



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK GORGONIAN *ISIS*
HIPPURIS 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:
VALENTINE YUNIA SARI
NIM. G2A 004 173

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

HALAMAN PERSETUJUAN

Telah disetujui oleh Dosen Pembimbing, Artikel Penelitian Karya Tulis Ilmiah
dari :

Nama : Valentine Yunia Sari
NIM : G2A 004 173
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
Fakultas : Kedokteran
Universitas : Universitas Diponegoro
Bagian : Histologi
Judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Gorgonian *Isis
hippuris* terhadap Gambaran Histopatologi Hepar
Mencit Swiss
Dosen Pembimbing : dr. Neni Susilaningsih, M.Si

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan dalam menempuh
Program Pendidikan Sarjana.

Semarang, 30 Juni 2008

Mengetahui,

Dosen Pembimbing

dr. Neni Susilaningsih, M.Si

NIP. 131 832 243

HALAMAN PENGESAHAN

Artikel Ilmiah

Pengaruh Pemberian Ekstrak Gorgonian *Isis hippuris* terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Swiss

yang disusun oleh:

Valentine Yunia Sari

G2A 004 173

telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Artikel Ilmiah Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro 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 S, M.Kes, Sp Rad
NIP. 132 205 006

The Effects of Gorgonian *Isis hippuris* Extract on Liver Histopathology of Swiss Mice

Valentine Yunia Sari¹⁾, Neni Susilaningsih²⁾

ABSTRACT

Background: Gorgonian *Isis hippuris* contains hippuristanol, an anti cancer compound, but there has been no in vivo toxicity study. This study was aimed to know the effects of subchronic administration of gorgonian *Isis hippuris* extract on the liver histopathology of Swiss mice.

Methods: This research was designed as a randomized post test only control group, using 25 male and 25 female Swiss mice that fulfilled the inclusion criteria. Experimental mice were treated by 3 levels ethanol extract of gorgonian *Isis hippuris* i.e. 0,15 mg (P1), 1,5 mg (P2) and 15 mg extract (P3) per 0,5 g standard pelleted diet daily. Two control groups consisted of mice fed the standard diet only (Cneg) and mice fed pelleted diet that contain ethanol (C0). After 3 months of extract administration, all mice were terminated and their liver were processed and stained by hematoxylin eosin. Liver histopathology was examined using modified Knodell score.

Results: Liver samples of all groups showed low level of damage, histopathology index between 0,04-0,14. The highest median i.e. 0,095 (0,088; 0,103) in P2 and the lowest i.e. 0,060 (0,055; 0,085) in C0. Kruskal-Wallis test showed no significant difference between liver histopathology index of experimental and control groups ($p=0,085$).

Conclusion: Gorgonian *Isis hippuris* extract orally administered has no effect on the liver histopathology which indicates its safety for short to medium term oral use in mice.

Key Words: Gorgonian *Isis hippuris*, toxicity, liver histopathology.

¹⁾Undergraduate Student of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾Lecturer Staff at Histology Department of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

Pengaruh Pemberian Ekstrak Gorgonian *Isis hippuris* terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Swiss

Valentine Yunia Sari¹⁾, Neni Susilaningsih²⁾

ABSTRAK

Latar belakang: Gorgonian *Isis hippuris* mengandung hippuristanol, suatu senyawa antikanker, namun belum pernah dilakukan penelitian mengenai uji toksisitas secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* selama 3 bulan terhadap gambaran histopatologi hepar mencit Swiss.

Metode: Penelitian ini adalah suatu *randomized post test only control group design* dengan 25 ekor mencit Swiss jantan dan 25 ekor mencit Swiss betina yang memenuhi kriteria inklusi. Mencit kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol gorgonian *Isis hippuris* dosis bertingkat yaitu P1 (0,15 mg), P2 (1,5 mg) dan P3 (15 mg) yang dicampurkan dalam 0,5 gram pakan standar setiap hari. Dua kelompok digunakan sebagai kontrol yaitu mencit yang diberi pakan standar saja (C neg) dan mencit yang diberi pakan yang mengandung etanol (C0). Setelah perlakuan selama 3 bulan semua mencit diterminasi dan dibuat preparat hepar dengan pengecatan *hematoxylin eosin*. Indeks histopatologi hepar dinilai menggunakan *modified Knodell Score*.

