadi variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang dipilih sebagai variabel yang sengaja dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang menjadi pusat persoalan (Suryasubrata, 1989).

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol nol; $0,5 \text{ ppm}$ ikan (kontrol negatif); $0,5 \text{ ppm}$ formalin (kontrol positif) dan $0,5 \text{ ppm}$ ikan berformalin Sedangkan variabel terikatnya adalah berat organ hati mencit, kadar formaldehid dalam serum darah, kadar SGPT ,SGOT dan kematian sel hati mencit (apoptosis).

3.4 Rancangan Percobaan

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL faktorial) dengan 2 faktor perlakuan dan 3 kali ulangan . Tabel rancangan percobaan dapat dilihat sebagai berikut :

Perlakuan		Ulangan		
Lama paparan	Dosis paparan	1	2	3
1 bulan	Kontrol nol			
	0,5 ppm ikan			
	0,5 ppm formalin			
	0,5 ppm ikan berformalin			
2 bulan	Kontrol nol			
	0,5 ppm ikan			
	0,5 ppm formalin			
	0,5 ppm ikan berformalin			
3 bulan	Kontrol nol			
	0,5 ppm ikan			
	0,5 ppm formalin			
	0,5 ppm ikan berformalin			

Secara menyeluruh perolehan data sel apoptosis, kadar formalin dalam darah, kadar SGOT dan SGPT serta data berat organ hati mencit dianalisis statistik menggunakan oneway anova dengan bantuan program SPSS dan dilanjutkan dengan analisis perbandingan menggunakan uji Tukey.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penyiapan Hewan Percobaan

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina dewasa umur 2 bulan (8 minggu). Sebelum percobaan, mencit dipastikan dalam keadaan sehat dan selanjutnya mencit diadaptasikan (aklimatisasi) lalu diberi pakan secara rutin. Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit yang terpapar 0,5 ppm ikan berformalin 3 bulan.

3.5.2 Penyediaan 0,5 ppm formalin

Pembuatan formalin 0,5 *ppm* menggunakan rumus pengenceran untuk mengetahui volume formalin yang dibutuhkan dalam 100 ml aquadest. Rumus pengencerannya sebagai berikut :

$$\text{Rumus pengenceran : } V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

V_1 : volume formalin yang dibutuhkan

N_1 : konsentrasi formalin

V_2 : volume aquadest

N_2 : konsentrasi formalin yang dibutuhkan

Perhitungan volume formalin yang dibutuhkan adalah sebagai berikut.

$$V_1 = \frac{100 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ppm}}{37 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 1,351 \text{ ml}$$

Jadi volume formalin yang dibutuhkan untuk membuat 100 ml formalin 0,5 *ppm* yaitu sebesar 1,351 ml.

3.5.3 Penyediaan 0,5 ppm Ikan Nila Berformalin

Ikan nila dicuci bersih dan difilet. Daging ikan nila diambil sebanyak 100 g ditambah dengan 100 ml aquades dan kemudian diblender sampai halus. Daging yang telah halus disaring dan filtratnya dibuang. Residu ditambahkan formalin 37 % dilakukan pengenceran bertingkat sampai menjadi larutan ikan berformalin 37 *ppm*. Selanjutnya ikan berformalin diencerkan lagi untuk mendapatkan konsentrasi 0,5 *ppm*. Adapun prosedur pembuatan larutan ikan nila berformalin dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.5.4 Penyediaan 0,5 ppm Ikan

Ikan nila dicuci bersih dan filet. Daging ikan nila diambil sebanyak 100 g ditambah dengan 100 ml aquades dan kemudian diblender sampai halus. Daging yang telah halus disaring dan filtratnya dibuang. Residu dilakukan pengenceran bertingkat sampai menjadi larutan ikan. Prosedur pembuatan larutan ikan nila dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5.5 Perlakuan Induksi Oral Ikan Berformalin Pada Mencit

Tiap perlakuan dilakukan pemberian peroral setiap hari pada pagi hari selama 3 bulan. Bahan diinduksikan langsung ke mulut dengan metode sonde. Dosis tiap perlakuan adalah 0,5 ppm. Besarnya volume cekok yang diberikan berdasarkan berat mencit setiap harinya. Volume cekok yang diberikan pada mencit dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.5.6 Cara Pembuatan Jaringan Hepar Dan Pengamatan Sel Apoptosis

3.5.6.1 Pembuatan Parafin Block Jaringan

Jaringan hepar dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan. Kemudian difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6 μ m dengan rotary microtome. Dilakukan mounting pada gelas objek dengan gelatin 5%.

3.5.6.2 Proses Deparafinisasi

Gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam H₂O selama 5 menit.

3.5.6.3 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit. Setelah itu, direndam dalam tap water selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan dH₂O. Dilakukan dehidrasi dengan alcohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit. Setelah itu dibilas dengan alcohol 30%. Dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan dikering anginkan. Kemudian dilakukan mounting dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

3.5.6.4 Pengamatan Sel Apoptosis Dengan Teknik DNA Terfragmentasi (TUNEL).

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inkubasi menggunakan 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi pada 3% H₂O₂ selama 15 menit dan selanjutnya cuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan Tunel fragmented DNA labelling selama 60 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan Peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Tetesi menggunakan substrat untuk

Peroksidase (DAB – Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang.. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan Counterstain dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH₂O. keringkan dan tutup coverglass. Kemudian amati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel.

3.5.7 Analisa Berat Hati Mencit

Prosedur analisa berat organ adalah dengan menimbang berat hati mencit menggunakan timbangan digital yang dilakukan setelah perlakuan paparan selama 2 bulan.

3.5.8 Tes Fungsi Hati

Pemeriksaan gangguan fungsi jaringan hati dapat dilakukan dengan uji SGPT (*Serum Glutamat Piruvat Transaminase*) dan uji SGOT (*Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase*) untuk mengetahui adanya kerusakan pada sel hati. Uji kandungan formaldehid dalam plasma darah untuk mengetahui kadar formaldehid dalam darah sebagai mekanisme jalannya suatu zat toksik dalam tubuh.

3.5.8.1 Uji SGOT (*Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase*)

Uji SGOT menunjukkan kerusakan fungsi jaringan hati, dengan uji ini dapat digunakan untuk mengetahui adanya indikasi kematian sel hati secara apoptosis. Cara pengujian SGOT dengan metode Kolorimetri dan Frankel dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.5.8.2 Uji SGPT (*Serum Glutamat Piruvat Transaminase*)

Uji SGPT biasanya digunakan untuk mengetahui adanya indikasi kematian sel hati secara apoptosis. Cara pengujian SGPT menggunakan metode Kolorimetri dan Frankel dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.5.9 Uji Asam Amino Menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Uji asam amino ikan nila berformalin bertujuan untuk mengetahui asam amino yang berikatan dengan formaldehid. Metode pengujian menggunakan HPLC. Teknik HPLC mempunyai beberapa keuntungan yaitu dapat membedakan asam amino D dan L, dapat bekerja lebih cepat dan pemisahan 24 asam amino dalam cairan fisiologik dapat diselesaikan dalam waktu 40 menit. Teknik HPLC memerlukan *pre-column derivatization* untuk analisa asam amino, biasanya menggunakan *dansil klorida*. Turunan dansil yang fluoresens dapat dipisahkan oleh sebuah reverse phase column dengan menggunakan *multi-step non linier elution*. Asam amino dianalisis dengan *fluorescence detector* (Winarno, 2002).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Berat Organ Hati Mencit

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data berat organ hati mencit setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Berat Organ Hati Mencit

Lama paparan	Jenis paparan	Perlakuan			Ulangan
		1	2	3	
1 bulan	Kontrol nol	0,045	0,037	0,026	
	0, 5 ppm ikan	0,053	0,051	0,061	
	0,5 ppm formalin	0,026	0,049	0,048	
	0,5 ppm ikan berformalin	0,053	0,052	0,075	
2 bulan	Kontrol nol	0,051	0,053	0,045	
	0, 5 ppm ikan	0,058	0,052	0,051	
	0,5 ppm formalin	0,050	0,048	0,047	
	0,5 ppm ikan berformalin	0,046	0,043	0,067	
3 bulan	Kontrol nol	0,057	0,045	0,043	
	0, 5 ppm ikan	0,064	0,050	0,064	
	0,5 ppm formalin	0,043	0,057	0,059	
	0,5 ppm ikan berformalin	0,053	0,056	0,064	

4.1.2 Tes Fungsi Hati

4.1.2.1 SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*)

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data kadar enzim SGOT mencit setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kadar SGOT Dalam Darah (U/L)

Perlakuan		Ulangan		
Lama paparan	Jenis paparan	1	2	3
1 bulan	Kontrol nol	181	154	183
	0, 5 ppm ikan	274	198	201
	0,5 ppm formalin	332	387	322
	0,5 ppm ikan berformalin	284	225	259
2 bulan	Kontrol nol	100	164	127
	0, 5 ppm ikan	209	170	292
	0,5 ppm formalin	289	290	457
	0,5 ppm ikan berformalin	308	182	296
3 bulan	Kontrol nol	121	114	109
	0, 5 ppm ikan	197	199	185
	0,5 ppm formalin	345	290	301
	0,5 ppm ikan berformalin	235	297	240

4.1.2.2 SGPT (*Serum Glutamic Piruvat Transaminase*)

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data kadar enzim SGOT mencit setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kadar SGPT Dalam Darah (U/L)

Perlakuan		Ulangan		
Lama paparan	Jenis paparan	1	2	3
1 bulan	Kontrol nol	37	57	64
	0, 5 ppm ikan	68	77	65
	0,5 ppm formalin	76	80	67
	0,5 ppm ikan berformalin	76	78	67
2 bulan	Kontrol nol	42	31	59
	0, 5 ppm ikan	65	78	61
	0,5 ppm formalin	65	72	71
	0,5 ppm ikan berformalin	50	58	51
3 bulan	Kontrol nol	53	47	45
	0, 5 ppm ikan	63	70	76
	0,5 ppm formalin	84	81	60
	0,5 ppm ikan berformalin	86	97	56

4.1.3 Apoptosis Sel Hati Mencit

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data jumlah apoptosis sel hati mencit setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Jumlah Apoptosis Sel Hati Mencit

Lama paparan	Jenis paparan	Perlakuan			Ulangan		
		1	2	3	1	2	3
1 bulan	Kontrol nol	3	6	7	3	8	6
	0,5 ppm ikan	21	18	-	16	22	21
	0,5 ppm formalin	36	40	30	37	39	40
	0,5 ppm ikan berformalin	21	22	28	23	24	28
2 bulan	Kontrol nol	3	6	9	8	5	7
	0,5 ppm ikan	35	35	37	32	31	34
	0,5 ppm formalin	38	32	33	31	39	27
	0,5 ppm ikan berformalin	34	34	32	34	35	34
3 bulan	Kontrol nol	8	5	5	4	3	7
	0,5 ppm ikan	45	31	34	33	29	27
	0,5 ppm formalin	32	43	51	45	43	49
	0,5 ppm ikan berformalin	37	38	32	33	39	41

4.1.4 Asam Amino Daging Ikan

Dari hasil penelitian asam amino menggunakan metode HPLC, didapatkan perbandingan kadar persentase asam amino ikan Nila berformalin dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Perbandingan Kadar Asam Amino Ikan Nila Berformalin

Asam amino	Residu	
	Kontrol (%)	Formalin (%)
Asam Aspartat	4,878	0
Serin	4,819	0
Asam Glutamat	4,651	0
Threonin	4,082	4
Arginin	3,962	3,949
Alanin	3,949	3,949
Prolin	3,823	0
Cystein	3,704	0
Methionin	3,571	0

4.2 Pembahasan

4.2.1 Berat Organ Hati Mencit

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pada paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan berat organ hati ($P<0,05$) (Tabel 8). Lama Pemaparan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan berat hati mencit ($p>0,05$) (Tabel 9) dan tidak terjadi interaksi antara jenis paparan ikan berformalin dengan lama pemaparan ($p>0,05$).

