

**STUDI NEKROSIS SEL HEPAR DAN PARU MENCIT
(*Mus musculus*) SETELAH PAPARAN FORMALIN DAN
BENZO(*a*)PYRENE**

SKRIPSI

oleh:

Ahmad Soni

0810910002



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**STUDI NEKROSIS SEL HEPAR DAN PARU MENCIT
(*Mus musculus*) SETELAH PAPARAN FORMALIN DAN
BENZO(a)PYRENE**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

oleh:

Ahmad Soni

0810910002



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

LEMBAR PENGESAHAN PROPOSAL SKRIPSI

STUDI NEKROSIS SEL HEPAR DAN PARU MENCIT (*Mus musculus*) SETELAH PAPARAN FORMALIN DAN BENZO(α)PYRENE

oleh:

AHMAD SONI
0810910002

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 21 Mei 2012 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Widiyarti, M.Si
NIP. 19670525199103 2 001

Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP. 19641122199002 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Widodo, S.Si.,Ph.D.,Med.Sc
NIP 19730811 200003 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ahmad Soni

NIM : 0810910002

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi Berjudul :

**STUDI NEKROSIS SEL HEPAR DAN PARU MENCIT
(*Mus musculus*) SETELAH PAPARAN FORMALIN DAN
BENZO(α)PYRENE**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 21 Mei 2012

Yang menyatakan

Ahmad Soni

0810910002

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



STUDI NEKROSIS SEL HEPAR DAN PARU MENCIT (*Mus musculus*) SETELAH PAPARAN FORMALIN DAN BENZO(α)PYRENE

Ahmad Soni, Sri Widyarti, Aris Soewondo
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Formalin dan benzo(α)pyrene merupakan senyawa yang berbahaya bagi kesehatan tubuh. Penyalahgunaan senyawa ini dapat menimbulkan dampak berupa kerusakan organ di dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak pemberian gabungan paparan formalin dan benzo(α)pyrene pada nekrosis organ hepar dan paru-paru mencit (*Mus musculus*). Pemberian formalin dosis 25 mg/kg BB kepada mencit dilakukan secara peroral setiap hari selama 60 hari. Pemberian benzo(α)pyrene melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 250 mg/kg BB dilakukan setelah 30 hari masa inkubasi dengan empat kali injeksi selang waktu satu hari. Setelah itu dibuat preparat histologi organ hepar dan paru hasil perlakuan melalui pewarnaan dengan HE. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop terhadap preparat hepar dan paru. Data yang didapatkan adalah persentase sel yang mengalami nekrosis dan *necrotic foci*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan selang kepercayaan 95%. Hasil pengamatan preparat organ hepar menunjukkan bahwa persentase nekrosis pada kontrol tanpa perlakuan, Benzo(a)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, kombinasi formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut yaitu sebesar $14,43\% \pm 0,91$; $26,05\% \pm 3,75$; $49,38\% \pm 2,66$; $51,86 \pm 1,73$. Rerata *necrotic foci* organ hepar yang terbentuk pada kontrol tanpa perlakuan, Benzo(a)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut, yaitu $1,3 \pm 0,07$; $1,63 \pm 0,61$; $2 \pm 0,51$; dan $3,4 \pm 0,76$. Rerata *necrotic foci* organ paru-paru yang terbentuk pada Benzo(a)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut, yaitu $2,1 \pm 0,29$; $3,3 \pm 0,25$; dan $5,6 \pm 0,72$. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan gabungan memiliki tingkat toksistas yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Kata kunci: Benzo(α)pyrene, formalin, hepar, nekrosis, paru.

STUDY OF CELL NECROSIS IN THE LIVER AND LUNG OF MICE (*Mus musculus*) AFTER EXPOSURE WITH FORMALDEHYDE AND BENZO(α)PYRENE

Ahmad Soni, Sri Widyarti, Aris Soewondo

Biology Department, Faculty of Natural Sciences and Mathematics
Brawijaya University

ABSTRACT

Formaldehyde and benzo(α)pyrene are compounds that harmful for health. Misapplication of this compound have an impact in the form of organ damage in the body. This study aims to determine the impact of the treatment of the combined exposure of formaldehyde and benzo(α)pyrene to cell necrosis in the liver and lungs of mice (*Mus musculus*). Treatment of formalin dose of 25 mg/kg BW to mice were given orally every day for 60 days. Treatment of benzo(α)pyrene via intraperitoneal injection at a dose of 250 mg/kg BW were given after 30 days of incubation with four times injection with one day interval. Liver and lung organs histological preparations were made through the HE staining. Observations were made by using a microscope for liver and lung organ preparations. The data obtained that is the percentage of cells necrosis and necrotic foci. This research used Completely Randomized Design (CRD) with 95% confidence interval. Hepatic organ preparations observations indicate that the percentage of necrosis in the untreated control, benzo(α)pyrene 250 mg/kg BW, Formalin 25 mg/kg BW, combination of formalin 25 mg/kg BW with BaP in a row that is equal to $14.43\% \pm 0.91$; $26.05\% \pm 3.75$; $49.38\% \pm 2.66$; 51.86 ± 1.73 . The mean of necrotic foci in liver organ formed in the untreatment control, benzo(α)pyrene 250 mg/kg BW, Formalin 25 mg/kg BW, and the combination of formalin 25 mg/kg BW with BaP in a row, equal to $1.3 \pm 0,07$; 1.63 ± 0.61 ; 2 ± 0.51 , and 3.4 ± 0.76 . The mean of necrotic foci in lungs are formed in the benzo(α)pyrene 250 mg/kg BW, Formalin 25 mg/kg BW, and the combination of formalin 25 mg/kg BW with BaP in a row, equal to 2.1 ± 0.29 ; 3.3 ± 0.25 , and 5.6 ± 0.72 . This suggests that the combined treatment had the highest level of toxicity compared with other treatments.

Keywords: benzopyrene, formaldehyde, liver, necrosis, pulmonary.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT. yang telah melimpahkan segala rahmat dan kasih sayang-Nya kepada penulis, sehingga penulis mampu menyelesaikan tugas akhir dengan judul "Studi Nekrosis Sel Hepar Dan Paru Mencit (*Mus Musculus*) Setelah Paparan Formalin Dan Benzo(α)Pyrene" ini dengan tepat waktu. Dalam kesempatan ini, penulis juga ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Sri Widyarti, M.Si dan Bapak Aris Soewondo, M.Si selaku pembimbing saya dalam penyelesaian tugas akhir ini yang telah meluangkan waktunya dan memberikan ilmunya serta telah membimbing saya dengan sangat sabar sehingga saya mampu menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Bapak Sofy Permana, M.Sc., D.Sc. selaku penguji yang telah memberi saran dan masukan yang telah sangat membantu saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini
3. Ayah dan Ibu beserta segenap keluarga saya yang telah mendukung saya dengan sepenuh hati dalam proses penyelesaian tugas akhir saya ini.
4. Segenap teman-teman Biologi angkatan 2008 yang telah bersedia membantu saya ketika saya menemui kendala-kendala dalam penyelesaian tugas akhir ini.

Demikianlah yang penulis dapat sampaikan. Semoga kedepannya tugas akhir saya ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membutuhkan. Saran dan kritik akan penulis terima demi membangun dan memperoleh ilmu yang baru dalam pengembangan studi ini, sehingga akan lebih bermanfaat bagi akademisi yang membutuhkannya dan/atau bagi masyarakat. Terimakasih banyak.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN PROPOSAL SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Benzo(α)pyrene	4
2.1.1 Toksisitas Benzo(α)pyrene.....	4
2.1.2 Metabolisme Benzo(α)pyrene dalam Tubuh	5
2.2 Formalin	7
2.2.1 Toksisitas Formalin.....	7
2.2.2 Metabolisme Formalin dalam Tubuh	8
2.3 Hepar	10
2.4 Paru-paru	12
2.5 Radikal Bebas dan Nekrosis.....	13
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian.....	18
BAB III METODOLOGI	21
3.1 Waktu dan Tempat	21
3.2 Cara Kerja.....	21
3.2.1 Preparasi Larutan Formalin.....	21
3.2.2 Preparasi Larutan Benzo(α)pyrene.....	22
3.2.3 Perlakuan Hewan Coba	22
3.2.4 Persiapan Preparat	23
3.2.5 Pewarnaan Preparat	23

3.2.6 Pengamatan	24
3.2.7 Analisis Data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil	26
4.1.1 Nekrosis pada Organ Hepar.....	26
4.1.2 Analisis Hasil Pengamatan Preparat Organ Paru-paru	32
4.2 Pembahasan.....	40
BAB V PENUTUP	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Metabolisme BaP dan Pengikatan BaP-DNA.....	6
Gambar 2.2	Struktur Formalin.....	7
Gambar 2.3	Metabolisme Formalin.....	10
Gambar 2.4	Histologi Hepar.....	12
Gambar 2.5	Histologi <i>pulmo</i>	13
Gambar 2.6	Diagram skematis aktivitas PARP-1 pada berbagai level kerusakan DNA.....	14
Gambar 2.7	Perbandingan sel hepar normal (A dan B), dan sel hepar yang mengalami nekrosis (C – H)	17
Gambar 2.8	Bagan kerangka konseptual penelitian.....	20
Gambar 4.1	Histologi organ hepar tanpa perlakuan.....	27
Gambar 4.2	Histologi organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP.....	27
Gambar 4.3	Perbandingan persentase sel nekrosis pada organ hepar	28
Gambar 4.4	Perbandingan rerata spot <i>necrotic foci</i> yang terbentuk pada organ hepar.....	29
Gambar 4.5	<i>Necrotic foci</i> pada preparat organ hepar kontrol tanpa perlakuan (K(-)), dan pada perlakuan Benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB.....	30
Gambar 4.6	<i>Necrotic foci</i> pada preparat organ hepar perlakuan formalin 25 mg/kg BB (F25), dan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP (F25B)..	31
Gambar 4.7	Perbandingan rerata spot <i>necrotic foci</i> yang terbentuk pada organ paru-paru.....	33
Gambar 4.8	Penampang histologi preparat organ paru-paru tanpa perlakuan dan paru-paru dengan perlakuan Formalin dan BaP.....	34
Gambar 4.9	<i>Necrotic foci</i> yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan Kontrol tanpa perlakuan (K(-)), dan Benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB (BaP).....	35
Gambar 4.10	<i>Necrotic foci</i> yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan formalin 25 mg/kg BB (F25), sedangkan pada perlakuan gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP (F25B) terbentuk <i>intrapulmonary necrobiotic nodule</i>	36

Gambar 4.11 *Intrapulmonary necrobiotic nodule* yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP.....37

Gambar 4.12 Infiltrasi sel-sel limfoid pada organ paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin dosis 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg.....39

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Parameter sel yang mengalami Nekrosis.....	18
Tabel L1.1. Rata-rata sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar	52
Tabel L1.2. Persentase sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar	52
Tabel L2.1. Rerata Spot <i>Necrotic Foci</i> pada Preparat Organ Hepar	53
Tabel L2.2. Rerata Spot <i>Necrotic Foci</i> pada Preparat Organ Paru-paru	53
Tabel L6.1. Pengamatan Sel Nekrosis	61
Tabel L6.2. Pengamatan <i>Necrotic Foci</i>	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I_Persentase Sel Nekrosis Pada Organ Hepar.....	52
Lampiran II_Necrotic Foci Pada Organ Hepar Dan Paru Mencit	53
Lampiran III_Analisis Data Statistik Nekrosis Sel Pada Preparat Organ Hepar	54
Lampiran IV_Analisis Data Statistik Necrotic Foci Pada Preparat Organ Hepar Dan Paru-Paru.....	57
Lampiran V_Pembuatan Larutan Stok Dan Perhitungan Dosis	60
Lampiran VI_Rancangan Pengamatan	61



DAFTAR ISTILAH

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
BaP	<i>Benzo(α)pyrene</i>
BPDE	<i>Benzo(α)pyrene Diol Epoxide</i>
Caspase	<i>Cysteinyl Aspartate Protease</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleid Acid</i>
FDH	<i>Formaldehyde Dehidrogenase</i>
HE	<i>Hematoksilen Eosin</i>
HSD	<i>High Significant Difference</i>
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
NO	<i>Nitrit Oksida</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
O ₂ -	<i>Oksigen Radikal</i>
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hidrocarbon</i>
PARP1	<i>Poly-ADP-Ribose Polymerase 1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
RAL	<i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Formaldehida merupakan suatu senyawa yang secara alami dihasilkan oleh tubuh melalui proses metabolisme yang terjadi di dalam tubuh. Formaldehida yang dihasilkan oleh tubuh terdapat dalam konsentrasi yang sangat kecil. Selain itu, formaldehida juga dapat ditemui di lingkungan sekitar dalam bentuk formalin, terutama pada industri mebel, pembersih karpet, dan juga pada beberapa produk industri lainnya (Anonymous¹, 1999). Namun, saat ini penyalahgunaan formalin sudah melewati ambang batas, terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Salah satu bentuk penyalahgunaan formalin yaitu, formalin digunakan sebagai bahan pengawet pada makanan dan beberapa produk rumah tangga lainnya. Hal ini diperparah dengan penggunaan formalin yang tidak sesuai dosis, dimana hal ini akan mengakibatkan terjadinya kerusakan pada organ tubuh manusia yang mengkonsumsinya. Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Golalipour *et. al.* (2007), menunjukkan bahwa perlakuan dengan formalin dapat menurunkan sel yang aktif membelah, penghambatan proses spermatogenesis, dan juga menipisnya membran basalis pada tubulus seminiferus.

Paparan formalin dapat meningkatkan resiko perubahan mukosa pada lambung mencit (*Mus musculus*). Perubahan yang terjadi pada mukosa lambung mencit ditunjukkan oleh pelebaran sel parietal pada mukosa lambung dan adanya destruksi sel parietal dan *chief* sel (Priambowo, 2010). Menurut Imron (2010), paparan formalin juga dapat menyebabkan perubahan struktur histologi testis mencit yang meliputi penurunan diameter tubulus seminiferus, serta penipisan epitel tubulus seminiferus. Selain itu, paparan formalin juga menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogonium dan jumlah sel spermatozoa.

Benzo(α)pyrene (BaP) merupakan suatu senyawa yang strukturnya memiliki lima cincin *polycyclic aromatic* dengan ikatan

hidrokarbon. Zat ini bersifat karsinogenik dan dapat mengakibatkan terjadinya kanker apabila zat ini masuk ke dalam sel. Zat ini biasanya ditemukan pada rokok dan sering dikenal sebagai salah satu bagian dari tar. Benzo(α)pyrene dapat menginisiasi terjadinya mutasi pada tingkat gen jika dipaparkan secara terus menerus (Aygun dan Kabadayi, 2005). Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Ye dan Xu (2010), menunjukkan bahwa BaP yang dimetabolisme menjadi Benzo(α)pyrene Diol Epoxide menurunkan ekspresi dari gen RAR- β_2 yang selanjutnya dapat menyebabkan kanker pada sel epitelium esofagus.

Yunus (1996), mengemukakan bahwa induksi BaP pada hepar dapat menyebabkan perubahan morfologi sel, yaitu vakuolisasi, penyempitan sinusoid dan pembengkakan nukleus. Pada paru-paru terdapat perubahan berupa proliferasi lapisan epitel bronkiolus. Selain itu menurut Pinuji (1999), induksi BaP pada hepar menyebabkan terjadinya piknosis dan karyolisis pada inkubasi hari pertama.

Di negara berkembang seperti Indonesia, penyalahgunaan formalin sebagai bahan pengawet makanan dan ditambah dengan tingginya polusi udara akibat asap yang ditimbulkan dari kendaraan bermotor dan asap industri, dapat menyebabkan peningkatan paparan formalin dan BaP terhadap penduduk. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Putri (2010), menunjukkan bahwa pengaruh paparan baik formalin maupun benzo(α)pyrene dapat meningkatkan ekspresi dari gen PARP 1, dimana menurut Filipovic *et al.* (1999), meningkatnya ekspresi dari gen ini dapat menginisiasi sel untuk melakukan nekrosis sehingga jaringan yang bersangkutan memiliki kemungkinan yang lebih besar untuk terjadinya kanker dibandingkan dengan jaringan yang memiliki ekspresi gen PARP 1 normal.

Pengamatan histologi dari organ mencit ini yang selanjutnya akan membuktikan adanya peningkatan persentase sel yang mengalami nekrosis dan *necrotic foci* pada organ hepar dan paru-paru mencit (*Mus musculus*) setelah terpapar formalin dan benzo(α)pyrene.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan diangkat dalam penelitian ini, yaitu seberapa besar dampak pemberian gabungan paparan formalin dan benzo(α)pyrene pada nekrosis organ hepar dan paru-paru mencit (*Mus musculus*) ?

