PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)

SKRIPSI

Oleh:
KIRANA SITA PINASTHIKA
155130100111017

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

KIRANA SITA PINASTHIKA
155130100111017

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)

Oleh :

KIRANA SITA PINASTHIKA
155130100111017

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 7 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I	Pembimbing II
Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS	**drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed**
NIP. 19520412 198002 1 001	NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

repository.ub.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kirana Sita Pinasthika
NIM : 155130100111017
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi organ Hepar Pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 7 Mei 2019
Yang menyatakan,

Kirana Sita Pinasthika
NIM. 155130100111017

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi organ Hepar Pada Tikus (*Rattus novergicus*)

ABSTRAK

Klorin yang berasal dari $Ca(OCl)_2$ merupakan senyawa kimia yang bersifat korosif pada kadar tinggi dan pada kadar rendah umumnya digunakan sebagai penjernih air. Klorin sering digunakan pada proses klorinasi, dimana proses ini dilakukan untuk menghilangkan mikroorganisme yang ada pada air. Klorinasi air merupakan cara untuk desinfeksi agar aman dikonsumsi sebagai air minum. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar MDA dan gambaran histopatologi organ hepar pada tikus (*Rattus novergicus*). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan umur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram dibagi menjadi 5 kelompok dengan 4 ulangan, yaitu K- (kontrol negatif), P1, P2, P3, P4 merupakan kelompok yang diberi dosis 50 ppm /ekor, 100 ppm /ekor, 150 ppm /ekor, dan 200 ppm /ekor yang diberikan selama 7 hari dengan menggunakan sonde lambung. Kadar MDA setelah pemberiann klorin berlebih pada kontrol negatif 323,3±11,08 ng/mL, paparan 50 ppm (P1) 406,9±47,04 ng/mL, paparan 100 ppm (P2) 447,7±77,69 ng/mL, paparan 150 ppm (P3) 453,0±56,83 ng/mL, dan paparan 200 ppm (P4) 584,4±97,40 ng/mL. Analisa data menggunakan *One-Way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan *Tukey Test*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang diberikan klorin $Ca(OCl)_2$ terjadi peningkatan kadar MDA yang sangat nyata ($p<0,01$). Gambaran histopatologi hepar pewarnaan HE dianalisa secara deskriptif hepar menunjukkan perubahan adanya pelebaran sinusoid, infiltrasi sel radang, nekrosis, dan adanya kongesti sinusoid.

Kata kunci: Klorin, kadar MDA, histopatologi, hepar, kalsium hipoklorit.

Effect of Chlorine Overload on Level MDA and Liver Histopathology in White Rat *(Rattus norvegicus)*

ABSTRACT

Chlorine derived from Ca $(OCl)_2$ is a chemical compound that is corrosive at high levels and at low levels is generally used as a water purifier. Chlorine is often used in the chlorination process, where this process is carried out to remove microorganisms present in water. Water chlorination is a way to disinfect it to be safely consumed as drinking water. The purpose of this study was to determine the effect of excessive chlorine administration on MDA levels and histopathology of hepatic organs in rats (*Rattus novergicus*). This study used a completely randomized design with 20 male Wistar strains (*Rattus norvegicus*) aged 8-12 weeks with an average weight of 200 grams divided into 5 groups with 4 replications, namely K- (negative control), P1, P2, P3 , P4 is a group given a dose of 50 ppm / head, 100 ppm / head, 150 ppm / head, and 200 ppm / head which is given for 7 days using the gastric sonde. MDA levels after administration of excess chlorine in the negative control 323.3 ± 11.08 ng / mL, exposure to 50 ppm (P1) 406.9 ± 47.04 ng / mL, exposure to 100 ppm (P2) 447.7 ± 77.69 ng / mL, exposure to 150 ppm (P3) 453.0 ± 56.83 ng / mL, and exposure to 200 ppm (P4) 584.4 ± 97.40 ng / mL. Data were analyzed using One-Way ANOVA then continued with Tukey Test. The results of this study showed that mice given chlorine Ca $(OCl)_2$ had a very significant increase in MDA levels ($p < 0.01$). The liver histopathology description of HE staining was analyzed descriptively by hepatic showed changes in sinusoidal dilation, inflammatory cell infiltration, necrosis, and the presence of sinusoidal congestion.

Keywords: chlorine, MDA levels, histopathology, liver, calcium hypochlorite.

repository.ub.ac.id

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Organ Hepar pada Tikus (*Rattus Novergicus*)"**.** Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
2. Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS., selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed., selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
4. drh. Mira Fatmawati, M.Si. dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc. sebagai dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk perbaikan penulisan skripsi ini.
5. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

6. Keluarga besar penulis yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan moril dan materiil untuk menyesaikan studi penulis.
7. Tim penelitian klorin yang terdiri dari Dinda, Yohana, dan Anwar yang telah berjuang bersama-sama dalam menjalankan penelitian, serta memberikan dukungan terhadap penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Teman sejawat DNA dan seluruh kawan GEA yang memberikan semangat kepada penulis.
9. Seluruh kolega di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan semangat, inspirasi, dan mimpi-mimpi luar biasa.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Penulis berharap ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 7 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ii
LEMBAR PENGESAHAN iii
LEMBAR PERNYATAAN iv
ABSTRAK v
ABSTRACT vi
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR TABEL xi
DAFTAR GAMBAR xii
DAFTAR LAMPIRAN xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG xiv

BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 3
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Batasan Masalah 4
1.4 Tujuan 4
1.5 Manfaat Penelitian 5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Klorin ($Ca(OCl)_2$ 6
2.2 Bahaya Paparan Klorin 7
2.3 Mekanisme Toksisitas Klorin 7
2.4 Hepar 10
2.5 *Malondialdehid* (MDA) 14
2.6 Hubungan Kadar MDA dengan Pemberian Klorin 16
2.7 Tikus *(Rattus novergicus)* 17

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 19
3.1 Kerangka Teori 19
3.2 Kerangka Konsep 20
3.2 Hipotesis Penelitian 22

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN 23
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian 23
4.2 Populasi dan Sampel 23
4.3 Pembagian Kelompok Tikus 23
4.4 Aklimatisasi 24
4.5 Rancangan Penelitian 24
4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan 25

4.7 Variabel Penelitian 26
4.8 Alat dan Bahan 26
4.9 Prosedur Penelitian 27
4.9.1 Pemberian Klorin Berlebih 27
4.9.2 Pengambilan Organ Hepar 28
4.9.3 Pembuatan Preparat Histopatologi 29
4.9.4 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) 30
4.9.5 Pengamatan Histopatologi 31
4.9.6 Pembuatan Kurva Baku MDA 32
4.10 Analisis Data 32

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN 34
5.1 Kadar Malondialdehid (MDA) Organ Hepar pada Tikus (*Rattus novergicus*) Hasil Pemberian Klorin Berlebih 34
5.2 Efek Pemberian Klorin Berlebih $Ca(OCl)_2$ terhadap Gambaran Histopatologi Organ Hepar pada Tikus Putih 37
5.3 Hubungan Antara Kadar MDA Dengan Tingkat Kerusakan Organ Hepar Akibat Paparan Klorin Berlebih 39

BAB 6 PENUTUP 46
6.1 Kesimpulan 46
6.2 Saran 46

DAFTAR PUTAKA 46
LAMPIRAN 47

repository.ub.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

4.1 Rancangan Kelompok Penelitian 19
4.2 ANOVA (*Analysis of Variance*) 26
5.1. Analisa Statistik Kadar MDA 35
5.2 Rata-rata Kadar MDA Organ Hepar Tikus 35
5.3 Perhitungan Jumlah Sel Nekrosis pada Gambaran Histopatologi Organ Hepar Tikus 43

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

2.1 Histologi Hepar 10
2.2 Histopatologi Hepar 10
2.3 Tikus Putih 13
5.1 Gambaran Histopatologi 37

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Keterangan Laik Etik 47
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian 48
3. Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar 49
4. Perhitungan Senyawa Klorin $Ca(OCl)_2$ Granular 50
5. Pembuatan Kurva Standar MDA 51
6. Pengukuran Kadar MDA Hepar 52
7. Perhitungan Kadar MDA (Malondialdehida) 53
8. Uji Statistik Kadar MDA 56

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol / Singkatan	Keterangan
MDA	*Malondialdehid*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
HOCL	Asam Hipoklorit
HE	Hematoxylin Eosin
PUFA	*Poly Unsaturated Fatty Acid*
PPM	*Part Per Million*
BR 1	Broiler 1
RAL	Rancangan Acak Lengkap
PFA	*Paraformaldehyde*
PBS	*Phospat Buffer Saline*
ANOVA	*Analysis of variance*
BNJ	Beda Nyata Jujur
TBA	*thio barbituric acid*
$Ca(OCl)_2$	Kalsium Hipoklorit
NADPH	Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen
SOD	*Superoxide Dismutase*
OH	Radikal Hidroksil
H_2O_2	Hidrogen Peroksida
O_2^-	Superoksida

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Air merupakan senyawa kimia yang dibutuhkan oleh mahluk hidup. Fungsi utama air untuk mahluk hidup yaitu dikonsumsi sebagai air minum. (Setiawan, 2009). Air minum yang dikonsumsi oleh mahluk hidup seperti hewan peliharaan harus memenuhi standar yang layak untuk konsumsi. Layak untuk dikonsumsi yaitu air minum yang baik dan tidak menimbulkan penyakit. Air minum layak konsumsi memiliki standar kualitas. Secara fisik air minum harus bersih, jernih, tidak berwarna, tidak berbau, dan tidak berasa. Jernih dalam arti, air bebas atau sedikit sekali tercampur lumpur. Tidak berwarna artinya tidak mengandung bahan organik dan bahan kimia yang berbahaya bagi kesehatan. Tidak berbau artinya tidak terjadi pelapukan di dalam air oleh mikroorganisme, karena bau yang kadang tercium dalam air merupakan ciri terjadinya proses pelapukan bahan-bahan organik yang disebabkan oleh mikroorganisme dalam air (Joko, 2010).

Seluruh persediaan air perlu dilakukan proses desinfeksi. Hal ini bertujuan untuk membunuh bakteri penyebab penyakit yang ada sebelum didistribusikan. Saat ini, desinfektan yang sering digunakan yaitu klorin atau kalsium hipoklorit walaupun pilihan alternatif lainnya masih dalam penyelidikan serta seperti proses ozonisasi menjadi lebih umum (Schenck *et al.*, 2009).

Klorin sudah umum diketahui oleh masyarakat dengan sebutan klor atau kapur klor karena banyak digunakan sebagai bahan pemutih atau *bleaching*

agent yang mengandung kalsium hipoklorit dan dikenal dengan nama kaporit. Kaporit dipergunakan juga untuk campuran dalam detergen. Senyawa kaporit ini dapat digunakan sebagai desinfektan dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan lapisan mukosa. Beberapa peternak banyak menggunakan klor atau kapur klor sebagai desinfektan pada proses klorinasi dalam air, untuk mengatasi pencemaran kuman patogen dalam air minum (Wiryawan, 2003). Penggunaan klorin dalam air ini harus memperhatikan dosis maupun sistem klorinasi. Pada sistem klorinasi tertutup dapat memperlambat penguapan, sehingga klorin bekerja dengan efektif. Sebagai contoh pada sistem klorinasi ini kadang-kadang peternak tidak mengetahui keberadaan kandungan klorin dalam air minum, sehingga sering menyebabkan kegagalan dalam vaksinasi melalui air minum dan ternyata air minum yang digunakan masih mengandung klorin cukup tinggi yang dapat mengurangi keaktifan bahan biologik dalam vaksin (Yuningsih, 2005)

Klorin yang ada didalam kaporit atau kalsium hipoklorit $Ca(OCl)_2$ merupakan desinfektan yang umum digunakan karena efektif pada konsentrasi rendah, harga yang terjangkau, dan efektif digunakan pada dosis yang tepat. Penggunaan klorin berfungsi untuk membunuh bakteri dalam air pada proses desinfeksi air di dalam pipa. Kemampuan desinfeksi klorin yaitu berasal dari sifat senyawa tersebut sebagai oksidator yang kuat (Lestari dkk., 2008). Klorin akan mengoksidasi enzim pada mikroorganisme yang berfungsi sebagai proses metabolisme (Iji dkk., 2013).

Sebagai contoh dalam upaya untuk menyediakan air minum dan bebas kuman untuk hewan domestik dan penggunaan air dalam rumah tangga di negara-negara berkembang seperti Nigeria, penggunaan kalsium hipoklorit $Ca(OCl)_2$ sebagai disinfektan air terus meningkat. Kalsium hipoklorit diberikan secara berlebih tanpa ukuran yang tepat sehingga dapat menimbulkan efek toksikologis langsung pada hewan dan manusia, atau efek yang tidak langsung pada konsumen dalam produk hewani (Iji dkk., 2013). Sementara itu, $Ca(OCl)_2$ telah dilaporkan menyebabkan stres oksidatif meskipun perannya yang diinginkan dalam desinfeksi air (Semenza *et al*., 1998).

Klorin yang masuk ke dalam tubuh akan menyebabkan penumpukan konsentrasi klorin pada organ. Jika dalam jangka waktu yang lama klorin dapat menyebabkan gangguan pada organ, salah satunya akan mengganggu fungsi organ hepar. Hepar merupakan organ yang salah satu fungsinya untuk detoksifikasi. Namun, hepar memliki keterbatasan fungsi untuk detoksifikasi jika terjadi overdosis dari senyawa klorin yang dapat menyebabkan gangguan hepar (Rodriguez dan Serodes, 2001).

Klorin yang terdapat pada hepar akan meningkatkan ROS. ROS akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Albano, 2006). Kemudian peningkatan stres oksidatif akan menyebabkan peroksidasi lipid sehingga dengan adanya peroksidasi lipid yang meningkat dapat merusak sel hepar dan dapat mengganggu fungsi kerja dari hepar. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu malondialdehid (MDA),

yang merupakan suatu produk akhir dari peroksidasi lipid dan yang bersifat toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA pada hepar merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan hepar serta gangguan fungsi hepar (Setiawan, 2009).

