



**PERUBAHAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS REMAJA
AKIBAT PAPARAN SUBKRONIS KLOORPIRIFOS, KARBOFURAN DAN
SIPERMETRIN**

SKRIPSI

Oleh
Siti Jamalia
NIM 182010101042

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2022**



**PERUBAHAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS REMAJA
AKIBAT PAPARAN SUBKRONIS KLORPIRIFOS, KARBOFURAN DAN
SIPERMETRIN**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

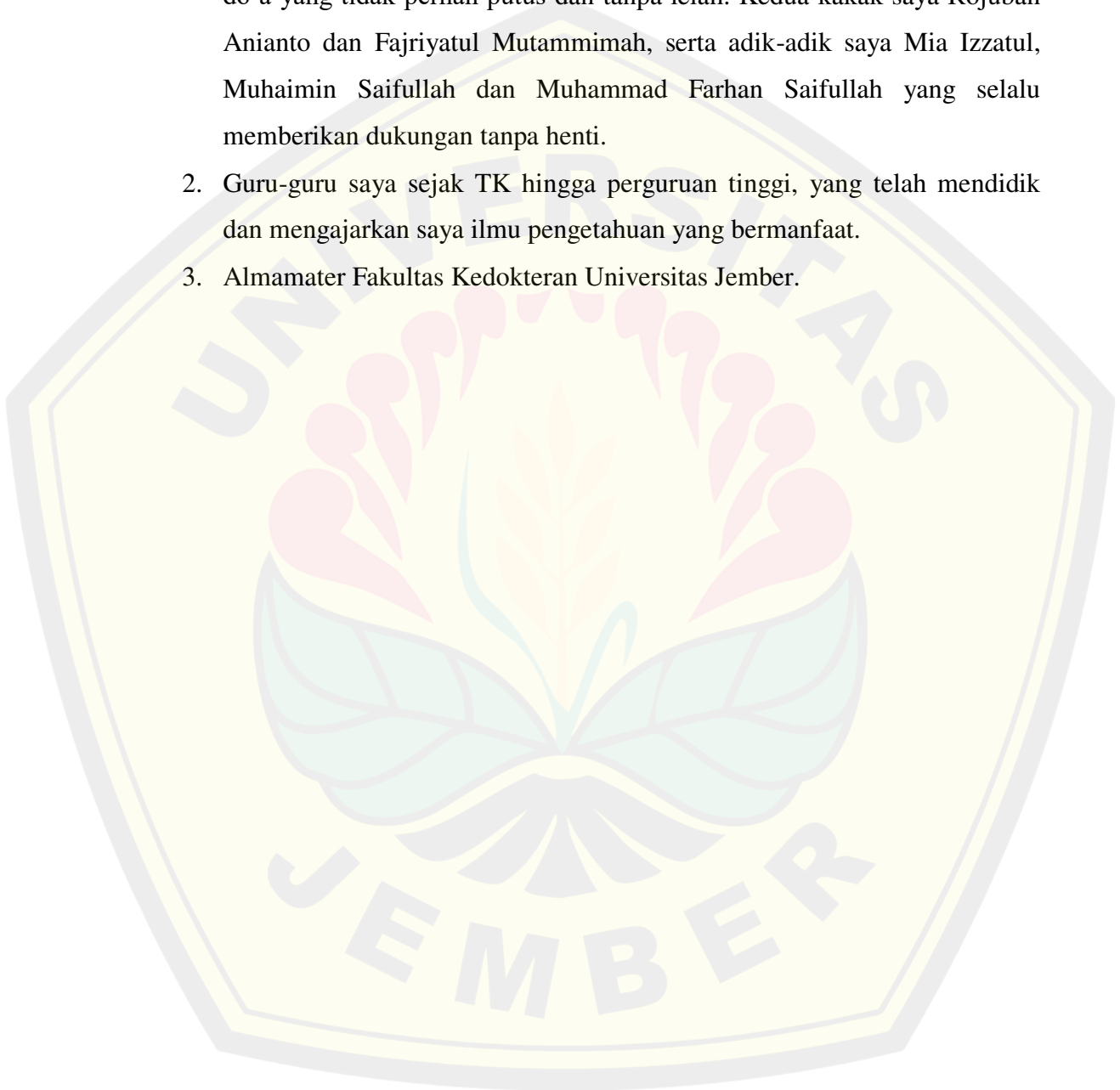
Oleh
Siti Jamalia
NIM 182010101042

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2022**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Saifullah Yunarto dan Ibu Kis Pujiati yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, semangat, motivasi dan do'a yang tidak pernah putus dan tanpa lelah. Kedua kakak saya Rojuban Anianto dan Fajriyatul Mutammimah, serta adik-adik saya Mia Izzatul, Muhaimin Saifullah dan Muhammad Farhan Saifullah yang selalu memberikan dukungan tanpa henti.
2. Guru-guru saya sejak TK hingga perguruan tinggi, yang telah mendidik dan mengajarkan saya ilmu pengetahuan yang bermanfaat.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTTO

“Allah does not burden a soul beyond that it can bear”

(QS. Al-Baqarah: 286)



SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

nama : Siti Jamalia

NIM : 182010101042

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Perubahan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2022

Yang menyatakan,

Siti Jamalia

NIM 182010101042

SKRIPSI

**PERUBAHAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS REMAJA
AKIBAT PAPARAN SUBKRONIS KLORPIRIFOS, KARBOFURAN DAN
SIPERMETRIN**

Oleh
Siti Jamalia
NIM 182010101042

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr. Muhammad Ihwan Narwanto, M.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Perubahan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 14 Juni 2022

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

dr. Azham Purwandhono, M.Si, Sp.N
NIP 198105182006041002

dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech
198408192009122003

Anggota II,

Anggota III,

Dr. dr. Muhammad Ihwan Narwanto, M.Sc
NIP 198002182005011001

Dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD
196607111996011001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M. Kes, Ph. D, Sp. BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Perubahan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin; Siti Jamalia, 182010101042; 2022; 83 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang paling banyak digunakan masyarakat dalam berbagai bidang, seperti bidang pertanian, perkebunan, kegiatan rumah tangga dan industri. Hanya 1% dari insektisida yang bekerja efektif menyerang target dan 99% sisanya lepas bebas menuju tanah, air, atmosfer dan akhirnya berdampak pada organisme non target, termasuk manusia. Insektisida klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin merupakan jenis yang paling banyak digunakan pada masing-masing kelompoknya, yaitu organofosfat, karbamat dan piretroid. Selain memiliki efek utama terhadap sistem saraf, ketiga insektisida ini juga bersifat hepatotoksik. Hepar usia remaja memiliki laju regenerasi yang lebih cepat namun rentan mengalami kerusakan dibanding kelompok usia tua. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perubahan gambaran histopatologi hepar tikus remaja akibat paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin.

Penelitian eksperimental ini menggunakan hewan coba tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) usia remaja yang diberi paparan insektisida klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Desain penelitian menggunakan *post test-only control group design* dan teknik pengambilan sampel menggunakan *Completely Randomized Design* (CRD). Penelitian ini dilakukan di Rumah Hewan Coba, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok normal tanpa pemberian paparan (N), kelompok kontrol dengan pemberian pelarut DMSO 5% (K), kelompok perlakuan klorpirifos 20 mg/kgbb (P1), kelompok perlakuan karbofuran 0,2 mg/kgbb (P2) dan kelompok perlakuan sipermetrin 20 mg/kgbb (P3). Besar sampel setiap kelompok adalah 5 ekor. Pemberian paparan dilakukan secara injeksi subkutan dengan pelarut DMSO 5% selama 21 hari. Metode skoring yang digunakan dalam pengamatan histopatologi hepar adalah skor *Mandja Roenigk*.

Analisis data menggunakan uji ANOVA (*one way analysis of varians*) dan dilanjutkan uji *post hoc LSD*. Pada penelitian ini didapatkan hasil signifikan $P < 0,05$ yang menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada gambaran histopatologi hepar tikus remaja yang diberi paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Gambaran kerusakan histopatologi hepar paling berat ditemukan pada kelompok karbofuran.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perubahan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Penyusunan ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak sebagai berikut:

1. Ayahanda Saifullah Yunarto dan Ibunda Kis Pujiati yang senantiasa mendidik, memberikan kasih sayang, semangat, pengorbanan, dukungan moral dan finansial serta do'a yang tiada henti. Kedua kakak saya Rojuban Anianto dan Fajriyatul Mutammimah, serta adik-adik saya Mia Izzatul, Muhaimin Saifullah dan Muhammad Farhan Saifullah yang selalu memberikan dukungan tanpa henti;
2. dr. Supangat, M. Kes, Ph.D, Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
3. Dr. dr. Muhammad Ihwan Narwanto, M.Sc selaku dosen pembimbing utama dan dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Azham Purwandhono, M.Si, Sp.N dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun serta bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
5. dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. Seluruh civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang turut ikut membantu dalam proses administrasi skripsi ini;
7. Teman-teman saya di bangku kuliah, Minki Nida, Devi Octvia, Lailia Fatkul Jannah dan Ata Kamilatuzzahroh yang senantiasa ada saat dibutuhkan, memberi dukungan, semangat dan doa agar saya bisa menyelesaikan tugas akhir ini;

8. Teman-teman kelompok penelitian, Elok Azizatul, Fenny Aulia, Muhammad Haikal dan Libri Wira yang telah bersedia berjuang bersama, saling membantu, memberikan dukungan, dan semangat untuk menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini;
9. Teman-teman sekolah saya, Niken Ayu, Shofiyyah Zahrah, Sintya Purnamasari, Dina Hikmatul, Indira Milenia, Dewa Athaya, Gangsar Panji, Muhammad Faiqur dan Bagas Pramudya, yang selalu memberi dukungan dan motivasi untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
10. Teman-teman CRANIUM FK UNEJ 2018 yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis;
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bisa bermanfaat.

Jember, Juni 2022

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN SURAT PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	2
2.1. Insektisida	2
2.1.1 Definisi Insektisida	2
2.1.2 Klasifikasi Insektisida.....	2
2.2 Klorpirifos	8
2.2.1 Definisi Klorpirifos.....	8
2.2.2 Toksisitas Klorpirifos	9
2.2.3 Pengaruh Klorpirifos pada Hepar.....	9
2.3 Karbofuran	12
2.3.1 Definisi Karbofuran	12
2.3.2 Toksisitas Karbofuran.....	13
2.3.3 Pengaruh Karbofuran pada Hepar.....	14

2.4 Sipermetrin	15
2.4.1 Definisi Sipermetrin.....	15
2.4.2 Toksisitas Sipermetrin.....	16
2.4.3 Pengaruh Sipermetrin pada Hepar.....	17
2.5 Hepar	18
2.5.1 Anatomi Hepar	18
2.5.2 Fisiologi Hepar	20
2.5.3 Histologi Hepar	23
2.5.4 Hepar pada Usia Remaja	27
2.7 Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian	30
2.7.1 Kerangka Konseptual.....	30
2.7.2 Hipotesis Penelitian	31
BAB 3. METODE PENELITIAN	30
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	30
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	33
3.3 Populasi dan Besar Sampel	34
3.3.1 Populasi Penelitian.....	34
3.3.2 Sampel Penelitian.....	34
3.3.3 Besar Sampel	34
3.4 Jenis dan Sumber Data	35
3.5 Variabel Penelitian	35
3.5.1 Variabel Bebas.....	35
3.5.2 Variabel Terikat.....	36
3.5.3 Variabel Kontrol.....	36
3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukuran	36
3.7 Instrumen Penelitian	37
3.8 Prosedur Penelitian	38
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	38
3.8.2 Aklimatisasi dan Perawatan Hewan Coba.....	38
3.8.3 Pemberian Paparan Insektisida	38

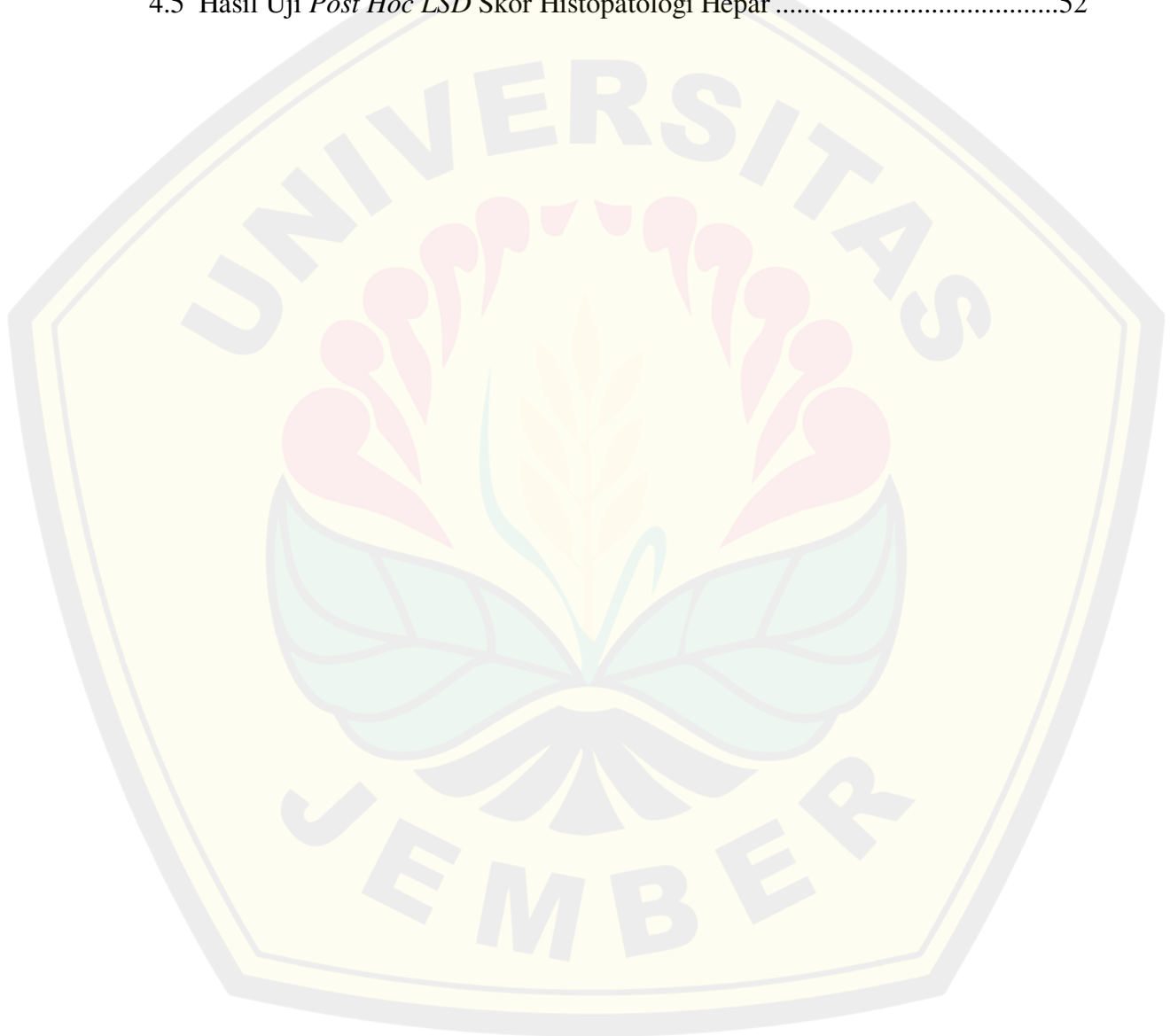
3.8.4	Terminasi dan Nekropsi	39
3.8.5	Pembuatan Preparat Histopatologi	39
3.8.6	Pengamatan Preparat Histopatologi	40
3.9	Analisis Data	42
3.10	Alur Penelitian	43
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1	Hasil Penelitian	33
4.2	Analisis Data	51
4.3	Pembahasan	53
BAB 5.	PENUTUP	57
5.1	Kesimpulan	56
5.2	Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	58
	LAMPIRAN	63

DAFTAR GAMBAR

2.1	Struktur Kimia Klorpirifos	8
2.2	Struktur Kimia Karbofuran	12
2.3	Metabolisme Karbofuran	14
2.4	Struktur Kimia Sipermetrin.....	16
2.5	Facies Diaphragmatica dari Ventral.....	19
2.6	Facies Visceralis dari Kaudal.....	19
2.7	Sistematika Vaskular Hepar	20
2.8	Skematik Aliran Darah Hepar	22
2.9	Histologi Hepar	24
2.10	Susunan dalam 1 Lobulus Hepar.....	24
2.11	Sel Fungsional Hepar	25
2.12	Irisan Lobulus Hepar Diperbesar	26
2.13	Zona Hepar.....	27
2.14	Kerangka Teori.....	28
2.15	Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian	30
3.1	Skema Rancangan Penelitian	32
3.2	Perhitungan Sampel	35
3.3	Perhitungan Sampel Koreksi.....	35
3.4	Alur Penelitian	43
4.1	Gambaran Histopatologi Hepar Kelompok Normal	46
4.2	Gambaran Histopatologi Hepar Kelompok Kontrol	47
4.3	Gambaran Histopatologi Hepar Kelompok Klorpirifos.....	48
4.4	Gambaran Histopatologi Hepar Kelompok Karbofuran	49
4.5	Gambaran Histopatologi Hepar Kelompok Sipermetrin.....	50

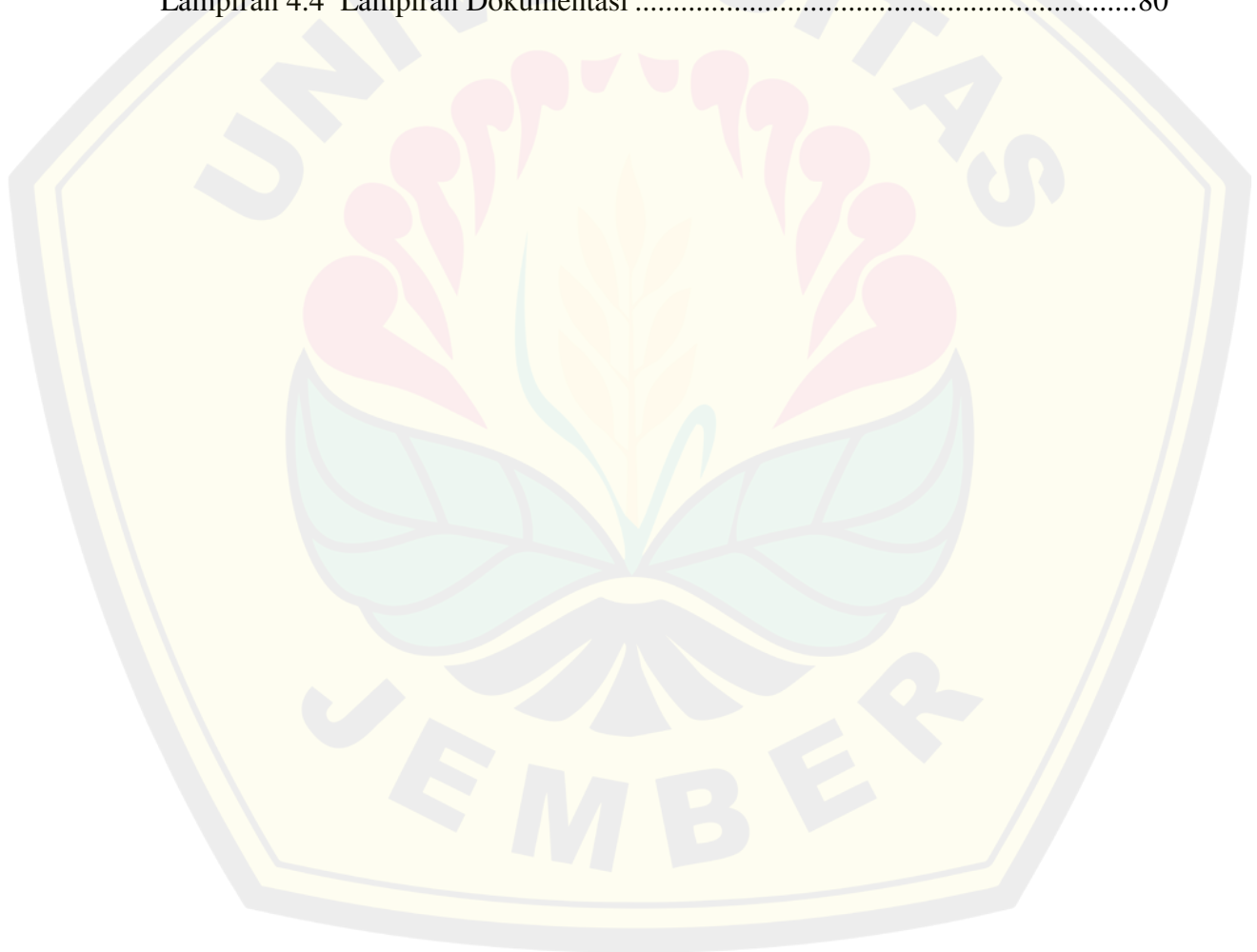
DAFTAR TABEL

3.1 Definisi Operasional.....	36
3.2 Instrumen Penelitian.....	37
3.3 Skor <i>Manja Roenigk</i>	41
4.1 Hasil Rata-Rata Skor Histopatologi Hepar	45
4.2 Hasil Uji Normalitas Setiap Kelompok.....	51
4.3 Hasil Uji Homogenitas Skor Histopatologi Hepar	51
4.4 Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i> Skor Histopatologi Hepar	52
4.5 Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Skor Histopatologi Hepar	52