1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini, yaitu untuk mengetahui dampak pemberian gabungan paparan formalin dan benzo(α)pyrene pada nekrosis organ hepar dan paru-paru mencit (*Mus musculus*)

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diambil setelah dilakukannya pengamatan histologi ini yaitu mampu memberikan wawasan kepada masyarakat tentang pengaruh formalin dan benzo(α)pyrene bagi tubuh, sehingga diharapkan masyarakat akan lebih waspada dalam memilih makanan dan produk yang beredar di pasaran, yang akhirnya akan menghindarkan masyarakat dari hal-hal yang tidak diinginkan akibat makanan yang mengandung zat tersebut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Benzo(α)pyrene

2.1.1 Toksisitas Benzo(α)pyrene

Benzo(α)pyrene merupakan salah satu senyawa *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH), dan merupakan senyawa yang terbentuk ketika bahan bakar, sampah atau material tanaman mengalami pembakaran tidak sempurna. Zat ini dapat mengkontaminasi makhluk hidup melewati udara, air, tanah, rokok dan produk yang sejenisnya serta makanan. Kontaminasi zat ini bisa melalui saluran pernapasan, lendir maupun kontak langsung dengan kulit. Manusia yang terpapar zat ini walaupun dalam waktu yang singkat, dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan pada sel darah merah yang mengacu pada terjadinya anemia, dan penurunan sistem imunitas. Apabila paparan zat ini terjadi dalam waktu yang lebih lama, maka akan mengakibatkan terjadinya kanker. Hal tersebut dikarenakan zat ini sangat bersifat karsinogenik (Wang, 1997).

Benzo(α)pyrene pada manusia akan diasosiasikan dengan kerusakan replikasi kromosomal dalam hal ini yaitu saat replikasi DNA, serta kerusakan DNA pada sel gamet. BaP juga akan membentuk ikatan BaP-DNA baik pada fetus maupun jaringan dewasa. Pada orang dewasa, paparan BaP akan mengakibatkan kelainan pada morfologi sperma dan menurunkan jumlah sperma serta menurunkan jumlah sel telur yang diproduksi. Paparan BaP pada konsentrasi yang tinggi akan mengakibatkan menurunnya sistem imunitas dan menyebabkan kerusakan pada sel darah merah, sehingga dapat mengarahkan seseorang mengalami anemia (Epa, 2007).

Benzo(α)pyrene dengan rumus kimia $C_{20}H_{12}$, merupakan *polycyclic aromatic hydrocarbon* dimana hasil metabolitnya bersifat mutagenik dan sangat karsinogenik. Benzo(α)pyrene termasuk dalam kelas senyawa *polycyclic aromatic* yang dikenal sebagai benzopyrenes, yang terdiri dari sebuah cincin benzen yang berdifusi dengan molekul

pyren. Benzo(α)pyrene merupakan produk dari hasil pembakaran yang tidak sempurna pada suhu antara 300 dan 600°C (IARC,1995).

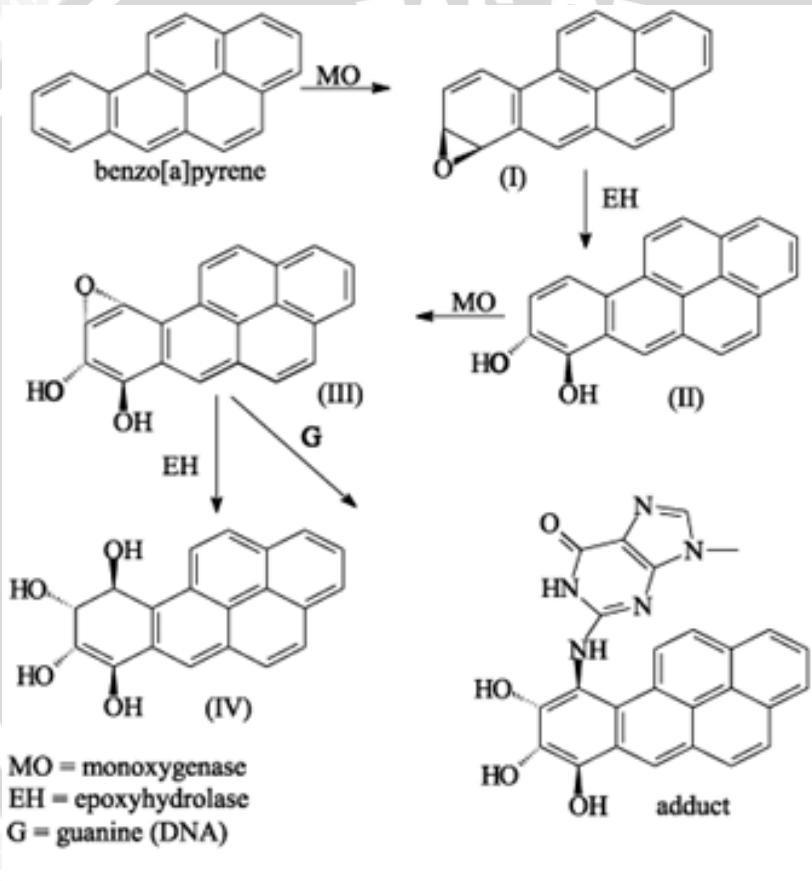
2.1.2 Metabolisme Benzo(α)pyrene dalam Tubuh

Terdapat korelasi antara kanker dan efek pada suatu populasi dari area dengan tingkat pencemaran, terutama polusi udara yang sangat tinggi. Benzo(α)pyrene merupakan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang paling banyak dipelajari karena mempunyai sifat karsinogenik yang tinggi. Berdasarkan gambar 2.1, dapat diketahui bahwa BaP akan dimetabolisme oleh anti-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(α)pyrene-7,8-diol 9,10-epoxide sehingga akan terbentuk benzo(α)pyrene diol epoxide (BPDE), yang selanjutnya akan bereaksi dengan DNA baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pembentukan ikatan BaP-DNA ini melibatkan reaksi dari kelompok amino *exocyclic* yaitu guanosin dengan *benzylic carbon* dari epoxide. Ikatan DNA dengan PAH lain juga terbentuk tetapi dalam kuantitas yang kecil (Paula *et al*, 2005).

Benzo(α)pyrene merupakan senyawa prokarsinogen, artinya mekanisme karsinogenesis dari benzo(α)pyrene tergantung pada metabolisme enzimatik dari benzo(α)pyrene itu sendiri sehingga menjadi senyawa mutagen, yaitu Benzo(α)pyrene diol epoxide (BPDE). Molekul ini akan berikatan dengan DNA, memiliki ikatan kovalen pada basa nukleotida yaitu guanin. Studi X-ray kristalografi dan struktur *nuclear magnetic resonance* menunjukkan bahwa senyawa ini mengikat DNA, menginduksi mutasi dengan mengacaukan struktur untai ganda DNA. Hal ini akan mengganggu proses replikasi DNA secara normal sehingga akan menginduksi mutasi, yang mengarahkan terjadinya kanker setelah terpapar oleh senyawa ini (Volk *et al.*, 2003).

Benzo(α)pyrene diol epoxide (BPDE) merupakan senyawa yang terbentuk dari proses metabolisme benzo(α)pyrene dan bersifat toksik. Senyawa ini mampu berikatan dengan DNA serta mampu menginduksi terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS). Menurut Burdick *et al.* (2003), profil dari hasil metabolisme BaP akan menghasilkan senyawa

kimia yang sangat reaktif dan satu buah elektronnya akan mengalami reaksi redoks dan dapat menghasilkan O₂⁻, hidrogen peroksida dan hidroksil radikal. Tingginya pemberian BaP dengan konsentrasi yang tinggi akan meningkatkan produksi ROS, sehingga akan terjadi kerusakan pada level sel bahkan mengarahkan pada terjadinya kerusakan DNA.

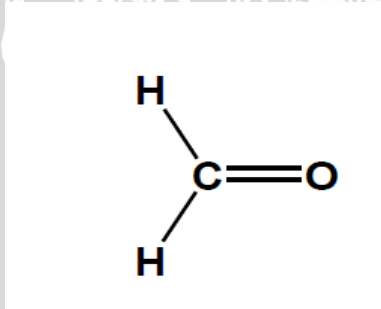


Gambar 2.1. Metabolisme BaP dan Pengikatan BaP-DNA (Paula *et al.*, 2005).

2.2 Formalin

2.2.1 Toksisitas Formalin

Formalin adalah nama umum dan secara kimiawi disebut Formaldehida yang biasanya dimanfaatkan sebagai pembersih lantai, kapal, gudang dan pakaian. Formaldehida biasanya tidak berwarna, dapat terbakar dalam suhu ruang, dapat menyebabkan sensasi terbakar pada mata, hidung, dan bahkan paru-paru jika terdapat pada konsentrasi yang tinggi. Jika digabungkan dengan fenol, urea, atau melamina, formaldehida menghasilkan resin termoset yang keras. Resin formaldehida biasanya dipakai dalam bahan konstruksi, dan resin ini mampu melepaskan formaldehida ke udara secara pelan-pelan. Apabila kadar di udara lebih dari 0,1 mg/kg, formaldehida yang terhisap bisa menyebabkan iritasi kepala dan membran mukosa. Dalam tubuh manusia, formaldehida dikonversi menjadi asam format yang meningkatkan keasaman darah, tarikan nafas menjadi pendek dan sering, hipotermia. Di dalam tubuh, formaldehida bisa menimbulkan terikatnya DNA oleh protein, sehingga mengganggu ekspresi genetik yang normal (Anonymou³, 1999).



Gambar 2.2. Struktur Formalin (Kiernan, 2000).

Formaldehida merupakan produk metabolik normal yang dihasilkan pada saat proses metabolisme. Sehingga sebagian besar jaringan di dalam tubuh dapat memetabolisme formaldehida. Formaldehida akan dimetabolisme oleh jaringan tubuh menjadi asam format yang akan dibuang melalui urin atau dapat dimetabolisme lebih

lanjut menjadi karbon dioksida dan akan dikeluarkan oleh tubuh melalui sistem respirasi. Apabila metabolisme formaldehida menjadi asam format dihambat atau proses metabolismenya meningkat, maka level formaldehida dalam tubuh akan meningkat dan pada akhirnya dapat membentuk ikatan antara protein atau dengan DNA (Anonymous³, 2011).

Formalin dapat memicu terjadinya kerusakan DNA. Asam format yang dibentuk dari metabolisme formalin tidak bersifat berbahaya bagi sel. Namun, dalam jumlah yang tinggi asam format dapat memicu terjadinya asidasi pada sel. Hal ini mengakibatkan pH didalam sel akan menurun sehingga sel berada dalam kondisi stress. Kondisi ini lah yang memicu sel untuk membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS), seperti superoxide, hydrogen peroxide, dan hidroksi radikal. ROS ini dapat menyerang baik DNA, protein maupun lipid (Miyoshi *et al.*, 2006).

Menurut Saito *et al.* (2005), formaldehida akan menyebabkan kerusakan DNA oksidatif. Hal ini ditandai dengan terbentuknya radikal bebas seperti Nitrit oksida (NO) dan menurunnya kadar glutathione tereduksi (GSH) seluler secara drastis. Meningkatnya produksi radikal bebas dan disertai dengan menurunnya kinerja GSH akan mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA secara oksidatif.

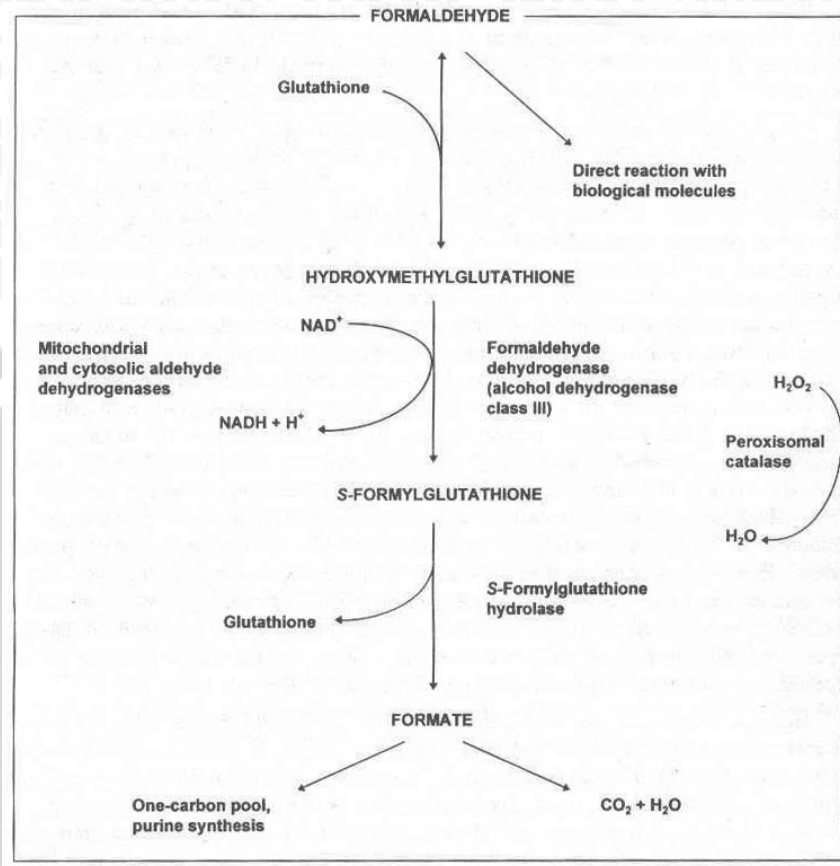
2.2.2 Metabolisme Formalin dalam Tubuh

Formalin dapat diserap baik melalui pernafasan maupun rute gastrointestinal. Absorpsi formalin melalui kulit tidak menampakkan dampak yang signifikan. Formalin yang terserap selanjutnya akan dioksidasi menjadi asam format dan CO₂. Metabolisme formalin menjadi asam format ini terjadi di semua jaringan tubuh, dan asam format akan secara cepat dihapus oleh adanya suplai darah. Formaldehyde dehidrogenase (FDH), merupakan enzim metabolik yang mempunyai peranan utama dalam metabolisme formalin yang terjadi di semua jaringan tubuh. Formalin juga dapat berikatan dengan molekul biologis. Hal tersebut dapat membentuk cross-link antara protein dengan protein, antara protein dengan *Single Stranded DNA* (SSB), atau

memasukkan satu karbon *intermediate metabolic* dengan inisiasi pengikatan pada tertrahydrofolate (IARC, 1995).

Formalin dapat dengan cepat dimetabolisme menjadi asam format dalam seluruh jaringan tubuh, khususnya pada sel darah merah. Jalur metabolisme formalin dalam tubuh diawali dengan pengikatan antara formalin dengan glutathione. Ikatan tersebut akan menghasilkan Hydroxymethylglutathione. Selanjutnya Hydroxymethylglutathione dengan katalisator Formaldehyde dehydrogenase akan membentuk S-Formylglutathione. Dalam reaksi ini terjadi transfer proton, sehingga NAD^+ akan bertindak sebagai akseptor proton tersebut, sehingga membentuk NADH dengan bantuan *Mitochondrial* dan sitosolik aldehyde dehydrogenase. S-Formylglutathione akan melepaskan glutathione dengan dikatalis oleh S-Formylglutathione hydrolase dan membentuk asam format. Asam format yang dibentuk dari formalin ini selanjutnya akan diekskresikan dalam bentuk CO_2 dan H_2O , maupun diekskresikan melalui urin sebagai asam format. Selain itu, formaldehyde bisa berikatan langsung dengan molekul biologisnya yaitu berupa DNA (Anonymous², 2011).

Penentuan dosis perlakuan didasarkan pada NOAEL serta LOAEL yang didapatkan beberapa penelitian yang telah dilakukan. No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) merupakan suatu kondisi dimana tidak ditemukannya efek yang berarti terhadap suatu dosis perlakuan dari suatu bahan yang diberikan kepada hewan coba. Selanjutnya, Lowest-Observed-Adverse-Effect Level (LOAEL) merupakan dosis terendah yang mampu memberikan efek pada hewan coba terkait dengan suatu senyawa yang diberikan pada hewan coba tersebut (Anonymous, 2006).



Gambar 2.3. Metabolisme Formalin (Anonymous², 2011).

2.3 Hepar

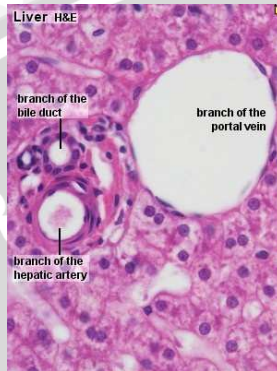
Hepar pada umumnya terbagi atas tiga lobus. Tiap lobus terdiri dari ratusan lobuli yang berbentuk heksagonal. Lobulus terdiri dari sel hepar (hepatosit). Sel-sel itu bersusun berupa deretan-deretan membentuk lempeng. Lempeng-lempeng dalam satu tubulus bersusun radial, dan ditengah lobulus, terdapat saluran yang disebut vena centralis. Diantara lempengan tersebut terdapat rongga yang membentuk saluran yang disebut *sinusoid*. Dinding sinusoid tersusun atas sel-sel endotel. Hepatosit berbentuk polihedral, dengan sisi paling sedikit

enam. Inti besar dan bulat, dan selaput inti berpermukaan rata (Cormack, 1994).