Berdasarkan latar belakang diatas, perlu adanya penelitian tentang pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar MDA dan gambaran histopatologi organ hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

1.1 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar MDA pada organ hepar pada tikus (*Rattus novergicus*) ?
2. Bagaimana pengaruh pemberian pemberian klorin berlebih terhadap gambaran histopatologi organ hepar pada tikus (*Rattus novergicus*) ?

1.2 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan dengan umur 8 – 10 minggu dan berat badan 150 – 200 g.

2. Air berklorin yang diberikan dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm sekali setiap hari selama 7 hari.
3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehid (MDA) hepar yang diukur dengan spektrofotometer dan gambaran histopatologi hepar dengan pewarnaan HE.

1.1 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar MDA pada organ hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*).
2. Mengetahui pengaruh pemberian pemberian klorin berlebih terhadap gambaran histopatologi organ hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

1.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi kepada masyarakat dan dapat digunakan sebagai sumber literatur bagi penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian klorin berlebih pada tikus (*Rattus novergicus*).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klorin $Ca(OCl)_2$

Klor atau klorin adalah unsur kimia dengan nomor atom 17 dan simbol Cl. Klorin termasuk dalam golongan halogen. Klorin adalah bahan kimia yang umumnya digunakan sebagai pembunuh mikroorganisme. Klorin dalam suhu kamar berbentuk gas dan merupakan unsur golongan halogen yang sangat reaktif dan sebagai oksidator kuat yang mudah bereaksi dengan berbagai unsur. Pada suhu -34 °C klorin berbentuk cair dan pada suhu -103 °C berbentuk padatan kristal kekuningan. Klorin sekarang bukan hanya digunakan untuk bahan pakaian dan kertas saja, tetapi telah digunakan sebagai bahan desinfeksi pada air (Hasan, 2006).

Klorin sudah umum digunakan dengan sebutan klor atau kapur klor karena banyak digunakan sebagai bahan pemutih *bleaching agent* yang mengandung sodium hipoklorit atau kalsium hipoklorit dan dikenal sebagai kaporit. Kaporit dipergunakan juga untuk campuran dalam detergen. Senyawa kaporit ini menghasilkan gas klorin yang cukup beracun, sehingga dapat dipergunakan sebagai desinfektan dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan lapisan mukosa (Permana, 2010). Senyawa klor atau klorin yang berfungsi sebagai biosida pengoksidasi dapat berasal dari gas Cl_2 atau dari garam-garam NaOCl dan $Ca(OCl)_2$ atau kaporit. Kaporit atau kalsium hipoklorit merupakan senyawa kimia yang bersifat korosif pada kadar tinggi dan pada kadar rendah umumnya digunakan sebagai penjernih air (Lestari dkk., 2008).

2.2 Bahaya Paparan Klorin

Klorin memiliki sifat sebagai oksidator yang kuat sehingga umum digunakan untuk desinfeksi air. Sifat oksidator tersebut dapat membunuh mikroorganisme yang ada di air seperti bakteri, fungi, spora, dan virus. Namun, jika klorin masuk ke dalam tubuh dengan kadar yang tidak dapat ditoleran oleh tubuh maka dapat terjadi toksisitas pada organ (Sinuhaji, 2009). Efek dari konsumsi air minum yang berklorin dapat menyebabkan kanker hati, rektum dan kolon. Serta dapat menghancurkan protein di dalam tubuh yang menyebabkan efek buruk pada kulit dan rambut (Smith, 2008).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan hewan coba burung yang diberi air minum dengan klorin dapat menyebabkan aterosklerosis (Smith, 2008). Selain itu kalsium hipoklorit mampu menyebabkan kerusakan hepar dikarenakan meningkatnya stress oksidatif pada penelitian yang sebelumnya telah dilakukan (Iji, 2013).

2.3 Mekanisme Toksisitas Klroin

Mekanisme toksisitas klorin berawal dari masuknya air yang mengandung klorin yang berasal dari kaporit atau kalsium hipoklorit $Ca(OCl)_2$ yang melalui oral tikus. Ketika kalsium hipoklorit ada di dalam air, kalsium hipoklorit akan menjadi kaslsium hidroksida $Ca(OH)_2$ dan asam hipoklorit HOCl yang bersifat iritatif dan korosif (Regulated EU, 2009). Reaksi sebagai berikut:

$$Ca(OCl)_2 + 2\ H_2O = 2\ HOCl + Ca(OH)_2$$

Senyawa tersebut akan masuk kedalam saluran pencernaan dan diserap oleh pembuluh darah. Kemudian didistribusikan ke seluruh jaringan hingga masuk ke dalam sel hepar.Asam hipoklorit mengandung konsentrasi klorin yang tinggi dan merupakan bahan pembasmi yang terbukti mampu mengendalikan mikroorganisme patogen seperti bakteri, jamur dan fungi yang biasa ditemukan di sumber air (Lombardi *et al*., 2008).

Mekanisme peroksidasi lipid oleh asam hipoklorit diinisiasi melalui asam hipoklorit yang berasal dari kalsium hipoklorit dimetabolisme di dalam hepar dengan bantuan O_2 dan NADPH menjadi radikal superoksida. Radikal superoksida ini kemudian dikatalisis oleh enzim endogen yaitu SOD menjadi hidrogen perosksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida mengalami reaksi fenton yang kemudian menjadi radikal hidroksil (•OH) yang reaktif, sehingga dapat merusak sel dan menyebabkan peroksidasi lipid pada sel hepar. Reaksi ini disertai dengan produksi radikal bebas yaitu radikal hidoksil (•OH) yang termasuk ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Spickett *et al*., 2000). Antioksidan memainkan peran utama dengan terus menerus menonaktifkan ROS ke tingkat yang diperlukan untuk mempertahankan fungsi sel normal (Al-Dabbas *et al*., 2006).

Kerusakan oksidatif terjadi ketika produksi ROS semakin tinggi dan menguasai mekanisme pertahanan antioksidan (Spickett *et al*., 2000). Pada kondisi tubuh sehat, ROS dan antioksidan berada dalam keseimbangan. Apabila keseimbangan ini terganggu dan bergeser dengan peningkatan ROS maka terjadi stres oksidatif (Bender, 2009).

Pada dasarnya ROS tetap dibutuhkan oleh tubuh dalam jumlah yang kecil untuk fungsi fisiologis yang normal (Devasagayam *et al*., 2004). ROS dalam jumlah kecil dibutuhkan dalam ekspresi gen, pertumbuhan sel, dan pertahanan terhadap infeksi (Kunwar, 2011). Reaksi ROS terhadap lipid yang tidak jenuh pada membran sel dan plasma lipoprotein menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid (Bender, 2009). Produk yang dihasilkan dari peroksidasi lipid yaitu malondialdehid (MDA). Peningkatan produk peroksidasi lipid yaitu MDA dan H_2O_2 menunjukkan bahwa kalsium hipoklorit meningkatkan stres oksidatif dan menghabiskan sistem pertahanan antioksidan, yang menyebabkan kerusakan pada sel hepar (Rosyidah, 2013).

Kadar peroksidasi lipid digunakan sebagai parameter kerusakan awal pada hepar. Peningkatan kadar peroksidasi lipid lebih jauh akan menyebabkan akumulasi trigliserida pada sel hati kemudian menyebabkan terjadinya nekrosis hati (Ruswandi, 2005). Konsentrasi peroksidasi lipid yang berlebih tidak hanya menyebabkan kerusakan pada hepar, tetapi dapat berpengaruh besar terhadap kerusakan jaringan lain dalam tubuh. Jika konsentrasi peroksidasi pada hepar meningkat, maka peroksidasi lipid ini dapat merusak sel hepar sehingga peroksida akan keluar dari hepar menuju pembuluh darah dan dapat merusak organ dan jaringan lain. Konsentrasi peroksidasi lipid yang meningkat pada jaringan maupun organ dapat mengakibatkan kehilangan fungsi dari organ hepar (Koolman dan Roehm, 2005).

2.4 Hepar

Hepar merupakan organ terbesar yang terletak di bagian cavitas abdominalis dibawah difragma. Organ ini memiliki fungsi yang banyak antara lain metabolisme lemak, tempat penyimpanan glikogen, sintesa urea, pembentukan serta sekresi empedu, dan detoksifikasi berbagai macam obat dan racun (Lumongga, 2008).

Fungsi metabolisme lemak oleh hati yaitu diawali dengan pengangkutan asam lemak dan kolesterol dari hati ke seluruh tubuh dalam bentuk lipoprotein. Di dalam hepar, asam lemak diresintesis menjadi trigliserida yang kemudian bergabung dengan kolesterol, fosfolipid, dan protein menjadi *very low density lipoprotein* (VLDL). Fungsi VLDL adalah untuk mengangkut trigliserida dari hepar ke seluruh jaringan tubuh. Selain dalam bentuk VLDL, trigliserida juga diedarkan ke seluruh tubuh dalam bentuk *intermedier density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL), dan *high density lipoprotein* (HDL). Pembebasan asam lemak dari VLDL dengan cara hidrolisis oleh enzim lipase memerlukan heparin yang berfungsi sebagai kofaktor. VLDL yang telah kehilangan *free fatty acid* (FFA) berubah menjadi *intermediate density lipoproteins* (IDL). IDL setelah dihidrolisis oleh lipase akan kehilangan asam lemak kemudian berubah menjadi LDL. LDL memberikan kolesterol ke jaringan untuk sintesis membran sel dan hormon steroid (Baret *et al*., 2004).

Hepar sebagai tempat penyimpanan glikogen untuk mengontrol kadar gula dalam darah. Pada saat kadar gula dalam darah tinggi, maka hati dapat

mengubah glukosa dalam darah menjadi glikogen yang kemudian disimpan dalam hati melalui proses glikogenesis. Ketika kadar gula darah menurun, maka cadangan glikogen di hati atau asam amino dapat diubah menjadi glukosa dan dilepaskan ke dalam darah melalui proses glukoneogenesis sehingga kadar gula darah dipertahankan untuk tetap normal (Murray *et al*., 2003).

Pada proses detoksifikasi, hepar melakukan inaktivasi hormon, detoksifikasi toksin dan obat. Selain itu terjadi fagositosis mikroorganisme, eritrosit, dan leukosit yang sudah tua atau rusak. Dalam fungsi ekskresi, hepar memproduksi empedu yang berperan dalam emulsifikasi dan absorbsi lemak. Zat toksin dan obat dibawa aliran darah atau senyawa organik melewati sel hepar secara perlahan dan akan dimetabolisme di hepar kemudian bisa diekskresikan melalui urin dan empedu. Pada saat di hepar terjadi proses konjugasi kembali yang menghasilkan konjugat hidrofil, lalu dikeluarkan kembali melalui empedu. Konjugat obat yang tidak mengalami hidrolisis langsung diekskresikan melalui tinja (Dyah dan Sondakh, 2009).

Hepar tikus terdiri dari empat lobus yang saling berhubungan. Lobus tersebut terdiri dari lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister, lobus quadratus, dan lobus caudatus. Vaskularisasi hepar berasal dari vena porta dan sebagian kecil berasal dari arteri hepatika. Seluruh materi diserap melalui usus dibawa ke hepar melalui vena porta, kecuali lemak akan dibawa melalui pembuluh limfe. Vena porta membawa darah penuh makanan yang diserap dari usus, sedangkan arteri hepatika berisi darah yang mengandung oksigen.

Cabang-cabang dari kedua pembuluh darah tersebut mengikuti jaringan ikat interlobularis di daerah portal (Soemart, 2003).

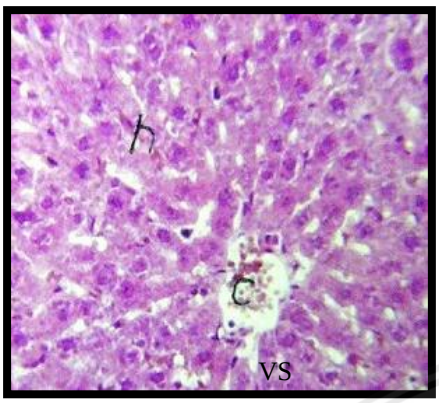
Hepar dibungkus oleh kapsula jaringan ikat tipis yaitu kapsula *Glisson* yang di dalamnya terdapat pembuluh darah kecil. Jaringan ikat hepar tersebut memasuki hepar dan membagi parenkim hepar menjadi lobus dan lobulus. Lobus hepar terbentuk dari parenkim dan sinusoid, dimana parenkim hepar terdiri dari hepatosit dan kapiler-kapiler empedu. Hepatosit tersebut berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan dan dikenal dengan lamina hepatis atau *hepatic plates*. Lobulus hepar dibentuk oleh jaringan ikat dan berbentuk poligonal (Junquieira, 1995). Lobulus hepar berbentuk poligonal yang terdiri atas hepatosit, sinusoid, dan vena sentralis. Sinusoid dibatasi oleh sel fagositik atau sel *Kupffer* yang fungsi utamanya adalah memfagositosis bakteri dan benda asing dalam darah (Price and Lorraine, 2006).

Hepatosit berbentuk polihedral yang memiliki satu atau dua inti dengan bentuk bulat, dan anak inti bisa satu atau dua. Sitoplasma hepatosit bersifat eosinofilik mengandung banyak organel dan inklusi antara lain mitokondria, endoplasmik retikulum kasar, endoplasmik retikulum halus, aparatus golgi, RNA, lisosom, butir-butir glikogen dan vakuola lemak. Hepatosit tersusun dalam deretan setebal satu sel dan disebut lamina hepatis atau *hepatic plates*. Permukaan hepatosit bersinggungan dengan dinding sinusoid melalui celah *Disse* dan juga bersinggungan dengan permukaan hepatosit lainnya. Di antara dua hepatosit yang saling berdekatan terdapat celah sempit dikenal dengan

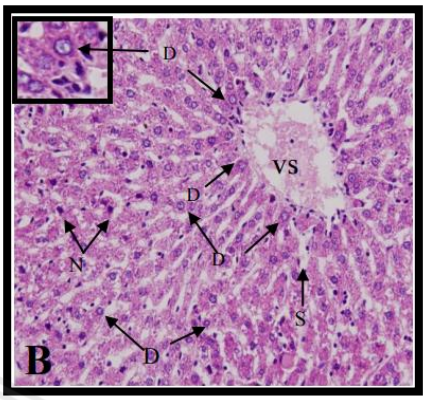
kanalikuli biliaris, yang merupakan bagian dari sistem empedu. Kapiler empedu membentuk jaring-jaring yang saling berhubungan menyusuri lamina hepatis pada lobulus hepar dan berakhir di kanal portal (Mescher, 2012).