Hasil: Seluruh sampel menunjukkan kerusakan ringan, dengan indeks histopatologi antara 0,04-0,14. Median tertinggi sebesar 0,095 (0,088; 0,103) pada P2 dan terendah 0,060 (0,055; 0,085) pada C0. Uji Kruskal-Wallis terbukti tidak ada perbedaan signifikan antara indeks histopatologi hepar kelompok perlakuan dan kontrol ($p=0,085$).

Kesimpulan: Pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* secara oral selama 3 bulan tidak menimbulkan perbedaan yang bermakna pada gambaran histopatologi hepar mencit Swiss.

Kata kunci: Gorgonian *Isis hippuris*, toksisitas, gambaran histopatologi hepar

¹⁾Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

²⁾Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Biota laut telah dimanfaatkan dalam dunia medis, baik dalam bidang terapi, prosedur diagnostik maupun bioteknologi.¹⁻⁶ Gorgonian *Isis hippuris* (karang pasifik) mengandung senyawa potensial yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kedokteran.⁷⁻¹² Hippuristanol adalah senyawa steroid dalam gorgonian *Isis hippuris* yang berperan sebagai antitumor, memiliki aktivitas *antimultidrug resistant* yang dapat melawan sel kanker.^{10,11,13} Penelitian tentang hewan avertebrata ini terus berkembang sejalan dengan bahan antikanker lain dalam melewati tahap-tahap penelitian praklinik maupun klinik.¹⁻⁶ Meskipun demikian gorgonian *Isis hippuris* juga bersifat toksik. Hasil dari suatu uji toksisitas akut ekstrak gorgonian *Isis hippuris* fraksi etil asetat secara terhadap nauplius *Artemia salina* menunjukkan bahwa gorgonian *Isis hippuris* bersifat toksik. Nilai LD-50 Gorgonian *Isis hippuris* secara in vitro sebesar 16,98 ppm.⁷

Obat antikanker seringkali digunakan dalam waktu yang relatif panjang sehingga perlu dilakukan uji toksikologi dengan pemberian dosis berulang. Pemberian dosis berulang suatu senyawa dalam jangka waktu tertentu dapat menunjukkan efek toksik yang munculnya lambat dan tak dapat terdeteksi pada uji toksisitas akut.¹⁴

Hepar adalah organ yang sangat potensial terhadap kerusakan akibat masuknya bahan kimia dalam tubuh.¹⁴⁻¹⁸ Selain karena hepar merupakan organ pertama setelah saluran cerna yang terpapar bahan kimia, hepar merupakan organ penting dalam proses metabolisme dan detoksikasi.¹⁴⁻²⁰ Sebagai pusat metabolisme, hepar menerima berbagai zat yang diserap dari saluran cerna,

termasuk zat toksik dalam frekuensi dan konsentrasi yang tinggi.¹⁵ Kerusakan yang terjadi pada hepar dipengaruhi oleh jenis bahan, mekanisme kerja serta lamanya paparan.^{15,16} Penumpukan bahan-bahan toksik dalam hepar dapat melukai hepar dan menyebabkan perubahan histopatologi.^{14-18,21}

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* terhadap gambaran histopatologi hepar mencit Swiss.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* berdasarkan gambaran histopatologi hepar sehingga dapat menjadi pertimbangan dalam pemanfaatan gorgonian *Isis hippuris* sebagai antikanker dan juga mengetahui keamanan penggunaan gorgonian *Isis hippuris*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *randomized post test only control group design* yang dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Sampel berupa 25 ekor mencit Swiss jantan dan 25 ekor betina yang diperoleh dari PAU (Pusat Antar Universitas) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan mencit jantan dan betina untuk menghindari bias akibat pengaruh hormon. Mencit dewasa usia 5-6 minggu, berat badan 20-25 gram dan observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari lalu dibagi secara acak menjadi 5 kelompok P1, P2, P3, C0 dan Cneg. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor betina yang dikandangkan