Hepar terdiri atas bermacam-macam sel. Hepatosit meliputi kurang lebih 60% dari total sel pada hepar, sedangkan sisanya terdiri dari sel-sel epithelial sistem empedu dan sel-sel parenkimal yang termasuk di dalamnya endotelium, sel kuffer dan sel stellata yang berbentuk seperti bintang. Hepatosit sendiri dipisahkan oleh sinusoid yang tersusun melingkari efferent vena hepatica dan duktus hepaticus. Saat darah memasuki hepar melalui arteri hepatica dan vena porta serta menuju vena sentralis, maka akan didapatkan pengurangan oksigen secara bertahap. Sebagai konsekuensinya, akan didapatkan variasi penting kerentanan jaringan terhadap kerusakan asinus. Membran hepatosit berhadapan langsung dengan sinusoid yang mempunyai banyak mikrofil. Mikrofil juga tampak pada sisi lain sel yang membatasi saluran empedu dan merupakan petunjuk tempat permulaan sekresi empedu. Permukaan lateral hepatosit memiliki sambungan penghubung dan desmosom yang saling bertautan dengan sebelahnya. Sinusoid hepar memiliki lapisan endothelial - endothelial berpori yang dipisahkan dari hepatosit oleh ruang disse (ruang sinusoida). Sel-sel lain yang terdapat dalam dinding sinusoid adalah sel fagositik. Sel Kuffer yang merupakan bagian penting sistem retikuloendothelial dan sel stellata disebut sel limposit atau perisit. Sel tersebut memiliki aktifitas miofibroblastik yang dapat membantu pengaturan aliran darah. Sinusoidal disamping sebagai faktor penting dalam perbaikan kerusakan hepar. Peningkatan aktifitas sel-sel stellata tampaknya merupakan faktor kunci dalam pembentukan jaringan fibrotik di dalam hepar (Yatim, 1990).

Salah satu penyakit yang biasa menyerang hepar yaitu hepatitis. Pada hepatitis level akut, akan terjadi sirosis dimana dalam hal ini terjadi pembengkakan pada hepatosit akibat penyakit ini. Selain itu, hepatitis pada level akut juga mengakibatkan terjadinya fibrosis dan inflamasi yang ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel limfoid di sekitar saluran portal, dalam hal ini yaitu vena sentralis. Hepatitis dalam

level akut juga mampu mengakibatkan terjadinya nekrosis pada hepatosit (Kradin, 2010).



Gambar2.4 Histologi Hepar (Slomianka, 2006)

2.4 Paru-paru

Bronkus dan bronkiolus merupakan saluran yang penting dalam proses pernafasan. Tekstur histologi bronkus tersusun atas lempeng kartilago yang terletak melingkari lumen. Lapisan epithelium terletak di permukaan dan pada bagian bawah terdapat lapisan lamina propria dan otot polos yang mengandung berkas spiral berselang-seling yang menyusun otot polos. Berkas otot polos lebih menonjol di dekat zona pernafasan. Lamina propria kaya serat elastis dan mengandung mukosa yang melimpah, dimana saluran membuka menuju ke lumen. Sejumlah limfosit ditemukan dalam lamina propria dan sel-sel epitel (Junqueira, 2005).

Saluran alveoli merupakan saluran yang tipis dan ber dinding terputus-putus. Saluran ini bercabang-cabang, tiap cabang berujung pada kantung alveoli. Dinding saluran alveoli yang mengarah pada kantung alveoli tersusun atas berkas serat elastis, kolagen dan otot polos. Berkas otot polos mirip sfingter, tampak seperti tombol diantara alveoli berdekatan. Otot polos tidak lagi pada ujung distal dari saluran alveoli. Matriks serat-serat elastin dan kolagen merupakan satu-satunya penunjang bagi saluran maupun alveolinya. Serat elastin memungkinkan

alveolus mengembang sewaktu inspirasi dan berkontaksi secara pasif selama ekspirasi (Yatim, 1990).

Alveolus merupakan unit terkecil pada pulmo atau paru, yang berupa gelembung bentuk polihedral, terbuka pada satu sisi, yaitu muara ke kantung alveoli. Dindingnya terdiri dari selapis sel epitel gepeng yang sangat tipis. Dinding alveolusnya dililit oleh kapiler yang diluarnya terdapat serat retikulusa dan elastis. Epitel alveolus dipisahkan dari endotel kapiler oleh lamina basalis yang tipis. Terdapat pula sel epitel yang berbentuk bundar, atau kubus, berada pada dinding alveolus, yang disebut sel sekat atau sel alveolus besar (Marieb, 2004).

Salah satu penyakit yang dapat terjadi pada paru-paru yaitu pneumonia. Salah satu ciri yang menandakan terjadinya pneumonia adalah terjadinya fibrosis pada saluran alveolar dan juga pada ruang antar saluran alveolar tersebut yang dinamakan intraluminal fibrosis. Proses ini biasanya terjadi di sekitar bronkiolus (Dail dan Hammar, 2008).

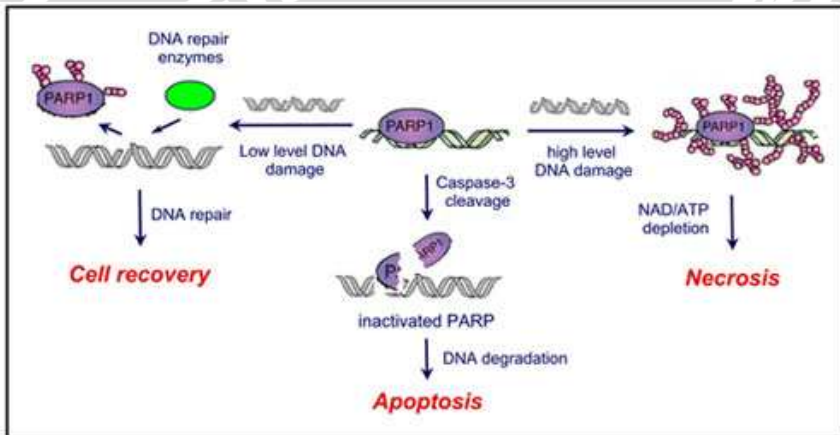


Gambar 2.5 Histologi *pulmo* (Slomianka, 2006)

2.5 Radikal Bebas dan Nekrosis

Menurut Fenech *et al.* (1999), adanya paparan hidrogen peroksida yang merupakan salah satu zat yang termasuk *Reactive Oxygen Species*

(ROS) terhadap sel, dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA. Semakin tinggi kadar ROS di dalam sel, maka kerusakan DNA akan semakin parah. Akibatnya sel tidak mampu mengaktifkan caspase melalui proses *caspase cascade pathway* untuk menginduksi apoptosis dikarenakan terjadinya deplesi ATP seluler. Keadaan kekurangan ATP seluler tersebut akan mengarahkan sel untuk mengalami nekrosis. Pada paparan ROS yang tinggi, jumlah sel yang mengalami apoptosis sangat sedikit, sebaliknya jumlah sel yang mengalami nekrosis meningkat.



Gambar 2.6. Diagram skematis aktivitas PARP-1 pada berbagai level kerusakan DNA (Anonymous⁵, 2011).

Nekrosis merupakan keadaan dimana sel mengalami kematian akibat kekurangan ATP intraseluler dan tidak diprogram oleh sel sebelumnya. Nekrosis pada umumnya disebabkan karena berubahnya lingkungan sel secara cepat dan tiba-tiba atau dengan suatu dedahan bahan karsinogenik dalam konsentrasi yang tinggi dan terjadi secara tiba-tiba. Pada kejadian nekrosis, sel akan mengalami kehilangan fungsi metaboliknya serta kehilangan integritas membran sel itu sendiri. Akibatnya sel akan hancur dan komponennya akan tersebar di sekitar jaringan pada sel yang mengalami nekrosis tersebut (Nanji dan Sturmhofel, 1997).

Nekrosis merupakan salah satu bentuk kematian sel yang dapat diinduksi oleh beberapa agen fisiologis dan farmakologis. Sel yang mengalami nekrosis mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu berupa pengerutan sel, kondensasi dari benang-benang kromatin dan lisis sel (Cruchten dan Broeck, 2002). Proses terjadinya nekrosis yaitu melalui tiga tahapan, yaitu piknosis, karyorhexis dan karyolisis. Pada piknosis, terjadi kondensasi irreversible dari benang-benang kromatin di dalam nukleus sel yang mengalami nekrosis maupun apoptosis. Proses ini diikuti dengan proses karyorhexis, yaitu terjadinya fragmentasi desdruktif dari nukleus sel yang mengalami kematian, sehingga benang-benang kromatin terdistribusi secara tidak teratur di seluruh sitoplasma. Karyolisis merupakan kondisi rusaknya kromatin secara menyeluruh dari sel yang mengalami kematian akibat adanya aktivitas DNase (Anonymous⁴, 2011).

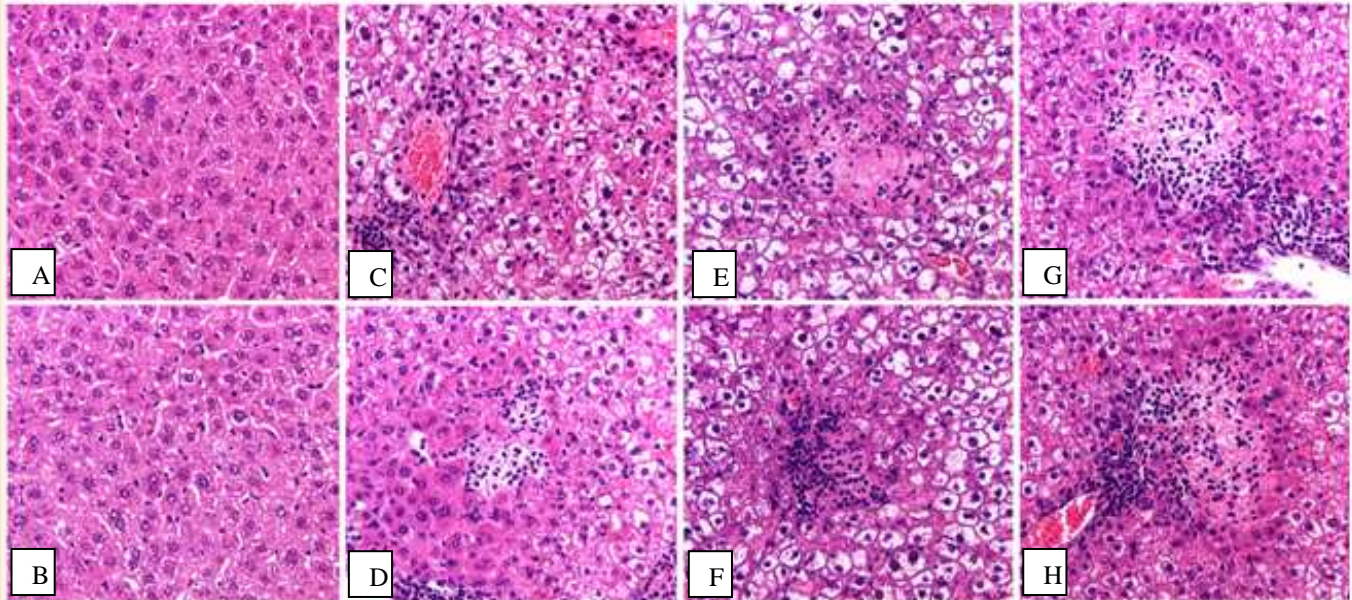
Apoptosis merupakan salah satu bentuk kematian sel yang terprogram dan ditujukan untuk menjaga homeostatis serta ketahanan hidup suatu organisme. Salah satu proses *signaling cascade* yang terjadi dalam proses apoptosis yaitu aktivasi cysteinyl aspartate protease (caspase) yang tersedia dalam bentuk inaktifnya dan dinamakan pro-caspase. Saat diaktivasi, caspase menginisiasi kematian sel dengan memecah dan mengaktifasi efektor caspase yang mengatur proses apoptosis. Caspase yang terlibat dalam proses apoptosis yaitu caspase-1 dan caspase-3. Dalam hal ini, caspase-3 bertindak sebagai inisiator dari protein PARP-1 untuk mengalami *cleavage* sebagai respon seluler untuk proses apoptosis (Chaitanya *et al.*, 2010). Pada kerusakan DNA dalam level yang tinggi, aktivasi pro-caspase-3 menjadi caspase-3 akan terhambat akibat sel yang mengalami deplesi ATP. Hal tersebut akan mengakibatkan sel mengalami nekrosis (Liu *et al.*, 2009).

Adanya peningkatan kadar H₂O₂ (ROS) di dalam sel, dapat meningkatkan aktivitas caspase-3 dan akan menginduksi apoptosis. Namun, pada konsentrasi ROS yang tinggi maka aktivitas caspase-3 akan terhambat akibat adanya deplesi NAD⁺ seluler secara drastis yang mengakibatkan sel akan kehilangan ATP dalam jumlah besar. Kondisi

sel yang kekurangan ATP ini akan mengarahkan sel pada proses kematian sel yang dinamakan nekrosis (Fenech *et al.*, 1999).

Senyawa lain yang dapat meningkatkan kadar ROS didalam tubuh yaitu fluoride. Fluoride dapat menyebabkan fluorosis apabila kadarnya didalam tubuh melebihi ambang batas. Tingginya kadar fluoride didalam tubuh dapat meningkatkan kadar ROS, seperti Hidrogen peroksida dan superoxide. Senyawa ROS tersebut akan dimetabolisasi oleh sel secara lanjut dan menghasilkan senyawa malondialdehyde (MDA). MDA merupakan marker yang dapat mengindikasikan kadar ROS didalam tubuh. Semakin tinggi kadar MDA yang terukur, memiliki arti bahwa semakin tinggi pula kadar ROS didalam tubuh. Tingginya kadar ROS dan MDA di dalam suatu sel dapat menurunkan kinerja glutathione tereduksi (GSH), sehingga akan berdampak pada terjadinya kerusakan DNA. Hal ini disebabkan karena MDA merupakan salah satu senyawa yang dapat berikatan langsung dengan basa nukleotida penyusun DNA (He dan Chen, 2006).

Berdasarkan gambar 2.7, dapat diketahui bahwa terdapat beberapa perbedaan antara sel hepar normal dengan sel hepar yang mengalami kerusakan. Pada preparat organ hepar yang normal, bentuk hepatositnya jelas dan memiliki inti yang bergranula serta membran selnya terlihat dengan jelas. Namun, pada preparat organ hepar yang dipapar oleh zat toksik, didapatkan hasil bahwa sel hepatosit tersebut mengalami nekrosis. Pada saat proses nekrosis, terjadi pula proses enzimatik yaitu berupa adanya enzim lisosim yang keluar ke sitoplasma sel yang rusak, sehingga ketika sel hepatosit mengalami lisis maka enzim tersebut juga akan keluar menuju ke lingkungan di sekitar sel yang mengalami nekrosis tersebut. Akibatnya, terbentuklah *necrotic foci* yaitu sekumpulan sel yang mengalami nekrosis, baik yang terdedah oleh zat toksik maupun yang terbentuk ketika terjadi proses enzimatik pada saat terjadinya proses nekrosis itu sendiri.



Gambar 2.7. Perbandingan sel hepar normal (A dan B), dan sel hepar yang mengalami nekrosis (C – H), pada gambar A dan B tidak ditemui adanya *necrotic foci*, sedangkan pada gambar C-H ditemukan adanya *necrotic foci* yaitu bagian yang berwarna biru gelap (Kim *et al.*, 2009).

Piknosis memiliki ciri-ciri yaitu berupa adanya inti sel yang menyusut hingga mengkerut, menunjukkan penggumpalan, densitas kromatinnya meningkat, memiliki batas yang tidak teratur, dan berwarna gelap. Karioreksis memiliki ciri-ciri membran nukleusnya robek, inti sel hancur sehingga terjadi pemisahan kromatin dan membentuk fragmen-fragmen dan menyebabkan materi kromatin tersebar dalam sel. Sedangkan kariolisis memiliki ciri-ciri yaitu inti sel tercerna oleh adanya aktivitas DNase sehingga tidak dapat diwarnai lagi dan benar-benar hilang (Anonymous⁴, 2011). Parameter ini digunakan sebagai acuan untuk pengamatan sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar dan paru mencit, dan disajikan dalam tabel 2.1 di bawah ini.

Tabel 2.1.Parameter sel yang mengalami Nekrosis (Anonymous⁴, 2011).

Tipe Nekrosis	Ciri-Ciri
<i>Piknosis</i>	Inti sel menyusut hingga mengkerut, menunjukkan penggumpalan, densitas kromatinnya meningkat, memiliki batas yang tidak teratur, dan berwarna gelap.
<i>Karioreksis</i>	Membran nukleus robek, inti sel hancur sehingga terjadi pemisahan kromatin dan membentuk fragmen-fragmen dan menyebabkan materi kromatin tersebar dalam sel.
<i>Kariolisis</i>	Inti sel tercerna oleh adanya aktivitas DNase, sehingga tidak dapat diwarnai lagi oleh haematoxylin dan benar-benar hilang.