Tabel 8. Hasil Rerata Jenis Paparan Berat Organ Hati Mencit

Jenis paparan	Rerata	Notasi
Kontrol nol	0,045	a
0,5 <i>ppm</i> ikan (kontrol negatif)	0,056	b
0,5 <i>ppm</i> formalin (kontrol positif)	0,048	ab
0,5 <i>ppm</i> ikan berformalin	0,057	b

Tabel 9. Hasil Rerata Lama Paparan Berat Organ Hati Mencit

Jenis paparan	Lama paparan	Rerata	Notasi
0,5 <i>ppm</i> ikan berformalin	1 bulan	0,048	a
	2 bulan	0,051	a
	3 bulan	0,055	a

Berdasarkan hasil uji Tukey menunjukkan bahwa paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin per oral selama 3 bulan menyebabkan pertambahan berat organ hati mencit dibanding dengan kontrol ($p<0,05$). Pertambahan berat hati mencit yang terpapar ikan berformalin disebabkan karena formaldehid merupakan zat toksik yang apabila masuk ke dalam jaringan hati menyebabkan kerusakan sel hati dan mengakibatkan pertambahan berat organ hati. Menurut Wahyuni (2002), organ hati merupakan pusat detoksifikasi, sehingga bila ada zat asing yang berbahaya masuk ke dalam tubuh maka organ hati yang lebih dahulu dipengaruhi. Pengaruh ini antara lain menyebabkan meningkatnya berat organ hati dari berat normalnya.

Paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak memberikan perbedaan yang nyata terhadap kontrol negatif (0,5 *ppm* ikan) dan kontrol positif (0,5 *ppm* formalin) ($p>0,05$) dan lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin selama 1 bulan, 2 bulan hingga 3 bulan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap pertambahan berat organ hati mencit. Pengaruh ini tidak memberikan perbedaan karena perubahan yang terjadi pada hati mencit setelah pemaparan ikan berformalin belum ke arah kerusakan secara makroskopis tetapi lebih ke arah mikroskopis. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Laksono (2007), bahwa berat hati tikus setelah perlakuan tidak berbeda nyata terhadap kontrol karena perubahan yang terjadi pada hati tikus yang terkena paparan formalin lebih ke arah mikroskopis. Hasil analisa perbandingan berat hati mencit secara menyeluruh menggunakan metode Tukey dengan bantuan program SPSS dapat dilihat pada Lampiran 8.

4.2.2 Tes Fungsi Hati

4.2.2.1 SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*)

SGOT merupakan salah satu uji untuk mengetahui adanya kerusakan hati. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan ikan berformalin memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan kadar SGOT hati mencit ($p<0,05$) (Tabel 10). Lama pemaparan 0,5 ppm ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar SGOT hati mencit ($p>0,05$) (Tabel 11) dan tidak terjadi interaksi antara jenis paparan ikan berformalin dengan lama pemaparan terhadap peningkatan kadar SGOT hati mencit ($p>0,05$).

Tabel 10. Hasil Rerata Jenis Paparan Kadar Enzim SGOT Mencit

Jenis paparan	Rerata	Notasi
Kontrol nol	139,22	a
0,5 ppm ikan (kontrol negatif)	213,89	b
0,5 ppm formalin (kontrol positif)	334,78	c
0,5 ppm ikan berformalin	258,44	b

Tabel 11. Hasil Rerata Lama Paparan Kadar Enzim SGOT Mencit

Jenis paparan	Lama paparan	Rerata	Notasi
0,5 ppm ikan berformalin	1 bulan	347,00	a
	2 bulan	345,33	a
	3 bulan	312,00	a

Berdasarkan hasil uji Tukey dapat diketahui bahwa paparan 0,5 ppm ikan berformalin selama 3 bulan menyebabkan peningkatan kadar enzim SGOT secara nyata terhadap kontrol nol, dan kontrol positif (0,5 ppm formalin) namun tidak berpengaruh nyata terhadap kontrol negatif (0,5 ppm ikan). Peningkatan kadar enzim SGOT pada jaringan hati mencit disebabkan oleh formaldehid bebas yang tidak berikatan dengan daging ikan masuk diserap oleh usus dan distribusikan melalui darah masuk ke dalam sel hati sehingga terjadi gangguan fungsi hati dan enzim SGOT keluar dari sel. Menurut

Suarsana dan Budiasa (2005). Peningkatan kadar SGOT disebabkan kerusakan fungsi hati sebagai akibat pemaparan bahan toksik. Adanya kerusakan sel-sel paremkim hati atau permeabilitas membran akan mengakibatkan enzim GOT (Glutamat Okasaloasetat Transminase) bebas keluar sel, sehingga enzim masuk ke pembuluh darah melebihi keadaan normal dan kadarnya dalam darah meningkat.

Paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak berpengaruh nyata terhadap kontrol negatif (0,5 *ppm* ikan) karena diduga adanya bahan toksik lain selain formalin yang terdapat dalam daging ikan sehingga apabila masuk ke dalam tubuh juga akan menyebabkan kerusakan sel hati. Menurut Lu (1995), toksisitas bahan kimia pada suatu organisme dapat meningkat bila organisme itu terpajan oleh bahan kimia lain secara serentak atau berurutan.

Lamanya pemaparan ikan berformalin selama 1, 2 dan 3 bulan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan kadar SGOT dalam hati mencit namun lama pemaparan justru menurunkan kadar enzim SGOT dalam hati. Penurunan kadar SGOT disebabkan karena kerusakan organ hati sudah semakin parah dan meluas. Tingkat kerusakan sel hati mencit yang sudah semakin meluas dan parah ini menyebabkan kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim SGOT semakin berkurang. Menurut Panjaitan *et al.*, (2002), Kerusakan yang relatif kecil pada sel hati akan meningkatkan kadar enzim AST atau SGOT dan ALT atau SGPT di dalam darah. Namun, pada tingkat kerusakan yang luas dan parah, ketersediaan enzim AST dan ALT di dalam sel hati sudah sangat rendah akibat kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim tersebut sudah berkurang atau hilang sama sekali. Hasil analisa perbandingan kadar SGOT secara menyeluruh menggunakan metode Tukey dengan bantuan program SPSS dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.2.2.2 SGPT (*Serum Glutamic Piruvat Transaminase*)

SGPT adalah parameter yang lebih spesifik dalam menentukan kerusakan hati. SGPT merupakan enzim yang dibuat dalam sel hati (hepatosit). Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin selama 3 bulan memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan kadar SGPT ($p<0,05$) (Tabel 12) tetapi lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar SGPT hati mencit ($p>0,05$) dan tidak terjadi interaksi antara jenis paparan ikan berformalin dengan lama pemaparan terhadap peningkatan kadar SGOT hati mencit ($p>0,05$) (Tabel 13).

Tabel 12. Hasil Rerata Jenis Paparan Kadar Enzim SGPT Mencit

Jenis paparan	Rerata	Notasi
Kontrol nol	48,33	a
0,5 <i>ppm</i> ikan	68,78	b
0,5 <i>ppm</i> formalin	69,22	b
0,5 <i>ppm</i> ikan berformalin	72,89	b

Tabel 13. Hasil Rerata Lama Paparan Kadar Enzim SGPT Mencit

Jenis paparan	Lama paparan	Rerata	Notasi
0,5 <i>ppm</i> ikan berformalin	1 bulan	73,67	a
	2 bulan	79,67	a
	3 bulan	53,00	a

Berdasarkan hasil uji Tukey menunjukkan bahwa paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin per oral selama 3 bulan menyebabkan peningkatan kadar enzim SGPT secara nyata terhadap kontrol nol ($p<0,05$). Peningkatan kadar SGPT pada mencit setelah terpapar 0,5 *ppm* ikan berformalin secara terus menerus selama 3 bulan disebabkan adanya formaldehid bebas yang tidak berikatan dengan daging ikan diserap oleh tubuh dan masuk ke organ hati sehingga menyebabkan gangguan fungsi hati yang ditandai dengan meningkatnya kadar enzim SGPT. Menurut Irnawati et al., (2005),

pengukuran aktivitas enzim GPT dan GOT dalam serum dilakukan dengan pertimbangan bahwa peningkatan aktivitas enzim-enzim tersebut merupakan indikator yang kuat dan peka terhadap kelainan sel hati.

Paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kontrol negatif (0,5 *ppm* ikan) dan kontrol positif (0,5 *ppm* formalin) ($p>0,05$). Pengaruh ini diduga karena adanya bahan toksik lain selain formalin yang terdapat pada ikan sehingga apabila masuk ke dalam tubuh bersama dengan formalin secara terus menerus akan menyebabkan kerusakan sel hati. Menurut Lu (1995), toksisitas bahan kimia pada suatu organisme dapat meningkat bila organisme itu terpajan oleh bahan kimia lain secara serentak atau berurutan.

Lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin selama 1 bulan, 2 bulan hingga 3 bulan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar enzim SGPT. Berdasarkan hasil reratanya menunjukkan bahwa lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin selama 1 dan 2 bulan terjadi peningkatan kadar enzim SGPT namun pada paparan selama 3 bulan terjadi penurunan kadar enzim SGPT. Pengaruh penurunan kadar enzim SGPT pada paparan selama 3 bulan disebabkan oleh tingkat kerusakan sel hati sudah semakin parah meluas sehingga kemampuan sel dalam mensintesis enzim semakin berkurang. Menurut Panjaitan *et al.*, (2002), Kerusakan yang relatif kecil pada sel hati akan meningkatkan kadar enzim AST atau SGOT dan ALT atau SGPT di dalam darah. Namun, pada tingkat kerusakan yang luas dan parah, ketersediaan enzim AST dan ALT di dalam sel hati sudah sangat rendah akibat kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim tersebut sudah berkurang atau hilang sama sekali. Hasil analisa perbandingan kadar SGPT secara menyeluruh menggunakan metode Tukey dengan bantuan program SPSS dapat dilihat pada Lampiran 10.