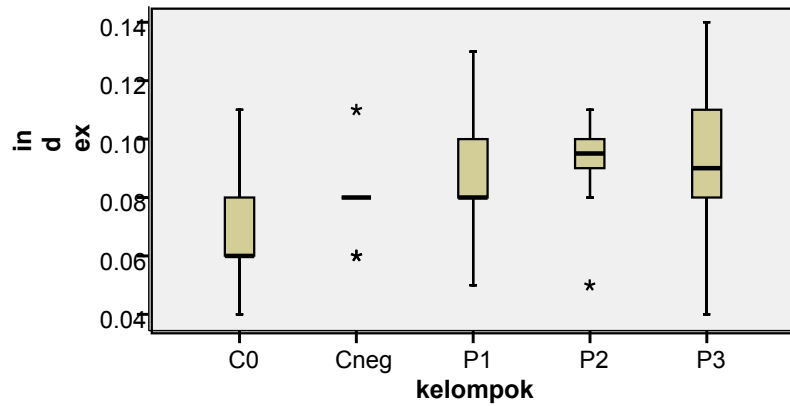
secara terpisah. Semua kelompok diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Setiap hari mencit kelompok P1, P2, P3 diberi pakan perlakuan berupa ekstrak etanol gorgonian *Isis hippuris* dengan dosis masing-masing 0,15 mg, 1,5 mg dan 15 mg ekstrak yang telah dicampurkan dalam 0,5 gram pakan standar (Lampiran 1). Penentuan dosis berdasarkan hasil konversi nilai IC-50 ekstrak etanol gorgonian *Isis hippuris* terhadap sel kanker leukemia (8 µg/ml) yang kemudian diaplikasikan pada mencit (Lampiran 2). Mencit kelompok C0 diberi 0,5 gram pakan standar yang telah dicampur etanol dan Cneg hanya diberikan pakan standar. Perlakuan diberikan setelah mencit dipuasakan selama 1 jam.

Setelah selesai masa perlakuan selama 3 bulan, semua mencit diterminasi dengan melakukan dislokasi leher, lalu hepar mencit diambil dan dibuat preparat dengan pengecatan *Hematoxyllin Eosin* (Lampiran 3). Preparat kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 x dalam 5 lapangan pandang. Data yang dikumpulkan berupa data primer indeks histopatologi hasil penilaian gambaran histopatologi hepar berdasarkan kriteria *modified Knodell Score* (Lampiran 4). Data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan Shapiro-Wilk. Hasil menunjukkan data berdistribusi tidak normal sehingga dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis.

HASIL

Sampel penelitian mengalami pengurangan jumlah, akibat kematian 1 ekor mencit kelompok C0 dan 1 ekor mencit kelompok Cneg sebelum dilakukan

terminasi. Data deskriptif indeks histopatologi pada setiap kelompok tampak pada gambar 1 dan tabel 1.



Gambar 1. Box Plot indeks histopatologi hepar mencit Swiss

Tabel 1. Analisis deskriptif indeks histopatologi hepar mencit Swiss

Kelompok	N	Median	Persentil 25	Persentil 75	Minimum	Maximum
C0	9	0,060	0,055	0,085	0,04	0,11
Cneg	9	0,080	0,070	0,080	0,06	0,11
P1	10	0,080	0,080	0,100	0,05	0,13
P2	10	0,095	0,088	0,103	0,05	0,11
P3	10	0,090	0,073	0,110	0,04	0,14

Uji Kruskal Wallis; $p=0,085$

Hasil analisis dengan Kruskal Wallis menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok, $p=0,085$ ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Kematian mencit kelompok kontrol mungkin disebabkan karena faktor lingkungan seperti masalah higienitas yang merupakan keterbatasan dalam penelitian ini.