2.6 Kerangka Konseptual Penelitian

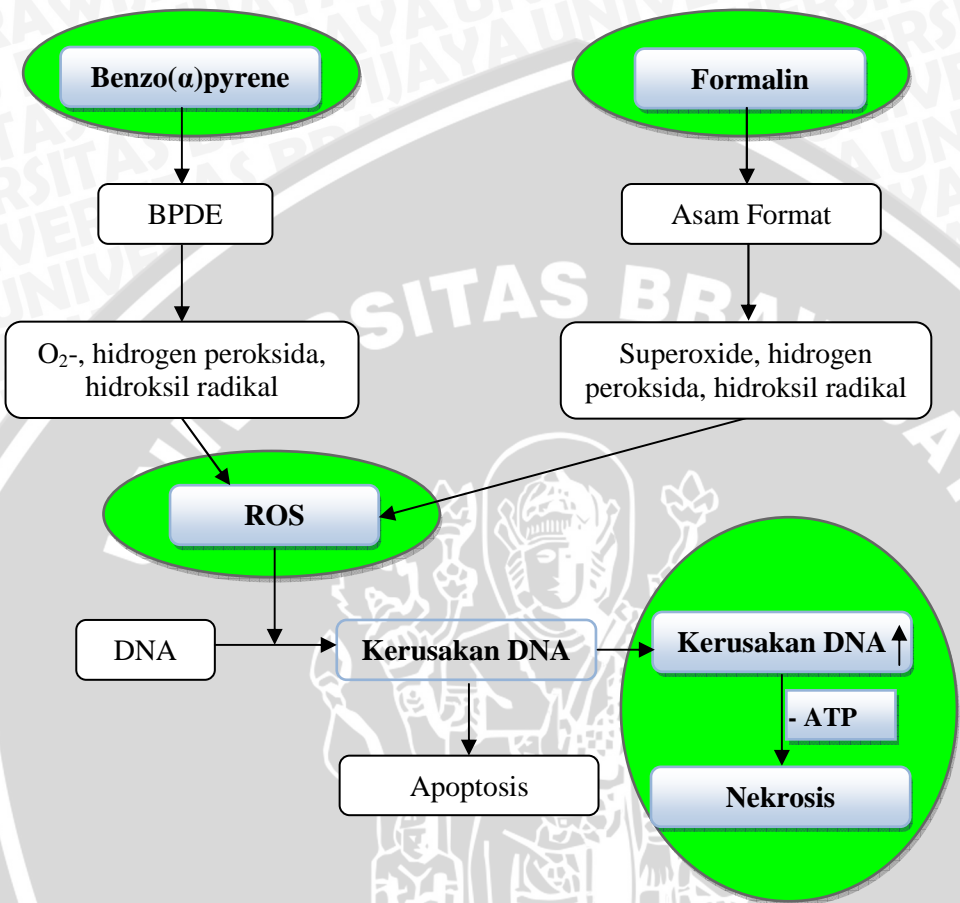
Benzo(α)pyrene merupakan suatu senyawa yang bersifat prokarsinogen yang terbentuk ketika bahan bakar, sampah atau material

tanaman mengalami pembakaran yang tidak sempurna. Senyawa ini dapat bersifat mutagenik melalui mekanisme enzimatisnya yaitu dengan bantuan anti-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(α)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide sehingga dapat terbentuk senyawa Benzo(α)pyrene diol epoxide (BPDE). Senyawa ini dapat berikatan langsung dengan basa guanin pada DNA. Profil dari hasil metabolisme BaP akan menghasilkan senyawa kimia yang sangat reaktif dan satu buah elektronnya akan mengalami reaksi redoks dan dapat menghasilkan radikal bebas seperti O_2^- , hidrogen peroksida dan hidroksil radikal.

Formalin didalam tubuh dapat dimetabolisme menjadi asam format yang dapat diekskresikan dalam bentuk CO_2 dan H_2O , maupun diekskresikan melalui urin sebagai asam format. Terakumulasinya asam format didalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya proses asidosis pada sel yang mengarahkan terbentuknya senyawa radikal bebas. Selain itu, formaldehyde yang terkandung dalam formalin dapat secara langsung berikatan dengan molekul biologisnya yaitu DNA.

Adanya paparan benzo(α)pyrene dan formalin dalam dosis toksik dapat menyebabkan terjadinya kerusakan DNA yang terjadi pada sel. Adanya kerusakan DNA dapat menginisiasi sel untuk melakukan proses perbaikan dengan mengaktifasi protein PARP-1. Penelitian yang dilakukan Maghfironi (2010), menunjukkan hasil bahwa terdapat peningkatan ekspresi dari protein PARP-1 seiring dengan peningkatan ekstrimitas dosis perlakuan yang diberikan.

Kerusakan DNA yang tinggi, akan menyebabkan protein PARP-1 mengalami hiperaktivasi, sehingga sel akan mengalami depleksi NAD^+ yang mengarahkan sel mengalami kekurangan ATP seluler. Hal ini mengakibatkan sel tidak mempunyai ATP dalam jumlah yang cukup untuk melakukan apoptosis, sehingga sel akan mengarah pada terjadinya nekrosis, sehingga pada penelitian kali ini akan dilakukan pemeriksaan adanya perbedaan jumlah sel yang mengalami nekrosis.



Gambar 2.8. Bagan kerangka konseptual penelitian.

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian yang berjudul “Studi Nekrosis Sel Hepar dan Paru Mencit (*Mus musculus*) setelah Paparan Formalin dan Benzo(α)pyrene” ini dilakukan pada bulan November 2011– April 2012 dan bertempat di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Preparasi Larutan Formalin

Preparasi diawali dengan pembuatan larutan stok dengan dosis 25 mg/kgBB. Serbuk paraformaldehyde (PFA) diambil berdasarkan konsentrasi yang diinginkan, untuk dosis 25 mg/kg BB diambil 100 mg dan selanjutnya dilarutkan dalam 50 ml aquades (2 mg/ml), dan setelah itu larutan dihomogenasi dengan menggunakan magnetic stirer. Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan yang akan dicekokkan pada mencit. Larutan ini dibuat dengan cara mengambil pada larutan stok berdasarkan berat badan mencit dan sesuai dengan dosis perlakuan. Larutan formalin yang dicekokkan pada mencit sebanyak 1 ml dan dilakukan setiap hari selama dua bulan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan beberapa konsentrasi Formalin yang telah diuji cobakan kepada beberapa mencit jantan, yaitu 0, 1.2, 15, dan 82 mg/kg BB selama 12 bulan. Parameter toksisitas yang diamati yaitu adanya perubahan berat badan mencit, perubahan pola makan mencit, tes urin pada mencit hasil perlakuan, serta perubahan berat otak mencit. Berdasarkan pada hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut, dosis terendah yang untuk LOAEL yaitu 15 mg/kg BB (Till *et. al.*, 1989).

3.2.2 Preparasi Larutan Benzo(α)pyrene

Preparasi diawali dengan pengambilan serbuk benzo(α)pyrene (Sigma) sebanyak 0,025 gram yang dilarutkan dalam 100 μ l minyak jagung, kemudian dihangatkan pada suhu 37°C pada *water bath*. Injeksi dilakukan sebanyak 20 μ l pada masing-masing mencit dan injeksi dilakukan sebanyak empat kali.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan beberapa konsentrasi Benzo(α)pyrene yang telah diuji cobakan kepada beberapa mencit yaitu 0, 75, 125, dan 250 mg/kg BB selama 13 minggu. Parameter toksisitas yang diamati yaitu adanya perubahan berat badan mencit, perubahan pola makan mencit, kematian, terjadinya proses patologis pada organ dan kelenjar, serta pengamatan terhadap serum mencit. Berdasarkan pada hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut, dosis terendah yang digunakan sebagai NOAEL yaitu 75 mg/kg, sedangkan dosis untuk LOAEL yaitu 125 mg/kg BB (Epa, 1989).

3.2.3 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) strain Balb-c yang berumur 2 bulan dengan berat badan berkisar antara 20-30 gram. Sebelum perlakuan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu. Perlakuan hewan coba dilakukan selama dua bulan. Di bawah ini merupakan macam-macam perlakuan yang diberikan pada hewan coba :

- a. Kontrol
- b. Pemberian formalin dengan dosis 25 mg/kg BB dilakukan secara peroral setiap hari selama dua bulan.
- c. Pemberian benzo(α)pyrene melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 250 mg/kg BB dilakukan setelah 30 hari masa inkubasi dengan empat kali injeksi selang waktu satu hari.
- d. Pemberian formalin dosis 25 mg/kg BB secara peroral setiap hari dan injeksi intraperitoneal benzo(α)pyrene dosis 250 mg/kg BB yang dilakukan setelah 30 hari masa perlakuan dengan dilakukan dalam empat kali injeksi dan selang waktu satu hari.

3.2.4 Persiapan Preparat

Langkah pertama yang dilakukan adalah organ hepar dan paru-paru mencit (*Mus musculus*) yang telah dipapar dengan formalin, benzo(α)pyrene maupun gabungan paparan antara formalin dan benzo(α)pyrene difiksasi terlebih dahulu dengan larutan Formalin 4% selama 24 jam. Organ hepar dan paru-paru tersebut selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama 3 kali, masing-masing selama 10 menit sambil dikocok. Spesimen kemudian direndam alkohol 70% selama semalam (overnight). Dilanjutkan perendaman dengan alkohol 80%, sebanyak 3 kali masing-masing selama 10 menit sambil dikocok. Dilanjutkan direndam dengan alkohol pada konsentrasi 90% dan 96% dengan perlakuan yang sama. Dilanjutkan pada perendaman dengan alkohol absolut selama 10 menit dan dikocok. Berikutnya, spesimen direndam dengan xilol selama ± 30 menit. Dilakukan proses infiltrasi dengan perbandingan xilol: parafin berturut-turut = 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit pada suhu 52^oC. Dilanjutkan dengan pemberian parafin murni pada suhu 56^oC selama 12 menit. Berikutnya dilakukan proses *blocking* dan *sectioning* dengan ukuran potongan ± 5 mikron. Pita hasil potongan diletakkan pada gelas objek yang telah diberi mayer albumin dengan menggunakan kuas lalu diletakkan pada *hot plate*.

3.2.5 Pewarnaan Preparat

Proses berikutnya adalah pewarnaan preparat. Langkah pertama yaitu dilakukan perendaman spesimen pada xilol selama 10 menit. Lalu xilol pada slide diserap dengan tissue sampai kering. Berikutnya dilakukan perendaman pada alkohol absolut dengan konsentrasi yang semakin menurun, yaitu 96, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 (%). Lalu direndam pada aquadest, dan dilanjutkan pada hematoxylin ehrlich selama 30 detik. Selanjutnya dilakukan perendaman pada aquadest kembali lalu dicuci dengan air yang mengalir. Spesimen selanjutnya direndam alkohol dengan konsentrasi yang semakin meningkat, yaitu 30, 40, 50, 60, 70 (%). Spesimen kemudian direndam

pada Eosin selama 1-2 menit. Dilanjutkan perendaman pada alkohol dengan konsentrasi yang semakin meningkat, yaitu 70, 80, 90, 96(%), dan alkohol absolut. Alkohol pada slide diserap dengan tisu sampai kering. Spesimen selanjutnya direndam dengan xilol selama 10 menit. Lalu diberi entelan dan selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

3.2.6 Pengamatan

Langkah pertama yaitu dengan melakukan observasi dan estimasi persentase terjadinya nekrosis pada satu bidang pandang, masing-masing pada perbesaran 200X, dan 400X untuk organ hepar. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler Olympus BX51 dengan perbesaran 200x dan 400x untuk spesimen organ hepar, dan perbesaran 1000x untuk spesimen organ paru-paru. Pada organ hepar, observasi ditentukan dengan mengambil 5 bidang pandang secara acak, kemudian pada masing-masing bidang pandang tersebut dihitung jumlah total selnya dan selanjutnya di rata-rata. Hasil rata-rata ini kemudian digunakan sebagai referensi jumlah total sel pada setiap bidang pandang. Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah sel yang mengalami nekrosis dan hasilnya dikonversi menjadi bentuk persentase dengan cara sebagai berikut.

$$\% \text{ sel nekrosis} = \frac{\sum \text{ sel nekrosis}}{\sum \text{ total sel}} \times 100$$

Pengamatan spesimen organ paru-paru dilakukan dengan cara melihat kerusakan sel yang terjadi. Selanjutnya dilakukan analisis secara deskriptif mengenai kerusakan sel paru-paru yang mengalami kerusakan tersebut.

Pengamatan dilakukan pada preparat organ hepar dan paru mencit yang dipapar dengan formalin dan benzo(α)pyrene dengan dosis toksik. Pengamatan dilakukan pada lima bidang pandang yang berbeda untuk setiap irisan preparat hepar dan paru. Namun, pada preparat paru

pengamatan yang berbeda dilakukan pada bronchiolus dan alveoli. Pada bronchiolus, dilakukan pengamatan secara utuh dari bronchiolus yang ditemukan, sedangkan pada alveoli pengamatan dilakukan sebanyak lima bidang pandang yang berbeda.

Nekrosis merupakan salah satu bentuk kematian sel yang dapat diinduksi oleh beberapa agen fisiologis dan farmakologis. Sel yang mengalami nekrosis mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu berupa pengkerutan sel, kondensasi dari benang-benang kromatin dan lisis sel (Cruchten dan Broeck, 2002). *Necrotic foci* merupakan suatu kumpulan sel, debris sel dan juga sel-sel limfoid yang terfokus pada suatu titik. Biasanya *necrotic foci* terbentuk karena adanya beberapa sel yang mengalami nekrosis akut sehingga sel tersebut mengalami lisis. Lisosim dari sel yang mengalami lisis tersebut akan mencerna sel-sel di sekitarnya sehingga sel di sekitarnya juga mengalami kematian sel.

Data untuk *necrotic foci* didapatkan dengan cara menghitung jumlah spot yang terbentuk pada setiap lapang pandang pada masing-masing preparat. Selanjutnya, dilakukan penjumlahan terhadap spot *necrotic foci* yang terbentuk dan kemudian dibuat rerata dengan cara membagi jumlah spot yang teramati dengan banyaknya lapang pandang pada setiap preparat. Setelah mendapatkan rerata jumlah spot *necrotic foci*, selanjutnya dibuat grafik rerata jumlah spot *necrotic foci*.

3.2.7 Analisis Data

Data yang didapatkan akan disortir terlebih dahulu yaitu dengan cara mengeliminasi data pencilan menggunakan batas atas dan batas bawah berdasarkan data hasil pengamatan yang didapatkan. Selanjutnya, penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan selang kepercayaan 95%. Analisis signifikansi dengan menggunakan Anova dan dilanjutkan dengan uji Tukey-HSD. Data yang digunakan adalah persentase sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar dan paru-paru mencit yang dipapar dengan benzo(α)pyrene dan formalin pada dosis toksik, serta rerata spot necrotic foci yang terbentuk pada organ hepar dan paru hewan coba.

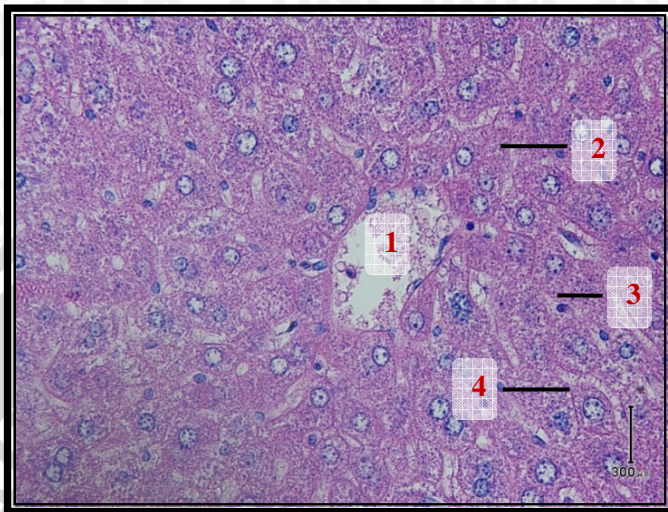
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

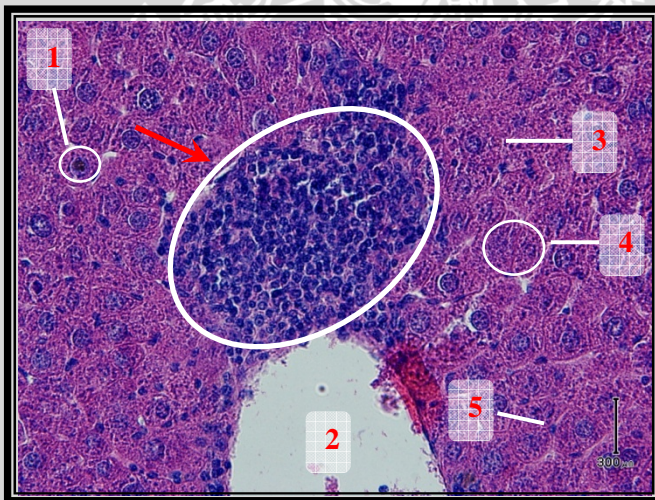
4.1.1. Nekrosis pada Organ Hepar

Berdasarkan pada pengamatan yang telah dilakukan, didapatkan beberapa perbedaan antara organ hepar tanpa perlakuan dengan organ hepar dengan perlakuan formalin dan benzo(α)pyrene (BaP). Pada preparat organ hepar normal, inti sel hepatosit berbentuk bulat dan bergranula, sedangkan pada preparat organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP, inti sel hepatosit mengalami kondensasi, dan bahkan mengalami lisis. Untuk sel Kupfer dan vena sentralis, baik pada organ hepar tanpa perlakuan maupun organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP terlihat memiliki kenampakan yang sama. Pada organ hepar tanpa perlakuan, ditemukan *necrotic foci* namun dengan distribusi yang sangat sedikit, sedangkan pada organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP ditemui adanya *necrotic foci* pada hepatosit yang terletak di sekitar vena sentralis dengan distribusi yang lebih banyak dibandingkan dengan organ hepar tanpa perlakuan. Selain itu, dalam preparat organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP, ditemui beberapa tipe sel nekrosis, antara lain piknosis dan karyolisis. Perbedaan tersebut akan disajikan dalam Gambar 4.1 dan 4.2.