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Etik Penelitian.....	63
Lampiran 3.2 Cara Pembuatan Larutan Stok DMSO 5% dan Insektisida	65
Lampiran 3.3 Data Berat Badan dan Volume Injeksi Kelompok Normal dan Kontrol.....	66
Lampiran 3.4 Perhitungan Dosis dan Volume Klorpirifos	68
Lampiran 3.5 Perhitungan Dosis dan Volume Karbofuran.....	69
Lampiran 3.6 Perhitungan Dosis dan Volume Sipermetrin	70
Lampiran 3.7 Prosedur Pembedahan Hewan Coba.....	71
Lampiran 3.8 Protokol Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar.....	72
Lampiran 4.1 Prosedur Pengamatan Preparat Histopatologi	74
Lampiran 4.2 Data Skoring Histopatologi Hepar	76
Lampiran 4.3 Uji Statistik	77
Lampiran 4.4 Lampiran Dokumentasi	80



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang paling banyak digunakan masyarakat dalam berbagai bidang, seperti bidang pertanian, perkebunan, kegiatan rumah tangga dan industri. Insektisida berperan penting untuk mengurangi penyebaran penyakit yang ditularkan melalui vektor kelompok insekta. Insektisida tidak hanya bersifat toksik pada serangga, namun juga terhadap organisme nontarget termasuk mamalia dan manusia (Gupta dan Milatovic, 2014). Secara global, insektisida merupakan salah satu penyebab utama terjadinya kasus keracunan pada manusia. Setiap tahunnya, terjadi 250.000 hingga 370.000 kasus keracunan insektisida (Chowański dkk., 2014).

Paparan insektisida dapat terjadi secara langsung yaitu melalui inhalasi, ingesti, dan dermal. Sedangkan paparan secara tidak langsung melalui konsumsi produk pertanian dan perkebunan yang didalamnya terkandung residu insektisida (Pascal dkk., 2020). Terdapat penelitian yang menunjukkan hanya 1% dari insektisida yang bekerja efektif menyerang target dan 99% sisanya dapat lepas bebas menuju tanah, air, atmosfer dan pada akhirnya menyerang organisme non target (Khan dan Ahmad, 2019). Insektisida sintetik organik terbagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan senyawa kimianya, yaitu organoklorin, organofosfat, karbamat dan piretroid (Akashe, 2018).

Organoklorin bekerja dengan merusak jaringan saraf yang mengakibatkan konvulsi, paralisis hingga berakhir dengan kematian insekta. Organoklorin memiliki efek residu jangka panjang karena kandungannya resisten terhadap sebagian besar proses degradasi biologi dan kimia. Hal ini menyebabkan organoklorin dilarang penggunaannya (Khan dan Ahmad, 2019).

Organofosfat lebih mudah terurai di lingkungan dibandingkan organoklorin (Khan dan Ahmad, 2019). Lebih dari 50% insektisida yang digunakan di seluruh dunia adalah organofosfat pada tahun 2015. Jenis senyawa organofosfat yang paling banyak digunakan adalah klorpirifos, yaitu sebanyak 40% (Liem dkk., 2021). Organofosfat bersifat neurotoksik dengan menghambat enzim asetilkolinesterase. Selain itu, organofosfat juga menginduksi stres oksidatif sel, memengaruhi jalur metabolisme dan menyebabkan disfungsi organ multipel. Beberapa penelitian telah mengonfirmasi hepar adalah organ utama yang mengalami kerusakan akibat toksisitas organofosfat (Karami-mohajeri dkk., 2017).

Karbamat memiliki mekanisme kerja yang sama dengan organofosfat. Perbedaan 2 kelompok tersebut ada pada asal turunan dan sifat ikatannya terhadap enzim asetilkolinesterase (Dias dkk., 2015). Karbamat mulai banyak digunakan masyarakat setelah organoklorin dilarang penggunaannya, yaitu sekitar 50% pada tahun 2015 secara global. Jenis senyawa karbamat yang paling banyak digunakan adalah karbofuran (Casida dan Bryant, 2017; Asrianti dkk., 2020). Beberapa penelitian menggunakan hewan coba menunjukkan karbamat memiliki efek samping terhadap banyak organ, terutama pada organ hepar (Dias dkk., 2015).

Piretroid memiliki mekanisme kerja utama yaitu dengan memodulasi saluran natrium yang menyebabkan perpanjangan depolarisasi sel saraf. Hal ini menimbulkan aktivitas saraf berulang yang berakhir menjadi hipereksitasi dan kematian (Riar, 2014). Selain itu, paparan piretroid juga menginduksi kerusakan sel melalui aktivasi stres oksidatif dan ekspresi gen proinflamator, terutama pada organ hepar (Aouey dkk., 2017). Piretroid mewakili sekitar 25% kelompok insektisida yang paling banyak digunakan secara global (Gupta dan Milatovic, 2014). Salah satu jenis senyawa piretroid yang paling banyak digunakan adalah sipermetrin (Kayode dkk., 2019; Al-omar dkk., 2020).

Hepar adalah salah satu organ utama yang berpotensi mengalami kerusakan akibat paparan insektisida. Hal ini dikarenakan fungsi utama hepar sebagai tempat aktivasi dan detoksifikasi zat toksik. Secara fisiologis, insektisida yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami detoksifikasi oleh hepar dengan

hasil akhir berupa senyawa lain yang lebih larut air agar mudah diekskresikan melalui urine (Pratama, 2019). Kerusakan hepar akibat paparan insektisida dapat dibuktikan melalui perubahan biomarker hepar, seperti serum aminotransferase, bilirubin direk dan bilirubin indirek (Ismail dkk., 2021). Pengamatan secara histopatologi lebih spesifik dapat mengetahui adanya kerusakan pada sel-sel hepar (Tanvir dkk., 2016).

Hepar memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi terutama pada kelompok usia muda. Namun, usia hanya memengaruhi laju regenerasi bukan kapasitas atau kemampuan untuk mengembalikan volume organ aslinya. Selain itu, organ hepar pada kelompok usia muda juga rentan mengalami kerusakan dibandingkan kelompok usia tua. Terdapat penelitian yang menunjukkan adanya induksi faktor proliferasi hepatosit dan ekspresi gen dalam siklus sel yang tidak terhambat pada tikus usia remaja (Schmucker dan Sanchez, 2011). Jika sejak usia remaja seseorang telah mengalami kerusakan hepar, dikhawatirkan akan berdampak pada produktivitas saat memasuki kelompok usia selanjutnya.

Terdapat beberapa penelitian terdahulu yang melakukan pengamatan histopatologi hepar akibat paparan insektisida secara subkronis. Uji toksisitas subkronis dilakukan untuk mengetahui efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, efek yang ditimbulkan akibat paparan berulang dalam jangka waktu tertentu dan efek kumulatif yang dapat ditimbulkan. Namun, jumlah penelitian tersebut sangat terbatas dan belum mencakup keseluruhan jenis insektisida. Hal inilah yang mendorong dilakukannya penelitian yang berjudul “Perubahan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah terdapat perubahan gambaran histopatologi hepar tikus remaja akibat paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan histopatologi hepar tikus remaja akibat paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk membuktikan kerusakan histopatologi hepar tikus remaja akibat paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Bagi Peneliti

Mengetahui dan menganalisa kerusakan histopatologi hepar akibat paparan insektisida klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin, serta meningkatkan kemampuan menulis karya ilmiah.

b. Bagi Ilmu Pengetahuan

Menambah data penelitian dan ilmu pengetahuan di bidang agromedis sehingga dapat dijadikan sebagai bahan acuan penelitian selanjutnya.

c. Bagi Pemerintah atau Penentu Kebijakan

Menambah informasi terkait dampak penggunaan insektisida terhadap kesehatan pelaku agroindustri usia remaja, sehingga dapat dijadikan sebagai bahan acuan untuk membuat kebijakan atau aturan penggunaan insektisida.

d. Bagi Masyarakat

Memberikan pengetahuan kepada masyarakat khususnya para pelaku agroindustri usia remaja akibat penggunaan insektisida berlebih dan tidak terkendali yang dapat berpotensi menyebabkan kerusakan hepar baik secara struktural maupun fungsional.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Insektisida

2.1.1 Definisi Insektisida

Insektisida adalah senyawa toksik yang digunakan untuk mengontrol dan membunuh serangga. Senyawa ini mampu memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan serangga dalam siklus hidupnya. Insektisida sangat bermanfaat dalam mengontrol penyebaran penyakit yang diperantarai oleh vektor kelompok insekta, seperti nyamuk dan kutu. Namun, insektisida banyak disalahgunakan oleh masyarakat. Salah satu contohnya adalah sering digunakan sebagai cara untuk bunuh diri terutama di negara berkembang. Selain itu, banyak juga kasus keracunan akibat paparan insektisida pada organisme non target. Paparan ini bisa melalui inhalasi, ingesti, dermal dan kontak langsung dengan mata (Gupta dan Milatovic, 2014; Ifemeje dan Patrick-iwuanyanwu, 2020).

Insektisida merupakan salah satu penyebab utama terjadinya kasus keracunan terhadap manusia. Setiap tahunnya, terjadi 250.000 hingga 370.000 kasus keracunan akibat insektisida secara global, baik akut maupun kronis. Keracunan akut banyak dialami oleh masyarakat di negara berkembang karena penggunaannya yang umum dan masif. Secara signifikan, bunuh diri merupakan kasus terbanyak yang masuk dalam kategori keracunan akut insektisida. Sedangkan di negara maju, keracunan yang paling banyak terjadi adalah akibat paparan insektisida kronis (Chowański dkk., 2014).

2.1.2 Klasifikasi Insektisida

Insektisida dibagi menjadi 2 kelompok besar, yaitu kelompok alami dan sintetik. Kelompok insektisida alami adalah insektisida yang berbahan dasar tanaman dan minyak mineral. Beberapa contohnya adalah *pyrethrum*, *azadirachtin*, *petroleum oil* dan *stylet oil*. Sedangkan kelompok insektisida sintetik dibagi lagi menjadi 2 jenis yaitu anorganik dan organik. Insektisida anorganik adalah jenis insektisida yang tidak mengandung unsur karbon dan bersifat tidak mudah menguap namun larut dalam air. Contohnya adalah arsenat

dan sulfur. Sedangkan insektisida organik memiliki kandungan unsur karbon. Jenis ini dibagi lagi berdasarkan senyawa aktifnya yaitu organoklorin, organofosfat, karbamat dan piretroid (Akashe, 2018).

a. Organoklorin

Organoklorin atau bisa disebut dengan hidrokarbon terklorinasi adalah insektisida dengan senyawa organik yang terikat pada 5 atau lebih atom klorin. Insektisida ini memiliki efek residu jangka panjang di lingkungan dan bekerja dengan merusak jaringan saraf yang mengakibatkan konvulsi, paralisis hingga berakhir dengan kematian insekta (Ifemeje dan Patrick-iwuanyanwu, 2020).

Organoklorin terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu *dichlorodiphenylethanes*, *cyclodienes* dan *hexachlorocyclohexanes*. Salah satu contoh organoklorin adalah DDT. DDT sudah tersedia sejak perang dunia ke-2 dan digunakan sebagai insektisida secara luas di seluruh dunia. Namun, sekarang penggunaan insektisida ini telah dilarang karena sifat persistensinya terhadap lingkungan dan organisme sangat tinggi. Endosulfan dan lindane adalah jenis insektisida yang masih bisa digunakan saat ini, karena sifatnya yang masih bisa mengalami degradasi biologis (Tsai dan Pingtung, 2014; Jayaraj dkk., 2016; Ifemeje dan Patrick-iwuanyanwu, 2020).

b. Organofosfat

Organofosfat adalah insektisida yang berasal dari turunan asam fosfat dan termasuk salah satu kelompok insektisida dengan spektrum luas. Kelompok insektisida ini dikategorikan menjadi 13 jenis yang berbeda, beberapa diantaranya yaitu fosfat, fosforotioat, fosfonat dan fosforamidat. Organofosfat termasuk dalam kelompok yang paling banyak digunakan sejak setengah abad yang lalu. Hal ini disebabkan oleh perkembangan resistensi yang lebih rendah dari organoklorin terhadap serangga dan lemahnya persistensi residu terhadap lingkungan. Organofosfat mewakili lebih dari 50% kelompok insektisida yang paling banyak digunakan. Keracunan akut organofosfat secara global menyebabkan 100.000 kematian per tahun (Karami-mohajeri dkk., 2017).

Organofosfat memiliki mekanisme utama sebagai inhibitor enzim asetilkolinesterase. Namun, insektisida ini juga mampu memengaruhi sistem organ lainnya dalam tubuh. Beberapa mekanismenya adalah dengan menginduksi stres oksidatif sel, memengaruhi jalur metabolisme dan menyebabkan disfungsi organ multipel. Beberapa contoh kelompok organofosfat yaitu klorpirifos, ziadinon, malation, diaksinon dan dioklorvos (Karami-mohajeri dkk., 2017; Ifemeje dan Patrick-iwuanyanwu, 2020).

c. Karbamat

Karbamat adalah insektisida yang berasal dari turunan asam karbamat dan memiliki struktur yang mirip dengan organofosfat. Mekanisme kerja utamanya adalah memengaruhi transmisi sinyal saraf yang dapat berakhir menjadi kematian serangga. Sebagai inhibitor asetilkolinesterase, karbamat memiliki sifat *reversible* dibandingkan dengan organofosfat yang bersifat *irreversible*. Insektisida ini juga mudah mengalami degradasi alami dengan polusi minimal. Karbofuran, karbaril dan aminokarb adalah beberapa contoh dari kelompok insektisida karbamat (Dias dkk., 2015; Ifemeje dan Patrick-iwuanyanwu, 2020).

d. Piretroid

Piretroid adalah insektisida berbahan kimia sintetik yang strukturnya mirip dengan insektisida alami *pyrethrum*. *Pyrethrum* dapat terdegradasi dengan sangat mudah melalui paparan cahaya (sinar *ultraviolet*) dan udara. Karena sifat inilah derivat sintetik mulai dikembangkan yang kemudian disebut dengan piretroid. Piretroid mewakili sekitar 25% kelompok insektisida yang paling banyak digunakan (Gupta dan Milatovic, 2014). Diperkirakan bahwa penggunaan piretroid sintetik kelak akan mengalahkan organofosfat karena toksisitasnya yang lebih rendah terhadap mamalia dan tinggi terhadap serangga (Gupta dan Milatovic, 2014; Aouey dkk., 2017).

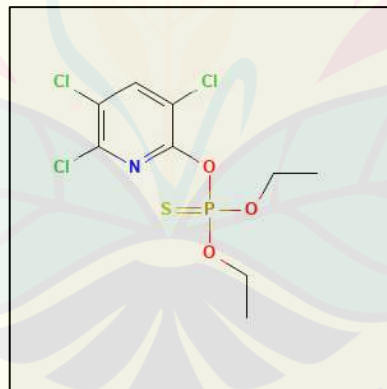
Mekanisme kerja utama piretroid yaitu dengan memodulasi saluran natrium yang dapat menyebabkan perpanjangan depolarisasi sel saraf. Hal ini menyebabkan terjadinya aktivitas sel saraf berulang yang berakhir menjadi hipereksitasi dan kematian. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa piretroid juga dapat memengaruhi sistem organ lainnya yang dapat dilihat

menggunakan biomarker biokimia dan histopatologi. Beberapa contoh kelompok piretroid yaitu α -sipermetrin, bifentrin, siflutrin, deltametrin dan permetrin (Nwabor, 2019; Al-omar dkk., 2020).

2.2 Klorpirifos

2.2.1 Definisi Klorpirifos

Klorpirifos adalah jenis insektisida golongan organofosfat dengan formula kimia $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ dan struktur kimia yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Karami-mohajeri dkk., 2017). Klorpirifos merupakan insektisida terklorinasi spektrum luas yang mudah diabsorpsi dari usus dan paru-paru pada manusia dan hewan percobaan. Klorpirifos berbentuk padatan kristal berwarna putih dengan bau yang menyengat. Klorpirifos tidak mudah larut oleh air dan biasanya dicampur dengan minyak terlebih dahulu sebelum diaplikasikan. Toksisitas klorpirifos dapat terjadi melalui paparan langsung maupun tidak langsung akibat konsumsi makanan dan air yang terkontaminasi oleh residu klorpirifos (Tanvir dkk., 2016). Organisme non target mudah terpapar klorpirifos melalui *gastrointestinal tract*, inhalasi dan melalui kulit intak (Yassin dkk., 2021).



Gambar 2.1 Struktur kimia klorpirifos (Sumber: APA *PubChem.*, 2021)

2.2.2 Toksisitas Klorpirifos

Klorpirifos memengaruhi sistem saraf dengan menghambat enzim asetilkolinesterase sehingga pemecahan neurotransmitter asetilkolin terhenti. Klorpirifos juga memiliki sifat *irreversible* dalam menghambat enzim asetilkolinesterase di celah sinaptik saraf. Akumulasi asetilkolin menyebabkan stimulasi berlebih dari sel-sel saraf dan krisis kolinergik. Hal ini mengakibatkan neurotoksisitas dan akhirnya mengakibatkan kematian (Yassin dkk., 2021).

Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus yang dilakukan oleh Tanvir dkk. (2016), menunjukkan distribusi klorpirifos tersebar sebanyak 6,18% di jaringan non adiposa, 3,80% di jaringan adiposa, 0,29% terakumulasi di hepar, 0,22% di otak, 0,10% di ginjal dan 0,03% di ovarium. Sedangkan sisanya sebanyak 83,50% terdeteksi dalam urine. Penelitian ini tidak mendeteksi klorpirifos di jantung, paru-paru dan muskulus skeletal, namun terdeteksi sebanyak 0.008 mg/mL klorpirifos dalam darah. Hal ini menunjukkan klorpirifos memiliki sifat lipofilik yang kuat, lalu dimetabolisme di hepar menjadi metabolit yang lebih larut air agar bisa diekskresikan melalui urine (Tanvir dkk., 2016).