Vaskularisasi hepar berasal dari vena porta dan arteri hepatika. Dalam memasuki hepar vena porta dan arteri hepatika langsung bercabang cabang menuju lobus menjadi arteri dan vena interlobaris kemudian bercabang-cabang membentuk arteri dan vena interlobularis yang terdapat di daerah portal atau segitiga *Kiernan*. Segitiga *Kiernan* merupakan pertemuan beberapa sudut lobulus hepar yang terbentuk oleh arteri interlobularis, vena interlobularis, dan duktus interlobularis (Ross dan Pawlina, 2011).

Sinusoid hepar merupakan pembuluh darah kapiler yang mengisi lobulus, membawa darah dari arteri dan vena interlobularis masuk ke sinusoid dan menuju ke vena sentralis. Dinding sinusoid mempunyai lubang karena dindingnya terdiri dari sel endotel dan sel-sel makrofag yang besar dan aktif yaitu sel Kupffer. Fungsi dari sel *Kupffer* yaitu untuk memecah eritrosit berusia tua, membebaskan heme untuk digunakan kembali, fagositosis bakteri atau benda asing, dan bertindak sebagai sel antigen dalam kekebalan adaptif. Sinusoid dan hepatosit dipisahkan oleh suatu celah sempit yang disebut celah perisinusoid atau celah *Disse*. Celah *Disse* adalah tempat dimana terjadi pertukaran nutrisi antara sel dan plasma (Samuelson, 2007). Histologi dan histopatologi hepar dapat diamati pada **Gambar 2.1** dan **Gambar 2.2**.



Gambar 2.1 Histologi hepar dengan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin



Gambar 2.2 Histopatologi hepar dengan degenerasi lemak dan nekrosis pewarnaan Hematoxylin dan Eosin

Keterangan :

1. D : Degenerasi lemak
2. S : Sinusoid
3. SN : Sel Normal
4. N : Nekrosis
5. VS : Vena Sentralis

2.5 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid merupakan suatu produk akhir dari hasil peroksidasi lipid. Malondialdehid umumnya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan menggambarkan derajat stres oksidatif. Senyawa malondialdehid terdiri dari dialdehida atau berkarbon tiga yang reaktif. Dalam material hayati senyawa MDA terdapat dalam bentuk bebas atau membentuk ikatan kompleks dengan lainnya di dalam jaringan (Suryohudoyo, 2000). MDA dapat berpolimerisasi baik antar sesama MDA membentuk pigmen dalam jaringan tua. Di dalam sel, MDA dalam bentuk bebas ataupun berikatan dengan molekul lain. Senyawa tersebut dapat membentuk ikatan silang

dengan berbagai molekul dan merupakan penanda toksisitas sel, mutagenesis, dan penguraian lipid pada membran sel (Oktrian dkk., 2013).

Malondialdehid (MDA) merupakan produk akhir dari proses peroksidasi lipid PUFA, yang tergolong sebagai metabolit reaktif dan toksik terhadap sel. Peningkatan kadar MDA dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan oksidatif (Inal, 2001). Oleh karena itu, MDA digunakan sebagai biomarker atau indikator untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif suatu sel. Metode yang digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif suatu sel adalah TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) yang menggunakan dasar reaksi MDA terhadap asam tiobarbiturat dan selanjutnya dinilai menggunakan spektrofotometer (Lykkesfeldt, 2007).

Mekanisme reaksi peroksidasi lipid diawali pada tahap inisiasi yaitu pengambilan atom H dari asam lemak tak jenuh oleh oksigen bebas yang terdapat pada •OH. Stabilitas bentuk dari produk awal ini ditentukan oleh energi disosiasi ikatan antara C-H. Ikatan ganda metilen pada asam lemak tak jenuh lebih mudah teroksidasi dari pada ikatan pada asam lemak jenuh. Selanjutnya reaksi antara radikal pentadienil dengan atom O_2 pada tahap propagasi akan menghasilkan reaksi yang menginisiasi asam lemak jenuh yang lainnya sehingga menghasilkan produk radikal yang baru. Reaksi ini akan terjadi terus menerus menjadi reaksi berantai hingga dihasilkan metabolit sekunder yang salah satunya adalah malondialdehid yang dapat diukur sebagai marker terjadinya peroksidasi lipid (Burchman, 1998).

MDA tepat digunakan sebagai biomarker untuk stres oksidatif karena beberapa alasan, yaitu pembentukan MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, kadarnya dapat diukur secara akurat dengan metode yang digunakan, bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, merupakan produk spesifik dari peroksidasi lemak, dan terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Llurba *et al*., 2004).

2.6 Hubungan Kadar MDA dengan Pemberian Klorin Berlebih

Pemberian klorin berlebih akan meningkatkan kadar MDA di dalam hepar. Proses tersebut dimulai ketika asam hipoklorit diserap oleh saluran pencernaan dan diedarkan melalui pembuluh darah kemudian masuk ke dalam sel hepar. Asam hipoklorit yang menembus membran sel yang terdiri asam lemak tidak jenuh akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Asam hipoklorit akan menyerang membran sel hepar yang tersusun atas fosfolipid sehingga akan mengganggu permeabilitas membran sel hepar tersebut. Membran sel tersusun dari *fosfolipid bilayer* yang merupakan asam lemak tidak jenuh dan protein yang memiliki fungsi mengangkut molekul-molekul melintasi membran sel. Proses tersebut akan menyebabkan peroksidasi lipid pada membran sel hepar. Produk akhir dari peroksidasi lipid tersebut akan menghasilkan senyawa malondialdehid. Senyawa malondialdehid digunakan sebagai penanda kerusakan pada sel hepar (Iji *et al*, 2013).

2.7 Tikus Putih *(Rattus novergicus)*

Gambar 2.3 Tikus putih (*Rattus novergicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai *Norway rat* merupakan hewan percobaan yang sering digunakan untuk penelitian. Hal ini dikarenakan genetik yang memiliki karakterisitik dengan baik, galur yang bervariasi dan tersedia dalam jumlah yang banyak (Barnett dan Anthony, 2002).

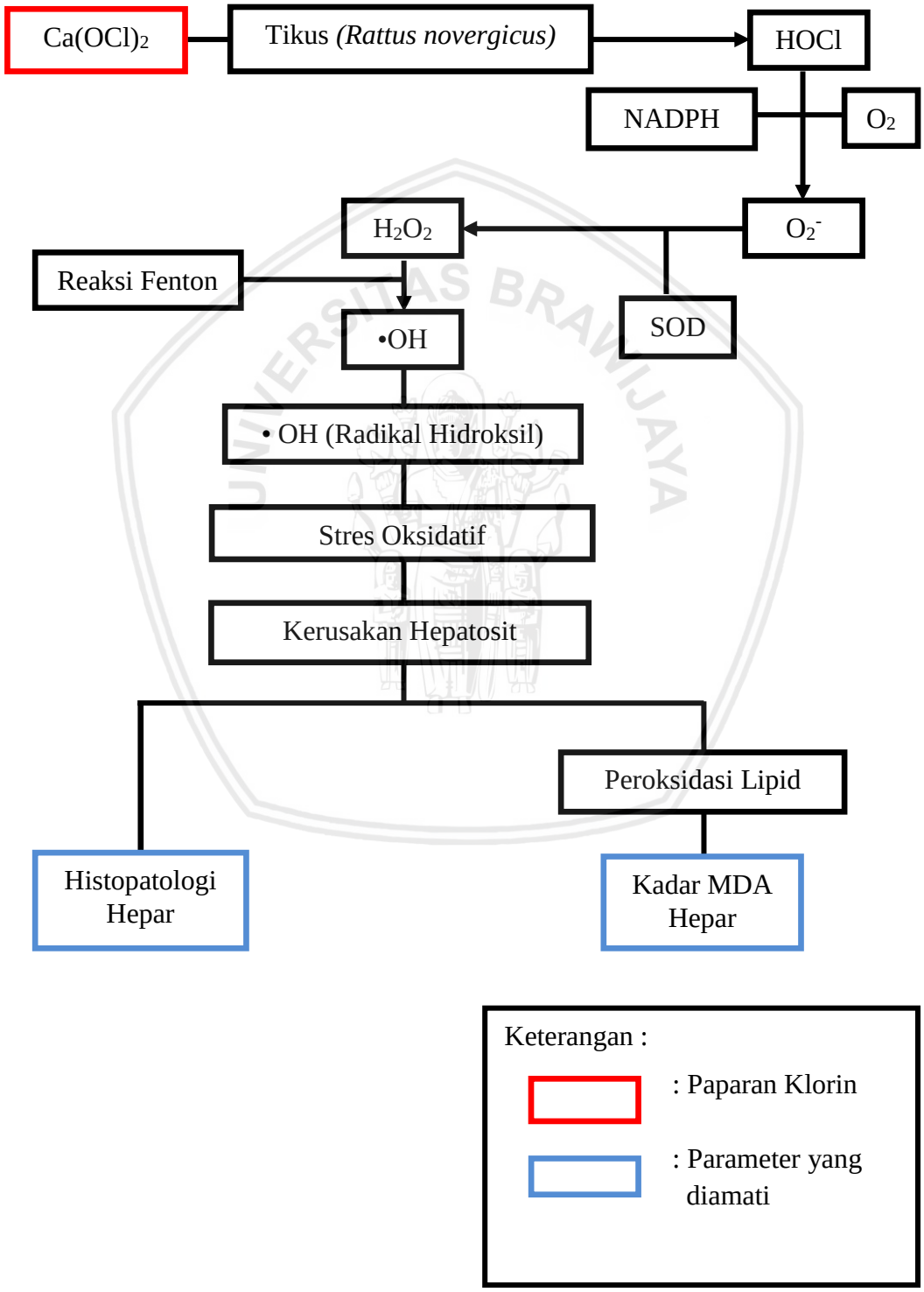
Tikus putih memliki sifat yang menguntungkan sebagai hewan coba dalam penelitian karena perkembangbiakannya yang cepat dan memiliki ukuran yang lebih besar dari mencit. Selain itu tikus mempunyai sifat yang membedakannya dari hewan percobaan lain yaitu tikus tidak dapat muntah. Hal tersebut karena tikus tidak memiliki kekuatan pada otot esophagus untuk membuka *sphincter gastroesophageal* dengan paksa yang diperlukan untuk muntah. Selain itu tikus tidak memiliki koneksi saraf dalam batang otak dan viscera yang mengkoordinasi otot yang terlibat dalam muntah (Permana, 2010).

Galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian adalah galur *Wistar* dan *Sprague dawley*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* dikembangkan dari tikus putih galur *Wistar*. Alasan menggunakan tikus

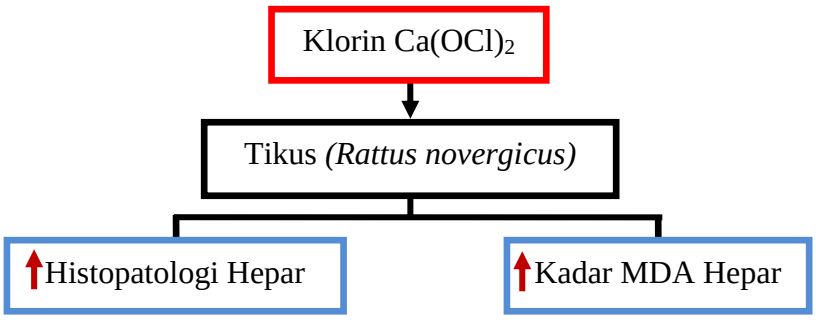
jantan karena pada tikus jantan tidak mengalami sklus estrous yang dapat mengganggu pengamatan. Ciri dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram (Maula, 2014). Galur ini memiliki pertumbuhan yang cepat, tempramen yang baik dan kemampuan laktasi yang tinggi (Rosyidah, 2013).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



Hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) diberikan klorin berlebih dalam air minum dengan cara disonde sehingga langsung masuk ke lambung. Konsentrasi klorin yang diberikan yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm sebanyak 1 mL. Pemberian klorin berlebih pada air minum dilakukan satu kali dalam sehari selama tujuh hari.

Pemberian klorin berlebih dapat menyebabkan kerusakan hepar dengan menginduksi enzim sitokrom P-450. Klorin berlebih $Ca(OCl)_2$ masuk ke dalam tubuh melalui traktus gastrointestinal, diabsorbsi di dalam intestinal dan didistribusikan ke hepar melalui pembuluh darah untuk dimetabolisme dengan bantuan enzim P-450. $Ca(OCl)_2$ masuk ke dalam tubuh berubah menjadi asam hipoklorit HOCl kemudian dimetabolisme oleh hepar dengan bantuan O_2 dan sebagai kofaktor NADPH yang dapat menghasilkan radikal bebas superoxide (O_2^-). Peningkatan metabolisme oksidatif karena pemberian klorin berlebih akan meningkatkan terbentuknya radikal bebas. Radikal superoksida yang terbentuk akan dikatalis oleh antioksidan enzimatik *Superoxide Dismutase* (SOD) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan air. Jika hidrogen peroksida mengalami reaksi fenton maka akan terbentuk radikal

hidroksil, sehingga akan menginduksi terjadinya stress oksidatif pada sel hepar. Peningkatan radikal bebas akan menyebabkan peroksidasi lipid (Schneider *et al*., 2004).

Radikal hidroksil (•OH) merupakan senyawa yang sangat reaktif dan berbahaya. Radikal hidroksil bukan merupakan produk primer proses biologis melainkan berasal dari H_2O_2 dan O_2. Radikal hidroksil ini sebagai sumber *reactive oxygen species* (ROS). Jika radikal hidroksil sebagai sumber ROS lebih tinggi daripada antioksidan maka akan terjadi ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang disebut stress oksidatif. Stress oksidatif disebabkan adanya radikal hidroksil sebagai sumber ROS di dalam sel yang tidak dapat distabilkan (Adji, 2008). Kemudian radikal hidroksil akan bereaksi dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) atau asam lemak, sehingga menyebabkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan penanda stres oksidatif yang tidak stabil yang mengubah suatu bentuk yang kompleks menjadi reaktif dengan hasil akhir yaitu malondialdehid (MDA) (Pribadi & Ernawati, 2010). Malondialdehid tersebut merupakan marker dari kerusakan sel hepatosit yang akan diukur secara kuantitatif dan digunakan sebagai parameter dalam penelitian ini (Kunwar, 2011).

