



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SPONGE *HALICLONA* SP
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT SWISS**

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk Memenuhi Tugas dan Melengkapi Persyaratan
dalam Menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran

Disusun oleh:
ARI SARININGRUM
NIM. G2A 004 023

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

HALAMAN PENGESAHAN

Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge *Haliclona* sp terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Swiss

yang disusun oleh:

Ari Sariningrum

NIM. G2A 004 023

Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Artikel Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 23 Agustus 2008 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

TIM PENGUJI ARTIKEL

Penguji,

Pembimbing,

dr. Udadi Sadhana, M.Kes, Sp.PA
NIP. 131 967 650

dr. Neni Susilaningsih, M.Si
NIP. 131 832 243

Ketua Penguji,

dr. Hermina Sukmaningtyas, Sp.Rad
NIP.132 205 006

The Effects of Sponge Haliclona sp Extract on Histopathological Appearance of Swiss Mice Liver

Ari Sariningrum¹⁾, Neni Susilaningsih²⁾

ABSTRACT

Background: *Sponge Haliclona sp* is one of marine organisms that rich in active metabolites with anticancer potency. Eventhough it has been proven as one of the toxic organism, it only had in vitro toxicity study. This research aimed to investigate the effects of sponge *Haliclona sp* extract administration on histopathological appearance of Swiss mice liver.

Method: An experimental post test only control group design research was applied in 25 male and 25 female Swiss mice. They were divided into 2 control groups (K) and 3 treatment groups (P). K1 and K2 were administrated by food pellets contained ethanol and daily food pellets only respectively. P1, P2, and P3 treated by level dose ethanol extract of sponge *Haliclona sp*: 0,15 mg; 1,5 mg; and 15 mg in 0,5 g food pellets daily. After 3 months (subchronic) treatment period, histopathological appearances were examined and the index of histopathology was assesed by using modified Knodell Score System (HAI).

Result: P3 index histopathological median that valued 0,10 (0,080; 0,140) was the highest value of all median. Then from the lowest median, respectively: P2 (0,10); P1 (0,08); K2 (0,08); and K1 (0,06) Kruskal Wallis presented no significant differences ($p = 0,058$).

Conclusion: No significant difference between liver histopathological appearance of Swiss mice administrated by sponge *Haliclona sp* extract and control group after 3 months (subchronic) period.

Key Words: *Sponge Haliclona sp*, liver histopathological appearance, toxicity

¹⁾ Student of Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang

²⁾ Staff on Histology Department Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang

Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge *Haliclona* sp Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Swiss

Ari Sariningrum¹⁾, Neni Susilaningsih²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Sponge *Haliclona* sp merupakan salah satu biota laut yang kaya akan metabolit aktif, salah satunya sebagai antikanker. Sponge *Haliclona* sp merupakan spesies toksik, sementara studi mengenai toksisitasnya masih dilakukan secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak sponge *Haliclona* sp terhadap gambaran histopatologi hepar mencit Swiss.

Metode: Suatu penelitian eksperimental *Post Test Only Control Group Design* dilakukan pada 25 ekor mencit Swiss jantan dan 25 ekor mencit Swiss betina, dibagi menjadi 2 kelompok kontrol (K) dan 3 kelompok perlakuan (P) yang ditentukan secara acak. K1 diberi pakan yang mengandung etanol sebagai pelarut sedangkan K2 hanya diberi pakan standar. P1, P2, dan P3 diberi pakan perlakuan dengan ekstrak etanol dari sponge *Haliclona* sp dengan dosis masing-masing: 0,15 mg; 1,5 mg; dan 15 mg dalam 0,5 gram pakan standar setiap harinya. Setelah perlakuan selama 3 bulan (subkronik), dilakukan pemeriksaan histopatologi hepar dan dinilai indeks histopatologinya dengan modifikasi sistem *Knodell Score (HAI)*.

Hasil: Median dari indeks histopatologi P3 sebesar 0,10 (0,080; 0,140) paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lain. Kemudian berturut-turut ke median yang terendah adalah P2 (0,10); P1 (0,08); K2 (0,08); K1 (0,06). Uji Kruskal Wallis tidak didapatkan perbedaan bermakna ($p = 0,058$).

Simpulan: Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada gambaran histopatologi hepar mencit Swiss yang diberi ekstrak sponge *Haliclona* sp dibandingkan dengan kelompok kontrol setelah pemberian perlakuan selama 3 bulan (subkronik).