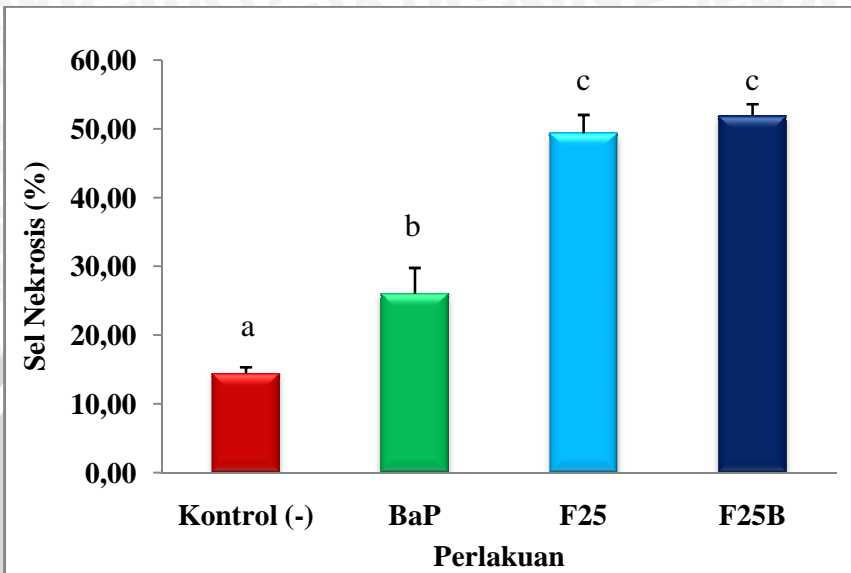
Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antara perlakuan kontrol tanpa perlakuan, dan perlakuan Benzo(α)pyrene (BaP) dengan perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB dan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB Benzo(α)pyrene pada organ hepar. Berdasarkan pada analisis yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan persentase sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar di setiap perlakuan (Gambar 4.3). Persentase nekrosis pada kontrol tanpa perlakuan, Benzo(a)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut yaitu sebesar $14,43\% \pm 0,91$; $26,05\% \pm 3,75$.; $49,38\% \pm 2,66$; $51,86 \pm 1,73$.



Gambar 4.1. Histologi organ hepar tanpa perlakuan. Vena sentralis (1), hepatosit (2), sel Kupfer (3), dan inti sel hepatosit (4). (HE, 400x skala 300 μ m).



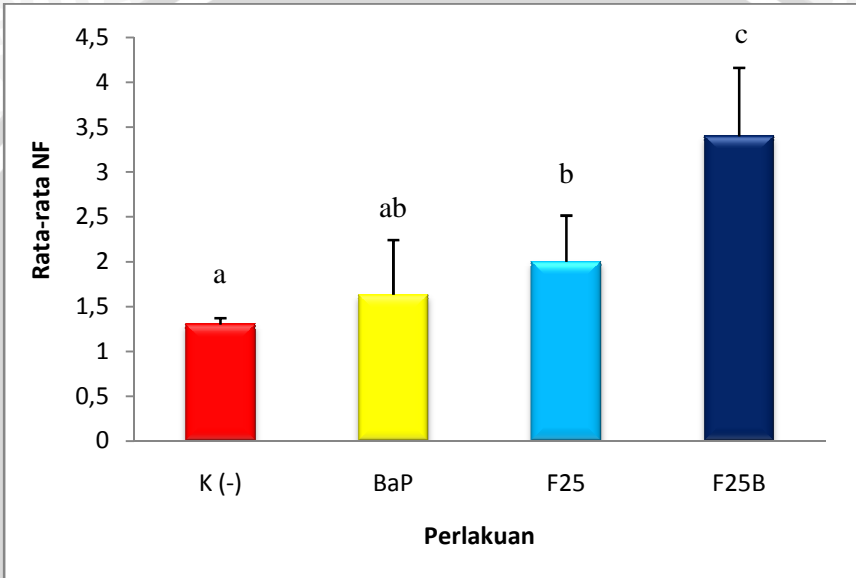
Gambar 4.2. Histologi organ hepar dengan perlakuan formalin dan BaP. Vena sentralis (2), hepatosit (3), dan sel Kupfer (5). Selain itu, ditemukan juga sel yang mengalami piknosis (1) dan karyolisis (4), serta terbentuknya *necrotic foci* (→) (HE, 400x skala 300 μ m).



Gambar 4.3. Perbandingan persentase sel nekrosis pada organ hepar
 Keterangan: Kontrol tanpa perlakuan; BaP (benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB); F25 (formalin dosis 25 mg/kg BB); F25B (formalin 25 mg/kg BB BaP).

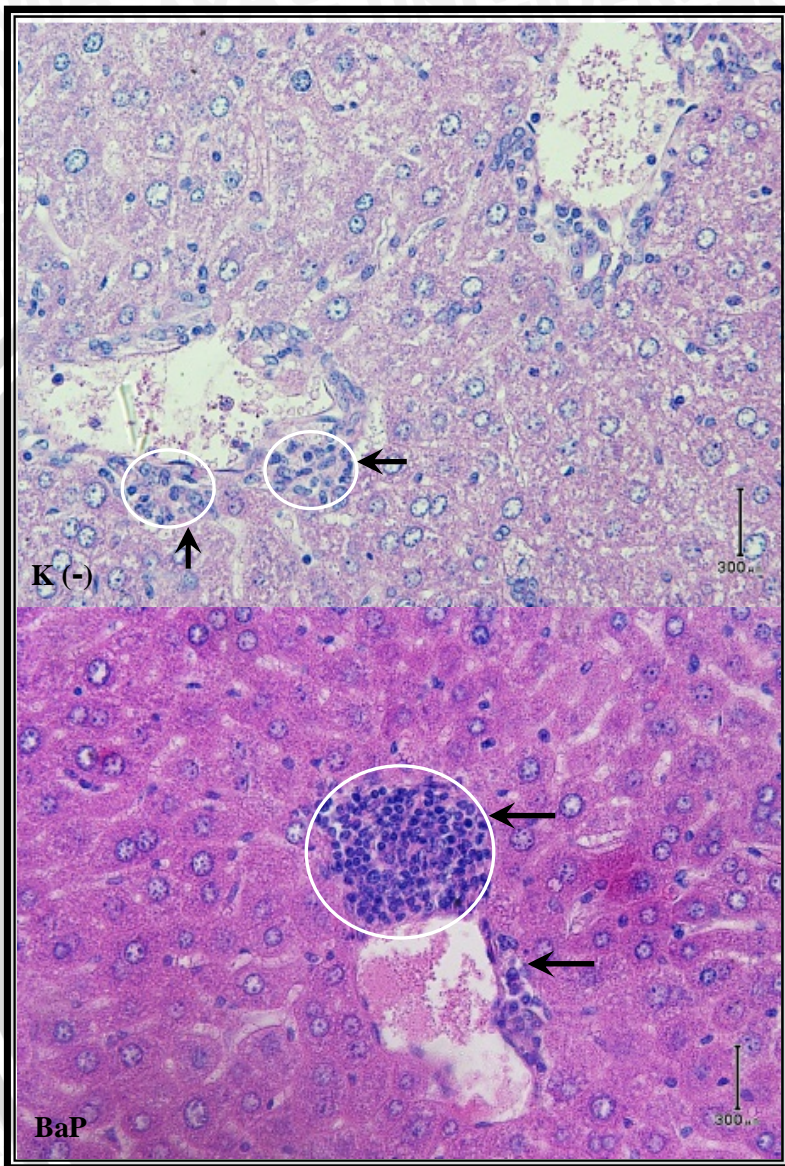
Berdasarkan pada analisis statistik yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol tanpa perlakuan, dan BaP. Hal ini menunjukkan bahwa baik perlakuan perlakuan BaP memiliki efek toksik terhadap organ hepar hewan coba yang ditandai dengan meningkatnya persentase sel yang mengalami nekrosis. Analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antara perlakuan formalin 25 mg/kg BB dengan perlakuan kontrol tanpa perlakuan, dan BaP, sedangkan perlakuan formalin 25 mg/kg BB tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP. Hal ini menunjukkan bahwa, perlakuan formalin 25 mg/kg BB memiliki efek tingkat toksisitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol tanpa perlakuan, dan perlakuan BaP. Perlakuan

formalin 25 mg/kg BB memiliki efek toksisitas yang sama dengan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB BaP, meskipun pada grafik diatas menunjukkan adanya peningkatan persentase sel yang mengalami nekrosis pada perlakuan gabungan tersebut.

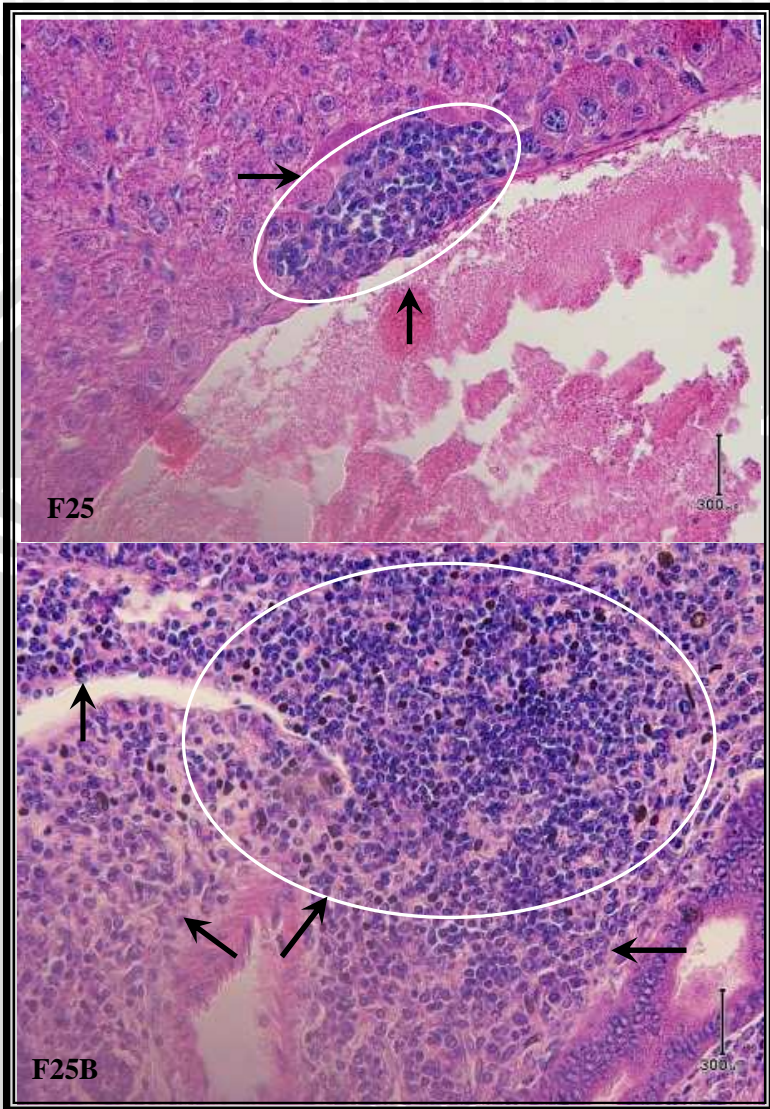


Gambar 4.4. Perbandingan rerata spot *necrotic foci* yang terbentuk pada organ hepar. Keterangan: Kontrol tanpa perlakuan; BaP (benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB); F25 (formalin dosis 25 mg/kg BB); F25B (formalin 25 mg/kg BB BaP).

Hasil pengamatan preparat organ hepar menunjukkan terbentuknya *necrotic foci* pada setiap perlakuan, namun dengan distribusi yang berbeda-beda (Gambar 4.4). Rerata *necrotic foci* yang terbentuk pada perlakuan kontrol tanpa perlakuan, Benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut, yaitu $1,3 \pm 0,07$; $1,63 \pm 0,61$; $2 \pm 0,51$; dan $3,4 \pm 0,76$. Penampang histologi *necrotic foci* pada preparat organ hepar akan ditunjukkan dalam gambar berikut.



Gambar 4.5. *Necrotic foci* pada preparat organ hepar kontrol tanpa perlakuan (K(-)), dan pada perlakuan Benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB. *Necrotic foci* ditunjukkan oleh tanda panah hitam (\rightarrow). (HE, 400x skala 300 μ m).



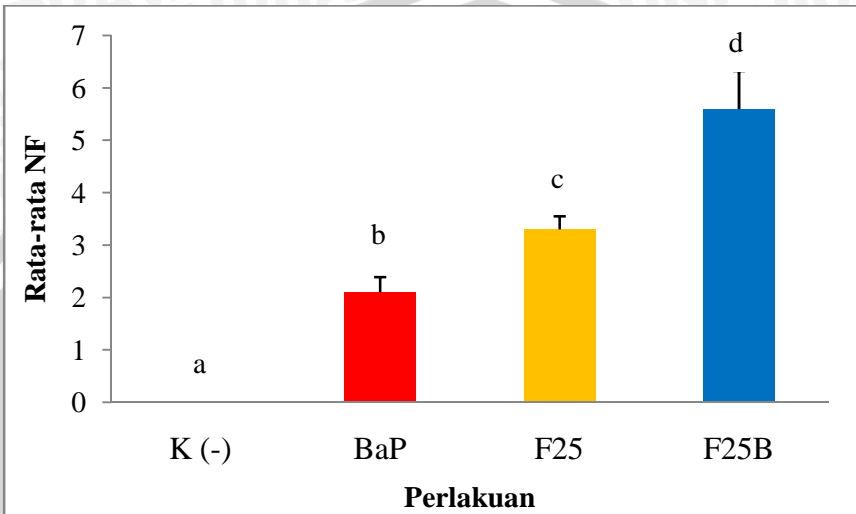
Gambar 4.6. *Necrotic foci* pada preparat organ hepar perlakuan formalin 25 mg/kg BB (F25), dan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP (F25B). *Necrotic foci* ditunjukkan oleh tanda panah hitam (→) (HE, 400x skala 300 µm).

Pengamatan penampang histologi preparat organ hepar menunjukkan bahwa pada kontrol tanpa perlakuan ditemukan adanya *necrotic foci* yang terbentuk namun dalam distribusi yang sangat sedikit, sedangkan pada perlakuan BaP, distribusi *necrotic foci* yang terbentuk lebih banyak jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Gambar 4.5). Hal ini dikarenakan adanya zat toksik yang masuk pada tubuh hewan coba, sehingga menimbulkan respon terhadap adanya zat toksik yang masuk tersebut. Selanjutnya, pada perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB terlihat terbentuknya *necrotic foci* pada hepatosit yang terletak di sekitar *vena sentralis*. Berdasarkan pengamatan histologi yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa distribusi *necrotic foci* yang terbentuk pada perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB lebih banyak jika dibandingkan dengan perlakuan BaP, sedangkan pada perlakuan gabungan, distribusi *necrotic foci* yang terbentuk sangat banyak dan tidak hanya terbentuk di sekitar *vena sentralis* saja, namun terbentuk hampir di seluruh bagian dari preparat organ hepar yang diamati (Gambar 4.6). Pada gambar 4.5, dan Gambar 4.6 tersebut, dapat disimpulkan bahwa perlakuan gabungan yang diberikan dapat meningkatkan distribusi *necrotic foci* yang terbentuk. Semakin banyaknya distribusi *necrotic foci* yang terbentuk, menandakan bahwa semakin parahnya tingkat kerusakan organ yang mengalami suatu perlakuan dengan suatu zat tertentu.