Selain malondialdehid (MDA) yang diukur sebagai penanda kerusakan sel dalam penelitian ini, secara kualitatif akan menggunakan parameter gambaran histopatologi dari organ hepar akibat kerusakan sel hepatosit karena radikal hidroksil yang berasal dari pemberian klorin berlebih $Ca(OCl)_2$.

3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian diatas, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

a. Pemberian klorin berlebih dapat meningkatkan kadar MDA pada hepar tikus putih (*Rattus novergicus*).

b. Pemberian klorin berlebih dapat menimbulkan kerusakan pada hepar tikus putih (*Rattus novergicus*).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Biosains Universitas Brawijaya, pengamatan histopatologi hepar diamati di Laboratorium Histologi FKH Universitas Brawijaya, pengukuran kadar MDA di Laboratorium FAAL FK Universitas Brawijaya dan pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2019 sampai bulan Februari 2019.

4.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata- rata 150 – 200 gram.

4.3 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor, dimana terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus.

Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif. Tikus putih tanpa pemberian air minum klorin berlebih.
2. Kelompok kedua adalah kelompok tikus putih dengan pemberian air minum klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm dalam waktu 7 hari.

3. Kelompok ketiga adalah kelompok tikus putih dengan pemberian air minum klorin berlebih dengan konsentrasi 100 ppm dalam waktu 7 hari.
4. Kelompok keempat adalah kelompok tikus putih dengan pemberian air minum klorin berlebih dengan konsentrasi 150 ppm dalam waktu 7 hari.
5. Kelompok kelima adalah kelompok tikus putih dengan pemberian air minum klorin berlebih dengan konsentrasi 200 ppm dalam waktu 7 hari.

4.4 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba. Tikus diberikan ransum basal berbentuk pelet dengan tipe BR1 dan diberikan air mineral secara *ad libitum* (Lina, 2003).

4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana dengan membagi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari 4 ekor hewan coba. Kelompok 1 adalah tikus putih yang tidak diberi perlakuan, hanya diberi pakan berupa ransum basal berbentuk pellet BR1 serta diberikan air minum (kontrol negatif). Kelompok 2 adalah tikus putih yang diberi air minum klorin berlebih berlebih dengan konsentrasi 50 ppm sekali sehari dalam waktu 7 hari. Kelompok 3 adalah tikus putih yang diberi air minum

klorin berlebih dengan konsentrasi 100 ppm sekali sehari dalam waktu 7 hari. Kelompok 4 adalah tikus putih yang diberi air minum klorin berlebih dengan konsentrasi 150 ppm sekali sehari dalam waktu 7 hari. Kelompok 5 adalah tikus putih yang diberi air minum klorin berlebih berlebih dengan konsentrasi 200 ppm sekali sehari dalam waktu 7 hari.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok Penelitian

Perlakuan	**Ulangan**			
	1	**2**	**3**	**4**
Kontrol negatif	K-1	K-2	K-3	K-4
Kelompok P1	P1.1	P1.2	P1.3	P1.4
Kelompok P2	P2.1	P2.2	P2.3	P2.4
Kelompok P3	P3.1	P3.2	P3.3	P3.4
Kelompok P4	P4.1	P4.2	P4.3	P4.4

Tabel 4.2 ANOVA (*Analysis of Variance*)

S.V	df[x]	**SS**	MS[xx]	F[xxx] **Cale**	**F5%**	**F1%**
Treatment	P-1	SST	MST	MST / MSE	3,11	4,89
Error	P(n-1)	SSE	MSE			
Total	Pn-P					

Keterangan :

x). d.f *varietas (treatment)* = t-1 = 5 – 1 = 4

d.f total = nt – 1 = 20 – 1 = 19

d.f *error* = df total – df varietas = 19 – 4 = 15

xx). MS *Varietas* $= \frac{SS\ Varietas}{df\ Varietas}$

MS *error* $= \frac{SS\ error}{df\ error}$

xxx). F *Calculated* $= \frac{MS\ Varietas}{MS\ Varietas}$

4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata- rata 150 - 200 gram. Menurut Kusriningrum (2008), estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

t (n-1) ≥ 15
5 (n-1) ≥ 15
5n – 5 ≥ 15
5n ≥ 20
n ≥ 4

Keterangan:
t = Jumlah kelompok perlakuan
n = Jumlah ulangan yang diberikan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok dan hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

4.7 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : pemberian air minum klorin berlebih

Variabel terikat : kadar Malondialdehid (MDA) dan gambaran histopatologi hepar pewarnaan HE.

Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, umur, berat badan, suhu, dan pakan.

4.8 Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

a. Kandang pemeliharaan berukuran 45x38x20 cm yang terbuat dari plastik *polyvinyl* dengan tutup jaring jaring dari bahan *stainless steel* sebanyak 5 buah.
b. Sonde lambung.
c. Peralatan untuk pembuatan preparat irisan histologis adalah bak paraffin, dissecting kit, kertas label, botol flakon, gelas objek, gelas penutup, oven, rotary microtome ,staining kit, base molt, holder, cawan petri, hot plate,

pipet tetes, mikroskop cahaya, micrometer objektif, dan micrometer okuler.

d. Alat untuk pengukuran kadar MDA, yaitu spektrofotometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, pakan tikus putih standar, larutan chlorin, Phosphate Buffer Saline (PBS) aquadest, NaCl fisiologis, xylol bertingkat, alkohol bertingkat, PFA 4%, blok parafin, pewarna Hematoxyline Eosin (HE), alkohol 70%, alkohol 90%, dan alkohol 95%.

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Pemberian Klorin Berlebih

Klorin yang diberikan pada hewan coba adalah klorin dalam sediaan granul yang akan dihaluskan kemudian dilarutkan dengan aquades. Sebelumnya dilakukan perhitungan agar memperoleh konsentrasi yang sesuai. Cara membuat 50 ppm klorin yaitu dengan melarutkan 0,01007 g klorin dalam 100 mL aquades. Cara membuat 100 ppm klorin yaitu dengan melarutkan 0,020140 g klorin dalam 100 mL aquades. Cara membuat 150 ppm klorin yaitu dengan melarutkan 0,03021 g klorin dalam 100 mL aquades. Cara membuat 200 ppm klorin yaitu dengan melarutkan 0,040281 g klorin dalam 100 mL aquades. Kemudian dilakukan pengadukan agar homogeny

serta dimasukan kedalam botol yang berwarna coklat dan ditutup dengan rapat.

Larutan aquades yang telah dicampur klorin tersebut diberikan secara per oral menggunakan sonde sebanyak 1 mL sekali setiap hari pada tikus P1, P2, P3, P4. Induksi klorin dilakukan pada hari ke 8 sampai hari ke 14.

4.9.2 Pengambilan Organ Hepar

Pengambilan organ hepar pada hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) dilakukan pada hari ke 15 setelah pemberian terapi selama 7 hari dengan pemberian klorin berlebih. Sebelum dilakukan pengambilan organ hepar, langkah pertama yang dilakukan adalah dislokasi cervical pada hewan coba kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian peritoneum, tikus diletakkan pada posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Kemudian insisi bagian peritoneum, hepar yang berwarna coklat kemerahan dan terletak dibawah diafragma dalam rongga abdomen dipotong dan disimpan untuk diamati. Lobus hepar yang akan dikoleksi yaitu lobus yang terlihat perubahan secara makroskopik. Jika tidak terlihat secara makroskopik makan diambil lobus hepar yang mendekati dengan pembuluh darah. Lobus yang mendapat aliran darah dari cabang utama vena porta yaitu lobus lateral sinister dan lobus medial sinister (Gheorghe, 2018). Organ hepar dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9 %. Kemudian organ hepar dimasukkan dalam pot sampel dengan larutan formalin 10 % untuk pembuatan preparat histopatologi.

4.9.3 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ hepar dalam formalin 10% selama 24 jam. Tujuan dilakukannya fiksasi adalah untuk mencegah kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Menurut Junqueira (2005) proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari dehidrasi, clearing, embedding, sectioning, dan mounting.

a. Dehidrasi, yaitu mengeluarkan air dari jaringan agar dapat diisi oleh parafin sehingga dapat diiris tipis. Organ hepar dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit.
b. Clearing, yaitu penjernihan organ. Organ dimasukkan dalam xylol I selama 1 jam, xylol II selama 30 menit, dan xylol III selama 30 menit.
c. Embedding, yaitu organ dimasukkan kedalam parafin cair dengan suhu 56 ^{o}C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan keparafin blok.
d. Sectioning, yaitu proses pemotongan parafin blok dengan microtome. Ketebalan pemotongan adalah 5 μm agar tembus cahaya saat dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop dan direndam pada *water bath* dengan suhu 40 ^{o}C. Awal pemotongan

dilakukan trimming karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna.

e. Mounting, yaitu penempelan blok parafin yang sudah dipotong ke object glass. Setelah ditempel, keringkan diatas hot plate 38-40 ^{o}C sampai kering kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37 ^{o}C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati, 2013).

4.9.4 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Pewarnaan Hematoxylin Eosin memiliki dua fungsi, yaitu Hematoxylin untuk memberi warna biru pada inti sel, sedangkan Eosin untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Prosedur pewarnaan HE adalah:

a. Deparafinisasi, yaitu melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan kedalam xylol bertingkat I, II, dan III masing-masing selama 5 menit.
b. Rehidrasi, yaitu preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit lalu direndam dalam aquades selama 5 menit.
c. Pewarnaan I, yaitu pewarnaan dengan menggunakan hematoxyline selama 10 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna biru pada inti sel.
d. Differensiasi, yaitu preparat dimasukkan dalam Hydrochloric acid (HCl) 0,6% selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir.

Tujuan differensiasi adalah untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma.

e. Pewarnaan kedua, yaitu preparat dimasukkan dalam eosin selama 3 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma.
f. Dehidrasi, yaitu menghilangkan air dari jaringan. Preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing 5 menit.
g. Clearing, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol I dan II selama 1 menit dan ditunggu sampai kering.
h. Mounting, yaitu preparat diberi Entelan atau balsam canada dan ditutup dengan *cover glass*. Hal ini bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang sudah diwarnai (Jusuf, 2009).

4.9.5 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi hepar dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan histopatologi hepar yang diamati adalah sel hepar dan sinusoid. Pengamatan histopatologi berupa peroksidasi lipid ditandai dengan sinusoid yang melebar dan nekrosis pada inti sel hepar yang ditandai dengan perubahan inti sel yaitu inti menjadi keriput, inti tampak lebih padat, dan warna pada inti gelap atau piknosis (Hirmawan, 1992).

4.9.6 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehid

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 mg/ml masing masing diambil 100 µL, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda setelah itu ditambahkan 550 µL aquades. Setiap tabung tersebut ditambahkan 100 µL TCA 100 %, 250 µL HCL 1 N dan 100 µL Na-Thio 1% dan campuran yang terbentuk dihomogenkan dengan vortex. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100 °C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum (530 nm) menggunakan spektrofomotometer (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV- 1601). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Aulani'am, 2012).

4.10 Analisis Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid dan gambaran histopatologi hepar. Kadar MDA diamati menggunakan uji TBA. Selanjutnya dilakukan analisis statistika dengan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA) menggunakan *Statistical Package for The Social Science* (SPSS) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikasi 5 %. Analisa data menggunakan *One-Way Anova* dikarenakan *One-Way Anova* untuk menguji rata-rata atau pengaruh dari suatu percobaan

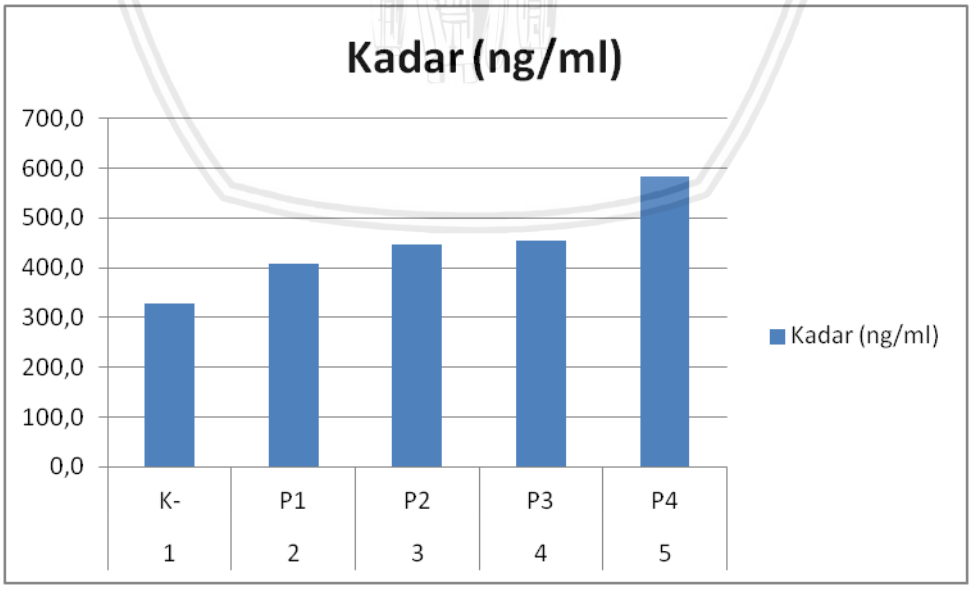
yang menggunakan satu faktor, dimana satu faktor tersebut memiliki tiga atau lebih kelompok. Dalam penelitian ini ingin mengetahui ada perbedaan yang nyata pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap rata-rata MDA pada 5 kelompok perlakuan. Sementara itu, hasil pengamatan histopatologi hepar dianalisa secara deskriptif untuk melihat ada tidaknya kerusakan pada sel hepar berupa nekrosis pada inti sel dan pelebaran sinusoid.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kadar MDA Organ Hepar pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Malondialdehid (MDA) merupakan suatu produk akhir peroksidasi lipid, yang dapat digunakan sebagai biomarker biologis dari proses peroksidasi lipid serta dapat menggambarkan derajat stres oksidatif. Peroksidasi lipid tersebut disebabkan oleh radikal hidroksil yang merupakan *reactive oxygen species* (ROS) berasal dari HOCl yang ada di dalam kalsium hipklorit atau $Ca(OCl)_2$. Cara kerja dari radikal hidroksil sebagai ROS adalah dengan cara berikatan dengan PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) baik pada membran sel atau membran mitokondria. Ikatan tersebut mengakibatkan membran sel kehilangan atom hidrogen yang akan menghasilkan produk akhir berupa malondialdehid (Mutaqin dkk., 2012).