Kata Kunci: Sponge *Haliclona* sp, gambaran histopatologi hepar, toksisitas

¹⁾Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²⁾Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Penggunaan obat dalam terapi kedokteran semakin berkembang. Berbagai bahan untuk obat dapat didapatkan, salah satunya berasal dari bahan alam.¹ Pengembangan obat baru yang berasal dari biota laut saat ini menjadi perhatian seluruh peneliti kimia bahan alam. Hal ini dikarenakan tingginya keanekaragaman hayati laut yang belum dimanfaatkan secara optimal dan uniknya struktur metabolit sekunder yang dihasilkannya. Salah satu potensi metabolit ini adalah sebagai antikanker yang penelitiannya mengalami perkembangan pesat.²⁻⁵

Sponge *Haliclona* sp merupakan salah satu biota laut yang kaya akan metabolit aktif, yaitu *Haliclonyclamine A* dan *Haliclonyclamine B* yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor.^{6,7} Biota laut yang biasa disebut spon laut ini merupakan spesies yang toksik, sementara studi mengenai toksisitasnya masih dilakukan secara *in vitro*.^{8,9}

Pada dasarnya semua obat yang masuk ke dalam tubuh adalah senyawa toksik sehingga perlu diketahui toksisitasnya terhadap tubuh.¹⁰ Penggunaan obat sebagai antikanker memerlukan waktu yang relatif panjang,¹¹ untuk itu perlu dilakukan uji toksisitas subkronik dengan memberikan dosis berulang selama 13 minggu (3 bulan) pada hewan uji.¹²

Toksitas suatu zat dapat diidentifikasi melalui target organ dengan berbagai parameter, salah satunya adalah dengan melihat gambaran histopatologi organ tersebut. Hepar merupakan target organ untuk berbagai macam bahan kimia. Hal ini dikarenakan hampir semua zat dimetabolisme di hepar sebelum

dieliminasi oleh tubuh. Kerusakan sel hepar tidak hanya tergantung dari agen yang diberikan tapi juga lama pemberiannya.¹²

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak sponge *Haliclona* sp terhadap gambaran histopatologi hepar mencit Swiss.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Besar sampel penelitian ditentukan berdasar kriteria WHO, yaitu minimal 5 ekor binatang coba tiap satu kelompok perlakuan. Sampel penelitian ini adalah 25 ekor mencit Swiss jantan dan 25 ekor mencit Swiss betina, dengan kriteria umur 5 – 6 minggu (mencit dewasa), berat badan 20 – 25 gram, selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*. Penelitian ini menggunakan mencit jantan dan betina dengan tujuan untuk menghindari bias karena faktor gender yang berhubungan dengan hormon.

Mencit jantan dikandangan secara terpisah dengan mencit betina. Mencit tersebut dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang ditentukan secara acak. Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor mencit yang terdiri dari 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina. Kelompok kontrol terdiri dari K1 dan K2, sedangkan kelompok perlakuan terdiri dari P1, P2, dan P3. K1 diberi pakan yang mengandung etanol sebagai pelarut sedangkan K2 hanya diberi pakan

standar. P1, P2, dan P3 diberi pakan perlakuan dengan ekstrak etanol dari sponge *Haliclona* sp dengan dosis masing-masing: 0,15 mg; 1,5 mg; dan 15 mg dalam 0,5 gram pakan standar. Perlakuan diberikan setelah mencit dipuasakan selama 1 jam. Penentuan dosis pada penelitian ini berdasarkan perhitungan hasil konversi nilai IC_{50} ekstrak sponge *Haliclona* sp terhadap sel kanker leukemia (L-1210 *cell line*) yang kemudian diaplikasikan pada mencit (lampiran I).

Setelah perlakuan selama 3 bulan, mencit diterminasi, kemudian diambil heparnya untuk dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE. Dari setiap preparat organ diamati di bawah mikroskop dalam 5 lapangan pandang, yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat, dengan perbesaran 400x. Data yang dikumpulkan berupa data primer dari hasil penilaian gambaran histopatologi hepar mencit Swiss, kemudian dinilai indeks histopatologinya. Indeks histopatologi hepar dinilai dengan modifikasi sistem *Knodell Score* (lampiran II).

Normalitas distribusi data dianalisis dengan uji Saphiro Wilk. Hasil analisis menunjukkan distribusi data tidak normal sehingga dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis. Nilai p bermakna jika $p > 0,05$. Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan program SPSS 15.0 for Windows.