Klorpirifos juga memengaruhi kadar enzim asetilkolinesterase di berbagai sistem dalam tubuh. Penelitian Kondakala dkk. (2017), menunjukkan terdapat penghambatan enzim asetilkolinesterase plasma dan sel darah merah pada mencit. Dosis 2,0 mg/kgBB dapat digunakan untuk menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase dalam plasma dan sel darah merah, tetapi tidak di sistem saraf pusat. Hal ini dikarenakan aktivitas enzim asetilkolinesterase yang lebih sensitif terhadap inhibisi akibat paparan klorpirifos daripada di sistem saraf pusat (Kondakala dkk., 2017).

2.2.3 Pengaruh Klorpirifos pada Hepar

Sebagian besar penelitian sebelumnya berfokus pada penilaian neurotoksisitas klorpirifos dan sedikit mengenai efek terhadap organ lainnya pada mamalia, termasuk organ hepar (Yassin dkk., 2021). Penelitian yang dilakukan Uzun dan Kalender (2013), paparan klorpirifos pada tikus secara oral dengan dosis 5,4 mg/kgBB atau 1/25 LD50 setiap hari selama 28 hari menunjukkan

gambaran kerusakan histopatologi hepar. Selain itu juga terjadi peningkatan signifikan pada biomarker hepar yaitu ALP, ALT, AST dan aktivitas LDH, namun secara statis juga terjadi penurunan pada total protein dan albumin jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kerusakan histopatologi hepar ditandai dengan ditemukannya dilatasi sinusoid, difusi proliferasi sel kupffer, infiltrasi sel mononuklear, piknosis dan sitoplasma eosinofilik (Uzun dan Kalender, 2013).

Penelitian yang dilakukan Tanvir dkk. (2016), paparan klorpirifos pada tikus secara oral dengan dosis 5 mg/kgBB atau sekitar 1/27 dari LD50 setiap hari selama 21 hari menimbulkan toksisitas pada hepar yang ditandai dengan perubahan histopatologi hepar tikus. Kelompok kontrol penelitian tersebut menunjukkan gambaran histopatologi hepar yang tampak normal dengan vena sentral yang terlihat jelas di tengah lobulus. Sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan gambaran infiltrasi berat dan degenerasi sel yang tampak pada area vena sentral perifer. Selain itu, juga tampak gambaran kongesti dengan infiltrat pada vena sentral hepar tikus yang diinduksi klorpirifos (Tanvir dkk., 2016).

Terdapat penelitian yang menunjukkan klorpirifos dapat meningkatkan biomarker AST dan ALT sebagai tanda kerusakan pada hepar. Peningkatan biomarker ini diikuti oleh peningkatan mediator inflamasi *Tumor Necrosis Factor* α (TNF- α). Selain itu, ketika terjadi peningkatan BUN dan albumin pada hewan coba juga selalu diikuti oleh peningkatan biomarker AST dan ALT. Oleh karena itu, tidak dapat dipastikan perubahan biomarker tersebut menunjukkan kerusakan hepar sesungguhnya. Sehingga diperlukan penilaian lain yaitu dengan pengamatan histopatologi (Karami-mohajeri dkk., 2017).

Hepar adalah tempat metabolisme utama klorpirifos oleh beberapa oksidasi campuran sitokrom P450 spesifik melalui beberapa jalur reaksi. *CPF-Oxon* adalah metabolit toksik utama klorpirifos. *CPF-Oxon* dapat menghambat enzim asetilkolinesterase di jaringan target yang menyebabkan stimulasi berlebih serta kerusakan sistem saraf. Klorpirifos juga menginduksi stres oksidatif pada sel hepar sehingga menyebabkan lesi berat hingga nekrosis (Tanvir dkk., 2016).

Secara umum, pada metabolisme xenobiotik fase 1 organofosfat terjadi reaksi oksidasi yang dapat mengaktifkan bentuk thiono organofosfat untuk menjadi inhibitor aktif enzim asetilkolinesterase. Senyawa organofosfat dipecah oleh enzim sitokrom P450 dan metabolit aktif yang dihasilkan adalah oksono-organofosfat dan ion sulfur bebas (mekanisme oksidasi desulfurasi). Metabolit oksono-organofosfat merupakan inhibitor kuat enzim asetilkolinesterase. Lalu, metabolit oksono-organofosfat dialirkan keluar hepar menuju aliran darah jantung hingga keseluruh tubuh dan kembali lagi ke hepar untuk dihidrolisis oleh enzim karboksilesterase dan paroksonase menjadi dialkil fosfat. Lalu, dialkil fosfat akan masuk ke fase II dan mengalami proses pemecahan menjadi dietil dan produk sisa yang pada akhirnya diekskresikan bersama urin. Dialkil fosfat bersifat lebih hidrofilik dari sebelumnya, sehingga akan mudah dikonjugasi di fase II ini. Dietil yang tersisa setelah konjugasi akan berikatan dengan gugus (OH⁻) dan menghasilkan ikatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) baru (Eleršek dan Filipi, 2006).

CPF-Oxon yang menginhibisi enzim asetilkolinesterase menyebabkan neurotransmitter asetilkolin menumpuk di celah sinaptik. Penumpukan asetilkolin ini menyebabkan peningkatan influx ion kalsium (Ca²⁺) di intraselular yang berkelanjutan. Terjadinya peningkatan influx ion kalsium (Ca²⁺) intrasel merangsang produksi *Nitric Oxide* (NO) yang selanjutnya juga meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Selain itu, produksi *Nitric Oxide* (NO) tidak hanya akibat dari inhibisi enzim asetilkolinesterase melalui peningkatan influx ion kalsium (Ca²⁺) dalam sel, namun juga karena terjadinya disfungsi mitokondria akibat paparan *CPF-Oxon*. Disfungsi mitokondria ini dapat mengganggu transpor ion kalsium (Ca²⁺) sehingga ion tersebut tertahan dalam sel secara persisten dan meningkatkan produksi *Nitric Oxide* (NO) (Eleršek dan Filipi, 2006; Pearson dan Patel, 2016).

Tubuh manusia secara alami dapat memproduksi antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), dan *Glutathion Peroxidase* (GPx). Jika jumlah produksi radikal bebas melebihi kemampuan produksi antioksidan endogen dan asupan antioksidan eksogen, maka dapat terjadi stres

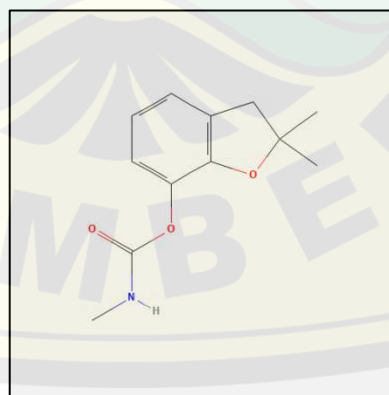
oksidatif di dalam sel melalui peroksidasi lipid pada membrane sel. Tidak seimbangya radikal bebas dan antioksidan ini menyebabkan kerusakan sel dan jaringan tubuh (Uzun dan Kalender, 2013).

2.3 Karbofuran

2.3.1 Definisi Karbofuran

Karbofuran dengan nama lain *2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate* adalah insektisida kelompok karbamat yang juga biasa disebut Furadan. Struktur kimia karbofuran dapat dilihat pada Gambar 2.2. Karbofuran merupakan salah satu insektisida kelompok karbamat yang paling bersifat toksik terhadap mamalia (Purushothaman dan Kuttan, 2017). Karbofuran berbentuk padatan seperti kristal putih dan tidak berbau. Jika terkena panas atau api, karbofuran dapat memancarkan nitrogen oksida toksik. Residu karbofuran telah terdeteksi di berbagai komponen lingkungan seperti tanah dan air akibat penggunaan karbofuran yang terus menerus (Kim dkk., 2021).

Organisme nontarget dapat terpapar karbofuran melalui ingesti dari makanan dan minuman yang telah terkontaminasi karbofuran (Jaiswal dkk., 2016). Karbofuran bersifat toksik berat melalui inhalasi dan ingesti, serta bersifat toksik sedang jika terpapar melalui kulit atau dermal (Patel, 2017). Karbofuran dapat diabsorpsi dengan baik melalui oral, inhalasi dan dermal. Namun, cukup sulit untuk diabsorpsi melalui kulit yang intak (Song dan Point, 2014).



Gambar 2.2 Struktur kimia karbofuran (Sumber: APA *PubChem.*, 2021)

2.3.2 Toksisitas Karbofuran

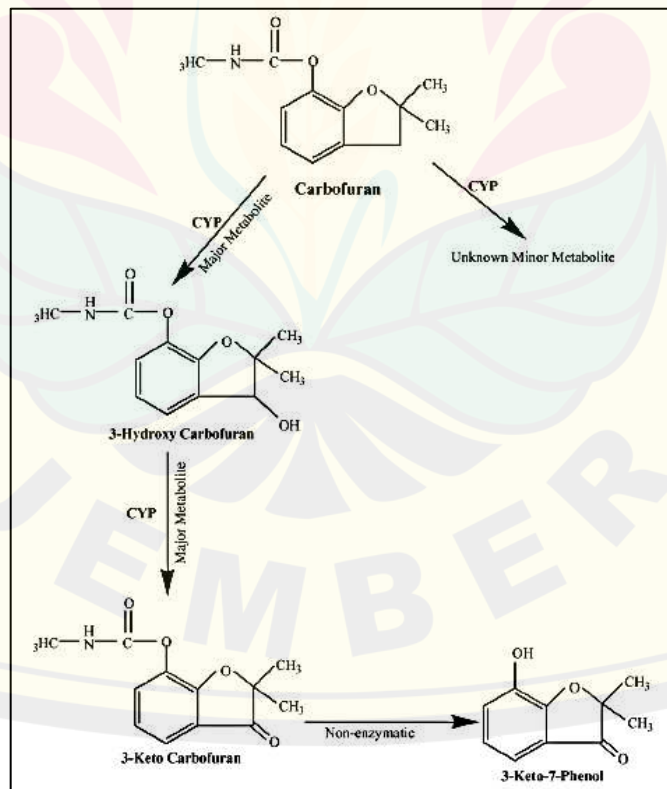
Karbofuran memiliki mekanisme kerja utama dengan menginhibisi enzim asetilkolinesterase di jaringan saraf, baik pada organisme target maupun nontarget. Akibatnya, terjadi akumulasi enzim asetilkolinesterase di reseptor dan *synaptic junction*. Hal inilah yang pada akhirnya menyebabkan hipereksitasi, konvulsi dan kematian (Purushothaman dan Kuttan, 2017). Karbofuran memiliki sifat lipofilik dan reversibel dalam menghambat enzim asetilkolinesterase melalui karbamilasi dari residu serin di celah sinaptik. Ikatan dengan asetilkolinesterase terhidrolisis secara spontan dalam kurun waktu beberapa jam (Jaiswal dkk., 2016). Selain menginhibisi enzim asetilkolinesterase, karbofuran juga memengaruhi aktivitas *Butyrylcholinesterase* (BChE) dengan mengikat *catalytic site* melalui karbamilasi. Hal ini menyebabkan komplikasi neurologi melalui penghambatan neurotransmisi saraf akibat penumpukan konsentrasi asetilkolin di *synaptic junction* dan *myoneural junction* (Saqib dkk., 2021).

Penelitian yang dilakukan oleh Purushothaman dkk. (2017), paparan karbofuran pada tikus secara oral dengan dosis 5 mg/kgBB setiap hari selama 30 hari menimbulkan perubahan signifikan pada kadar enzim di serum. Penelitian ini menunjukkan penurunan enzim asetilkolinesterase serta peningkatan enzim keratin kinase, laktat dehidrogenase dan gamma glutamil transferase (γ -GT). Selain itu, hasil penelitian kelompok yang diinduksi karbofuran juga menunjukkan terdapat perubahan enzim antioksidan, marker stres oksidatif, enzim mitokondrial dan enzim metabolisme karbohidrat di hepar. Kadar enzim antioksidan seperti SOD, CAT, GPX dan GSH didapatkan menurun. Kadar marker stres oksidatif berupa peroksidase lipid, diene konjugasi dan hidroperoksida didapatkan meningkat. Kadar enzim mitokondrial hepar berupa ICDH, MDH, SDH dan NADH dehidrogenase didapatkan menurun. Kadar enzim metabolisme karbohidrat hepar berupa *glucose-6-phosphatase*, *glucose-6-phosphate dehydrogenase* and *fructose1-6-bisphosphatase* juga didapatkan mengalami penurunan (Purushothaman dan Kuttan, 2017). Stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan antara produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan sistem pertahanan antioksidan sel atau jaringan dalam tubuh. Keracunan

karbofuran dapat menyebabkan toksisitas berat pada otak, hepar, jantung, ginjal dan otot yang onset gejalanya bergantung pada dosis paparan yang diberikan (Jaiswal dkk., 2016).

2.3.3 Pengaruh Karbofuran pada Hepar.

75% karbofuran yang diabsorpsi adalah protein terikat. Karbofuran dimetabolisme di hepar dan menghasilkan metabolit berupa *3-hydroxycarbofuran* dan *3-ketocarbofuran* melalui mekanisme oksidasi pada metabolisme fase I. Metabolit kunci ini diproduksi melalui mekanisme hidroksilasi pada karbon benzilik untuk menghasilkan *3-hydroxycarbofuran* yang kemudian dioksidasi menjadi *3-ketocarbofuran*. Setelah itu dilanjutkan dengan proses hidrolisis hingga menghasilkan zat berupa *3-hydroxy-7-phenol*, *3-keto-7-phenol* dan *7-phenol* (Gambar 2.3). Pada fase II sebagian besar metabolit yang terbentuk berupa konjugat glukoronida atau sulfat akan diekskresikan melalui urine (Song dan Point, 2014).



Gambar 2.3 Metabolisme karbofuran (Sumber: Usmani dkk., 2004)

Tempat metabolisme utama xenobiotik berada di hepar, termasuk juga insektisida karbofuran. Detoksifikasi utama obat, bahan kimia dan zat toksin terjadi di hepar, yang mana metabolit intermediet akan terakumulasi di hepatosit. Hal ini sangat memungkinkan terjadinya induksi stres oksidatif pada sel-sel hepar (Jaiswal dkk., 2015).

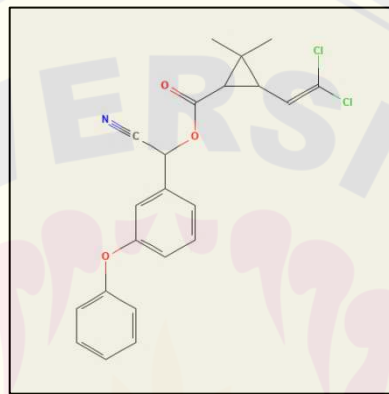
Efek paparan karbofuran terhadap hepar, baik perubahan biomarker dan histopatologi sama-sama dipengaruhi oleh dosis dan durasi paparan yang diberikan. Terdapat penelitian oleh El-Damaty dkk. (2012), yang membandingkan hasil gambaran histopatologi dan biomarker hepar tikus dari kelompok kontrol, kelompok perlakuan induksi karbofuran dosis rendah (1/20 LD50; 0,4 mg/kgbb) dan kelompok perlakuan induksi karbofuran dosis tinggi (1/10 LD50; 0,8 mg/kgbb). Penelitian ini dilakukan selama 30 hari dengan perlakuan berupa pemberian paparan karbofuran secara oral pada tikus. Pada kelompok kontrol didapatkan gambaran histologi hepar normal. Pada kelompok perlakuan karbofuran dosis rendah (1/20 LD50; 0,4 mg/kgbb) didapatkan gambaran hepatosit normal dan dilatasi sinusoid hepatic. Sedangkan, pada kelompok perlakuan karbofuran dosis tinggi (1/10 LD50; 0,8 mg/kgbb) didapatkan gambaran vakuola besar di hepatosit dan kongesti sinusoid hepatic. Juga, beberapa bagian hepar pada beberapa tikus di kelompok ini didapatkan distorsi lobulus hepar, mikrovesikel dan piknotik nucleus. Selain itu, juga terjadi peningkatan biomarker hepar berupa AST, ALT dan ALP sesuai dengan tingkatan dosisnya. Kelompok dosis tinggi didapatkan peningkatan biomarker yang lebih signifikan daripada kelompok dosis rendah terhadap kelompok kontrol (El-Damaty dkk., 2012).

2.4 Sipermetrin

2.4.1 Definisi Sipermetrin

Sipermetrin adalah ester karboksilat yang dihasilkan dari kondensasi formal antara asam 3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilsiklopropana-karboksilat dan gugus hidroksi alkohol dari hidroksi (3-fenoksifenil) asetonitril (Kim dkk., 2021). Struktur kimia sipermetrin dapat dilihat pada Gambar 2.4. Sipermetrin merupakan

insektisida kelompok piretroid II yang banyak digunakan secara global untuk pertanian, perumahan dan produk pengendali hama komersial. Residu sipermetrin dapat terdeteksi di lingkungan dan produk makanan. Meskipun telah dilaporkan sipermetrin memiliki toksisitas rendah, bioakumulasi dan persistensi sipermetrin menyebabkan toksisitas yang signifikan pada jaringan mamalia (Singh dkk., 2012). Paparan sipermetrin cukup toksik melalui ingesti atau dermal (Abdou dan Sayed, 2019).



Gambar 2.4 Struktur kimia sipermetrin (Sumber: APA *PubChem.*, 2021)

2.4.2 Toksisitas Sipermetrin

Sipermetrin merupakan senyawa hidrofobik yang dapat melewati membran sel. Karena sifat inilah, sipermetrin dengan mudah melewati *lipid bilayer* dan merusak susunan sel tubuh. Sipermetrin dapat merusak struktur sel dengan menyebabkan *efflux* enzim pada sitoplasma (Hussien dkk., 2013).

Target utama sipermetrin adalah dengan memodulasi saluran natrium hingga mengakibatkan hipereksitasi. Sipermetrin juga bersifat neurotoksik dengan memproduksi radikal bebas dan menurunkan pertahanan antioksidan. Sipermetrin meningkatkan kerusakan jaringan dengan meningkatnya kadar sitokin pro-inflamasi IL-1 dan TNF- α . Selain itu, sipermetrin juga diperkirakan dapat meningkatkan sitokin pro-inflamasi IL-1, IL-8 dan TNF- α serta menurunkan sitokin anti-inflamatori IL-4, IL-10 dan IL-13 (Abdou dan Sayed, 2019).

2.4.3 Pengaruh Sipermetrin pada Hepar

Sipermetrin bersifat toksik pada hepar karena tempat utama metabolisme sipermetrin berada di hepar. Sipermetrin dimetabolisme oleh enzim CYP-450 melalui jalur oksidatif yang dapat memicu *Reactive Oxygen Species* (ROS), serta berujung mengakibatkan stres oksidatif jaringan (Abdou dan Sayed, 2019). Produk metabolit aktif yang dihasilkan melalui metabolisme fase I adalah *3-phenoxybenzoic acid* (Gupta dan Milatovic, 2014).