4.1.2. Analisis Hasil Pengamatan Preparat Organ Paru-paru

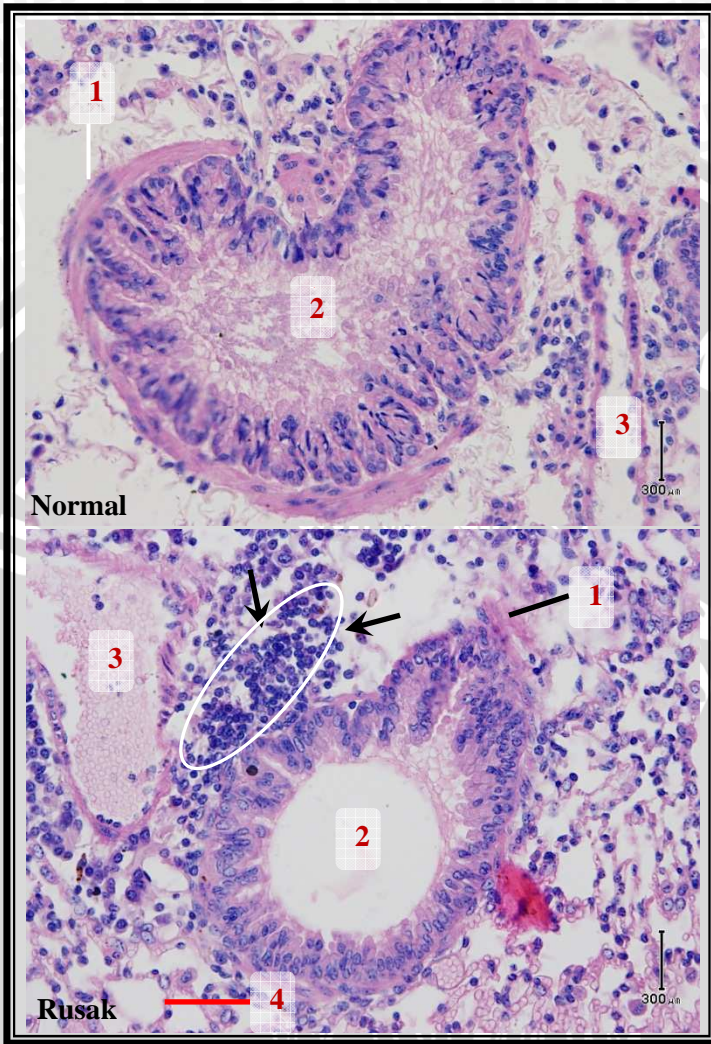
Analisis pada preparat organ paru-paru dilakukan secara deskriptif, sehingga tidak didapatkan persentase sel yang mengalami nekrosis. Hal ini disebabkan karena antara sel paru-paru normal dengan sel yang mengalami nekrosis tidak bisa dibedakan. Berdasarkan pada pengamatan yang telah dilakukan, didapatkan beberapa perbedaan antara organ paru-paru tanpa perlakuan dengan organ paru-paru yang mengalami perlakuan formalin dan BaP. Salah satu perbedaan tersebut terletak pada ada tidaknya *necrotic foci* yang terbentuk, dan ada

tidaknya infiltrasi sel limfoid yang menandakan terjadinya reaksi inflamasi pada organ paru-paru hewan coba.

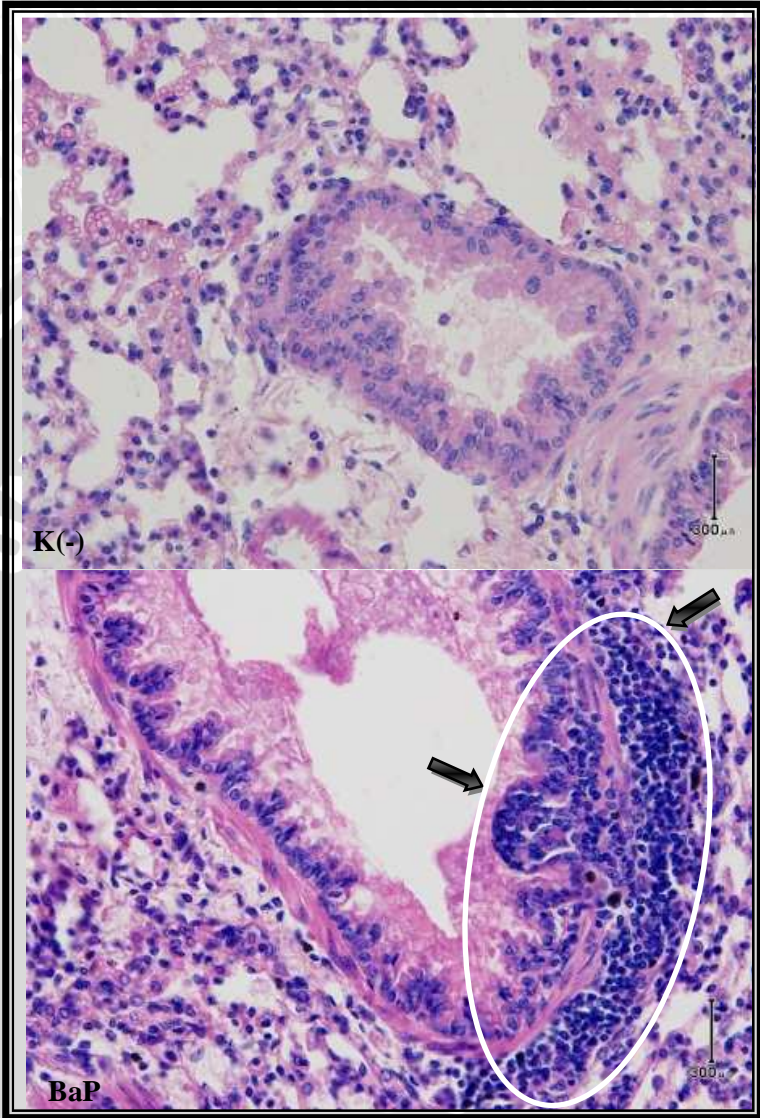


Gambar 4.7. Perbandingan rerata spot *necrotic foci* yang terbentuk pada organ paru-paru. Keterangan: Kontrol tanpa perlakuan K(-); BaP (benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB); F25 (formalin dosis 25 mg/kg BB); F25B (formalin 25 mg/kg BB BaP).

Hasil pengamatan preparat organ paru-paru menunjukkan terbentuknya *necrotic foci* pada perlakuan BaP 250 mg/kg BB, perlakuan formalin 25 mg/kg BB, dan perlakuan gabungan formalin BaP, namun *necrotic foci* tidak ditemukan pada perlakuan kontrol tanpa perlakuan (Gambar 4.7). Rerata *necrotic foci* yang terbentuk pada Benzo(a)pyrene 250 mg/kg BB, Formalin 25 mg/kg BB, gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP berturut-turut, yaitu $2,1 \pm 0,29$; $3,3 \pm 0,25$; dan $5,6 \pm 0,72$. Jika dilihat berdasarkan nilai rerata tersebut, terlihat adanya peningkatan jumlah spot *necrotic foci* yang terbentuk seiring dengan peningkatan ekstrimitas perlakuan. Penampang histologi *necrotic foci* pada preparat organ paru-paru akan ditunjukkan dalam gambar berikut.

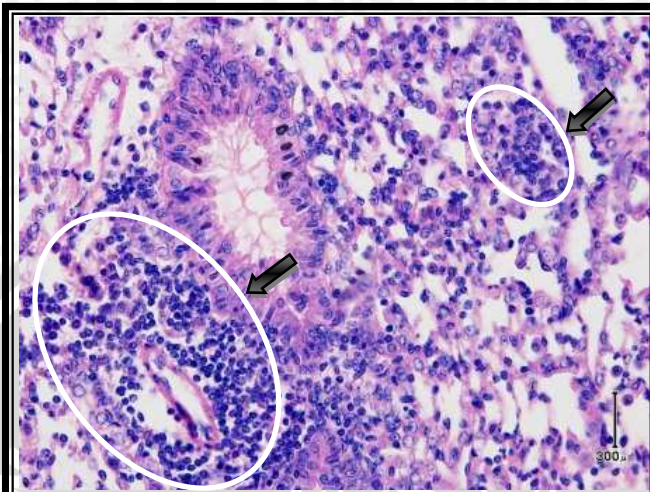


Gambar 4.8. Penampang histologi preparat organ paru-paru tanpa perlakuan dan paru-paru dengan perlakuan Formalin dan BaP. Terlihat pada gambar terdapat otot polos (1), lumen bronkiolus (2), pembuluh darah (3), alveolus (4). Pada paru-paru normal, tidak terdapat *necrotic foci*, sedangkan pada paru-paru yang mengalami kerusakan terdapat adanya *necrotic foci* (→) (HE, 400x skala 300 μm).

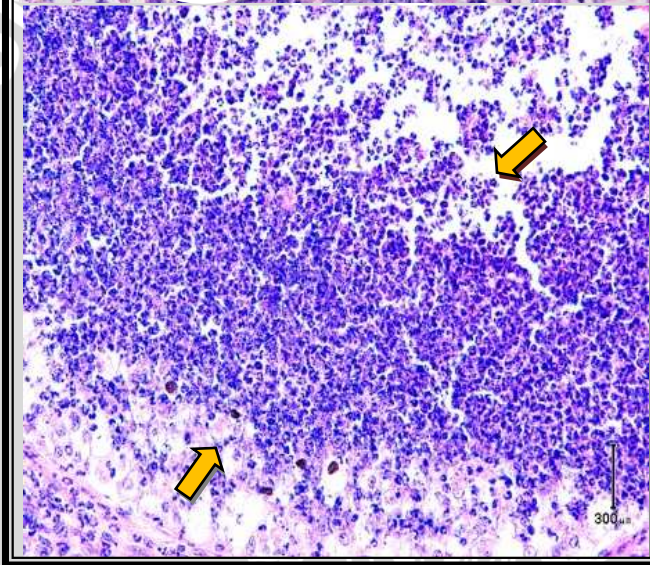


Gambar 4.9. *Necrotic foci* yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan Kontrol tanpa perlakuan (K(-)), dan Benzo(α)pyrene 250 mg/kg BB (BaP). *Necrotic foci* ditunjukkan oleh tanda panah hitam (➡) dan lingkaran putih. (HE, 400x skala 300 μ m).

F25

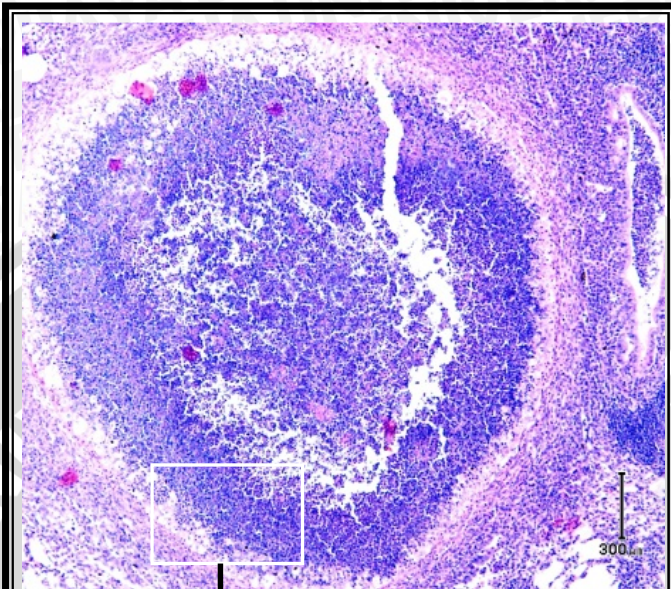


F25B

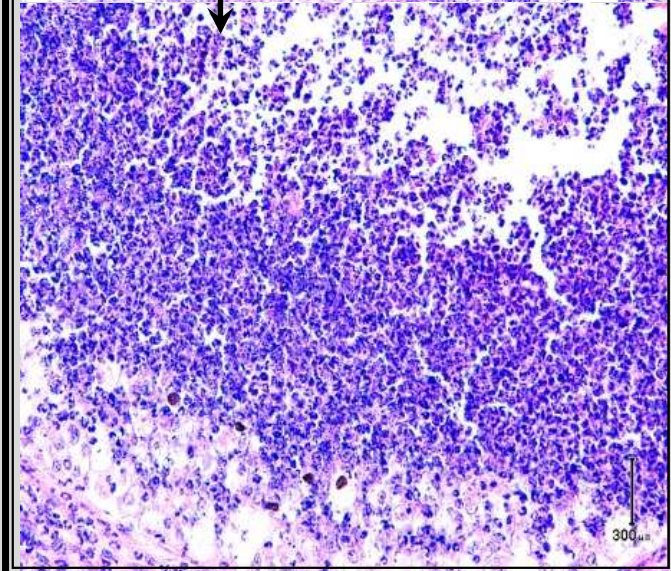


Gambar 4.10. *Necrotic foci* yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan formalin 25 mg/kg BB (F25), sedangkan pada perlakuan gabungan formalin 25 mg/kg BB dengan BaP (F25B) terbentuk *intrapulmonary necrobiotic nodule* (→). *Necrotic foci* ditunjukkan oleh tanda panah hitam (→) dan lingkaran putih. (HE, 400x skala 300 μ m).

F25B



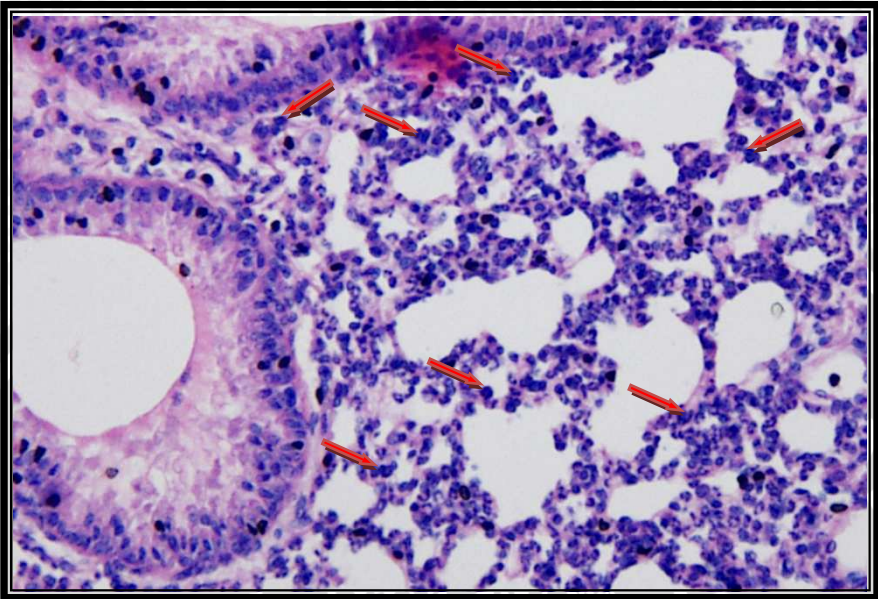
F25Bi




Gambar 4.11. *Intrapulmonary necrobiotic nodule* yang terbentuk pada organ paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP. HE, 100x (F25B), dan insert pada perbesaran 400x skala 300 μm (F25Bi).

Berdasarkan pada pengamatan penampang histologi yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa tidak terjadi kerusakan yang parah baik di bronchiolus maupun alveolus pada perlakuan kontrol tanpa perlakuan. Sebaliknya, distribusi *necrotic foci* mulai terbentuk pada perlakuan BaP 250 mg/kg BB (Gambar 4.9), Formalin 25 mg/kg BB, dan pada perlakuan gabungan formalin dan BaP. *Necrotic foci* yang terbentuk pada perlakuan BaP berada di sekitar respiratory epithelium bronchiolus, namun *necrotic foci* yang terbentuk tersebut tidak mempengaruhi sel-sel di sekitarnya yaitu sel-sel alveolus. Pada perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB terjadi pula pembentukan *necrotic foci* pada respiratory epithelium bronchiolus dan juga di sekitar pembuluh darah dengan distribusi yang cukup banyak. Namun, *necrotic foci* yang terbentuk akibat perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB juga mempengaruhi kerusakan sel-sel di sekitarnya, hanya saja dalam rentang yang dekat dengan posisi dari *necrotic foci* yang terbentuk. Sel-sel yang letaknya relatif jauh dari posisi terbentuknya *necrotic foci* akibat perlakuan formalin 25 mg/kg BB tidak mengalami kerusakan sel. Perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP mengakibatkan terjadinya kerusakan yang sangat parah pada organ paru-paru. Peristiwa yang terjadi pada preparat paru-paru hasil perlakuan gabungan ini dinamakan *Intrapulmonary Necrobiotic Nodule*.

Necrotic foci yang terbentuk pada perlakuan gabungan memiliki jumlah yang sangat banyak dan dapat dikatakan bahwa terjadi proses inflamasi secara merata. Hal ini ditunjukkan dengan rusaknya sebagian besar sel, tidak hanya pada sel-sel yang berada di sekitar bronchiolus dan pembuluh darah saja namun juga pada sel-sel alveolus. Dikatakan mengalami inflamasi karena pada pengamatan yang telah dilakukan ditemukan terjadinya infiltrasi sel-sel limfosit yang berada di sebagian besar preparat paru-paru hasil dari perlakuan gabungan ini. Berikut adalah gambar adanya infiltrasi sel-sel limfosit yang terjadi pada preparat paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg/kg BB.



Gambar 4.12. Infiltrasi sel-sel limfoid pada organ paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin dosis 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg ( (HE, 400x skala 300 μ m).

Pengamatan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terjadi infiltrasi sel-sel limfosit pada preparat paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP terjadi di seluruh bagian, baik di sekitar bronchiolus maupun pada alveolus (Gambar 4.12). Adanya infiltrasi sel-sel limfosit tersebut ditandai dengan terjadinya penebalan pada bagian alveolus. Setelah dilakukan pengamatan, bagian yang mengalami penebalan tersebut tidak hanya terdiri dari sel-sel alveolus yang berbentuk pipih, namun juga terdapat sel-sel limfosit yang memiliki inti bulat sempurna sehingga bagian tersebut terlihat menebal. Adanya infiltrasi dari sel-sel limfosit tersebut menandakan bahwa pada perlakuan gabungan ini telah menyebabkan terjadinya proses inflamasi sebagai respon terhadap zat-zat toksik yang masuk, yaitu seperti pada perlakuan yang telah diberikan.