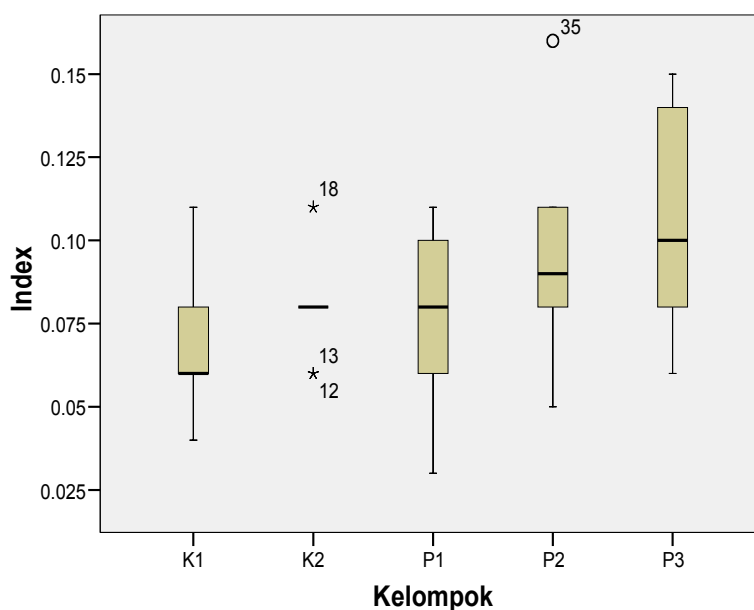
HASIL PENELITIAN

Pada K1, K2, dan P1 terdapat 1 ekor mencit yang mati pada masing-masing kelompok sebelum waktu terminasi. Data deskriptif indeks histopatologi pada setiap kelompok ditampilkan pada tabel 1 dan gambar 1.

Tabel. 1 Data Deskriptif Indeks Histopatologi Hepar

Kelompok	N	Median	Persentil 25	Persentil 75	Minimum	Maximum
K1	9	0,06	0,055	0,085	0,04	0,11
K2	9	0,08	0,070	0,080	0,06	0,11
P1	9	0,08	0,055	0,105	0,03	0,11
P2	10	0,09	0,073	0,110	0,05	0,16
P3	10	0,10	0,080	0,140	0,06	0,15

Uji Kruskal Wallis; $p = 0,058$



Gambar 1. Diagram Box Plot Indeks Histopatologi Hepar

Setelah dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro Wilk*, didapatkan hasil distribusi data normal pada kelompok K1, P1, P2, dan P3 ($p > 0,05$). Sedangkan pada kelompok K2 didapatkan distribusi data yang tidak normal dengan $p=0,008$ ($p < 0,05$), sehingga uji statistik yang digunakan adalah uji statistik non parametrik Kruskal Wallis.

Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna antar kelompok dengan $p=0,058$ ($p > 0,05$).

PEMBAHASAN

Pada K1, K2, dan P1 terdapat 1 ekor mencit yang mati pada masing-masing kelompok sebelum waktu terminasi. Kematian pada mencit dapat terjadi karena pengaruh faktor lingkungan serta faktor alamiah lain.

Ekstrak sponge *Haliclona* sp yang masuk ke dalam tubuh akan diidentifikasi sebagai senyawa asing (xenobiotik) dan akan mengalami berbagai proses kimiawi agar dapat dieliminasi keluar tubuh.¹⁰ Hepar merupakan target organ dari suatu jejas atau toksisitas yang disebabkan oleh senyawa kimia karena hampir semua senyawa kimia dimetabolisme di hepar sebelum diekskresi keluar tubuh.^{12,13}

Jejas yang terjadi pada hepar akibat senyawa kimia dapat menyebabkan kerusakan (jejas) hepatosit yang dapat terjadi secara reversibel dan ireversibel. Jejas yang reversibel ditandai dengan pembengkakan mitokondria yang disertai dengan robeknya mitokondria atau penimbunan lemak. Keadaan ini disebut degenerasi. Jika terjadi robekan membran plasma dan terjadi perubahan inti maka jejas sel akan menjadi ireversibel dan sel mengalami kematian (nekrosis). Sel yang mengalami kematian mempunyai perubahan inti yang tipikal, yaitu: piknotik (kromatin menggumpal, mengalami pengisutan dan bertambah basofil), karioreksis (fragmentasi material inti dengan sitoplasma asidofil suram bergranula), dan kariolisis (kromatin inti menjadi lisis dan tampak pucat). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa sponge *Haliclona* sp tidak menyebabkan kerusakan yang berarti pada hepar karena gambaran mikroskopisnya tidak menunjukkan perbedaan bermakna bila dibanding kelompok kontrol.