Pemberikan klorin bertingkat menyebabkan peningkatan kadar MDA pada organ hepar. Semakin tinggi konsentrasi klorin, semakin tinggi pula kadar MDA pada organ hepar.

Setelah dilakukan penelitian pemberian klorin berlebih terhdap kadar MDA organ hepar didapatkan data yang telah dianalisis menggunakan SPSS. Dari analisis data *One Way Anova* menggunakan SPSS dengan tingkat kepercayaan 95%, bahwa pemberian klorin berlebih menunjukkan pengaruh yang sangat berbeda nyata karena F hitung (8,198) > F tabel 1% (4,89). Sehingga dapat disimpulkan diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata (P < 0,01) terhadap kadar MDA pada organ hepar tikus putih (*Rattus novergicus)*. Analisa statistik pengukuran kadar malondialdehid (MDA) dapat dilihat pada **Tabel 5.1.**

Tabel 5.1. Analisa Statistik Kadar MDA

S.V	df[x]	SS	MS[xx]	F[xxx] Calculated	F5%	F1%
Treatment	4	138310,247	34577,562	8,400	3,11	4,89
Error	15	62370,182	4218,012			
Total	19	201580,429				

Tabel 5.2 Rata-rata Kadar MDA Organ Hepar Tikus

Kelompok	Rata-rata kadar Mda (ng/mL)
Kontrol Negatif (K-)	323,3±11,08[a]
P1 50 ppm	406,9±47,04[a]
P2 100 ppm	447,7±77,69[ab]
P3 150 ppm	453,0±56,83[ab]
P4 200 ppm	584,4±97,40[b]

Rata-rata kadar MDA dari hasil penelitian ini pada kelompok kontrol yaitu didapatkan hasil 323,3±11,08 ng/mL. Pada perlakuan pertama dengan konsentrasi 50 ppm adalah 406,87 ± 47,04 ng/mL. Pada perlakuan kedua dengan konsentrasi 100 ppm adalah 447,73 ± 77,69 ng/ mL. Pada perlakuan ketiga dengan konsentrasi 150 ppm adalah 453,00 ± 56,83 ng/mL. Pada perlakuan keempat dengan konsentrasi 200 ppm adalah 584,40 ± 97,40 ng/mL.

Berdasarkan tabel nilai rata-rata kadar MDA tersebut terjadi kenaikan antara kelompok perlakuan kontrol negatif dengan kelompok perlakuan pertama dengan konsentrasi 50 ppm sebesar 23,94 %, perlakuan kedua dengan konsentrasi 100 ppm sebesar 36,36 %, perlakuan ketiga dengan konsentrasi 150 ppm sebesar 37,98 dan terjadi peningkatan antara kontrol negatif dengan perlakuan keempat dengan konsentrai 200 ppm sebesar 78,00 %.

Perlakuan kontrol negatif memiliki nilai rata-rata kadar MDA sebesar 328,3±11,08 ng/mL. Hal ini disebabkan secara normal di dalam tubuh tikus akan memproduksi radikal bebas. Radikal bebas diproduksi dalam jumlah yang normal, penting untuk fungsi biologis, seperti sel darah putih yang menghasilkan H_2O_2 untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta pengaturan pertumbuhan sel, namun tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga dapat menyerang asam lemak ganda tidak jenuh dari membran sel atau PUFA, organel sel, atau DNA. Sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarsi, 2007). Oleh karena itu, kadar MDA dalam

kelompok kontrol dapat tetap ada diakibatkan terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan yang dikeluarkan tubuh secara normal.

Setiap waktu tubuh akan mengalami degenerasi sel yang mana bertujuan untuk memperbaiki sel-sel yang rusak. Sel yang rusak akan menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA), oleh karena itu MDA yang dijadikan sebagai marker atau penanda dari kerusakan jaringan yang secara fisiologis selalu dihasilkan oleh tubuh (Mutaqin, 2012). Dari hasil penelitian pengukuran MDA yang dianalisis dengan *One Way Anova* kadar MDA pada hepar meningkat seiring dengan pemberian konsentrasi klorin berlebih pada hewan coba. Hal ini disebabkan oleh tingginya ROS yang berupa radikal hidroksil yang berasal dari kalsium hipoklorit $Ca(OCl)_2$. ROS yang meningkat akan diikuti dengan adanya kerusakan jaringan stres oksidatif yang mana akan diikuti dengan peningkatan kadar MDA sebagai penanda kerusakan stres oksidatif (Makker *et al*., 2009).

Setelah dilakukan analisa data menggunakan *One-Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test* sebagai penentu perbedaan data apakah ada perbedaan yang signifikan atau tidak. Setelah dianalisa maka didapatkan kesimpulan bahwa hipotesa diterima, dimana pemberian klorin berlebih mampu mempengaruhi kadar MDA hepar tikus putih (*Rattus novergicus*), analisa statistik tersebut dapat diamati pada **Lampiran 7**.

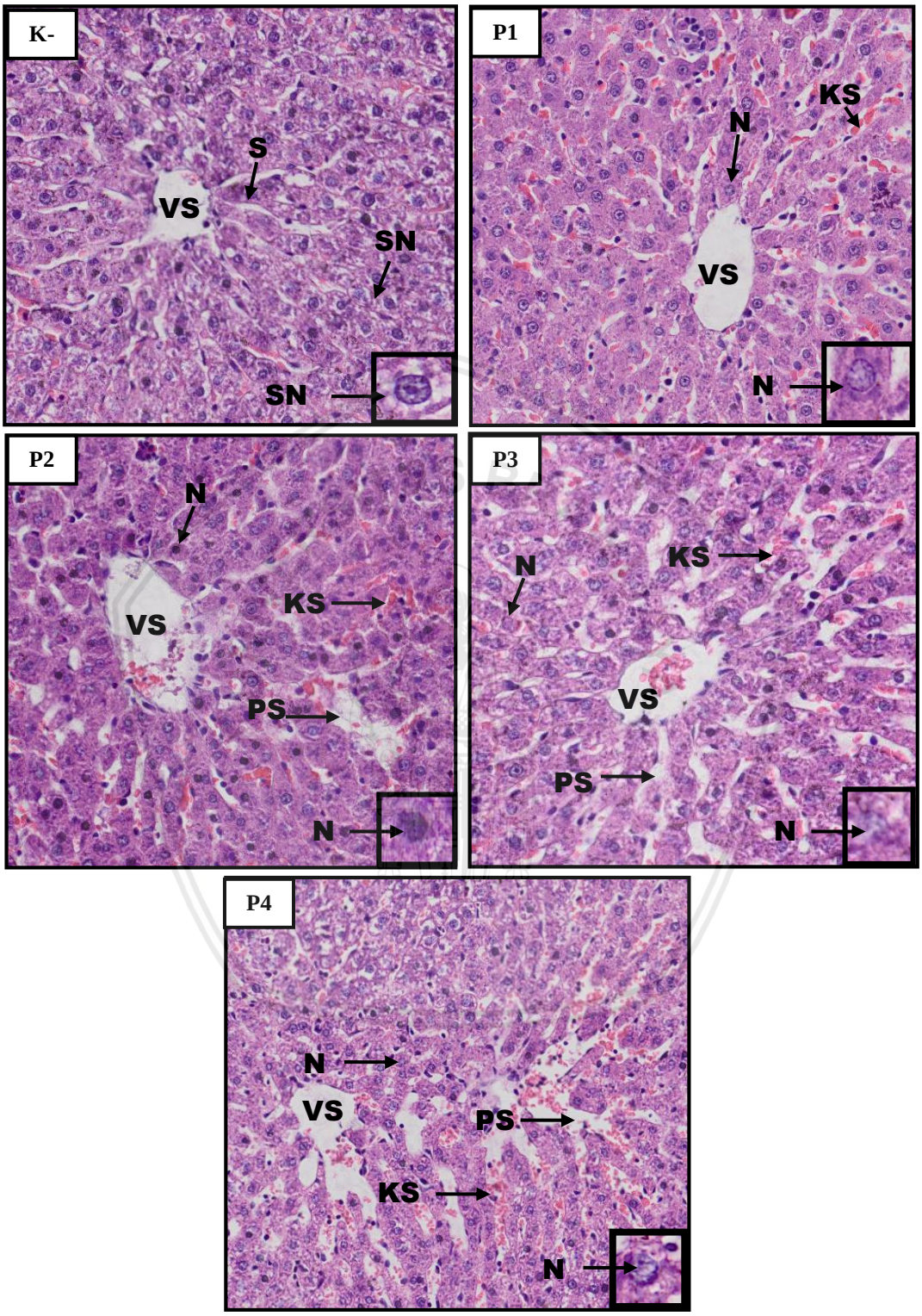
5.2 Efek Pemberian Klorin Berlebih $Ca(OCl)_2$ Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Hepar pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Hasil pengamatan yang dilakukan terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diberikan klorin berlebih selama tujuh hari menunjukkan perubahan sel dan abnormalitas struktur pada hepatosit. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini untuk mengetahui tingkat kerusakkan hepar akibat pemberian klorin berlebih pada gambaran histopatologi organ hepar. Hasil histopatologi yang diamati yaitu peroksidasi lipid atau degenerasi lemak yang ditandai dengan perubahan sinusoid yang melebar, nekrosis pada inti sel, dan kongesti sinusoid. Hal ini dapat terjadi ketika radikal hidroksil tersebut berikatan dengan ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh sehingga terjadi peroksidasi lipid yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepatosit yang ditandai dengan nekrosis berupa piknotik, kariolosis, dan karioreksis (Price dan Lorraine, 2006).

Pada gambaran histopatologi ditunjukkan pelebaran sinusoid dan adanya perdarahan dalam sinusoid hepar sehingga jaringan tampak lebih merah. Kongesti merupakan reaksi patologis sebagai salah satu manifestasi terjadi peradangan akibat kerusakan sel. Saat terjadi kerusakan karena peroksidasi lipid, maka akan terjadi dilatasi kapiler akibat rangsang vasodilator sehingga vaskularisasi pada sinusoid melebar dan berisi darah yang terbendung atau disebut dengan kongesti. Pada kongesti sinusoid akut, daerah yang mengalami bendungan terjadi pada area sentralis dan apabila kongesti

berlangsung lama maka seluruh tepi lobulus mengalami bendungan disertai pelebaran sinusoid hepar yang berisi eritrosit (Francisco *et al*., 2018).

Gambaran histopatologi organ hepar pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.1.** Pengamatan gambaran histopatologi organ hepar dilakukan dengan perbesaran 100x dan 400x.



Gambar 5.1 Gambaran histopatologi organ hepar.

Keterangan : K- : kontrol negatif, P1 : 50 ppm, P2: 100 ppm, P3: 150 ppm, P4: 200 ppm. S: sinusoid, VS: vena sentralis, PS: pelebaran sinusoid, KS: kongesti sinusoid, SN: sel normal

Pada gambar (K-) histopatologi kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan klorin berlebih terlihat morfologi dan struktur sel hepatosit yang normal. Hepatosit berbentuk polihedral dengan intinya bulat berada di tengah. Hepatosit tersusun secara homogen membentuk lempengan yang saling berhubungan, dimana masing masing membentuk celah yang disebut sinusoid hepar (Fitmawati dkk., 2018).

Pada gambaran histopatologi kelompok perlakuan satu (P1) yang diberi klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm terlihat adanya pelebaran sinusoid, infiltrasi sel radang, nekrosis, dan adanya kongesti sinusoid. Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan dua (P2) dengan konsentrasi 100 ppm terlihat sel radang yang lebih banyak dari P1, sinusoid yang semakin lebar, dan terjadi nekrosis yang lebih banyak. Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan tiga (P3) dengan konsentrasi 150 ppm terlihat sinusoid yang semakin lebar menuju vena sentralis jika dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Selain itu, terdapat eritrosit pada sinusoid hepar yang lebih banyak dari kelompok perlakuan P2, infiltrasi sel radang, dan terjadi nekrosis pada inti sel yang terlihat kariolisis. Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan empat (P4) dengan konsentrasi 200 ppm terlihat struktur yang abnormal dan tidak beraturan. Sinusoid melebar hingga vena sentralis tidak berbentuk serta terdapat sel nekrosis yang meluas. Selain itu, terlihat akumulasi eritrosit yang lebih banyak pada sinusoid jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan P1, P2, dan P3. Infiltrasi sel radang lebih banyak

terlihat pada kelompok perlakuan empat (P4). Hal ini sesuai dengan kadar MDA pada P4 yang tinggi dengan nilai 584,40 ± 97,40 ng/mL.

Kerusakan organ hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diberi klorin berlebih dapat terlihat pada histopatologi organ hepar yang diamati. Semakin tinggi konsentrasi klorin berlebih yang diberikan kepada tikus maka terlihat meningkatnya kerusakan organ hepar yang ditandai dengan sinusoid yang semakin lebar, infiltrasi sel radang semakin banyak, adanya eritrosit pada sinusoid, dan nekrosis yang luas (Amalina, 2009).

Kerusakan pada sinusoid juga dapat terjadi akibat terjadinya degenerasi lemak sehingga terbentuk vakuola lemak yang akan menimbulkan ruang kosong pada sinusoid dan menyebabkan sinusoid melebar (Oktavianti, 2005). Penyebab lainnya yaitu akibat desakan pada dinding sinusoid karena adanya penyempitan pada vena berupa darah yang disebabkan oleh penimbunan lemak karena terjadinya peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil (Wulandari dkk., 2007).