Penelitian ini mendapatkan hasil bahwa gorgonian *Isis hippuris* tidak menyebabkan kerusakan yang berarti pada hepar karena gambaran mikroskopisnya tidak menunjukkan perbedaan bermakna bila dibanding kelompok kontrol. Kerusakan yang tampak pada semua kelompok memiliki indeks histopatologi antara 0,04-0,14. Kerusakan yang terjadi adalah degenerasi dan nekrosis yang tampak berupa perubahan inti menjadi piknotik, karioreksis dan kariolisis.^{14-18,21-24} Median tertinggi didapatkan pada kelompok P2 sebesar 0,095 (0,088; 0,103) dan terendah pada kelompok C0 sebesar 0,060 (0,055; 0,085). Kerusakan yang terjadi tidak menunjukkan adanya *dose response relationship* sehingga kerusakan yang terjadi bukan akibat pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris*.¹⁶

Hepar merupakan organ metabolisme utama sehingga sangat potensial mengalami kerusakan.¹⁴⁻²⁰ Faktor eksogen seperti trauma fisik (kelembaban yang berlebihan, perubahan suhu), faktor kimiawi (toksin), dan faktor biologi (virus, bakteri) dapat menyebabkan kerusakan hepar disamping faktor endogen misalnya faktor penuaan yang terjadi secara alami.^{24,25} Faktor-faktor tersebut di atas mengakibatkan terjadinya hepatitis reaktif non spesifik yang menyebabkan munculnya gambaran kerusakan hepar yang merata pada semua kelompok.²⁶

Pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* dengan dosis bertingkat hingga 100 kali nilai IC-50 sel kanker leukemia (IC-50 = 8 µg/ml) tidak menimbulkan kerusakan yang bermakna pada hepar. Pada penelitian pendahuluan mengenai uji toksisitas akut, didapatkan hasil bahwa gorgonian *Isis hippuris* termasuk dalam

kategori *low toxic*.²⁷ Gorgonian *Isis hippuris* yang diberikan lewat oral selama 3 bulan aman untuk hepar mencit.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak gorgonian *Isis hippuris* per oral tidak menimbulkan perbedaan yang bermakna pada gambaran histopatologi hepar mencit Swiss bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

SARAN

Sebaiknya dilakukan penelitian serupa dengan waktu yang lebih panjang, dengan dosis yang lebih tinggi dan organ target yang berbeda misalnya ginjal dan sistem hematopoetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Insentif Riset Terapan Departemen Riset dan Teknologi sebagai penyandang dana penelitian, dr. Ika Pawitra M, M.Kes, Sp.PA selaku reviewer penelitian, dr. Kasno, Sp.PA selaku konsultan dalam bidang ilmu Patologi Anatomi, 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 seluruh pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan karya tulis ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mayer AMS, Hamann MT. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anti-malarial, anti-platelet, anti-tuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology* 2004; 6: 37-52.
2. Mayer AMS, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* 2004; 40: 2676-704.
3. Amador ML, Jimeno J, Ares LP, Funes HC, Hidalgo M. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology* 2003; 14: 1607-15.
4. Mayer AMS, Gustafson KR. Marine Pharmacology in 2003-2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 2241-70.
5. Calvert AH. Fishing for new drugs. *Journal of Clinical Oncology* 2005 November; 23 (31): 7780-2.
6. Schwartzmann G, Rocha ABD, Berlinck RGS, Jimeno J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The Lancet Oncology* 2001 April; 2 (4): 221-5.