Pada prinsipnya sel yang terjejas diakibatkan oleh defisiensi oksigen dan atau nutrisi penting dan metabolit, rangsangan normal yang berlangsung lama atau berlebihan, serta toksin dan gangguan hebat yang menghambat fungsi vital sel. Penyebab sel terjejas dapat dikelompokkan pula menjadi sebab eksogen dan sebab endogen. Pada penelitian ini, jejas yang terjadi pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dapat disebabkan oleh sebab eksogen berupa trauma fisik (kebersihan, kelembaban, perubahan suhu), faktor kimiawi (toksin), dan faktor biologi (virus, bakteri). Sebab endogen kerusakan hepar dalam penelitian ini adalah faktor penuaan secara alami.^{14,15,16} Higienitas yang rendah juga dapat menyebabkan hepatitis reaktif non-spesifik, dimana terjadi reaksi melawan endotoksin sebagai respon terhadap sepsis atau peningkatan absorpsi senyawa asing (xenobiotik) tertentu.¹⁷ Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya degenerasi dan nekrosis baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Haliclonacylamine A* dan *Haliclonacylamine B* yang diisolasi dari sponge *Haliclona* sp memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor yang diuji secara in vitro.¹⁹ Sedangkan penelitian uji toksisitas akut terdahulu menyatakan bahwa pemberian ekstrak sponge *Haliclona* sp dengan dosis hingga 100mg/ekor (5000mg/kg) tidak menimbulkan perubahan tingkah laku maupun kematian pada mencit, sehingga sponge *Haliclona* sp termasuk dalam kategori *low toxic*.²⁰ Hal tersebut sejalan dengan penelitian ini karena hampir seluruh sampel menunjukkan kerusakan hepatosit yang sangat ringan ($\leq 10\%$).

SIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada gambaran histopatologi hepar mencit Swiss yang diberi ekstrak sponge *Haliclona* sp dibandingkan dengan kontrol. Pemberian ekstrak sponge *Haliclona* sp tidak menyebabkan kerusakan atau toksisitas yang berarti pada hepar mencit.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas kronik ekstrak sponge *Haliclona* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis tujukan kepada yang terhormat; Program Insentif Riset Terapan Departemen Riset dan Teknologi sebagai penyandang dana penelitian; dr. Ika Pawitra M, M.Kes, Sp.PA selaku reviewer proposal penelitian; dr. Kasno, Sp.PA selaku konsultan dalam pembacaan preparat; Ir. Agus Trianto, MSc selaku konsultan dalam bidang ilmu kelautan dan bantuannya atas penyediaan ekstrak; seluruh dosen dan staf laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Kerangka acuan program kompetitif, sub program pengembangan bahan baku obat berbasis biodiversitas Indonesia. [Online]. 2005 [cited 2007 Sept 22]; Available from:
URL:[http://www.kompetitif.lipi.go.id/PortalVB/uploads/TOR%20Bahan%20Baku%20Obat%20\[Revisi%202005\].doc](http://www.kompetitif.lipi.go.id/PortalVB/uploads/TOR%20Bahan%20Baku%20Obat%20[Revisi%202005].doc)
2. Murniasih T. Substansi kimia untuk pertahanan diri dari hewan laut tak bertulang belakang. *Oseana* 2005;XXX(2):19-27.
3. COREMAP. Karang berpotensi sebagai obat anti kanker. [Online]. 2003 [cited 2007 Sept 22]; Available from: URL:<http://www.coremap.or.id/berita/article.php>
4. Departemen Kelautan dan Perikanan RI. Laut nusantara: sebuah kolam megabiodiversity untuk misi penyelamatan bumi. [Online]. 2007[cited 2007 Sept 23]; Available from: URL:<http://www.dkp.go.id/content.php>
5. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Potensi obat dari laut belum dimaksimalkan. [Online]. 2005[cited 2007 Sept 23]; Available from: URL:<http://www.bppt.go.id/index.php>
6. Wattanadilok R, Sawangwong P, Rodrigues C, Cidade H, Pinto M, Pinto E, et al. Antifungal activity evaluation of the constituent of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the gulf of Thailand. *Marine Drugs* 2007;5:40-51.
7. Liu H, Mishima Y, Fujiwara T, Nagai H, Kitazawa A, Mine Y, et al. Isolation of araguspongine M, a new stereoisomer of an araguspongine/xetospongine alkaloid, and dopamine from the marine sponge *Neopetrosia exigua* collected in Palau. *Marine Drugs* 2005;3:154-63.
8. Arif JM, Al-Hazzam AA, Kunhi M, Al-Khodairy F. Novel marine compounds: anticancer or genotoxic. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004;2:93-8.
9. Moslen MT. Toxic response of the liver. In: Klaassen CD, editor. *Casarett and doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5th ed. New York: McGraw-Hill. 1996. p. 814.
10. Katzung BG. *Farmakologi dasar dan klinik edisi VI diterjemahkan oleh Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. Jakarta: EGC. 1998. p. 53-9.

11. Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Kap-Herr CV, Pettenati MJ, et al. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. [Online]. 2006[cited 2007 Sept 22]; Available from: [URL:http://www.pnas.org/cgi/content/full](http://www.pnas.org/cgi/content/full)
12. Bank C, Keller A. Multidose toxicity and carcinogenicity studies. In: Kram DJ, Keller KA, editors. Toxicology testing handbook. New York: Headquarters. 2001. p. 33-7,55-8.
13. Levi PE. Target organ toxicity. In: Hogson E, Levi E, editors. A textbook of modern toxicology. 2th ed. New York: McGraw-Hill. 2000. p. 199-203.
14. Robins SL, Kumar V. Buku ajar patologi II edisi 4 diterjemahkan oleh Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: EGC. 1995. p. 318.
15. Sarjadi. Patologi umum. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro. 2003. p. 6-7,10.
16. Robins SL, Kumar V. Buku ajar patologi I edisi 4 diterjemahkan oleh Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: EGC. 1995. p. 12-16.
17. Rothuizen J, van den Ingg TS. Hepatitis in dogs, a review. Pubmed 1998;123(8):246-52.
18. Charan RD, Garson MJ, Brereton IM, Willis AC, Hooper HNA. Haliclona sp. Tetrahedron 1996;52(27):9117-20.
19. Zhou GX, Molinski TF. Long-chain acetylenic ketones from micronesian sponge Haliclona sp importance of the 1-yn-3-ol group for antitumor activity. Marine Drugs 2003;1:46-53.
20. Trianto A, Murwani R, Susilaningsih N. Laporan penelitian studi aplikasi ekstrak sponge Haliclona sp dan gorgonian Isis hippuris sebagai obat anti kanker alami. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro 2007.
21. Trianto A, Ambariyanto, Muwarni R. Skrining bahan anti kanker pada berbagai jenis sponge dan gorgonian terhadap L1210 cell line. Jurnal Ilmu Kelautan 2004;9(3):120-4.

LAMPIRAN I

CARA PENENTUAN DOSIS EKSTRAK SPONGE *HALICLONA* SP

Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ir. Agus Trianto, dkk didapatkan nilai IC_{50} ekstrak sponge *Haliclona* sp terhadap sel kanker leukemia (L-1210 *cell line*) adalah $8 \mu\text{g/ml}$.²¹

Dalam perhitungan, massa jenis sel dianggap setara dengan massa jenis air = 1 gr/ml ($1 \text{ ml} = 1 \text{ gr}$). Sehingga $8 \mu\text{g/ml}$ sel setara dengan $8 \mu\text{g/gr}$.

Berat badan tiap ekor mencit = $\pm 20 \text{ gram}$

Dosis untuk tiap ekor mencit = $8 \mu\text{g/gr} \times 20 \text{ gr} = 160 \mu\text{g/ekor}$
= $0,16 \text{ mg/ekor}$

Untuk memudahkan pembuatan ekstrak, dosis disesuaikan menjadi $0,15 \text{ mg/ekor}$ (*Expected Effective Dose* (EED) = $0,15 \text{ mg}$ ekstrak/ekor).

Untuk standar keamanan maka dosis ditingkatkan 10 dan 100 kali dari EED sehingga didapatkan dosis sebagai berikut:

Dosis I : $0,15 \text{ mg}$ ekstrak (EED)

Dosis II : $10 \times 0,15 \text{ mg} = 1,5 \text{ mg}$ ekstrak

Dosis III : $100 \times 0,15 \text{ mg} = 15 \text{ mg}$ ekstrak

LAMPIRAN II

KRITERIA PENILAIAN INDEKS HISTOPATOLOGI HEPAR

(Modifikasi Sistem *Knodell Score (HAI)*)

Degenerasi	Skor	Inti Piknotik	Skor	Inti Karioreksis	Skor	Inti Kariolisis	Skor
0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
<25%	1	<25%	1	<25%	1	<25%	1
25 – <50%	2	25 – <50%	2	25 – <50%	2	25 – <50%	2
50 – <75%	3	50 – <75%	3	50 – <75%	3	50 – <75%	3
75 – 100%	4	75 – 100%	4	75 – 100%	4	75 – 100%	4
Indeks histopatologi hepar = total skor/16							

LAMPIRAN III

PROSEDUR EKSTRAKSI SPONGE *HALICLONA SP*

I. Alat

1. Alat pemotong
2. Timbangan
3. Tabung erlenmeyer
4. Kertas saring
5. Filter flask (corong penyaring)
6. Rotary evaporator
7. Conical funnel (tempat sampel)

II. Bahan

1. Sponge *Haliclona* sp
2. Metanol
3. Etanol 96%
4. Pelet (pakan hewan uji)

III. Cara Mengekstraksi Sponge *Haliclona* sp

1. Memotong sampel kering sponge *Haliclona* sp menjadi potongan yang kecil-kecil.
2. Merendam potongan tersebut dengan pelarut metanol selama 24 jam, kemudian disaring dengan kertas saring.
3. Melakukan pemisahan pelarut dari ekstrak dalam filtrat menggunakan rotary evaporator, sehingga dihasilkan ekstrak kering.