Infiltrasi sel radang disebabkan oleh adanya *Reavtive Oxygen Species* (ROS) yang berupa radikal hiroksil (•OH) yang dapat menyebabkan terjadinya infiltrasi sel radang dan terjadinya nekrosis yang ditandai dengan inti tampak lebih padat, warnanya gelap hitam (piknosis), inti terbagi atas fragmen-fragmen, robek (karioreksis), inti tidak lagi menyerap warna banyak sehingga menjadi pucat (kariolisis) (Akhlaghi dkk., 2009).

Kongesti pada sinusoid seperti yang terlihat pada kelompok perlakuan P1, P2, P3, dan P4 merupakan tanda terjadinya inflamasi akut. Inflamasi akut

diawali dengan vasodilatasi sinusoid hepar yang mengakibatkan peningkatan aliran darah dan penyumbatan lokal, selanjutnya mikrovaskulator menjadi lebih permeabel sehingga cairan yang kaya protein masuk ke dalam jaringan ekstravaskular. Hal ini menyebabkan sel darah merah menjadi lebih terkonsentrasi sehingga meningkatkan viskositas darah dan memperlambat sirkulasi. Secara mikroskopik akan tampak sinusoid yang terdapat eritrosit (Kumar *et al*., 2007).

Kerusakan hepatosit yang diukur kadar MDA dan pengamatan histopatologi hepar dikarenakan adanya radikal hidroksil (•OH) yang merupakan senyawa yang sangat reaktif dan berbahaya. Radikal hidroksil bukan merupakan produk primer proses biologis melainkan berasal dari H_2O_2 dan O_2. Radikal hidroksil ini sebagai sumber *reactive oxygen species* (ROS). Jika radikal hidroksil sebagai sumber ROS lebih tinggi daripada antioksidan maka akan terjadi ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang disebut stress oksidatif. Stress oksidatif disebabkan adanya radikal hidroksil sebagai sumber ROS di dalam sel yang tidak dapat distabilkan (Adji, 2008). Kemudian radikal hidroksil akan bereaksi dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) atau asam lemak, sehingga menyebabkan kerusakan hepatosit berupa peroksidasi lipid (Pribadi & Ernawati, 2010).

Selain dilakukan pengamatan gambaran histopatologi pada organ hepar tikus dilakukan perhitungan sel nekrosis yang ditandai dengan piknosis, kariolisis, karioheksis pada gambaran histopatologi organ hepar tikus dengan perbesaran 100 x secara menyeluruh dan berpusat pada vena sentralis

(Akhlaghi dkk., 2009). Perhitungan tersebut dilakukan menggunakan 3 lapang pandang yang dapat diamati pada **Tabel 5.3** Perhitungan jumlah sel nekrosis pada gambaran histopatologi organ hepar tikus.

Tabel 5.3 Perhitungan jumlah sel nekrosis pada gambaran histopatologi organ hepar tikus dengan tiga lapang pandang.

Kelompok Perlakuan	Lapang Pandang	Jumlah Sel Normal	Jumlah Sel nekrosis	Rata-rata sel nekrosis
K-	I	62	15	16,3
	II	56	13	
	III	67	21	
P1 50 ppm	I	21	39	36
	II	18	46	
	III	28	23	
P2 100 ppm	I	23	65	53
	II	34	38	
	III	19	56	
P3 150 ppm	I	18	69	65,3
	II	26	54	
	III	23	73	
P4 200 ppm	I	11	86	77,3
	II	23	77	
	III	16	69	

Pada tabel tersebut dapat terlihat pada rata-rata dari jumlah sel nekrosis tersebut meningkat sesuai dengan kerusakan pada gambaran histopatologi organ hepar berupa nekrosis inti sel. Rata-rata sel nekrosis tersebut berbanding lurus dengan terjadinya peroksidase lipid yang sesuai dengan meningkatnya kadar MDA dan sesuai dengan gambaran histopatologi organ hepar. Nekrosis adalah kematian sel atau jaringan pada organisme hidup, ditandai dengan perubahan morfologi pada sel. Kematian sel merupakan kerusakan yang bersifat irreversibel, sehingga hepatosit tidak dapat kembali ke bentuk normal. Kematian sel dapat terjadi melalui proses apoptosis dan

nekrosis sel. Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terencana atau terprogram, sedangkan nekrosis dicirikan dengan adanya sel radang. Salah satu penyebab terjadinya nekrosis adalah paparan bahan kimia yang bersifat toksik seperti $Ca(OCl)_2$. Kalsium hipoklorit yang masuk ke dalam tubuh akan mengeluarkan radikal bebas yang menyebabkan terjadinya nekrosis sel karena sifat toksik yang dihasilkan oleh kalsium hipoklorit yang berupa radikal hidroksil (Sudiono, 2003).

Nekrosis pada gambaran histopatologi dapat dilihat pada inti selnya. Biasanya sel yang telah mati intinya menyusut, tampak lebih padat, batasnya tidak teratur dan berwarna gelap (hiperkromatik), proses ini dinamakan piknosis dan intinya disebut piknotik. Selai itu inti dapat hancur, robek dan meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar di dalam sel, proses ini disebut karioreksis. Pada beberapa keadaan, inti sel yang mati kehilangan kemampuan untuk diwarnai sehingga menjadi pucat dan menghilang begitu saja atau tidak nyata, proses ini disebut kariolisis (Price dan Lorraine, 2006).

Radikal hidroksil sebagai sumber ROS yang berasal dari kaporit akan menyebabkan stress oksidatif pada sel hepatosit. Peningkatan stres oksidatif menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel hepar yang ditandai dengan piknosis, kariolisis, dan karioreksis. Tingginya stres oksidatif disebabkan karena rendahnya aktivitas antioksidan yang ada di dalam tubuh tikus serta didukung oleh kadar MDA sebagai hasil akhir dari peroksidasi lipid (Winarsi, 2007).

5.3 Hubungan Antara Kadar MDA Dengan Tingkat Kerusakan Organ Hepar Akibat Paparan Klorin Berlebih

Berdasarkan penelitian ini menunjukkan bahwa emakin tinggi konsentrasi zat toksik yang diberikan yaitu berupa klorin maka akan semakin tinggi tingkat kerusakan sel tersebut (Loomis, 1987). Kerusakan sel tersebut dapat dilihat dari peningkatan kadar MDA dan histopatologi organ hepar yang mengalami nekrosis, kongesti sinusoid, dan pelebaran sinusoid.

Jika diamati pada histopatologi hepar pada kelompok tikus kontrol negatif hasilnya yaitu normal. Terlihat pada histopatologi yang normal yaitu sel tersusun secara radier, bentuk inti sel bulat, serta terdapat lempeng-lempeng hepatosit, serta sinusoid yang tidak melebar. Sehingga rata-rata kadar MDA yang tinggi pada hepar tikus kelompok kontrol negatif termasuk keadaan yang normal karena jika dibandingkan dengan pengamatan histopatologi hasilnya tidak terjadi perubahan dan abnormalitas (Sulistianto dkk., 2004).

Dampak dari pemberian klorin berlebih pada tikus putih (*Rattus novergicus*) selain terjadinya kerusakan pada organ hepar berupa peningkatan kadar MDA dan kerusakan hepatosit, terjadi kerusakan pada organ lambung, jejenum, dan ginjal. Pada organ lambung terjadi peningkatan kadar MDA sebesar 679,9 ng/mL dan terjadi kerusakan deskuamasi epitel, infitrasi sel radang dan vasodilatasi (Anwarifan, 2019). Pada organ jejunum dapat merubah profil protein jejenum dengan massa molekul 75 kDa dan 43 kDa diekspresikan lebih banyak sebagai *heat shock protein* dan diekspresikan protein dengan massa molekul 60 kDa yang merupakan protein penanda

terjadinya inflamasi dan kerusakan pada tunika mukosa terutama di bagian vili jejenum mengalami erosi, ruptur, dan adanya sel radang (Kristiani, 2019). Pada organ ginjal terjadi peningkatan aktivitas protease yang disebabkan oleh penurunan antioksidan glutathione akibat ROS yang disebabkan oleh asam hipoklorit serta terjadi kerusakan pada glomerulus, kapsula bowman, dan akumulasi sel radang (Cleopatra, 2019). Kerusakan-kerusakan organ seperti lambung, jejunum, hati, dan ginjal membuktikan bahwa pemberian klorin berlebih dapat menyebabkan gangguan kesehatan, sehingga penggunaan klorin untuk desinfeksi air perlu mengikuti persyaratan kualitas air minum dari peraturan menteri kesehatan yaitu konsentrasi klorin di dalam air tidak boleh lebih dari 5 ppm (Permenkes, 2010).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang dapat diamati dari peningkatan senyawa MDA (malondialdehid) pada organ hepar tikus putih (*Rattus novergicus*).
2. Pemberian klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm mengakibatkan kerusakan pada sel hepar yang ditandai dengan nekrosis, pelebaran sinusoid, dan kongesti pada sinusoid pada pengamatan histopatologi organ hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai terapi yang dapat diberikan pada penelitan pemberian klorin berlebih pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) .

Daftar Pustaka

Adji, D. 2008. *Hubungan Konsentrasi Malondialdehid, Glukosa dan Total Kolestrol pada TIkus Putih yang Diinduksi Streopzotocin.* Jurnal Sains : Vol. 26.

Akhlaghi, M., Brian, B. 2009. *Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.

Albano E. 2006. Alcohol, *oxidative stress and free radical damage*. Nutrition Society.

Al-Dabbas, M.M., Suganuma, T., Kitahara, K., Hou, D.X. & Fujii, M. 2006. *Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of Varthemia iphionoides Boiss extracts*. Journal of Ethnopharmacology.

Aulanni'am, R. Anna and N. L., Rahmah, 2012, *The Potency of Sargaasum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in* (*Rattus novergicus*). Journal of Life Sciences.

Amalina, N. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Valerian (Valeriana officinalis) terhadap Hepar Mencit Balb/C. Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.

Anwarifan. 2019. *Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih terhadap Kadar Mda dan Gambaran Histopatolgi Organ Lambung Pada Tikus* (*Rattus norvegicus*). Malang: Universitas Brawijaya.

Baret, J.M., Peter Abramoff, Kumaran, A.K., and Millington, W.F. 2004. Biology. New Jersey: Prentice Hall.

Barnett S, Anthony. 2002. *The Story of Rats: Their Impact on Us and Our Impact on Them*. Crows Nest NSW: Allen & Unwin

Bender DA. 2009. *Free Radicals an Antioxidant Nutrients*. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illuustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange.

Burchman P.C. 1998. *Genotoxic lipid peroxidation products : their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts*. Mutagenesis.

Cleopatra, Dinda T. 2019. *Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Aktivitas Protease Dan Gambaran Histopatolgi Organ Ginjal Pada Tikus (Rattus Norvegicus)*. Malang : Universitas Brawijaya

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D., 2004, *Free Radicals and Antioxidants in Human Health*: Current Status and Future Prospects, J Assoc Physicians India.

Dyah, N. W. dan R. Sondakh, 2009. *Hubungan Struktur, Metabolisme, dan Aktivitas Obat*. Kimia Medisinal. Surabaya: Airlangga University Press.

Fitmawati, Titrawani, Welly Safitri. 2018. *Struktur Histologi Hati Tikus Putih (Rattus Norvegicus Berkenhout 1769) Dengan Pemberian Ramuan Tradisional*. Riau : Ekotonia

Francisco J.S, Waldo L, Garcia J, Isadora L, Karin S. 2018. *Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in Leishmania donovaniinfected BALB/c mice*:a time-course study. Parasites Vector J.

Fuadi, Azhar. 2012. *Pengaruh Residual Klorin Terhadap Kualitas Mikrobiologi Pada Jaringan Distribusi Air Bersih*. Depok : FT Lingkungan UI

Halliwel, B., & J.M.C. Gutteridge. 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.

Hasan, achmad. 2006. *Dampak Penggunaan Klorin*. Deputi Teknologi Informasi, Energi, Material dan Lingkungan.

Himawan, S. 1992. *Kumpulan Kuliah Patologi*. UI Press, Jakarta.

Iji, T.O., Oyagbemi, A.A. & Azeez, O.I., 2013. *The effects of prolonged oral administration of the disinfectant calcium hypochlorite in Nigerian commercial cockerels'*, Journal of the South African Veterinary Association

Inal, M.E., K. Gungör., and S. Emine. 2001. *Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Levels Related to Aging*. Clinica Chimica Acta.

Joko, Tri. 2010. Unit *Air Baku Dalam Sistem Penyediaan air Minum*. Yogyakarta. Graha Ilmu.

Junqueira, L. C. and Carneiro, J. 2005. *Basic Histology*. Mc Graw Hill Companies Inc. America

Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.

Kristiani, Yohana N. 2019. *Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ($Ca(Clo)_2$) Berlebih Terhadap Profil Protein Dan Histopatologi Jejenum Pada Tikus Putih* (*Rattus Norvegicus*). Malang : Universitas Brawijaya.

Kunwar, A., & Priyadarsini, K. I., 2011. *Free Radicals, Oxidative Stress And Importance Of Antioxidants In Human Health*, J Med Allied Sci.

Kumar V, Cotran RS, Robbins RL. 2007. *Hati dan saluran empedu*. Dalam : Hartanto H, Darmaniah N, Wulandari N, editor. Buku Ajar Patologi Robbins. Ed 7. EGC

Koolman, J and Roehm, KH. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme

Lestari, D. E., Utomo, S.B, Sunarko, Virkyanov. 2008. *Pengaruh Penambahan Biosida Pengoksidasi Terhadap Kandungan Klorin untuk Pengendalian*

Pertumbuhan Mikroorganisme pada Air Pendingin Sekunder RSG-GAS. Pusat Reaktor Serba Guna BATAB. Kawasan Puspitek Serpong. Tangerang

Li J-H, Wang Z-H, Zhu X-J, Deng Z-H, Cai C-X, Qiu L-Q, et al. 2015.*Health Effects from Swimming Training in Chlorinated Pools and the Corresponding Metabolic Stress Pathways*. PLoS ONE

Llurba, E.,Grataco,E., Galla, M.P., Caberol, Dominguez, C., 2004. *A Comprehensive Study of Oxidative Stress and AntioxidantStatus in Preeclamsia and Normal Pregnancy.Free Radical Biology & Medicine*; 37(4): 557-70.