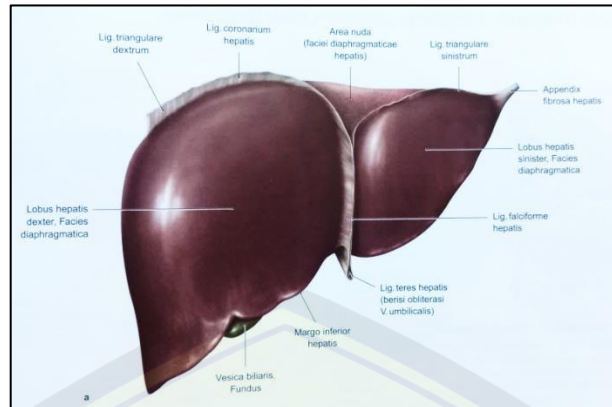
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kayode dkk. 2019, paparan sipermetrin pada tikus dengan dosis oral 25 mg/kgBB (1/10 LD50) setiap hari selama 14 hari dapat menimbulkan stres oksidatif, kerusakan sistem pertahanan antioksidan dan meningkatkan promotor inflamasi. Sipermetrin memicu stres oksidatif di hepar yang dibuktikan dengan meningkatnya lipid peroksidase dan produk protein oksidasi seperti MDA, LOOH dan AOPP secara signifikan. Peningkatan kadar produk inilah yang mengindikasikan sipermetrin menyebabkan kerusakan jaringan pada hepar. Sipermetrin dimetabolisme oleh sistem mikrosomal sitokrom P450 dan diikuti oleh reaksi stres oksidatif. Sipermetrin merusak sistem pertahanan antioksidan yang dibuktikan dengan menurunnya GSH dan TAC, serta meningkatnya SOD sebagai bentuk kompensasi respons adaptif peningkatan radikal bebas di hepar. Selain itu, sipermetrin juga mengaktifkan faktor transkripsi sensitif redoks seperti NF-kB akibat peningkatan stres oksidatif. Faktor transkripsi inilah yang menginduksi respons inflamasi, sehingga terjadi peningkatan kadar IL-6 dan TNF- α (Kayode dkk., 2019). Sedikit berbeda dengan penelitian Kayoke dkk. 2019, terdapat penelitian yang dilakukan oleh Ikpeme dkk. 2015, dan Soliman dkk. 2015, didapatkan terjadi penurunan SOD sebagai bukti kerusakan sistem pertahanan antioksidan akibat paparan sipermetrin (Ikpeme dkk., 2015; Soliman dkk., 2015).

Perubahan aktivitas enzim hepar dan histoarsitektur hepatosit juga menjadi bukti adanya kerusakan pada hepar akibat paparan sipermetrin. Menurut penelitian Mahna dkk. (2019), terjadi peningkatan ALT, AST dan ALP serta diikuti perubahan histopatologi hepar yaitu nekrosis, degenerasi vakuolar, peningkatan jumlah sel kupffer dan penurunan jumlah hepatosit setelah paparan sipermetrin pada hewan uji mencit. Penelitian ini dilakukan selama 28 hari dengan dosis oral 1/10 LD50. Selain itu, juga terjadi perubahan signifikan ekspresi gen p21 dan p53 pada hewan uji. Hal ini menunjukkan terdapat hubungan antara kerusakan hepar oleh sipermetrin melalui mekanisme regulasi siklus sel. Daerah promotor dari gen p53 juga menunjukkan perubahan status metilasi pada sampel hewan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol (Mahna dkk., 2019). Sipermetrin dapat menyebabkan efek toksik pada hepatosit melalui 2 cara yang berbeda, yaitu dengan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan mengakibatkan akumulasi hasil metabolit pada membran hepatosit. Akumulasi ini dapat terjadi karena sifat hidrofobik sipermetrin sehingga dapat mengganggu kestabilan hepatosit (Al-omar dkk., 2020).

2.5 Hepar

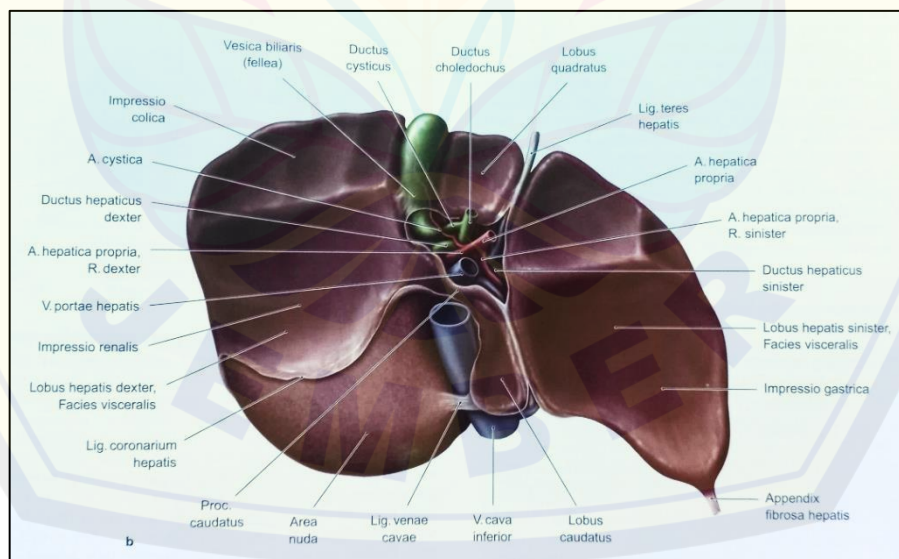
2.5.1 Anatomi Hepar

Hepar merupakan organ parenkim yang paling berat dalam tubuh manusia, beratnya sekitar 2-3% dari total berat badan. Sebagian besar hepar terletak di hipokondria kanan dan sisanya meluas melewati epigastrium hingga ke hipokondrium kiri. Lokasi hepar menyusup jauh hingga ke depan gaster. Secara morfologis, hepar dibagi menjadi 2 lobus utama yaitu lobus hepatis dekstra dan lobus hepatis sinistra. Kedua lobus tersebut dibatasi oleh ligamentum falciformis di bagian anterior, ligamentum teres hepatis di bagian inferior dan ligamentum venosum di bagian superior (Schunke dkk., 2013; Drake dkk., 2014).



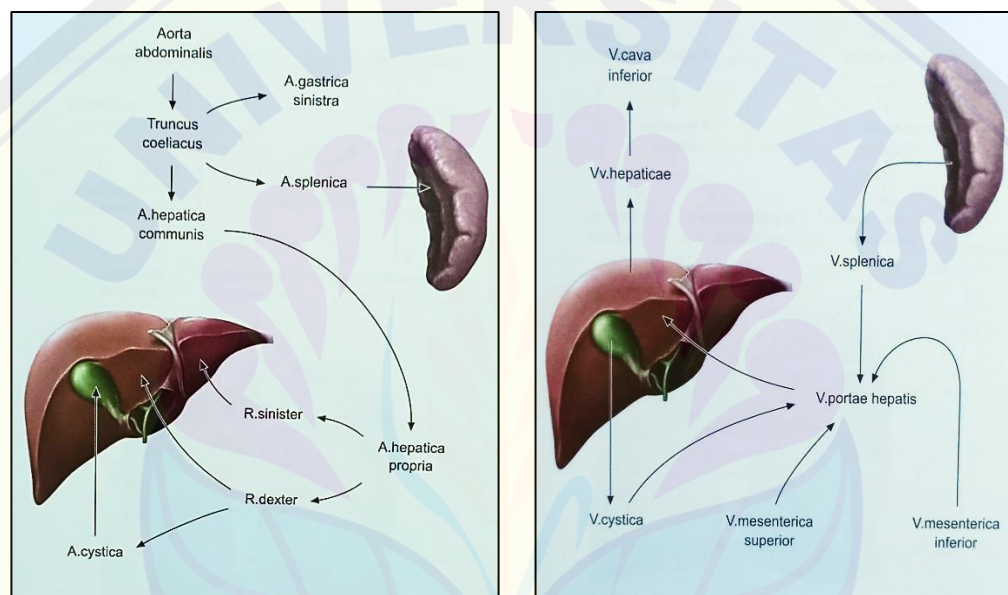
Gambar 2.5 Facies diaphragmatica dari ventral (Sumber: Schunke dkk., 2013)

Hepar juga memiliki dua facies, yaitu facies diaphragmatica dan facies visceralis (Gambar 2.5 dan Gambar 2.6). Facies diaphragmatica terletak di permukaan atas menghadap diafragma, sedangkan facies visceralis terletak di bagian bawah menghadap organ visceral. Di permukaan inferior hepar juga terdapat 2 lobus kecil, yaitu lobus caudatus dan lobus quadratus. Selain itu, facies visceralis juga mengandung porta hepatis untuk keluar masuknya pembuluh darah, pembuluh limfatik, saluran empedu dan saraf (ductus hepaticocommunis, A. hepatica propria dan V. porta hepatis) (Schunke dkk., 2013; Drake dkk., 2014).



Gambar 2.6 Fascies visceralis dari kaudal (Sumber: Schunke dkk., 2013)

Vaskularisasi hepar berasal dari arteri hepatica komunis yang merupakan salah satu cabang dari trunkus koleakus (Gambar 2.7). Kemudian, arteri hepatica komunis bercabang lagi menjadi arteri hepatica propria ramus dekstra yang menuju lobus kanan hepar dan ramus sinistra yang menuju lobus kiri hepar. Sedangkan vena yang memvaskularisasi hepar adalah vena porta hepatis yang berasal dari vena mesenterika inferior, vena mesenterika superior, vena splenika dan vena sistika. Selanjutnya aliran vena porta hepatis akan menuju ke vena hepatica dan kemudian dilanjutkan ke vena kava inferior (Schunke dkk., 2013; Waschke dkk., 2018).



Gambar 2.7 Sistematika vaskular hepar (Sumber: Schunke dkk., 2013)

2.5.2 Fisiologi Hepar

2.5.2.1 Fungsi Hepar

Hepar adalah organ metabolik terbesar dan terpenting dalam tubuh. Organ ini bisa disebut juga sebagai pabrik biokimia utama tubuh. Hepar memiliki banyak fungsi, termasuk berikut ini (Sherwood, 2019):

- a. Sekresi garam empedu yang membantu pencernaan lemak dan penyerapannya. Hal ini adalah satu-satunya fungsi hepar yang berkaitan dengan sistem pencernaan.

- b. Pemrosesan metabolik utama nutrisi (karbohidrat, protein dan lemak) setelah zat-zat ini diserap dari saluran pencernaan.
- c. Mendetoksifikasi atau menguraikan zat sisa tubuh, hormon, obat dan senyawa asing lainnya.
- d. Menyintesis protein plasma, termasuk protein yang dibutuhkan untuk proses pembekuan darah serta yang mengangkut hormon steroid dan tiroid.
- e. Menyimpan glikogen, lemak, besi, tembaga, dan banyak vitamin.
- f. Mengaktifkan vitamin D, yang dilakukan hepar bersama dengan ginjal.
- g. Menyekresi hormon trombopoietin (merangsang produksi trombosit), hepsidin (menghambat penerapan zat besi dari usus) dan faktor pertumbuhan mirip insulin 1 (merangsang pertumbuhan).
- h. Memproduksi protein fase akut yang penting dalam inflamasi.
- i. Mengekskresi kolesterol dan bilirubin. Bilirubin adalah produk penguraian yang berasal dari destruksi eritrosit tua.
- j. Mengeluarkan bakteri dan eritrosit tua, karena adanya makrofag residen hepar.

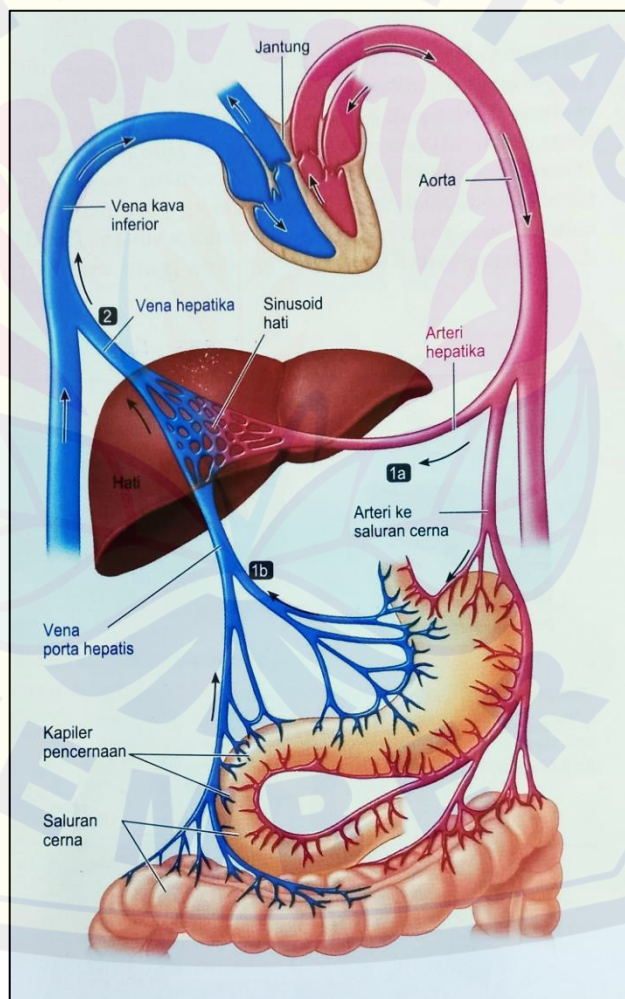
Meskipun hepar memiliki beragam fungsi yang kompleks, tidak banyak spesialisasi yang ditemukan di antara sel-sel dalam hepar. Setiap sel hepar (hepatosit) melakukan beragam tugas metabolik dan sekretorik yang sama. Spesialisasi ditimbulkan oleh organel-organel yang sangat berkembang dalam setiap hepatosit. Satu-satunya fungsi hepar yang tidak dilakukan oleh hepatosit adalah aktivitas fagosit yang dilakukan oleh makrofag residen yang biasa disebut dengan sel kupffer (Hall dan Guyton, 2014; Sherwood, 2019).

2.5.2.2 Mekanisme Aliran Darah

Untuk melakukan berbagai fungsi hepar, susunan anatomi hepar memungkinkan setiap hepatosit berkontak langsung dengan darah dari 2 sumber, yaitu darah arteri yang datang dari jantung dan darah vena yang datang langsung dari saluran cerna. Seperti sel lain, hepatosit menerima darah arteri segar melalui arteri hepatis, yang mengalirkan oksigen dan metabolit-metabolit darah untuk diproses di hepar. Darah vena juga masuk ke hepar melalui sistem porta hepatis,

suatu koneksi vaskular unik dan kompleks antara saluran cerna dan hepar (Sherwood, 2019).

Aliran vena dari saluran cerna tidak langsung bermuara di vena kava inferior, namun masuk ke vena porta hepatica terlebih dahulu (Gambar 2.8). Tujuannya adalah untuk memroses, menyimpan atau detoksifikasi produk-produk dari saluran cerna oleh hepar sebelum masuk ke sirkulasi umum. Di dalam hepar, vena porta kembali bercabang-cabang menjadi anyaman kapiler (sinusoid hepar) untuk memungkinkan terjadinya pertukaran antara darah dan hepatosit sebelum darah mengalir ke dalam vena hepatica yang kemudian menyatu dengan vena kava inferior (Sherwood, 2019).



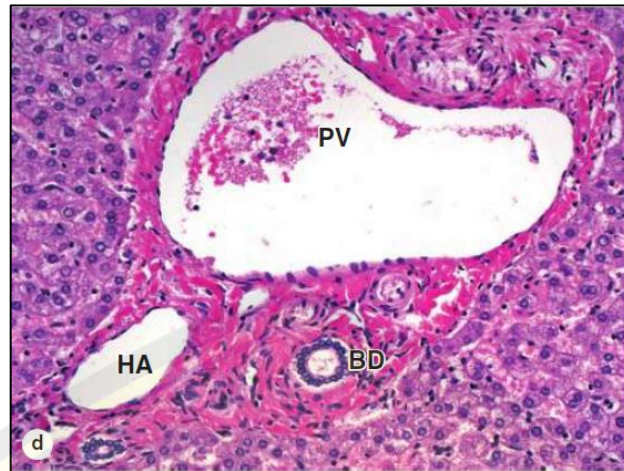
Gambar 2.8 Skematik aliran darah hepar (Sumber: Sherwood, 2019)

2.5.2.3 Metabolisme Xenobiotik Hepar

Xenobiotik adalah senyawa asing bagi tubuh yang meliputi obat, karsinogen kimia, senyawa alami dalam makanan nabati dan zat yang bersifat toksik. Metabolisme xenobiotik terdapat 2 fase utama, yaitu fase 1 dan fase 2. Fase 1, reaksi utamanya adalah hidroksilasi yang dikatalisis oleh anggota golongan enzim monooksigenase atau sitokrom P450. Selain hidroksilasi, enzim-enzim ini juga mengatalisis berbagai reaksi, termasuk reaksi yang melibatkan deaminasi, dehalogenasi, desulfurasi, epoksidasi, peroksigenasi dan reduksi. Metabolisme fase 1 membuat senyawa menjadi lebih reaktif dan bersifat polar. Sedangkan fase 2, reaksi utamanya adalah konjugasi senyawa hasil reaksi fase 1 dengan molekul seperti asam glukoronat, sulfat, atau glutation. Reaksi konjugasi ini menyebabkan xenobiotik menjadi lebih larut air dan akhirnya diekskresikan melalui urine atau empedu (Murray dkk., 2016)

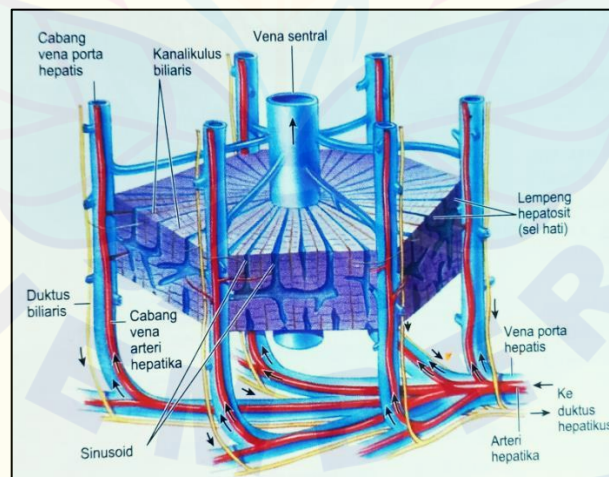
2.5.3 Histologi Hepar

Sel hepar atau disebut hepatosit merupakan sel epitel kuboid atau polihedral dengan ukuran yang besar, inti bulat dan sitoplasma eosinofilik yang kaya akan mitokondria (Gambar 2.9). Kebanyakan hepatosit memiliki 2 inti dan sekitar 50%nya berbentuk poliploid dengan 2-8 kali kromosom normal. Hepar tersusun atas unit-unit fungsional yang dikenal dengan lobulus hepar, yaitu susunan jaringan berbentuk heksagonal mengelilingi satu vena sentral dan dibatasi oleh vaskular serta saluran empedu (Mescher, 2013).



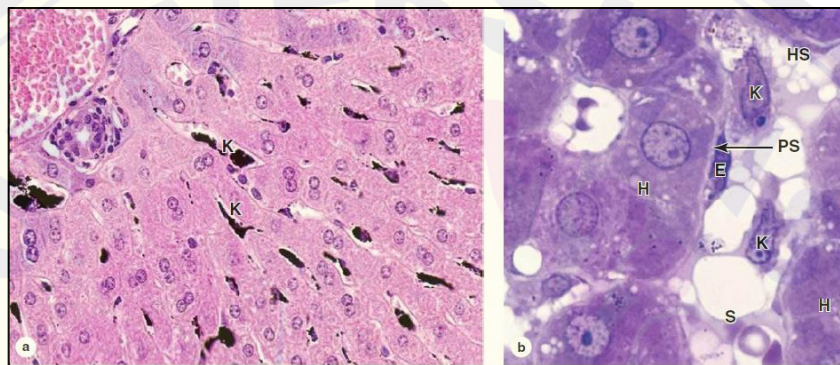
Gambar 2.9 Histologi hepar (Sumber: Mescher, 2013)

Di setiap sudut luar lobulus terdapat tiga pembuluh darah, yaitu cabang arteri hepatica, cabang vena porta hepatica dan duktus biliaris. Darah dari cabang arteri hepatica dan vena porta mengalir dari perifer lobulus ke ruang kapiler luas yang disebut dengan sinusoid. Sinusoid berjalan diantara jejeran hepatosit ke vena sentral seperti jari-jari roda sepeda. Anastomosis sinusoid memiliki lapisan fenestrasi yang tipis dan terputus-putus. Sel endotelnya jarang dikelilingi oleh lamina basal dan serat reticular (Gambar 2.10) (Sherwood, 2019).