4.2.3 Apoptosis Sel Hati Mencit

Proses apoptosis merupakan bagian dari proses pertumbuhan yang integral dan proses homeostatis pada jaringan sel muda maupun dewasa. Ada 2 macam faktor yang mampu menyebabkan proses apoptosis yaitu faktor fisiologis dan patologis. Secara patologis formaldehid dalam ikan berformalin dapat menyebabkan apoptosis pada sel hati mencit. Gambar sel hati mencit yang mengalami apoptosis setelah pemaparan ikan berformalin dapat dilihat pada Lampiran 6. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan 0,5 ppm ikan berformalin memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah sel apoptosis hati mencit ($p<0,05$) (Tabel 14). Lama pemaparan memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah sel apoptosis hati mencit ($p<0,05$) dan terjadi interaksi antara jenis paparan ikan berformalin dengan lama pemaparan terhadap peningkatan jumlah apoptosis sel hati mencit ($p<0,05$) (Tabel 15).

Tabel 14. Hasil Rerata Jenis Paparan Apoptosis Sel Hati Mencit

Jenis paparan	Rerata	Notasi
Kontrol nol	5,72	a
0,5 ppm ikan (kontrol negatif)	28,71	b
0,5 ppm formalin (kontrol positif)	38,78	c
0,5 ppm ikan berformalin	31,61	d

Tabel 15. Hasil Rerata Lama Paparan Apoptosis Sel Hati Mencit

Jenis paparan	Lama paparan	Rerata	Notasi
0,5 ppm ikan berformalin	1 bulan	24,33	a
	2 bulan	33,83	b
	3 bulan	36,67	b

Berdasarkan hasil uji Tukey menunjukkan bahwa paparan 0,5 ppm ikan berformalin per oral selama 3 bulan menyebabkan peningkatan jumlah apoptosis sel hati secara nyata terhadap semua kontrol dan lama pemaparan 0,5 ppm ikan berformalin selama 1 bulan dan 2 bulan menyebabkan peningkatan jumlah sel apoptosis hati mencit ($p<0,05$) namun

pada paparan 2 bulan dan 3 bulan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah sel apoptosis hati mencit ($p>0,05$). Berdasarkan hasil reratanya menunjukkan bahwa lama pemaparan 0,5 ppm ikan berformalin 2 dan 3 bulan menyebabkan peningkatan jumlah apoptosis sel hati mencit. Pengaruh paparan dan lama pemaparan 0,5 ppm ikan berformalin pada mulanya disebabkan karena perendaman daging ikan dengan formalin dimana gugus aldehid pada formaldehid bereaksi dan berikatan dengan asam amino dari daging ikan membentuk suatu ikatan silang -CH₂- yang disebut jembatan metilen. Berdasarkan hasil uji asam amino menggunakan metode HPLC diperoleh data asam amino dari residu ikan yang berikatan dengan formaldehid antara lain Asam Aspartat, Serin, Asam glutamat, Treonin, Arginin, Metionin, Prolin, dan Cystein.. Ikatan silang antara asam amino dan formaldehid ditandai dengan penurunan kadar asam amino pada daging. Data hasil pengujian asam amino dapat dilihat pada Lampiran 7. Menurut Skrzydlewskal *et al.*, (1999), formaldehid sangat mudah bereaksi dengan cystein, metionin, lisin, arginin, tirosin sampai kadar terkecil dari residu asam amino lain. Ditambahkan pula oleh Lazzari dan Ranly (2008), ikatan silang formaldehid dapat terbentuk antara gugus amino dengan gugus indol, gugus fenolik, gugus imidazol dan gugus amida.

Dalam reaksi ikatan silang antara asam amino dan formaldehid terdapat formaldehid bebas yang tidak terikat pada protein ikan. Formaldehid bebas ini apabila masuk ke dalam tubuh karena konsumsi ikan berformalin secara berulang akan menyebabkan toksik. Menurut Nurachman (2005), makanan berformalin akan beracun hanya jika di dalamnya mengandung sisa formaldehid bebas. Sisa formaldehid bebas (yang tidak bereaksi) hampir selalu ada dan sulit dikendalikan. Itulah sebabnya formalin untuk pengawet makanan tidak dianjurkan karena sangat beresiko.

Formaldehid bebas akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna setelah diserap oleh epitel usus akan dibawa oleh vena porta menuju ke hati. Formaldehid akan mengalami proses biotransformasi oleh enzim glutation yaitu dioksidasi menjadi asam format, asam format digedradasi lebih lanjut oleh enzim formaldehid dehidrogenase menjadi CO_2 dan H_2O dalam hati kemudian dikeluarkan melalui ginjal bersama urin. Namun, apabila terjadi paparan kronis karena dipapar terus menerus selama 3 bulan akan menyebabkan tingkat kejemuhan pada enzim formaldehid dehidrogenase dalam memetabolisme formaldehid sehingga hasil metabolit formaldehid tidak sempurna. Menurut Ariens *et al.*, (1985), pada konsentrasi zat yang masuk dalam tubuh terus menerus, jumlah zat yang dimetabolisme persatuan waktu akan naik, sehingga tercapai konsentrasi yang menyebabkan enzim yang berperan dalam metabolisme akan menjadi jemuhan.

Formaldehid yang tidak termetabolisme oleh enzim formaldehid dehidrogenase akan masuk dalam sel sehingga menyebabkan gangguan oksidasi di metabolisme sel hati dan terjadi iskemia. Iskemia menyebabkan gagalnya respirasi fosforilasi di mitokondria sehingga menyebabkan kerusakan pada mitokondria. Menurut Baraas (2006), kerusakan mitokondria berhubungan dengan lolosnya sitokrom c dalam sitosol. Sitokrom c merupakan komponen integral dari rantai transport elektron dan dapat mencetuskan apoptosis.

Pengaruh lain yang menyebabkan apoptosis sel yaitu diduga bahwa formaldehid yang telah berikatan dengan asam amino membentuk jembatan metilen dapat berikatan dengan DNA sel sehingga membentuk ikatan silang DNA-protein dan sel akan mengalami kerusakan DNA. Kerusakan DNA pada sel akan mengaktifkan gen p53 dan gen p53 akan mencetuskan proses apoptosis. Menurut Quevryn dan Zhitkovich (2000),

bahwa pemaparan formaldehid pada sel menyebabkan pembentukan ikatan silang DNA-protein sebagai bentuk utama dari kerusakan DNA. Struktur umum dari formaldehid dapat menyebabkan ikatan silang DNA-protein adalah histone-NH-CH₂-NH-DNA. Ditambahkan oleh Yusuf (2001), Kerusakan DNA akan mengaktifkan gen p53. p53 adalah gen supresor tumor yang diaktifasi oleh kerusakan DNA dan gen yang paling sering bermutasi pada tumor manusia. Pada pengaktifan p53, sel dapat mengalami baik penghentian pertumbuhan maupun apoptosis. Hasil analisa perbandingan sel apoptosis hati mencit secara menyeluruh menggunakan metode Tukey dengan bantuan program SPSS dapat dilihat pada Lampiran 11.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa:

- Ditinjau secara makroskopis, paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin menyebabkan pertambahan berat organ hati mencit secara nyata terhadap kontrol ($p<0,05$) namun lama pemaparan ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata ($p>0,05$) sehingga dapat terlihat bahwa perubahan jaringan hati yang terjadi setelah pemaparan ikan berformalin lebih ke arah mikroskopis.
- Bila ditinjau pada tes fungsi hati dengan mengukur kadar enzim SGPT dan SGOT menunjukkan bahwa paparan 0,5 *ppm* ikan berformalin menyebabkan peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT secara nyata terhadap kontrol nol ($p<0,05$). Lama pemaparan 0,5 *ppm* ikan berformalin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT ($p>0,05$) namun menyebabkan penurunan kadar enzim SGOT dan SGPT. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan sel pada jaringan hati sudah semakin parah dan meluas sehingga kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim tersebut sudah berkurang
- Ditinjau secara mikroskopis, jenis pemaparan dan lama pemaparan ikan berformalin menyebabkan peningkatan apoptosis sel hati mencit ($p<0,05$). Oleh sebab itu penggunaan formalin sebagai bahan pengawet pada makanan tidak dianjurkan karena apabila terpajan terus menerus ke dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan organ dalam tubuh terutama hati.

5.2 Saran

Saran yang dapat kami sampaikan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Perlu adanya pengenalan dan penyuluhan tentang bahaya formalin kepada masyarakat.
- Perlu adanya penelitian lebih lanjut terhadap pengaruh paparan ikan berformalin pada organ dalam tubuh lainnya dan pada mencit turunannya.



DAFTAR PUSTAKA

- Adawayah, R. 2007. Pegolahan Dan Pengawetan Ikan. Penerbit Bumi Aksara. Jakarta.
- Ahda, Y dan N. Suhana. 2002. Deteksi Mutasi Gen p53 Germline Pada Keluarga Sindrom Li-Fraumeni. Jurnal Kesokteran Yarsi 10 Vol.1 Hal. 39-44.
- Baraas, F. 2006. Dari Programmed Cell Survival Sampai Programmed Cell Death Pada Sel Otot Jantung.www.neuro-onkologi.com/articles. Departemen Kardiologi FKUI. Jakarta. Diakses tanggal 23 April 2008; 20:34 WIB.
- Cahyadi, W. 2006. Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. Edisi 1. PT. Bumi Aksara. Jakarta. Hal 4, 230-237.
- Departemen Kelautan dan Perikanan. 2005. Dalam Rangka Program Aksi 100 Hari, DKP Panen Raya INBUDKAN Nila di Kabupaten Subang. Ditjen Perikanan Budidaya. <http://www.dkp.go.id>. Diakses tanggal 28 November 2006 pukul 21.21 WIB.
- Efendi, J. 2007. Pengaruh Paparan Berulang Ikan Berformalin 0,5 ppm Per Oral Selama 1 Bulan Terhadap Kondisi Fisiologis Mencit (*Mus musculus*). Laporan Skripsi Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fatimah, N. 2006 Ada Apa Dengan Formalin. <http://www.percikan-iman.com>. Diakses tanggal 28 Agustus 2007 pukul 13.15 WIB.
- Girindra, A. 1998. Petunjuk Praktikum Biokimia Patologi. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal 113-115, 14-124-129, 182-189.
- Gips, C.H and Wilson, J.P.H. 1989. Diagnosis dan Terapi Penyakit Hati Dan Empedu. Penerbit KDT. Alih bahasa: Illyass Efendi. Jakarta
- Heck, H.D dan Casanova. M. 1984. Toxicol Appl Pharmacol 89(1): 122-134. Library of Medicine's TOXET System on August 18. 2000. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>. Diakses tanggal 12 Februari 2006.
- Hadiwiyoto, S. 1993. Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan. Jilid 1. Liberty. Yogyakarta.
- Irnowati. R; A. Widyawaruyanti dan H. Studiawan. 2005. Pengaruh Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Kulit Batang Artocarpus champeden Spreng Terhadap Kadar Enzim SGPT dan SGOT Mencit. Majalah Farmasi Airlangga, Vol.5 No.3. Hal 96-99
- IARC. 2005. Formaldehyde. <http://www.cie.iarc.fr/htdocs/announcements/vol88.html>. Diakses tanggal 13 Mei 2006.