7. Trianto A, Yan Yan, Ambariyanto, Murwani R. Uji toksisitas ekstrak gorgonian *Isis hippuris* terhadap nauplius *Artemia salina*. *Ilmu Kelautan* 2004 Juni; 9 (2): 61-6.
8. Trianto A, Ambariyanto, Murwani R. Skrining bahan anti kanker pada berbagai jenis sponge dan gorgonian terhadap L1210 cell line. *Ilmu Kelautan* 2004 September; 9 (3):120-4.
9. Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T et al. Functional characterization of IRESEs by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nature Chemical Biology* 2006 April; 2 (4): 213-20.
10. Trianto A, Tanaka J, Higa T. Structure elucidation of a new possible anticancer sterol from marine gorgonian *Isis hippuris*. *Ilmu Kelautan* 2001; 24 (7): 255-61.
11. Sheu JH, Chao CH, Wang GH, Hung KC, Duh CY, Chiang MY, et al. The first a-nor-hippuristanol and two novel 4,5-secosuberosanoids from the gorgonian *Isis hippuris*. *Tetrahedron* 2004; 45: 6413-6.
12. Chao CH, Huang LF, Yang YL, Su JH, Wang GH, Chiang MY et al. Polyoxygenated steroids from the gorgonian *Isis hippuris*. *Journal of Natural Products* 2005; 68 (6): 880-5.
13. Tanaka J, Trianto A, Musman M, Issa HH, Ohtani II, Ichiba T et al. New polyoxygenated steroids exhibiting reversal of multidrug resistance from the gorgonian *Isis hippuris*. *Tetrahedron* 2002 August; 58 (32): 6259-66.

14. Makiyah SNN, Tasminatun S. Uji toksisitas subkronis ekstrak etanolik biji srikaya (*Annona squamosa* L) sebagai repelan. *Mutiara Medika* 2006 Januari; 6 (1): 9-17.
15. Katzung BG. *Farmakologi dasar dan klinik 1*. Edisi 1. Jakarta:Salemba Medika,2001.
16. Banks C, Keller KA. Multidose toxicity and carcinogenicity studies. In: *Toxicology Testing Handbook: principles, applications, and data interpretation*. New York: Marcel Dekker Inc, 2001: 33-72.
17. Lestari D. Efek protektif dari lesitin terhadap hepatotoksisitas akibat induksi karbon tetraklorida pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). (cited on 2007 September 3). Available from URL: HYPERLINK <http://adln.lib.unair.ac.id/go.php?id=jiptunair-gdl-s2-2007-dewilestar-5561&q=hepar&PHPSESSID=e99ecec43aeb91a73c0e368ce140cf5f>.
18. Thadeus MS, Marwoto W, Wuyung PE, Jusman SWA, Siregar NC. Perubahan gambaran histopatologik hati, jantung dan aorta akibat pencekohan minyak jelantah pada mencit *Mus musculus* L dengan atau tanpa suplementasi vitamin C dan vitamin E. *Profesi Medika* 2005 Juli-Desember; 5 (2): 44-56.
19. Guyton AC, Hall JE. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC, 1997.
20. Snell RS. *Anatomi Klinik untuk mahasiswa kedokteran 1*. Edisi 3. Jakarta: EGC, 1997.

21. Rusmiati, Lestari A. Struktur histologis organ hepar dan ren mencit (Mus musculus L) jantan setelah perlakuan dengan ekstrak kayu secang (Caesalpinia sappan L). *Bioscientiae* 2004 Januari; 1 (1): 23-30.
22. Thomson AD, Cotton RE. *Lecture notes on pathology*. 3rd edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983.
23. Chandrasoma P, Taylor CR. *Concise pathology*. 3rd edition. Connecticut: Appleton and Lange, 1998.
24. Sarjadi. *Patologi umum*. Edisi 2. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro, 2004.
25. Robbins SL, Kumar V. *Buku ajar patologi I*. Edisi 4. Jakarta: EGC, 1995.
26. Rothuizen J, van den Ingg TS. Hepatitis in dogs, a review. *Pubmed* 1998; 123 (8): 246-52.
27. Trianto A, Murwani R, Susilaningsih N. Studi aplikasi ekstrak sponge Haliconia sp dan gorgonian Isis hippuris sebagai obat anti kanker alami. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro 2007.