Lumongga, Fitriani. 2008. *Struktur Liver*. Medan : FK Universitas Umatera Utara

Lombardi, M.E., Ladman, B.S., Alphin, R.L. & Benson, E.R., 2008. *Inactivation of avian influenza virus using common detergents and chemicals*. Avian Disease.

Loomis, T.A. W.Hayes, 1987. *Essential of Toxicology*. Academic Press. California.

Lykkesfeldt, Jens, 2007, *Malondialdehyde As Biomarker Of Oxidative Damage to Lipids Caused by Smoking*, Clinica Chimica Acta.

Makker K, Agarwal A, Sharma R. 2009. *Oxidative stress and male infertility*. Indian J Med Res.

Maula, Indah F. 2014. *Uji antifertilitas ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar pada Tikus Putih Jantan.* Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.

Mescher, A. L. 2012. *Histologi Dasar Junqueira: Teks dan Atlas*. Edisi ke 12. EGC. Jakarta

Mutaqin dkk., 2012. *Analisis Lipid Peroksida Hati Tikus Hiperkolesterolemia Pasca Terapi Ekstrak Kulit Kayu Mahoni*. Bogor : IPB

Murray K, robert *et al*. 2003. *Metabolism Glikogen*. Harper's ilustrated Biochemistry, McGraw-Hill Companies, USA.

Nur Aditya. 2017. *Keracunan Air Minum, Pekerja Perusahaan Kayu Di Samarinda Mual & Muntah*. Samarinda : Merdeka.

Oktavianti, R. 2005. *Struktur Hepar Mencit (Mus musculus L.) setelah Pemberian Aspartam Secara Oral*. Enviro.

Oktrian dkk., 2013. *Pengaruh Ekstrak Biji Jengkol Terhdap Kadar MDA Hati Dari Spargue Dawley Yang Diberikan CCl4*. Jakarta : FKUI

Oleg M. Panasenko. 1997. BioFactors. *The Mechanism of The Hypochlorite-induced lipid peroxidation*. Malaya Pirogovskaya Moscow, Russia

Permana, Zurida. 2010. *Konsumsi, Kecernaan dan Performa Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Disuplementasi Biomineral Cairan Rumen dalam Ransum.* Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Permenkes. 2010. *Persyaratan Kualitas Air Minum*. Menteri Kesehatan Republik Indonesia.

Pribadi, F.W., & D.A. Ernawati. 2010. *Efek Cathecin Kadar Asam Urat, C-Reaktive Protein (CRP) dan Malondialdehid Darah Tikus Putih (Rattus novergicus) Hiperurisemia*. Mandala of Health.

Price, S.A., dan Lorraine M.W. 2006. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta : EGC.

Regulated EU. 2009. *Active Chlorine Released From Calcium Hypochlorite*. European Parliament and of the Council.

Rodriguez, M.J dan Serodes J.B. 2001. *Assessing Empirical Linier and Non Linier Modelling of Residual Chlorine in Urban Drinking water System*. Environmental Modeling and Software.

Ross, M. H. and Pawlina, W.2011. *Histology:A Text and Atlas*. Lippincott, William & Wilkins. Philadelphia.

Rosyidah, I'anatur. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L.) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) DAN Malondialdehide (MDA) Mammae Mencit (Mus musculus) Betina Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen (DMBA) SECARA In Vivo*. Malang : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim

Ruswandi, D. 2005. *Penghambatan peroksidasi lipid oleh Ekstrak Buah Mahkota Dewa Pada Gangguan Fungsi Hati Tikus Akibat Parasetamol*. Bogor : FMIPA IPB

Samuelson, D. A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier. St. Louis, Missouri.

Schenck, K.M., Sivaganesan, M. & Rice, G.E., 2009, 'Correlations of water quality parameters with mutagenecity of chlorinated drinking water samples', Journal of Toxicology and Environmental Health

Semenza, J.C., Roberts L., Henderson, A., Bogan, J. Rubin, C. H., 1998, '*Water distribution system and diarrheal disease transmission*: A case study in Uzbekistan', American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Schneider, C.D., Alvaro, R.O. 2004. *Oxygen Free Radicals and Exercise:Mechanism of Synthesis and Application to the Physical Training*. Rev Bras Mod Esporte Vol:10 No.4.

Setiawan, Dwi. 2009. *Analisis Kuantitas Dan Kualitas Air Bersih Pelanggan Pdam Kota Surakarta Di Kelurahan Pucang Sawit.* Surakarta : Universitas Sebelas Maret

Sinuhaji, DN. 2009. *Perbedaan Kandungan Klorin (Cl2) pada Beras Berklorin Sebelum dan Sesudah Dimasak*. Medan: Universitas Sumatera Utara

Smith, Jerry. 2008. *Dangers of Chlorine*. Natural Health and Organic Living. Global Healing Centre

Soemrat. 2003. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: UGM Press.

Spickett, C.M., Jerlich, A., Panasenko, O.M., Arnhold, J., Pitt, A.R., Stelmaszynska, T. & Schaur, R.J., 2000. *The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids.* Acta Biochimica Polonica.

Sudiono, J., B. Kurniadhi, A. Hendrawan, dan B. Djimantoro. 2003. *Ilmu Patologi*. Kedokteran EGC, Jakarta.

Sulistianto DE, Harini M, Handajani NS. 2004. *Pengaruh pemberian ekstrak buah mahkota dewa [Phaleria macrocarfa (Scheff) Boerl] terhadap struktur histopatologis hepar tikus (Rattus norvegicus L.) setelah perlakuan dengan karbon tetraklorida (CCl4) secara oral*. Bogor: Universitas Sebelas Maret.

Suryohudoyo, P. 2000. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Perpustakaan Nasional RI. Jakarta. Penerbit CV Sagung Seto.

Teddy Permana, Dyah Suryani. 2013. *Hubungan Sisa Klor Dengan Keluhan Iritasi Kulit dan Mata Pada Pemakai Kolam Renang Hotel Di Wilayah Kota Yogyakarta*. KES MAS.

Vaya, J., dan Aviram, M., 2001. *Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications*.Curr. Med. Chem.-Imm, Endoc. and Metab.

Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

Wulandari, T., M. Harini, S. Listyawati. 2007. *Pengaruh Ekstrak Daun Sambiloto (Andrographis paniculata) terhadap Struktur Mikroanatomi Hepar dan Kadar Glutamat Piruvat Transaminase Serum Mencit (Musmusculus) yang Terpapar Diazinon*. Bioteknologi.

Wiryawan, W. 2003. *Rendahnya kualitas air dan permasalahan yang dapat ditimbulkannya* . Infovet

Yuningsih, 2005. *Pengaruh Cemaran Beberapa Senyawa Toksik dalam Air Minum lerhadap Ternak*. Bogor : Balai Penlitian Veteriner

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Laik Etik

KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 1028-KEP-UB

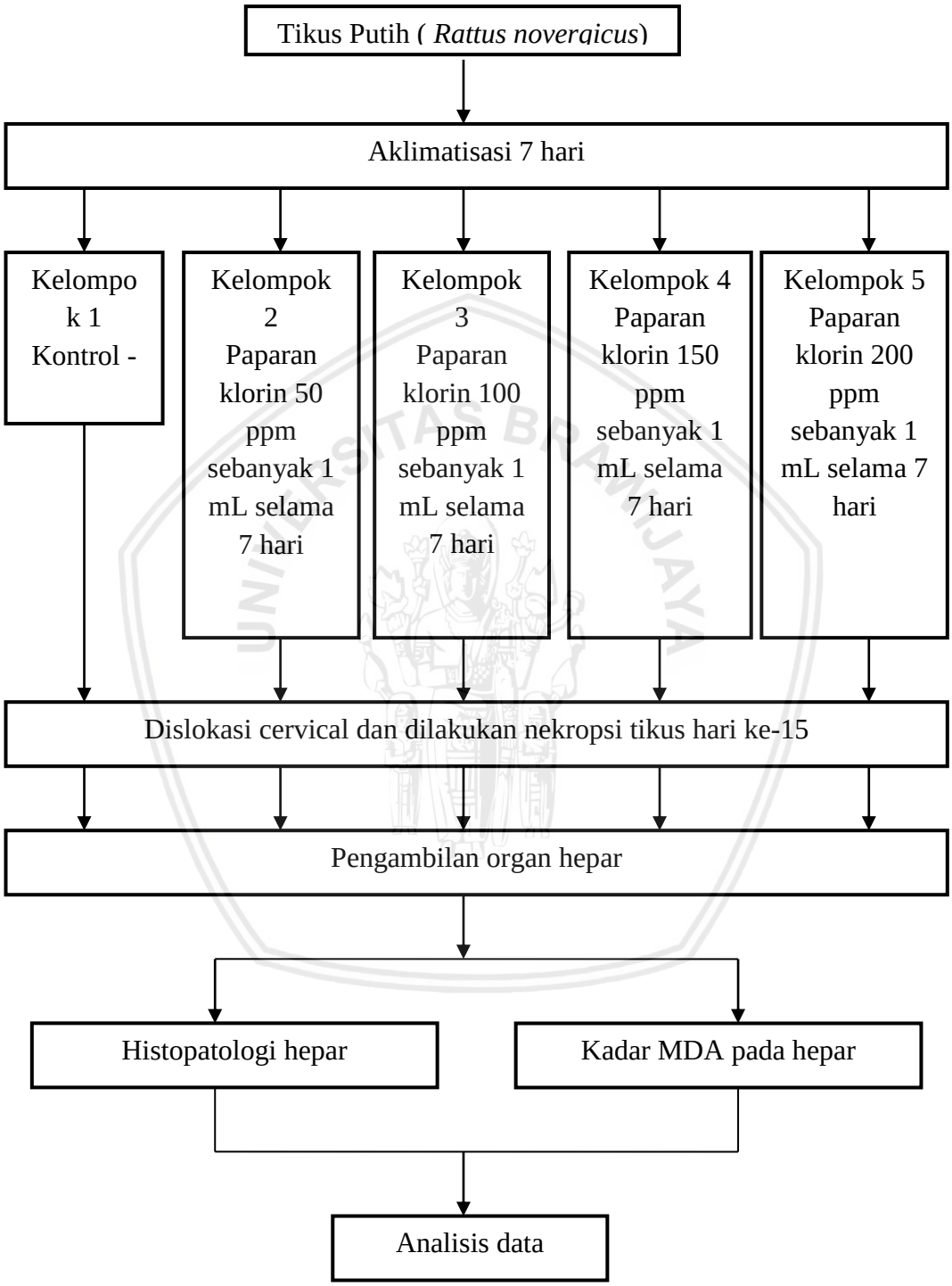
KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	**: PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN GINJAL PADA TIKUS *(Rattus norvegicus)***
PENELITI	**: DINDA TRI CLEOPATRA**
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	**: UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
DINYATAKAN	**: LAIK ETIK**

Malang, 25 Oktober 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

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

Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



Lampiran 3. Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

3.1 Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

Preparat

- Dideparafinisasi dengan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit
- Dilakukan dehidrasi dengan ethanol absolut sebanyak 3 kali dan Ethanol bertingkat (95%,90%,80%,70%) masing-masing 5 menit
- Direndam dalam akuades

Preparat

- Diwarnai dengan Hematoxylen selama 10 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dengan aquades selama 5 menit. Langkah selanjutnya
- Diwarnai dengan Eosin selama 5 menit lalu direndam kedalam aquades
- Dimasukan ke dalam ethanol absolut bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) masing-masing selama 10 menit sebagai proses dehidrasi
- Dimasukan kedalam ethanol absolut selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Dimasukkan ke dalam xylol (I dan II) selama 5 menit sebanyak 2 kali dan dikeringkan
- Dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup cover glass
- Dimounting dengan entelan
- Diamati dibawah mikroskop cahaya

Preparat Hasil HE

Lampiran 4. Perhitungan Senyawa Klorin $Ca(OCl)_2$ Granular

$Ca(ClO)_2$ = 0,949 g/ 1 g senyawa

Setelah melalui titrasi didapatkan hasil dalam $Ca(ClO)_2$ mengandung 95% Cl_2

- Jumlah senyawa untuk membuat 50 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{50}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{50}{x}$$

$$71x = 50 \text{ x } 143$$

$$x = \frac{50\ x\ 143}{71}$$

$$x = 100{,}704\ mg$$

$$50\ ppm = 0{,}01007 \text{ g / 100 mL}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 100 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{100}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{100}{x}$$

$$71x = 1000 \text{ x } 143$$

$$x = \frac{100\ x\ 143}{71}$$

$$x = 201{,}408\ mg$$

$$100\ ppm = 0{,}020140 \text{ g / 100 mL}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 150 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{150}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{150}{x}$$

$$71x = 150 \text{ x } 143$$

$$x = \frac{150\ x\ 143}{71}$$

$$x = 302{,}112\ mg$$

$$150\ ppm = 0{,}03021 \text{ g / 100 mL}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 200 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{200}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{200}{x}$$