Indra. 2007. Ancaman Formalin di Makanan Kita. <http://www.google.com>. Diakses tanggal 21 Februari 2007; 21:21 WIB.

Jahujuri, M. 2007. Kajian LD₅₀ Ikan Nila (Tilapia niloticus) Berformalin 10 % Dengan Menggunakan Hewan Percobaan Mencit (Mus musculus). Laporan Skripsi Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Jalal, E.A. 1999. Apoptosis Dan Dasar Molekuler Kematian Sel Terprogram. Jurnal Kedokteran YARSI. Vol. 7. No. 1. Lembaga Penelitian Universitas YARSI. Jakarta. Hal 35 – 41.

Judarwanto, W. 2006. Pengaruh Formalin Bagi Sistem Tubuh. Rumah Sakit Bunda Jakarta. www.Putrakembara.com. Diakses tanggal 19 September 2006.

Kiernan J.A., 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do., Department of Anatomy & Cell Biology,The University of Western Ontario, London.

Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Hal 5-7.

Kusumaningtyas, A. 2007. Pengaruh Konsumsi Ransum Berformalin Terhadap Pertumbuhan Dan Organ Dalam Tikus Wistar (Rattus norvegicus). Artikel Penelitian Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Kurniasih, R dan Wijaya, A. 2002. Peran Radikal Bebas Pada Iskemia-Reperfusi Serebral Atau Miokardium. Prodia Forum Daignosticum. Universitas Padjadjaran. Badung.

Nurachman .Z. 2005. Formalin. zeily@chem.itb.ac.id. Diakses tanggal 28 Oktober 2006;12:32 WIB.

Nazir, M. 1988. *Metode Penelitian*. PT Ghilia Indonesia. Jakarta.

Nurlaila, I dan M. Hadi. 2007. Kanker: Pertumbuhan , Terapi dan Nanomedis. <http://www.nano.lipi.go.id>. Diakses tanggal 10 Oktober 2007; 18:38 WIB.

Lazzari, E.P and D.M. Ranly. 2008. The Effects of Formocresol on Rat Sponge Implant Tissue: A Biochemical Study. Department of Biochemistry and Physiology, The Universityof Texas Dental Branch, Houston, Texas 77030, USA.

Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko. Penerjemah Edi Nugroho, Zunilda S. B, dan Iwan Darmansyah. Universitas Indonesia Press. Jakarta. Hal 106, 208-215.

- Laksono, C.S. 2007. Pengaruh Konsumsi Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Berformalin Terhadap Pertumbuhan Dan Organ Dalam Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Artikel Penelitian Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Murtidjo, B.A. 2001. Beberapa Metode Pemberian Ikan Air Tawar. Kanisius. Yogyakarta. Hal 67.
- Panjaitan, R.G.P; Handharyani, E; Chairul; Masriani; Zakiah, Z dan Manalu, W. 1997. Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida Terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus. Jurnal Kedokteran Dexa Medica vol 1 no. 1. Jakarta barat.
- Quievry, G and A. Zhitkovich. 2000. Loss of DNA-Protein Crosslink From Formaldehyde-exposed Cells Occurs Through Spontaneous Hydrolysis and An Active Repair Process Linked to Proteosome Function. Journal of Carcinogenesis Vol.21 No.8. Oxford University Press.
- Rustidja. 1996. Pola Warna dan Genetik Ikan Nila. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Sargowo, HD. 1993. Radikal Bebas Oksigen Dan Iskemik Miokard. Majalah Kedokteran Unibraw. Vol. IX. No. 2. Universitas Brawijaya.
- Sahara, A.S. Proses Apoptosis Sel Endotel Pada Penderita Preeklamsia. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Santoso, H.B dan Nurliani,A. 2006. Efek Doksisiklin Selama Masa Organogenesis Pada Struktur Histologi Organ Hati dan Ginjal Fetus Mencit. Jurnal Bioscientiae. <http://bioscientiae.tripod.com>. Volume 3, No. 1, Hal 15-27. Diakses tanggal 12 Mei 2008; 19:06 WIB.
- Skrzydlewska1. E; A. Roszkowska1 and J. Moniuszko. 1999. A Comparison of Methanol and Ethanol Effects on The Activity and Distribution of Lysosomal Proteases. Polish Journal of Environmental Studies Vol. 8, No. 4 (1999), 251-257.
- Suarsana, I.N dan Budiarsa, I.K. 2004. Potensi Hepatoprotektif Ekstrak Mengkudu Pada Keracunan Parasetamol. Jurnal Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana <http://www.w3.org/1999/xhtml>". Diakses tanggal 10 April 2008; 08:15.
- Suryasubrata, S. 1989. *Metodologi Penelitian*. Rajawali. Jakarta.
- Singarimbun, M dan S. Effendi. 1983. Metodologi Penelitian Survei. Lembaga Penelitian Peneranga Sosial. Matahari Bhakti. Jakarta.
- Widjaja, K.A. 2006. Tahu, Makanan Favorit yang Keamanannya Perlu Diwaspadai. <http://www.wismamas.tk>. Diakses tanggal 14 Oktober 2007 pukul 15.32 WIB.

Yusuf, K.M. 2001. Perbedaan Derajad Apoptosis di Tropoblast Mencit (BALB/C) pada Kehamilan Fisiologis Berdasarkan Umur Kehamilan. Laporan Skripsi Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya Malang.

Zulhaidah, A.M; Tjahjono, C.T. 2002. Peran Mitokondria Dalam Apoptosis. Majalah Kedokteran Unibraw. Vol. XVIII No. 2. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 106 – 112.



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Pembuatan 0,5 ppm Ikan Nila Berformalin

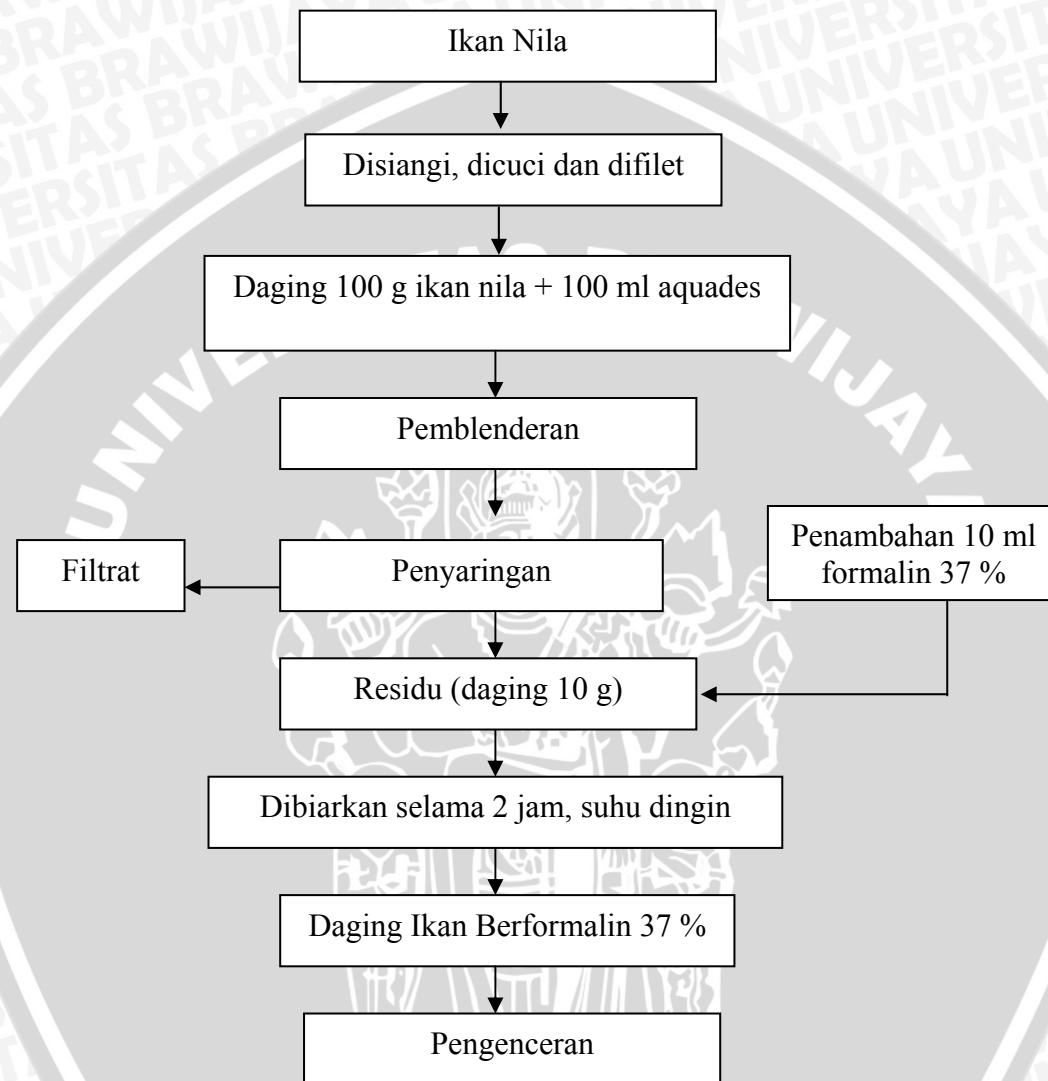
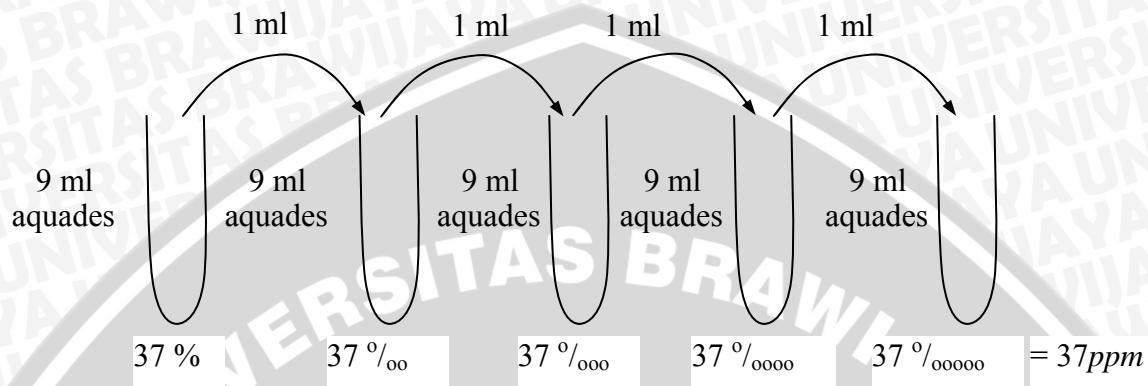