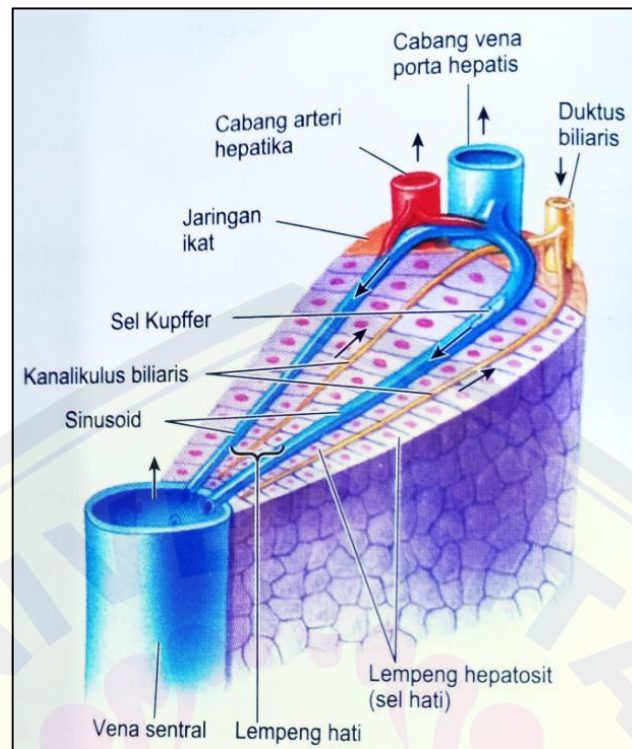
Gambar 2.10 Susunan dalam 1 lobulus hepar (Sumber: Sherwood, 2019)

Sel fungsional lain yang terdapat dalam parenkim hepar adalah makrofag stellate atau biasa disebut dengan sel kupffer yang melapisi bagian dalam sinusoid. Sel ini mengenali dan memfagositosis eritrosit tua, membebaskan heme dan besi untuk digunakan kembali atau disimpan di kompleks ferritin. Sel kupffer juga berfungsi untuk menghilangkan bakteri atau debris yang berada di darah porta. Di dalam ruang perisinusoidal juga terdapat sel fungsional lain, yaitu sel stellate hepatica atau biasa disebut sel ito (Gambar 2.11). Sel ito memiliki bentuk seperti tetesan lipid kecil yang berfungsi untuk menyimpan vitamin A dan vitamin larut lemak lainnya (Mescher, 2013).



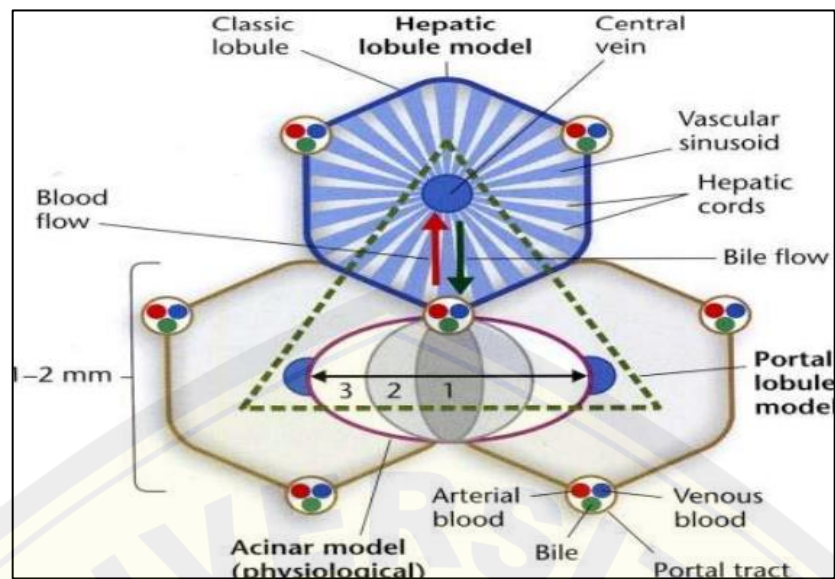
Gambar 2.11 Sel fungsional hepar (Sumber: Mescher, 2013)

Hepatosit tersusun di antara sinusoid dalam lempeng-lempeng yang tebalnya 2 sel, sehingga masing-masing tepi lateralnya menghadap ke kumpulan darah sinusoid (Gambar 2.12). Vena sentral di lobulus hepar kemudian menyatu untuk membentuk vena hepatica, kemudian membawa darah keluar dari hepar. Di setiap lempeng hepatosit terdapat saluran tipis pengangkut empedu yang disebut kanalikuli biliaris. Hepatosit terus mengeluarkan empedu ke dalam saluran ini, dan pada akhirnya berakumulasi di duktus lobulus yang letaknya di tepi lobulus. Duktus-duktus biliaris dari berbagai lobulus pada akhirnya akan menyatu dan membentuk duktus koledokus, yang mengangkut empedu dari hepar ke duodenum (Mescher, 2013; Sherwood, 2019).



Gambar 2.12 Irisan lobulus hepar diperbesar (Sumber: Sherwood, 2019)

Sel-sel pada hepar dibagi menjadi 3 zona berdasarkan sistem aliran darah lobulus, yaitu: zona 1 atau periportal yang menerima aliran darah dari arteri hepatica dan vena porta pertama; zona 3 atau sentrilobular terletak di sekitar vena sentralis; zona 2 atau midzonal terletak di antara zona 1 dan zona 3 (Gambar 2.13). Sel-sel pada zona 1 merupakan sel yang lokasinya paling dekat dengan pembuluh darah, sehingga sel-sel tersebut mengandung banyak nutrisi dan oksigen, serta sedikit metabolit. Sel-sel pada zona 2 menerima aliran darah yang lebih sedikit kandungan nutrisi dan oksigen dibanding zona 1. Sel-sel pada zona 3 adalah sel-sel yang paling dekat dengan vena sentralis, sehingga kandungan oksigen dan nutrisinya lebih sedikit, serta konsentrasi metabolitnya lebih tinggi. Hal ini menyebabkan area sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan (nekrosis) dibanding area perifer (Mescher, 2013).

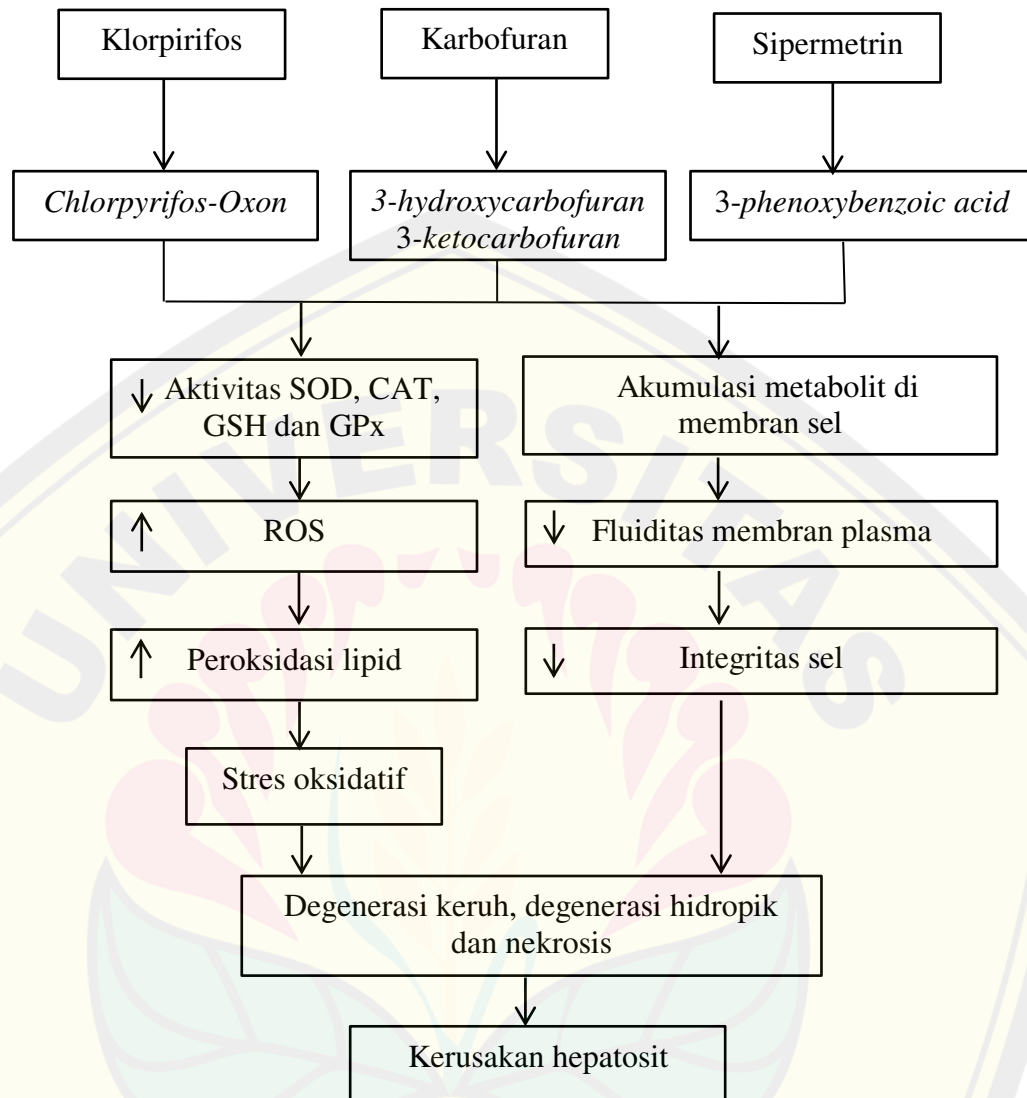


Gambar 2.13 Zona hepar (Sumber: Kerr, 2010)

2.5.4 Hepar pada Usia Remaja

Hepar merupakan organ yang memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi terutama pada kelompok usia muda. Namun, usia hanya berpengaruh terhadap laju regenerasi bukan kapasitas untuk mengembalikan volume organ aslinya. Selain itu, juga terjadi induksi faktor proliferasi hepatosit dan ekspresi gen dalam siklus sel yang tidak terhambat pada tikus usia remaja (Schmucker dan Sanchez, 2011; Nucci dkk., 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Biondo dkk., (2006), menyimpulkan usia kelompok muda membutuhkan waktu yang lebih cepat untuk regenerasi sel hepar dibanding dengan kelompok usia tua. Selain itu, terdapat penundaan replikasi sel di hepar pada kelompok usia tua yang ditunjukkan oleh hasil analisis nukleus positif *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) (Biondo-simões dkk., 2006).

2.6 Kerangka Teori



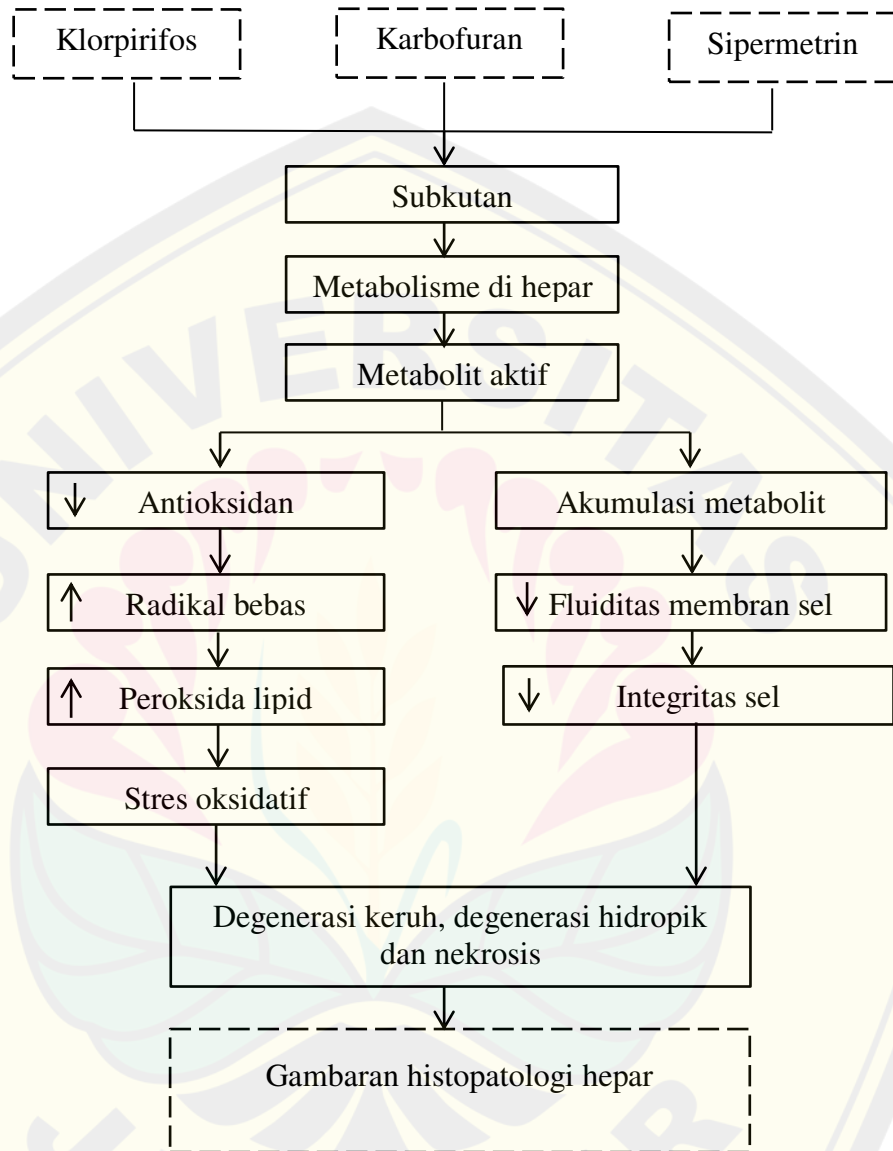
→ : Memicu

Gambar 2.14 Kerangka teori

Paparan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin pada akhirnya akan dimetabolisme oleh hepar. Hasil metabolisme klorpirifos berupa metabolit *Chlorpyrifos-Oxon*, karbofuran berupa metabolit *3-hydroxycarbofuran* dan *3-ketocarbofuran* serta sipermetrin berupa metabolit *3-phenoxybenzoic acid*. Seluruh hasil metabolit insektisida ini akan menurunkan enzim aktivitas antioksidan seperti SOD, CAT, GSH dan GPx sehingga radikal bebas tidak dapat dinetralkan. Radikal bebas yang tidak diimbangi dengan enzim antioksidan yang cukup akan memicu terjadinya peningkatan radikal bebas pada tubuh. Aktivitas radikal bebas inilah yang memicu terjadinya kerusakan hepatosit melalui stres oksidatif sel. Selain itu, metabolit insektisida ini juga dapat berakumulasi di hepatosit dan menyebabkan penurunan fluiditas sel. Hal ini memicu *efflux* enzim sitoplasma dan mengakibatkan penurunan integritas sel. Proses inilah yang juga dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepar.

2.7 Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian

2.7.1 Kerangka Konseptual



→ : Memicu
 [] : Variabel yang diteliti

Gambar 2.15 Kerangka konseptual penelitian

Kerangka konseptual penelitian menggambarkan hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat, serta bagaimana perbandingan dari masing-masing variabel yang diteliti. Pada penelitian ini, variabel bebas yang digunakan adalah paparan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin dengan dosis 10% LD50 di masing-masing jenis insektisida. Paparan diberikan melalui injeksi subkutan pada tikus remaja dengan dosis klorpirifos 20 mg/kgbb, karbofuran 0,2 mg/kgbb dan sipermetrin 20 mg/kgbb. Variabel terikat yang digunakan adalah gambaran histopatologi hepar tikus remaja yang diamati secara mikroskopis menggunakan kriteria skor *Manja Roenigk*.

2.7.2 Hipotesis Penelitian

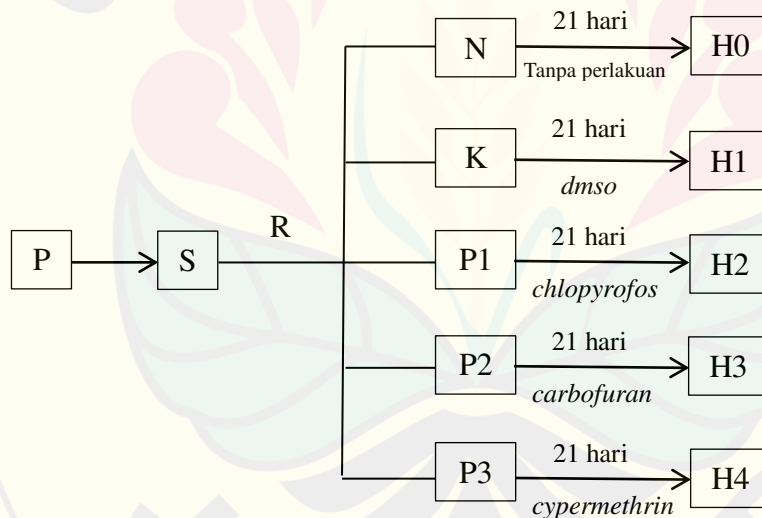
Hipotesis penelitian ini adalah terdapat perubahan gambaran histopatologi hepar tikus remaja akibat paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin terhadap kelompok normal dan kontrol.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental* dengan menggunakan hewan coba tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) remaja yang diberi paparan insektisida klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Tahapan penelitian terdiri dari aklimatisasi, pemberian paparan insektisida selama 21 hari, terminasi, nekropsi dan diakhiri dengan pembuatan serta pengamatan preparat histopatologi organ sampel. Desain penelitian menggunakan *post test – only control group Design*. Sedangkan rancangan percobaan menggunakan *Completely Randomized Design* (CRD).

Skema rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Keterangan:

- P : Populasi
 S : Sampel
 R : Randomisasi
 N : Kelompok normal yang tidak diberi perlakuan
 K : Kelompok kontrol yang diberi perlakuan berupa injeksi dms0 5% subkutan 0,2 cc selama 21 hari
 P1 : Kelompok perlakuan yang diberi klorpirifos 20 mg/kgBB/hari dengan pelarut DMSO 5% subkutan selama 21 hari
 P2 : Kelompok perlakuan yang diberi karbofuran 0,2 mg/kgBB/hari dengan pelarut DMSO 5% subkutan selama 21 hari
 P3 : Kelompok perlakuan yang diberi karbofuran 20 mg/kgBB/hari dengan pelarut DMSO 5% subkutan selama 21 hari
 H0-4 : Gambaran histopatologi kelompok K0, K1, P1, P2 dan P3

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Oktober 2021 hingga April 2022.

Tempat penelitian yaitu:

- a. Pemeliharaan dan pemberian paparan insektisida pada tikus dilakukan di rumah hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
- b. Terminasi dan nekropsi untuk pengambilan organ sampel dilakukan di laboratorium anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
- c. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- d. Pengamatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Populasi dan Besar Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) kelompok usia remaja. Tikus wistar ini diperoleh dari Kabupaten Malang, Jawa Timur.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) remaja yang telah dinyatakan memenuhi kriteria inklusi, eksklusi, dan *dropout* sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*);
- 2) Usia remaja 30-45 hari (Sengupta, 2013; Kirschmann dkk., 2018);
- 3) Berat tubuh 45 - 115 gram (Sengupta, 2013);
- 4) Bergerak dengan aktif dan nafsu makan baik;
- 5) Belum pernah digunakan sebagai sampel penelitian sebelumnya.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Memiliki kelainan kongenital berupa kecacatan pada ekstremitas;
- 2) Sakit atau mati selama aklimatisasi;

c. Kriteria *Dropout*

- 1) Tikus yang mati dalam rentang waktu antara pemberian paparan insektisida hingga sebelum proses terminasi;
- 2) Tikus yang sakit saat penelitian dengan ditandai oleh kondisi tikus yang lemah, rambut kusam, tidak mau makan dan diare.

3.3.3 Besar Sampel

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan. Besar sampel setiap kelompok akan dihitung menggunakan rumus *Federer* (Irmawartini dan Nurhaedah, 2017). Sehingga, akan didapatkan besar sampel minimal 5 ekor di setiap kelompoknya.