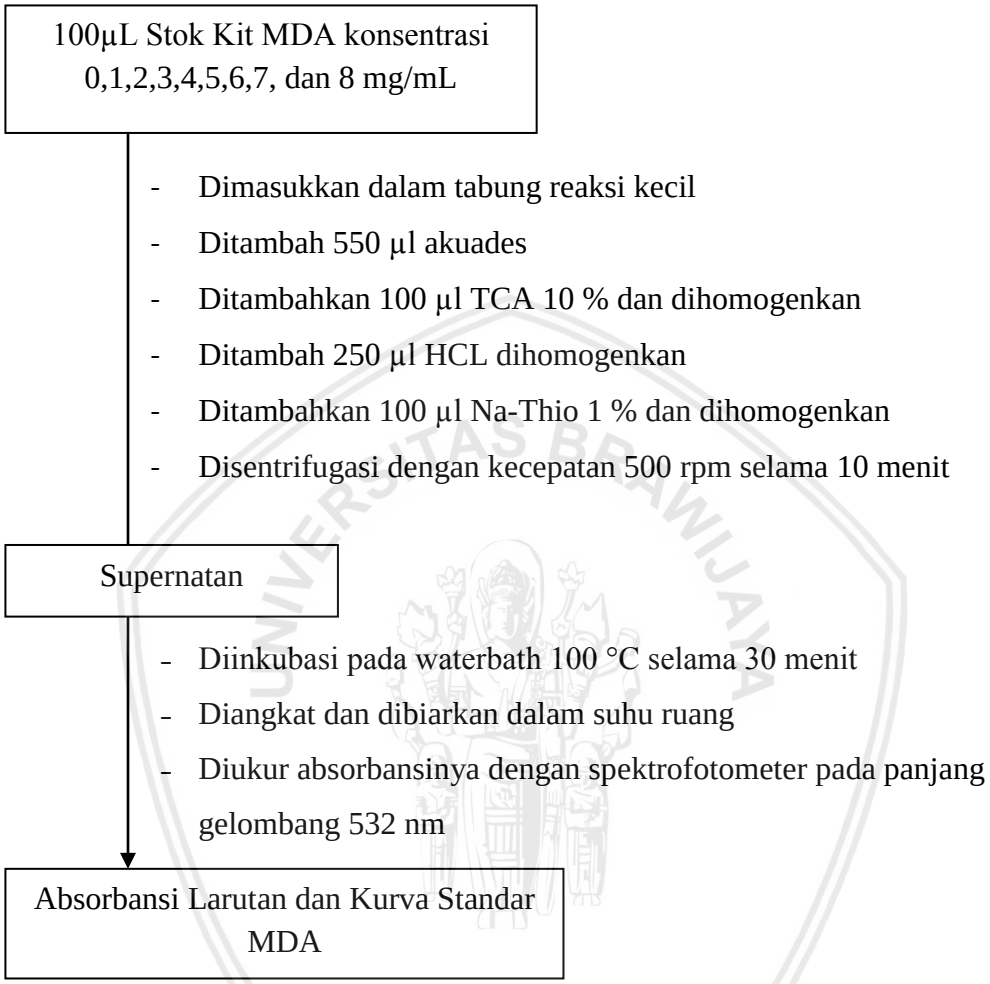
$$71x = 200 \text{ x } 143$$

$$x = \frac{200\ x\ 143}{71}$$

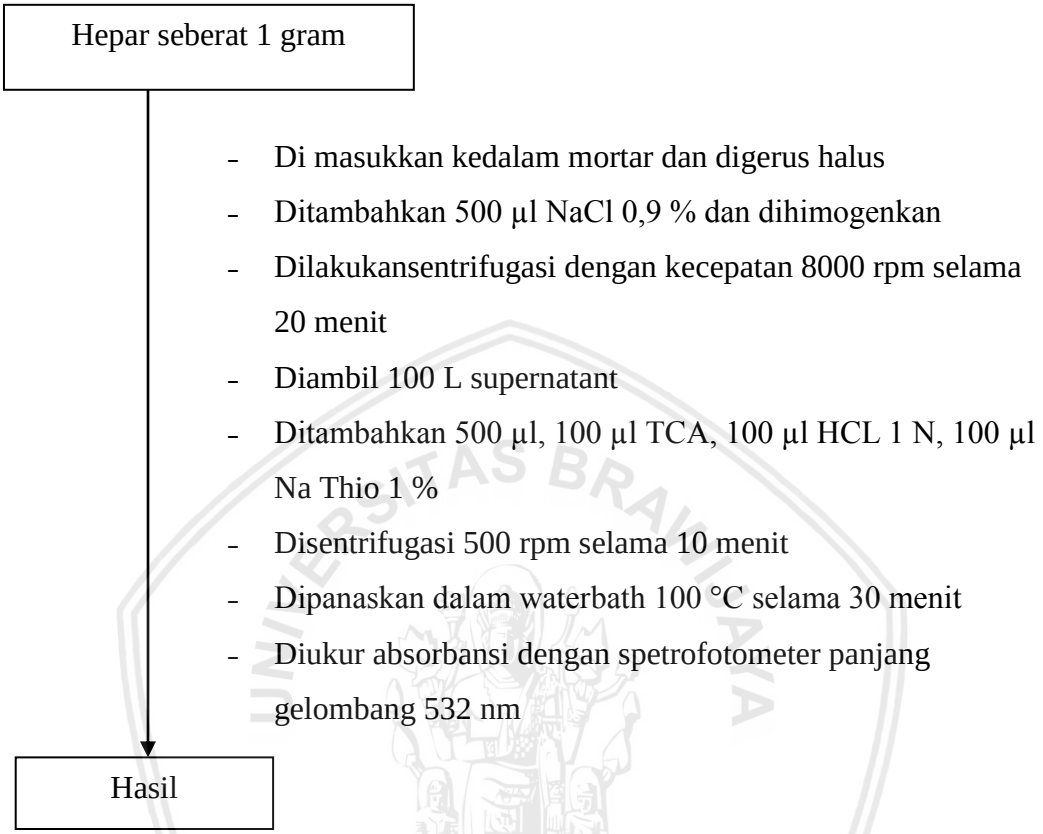
$$x = 402{,}816\ mg$$

$$200\ ppm = 0{,}040281 \text{ g / 100 mL}$$

Lampiran 5. Pembuatan Kurva Standar MDA



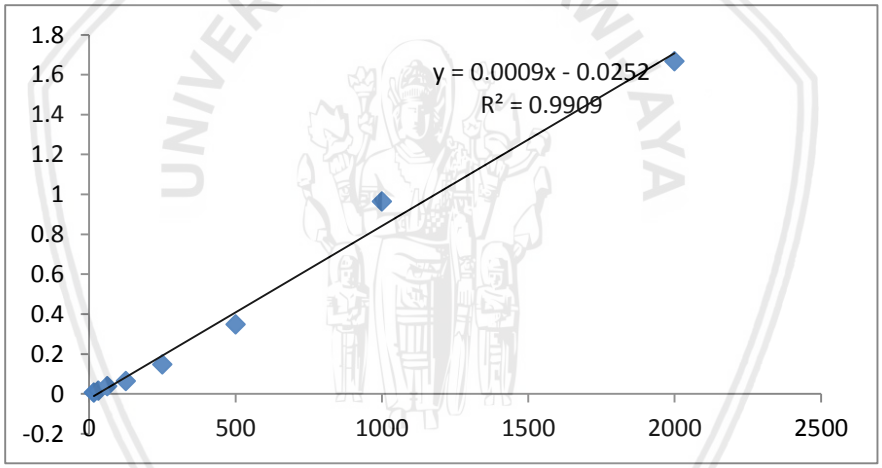
Lampiran 6. Pengukuran Kadar MDA Hepar



Lampiran 7. Perhitungan kadar MDA (Malondialdehida)

Tabel 7.1 Tabel dan Kurva Standar Absorbansi

No	Kadar (ng/ml)	Abs
1	16,125	0,006
2	31,25	0,016
3	62,5	0,038
4	125	0,064
5	250	0,148
6	500	0,348
7	1000	0,964
8	2000	1,668



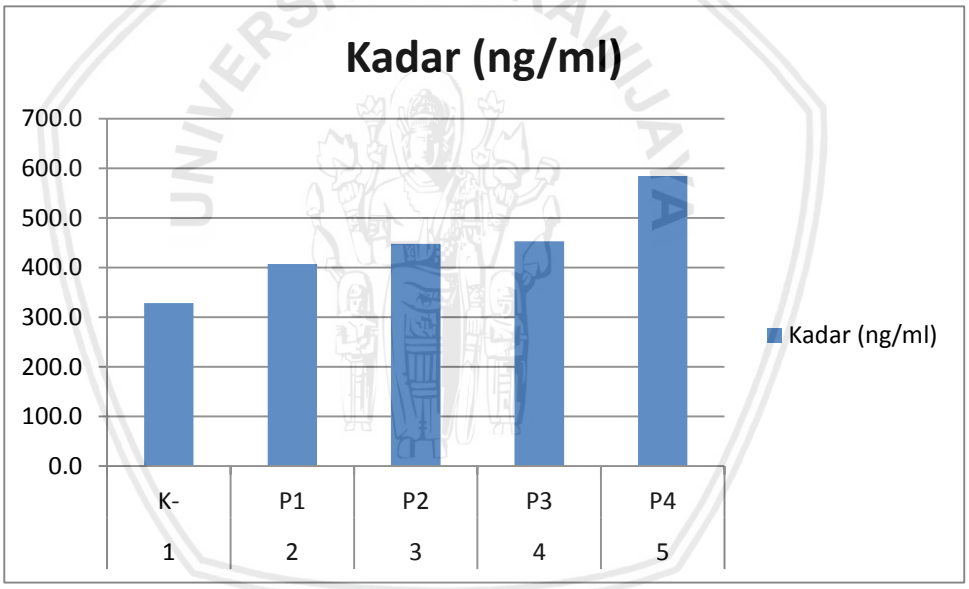
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Tabel 7.2 Tabel Kadar MDA berdasarkan nilai Absorbansi

No	Kode	Abs	Kadar (ng/ml)
1	K-1	0,246	301,3
2	K-2	0,271	329,1
3	K-3	0,262	319,1
4	K-4	0,284	343,6
Rata-rata			**323,3**
5	P1.1	0,345	411,3
6	P1.2	0,291	351,3
7	P1.3	0,334	399,1
8	P1.4	0,394	465,8
Rata-rata			**406,9**
9	P2.1	0,482	563,6
10	P2.2	0,341	406,9
11	P2.3	0,335	400,2
12	P2.4	0,353	420,2
Rata-rata			**447,7**
13	P3.1	0,397	469,1
14	P3.2	0,334	399,1
15	P3.3	0,351	418,0
16	P3.4	0,448	525,8
Rata-rata			**453,0**
17	P4.1	0,628	725,8
18	P4.2	0,457	535,8
19	P4.3	0,432	508,0
20	P4.4	0,486	568,0
Rata-rata			**584,4**

Tabel 7.3 Tabel Rata-Rata Kadar MDA dan Diagram Kadar MDA

No	Kode	Kadar (ng/ml)
1	K-	323,3
2	P1	406,9
3	P2	447,7
4	P3	453,0
5	P4	584,4



Lampiran 8. Uji statistik kadar MDA

Tabel 8.1 Uji Normalitas Data

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Konsentrasi Klorin	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	Kontrol (-)	,235	4	.	,893	4	,396
	P1 50 ppm	,213	4	.	,981	4	,909
	P2 100 ppm	,388	4	.	,724	4	,021
	P3 150 ppm	,231	4	.	,943	4	,671
	P4 200 ppm	,317	4	.	,845	4	,209

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 8.2 Tabel Deskriptif ANOVA

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	4	323,2750	17,77046	8,88523	294,9982	351,5518	301,30	343,60
P1 50 ppm	4	406,8750	47,04880	23,52440	332,0099	481,7401	351,30	465,80
P2 100 ppm	4	447,7250	77,69588	38,84794	324,0935	571,3565	400,20	563,60
P3 150 ppm	4	453,0000	56,83092	28,41546	362,5693	543,4307	399,10	525,80
P4 200 ppm	4	584,4000	97,40267	48,70133	429,4106	739,3894	508,00	725,80
Total	20	443,0550	104,34523	23,33230	394,2199	491,8901	301,30	725,80

Tabel 8.3 Tabel Homogenitas varian

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,695	4	15	,203

Tabel 8.4 Tabel ANOVA

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	143021,447	4	35755,362	8,400	,001
Within Groups	63849,182	15	4256,612		
Total	206870,629	19			

Tabel 8.5 Tabel Perbandingan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

Tukey HSD

(I) Konsentrasi Klorin	(J) Konsentrasi Klorin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-)	P1 50 ppm	-78,60000	45,92392	,456	-220,4096	63,2096
	P2 100 ppm	-119,45000	45,92392	,120	-261,2596	22,3596
	P3 150 ppm	-124,72500	45,92392	,098	-266,5346	17,0846
	P4 200 ppm	-256,12500*	45,92392	,000	-397,9346	-114,3154
P1 50 ppm	Kontrol (-)	78,60000	45,92392	,456	-63,2096	220,4096
	P2 100 ppm	-40,85000	45,92392	,896	-182,6596	100,9596
	P3 150 ppm	-46,12500	45,92392	,849	-187,9346	95,6846
	P4 200 ppm	-177,52500*	45,92392	,011	-319,3346	-35,7154
P2 100 ppm	Kontrol (-)	119,45000	45,92392	,120	-22,3596	261,2596
	P1 50 ppm	40,85000	45,92392	,896	-100,9596	182,6596
	P3 150 ppm	-5,27500	45,92392	1,000	-147,0846	136,5346
	P4 200 ppm	-136,67500	45,92392	,061	-278,4846	5,1346
P3 150 ppm	Kontrol (-)	124,72500	45,92392	,098	-17,0846	266,5346
	P1 50 ppm	46,12500	45,92392	,849	-95,6846	187,9346
	P2 100 ppm	5,27500	45,92392	1,000	-136,5346	147,0846
	P4 200 ppm	-131,40000	45,92392	,076	-273,2096	10,4096
P4 200 ppm	Kontrol (-)	256,12500*	45,92392	,000	114,3154	397,9346
	P1 50 ppm	177,52500*	45,92392	,011	35,7154	319,3346
	P2 100 ppm	136,67500	45,92392	,061	-5,1346	278,4846
	P3 150 ppm	131,40000	45,92392	,076	-10,4096	273,2096

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

Tabel 8.6 Homogeneous Subset

MDA

Tukey HSD[a]

Konsentrasi Klorin	N	Subset for alpha = 0.05	
		a	b
Kontrol (-)	4	328,2750	
P1 50 ppm	4	406,8750	
P2 100 ppm	4	447,7250	447,7250
P3 150 ppm	4	453,0000	453,0000
P4 200 ppm	4		584,4000
Sig.		,098	,061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Tabel 5.3 Jumlah Sel Nekrosis

Kelompok Perlakuan	Lapang Pandang	Jumlah Sel Normal	Jumlah Sel nekrosis	Rata-rata sel nekrosis
K-	I	62	15	16,3
	II	56	13	
	III	67	21	
P1 50 ppm	I	21	39	36
	II	18	46	
	III	28	23	
P2 100 ppm	I	23	65	53
	II	34	38	
	III	19	56	
P3 150 ppm	I	18	69	65,3
	II	26	54	
	III	23	73	
P4 200 ppm	I	11	86	77,3
	II	23	77	
	III	16	69	