Diagram pembuatan ikan nila berformalin

Pengenceran

Proses pengenceran ikan nila berformalin adalah sebagai berikut:



Pembuatan Ikan berformalin 0,5 ppm

Adapun perhitungan konsentrasi ikan berformalin yang dibutuhkan sebagai berikut:

- 0,5 ppm Ikan Berformalin

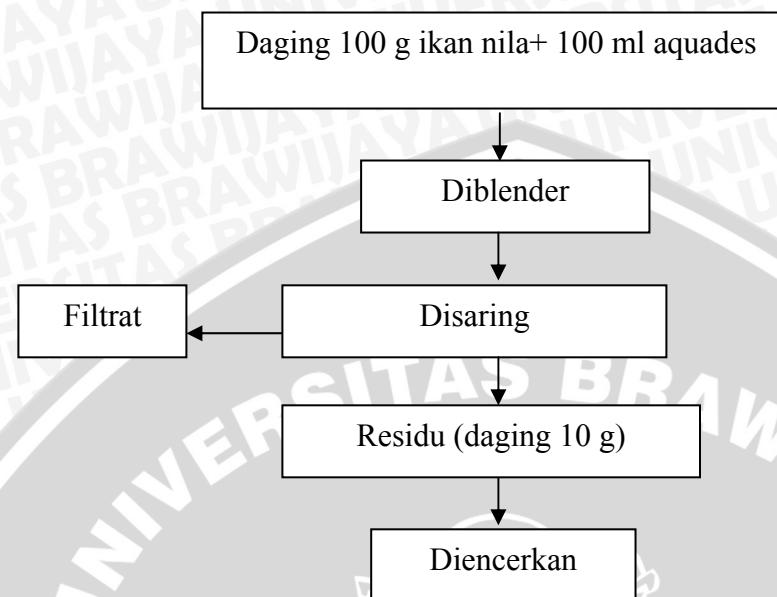
$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 37 \text{ ppm} = 100 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ppm}}{37 \text{ ppm}}$$

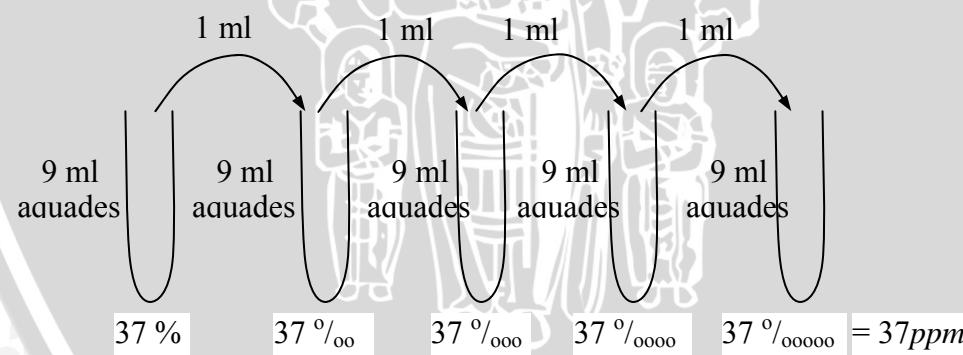
$$V_1 = 1,351 \text{ ml}$$

Lampiran 2. Prosedur Pembuatan 0,5 ppm Ikan



Pengenceran

Proses pengenceran 0,5 ppm ikan nila adalah sebagai berikut:



Lampiran 3. Perhitungan pemberian volume cekok

- Jika asumsi formalin yang masuk melalui oral secara terus menerus dengan konsentrasi 350 *ppm* formalin, sedangkan konsumsi ikan 26 kg/kapita/tahun atau 71,232 g/hr dan berat badan manusia 50 kg, maka penentuan dosis 0,5 *ppm* dapat diperoleh dari:

$$\begin{aligned}\text{Dosis ikan berformalin} &= \frac{\text{konsentrasi} \times \text{berat ikan}}{\text{berat badan}} \\ &= \frac{350 \text{ mg} \times 71232 \text{ mg}}{50000000 \text{ mg}} \\ &= 0,499 = 0,5 \text{ ppm}\end{aligned}$$

- Jika berat badan mencit 20 g, maka :

$$\begin{aligned}\text{Dosis yang masuk} &= \frac{20 \text{ gr} \times 0,5 \text{ ppm}}{50000 \text{ gr}} \\ &= 2 \times 10^{-4} \text{ ppm}\end{aligned}$$

- Volume cekok yang diberikan untuk berat mencit 20 g =

$$\begin{aligned}&= \frac{2 \times 10^{-4} \text{ ppm}}{0,5 \text{ ppm}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 0,04 \text{ ml}\end{aligned}$$

- Volume cekok yang diberikan untuk berat mencit 21 g, menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}&= \frac{\text{berat badan mencit}}{\text{berat rata-rata mencit (20 g)}} \times 0,04 \text{ ml} \\ &= \frac{21 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0,04 \text{ ml} \\ &= 0,042 \text{ ml}\end{aligned}$$

Lampiran 4. Uji SGOT dengan Metode Kolorometri Reitman dan frankle (Girindra, 1998).

Bahan :

- Serum yang tidak hemolisis,
- Larutan a (larutan buffer substrat 100ml mol/L, buffer fosfat 7,4 100ml/L L-aspartat, 2m mol/L 2-oksoglutarat. Larutkan semuanya dalam 30 ml aquades).
- Larutan b (Pereaksi warna 1,5 m mol/L 2,4 dinitrofenil hidrazin).
- Larutan c (larutan sodium hidroksid, 0,4 mol/L sodium hidroksid. Larutkan dalam 1000 ml aquades dalam tempat gelas).
- Larutan d (larutan standar (2m mol/L sodium piruvat). Semua pereaksi sudah disediakan secara siap pakai dari Merck.

Prosedur Kerja :

- Untuk setiap contoh harus disediakan 1 blanko.
- 2 tabung reaksi diisi 0,5 ml buffer substrat. Tabung pertama untuk contoh, tabung kedua untuk blanko. Inkubasikan pada penaggas air 37°C selama 5 menit.
- Tambahkan ke dalam tabung contoh serum segar bebas hemolisis sebanyak 0,2 ml serum. Campurkan dan biarkan pada suhu $15\text{-}25^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit tepat. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 5.0 ml larutan c. campurkan setelah 5 – 30 menit diukur absorbansinya lebih dari $86 \mu\text{/L}$. encerkan 0,2 ml serum dengan 0,8 ml larutan garam fisiologis. Ulangi analisis dengan 0,2 ml larutan yang sudah diencerkan dan kalikan hasilnya dengan 5.
- Buat kurva kalibrasi dengan seri pengenceran sebagai berikut :

No tabung	Larutan standar (ml)	Larutan bufer (ml)	Metod UV u/L
1	0.0	1.00	0
2	0.05	0.95	9
3	0.010	0.90	21
4	0.15	0.85	36
5	0.20	0.080	60
6	0.25	0.75	95

Campur dan tambahkan pereaksi warna ke dalam setiap tabung sebanyak 1 ml. Biarkan selama 20 menit pada suhu $15 - 25^{\circ}\text{C}$. Tambahkan larutan c 0,4 mol/L sebanyak 10 ml kedalam setiap tabung. Campur baik-baik. Sesudah 5 – 20 menit, ukur absorbansinya dari tabung no.2 sampai no.6 terhadap larutan no.1 pada panjang gelombang 500- 560 nm.



Lampiran 5. Uji SGPT metode Kolorimetri Reitman dan Frankle (Girindra, 1998).

Bahan :

- Serum yang tidak hemolisis,
- Larutan a (larutan buffer substrat 100ml mol/L, buffer fosfat 7,4 100ml/L L-aspartat, 2m mol/L 2-oksoglutarat. Larutkan semuanya dalam 30 ml aquades).
- Larutan b (Pereaksi warna 1,5 m mol/L 2,4 dinitrofenil hidrazin).
- Larutan c (larutan sodium hidroksid, 0,4 mol/L sodium hidroksid. Larutkan dalam 1000 ml aquades dalam tempat gelas).
- Larutan d (larutan standar 2 m mol/L sodium piruvat). Semua pereaksi sudah disediakan secara siap pakai dari Merck.

Prosedur Kerja :

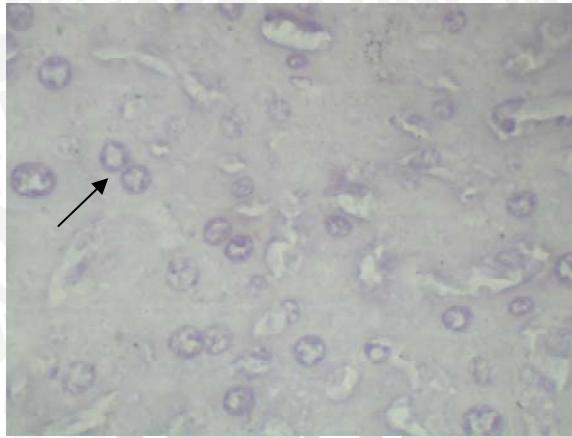
- Untuk setiap contoh harus disediakan 1 blanko.
- Larutan a dalam botol dilarutkan dalam 30 ml aquades. Larutan c dilarutkan dalam 1000 ml aquades di tempat dari gelas.
- 2 tabung reaksi diisi 0,5 ml buffer substrat. Tabung pertama untuk contoh, tabung kedua untuk blanko. Inkubasikan pada penaggas air 37°C selama 5 menit. Tambahkan ke dalam tabung contoh serum segar bebas hemolisis sebanyak 0,1 ml serum. Campurkan lagi dibiarkan dan ikubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C .
- Tambahkan ke masing-masing tabung 0,5 ml pereaksi warna. Pada blanko tambahkan 0,1 ml serum. Campur dan biarkan pada suhu $15-25^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit tepat. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 5,0 ml larutan c. campurkan setelah 5 – 30 menit diukur absorbansinya lebih dari $90 \mu\text{L}$. encerkan 0,2 ml serum dengan 0,8

ml larutan garam fisiologis. Ulangi analisis dengan 0,2 ml larutan yang sudah diencerkan dan kalikan hasilnya dengan 5.