Rumus Federer:

$$\begin{aligned} (t-1)(n-1) &\geq 15 \\ (5-1)(n-1) &\geq 15 \\ 4n-4 &\geq 15 \\ n &\geq 19/4 \\ n &\geq 4,75 \Rightarrow 5 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Keterangan:

t : Jumlah kelompok perlakuan
n : Jumlah sampel setiap kelompok perlakuan

Gambar 3.2 Perhitungan besar sampel

Faktor koreksi akan digunakan atas pertimbangan *dropout* sebesar 10% (Madiyono, 2014). Sehingga akan didapatkan besar sampel cadangan setiap kelompok sebanyak 1 ekor. Total besar sampel keseluruhan pada penelitian ini adalah 30 ekor tikus.

Rumus Faktor Koreksi:

$$\begin{aligned} n' &= n/(1-f) \\ &= 5/0,9 \\ &= 5,5 \Rightarrow 6 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Keterangan:

n': Besar sampel setelah dikoreksi
n : Jumlah sampel setiap kelompok perlakuan
f : Prediksi persentase sampel dropout

Gambar 3.3 Perhitungan faktor koreksi

3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data kuantitatif yang bersumber dari data primer penelitian. Data ini diperoleh dari hasil penilaian gambaran histopatologi hepar yang diukur berdasarkan metode skoring *Manja Roenigk*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah paparan klorpirifos 20 mg/kgbb, karbofuran 0,2 mg/kgbb dan sipermetrin 20 mg/kgbb pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) remaja dengan menggunakan dosis 10% LD50 (Sachana dkk., 2001; Giri dkk., 2003; Rai dan Sharma, 2007; Abdou dan Sayed, 2019; Kayode dkk., 2019).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi hepar tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*) remaja berupa skoring.

3.5.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu usia hewan coba, jenis kelamin hewan coba, pemeliharaan hewan coba, lama perlakuan dan metode skoring gambaran histopatologi.

3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukuran

Definisi operasional dari variable penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1 sebagai berikut.

Variabel	Definisi Operasional	Skala Data
Dosis klorpirifos	Klorpirifos merupakan insektisida kelompok organofosfat yang diberikan kepada tikus wistar jantan (<i>Rattus novergicus</i>) remaja dengan dosis 10%LD50 yaitu 20 mg/kgbb. Injeksi klorpirifos dilakukan secara subkutan setelah dilarutkan dengan menggunakan DMSO 5%.	Rasio
Dosis karbofuran	Karbofuran merupakan insektisida kelompok karbamat yang diberikan kepada tikus wistar jantan (<i>Rattus novergicus</i>) remaja dengan dosis 10%LD50 yaitu 0,2 mg/kgbb. Injeksi karbofuran dilakukan secara subkutan setelah dilarutkan dengan menggunakan DMSO 5%.	Rasio
Dosis sipermetrin	Sipermetrin merupakan insektisida kelompok piretroid yang diberikan kepada tikus wistar jantan (<i>Rattus novergicus</i>) remaja dengan dosis 10%LD50 yaitu 20 mg/kgbb. Injeksi sipermetrin dilakukan secara subkutan setelah dilarutkan dengan menggunakan DMSO 5%.	Rasio

Skor histopatologi hepar	Histopatologi hepar adalah kelainan struktur histologi hepar akibat paparan zat toksik yang pengukurannya menggunakan skoring <i>Manja Roenigk</i> . Penilaian dilakukan pada 20 hepatosit tiap lapang pandang dari total 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Setiap sel yang dipilih dikalikan berdasarkan kategori skoring, yaitu: skor 1 untuk sel normal; skor 2 untuk sel yang mengalami degenerasi parenkim; skor 3 untuk sel yang mengalami degenerasi hidropis; skor 4 untuk sel yang mengalami nekrosis. Lalu dijumlahkan untuk mendapatkan 1 data hewan coba. Skor minimal yang akan didapatkan adalah 100 dan skor maksimal yang akan didapatkan adalah 400.	Rasio
--------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------

3.7 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian terdiri dari alat dan bahan yang dapat dilihat pada Tabel 3.2

Perlakuan	Alat	Bahan
Aklimatisasi dan perawatan hewan coba	Kandang, label kertas sedang, tempat makan, tempat minum	Air mineral, serutan kayu, pakan standar tikus
Pembuatan larutan	Gelas ukur, gelas beker, pengaduk, <i>sput</i> dan <i>needle</i> , <i>magnetic stirer</i> , magnet, <i>aluminium foil</i> , timbangan	Klorpirifos, karbofuran, sipermetrin, dmso, akuades
Pemberian perlakuan	<i>Sput</i> 1 cc dan <i>needle</i> 25G, tabung reaksi, label, <i>handscoon</i>	Larutan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin
Terminasi dan nekropsis	Toples, kapas, <i>handscoon</i> , minorset, papan bedah, jarum fiksasi, tabung sampel	Eter, <i>Buffered Neutral Formalin</i> (BNF) 10%

Pembuatan preparat histopatologi	Mikrotom, kertas saring, pelat pemanas <i>slide</i> , <i>embedding cassette</i> , <i>tissue processor</i> , <i>object glass</i> , <i>cover glass</i>	larutan <i>xylol</i> , alkohol, akuades, parafin, pewarna Hematoksin-Eosin (HE),
Pengamatan preparat histopatologi	Mikroskop dan kamera	

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) remaja yang telah mendapatkan surat keterangan kelayakan etik. Penelitian ini sudah mendapat persetujuan etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomor 1584/H25.1.11/KE/2022. Prosedur ini bertujuan untuk menjamin keamanan peneliti, hewan coba dan memperjelas tujuan penelitian.

3.8.2 Aklimatisasi dan Perawatan Hewan Coba

Tikus dirawat dan dipelihara di dalam kandang beralaskan serutan kayu serta diberi makan pelet standar (*ratbio*) dengan metode *adlibitum*. Tikus diberi minum dengan air mineral untuk mencegah adanya faktor lain yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Tikus merupakan makhluk sosial, maka setiap 2 tikus diletakkan dalam 1 kandang. Selain itu, setiap 3 hari sekali serutan kayu pada kandang tikus diganti.

Sebelum memulai perlakuan, dilakukan aklimatisasi tikus terlebih dahulu selama 7 hari. Pemeliharaan ini dilakukan di rumah hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Tikus juga ditimbang berat badannya setiap 7 hari untuk menentukan dan memastikan jumlah dosis paparan insektisida.

3.8.3 Pemberian Paparan Insektisida

Pemberian paparan insektisida dilakukan melalui injeksi subkutan (Deborah dan Rowland, 2000; Voorhees dkk., 2019). Besar dosisnya adalah 10% LD50 yaitu Klorpirifos 20 mg/kgbb, Karbofuran 0,2 mg/kgbb dan Sipermetrin 20

mg/kgbb (Sachana dkk., 2001; Giri dkk., 2003; Rai dan Sharma, 2007; Abdou dan Sayed, 2019; Kayode dkk., 2019). Masing-masing insektisida dilarutkan dengan menggunakan DMSO 5% (Deborah dan Rowland, 2000; Uzun dan Kalender, 2013). Pemberian insektisida dilakukan sekali sehari selama 21 hari karena penelitian ini ingin menggunakan uji paparan subkronis (Tanvir dkk., 2016; Abdou dan Sayed, 2019; Voorhees dkk., 2019; Al-omar dkk., 2020).

3.8.4 Terminasi dan Nekropsi

Setelah tikus diberi perlakuan selama 21 hari, peneliti melakukan terminasi dengan metode dislokasi cervical pada hari ke-22. Proses terminasi dilakukan setelah tikus dianestesi menggunakan eter secara inhalasi (Abdou dan Sayed, 2019). Setelah terminasi selesai, dilanjutkan dengan fiksasi tikus ke papan bedah dengan menggunakan jarum pentul. Fiksasi dilakukan di setiap ekstremitas dengan posisi tubuh supinasi. Lalu dilanjutkan dengan nekropsi untuk mengambil organ hepar.

Organ hepar yang telah diambil lalu dicuci dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan dalam tabung sampel yang sudah berisi cairan fiksasi *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10%. Setelah itu, dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi diawali dengan melakukan fiksasi sampel jaringan menggunakan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan volume formalin minimal 10 kali volume jaringan. Waktu yang dibutuhkan untuk fiksasi sempurna kurang lebih 48 jam. Setelah proses fiksasi selesai, lalu dilanjutkan dengan pemotongan spesimen setebal 0,1 – 1 cm dari sampel lobus median hepar. Kemudian *embedding cassette* diisi dengan spesimen jaringan lalu dimasukkan ke dalam *tissue processor*. Setelah proses ini selesai, spesimen diletakkan di atas cetakan dan diisi parafin.

Prosedur pembuatan preparat ini dilanjutkan dengan proses pemotogan blok jaringan. Hasil potongan tersebut dipilih dengan kriteria tertentu, yaitu tidak

ada goresan dan kerutan. Setelah itu, blok jaringan terpilih diletakkan di *glass slide* lalu dipanaskan selama 2 jam dengan menggunakan alat pemanas *slide*. Kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan *Mayers Hematoxylin Eosin* pada preparat yang telah jadi. Langkah terakhir dari prosedur ini adalah pembersihan *glass slide* dengan menggunakan *xylol* lalu pemberian nomor menggunakan label pada seluruh preparat.

3.8.6 Pengamatan Preparat Histopatologi

Preparat histopatologi yang telah jadi diamati menggunakan mikroskop cahaya. Perbesaran yang digunakan adalah perbesaran 400x dengan 5 lapang pandang di setiap preparat. Pengamatan dilakukan dengan metode *blinding* oleh 1 dokter spesialis patologi anatomi. Setiap lapang pandang dipilih 20 hepatosit dengan kriteria berada di zona 3 hepar atau parenkim sentrilobular.

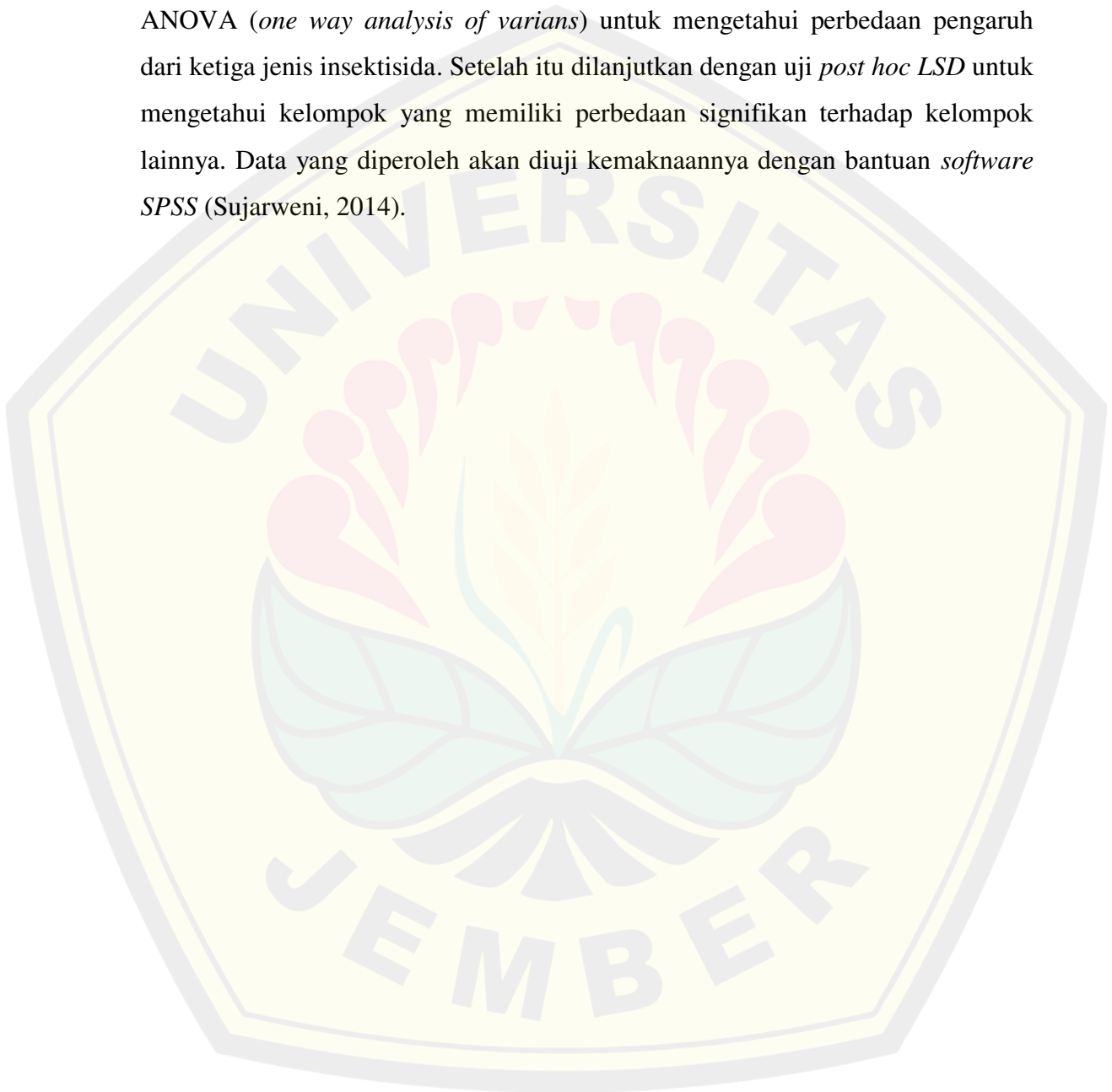
Setelah itu, masing-masing hepatosit tersebut dikalikan berdasarkan kategori skoring kemudian dijumlahkan untuk mendapatkan 1 data hewan coba. Metode skoring yang digunakan adalah skor *Manja Roenigk*. Berdasarkan skoring tersebut, maka diperoleh skor minimal 100 apabila seluruh sel normal dan skor maksimal 400 apabila seluruh sel mengalami nekrosis. Kriteria penilaian derajat histopatologi hepar metode skor *Manja Roenigk* dapat dilihat pada Tabel 3.3 berikut.

Skor	Jenis kerusakan	Deskripsi
1	Normal	Hepatosit berbentuk poligonal, dinding hepatosit berbatas tegas dan sitoplasma berwarna merah homogen
2	Degenerasi parenkim	Pembesaran hepatosit melebihi ukuran normal dengan disertai sitoplasma bergranula dan keruh
3	Degenerasi hidropis	Tampak hepatosit membesar dari normal, warna sitoplasma pucat, memiliki banyak vakuola dan terdapat akumulasi cairan
4	Nekrosis	Inti hepatosit tampak pecah membentuk fragmen kromatin yang menyebar (karioreksis), kromatin dan inti sel larut sehingga tidak nampak (kariolisis), dan inti padat tampak gelap dan mengecil

Sumber: (Kumar dkk., 2013; Yuningtyaswari dan Mega, 2020)

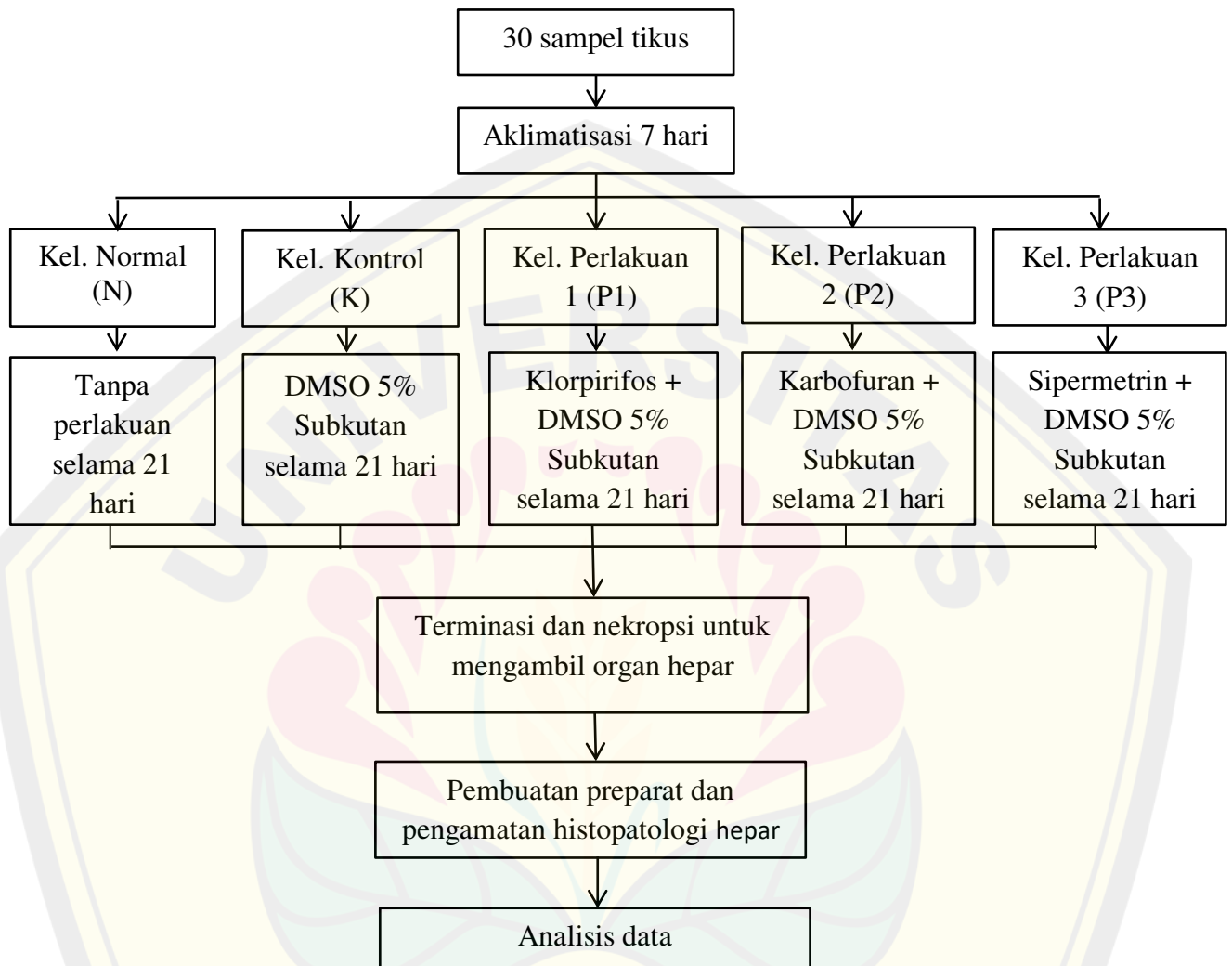
3.9 Analisis Data

Analisis data statistik yang digunakan adalah uji parametrik. Sampel pada penelitian ini berjumlah 30 sampel, sehingga uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitasnya menggunakan uji *Levene*. Didapatkan data terdistribusi normal dan homogen, lalu dilanjutkan dengan uji ANOVA (*one way analysis of varians*) untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari ketiga jenis insektisida. Setelah itu dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok lainnya. Data yang diperoleh akan diuji kemaknaannya dengan bantuan *software SPSS* (Sujarweni, 2014).



3.10 Alur Penelitian

Alur penelitian digambarkan seperti bagan berikut.



Gambar 3.4 Alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan untuk mengetahui perubahan gambaran histopatologi hepar pada tikus wistar jantan usia remaja yang diberi paparan insektisida klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang terbagi dalam 5 kelompok, yaitu kelompok normal (N), kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3). Kelompok N adalah kelompok normal yang tidak diberi perlakuan apapun selama 21 hari. Kelompok K adalah kelompok kontrol yang diberi pelarut DMSO 5% 0,2 cc secara subkutan selama 21 hari. Kelompok P1 adalah kelompok yang diberi paparan klorpirifos 20 mg/kgbb dengan pelarut DMSO 5% secara subkutan selama 21 hari. Kelompok P2 adalah kelompok yang diberi paparan karbofuran 0,2 mg/kgbb dengan pelarut DMSO 5% secara subkutan selama 21 hari. Kelompok P3 adalah kelompok yang diberi paparan sipermetrin 20 mg/kgbb dengan pelarut DMSO 5% secara subkutan selama 21 hari.