4.2. Pembahasan

Nekrosis merupakan proses kematian sel yang terjadi akibat adanya paparan zat toksik dalam dosis yang tinggi dan terjadi secara tiba-tiba. Menurut Edinger dan Thompson (2004), nekrosis merupakan hasil akhir dari katastrofis bioenergi yang disebabkan karena adanya deplesi ATP sampai pada level yang tidak memungkinkan sel untuk melakukan perbaikan diri atau melakukan apoptosis. Penyebab dari deplesi ATP itu sendiri disebabkan karena adanya zat toksik yang masuk atau adanya kerusakan secara fisik. Nekrosis dapat dikarakterisasi secara morfologi, yaitu dengan adanya vakuolasi pada sitoplasma, pecahnya plasma membran dan menginduksi adanya inflamasi di sekitar sel yang mengalami nekrosis tersebut dengan cara mengeluarkan debris sel yang mengalami nekrosis serta beberapa molekul proinflammatory. Selanjutnya, kumpulan debris sel dan adanya infiltrasi sel-sel limfoid akan membentuk *necrotic foci*. Hasil pengamatan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *necrotic foci* yang terbentuk sebagian besar terdapat di sekitar pembuluh darah, yaitu pada hepatosit yang terletak di sekitar vena sentralis. *Necrotic foci* terbentuk karena adanya sel yang mengalami lisis, sehingga lisosom dari sel yang telah mengalami lisis tersebut akan mencerna sel yang ada di sekitarnya. Proses ini selanjutnya akan menghasilkan debris sel, sehingga menginisiasi infiltrasi dari sel fagosit.

Hasil pengamatan pada organ hepar menunjukkan bahwa pada setiap perlakuan ditemukan adanya sel yang mengalami nekrosis, namun dalam persentase yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan karena nekrosis juga merupakan salah satu fenomena yang terjadi pada setiap organisme apabila mengalami suatu infeksi, namun dalam jumlah yang sangat sedikit (Edinger dan Thompson, 2004), seperti halnya pada perlakuan kontrol. Beberapa tipe nekrosis yang dapat ditemukan pada preparat organ hepar yaitu piknosis, karioreksis, dan kariolisis dengan distribusi yang berbeda-beda pada setiap perlakuan. Namun, pada preparat paru-paru tidak dilakukan pengamatan terhadap sel yang mengalami nekrosis dikarenakan antara sel pneumosit normal dan sel

pneumosit yang mengalami nekrosis tidak bisa dibedakan secara jelas. Semakin ekstrimnya suatu zat toksik yang masuk ke dalam tubuh maka akan menyebabkan terjadinya kerusakan sel dalam jumlah sangat banyak dan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan fungsi organ. Dalam penelitian ini, salah satu perlakuan ekstrim tersebut yaitu dengan menggunakan formalin dosis 25 mg/kg BB dan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg/kg BB. Hal ini terlihat dari tingginya persentase sel yang mengalami nekrosis pada kedua perlakuan tersebut dan tingginya rerata spot *necrotic foci* yang terbentuk pada preparat organ hepar dan paru hewan coba akibat perlakuan tersebut.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Maghfironi (2010), juga menunjukkan hasil bahwa terdapat peningkatan ekspresi dari protein PARP-1 seiring dengan peningkatan dosis perlakuan BaP dan formalin yang diberikan pada organ hepar dan paru mencit. Berdasarkan fragmen protein PARP tersebut, terdapat indikasi bahwa terjadi peristiwa nekrosis sel, baik pada organ hepar maupun paru-paru mencit. Menurut Erik *et al.* (2007), kerusakan DNA dalam level awal tidak akan memicu terjadinya apoptosis maupun nekrosis dikarenakan adanya protein PARP-1 yang bertanggung jawab dalam proses perbaikan DNA. Kerusakan DNA pada level sedang akan menginisiasi sel untuk melakukan apoptosis dikarenakan sel tidak mampu memperbaiki kerusakan DNA yang terjadi, namun sel dalam hal ini masih memiliki ATP dalam jumlah yang cukup untuk melakukan apoptosis. Namun, kerusakan DNA pada level tinggi akan menginisiasi sel untuk mengalami nekrosis dikarenakan adanya overekspresi dari PARP-1 sehingga terjadi deplesi ATP. Hal ini mengakibatkan sel tidak mempunyai ATP dalam jumlah yang cukup untuk melakukan apoptosis, sehingga sel akan mengarah pada terjadinya nekrosis.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa antara perlakuan kontrol dan BaP berbeda nyata yang berarti bahwa BaP memiliki efek toksik terhadap hewan coba walaupun tidak sebesar efek toksik yang ditimbulkan oleh perlakuan formalin 25 mg/kg BB dan perlakuan

gabungan, namun hal ini tidak berarti bahwa BaP tidak memiliki efek yang ringan terhadap tubuh jika tubuh terpapar dengan zat ini. Dalam penelitian ini terdapat beberapa sebab mengapa perlakuan BaP mempunyai efek yang tidak lebih toksik daripada formalin. Penyebab itu antara lain bahwa letal dosis (LD50) formalin lebih rendah daripada BaP, dimana menggambarkan bahwa formalin lebih toksik daripada BaP. Menurut MSDS yang didapatkan, LD50 formalin peroral yaitu 42 mg/kg BB, sedangkan LD50 BaP intraperitoneal yaitu 232 mg/kg BB. Selain itu, efek yang ditimbulkan oleh perlakuan formalin akan terjadi lebih cepat jika dibandingkan dengan perlakuan BaP. Perlakuan dengan formalin pada hewan coba akan mengakibatkan toksisitas akut pada rentang waktu 4 jam setelah perlakuan. Menurut Lewinska *et. al.* (2007), perlakuan dengan BaP akan menginduksi peningkatan micronucleus (MN) secara signifikan pada rentang waktu 48 jam setelah perlakuan. Penyebab lainnya yaitu dalam penelitian ini, perlakuan dengan formalin diberikan setiap hari selama masa perlakuan, sedangkan perlakuan dengan BaP hanya diberikan selama 4 kali pada minggu awal perlakuan, dan 4 kali di minggu akhir perlakuan.

Penelitian yang dilakukan Maghfironi (2010), menunjukkan bahwa pada organ hepar dan paru-paru mencit, baik perlakuan formalin 25 mg/kg BB, BaP 250 mg/kg BB, maupun perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP mengalami peningkatan sintesis PARP seiring dengan meningkatnya ekstrimitas perlakuan, dan diiringi dengan peningkatan apoptosis yang terjadi. Namun, berbeda dengan yang terjadi pada perlakuan gabungan, peningkatan nilai apoptosis yang terjadi tidak sebanding dengan peningkatan sintesis protein PARP 116 kDa. Hal ini mengindikasikan bahwa pada perlakuan gabungan ini mengindikasikan terjadi nekrosis. Hal ini sesuai dengan hasil yang telah diperoleh dalam penelitian ini. Pada penelitian ini, perlakuan gabungan memiliki tingkat toksisitas yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini terlihat dari distribusi *necrotic foci* yang terbentuk baik pada organ hepar maupun paru-paru hewan coba. Bahkan, dalam preparat organ paru-paru diindikasikan terjadinya reaksi

inflamasi dan ditemukan pula terbentuknya *intrapulmonary necrobiotic nodule*.

Intrapulmonary Necrobiotic Nodule merupakan suatu keadaan yang terjadi pada organ paru-paru yang mengalami kerusakan akibat dedahan bahan-bahan karsinogenik. *Intrapulmonary Necrobiotic Nodule* ini ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel eusinophil dan juga terdapatnya sel-sel yang telah mengalami lisis akibat kerusakan yang sangat parah terhadap sel paru-paru.

Persentase sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar terbanyak yaitu pada perlakuan formalin dosis 25 mg/kg BB, namun rerata *necrotic foci* yang tertinggi terdapat pada perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP baik pada preparat organ hepar maupun paru-paru, bahkan pada preparat organ paru-paru perlakuan ini menyebabkan terbentuknya *intrapulmonary necrobiotic nodule*. Hal ini menandakan bahwa kedua perlakuan ini mengakibatkan terjadinya kerusakan yang sangat parah terhadap organ hepar dan paru-paru tersebut, namun perlakuan gabungan formalin dan BaP yang menyebabkan kerusakan terparah. Hal ini terlihat dari terbentuknya *necrotic foci* baik pada organ hepar dan paru-paru dengan distribusi yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya, bahkan pada preparat paru-paru mengindikasikan terjadinya inflamasi secara merata.

Fazeli *et. al.* (2006), mengemukakan bahwa tingginya ekspose formaldehida terhadap organ hepar dapat menyebabkan terjadinya infiltrasi sel-sel limfoid di sekitar ruang antar sel, dan juga terjadinya dilatasi pada arteri. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Serpi (2003), BaP dapat meningkatkan akumulasi dari protein p53. Meningkatnya akumulasi protein p53 diasosiasikan dengan meningkatnya jumlah ikatan antara BPDE-DNA, dimana ikatan ini dapat menyebabkan terputusnya ikatan rantai tunggal DNA. Putusnya ikatan rantai tunggal DNA dapat mengaktifasi PARP-1 untuk melakukan perbaikan DNA. Selanjutnya, tingginya dosis perlakuan BaP pada penelitian ini dapat meningkatkan overekspresi dari protein PARP itu sendiri, sehingga dapat mengarahkan sel untuk mengalami

nekrosis. Hal ini lah yang menyebabkan perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg/kg BB memiliki efek yang lebih parah dibandingkan dengan perlakuan lainnya, meskipun persentase sel yang mengalami nekrosis tertinggi terdapat pada perlakuan formalin 25 mg/kg BB. Tingkat keparahan pada perlakuan gabungan itu sendiri dilihat berdasarkan *necrotic foci* yang terbentuk, karena *necrotic foci* merupakan efek lanjutan dari terjadinya nekrosis sel yang terjadi.

Sel yang mengalami nekrosis dan *necrotic foci* ditemukan pula pada organ hepar tanpa perlakuan. Hal ini dikarenakan nekrosis merupakan fenomena yang terjadi pada setiap makhluk hidup, namun persentasenya sangat kecil sehingga tidak mengganggu metabolisme di dalam tubuh itu sendiri. Namun pada preparat organ paru-paru tanpa perlakuan, tidak ditemukan adanya sel yang mengalami nekrosis dan juga *necrotic foci*. Hal ini sangat berkaitan dengan metabolisme yang terjadi pada masing-masing organ. Seperti diketahui, hepar merupakan organ tempat detoksifikasi zat-zat racun yang masuk ke dalam tubuh, sehingga dimungkinkan pada organ ini ditemukan pula sel hepatosit yang mengalami nekrosis walaupun tidak diperlakukan dengan perlakuan zat toksik. Sementara itu, paru-paru merupakan organ tempat terjadinya respirasi sehingga pada keadaan normal dimungkinkan tidak ditemukan adanya sel yang mengalami nekrosis baik pada respiratory epithelium maupun pada sel-sel alveolus.

Pengamatan preparat organ paru-paru, terutama hasil perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP mengindikasikan adanya inflamasi yang terjadi. Proses inflamasi merupakan sebuah respon tubuh terhadap kerusakan seluler. Tanpa adanya proses inflamasi, maka sel-sel tubuh yang mengalami gangguan tidak akan mampu bertahan. Inflamasi itu sendiri menggambarkan adanya respon perlindungan yang didesain untuk mencegah terjadinya kerusakan sel yang lebih parah. Kerusakan sel itu sendiri dapat terjadi akibat adanya trauma, kerusakan DNA, adanya agen kimia dan fisika, terjadinya

nekrosis itu sendiri, reaksi imun, dan karena adanya infeksi (Gurenlian, 2006).

Respon inflamasi terdiri dari reaksi vaskular dan seluler. Reaksi ini dimediasi oleh faktor kimia yang berasal dari protein plasma atau sel. Tanda-tanda adanya inflamasi yaitu organ berwarna kemerahan, panas, bengkak, terasa sakit dan bahkan kehilangan fungsinya. Tanda-tanda lain adanya inflamasi yaitu demam, leukositosis atau adanya peningkatan sirkulasi sel darah putih. Terdapat dua macam inflamasi, yaitu inflamasi akut dan inflamasi kronis. Inflamasi akut memiliki karakteristik yaitu berlangsung cepat dan memiliki durasi yang singkat. Hal ini menyebabkan adanya eksudasi cairan dan protein plasma, serta migrasi leukosit, terutama neutrofil. Inflamasi kronis memiliki durasi yang lama dan menyebabkan adanya infiltrasi sel-sel limfosit dan makrofag, serta dapat menyebabkan terjadinya fibrosis dan dan terbentuknya *necrotic foci* (Gurenlian, 2006).

Berdasarkan hasil pengamatan secara histologi pada preparat organ paru-paru hasil perlakuan gabungan antara formalin 25mg/kg BB dengan BaP, mengindikasikan terjadinya suatu fenomena yang dinamakan dengan *pneumonitis*. Menurut Takemura *et. al.* (2008), *pneumonitis* merupakan gejala kerusakan pada paru-paru yang disebabkan karena adanya paparan antigen yang bersifat toksik bagi tubuh. Kerusakan yang terjadi dapat berupa infiltrasi sel limfoid, bronchiolitis dan fibrosis. Pada preparat yang telah diamati, didapatkan adanya infiltrasi sel-sel limfoid, yaitu sel-sel limfosit dan mengakibatkan adanya inflamasi yang ditandai dengan penebalan pada bagian alveolus yang dinamakan lymphocytic alveolitis, dan juga menyebabkan adanya infiltrasi dari sel-sel limfoid di sekitar membran bronchiolus.

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang telah dilakukan yaitu pada setiap perlakuan ditemukan adanya sel yang mengalami nekrosis, namun dengan persentase yang berbeda-beda. Secara umum, persentase sel yang mengalami nekrosis semakin meningkat seiring dengan peningkatan ekstrimitas perlakuan. Persentase nekrosis yang tertinggi terlihat pada perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg/kg BB, sedangkan rerata *necrotic foci* yang tertinggi terbentuk pada perlakuan gabungan antara formalin 25 mg/kg BB dengan BaP 250 mg/kg BB. Hal ini menandakan bahwa perlakuan gabungan mempunyai efek toksisitas lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini juga terlihat dari distribusi *necrotic foci* yang terbentuk baik pada preparat organ hepar dan paru-paru hewan coba, serta adanya indikasi reaksi inflamasi pada preparat organ paru-paru.

5.2. Saran

Saran yang dapat penulis ajukan untuk penelitian selanjutnya yaitu agar pembuatan preparat dilakukan secara bertahap, yaitu setiap awal, pertengahan dan akhir perlakuan agar data yang didapatkan lebih mencerminkan adanya fase-fase kerusakan sel yang terjadi selama dilakukannya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous¹. 1999. Toxicological Profile for Formaldehyde. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. USA.
- Anonymous². 2011. Formaldehyde. <http://www.crios.be/Formaldehyde/metabolism%20formaldehyde.gif>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2011.
- Anonymous³. 2011. <http://www.anr.state.vt.us/air/formaldehyde.htm>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2011.
- Anonymous⁴. 2011. Karyorehexis. <http://www.enotes.com/topic/Karyorrhexis>. Diakses pada tanggal 25 Mei 2011.
- Anonymous⁵. 2011. Study of poly(ADP-ribose) polymerase 1. <http://www.uts.cc.utexas.edu>. Diakses pada tanggal 25 Mei 2011.
- Aygiün S. F., and Kabadayi F. 2005. Determination of benzo[a]pyrene in charcoal grilled meat samples by HPLC with fluorescence detection. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56(8):581-5
- Burdick, A. D., J. W. Davis II, K. J. Liu, L. G. Hudson, H. Shi, M. L. Monske, and S. W. Burchiel. 2003. Benzo(a)pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research*. 63: 7825–7833.
- Chaitanya, G. V., J. S. Alexander, and P. P. Babu. 2010. PARP-1 Cleavage Fragments: Signatures of Cell-Death Proteases in Neurodegeneration. *Biomed Central*. 8(31): 1-11.
- Cormack, D. H. 1994. HAM Histologi Edisi 9. Penerbit Binarupa Aksara. Jakarta.
- Cruchten, S. Van., and W.V an den Broeck. 2001. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat.Histol.Embryol.* (31): 214–223
- Dail, D. H., and Samuel P. Hammar. 2008. Dail and Hammar's Pulmonary Pathology Volume I: Nonneoplastic Lung Disease 3rd Edition. Springer Science+Business Media, LLC. New York.
- Edinger, A. L., and C. B. Thompson. 2004. Death by Design : Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 16: 663-669.