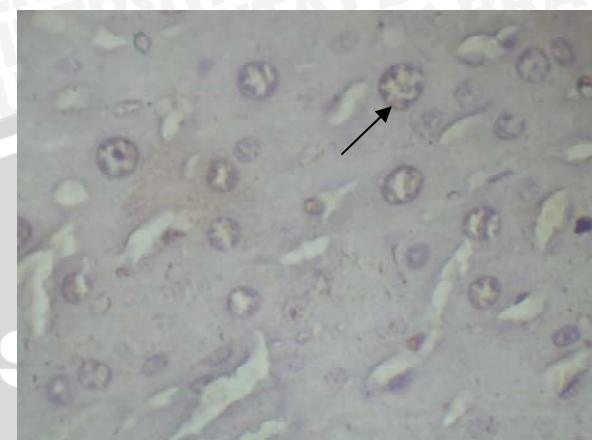
- Buat kurva kalibrasi dengan seri pengenceran sebagai berikut :

No tabung	Larutan standar (ml)	Larutan bufer (ml)	Metod UV u/L
1	0.0	1.00	0
2	0.10	0.90	14
3	0.20	0.80	32
4	0.30	0.70	51
5	0.40	0.60	69
6	0.50	0.50	92

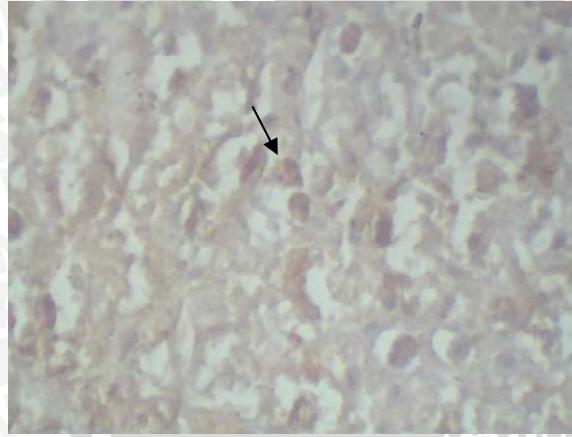
Campur dan tambahkan pereaksi warna ke dalam setiap tabung sebanyak 0,1 ml. Biarkan selama 20 menit pada suhu $15 - 25^{\circ}\text{C}$. Tambahkan larutan c 0,4 mol/L sebanyak 10 ml kedalam setiap tabung. Campur baik-baik. Sesudah 5 – 20 menit, ukur absorbansinya dari tabung no.2 sampai no.6 terhadap larutan no.1 pada panjang gelombang 500- 560 nm.

Lampiran 6. Gambar Sel Hati Mencit Setelah Perlakuan

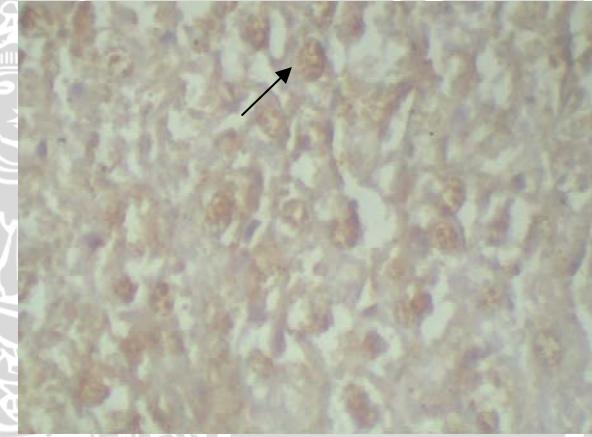
Kontrol nol



0,5 ppm Ikan



0,5 ppm Ikan berformalin

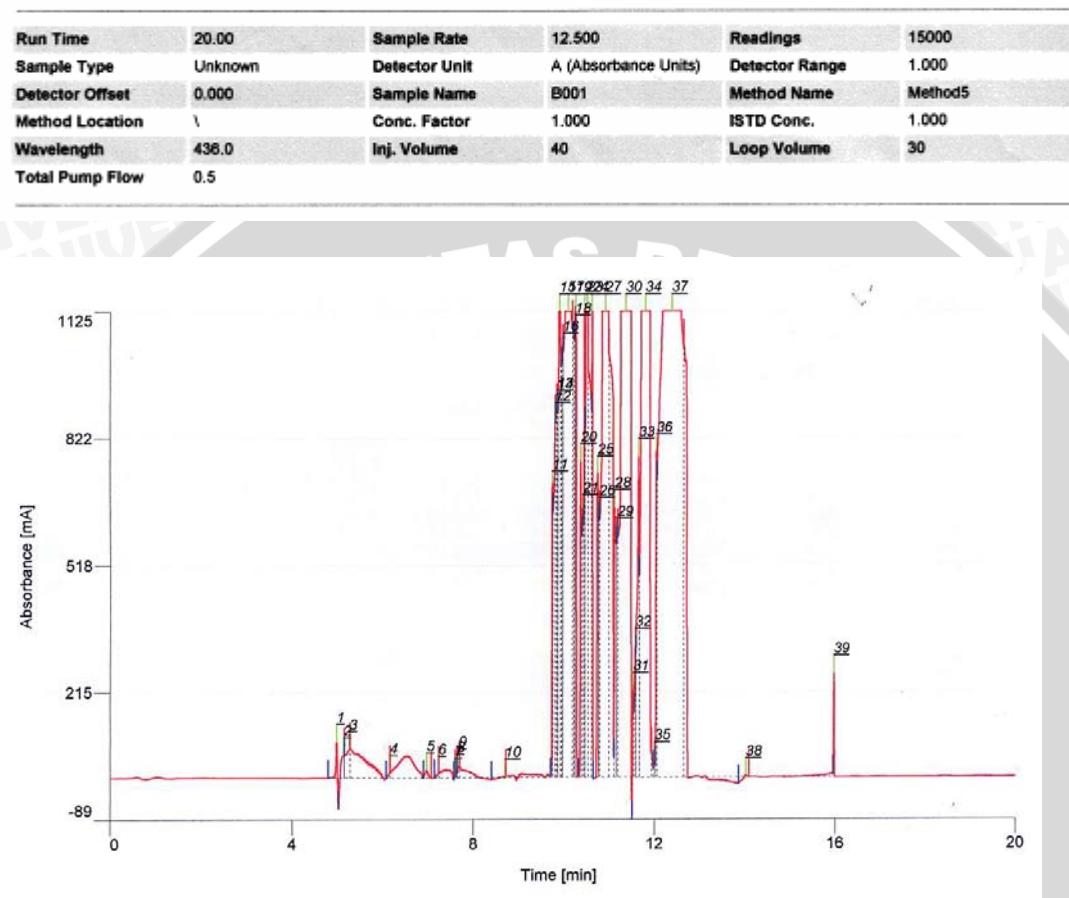


0,5 ppm formalin

Lampiran 7. Hasil Analisa Asam Amino Ikan Nila Berformalin

➤ Asam Amino Residu Ikan Nila Tanpa Formalin

Chromatogram Report upn
B001 26-06-08 1032 ('Bu Ketut UPN-1\Asam Amino')



➤ Rumus perhitungan Persentase Asam Amino

- Menghitung Konsentrasi Sampel

$$\text{Konsentrasi Sampel} = \frac{\text{Area sampel}}{\text{Area standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

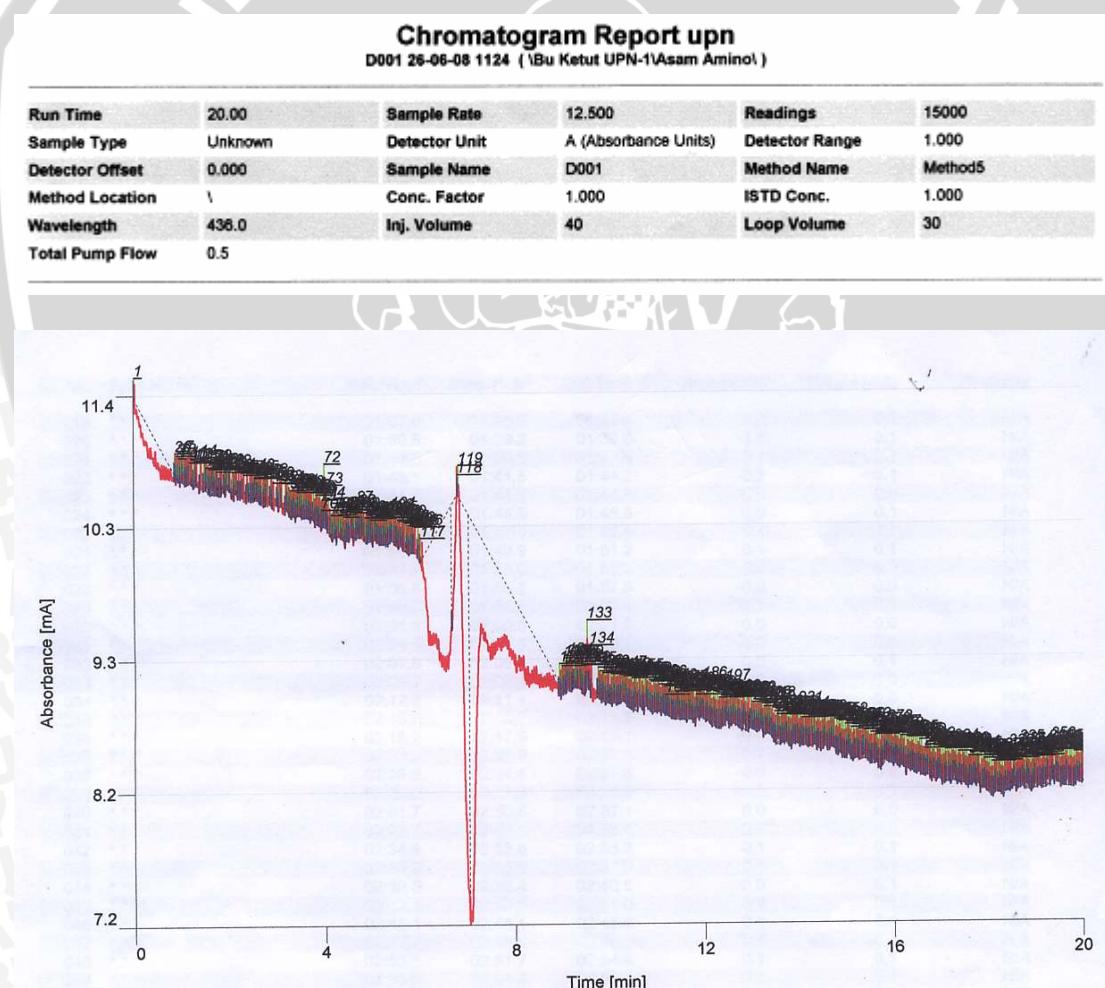
- Menghitung Konsentrasi Standart

$$\% \text{ b/v Asam amino dalam Sampel} = \frac{\text{Konsentrasi sampel} \times \text{Volume Total}}{\text{Volume cuplikan}} \times 100 \%$$