4. Menimbang butiran pakan dan ekstrak dengan berat yang sudah ditentukan. Untuk memudahkan pembuatan, maka ekstrak dicampurkan pada 1 gram pakan standar sehingga ekstrak yang akan dicampurkan masing-masing adalah 0,3 mg; 3 mg; 30 mg. Kemudian mencampur ekstrak dengan pakan standar yang ditambah pelarut etanol sebagai bahan pencampur sampai keduanya homogen, sehingga dihasilkan jenis pakan sebagai berikut :

HC1 terdiri atas 0,3 mg ekstrak tiap 1 gram pakan, diberikan untuk kelompok P1.

HC2 terdiri atas 3 mg ekstrak tiap 1 gram pakan, diberikan untuk kelompok P2.

HC3 terdiri atas 30 mg ekstrak tiap 1 gram pakan, diberikan untuk kelompok P3.

5. Membiarkan butiran pakan menjadi kering setelah mengabsorpsi ekstrak.

6. Pakan kontrol didapatkan dengan merendam butiran pakan dalam etanol 96 % dan kemudian dibiarkan sampai kering.

LAMPIRAN IV

PROSEDUR PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI

I. Pengambilan Jaringan

Mengambil jaringan dengan pisau tajam secepatnya setelah tikus dibunuh (kurang dari 2 jam) dengan ukuran 1x1x1 cm³.

II. Fiksasi

Merendam jaringan dalam formalin 10 % selama 1 jam.

III. Dehidrasi

Mengeluarkan air dari jaringan, dengan cara:

1. Merendam jaringan dalam alkohol 30 % masing-masing selama 20 menit dalam 3 botol yang berbeda.
2. Merendam jaringan dalam alkohol 40 % selama 1 jam.
3. Merendam jaringan dalam alkohol 50 % selama 1 jam.
4. Merendam jaringan dalam alkohol 60 % selama 1 jam.
5. Merendam jaringan dalam alkohol 70 % selama 1 jam.
6. Merendam jaringan dalam alkohol 80 % selama 1 jam.
7. Merendam jaringan dalam alkohol 90 % selama 1 jam.
8. Merendam jaringan dalam alkohol 96 % selama 1 jam.

IV. *Clearing* (Penjernihan)

Memasukkan jaringan yang telah didehidrasi ke dalam larutan penjernih (clearing agent) agar parafin cair mudah masuk ke dalam jaringan, dengan cara:

1. Antara dehidrasi dan clearing pada umumnya ada cairan antara, yaitu alkohol 96% dan xylol (1:1) selama 2x20 menit.
2. Merendam jaringan dalam larutan Xylol I selama 20 menit.
3. Merendam jaringan dalam larutan Xylol II selama 20 menit.
4. Merendam jaringan dalam larutan Xylol III selama 20 menit.

v. ***Embedding (Pengikatan)***

Pengikatan jaringan oleh parafin, dengan cara:

1. *Blocking*

1. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair dan xylol (1:1) selama 20 menit dan dimasukkan dalam oven 60° supaya tidak beku.
2. Kemudian dimasukkan ke dalam : Parafin I selama 20 menit, Parafin II selama 20 menit, dan Parafin III selama 20 menit.
3. Jaringan dimasukkan dalam cetakan dari logam.
4. Jaringan didinginkan dalam air es sehingga logam-logam tersebut dapat dibuka.

2. *Trimming*

Memotong balok-balok parafin yang berisi jaringan di dalamnya.

vi. ***Sectioning (Pemotongan)***

1. Memotong balok parafin yang telah dipotong dengan mikrotom (Rotary Microtom) dengan tebal 3 – 10 mikron. Potongan yang baik adalah yang berbentuk pita (*parafin ribbon*).

2. Jaringan yang telah dipotong diambil dengan jarum dan diletakkan dalam air hangat (40- 45 °C) dalam water bath agar irisan mengembang.
3. Mengambil jaringan dengan object glass yang sudah diberi perekat dengan gliserin albumin (1:1).
4. Mengeringkan object glass dan jaringan.
5. Dapat ditambahkan timol pada preparat setelah ditutup dengan deck glass untuk mencegah pembusukan egg albumin dan jamur.

VII. ***Staining (Pewarnaan)***

1. Meletakkan preparat dalam *staining yard*.
2. Parafin yang ada dalam irisan jaringan dihilangkan (deparafinisasi).
3. Slide jaringan dimasukkan dalam :
 - Xylol I selama 10 menit
 - Xylol II selama 10 menit
 - Xylol III selama 10 menit
4. Selanjutnya rehidrasi dengan :
 - Xylol Alkohol(alkohol 96% + xylol) selama 5 menit
 - Alkohol 80% - 70% - 60% - 50% - 40% - 30% masing-masing dicelup.
 - Air
5. Melakukan pengecatan dengan Hematoxyllin :
 - a. Merendam dalam larutan Hematoxyllin selama 10 menit.
 - b. Membilas dengan aquadest.