- Epa. 1989. Mouse Oral Subchronic Toxicity of Pyrene. Study conducted by Toxicity Research Laboratories, Muskegon. MI for the Office of Solid Waste. Washington, DC.
- Epa. 2007. Benzo(α)pyrene. <http://www.epa.gov/teach/>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2011.
- Epa. 2010. Formaldehida. <http://www.epa.gov/iris/>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2011.
- Erdelyi, K., E. Bakondi, P. Gergely, C. Szabo, and L. Virag. 2005. Poly-ADP-ribosylation in Health and Disease Pathophysiologic Role of Oxidative Stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 Activation: Focus on Cell Death and Transcriptional Regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(7-8): Abstrak
- Erik A. Bey, Melissa S. Bentle, Kathryn E. Reinicke, Ying Dong, Chin-Rang Yang, Luc Girard, John D. Minna, William G. Bornmann, Jinming Gao, and David A. Boothman. 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. *National Academy of Sciences of USA*. 28(104) : 1-6
- Fazeli, S. A., A. Davarian, R. Azarhoush, and M. J. Golalipour. 2006. Histopatologic Changes of Rat Liver Following Formaldeyde Exposure. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9 (11) : 2137-2140
- Fenech, M., J. Crott, J. Turner, and S. Brown. 1999. Necrosis, Apoptosis, Cytostasis and DNA Damage in Human Lymphocytes Measured Simultaneously within the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay: Description of the Method and Result for Hydrogen Peroxide. *Mutagenesis*. 6(14): 605-612.
- Filipovic, D. M., X. Meng, and W. B. Reeves. 1999. Inhibition of PARP Prevents Oxidant-induced Necrosis but not Apoptosis in LLC-PK1 Cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 277 : 438-476
- Gobeil, S., C. C. Boucher, D. Nadeau, and G. G. Poirier. Characterization of the Necrotic Cleavage of Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-1): Implication of Lysosomal Proteases. *Nature*. 8: 588-594
- Golalipour, M. J., R. Azarhoush, S. Ghafari, A. M. Gharravi, S. A. Fazeli, and A. Davarian. 2007. Formaldehyde exposure induces

- histopathological and morphometric changes in the rat testis. *Folia Morphol.* 66 (3) : 167-171
- Gurenlian, J. R. 2006. Inflammation: The Relationship Between Oral Health and Systemic Disease. *Special Supplementas Issue*. Access : 1-2.
- He, L. F., and J. G. Chen. 2006. DNA Damage, Apoptosis and Cell Cycle Changes Induced by Fluoride in Rat Oral Mucosal Cells and Hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology*. 12(7) : 1144-1148.
- IARC. 1995. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans vol 92. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92-9.pdf>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2011.
- Imron, A. T. A. 2010. Studi Paparan Formalin terhadap Struktur Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*) BALB/c. Skripsi Tidak Diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.
- Junqueira, L., C. J. Carneiro, and R.O. Kelley. 2005. Histologi Dasar. Edisi Kesepuluh. Alih Bahasa J. Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kiernan, J. A. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde : What they are and what they do. <http://www.publish.uwo.ca/jkiernan/index.htm>. Diakses pada tanggal 24 Maret 2012.
- Kim, S. Y., D. A. Weinstein, M. F. Starost, B. C. Mansfield, and J. Y. Chou. 2009. *Necrotic foci*, Elevated Chemokines and Infiltrating Neutrophils in the Liver of Glycogen Storage Disease Typa Ia. *J Hepatol*.48(3): 479-485.
- Kradin, R. L. 2010. Diagnostic Pathology of Infectious Disease. Elsevier Inc. Philadelphia.
- Lewinska, D., J. Arkusz, M. Stanczyk, J. Palus, E. Dziubaltowska, and M. Stepnik. 2007. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a)pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. Abstrak.
- Liu, H., J. R. Knabb, B. T. Spike, and K. F. Macleod. 2009. Elevated Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity Sensitizes Retinoblastoma-Deficient Cells to DNA Damage-Induced Necrosis. *Mol Cancer Res* : 1099-1109.
- Maghfironi, A. 2010. Studi Ekspresi Protein PARP-1 pada Organ Hepar dan Paru Mencit yang Dipapar Formalin dan Benzopiren.

- Skripsi tidak diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang
- Marieb, E. H., 2004, *Human Anatomy and Physiology*, Pearson Education Inc, San Francisco.
- Miyoshi, N., H. Oubrahim, P. B. Chock, and E. R. Stadtman. 2006. Age-Dependent Cell Death and the Role of ATP in Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis and Necrosis. *PNAS*. 103(6) : 1727-1731.
- Moubarak, R. S., V. J. Yuste, C. D. Artus, A. D. Bouharrour, P. A. Greer, J. M. Murcia, and S. A. Susin. 2007. Sequential Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1, Calpains, and Bax Is Essential in Apoptosis-Inducing Factor-Mediated Programmed Necrosis. *Journal Molecular and Cellular Biology*. 13(27): 4844-4862.
- Nanji, A. A., and S. H. Sturmhofel. Apoptosis and Necrosis: Two Types of Cell Death in Alcoholic Liver Disease. 21(4): 325-331
- Paula, A.F., R. P. Machado, F. M. Lancas, and E. Carrilho. 2005. Solid-Phase purification of Deoxyguanosine-benzo(a)pyrene diol Epoxide Adducts from Genomic DNA Adduct Synthesis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.
- Pinuji, Henny M. 1999. Histopatologi Hepar dan Lien *Rattus norvegicus* Muda Pasca Induksi Benzapiren. Skripsi Tidak Diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.
- Priambowo, Anang. 2010. Studi Histopatologi Mukosa Lambung Mencit (*Mus musculus*) setelah Paparan Formalin Subkronik. Skripsi Tidak Diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.
- Putri, P. Finawati. 2010. Ekspresi mRNA Gen PARP-1 Hepar dan Paru Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar Formalin dan Benzo(a)pyrene. Skripsi tidak diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.
- Saito, Y., K. Nishio, Y. Yoshida, and E. Niki. 2005. Cytotoxic Effect Of Formaldehyde With Free Radicals Via Increment Of Cellular Reactive Oxygen Species. *Toxicology*. 210 : 235–245.
- Serpi, Raisa. 2003. Mechanism Of Benzo(A)Pyrene-Induced Accumulation Of P53 Tumour Suppressor Protein In Mouse. Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu. Oulu, Finland.

- Slomianka, L. 2006 Blue Histology Endocrin, Liver, Pancreas, and Nervous System. The University of Western Australia- School of Anatomy and Human Biology. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/> Tanggal akses 13 November 2011.
- Takemura, T., Takumi A., Yoshio O., Naohiko I., and Yasuyuki Y. 2008. Pathology of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* (14) : 440–454.
- Til, H.P., R.A. Woutersen, V.J. Feron, V.H.M. Hollanders, H.E. Falke and J.J. Clary. 1989. Two-year drinking water study of formaldehyde in rats. *Food Chem. Toxicol.* 27: 77-87.
- Volk D. E., Thiviyathan V, Rice J.S., Luxon B.A., Shah J.H., Yagi H., Sayer J.M., Yeh H. J., Jerina D.M., and Gorenstein D.G. 2003. Solution structure of a cis-opened (10R)-N6-deoxyadenosine adduct of (9S,10R)-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo [a]pyrene in a DNA duplex. *Biochemistry.* 42(6):1410-1420.
- Wang, Yi. 1997. Public Health Goal for Benzo(a)pyrene in Drinking Water. California Public Health Goal. California.
- Wang, Z.Q., L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff, and E. F. Wagner. 1997. PARP is Important for Genomic Stability but Dispensable in Apoptosis. *Genes and Development.* 11 : 2347-2358.
- Yatim, W. 1990. Biologi Modern Histologi. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Ye, Fei, and X. C. Xu. 2010. Benzo[a] pyrene diol epoxide suppresses retinoic acid receptor- β 2 expression by recruiting DNA (cytosine-5-) methyltransferase 3A. *Molecular Cancer.* 9 : 93.
- Yunus, Machmud. 1996. Pengaruh Induksi Benzapiren terhadap Histologi Hati dan Paru-Paru Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Skripsi Tidak Diterbitkan. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.

LAMPIRAN I
PERSENTASE SEL NEKROSIS PADA ORGAN HEPAR

Tabel L1.1. Rata-rata sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar

No	Perlakuan			
	K (-)	BaP	F25	F25B
1	15.07	22.15	50.22	50.69
2	13.78	26.34	46.40	51.05
3		29.64	51.51	53.85
4				
5				

Tabel L1.2. Persentase sel yang mengalami nekrosis pada organ hepar

Perlakuan	Sel Nekrosis (%)
Kontrol (-)	14.43 ± 0.91
BaP	26.05 ± 3.75
F25	49.38 ± 2.66
F25B	51.86 ± 1.73

LAMPIRAN II
NECROTIC FOCI PADA ORGAN HEPAR DAN PARU MENCIT

Tabel L2.1. Rerata Spot *Necrotic Foci* pada Preparat Organ Hepar

Perlakuan	Rerata NF
K (-)	$1.3 \pm 0,07$
BaP	$1.63 \pm 0,61$
F25	$2 \pm 0,51$
F25B	$3.4 \pm 0,76$

Tabel L2.2. Rerata Spot *Necrotic Foci* pada Preparat Organ Paru-paru

Perlakuan	Rerata NF
K (-)	$0 \pm 0,00$
BaP	$2.1 \pm 0,29$
F25	$3.3 \pm 0,25$
F25B	$5.6 \pm 0,72$

LAMPIRAN III

Analisis Data Statistik Nekrosis Sel pada Preparat Organ Hepar

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Nekrosis Hepar
N		11
Normal Parameters ^a	Mean	37.3364
	Std. Deviation	15.96742
Most Extreme Differences	Absolute	.260
	Positive	.151
	Negative	-.260
Kolmogorov-Smirnov Z		.863
Asymp. Sig. (2-tailed)		.445
a. Test distribution is Normal.		

Descriptives

Nekrosis
Hepar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	2	14.4250	.91217	.64500	6.2295	22.6205	13.78	15.07
BaP	3	26.0433	3.75380	2.16726	16.7184	35.3683	22.15	29.64
F25	3	49.3767	2.65734	1.53421	42.7755	55.9779	46.40	51.51

F25B	3	51.8633	1.72989	.99875	47.5660	56.1606	50.69	53.85
Total	11	37.3364	15.96742	4.81436	26.6093	48.0634	13.78	53.85

Test of Homogeneity of Variances

Nekrosis Hepar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.122	3	7	.403

ANOVA

Nekrosis Hepar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2500.464	3	833.488	118.774	.000
Within Groups	49.122	7	7.017		
Total	2549.586	10			

Multiple Comparisons

Nekrosis Hepar

Tukey HSD

(I)	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	BaP	-11.61833*	2.41824	.008	-19.6231	-3.6136
	F25	-34.95167*	2.41824	.000	-42.9564	-26.9469

	F25B	-37.43833*	2.41824	.000	-45.4431	-29.4336
BaP	Kontrol	11.61833*	2.41824	.008	3.6136	19.6231
	F25	-23.33333*	2.16294	.000	-30.4930	-16.1737
	F25B	-25.82000*	2.16294	.000	-32.9797	-18.6603
F25	Kontrol	34.95167*	2.41824	.000	26.9469	42.9564
	BaP	23.33333*	2.16294	.000	16.1737	30.4930
	F25B	-2.48667	2.16294	.674	-9.6463	4.6730
F25B	Kontrol	37.43833*	2.41824	.000	29.4336	45.4431
	BaP	25.82000*	2.16294	.000	18.6603	32.9797
	F25	2.48667	2.16294	.674	-4.6730	9.6463

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Nekrosis Hepar

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	2	14.4250		
BaP	3		26.0433	
F25	3			49.3767
F25B	3			51.8633
Sig.		1.000	1.000	.710

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

LAMPIRAN IV
Analisis Data Statistik Necrotic Foci pada Preparat Organ Hepar dan Paru-paru

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Hepar	Paru
N		28	26
Normal Parameters(a,b)	Mean	2.3079	3.4638
	Std. Deviation	.79362	1.68828
Most Extreme Differences	Absolute	.130	.155
	Positive	.088	.155
	Negative	-.130	-.147
Kolmogorov-Smirnov Z		.687	.793
Asymp. Sig. (2-tailed)		.732	.556

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hepar	Kontrol	2	1.3250	.10607	.07500	.3720	2.2780	1.25	1.40
	BaP	6	1.6283	.29923	.12216	1.3143	1.9424	1.24	2.00
	F25	10	2.0100	.51521	.16292	1.6414	2.3786	1.00	2.50
	F25B	10	3.2100	.21833	.06904	3.0538	3.3662	2.90	3.50
	Total	28	2.3079	.79362	.14998	2.0001	2.6156	1.00	3.50
Paru	Kontrol	2	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	BaP	6	2.1367	.29710	.12129	1.8249	2.4485	1.85	2.68
	F25	10	3.2920	.25086	.07933	3.1125	3.4715	2.82	3.62
	F25B	8	5.5400	.35972	.12718	5.2393	5.8407	5.14	6.21
	Total	26	3.4638	1.68828	.33110	2.7819	4.1458	.00	6.21

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hepar	2.080	3	24	.130
Paru	1.220	3	22	.326

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hepar	Between Groups	13.728	3	4.576	33.515	.000
	Within Groups	3.277	24	.137		
	Total	17.005	27			
Paru	Between Groups	69.344	3	23.115	265.754	.000
	Within Groups	1.913	22	.087		
	Total	71.257	25			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Hepar	Kontrol	BaP	-.3033	.30171	.748	-1.1356	.5290
		F25	-.6850	.28622	.105	-1.4746	.1046
		F25B	-1.8850(*)	.28622	.000	-2.6746	-1.0954
	BaP	Kontrol	.3033	.30171	.748	-.5290	1.1356
		F25	-.3817	.19082	.216	-.9081	.1447
		F25B	-1.5817(*)	.19082	.000	-2.1081	-1.0553
	F25	Kontrol	.6850	.28622	.105	-.1046	1.4746
		BaP	.3817	.19082	.216	-.1447	.9081
		F25B	-1.2000(*)	.16525	.000	-1.6559	-.7441
	F25B	Kontrol	1.8850(*)	.28622	.000	1.0954	2.6746
		BaP	1.5817(*)	.19082	.000	1.0553	2.1081
		F25	1.2000(*)	.16525	.000	.7441	1.6559
Paru	Kontrol	BaP	-2.1367(*)	.24080	.000	-2.8053	-1.4680

	F25	-3.2920(*)	.22844	.000	-3.9263	-2.6577
	F25B	-5.5400(*)	.23315	.000	-6.1874	-4.8926
BaP	Kontrol	2.1367(*)	.24080	.000	1.4680	2.8053
	F25	-1.1553(*)	.15230	.000	-1.5782	-.7324
F25	F25B	-3.4033(*)	.15927	.000	-3.8456	-2.9611
	Kontrol	3.2920(*)	.22844	.000	2.6577	3.9263
F25B	BaP	1.1553(*)	.15230	.000	.7324	1.5782
	F25B	-2.2480(*)	.13989	.000	-2.6365	-1.8595
	Kontrol	5.5400(*)	.23315	.000	4.8926	6.1874
	BaP	3.4033(*)	.15927	.000	2.9611	3.8456
	F25	2.2480(*)	.13989	.000	1.8595	2.6365

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

Hepar

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	2	1.3250		
BaP	6	1.6283	1.6283	
F25	10		2.0100	
F25B	10			3.2100
Sig.		.604	.414	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Paru

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Kontrol	2	.0000			
BaP	6		2.1367		
F25	10			3.2920	
F25B	8				5.5400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

LAMPIRAN V

Pembuatan Larutan Stok dan Perhitungan Dosis

a. Formalin

100 mg PFA dilarutkan dalam 50 ml aquades.

$$\text{Konsentrasi} = \frac{100 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 2 \text{ mg/ml}$$

Jumlah larutan stok yang diambil berdasarkan berat badan mencit yaitu:

Misal : BB mencit = 10 g

Dosis = 25 mg/kg BB = 0.025 mg/g BB, maka

$$\begin{aligned} \text{Formalin} &= \text{BB mencit} \times \text{Dosis} \\ &= 10 \text{ g} \times 0.025 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{BB} = 0.250 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V \text{ Larutan Stok} &= \text{Formalin} \div \text{Konsentrasi} \\ &= 0.250 \text{ mg} \div 2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \\ &= 0.125 \text{ ml} \end{aligned}$$

b. BaP

Serbuk benzo(α)pyrene (Sigma) sebanyak 0,025 gram dilarutkan dalam 100 μ l minyak jagung, kemudian dihangatkan pada suhu 37°C pada *water bath*. Injeksi dilakukan sebanyak 20 μ l pada masing-masing mencit.

LAMPIRAN VI
Rancangan Pengamatan

Tabel L6.1. Pengamatan Sel Nekrosis

No.	Perlakuan Dosis (Kg BB)	Organ	Nekrosis Sel (%)					Rata-rata (%)
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	
1	Formalin 25 mg/kg BB	Hepar						
2	Benzo(α) pyrene 250 mg/kg BB	Hepar						
3	Formalin 25 mg/KgBB dan benzo(α) pyrene 250 mg/kg BB	Hepar						

Keterangan: LP = Lapang Pandang

Tabel L6.2. Pengamatan *Necrotic Foci*

No	Perlakuan Dosis (Kg BB)	Organ	Jumlah Spot <i>Necrotic Foci</i>	Jumlah Lapang Pandang	Rata-Rata Spot <i>Necrotic Foci</i>
1	Formalin 25 mg/Kg BB	Hepar			
		Paru			
2	Benzo(α) pyrene 250 mg/KgBB	Hepar			
		Paru			
3	Formalin 25 mg/KgBB dan benzo(α) pyrene 250 mg/KgBB	Hepar			
		Paru			