LAMPIRAN 1

PROSEDUR EKSTRAKSI GORGONIAN *ISIS HIPPURIS*

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. Gorgonian *Isis hippuris*
2. Metanol
3. Etanol 96%
4. Pelet (pakan hewan uji)

III. Cara Mengekstraksi Gorgonian *Isis hippuris*

1. Memotong sampel kering gorgonian *Isis hippuris* menjadi potongan yang kecil-kecil.
2. Merendam potongan tersebut dengan pelarut metanol selama 24 jam, kemudian disaring dengan kertas saring.

LAMPIRAN 2

PENENTUAN DOSIS

- Nilai IC_{50} *crude extract* Gorgonian *Isis hippuris* terhadap sel kanker leukemia (L-1210 *cell line*) : $8 \text{ mg/L} = 8 \text{ }\mu\text{g/mL}$
- Massa jenis sel dianggap setara dengan massa jenis air : 1 g/mL , sehingga $1 \text{ mL} = 1 \text{ gram}$
- Berat badan mencit : 20 gram, sehingga dosis untuk tiap ekor mencit
$$= 20 \text{ g} \times 8 \text{ }\mu\text{g/g}$$
$$= 160 \text{ }\mu\text{g}$$
- Untuk memudahkan pembuatan ekstrak dosis disesuaikan menjadi $150\mu\text{g/ekor}$ (EED = $0,15 \text{ mg/ekor}$).
- Untuk standar keamanan, maka dosis ditingkatkan 10 dan 100x EED ($1,5\text{mg/ekor}$ dan 15mg/ekor).

LAMPIRAN 3

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

V. ***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-xylool.
 - e. Mengeringkan preparat dalam kertas saring, jaga jaringan supaya kering di udara.
 - f. Membersihkan object glass dengan kapas alkohol.
 - g. Merendam dalam Xylool I.
 - h. Merendam dalam Xylool II.
 - i. Menetesi dengan balsam canada.

VI. ***Mounting***

Menutup preparat dengan *deck glass*.

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

LAMPIRAN 4

KRITERIA PENILAIAN INDEKS HISTOPATOLOGI HEPAR

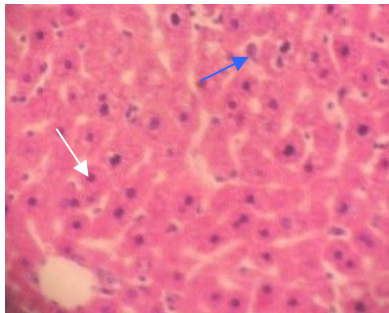
(Modifikasi Sistem *Knodell Score (HAI)*)

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

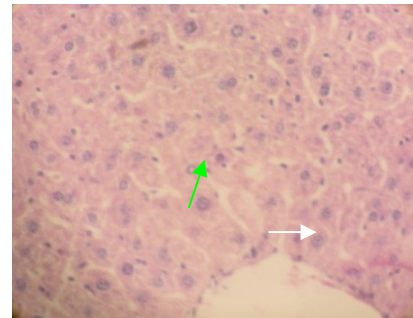
Indeks histopatologi hepar = total skor/16

LAMPIRAN 5

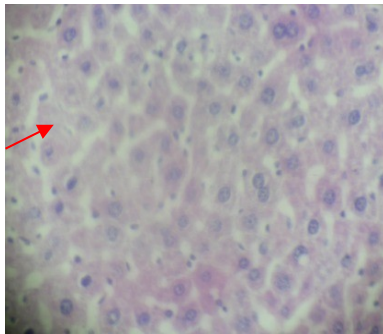
GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT SWISS



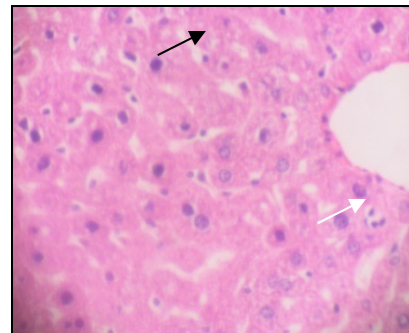
Kelompok C0



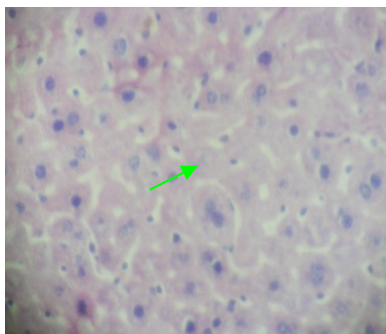
Kelompok Cneg



Kelompok P1



Kelompok P2



Kelompok P3

Gambaran Histopatologi Hepar

Keterangan:

- Panah putih menunjukkan sel hepar normal
- Panah hitam menunjukkan degenerasi
- Panah biru menunjukkan inti piknotik
- Panah hijau menunjukkan karioreksis

LAMPIRAN 6

HASIL ANALISIS SPSS 15.0

Case Processing Summary

kelompok	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
index C0	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
Cneg	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
P1	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
P2	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
P3	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%

Descriptives

Report

index

kelompok	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
C0	,0700	,02179	,0600	,04	,11
Cneg	,0789	,01453	,0800	,06	,11
P1	,0870	,02058	,0800	,05	,13
P2	,0920	,01751	,0950	,05	,11
P3	,0900	,02906	,0900	,04	,14
Total	,0840	,02200	,0800	,04	,14

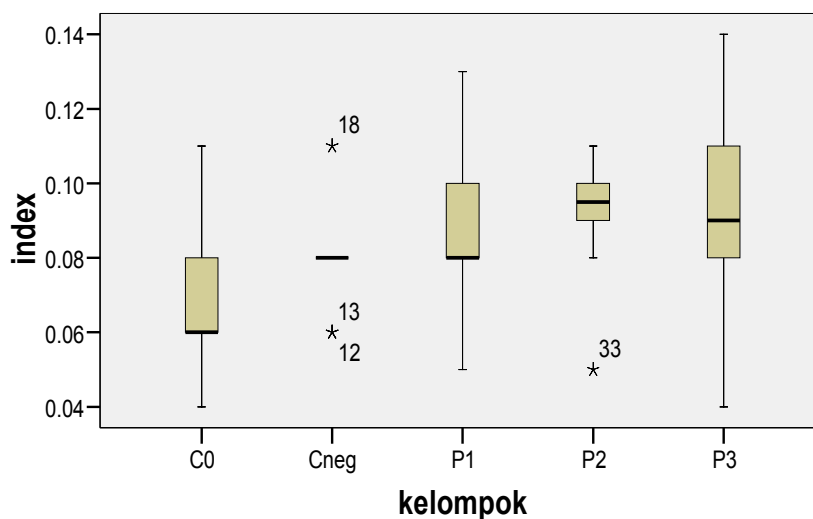
kelompok	Percentiles							
	5	10	25	50	75	90	95	
Weighted Average(Definitio n 1)	index C0	,0400	,0400	,0550	,0600	,0850	.	.
	Cneg	,0600	,0600	,0700	,0800	,0800	.	.
	P1	,0500	,0530	,0800	,0800	,1000	,1270	.
	P2	,0500	,0530	,0875	,0950	,1025	,1100	.
	P3	,0400	,0410	,0725	,0900	,1100	,1370	.
Tukey's Hinges	index C0			,0600	,0600	,0800		
	Cneg			,0800	,0800	,0800		
	P1			,0800	,0800	,1000		
	P2			,0900	,0950	,1000		
	P3			,0800	,0900	,1100		

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
index C0	,232	9	,176	,949	9	,676
Cneg	,358	9	,001	,764	9	,008
P1	,267	10	,042	,883	10	,140
P2	,255	10	,065	,837	10	,041
P3	,200	10	,200(*)	,945	10	,615

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction



NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

kelompok	N	Mean Rank
index C0	9	16,11
Cneg	9	19,50
P1	10	25,20
P2	10	31,45
P3	10	28,90
Total	48	

Test Statistics(a,b)

	index
Chi-Square	8,188
df	4

Asymp. Sig.	,085
-------------	------

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: kelompok