- c. Membilas dengan acid alkohol (alkohol + NaCl 90%)
 - d. Menuang ke dalam staining yard dan segera kembalikan ke tempat semula berturut-turut deretan alkohol 50% sampai alkohol 96%.
6. Melakukan pengecatan dengan Eosin :
- a. Merendam dengan larutan Eosin selama 6 menit.
 - b. Membilas dengan alkohol 96% A.
 - c. Membilas dengan alkohol 96% B.
 - d. Merendam dalam alkohol-xylol.
 - e. Mengeringkan preparat dalam kertas saring, jaga jaringan supaya kering di udara.
 - f. Membersihkan object glass dengan kapas alkohol.
 - g. Merendam dalam Xylol I.
 - h. Merendam dalam Xylol II.
 - i. Menetesi dengan balsam canada.

VIII. ***Mounting***

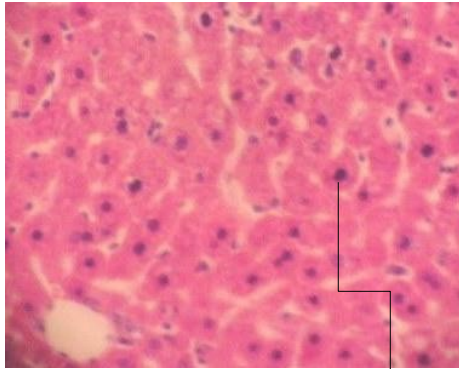
Menutup preparat dengan *deck glass*.

Sumber : Metode Pembuatan Preparat Histologi, Laboratorium Histologi FK
UNDIP.

LAMPIRAN V

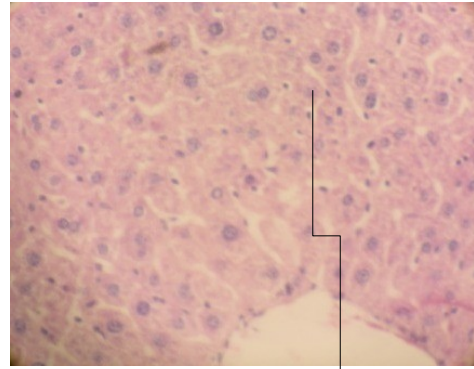
HASIL PENGAMATAN HISTOPATOLOGI HEPAR

Kelompok K1



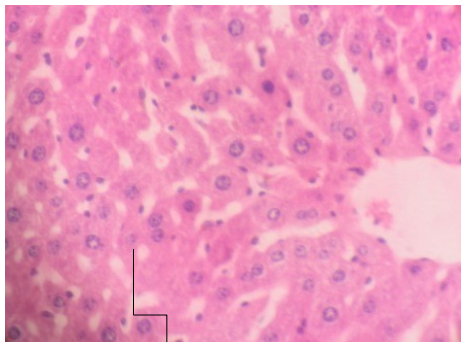
Inti Piknotik

Kelompok K2



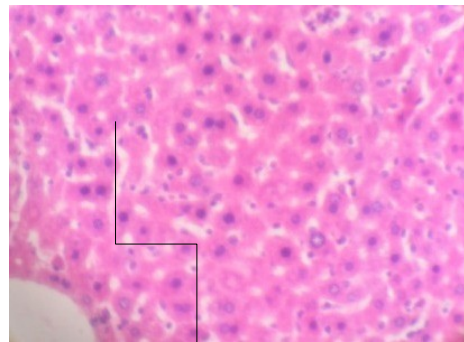
Inti Karioreksis

Kelompok P1



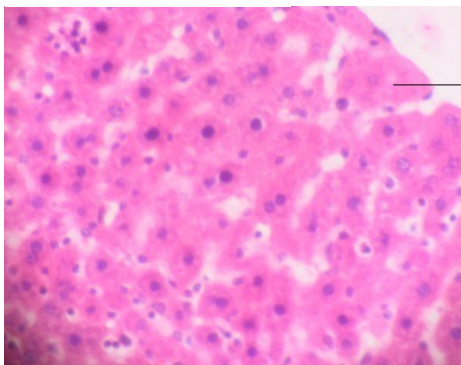
Inti Karioreksis

Kelompok P2



Inti Kariolisis

Kelompok P3



Degenerasi

LAMPIRAN VI

Explore

Kelompok

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Index	K1	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	K2	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	P1	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	P2	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	P3	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%

Descriptives

Kelompok				Statistic	Std. Error	
Index	K1	Mean		,0700	,00726	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0532		
			Upper Bound	,0868		
		5% Trimmed Mean		,0694		
		Median		,0600		
		Variance		,000		
		Std. Deviation		,02179		
		Minimum		,04		
		Maximum		,11		
		Range		,07		
		Interquartile Range		,03		
		Skewness		,559	,717	
		Kurtosis		-,131	1,400	
		K2	Mean		,0789	,00484
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0677	
				Upper Bound	,0901	
			5% Trimmed Mean		,0782	
Median			,0800			
Variance			,000			
Std. Deviation			,01453			
Minimum			,06			
Maximum			,11			
Range			,05			
Interquartile Range		,01				
Skewness		,872	,717			