➤ Hasil Perhitungan Asam Amino

AA	Min	A.sp	A.st	K.st	K.Sp (mg/ml)	V.tot	V.C	x 100%	% AA
Asp	6.58	91.3	18.717	1	0.0049	10	1	100	4.878
Ser	7.13	36.5	7.574	1	0.0048	10	1	100	4.819
Glu	7.4	68.3	14.685	1	0.0047	10	1	100	4.651
Thr	9.44	695.2	170.324	1	0.0041	10	1	100	4.082
Arg	10.3	4580.2	1156.042	1	0.0040	10	1	100	3.962
Ala	10.44	1371.7	347.314	1	0.0039	10	1	100	3.949
Pro	12.23	37759.8	9877.964	1	0.0038	10	1	100	3.823
Cys	14.01	-62.1	-16.767	1	0.0037	10	1	100	3.704
Met	15.58	243	68.040	1	0.0036	10	1	100	3.571

➤ Asam Amino Residu Ikan Nila Berformalin



➤ Hasil Perhitungan Asam Amino

AA	Min	A.sp	A.st	K.st	K.Sp (mg/ml)	V.tot	V.C	x 100%	% AA
Asp	0	0	0	1	0	10	1	100	0
Ser	0	0	0	1	0	10	1	100	0
Glu	0	0	0	1	0	10	1	100	0
Thr	9.53	0.2	0.050	1	0.050	10	1	100	4.000
Arg	10.36	0.2	0.051	1	0.051	10	1	100	3.949
Ala	10.44	0.1	0.025	1	0.025	10	1	100	3.949
Pro	0	0	0	1	0	10	1	100	0
Cys	0	0	0	1	0	10	1	100	0
Met	0	0	0	1	0	10	1	100	0

Lampiran 8. Analisa Statistik Berat Organ Hati Mencit**Univariate Analysis of Variance****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
PERLAKUAN	1	kontrol nol	9
	2	0,5 ppm ikan	9
	3	0,5 ppm formalin	9
	4	0,5 ppm ikan berformalin	9
BULAN	1	1 bulan	12
	2	2 bulan	12
	3	3 bulan	12

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: hati

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002(a)	11	.000	2.066	.067
Intercept	.094	1	.094	1266.504	.000
PERLAKUAN	.001	3	.000	4.374	.014
BULAN	.000	2	.000	1.755	.194
PERLAKUAN * BULAN	.000	6	.000	1.015	.439
Error	.002	24	.000		
Total	.098	36			
Corrected Total	.003	35			

a R Squared = .486 (Adjusted R Squared = .251)

Post Hoc Tests**PERLAKUAN****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: hati
 Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol nol	0,5 ppm ikan	-.01133(*)	.004067	.047	-.02255	-.00012
	0,5 ppm formalin	-.00278	.004067	.903	-.01400	.00844
	0,5 ppm ikan berformalin	-.01189(*)	.004067	.035	-.02311	-.00067
	kontrol nol	.01133(*)	.004067	.047	.00012	.02255
0,5 ppm ikan	0,5 ppm formalin	.00856	.004067	.181	-.00266	.01977
	0,5 ppm ikan berformalin	-.00056	.004067	.999	-.01177	.01066
	kontrol nol	.00278	.004067	.903	-.00844	.01400
	0,5 ppm ikan	-.00856	.004067	.181	-.01977	.00266
0,5 ppm formalin	0,5 ppm ikan berformalin	-.00911	.004067	.141	-.02033	.00211
	kontrol nol	.01189(*)	.004067	.035	.00067	.02311
	0,5 ppm ikan	.00056	.004067	.999	-.01066	.01177
	0,5 ppm formalin	.00911	.004067	.141	-.00211	.02033

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**Hati****Tukey HSD**

perlakuan	N	Subset	
		1	2
kontrol nol	9	.04467	
0,5 ppm formalin	9	.04744	.04744
0,5 ppm ikan	9		.05600
0,5 ppm ikan berformalin	9		.05656
Sig.		.903	.141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .000.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b Alpha = .05.

BULAN**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: hati

Tukey HSD

(I) bulan	(J) bulan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 bulan	2 bulan	-.00292	.003522	.690	-.01171	.00588
	3 bulan	-.00658	.003522	.169	-.01538	.00221
2 bulan	1 bulan	.00292	.003522	.690	-.00588	.01171
	3 bulan	-.00367	.003522	.559	-.01246	.00513
3 bulan	1 bulan	.00658	.003522	.169	-.00221	.01538
	2 bulan	.00367	.003522	.559	-.00513	.01246

Based on observed means.

**Homogeneous Subsets
Hati****Tukey HSD**

bulan	N	Subset
		1
1 bulan	12	.04800
2 bulan	12	.05092
3 bulan	12	.05458
Sig.		.169

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .000.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: hati

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002(a)	11	.000	2.066	.067
Intercept	.094	1	.094	1266.504	.000
interaksi	.002	11	.000	2.066	.067
Error	.002	24	.000		
Total	.098	36			
Corrected Total	.003	35			

a R Squared = .486 (Adjusted R Squared = .251)

Homogeneous Subsets

Hati

Tukey HSD

interaksi	N	Subset
		1
kontrol bulan 1	3	.03600
0,5 ppm formalin bulan 1	3	.04100
kontrol bulan 3	3	.04833
0,5 ppm formalin bulan 2	3	.04833
kontrol bulan 2	3	.04967
0,5 ppm ikan berformalin bulan 2	3	.05200
0,5 ppm formalin bulan 3	3	.05300
0,5 ppm ikan bulan 2	3	.05367
0,5 ppm ikan bulan 1	3	.05500
0,5 ppm ikan berformalin bulan 3	3	.05767
0,5 ppm ikan bulan 3	3	.05933
0,5 ppm ikan berformalin bulan 1	3	.06000
Sig.		.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .000.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

Lampiran 9. Analisa Statistik Kadar SGOT Mencit**Univariate Analysis of Variance****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
PERLAKUAN	1	kontrol nol	9
	2	0,5 ppm ikan	9
	3	0,5 ppm formalin	9
	4	0,5 ppm ikan berformalin	9
BULAN	1	1 bulan	12
	2	2 bulan	12
	3	3 bulan	12

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SGOT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	190669.417(a)	11	17333.583	8.174	.000
Intercept	2014980.250	1	2014980.250	950.213	.000
PERLAKUAN	181028.528	3	60342.843	28.456	.000
BULAN	5865.167	2	2932.583	1.383	.270
PERLAKUAN * BULAN	3775.722	6	629.287	.297	.932
Error	50893.333	24	2120.556		
Total	2256543.000	36			
Corrected Total	241562.750	35			

a R Squared = .789 (Adjusted R Squared = .693)

Post Hoc Tests

PERLAKUAN

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SGOT

Tukey HSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol nol	0,5 ppm ikan	-74.67(*)	21.71	.011	-134.55	-14.78
	0,5 ppm formalin	-195.56(*)	21.71	.000	-255.44	-135.67
	0,5 ppm ikan berformalin	-119.22(*)	21.71	.000	-179.11	-59.34
0,5 ppm ikan	kontrol nol	74.67(*)	21.71	.011	14.78	134.55
	0,5 ppm formalin	-120.89(*)	21.71	.000	-180.77	-61.00
	0,5 ppm ikan berformalin	-44.56	21.71	.197	-104.44	15.33
0,5 ppm formalin	kontrol nol	195.56(*)	21.71	.000	135.67	255.44
	0,5 ppm ikan	120.89(*)	21.71	.000	61.00	180.77
	0,5 ppm ikan berformalin	76.33(*)	21.71	.009	16.45	136.22
0,5 ppm ikan berformalin	kontrol nol	119.22(*)	21.71	.000	59.34	179.11
	0,5 ppm ikan	44.56	21.71	.197	-15.33	104.44
	0,5 ppm formalin	-76.33(*)	21.71	.009	-136.22	-16.45

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

SGOT

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset		
		1	2	3
kontrol nol	9	139.22		
0,5 ppm ikan	9		213.89	
0,5 ppm ikan berformalin	9		258.44	
0,5 ppm formalin	9			334.78
Sig.		1.000	.197	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2120.556.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b Alpha = .05.

BULAN**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: SGOT

Tukey HSD

(I) BULAN	(J) BULAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 bulan	2 bulan	9.67	18.80	.865	-37.28	56.61
	3 bulan	30.58	18.80	.254	-16.36	77.53
2 bulan	1 bulan	-9.67	18.80	.865	-56.61	37.28
	3 bulan	20.92	18.80	.516	-26.03	67.86
3 bulan	1 bulan	-30.58	18.80	.254	-77.53	16.36
	2 bulan	-20.92	18.80	.516	-67.86	26.03

Based on observed means.

Homogeneous Subsets**SGOT**

Tukey HSD

BULAN	N	Subset
		1
3 bulan	12	219.42
2 bulan	12	240.33
1 bulan	12	250.00
Sig.		.254

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2120.556.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SGOT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	190669.417(a)	11	17333.583	8.174	.000
Intercept	2014980.250	1	2014980.250	950.213	.000
INTERAKSI	190669.417	11	17333.583	8.174	.000
Error	50893.333	24	2120.556		
Total	2256543.000	36			
Corrected Total	241562.750	35			

a R Squared = .789 (Adjusted R Squared = .693)

Homogeneous Subsets

SGOT

Tukey HSD

INTERAKSI	N	Subset			
		1	2	3	4
kontrol bulan 3	3	114.67			
kontrol bulan 2	3	130.33	130.33		
kontrol bulan 1	3	172.67	172.67		
0,5 ppm ikan bulan 3	3	193.67	193.67	193.67	
0,5 ppm ikan bulan 2	3	223.67	223.67	223.67	223.67
0,5 ppm ikan bulan 1	3	224.33	224.33	224.33	224.33
0,5 ppm ikan berformalin bulan 1	3		256.00	256.00	256.00
0,5 ppm ikan berformalin bulan 3	3		257.33	257.33	257.33
0,5 ppm ikan berformalin bulan 2	3		262.00	262.00	262.00
0,5 ppm formalin bulan 3	3			312.00	312.00
0,5 ppm formalin bulan 2	3				345.33
0,5 ppm formalin bulan 1	3				347.00
Sig.		.196	.062	.128	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2120.556.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

Lampiran 10. Analisa Statistik Kadar SGPT Mencit

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PERLAKUAN	1	kontrol nol	9
	2	0,5 ppm ikan	9
	3	0,5 ppm formalin	9
	4	0,5 ppm ikan berformalin	9
BULAN	1	1 bulan	12
	2	2 bulan	12
	3	3 bulan	12