Terminasi dilakukan pada hari ke-22 menggunakan metode dislokasi servikal dan anestesi eter secara inhalasi. Kemudian dilakukan nekropsi dan pengambilan organ hepar tikus pada hari yang sama. Bagian organ hepar yang dipakai untuk pembuatan preparat histopatologi adalah lobus median dengan pewarnaan Hemotoksilin-Eosin (HE). Data pengamatan yang didapat adalah hasil penilaian mikroskopis berupa skoring dengan metode *Mandja Roenigk*. Skor histopatologi hepar dapat dilihat pada Lampiran 4.2. Hasil rata-rata skor histopatologi hepar tiap kelompok dapat dilihat pada Tabel 4.1.

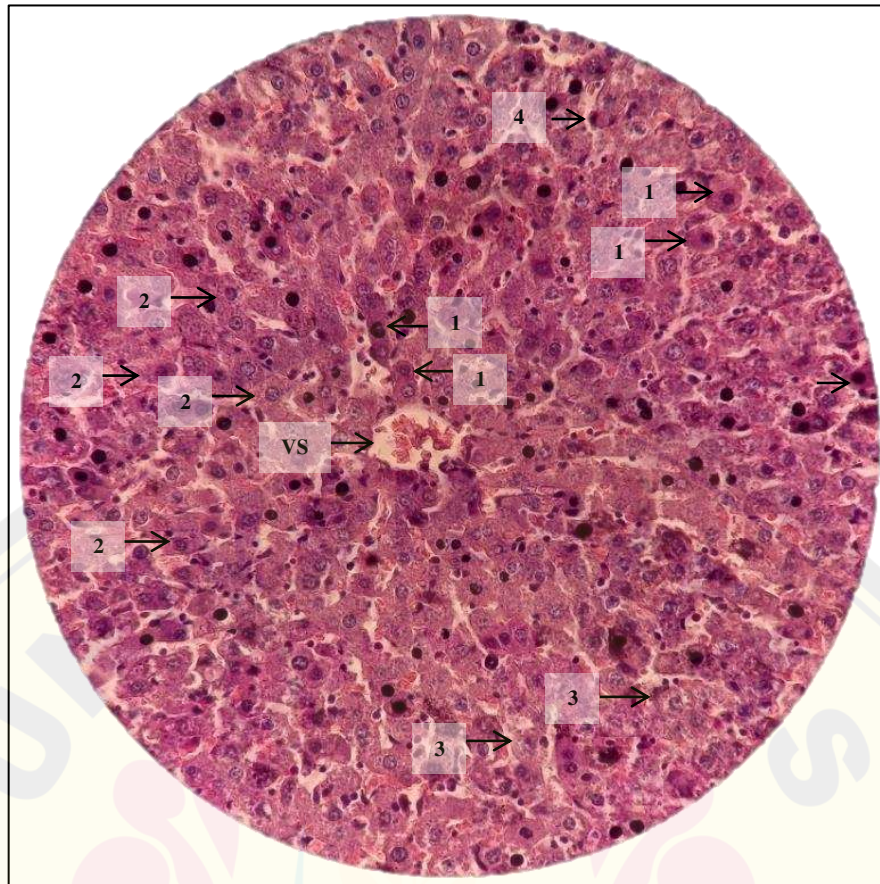
Tabel 4.1 Hasil rata-rata skor histopatologi hepar *Mandja Roenigk*

Kelompok	Rata-rata skor histopatologi hepar (Rata-rata \pm standar deviasi)
N (Normal)	195,00 \pm 2,000 (n=5)
K (Kontrol)	195,40 \pm 1,140 (n=5)
P1 (Klorpirifos)	202,00 \pm 3,162 (n=5)*, **
P2 (Karbofuran)	216,60 \pm 4,159 (n=5)*, **
P3 (Sipermetrin)	210,40 \pm 3,847 (n=5)*, **

*Berbeda signifikan dengan kelompok kontrol DMSO 5% (P<0,05)

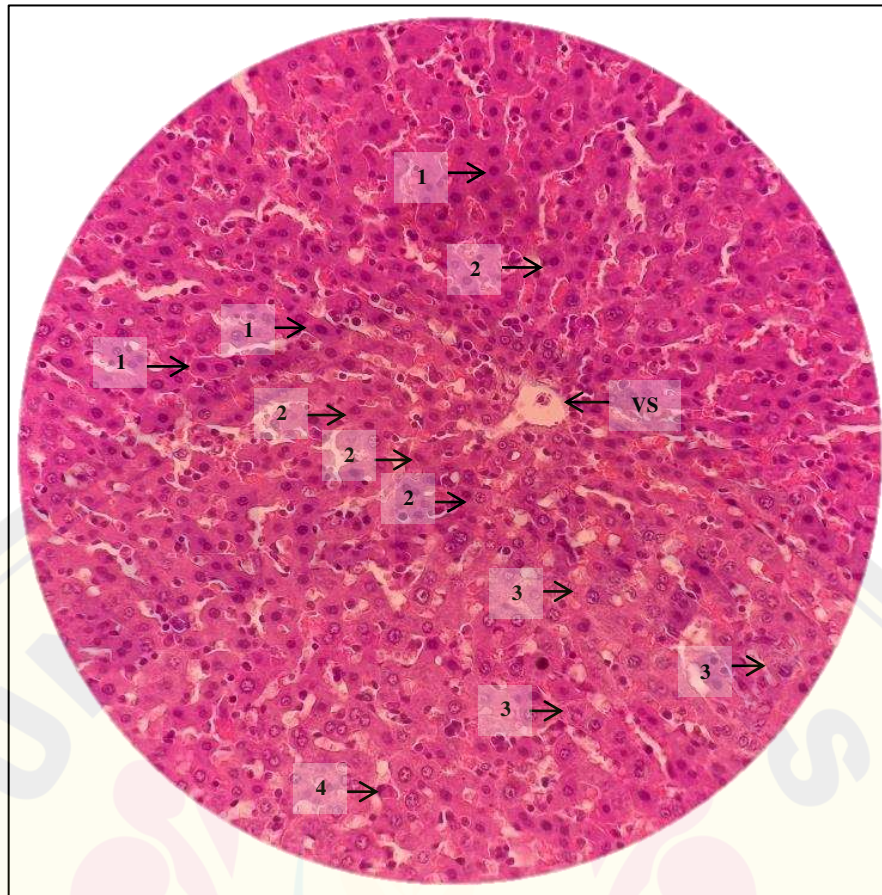
**Berbeda signifikan antar kelompok perlakuan insektisida (P<0,05)

Berdasarkan data rata-rata skor histopatologi hepar pada tiap kelompok, didapatkan bahwa rata-rata skor terendah adalah kelompok N dengan nilai 195,00 yang berarti derajat kerusakan hepatositnya paling ringan. Kemudian diikuti oleh kelompok K dengan nilai rata-rata 195,40 yang mana selisih nilai kelompok N dan K tidak jauh berbeda. Lalu, kelompok P1 dengan nilai rata-rata 202,00 dan kelompok P3 dengan nilai rata-rata 210,40. Rata-rata skor histopatologi hepar tikus tertinggi adalah kelompok P2 dengan nilai 216,60 yang berarti derajat kerusakan hepatositnya paling berat. Hasil pengamatan histopatologi dapat dilihat pada Gambar 4.1, Gambar 4.2, Gambar 4.3, Gambar 4.4 dan Gambar 4.5. Terdapat perbedaan gambaran histopatologi hepar pada kelompok yang diberi paparan insektisida dibandingkan dengan kelompok normal dan kontrol. Gambaran hepatosit yang mengalami degenerasi parenkim dan degenerasi hidropik lebih banyak ditemukan pada kelompok perlakuan daripada kelompok normal dan kontrol. Selain itu, juga ditemukan gambaran nekrosis hepatosit yang sangat sedikit pada kelompok normal dan kontrol.



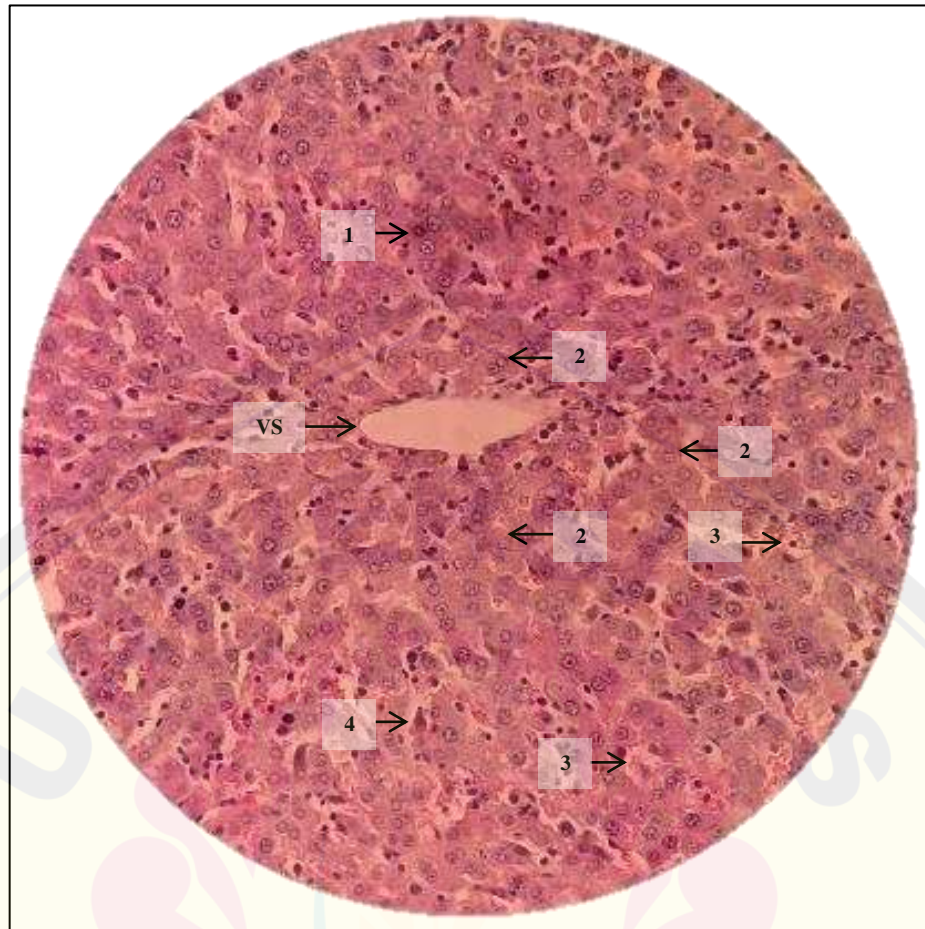
Keterangan: (VS: vena sentralis; 1: hepatosit normal; 2: hepatosit degenerasi parenkim; 3: hepatosit degenerasi hidropik; 4: hepatosit nekrosis).

Gambar 4.1 Gambaran histopatologi hepar kelompok normal (N) dengan perbesaran 400X menggunakan mikroskop.



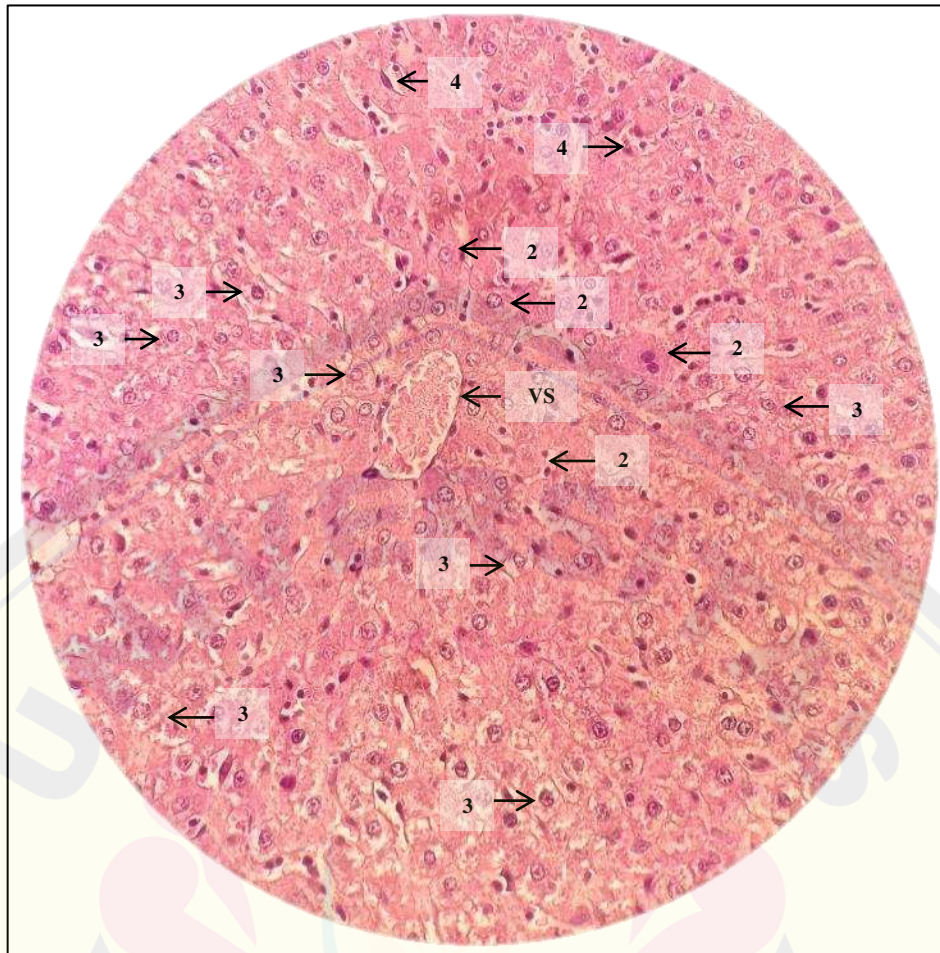
Keterangan: (VS: vena sentralis; 1: hepatosit normal; 2: hepatosit degenerasi parenkim; 3: hepatosit degenerasi hidropik; 4: hepatosit nekrosis).

Gambar 4.2 Gambaran histopatologi hepar kelompok kontrol (K) dengan perbesaran 400X menggunakan mikroskop.



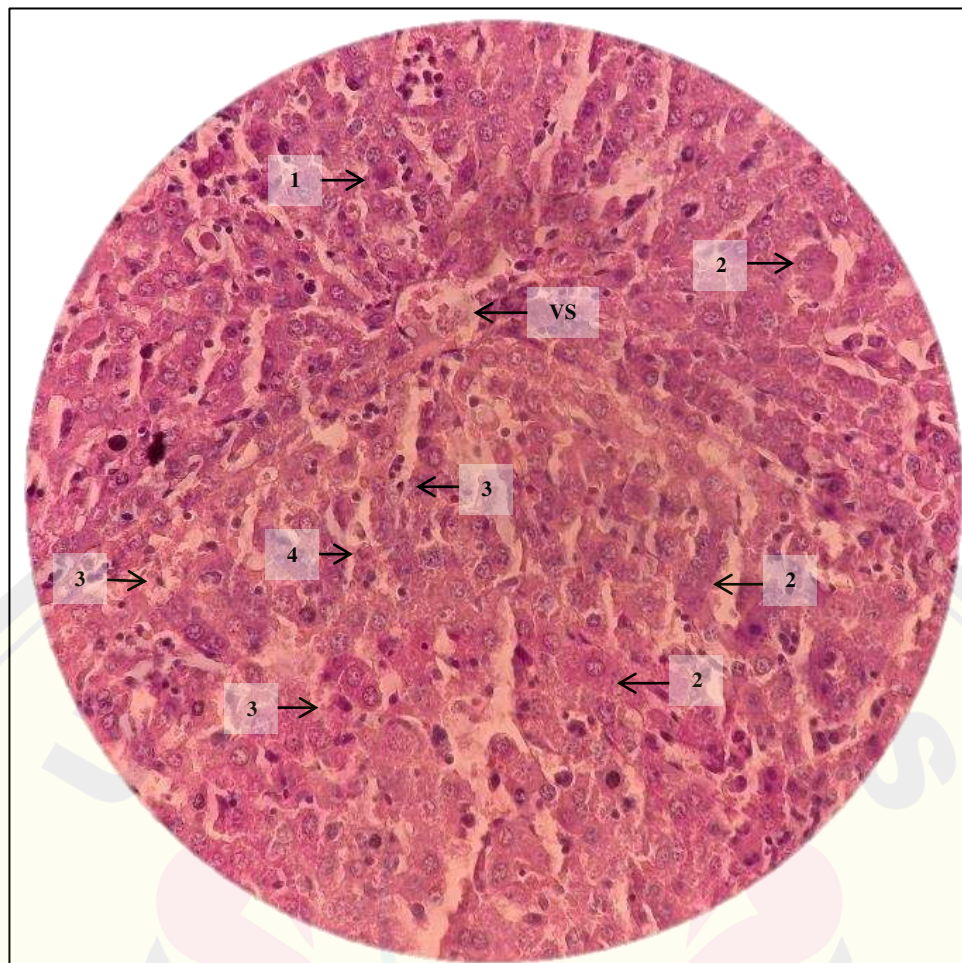
Keterangan: (VS: vena sentralis; 1: hepatosit normal; 2: hepatosit degenerasi parenkim; 3: hepatosit degenerasi hidropik; 4: hepatosit nekrosis).

Gambar 4.3 Gambaran histopatologi hepar kelompok klorpirifos (P1) dengan perbesaran 400X menggunakan mikroskop.



Keterangan: (VS: vena sentralis; 2: hepatosit degenerasi parenkim; 3: hepatosit degenerasi hidropik; 4: hepatosit nekrosis).

Gambar 4.4 Gambaran histopatologi hepar kelompok karbofuran (P2) dengan perbesaran 400X menggunakan mikroskop.



Keterangan: (VS: vena sentralis; 1: hepatosit normal; 2: hepatosit degenerasi parenkim; 3: hepatosit degenerasi hidropik; 4: hepatosit nekrosis).

Gambar 4.5 Gambaran histopatologi hepar kelompok P3 dengan perbesaran 400X menggunakan mikroskop.

4.2 Analisis Data

Setelah diperoleh skor seluruh sampel dengan menggunakan metode *Mandja Roenigk*, maka dilanjutkan dengan analisis uji komparatif. Sampel pada penelitian ini < 30 sehingga dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Hasil uji *Saphiro Wilk* dapat dilihat pada Tabel 4.2. Sedangkan hasil uji *Levene* dapat dilihat pada Tabel 4.3. Hasil uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan nilai signifikansi $> 0,05$ yang berarti data skor *Mandja Roenigk* dalam penelitian ini berdistribusi normal dan data homogen. Oleh karena itu, dapat dilanjutkan dengan uji komparatif parametrik *One Way Anova* (Tabel 4.4).

Tabel 4.2 Hasil uji normalitas skor histopatologi hepar setiap kelompok

Kelompok	<i>Saphiro Wilk</i>		
	<i>Statistics</i>	df	Sig.
N (Normal)	0,905	5	0,440
K (Kontrol)	0,961	5	0,814
P1 (Klorpirifos)	0,987	5	0,967
P2 (Karbofuran)	0,933	5	0,617
P3 (Sipermetrin)	0,829	5	0,137

Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas skor histopatologi hepar

<i>Levene statistic</i>	df1	df2	Sig.
2.484	4	20	0,077

Berdasarkan uji *One Way Anova* didapatkan hasil signifikansi sebesar 0,000. Hasil signifikansi $< 0,05$ menandakan adanya perbedaan signifikan antar kelompok dalam penelitian ini. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* (Tabel 4.5).