P1	Kurtosis		2,589	1,400
	Mean		,0778	,00909
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0568	
		Upper Bound	,0988	
	5% Trimmed Mean		,0786	
	Median		,0800	
	Variance		,001	
	Std. Deviation		,02728	
	Minimum		,03	
	Maximum		,11	
	Range		,08	
	Interquartile Range		,05	
	Skewness		-,460	,717
	Kurtosis		-,557	1,400
P2	Mean		,0930	,01023
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0699	
		Upper Bound	,1161	
	5% Trimmed Mean		,0917	
	Median		,0900	
	Variance		,001	
	Std. Deviation		,03234	
	Minimum		,05	
	Maximum		,16	
	Range		,11	
	Interquartile Range		,04	
	Skewness		,625	,687
	Kurtosis		1,110	1,334
	P3	Mean		,1070
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,0846	
		Upper Bound	,1294	
5% Trimmed Mean			,1072	
Median			,1000	
Variance			,001	
Std. Deviation			,03129	
Minimum			,06	
Maximum			,15	
Range			,09	
Interquartile Range			,06	
Skewness			,048	,687
Kurtosis			-1,565	1,334

Percentiles

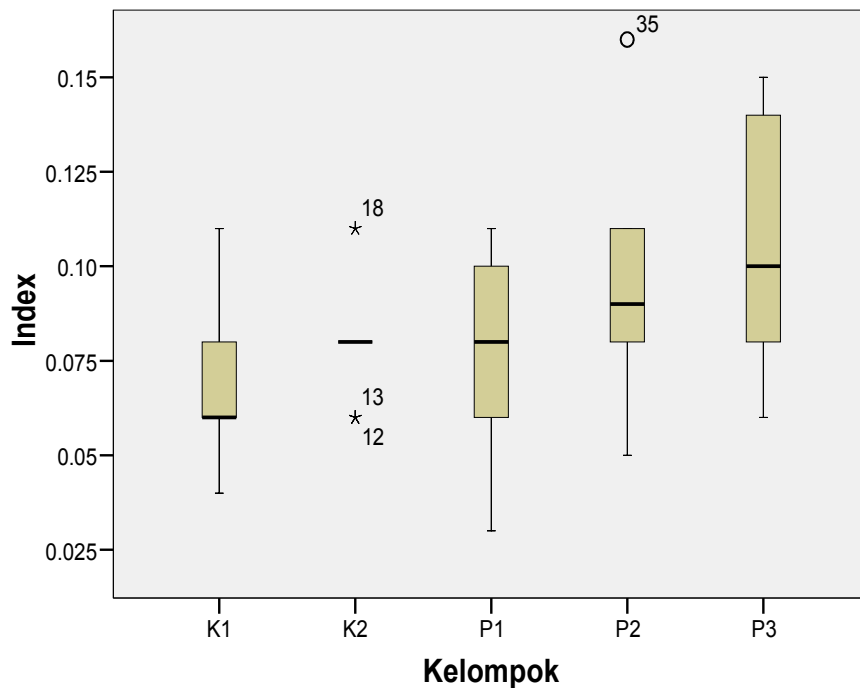
			Percentiles						
			5	10	25	50	75	90	95
Weighted Average(Definition 1)	Index	K1	,0400	,0400	,0550	,0600	,0850	.	.
		K2	,0600	,0600	,0700	,0800	,0800	.	.
		P1	,0300	,0300	,0550	,0800	,1050	.	.
		P2	,0500	,0500	,0725	,0900	,1100	,1550	.
		P3	,0600	,0620	,0800	,1000	,1400	,1490	.
Tukey's Hinges	Index	K1			,0600	,0600	,0800		
		K2			,0800	,0800	,0800		
		P1			,0600	,0800	,1000		
		P2			,0800	,0900	,1100		
		P3			,0800	,1000	,1400		

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Index	K1	,232	9	,176	,949	9	,676
	K2	,358	9	,001	,764	9	,008
	P1	,199	9	,200(*)	,931	9	,494
	P2	,200	10	,200(*)	,918	10	,343
	P3	,207	10	,200(*)	,918	10	,343

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction



NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
Index	K1	9	16,44
	K2	9	20,50
	P1	9	21,06
	P2	10	27,55
	P3	10	33,05
	Total		47

Test Statistics(a,b)

	Index
Chi-Square	9,148
df	4
Asymp. Sig.	,058

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Kelompok