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SGPT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4698.972(a)	11	427.179	3.924	.002
Intercept	151191.361	1	151191.361	1388.846	.000
PERLAKUAN	3347.639	3	1115.880	10.250	.000
BULAN	407.389	2	203.694	1.871	.176
PERLAKUAN * BULAN	943.944	6	157.324	1.445	.239
Error	2612.667	24	108.861		
Total	158503.000	36			
Corrected Total	7311.639	35			

a R Squared = .643 (Adjusted R Squared = .479)

Post Hoc Tests**PERLAKUAN****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: SGPT

Tukey HSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol nol	0,5 ppm ikan	-20.89(*)	4.92	.002	-34.46	-7.32
	0,5 ppm formalin	-24.56(*)	4.92	.000	-38.12	-10.99
	0,5 ppm ikan berformalin	-20.44(*)	4.92	.002	-34.01	-6.88
0,5 ppm ikan	kontrol nol	20.89(*)	4.92	.002	7.32	34.46
	0,5 ppm formalin	-3.67	4.92	.878	-17.23	9.90
	0,5 ppm ikan berformalin	.44	4.92	1.000	-13.12	14.01
0,5 ppm formalin	kontrol nol	24.56(*)	4.92	.000	10.99	38.12
	0,5 ppm ikan	3.67	4.92	.878	-9.90	17.23
	0,5 ppm ikan berformalin	4.11	4.92	.837	-9.46	17.68
0,5 ppm ikan berformalin	kontrol nol	20.44(*)	4.92	.002	6.88	34.01
	0,5 ppm ikan	-.44	4.92	1.000	-14.01	13.12
	0,5 ppm formalin	-4.11	4.92	.837	-17.68	9.46

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**SGPT**

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset	
		1	2
kontrol nol	9	48.33	
0,5 ppm ikan berformalin	9		68.78
0,5 ppm ikan	9		69.22
0,5 ppm formalin	9		72.89
Sig.		1.000	.837

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 108.861.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b Alpha = .05.

BULAN**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: SGPT

Tukey HSD

(I) BULAN	(J) BULAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 bulan	2 bulan	1.00	4.26	.970	-9.64	11.64
	3 bulan	7.58	4.26	.197	-3.05	18.22
2 bulan	1 bulan	-1.00	4.26	.970	-11.64	9.64
	3 bulan	6.58	4.26	.288	-4.05	17.22
3 bulan	1 bulan	-7.58	4.26	.197	-18.22	3.05
	2 bulan	-6.58	4.26	.288	-17.22	4.05

Based on observed means.

Homogeneous Subsets

SGPT

Tukey HSD

BULAN	N	Subset
		1
3 bulan	12	60.08
2 bulan	12	66.67
1 bulan	12	67.67
Sig.		.197

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 108.861.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SGPT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3642.306(a)	9	404.701	2.868	.017
Intercept	138245.333	1	138245.333	979.573	.000
INTERAKSI	3642.306	9	404.701	2.868	.017
Error	3669.333	26	141.128		
Total	158503.000	36			
Corrected Total	7311.639	35			

a R Squared = .498 (Adjusted R Squared = .324)

Homogeneous Subsets**SGPT**

Tukey HSD

interaksi	N	Subset	
		1	2
kontrol bulan 2	3	44.00	
kontrol bulan 1	3	52.67	52.67
0,5 ppm ikan berformalin bulan 3	3	53.00	53.00
0,5 ppm formalin bulan 1	6	61.33	61.33
0,5 ppm ikan bulan 2	3	68.00	68.00
0,5 ppm formalin bulan 3	3	69.33	69.33
0,5 ppm ikan bulan 1	3	70.00	70.00
0,5 ppm formalin bulan 2	6	72.33	72.33
0,5 ppm ikan berformalin bulan 1	3	73.67	73.67
0,5 ppm ikan berformalin bulan 2	3		79.67
Sig.		.082	.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 141.128.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.333.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

Lampiran 11. Analisa Statistik Apoptosis Sel Hati Mencit.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PERLAKUAN	1	kontrol nol	18
	2	0,5 ppm ikan	17
	3	0,5 ppm formalin	18
	4	0,5 ppm ikan berformalin	18
BULAN	1	1 bulan	23
	2	2 bulan	24
	3	3 bulan	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12657.772(a)	11	1150.707	140.214	.000
Intercept	48160.953	1	48160.953	5868.435	.000
PERLAKUAN	10988.537	3	3662.846	446.319	.000
BULAN	795.123	2	397.562	48.443	.000
PERLAKUAN * BULAN	869.706	6	144.951	17.662	.000
Error	484.200	59	8.207		
Total	61764.000	71			
Corrected Total	13141.972	70			

a R Squared = .963 (Adjusted R Squared = .956)

Post Hoc Tests

PERLAKUAN

Multiple Comparisons

Dependent Variable: apoptosis

Tukey HSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol nol	0,5 ppm ikan	-22.98(*)	.969	.000	-25.55	-20.42
	0,5 ppm formalin	-33.06(*)	.955	.000	-35.58	-30.53
	0,5 ppm ikan berformalin	-25.89(*)	.955	.000	-28.41	-23.36
0,5 ppm ikan	kontrol nol	22.98(*)	.969	.000	20.42	25.55
	0,5 ppm formalin	-10.07(*)	.969	.000	-12.63	-7.51
0,5 ppm formalin	0,5 ppm ikan berformalin	-2.91(*)	.969	.020	-5.47	-.34
	kontrol nol	33.06(*)	.955	.000	30.53	35.58
	0,5 ppm ikan	10.07(*)	.969	.000	7.51	12.63
0,5 ppm ikan berformalin	0,5 ppm ikan berformalin	7.17(*)	.955	.000	4.64	9.69
	kontrol nol	25.89(*)	.955	.000	23.36	28.41
	0,5 ppm ikan	2.91(*)	.969	.020	.34	5.47
	0,5 ppm formalin	-7.17(*)	.955	.000	-9.69	-4.64

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

apoptosis

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset			
		1	2	3	4
kontrol nol	18	5.72			
0,5 ppm ikan	17		28.71		
0,5 ppm ikan berformalin	18			31.61	
0,5 ppm formalin	18				38.78
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 8.207.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 17.739.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

BULAN**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: apoptosis

Tukey HSD

(I) BULAN	(J) BULAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 bulan	2 bulan	-5.18(*)	.836	.000	-7.19	-3.17
	3 bulan	-8.05(*)	.836	.000	-10.06	-6.04
2 bulan	1 bulan	5.18(*)	.836	.000	3.17	7.19
	3 bulan	-2.88(*)	.827	.003	-4.86	-.89
3 bulan	1 bulan	8.05(*)	.836	.000	6.04	10.06
	2 bulan	2.88(*)	.827	.003	.89	4.86

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

apoptosis

Tukey HSD

bulan	N	Subset		
		1	2	3
1 bulan	23	21.70		
2 bulan	24		26.87	
3 bulan	24			29.75
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 8.207.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 23.657.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12657.772(a)	11	1150.707	140.214	.000
Intercept	48160.953	1	48160.953	5868.435	.000
INTERAKSI	12657.772	11	1150.707	140.214	.000
Error	484.200	59	8.207		
Total	61764.000	71			
Corrected Total	13141.972	70			

a R Squared = .963 (Adjusted R Squared = .956)

Homogeneous Subsets

apoptosis

Tukey HSD

Interaksi	N	Subset				
		1	2	3	4	5
kontrol bulan 3	6	5.33				
kontrol bulan 1	6	5.50				
kontrol bulan 2	6	6.33				
0,5 ppm ikan bulan 1	5		19.60			
0,5 ppm ikan berformalin bulan 1	6		24.33			
0,5 ppm ikan bulan 3	6			31.00		
0,5 ppm formalin bulan 2	6			33.33	33.33	
0,5 ppm ikan berformalin bulan 2	6			33.83	33.83	
0,5 ppm ikan bulan 2	6			34.00	34.00	
0,5 ppm ikan berformalin bulan 3	6			36.67	36.67	
0,5 ppm formalin bulan 1	6				37.00	
0,5 ppm formalin bulan 3	6					46.00
Sig.		1.000	.191	.051	.557	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 8.207.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.902.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

Lampiran 12. Perhitungan Persentase Jumlah Sel Apoptosis

Paparan 1 Bulan

Lama Paparan	Jenis Paparan	Total Sel	Jumlah Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis
1 Bulan	Kontrol nol	1082	32	2.957	3
		1020	61	5.980	6
		1124	79	7.028	7
		1193	36	3.018	3
		1035	83	8.019	8
		1026	62	6.043	6
	0.5 ikan	1097	230	20.966	21
		1120	202	18.036	18
		-	-	-	-
		1074	172	16.015	16
		1251	275	21.982	22
		918	193	21.024	21
	0.5 formalin	1061	382	36.004	36
		1196	478	39.967	40
		927	278	29.989	30
		1257	465	36.993	37
		947	369	38.965	39
		999	400	40.040	40
	0.5 ikan berformalin	974	205	21.047	21
		1029	226	21.963	22
		1058	296	27.977	28
		977	225	23.030	23
		969	233	24.045	24
		1220	342	28.033	28

Paparan 2 Bulan

Lama Paparan	Jenis Paparan	Total Sel	Jumlah Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis
2 Bulan	Kontrol nol	1286	39	3.033	3
		1036	62	5.985	6
		1080	97	8.981	9
		1287	103	8.003	8
		1288	64	4.969	5
		1206	84	6.965	7
	0.5 ikan	1082	379	35.028	35
		1077	377	35.005	35
		1185	438	36.962	37
		994	318	31.992	32
		1210	375	30.992	31
		1074	365	33.985	34
	0.5 formalin	1140	433	37.982	38
		1250	400	32.000	32
		1115	368	33.004	33
		1125	349	31.022	31
		1008	393	38.988	39
		1072	397	37.034	37
	0.5 ikan berformalin	1140	388	34.035	34
		1045	355	33.971	34
		1083	347	32.041	32
		1082	368	34.011	34
		1056	370	35.038	35
		1040	354	34.038	34

Paparan 3 Bulan

Lama Paparan	Jenis Paparan	Total Sel	Jumlah Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis	% Sel Apoptosis
3 Bulan	Kontrol nol	984	79	8.028	8
		1160	58	5.000	5
		1085	54	4.977	5
		1036	41	3.958	4
		1048	31	2.958	3
		1044	73	6.992	7
	0.5 ikan	1062	478	45.009	45
		1191	369	30.982	31
		1023	348	34.018	34
		1140	376	32.982	33
		1252	363	28.994	29
		1264	341	26.978	27
	0.5 formalin	1030	330	32.039	32
		948	408	43.038	43
		1088	555	51.011	51
		1254	564	44.976	45
		1164	501	43.041	43
		1268	495	39.038	39
	0.5 ikan berformalin	1155	427	36.970	37
		920	350	38.043	38
		1341	429	31.991	32
		1052	347	32.985	33
		1284	501	39.019	39
		996	408	40.964	41