Tabel 4.4 Hasil uji *One Way ANOVA* skor histopatologi hepar

	<i>Sum of squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between groups</i>	1793.040	4	448.260	47.285	0,000
<i>Within groups</i>	189.600	20	9.480		
Total	1982.640	24			

Tabel 4.5 Hasil uji *Post Hoc LSD* skor histopatologi hati

	N	K	P1	P2	P3
N (Normal)		0,839	0,002*	0,000*	0,000*
K (Kontrol)	0,839		0,003*	0,000*	0,000*
P1 (Klorpirifos)	0,002*	0,003*		0,000*	0,000*
P2 (Karbofuran)	0,000*	0,000*	0,000*		0,005*
P3 (Sipermetrin)	0,000*	0,000*	0,000*	0,005*	

Keterangan: (*) terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Data hasil uji *post hoc LSD* didapatkan nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan terdapat perbedaan signifikan terhadap rata-rata skoring histopatologi hepar tikus antar kelompok. Kelompok normal tidak menunjukkan perbedaan signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil seluruh kelompok perlakuan, yaitu kelompok klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin menunjukkan perbedaan signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok normal dan kontrol. Selain itu, antar kelompok perlakuan insektisida memiliki perbedaan yang signifikan jika saling dibandingkan.

4.3 Pembahasan

Hepar adalah organ yang memiliki beragam fungsi penting dan kompleks dalam tubuh manusia. Hepar bertanggung jawab sebagai pusat metabolisme nutrisi dan xenobiotik dalam tubuh. Klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin termasuk dalam kelompok senyawa asing yang bersifat toksik. Oleh karena itu, jika senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh maka harus segera didetoksifikasi dan diekskresikan (Tanvir dkk., 2016; Murray dkk., 2016). Hepar merupakan tempat utama terjadinya mekanisme detoksifikasi atau biotransformasi xenobiotik, dan mungkin menjadi target akhir dari insektisida. Detoksifikasi klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin terjadi di hepar yang diperankan oleh beberapa mekanisme oksidasi campuran sitokrom P450 spesifik melalui beberapa jalur reaksi (Tanvir dkk., 2016).

Penelitian ini menggunakan lobus median dengan arah potongan transversal untuk pembuatan preparat histopatologi. Lobus median merupakan lobus terbesar di hepar tikus dengan banyak cabang vaskular dari vena porta dan vena hepatica. Lobus median merupakan lobus hepar yang mendapatkan suplai dari 2 cabang utama *portal vein stem*, yaitu vena porta dekstra median dan vena porta sinistra. Selain itu, lobus median juga didrainase oleh 3 cabang vena hepatica, yaitu vena hepatica dekstra median, vena hepatica medialis median dan vena hepatica sinistra median. Hal ini memungkinkan kerusakan pada lobus median lebih berat daripada kerusakan pada lobus lainnya (Sänger dkk., 2015; Vdoviaková dkk., 2016; Stan, 2018). Kemudian, pengamatan preparat histopatologi dilakukan di zona sentrilobular atau zona 3 hepar. Sel-sel pada zona 3 adalah sel-sel yang paling dekat dengan vena sentralis, sehingga kandungan oksigen dan nutriennya lebih sedikit, serta konsentrasi metabolitnya lebih tinggi. Hal ini menyebabkan area sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan (nekrosis) dibanding area perifer (zona 1 dan zona 2). Selain itu, sel-sel pada zona 3 lebih banyak mengandung enzim sitokrom P450 daripada di zona lainnya, sehingga proses metabolisme fase 1 banyak dilakukan di area tersebut yang juga memungkinkan terjadinya kerusakan sel lebih banyak (Mescher, 2013; Maulina, 2018).

Pengamatan gambaran histopatologi hepar dengan menggunakan metode *Mandja Roenigk* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada kelompok tanpa perlakuan dan kontrol DMSO 5%. Hal ini menunjukkan DMSO 5% yang digunakan sebagai pelarut insektisida tidak bersifat toksik pada hepar. Masih ditemukan gambaran degenerasi parenkim hepatosit pada kelompok tanpa perlakuan dan kontrol DMSO 5%, namun sangat jarang ditemukan gambaran degenerasi hidropik dan nekrosis. Sebaliknya, banyak ditemukan gambaran degenerasi parenkim, degenerasi hidropik dan nekrosis hepatosit pada kelompok perlakuan yang diberi paparan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan gambaran histopatologi hepar pada kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol DMSO 5%. Hasil rata-rata skor histopatologi hepar menggunakan skoring *Mandja Roenigk* menunjukkan kelompok perlakuan yang diberi paparan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin (P1, P2 dan P3) mendapatkan skor yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol DMSO 5%. Hasil ini menandakan kerusakan yang dialami oleh hepatosit kelompok perlakuan lebih berat dibandingkan kelompok kontrol DMSO 5%.

Hasil uji statistik pada kelompok klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin didapatkan perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol DMSO 5%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Uzun dan Kalender (2013) dan Tanvir dkk. (2016) pada tikus kelompok klorpirifos, El-Damaty dkk. (2012) pada tikus kelompok karbofuran, dan Mahna dkk. (2019) pada tikus kelompok sipermetrin. Pada penelitian Uzun dan Kalender (2013) didapatkan kerusakan histopatologi hepar dengan gambaran dilatasi sinusoid, difusi proliferasi sel kupffer, infiltrasi sel mononuklear, piknosis dan sitoplasma eosinofilik pada hepatosit. Pada penelitian Tanvir dkk. (2016) didapatkan kerusakan histopatologi hepar dengan gambaran infiltrasi dan degenerasi hepatosit pada area vena sentral dan kongesti dengan infiltrat pada vena sentral. Penelitian El-Damaty dkk. (2012) menunjukkan kerusakan histopatologi hepar dengan gambaran kongesti sinusoid hepatic, hepatosit bervakuola besar, mikrovesikel dan piknotik nucleus, serta distubansi lobulus. Pada penelitian Mahna dkk. (2019) didapatkan kerusakan

histopatologi hepar dengan gambaran hepatosit nekrosis dan degenerasi vacuolar (El-Damaty dkk., 2012; Uzun dan Kalender, 2013; Tanvir dkk., 2016; Mahna dkk., 2019).

Proses regenerasi hepatosit berurutan mulai dari sel normal, degenerasi parenkim, degenerasi hidropik hingga nekrosis, baik akibat mekanisme apoptosis ataupun stres oksidatif. Degenerasi parenkim merupakan kerusakan hepatosit paling ringan dan memiliki sifat reversibel yang menyebabkan sel dapat kembali menjadi normal jika tubuh mampu mengompensasinya. Hal ini dipengaruhi oleh dosis dan durasi paparan. Jika hepatosit tidak mampu menjadi normal kembali, maka sel akan semakin rusak menjadi degenerasi hidropik dan nekrosis yang bersifat ireversibel. Hepatosit yang mengalami degenerasi parenkim dan degenerasi hidropik masih bisa berfungsi meskipun tidak maksimal. Hepatosit tidak bisa berfungsi dan dikatakan sel mati bila mencapai kerusakan nekrosis (Kumar dkk., 2013; Yuningtyaswari dan Mega, 2020).

Paparan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin menyebabkan terjadinya perubahan pada membran hepatosit melalui jalur akumulasi metabolit aktif dan stres oksidatif. Terjadinya perubahan membran sel hepatosit mencerminkan gangguan pengaturan ion dan volume akibat hilangnya ATP. Proses ini mengganggu transport ion aktif dan pasif. Gangguan membran sel yang terjadi terus menerus dapat menyebabkan robekan kecil pada membran tersebut yang pada akhirnya juga berefek pada organel-organel di dalamnya. Ion Na^+ masuk berlebih ke dalam sel diikuti oleh H_2O . Akumulasi H_2O menyebabkan pembengkakan dan disfungsi mitokondria. Disfungsi mitokondria inilah yang berperan penting menyebabkan timbulnya gambaran degenerasi parenkim, hidropik dan pada akhirnya nekrosis (Kumar dkk., 2013; Mescher, 2013; Murray dkk., 2016; Sherwood, 2019)

Penelitian ini juga menunjukkan perbedaan gambaran histopatologi hepar pada kelompok perlakuan klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Gambaran hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik dan nekrosis pada kelompok karbofuran lebih banyak dibandingkan kelompok klorpirifos dan sipermetrin. Sedangkan kelompok klorpirifos memiliki gambaran degenerasi hidropik dan

nekrosis hepatosit yang lebih sedikit dibandingkan kelompok karbofuran dan sipermetrin. Sehingga, berdasarkan urutan tingkat kerusakan yang ditimbulkan mulai dari yang paling berat hingga ringan adalah karbofuran, sipermetrin lalu klorpirifos.

Paparan karbofuran menyebabkan gambaran kerusakan histopatologi hepar melalui jalur utama stres oksidatif. Karbofuran secara spesifik merusak fluiditas membran sel dan disfungsi organel penting dalam sel yaitu, mitokondria, ribosom, retikulum endoplasma halus dan lisosom. Hal ini menyebabkan gangguan metabolisme protein, lipid dan karbohidrat yang dapat menimbulkan gambaran degenerasi berat (Purushothaman dan Kuttan, 2017). Paparan sipermetrin juga menyebabkan kerusakan histopatologi hepar melalui jalur utama stres oksidatif. Sipermetrin secara spesifik merusak fluiditas membran dan disfungsi mitokondria sel sehingga menimbulkan kegagalan metabolisme trigliserida. Akumulasi trigliserida inilah yang menyebabkan gambaran degenerasi hepatosit. Selain itu, sipermetrin juga dapat meningkatkan sitokin proinflamatori dan menurunkan sitokin antiinflamatori, yang mana kondisi ini dapat meningkatkan terjadinya lesi hepatosit (Hussien dkk., 2013; Abdou dan Sayed, 2019; Kayode dkk., 2019; Al-omar dkk., 2020). Paparan klorpirifos juga menyebabkan kerusakan histopatologi hepar melalui jalur utama stres oksidatif. Klorpirifos menyebabkan influks dan akumulasi ion kalsium (Ca^{2+}) melalui inhibisi enzim asetilkolinesterase, serta mengganggu mekanisme transport ion kalsium yang menyebabkan ion tersebut tertahan di dalam sel secara persisten. Mekanisme ini merangsang produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) ((Eleršek dan Filipi, 2006; Uzun dan Kalender, 2013; Pearson dan Patel, 2016; Tanvir dkk., 2016).

Penelitian El-Damaty dkk. (2012) menunjukkan terjadinya kerusakan hepatosit yang cukup berat pada tikus usia dewasa yang diberikan paparan subkronis karbofuran dosis 1/10 LD50 0,8 mg/kgbb. Gambaran histopatologinya berupa vakuola besar di hepatosit dan kongesti sinusoid hepatic. Juga, didapatkan disturbansi lobulus hepar, mikrovesikel dan piknotik nukleus. Dengan kata lain, pada hepatositnya banyak menunjukkan gambaran degenerasi parenkim,

degenerasi hidropik dan nekrosis. Sedangkan pada dosis 1/20 LD50 0,4 mg/kgbb, menunjukkan gambaran hepatosit normal dan kongesti sinusoid hepatic.

Penelitian ini memberikan paparan dosis karbofuran lebih rendah dibandingkan dosis yang diberikan pada penelitian El-Damaty dkk. (2012). Dosis karbofuran pada penelitian ini yaitu 0,2 mg/kgbb, namun mendapatkan gambaran kerusakan histopatologi hepar berat dengan nilai skor paling tinggi. Akan tetapi, usia tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah usia remaja, berbeda dengan usia tikus yang digunakan pada penelitian El-Damaty dkk., yaitu tikus usia dewasa.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perubahan gambaran histopatologi hepar tikus remaja yang diberi paparan subkronis klorpirifos, karbofuran dan sipermetrin. Karbofuran menyebabkan kerusakan histopatologi hepar paling berat dibandingkan jenis insektisida lainnya.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti adalah dilakukannya penelitian lanjutan terkait dosis insektisida yang masih bisa ditoleransi oleh hepar, terutama pada insektisida karbofuran. Pada dosis rendah, karbofuran sudah dapat menyebabkan kerusakan histopatologi hepar yang paling berat, sehingga perlu diperhatikan lagi terkait penggunaan insektisida karbofuran bagi para pelaku agroindustri. Selain itu, dapat dilakukan penelitian lanjutan lain terkait pencegahan terjadinya kerusakan hepar akibat paparan insektisida.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou, R. H. dan N. Sayed. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of nano-selenium against cypermethrin-induced liver toxicity. 53–65.
- Akashe, M. M. 2018. CLASSIFICATION of pesticides : a review. (May 2020)
- Al-omar, M. S., M. Naz, S. A. A. Mohammed, dan M. Mansha. 2020. Pyrethroid-induced organ toxicity and anti-oxidant-supplemented amelioration of toxicity and organ damage : the protective roles of ascorbic acid and α - tocopherol
- Aouey, B., M. Derbali, Y. Chtourou, dan M. Bouchard. 2017. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*
- Asrianti, A., D. Legowo, L. Maslachah, dan E. P. Y. Muhammad. 2020. The effect of carbofuran exposure on mice during lactation period against on histopathology description of the heart of mice (mus musculus) offspring. 12(4):4646–4653.
- Biondo-simões, M. D. L. P., J. Eduardo, F. Matias, G. R. Montibeller, C. D. Siqueira, S. Nunes, dan C. A. Grassi. 2006. Effect of aging on liver regeneration in rats 1 efeitos do envelhecimento na regeneração hepática em ratos. 21(4):197–202.
- Casida, J. E. dan R. J. Bryant. 2017. The abcs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry
- Chowański, S., M. Kudlewska, P. Marciniak, dan G. Rosiński. 2014. Synthetic insecticides – is there an alternative ? (January)
- Deborah, S. dan J. Rowland. 2000. Toxicology chapter for chlorpyrifos
- Dias, E., F. Garcia, S. Morais, dan M. D. L. Pereira. 2015. A review on the assessment of the potential adverse health impacts of carbamate pesticides
- El-Damaty, E.-S. M. A. A.-R. H. F., G. Rowayshed, dan H. M. Fahmy. 2012. Biochemical and histopathological effects of systemic pesticides on some functional organs of male albino rats biochemical and histopathological effects of systemic pesticides on some functional. (October)
- Eleršek, T. dan M. Filipi. 2006. Organophosphorus pesticides - mechanisms of their toxicity

Fathiyah, S. 2018. Mekanisme regenerasi hati secara endogen pada fibrosis hati.

Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang Fakultas. 2:4.

- Giri, S., A. Giri, dan G. D. Sharma. 2003. Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice in vivo. 18(1):53–58.
- Gupta, R. C. dan D. Milatovic. 2014. Chapter 23. insecticides. (Cm):389–407.
- Hussien, H. M., H. M. Abdou, dan M. I. Yousef. 2013. Cypermethrin induced damage in genomic dna and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: the protective effect of sesame oil. *Brain Research Bulletin*
- Ifemeje, J. C. dan K. C. Patrick-iwuanyanwu. 2020. Pesticides , history , and classification
- Ismail, A. A., O. Hendy, G. A. Rasoul, J. R. Olson, M. R. Bonner, dan D. S. Rohlman. 2021. Acute and cumulative effects of repeated exposure to egyptian adolescents
- Jaiswal, S. K., V. K. Gupta, N. J. Siddiqi, R. S. Pandey, dan B. Sharma. 2015. Hepatoprotective effect of citrus limon fruit extract against carbofuran induced toxicity in wistar rats. 2015
- Jaiswal, S. K., A. Sharma, V. K. Gupta, R. K. Singh, dan B. Sharma. 2016. Curcumin mediated attenuation of carbofuran induced oxidative stress in rat brain. 2016
- Jayaraj, R., P. Megha, dan P. Sreedev. 2016. Organochlorine pesticides , their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. 9:90–100.
- Karami-mohajeri, S., A. Ahmadipour, dan H. Rahimi. 2017. Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver : a brief summary of four decades of research. (Figure 1):261–275.
- Kayode, O., F. Adesola, D. Teslim, A. Arinola, dan A. Dorcas. 2019. Heliyon oxidative stress and in fl ammation following sub-lethal oral exposure of cypermethrin in rats : mitigating potential of epicatechin. *Heliyon*. 5(July):e02274.
- Khan, M. A. dan W. Ahmad. 2019. *Microbes for Sustainable Insect Pest Management*. Sustainability in Plant and Crop Protection.
- Kirschmann, E. K., M. W. Pollock, V. Nagarajan, dan M. M. Torregrossa. 2018. Developmental cognitive neuroscience development of working memory in the male adolescent rat. *Developmental Cognitive Neuroscience*. (November):0–1.

- Kondakala, S., J. H. Lee, M. K. Ross, dan E. George. 2017. PT us. *Toxicology and Applied Pharmacology*
- Liem, J. F., M. Mansyur, D. S. Soemarmo, A. Kekalih, I. Subekti, F. D. Suyatna, D. A. Suryandari, S. G. Malik, dan B. Pangaribuan. 2021. Cumulative exposure characteristics of vegetable farmers exposed to chlorpyrifos in central java – indonesia ; a cross- sectional study. 1–9.
- Maulina, M. 2018. ZAT zat yang mempengaruhi histopatologi hepar. *Unimal Press Universitas Malikussaleh*. 49:13.
- Mescher, A. L. 2013. *Junqueira's Basic Histology*. Edisi 13.
- Nucci, R. A. B. ., A. C. S. Teodoro, dan E. F. Gama. 2016. Liver regeneration and aging : a review. 33(4):179–182.
- Nwabor, O. F. 2019. Synthetic insecticides , phytochemicals and mosquito resistance synthetic insecticides , phytochemicals and mosquito resistance. (February)
- Pascal, F., T. Manfo, S. A. Mboe, E. A. Nantia, F. Ngoula, P. B. Telefo, P. F. Moundipa, dan F. Cho-ngwa. 2020. Evaluation of the effects of agro pesticides use on liver and kidney function in farmers from buea , cameroon. 2020
- Patel, J. 2017. TOXICOPATHOLOGY of induced carbofuran toxicity in wistar rats. (January 2014)
- Pearson, J. N. dan M. Patel. 2016. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. 1–8.
- Pratama, D. A. O. A. 2019. The study of organophosphate (diazinon) toxicity toward liver histopathology ity toward liver histopathology a nd malondialdehyde (mda) serum levels on rats (*rattus norvegicus*). 1(2):15–23.
- Purushothaman, B. P. dan R. Kuttan. 2017. Protective effect of curcumin against carbofuran- induced toxicity in wistar rats. 36(1):73–86.
- Rai, D. K. dan Æ. B. Sharma. 2007. Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain. 66–71.
- Riar, N. K. 2014. Chemical profile. 1:449–451.
- Sachana, M., J. Flaskos, E. Nikolaidis, A. Hargreaves, E. Alexaki-tzivanidou, M. Sachana, dan E. T. Al. 2001. Inhibition of rat platelet 5-hydroxytryptamine uptake by chlorpyrifos and carbaryl. 195–200.
- Sänger, C., A. Schenk, L. O. Schwen, L. Wang, dan F. Gremse. 2015. Intrahepatic

vascular anatomy in rats and mice — variations and surgical implications. 1–13.

Saquib, Q., H. A. Alwathnani, S. M. Ansari, dan A. A. Al-khedhairi. 2021. Carbofuran cytotoxicity , dna damage , oxidative stress , and cell death in human umbilical vein endothelial cells : evidence of vascular toxicity. (February):847–860.

Schmucker, D. L. dan H. Sanchez. 2011. Liver regeneration and aging : a current perspective. 2011

Sengupta, P. 2013. The laboratory rat : relating its age with human ' s. 4(624):2–8.

Sherwood, L. 2019. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Edisi 9.

Singh, A. K., M. N. Tiwari, O. Prakash, dan M. P. Singh. 2012. A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. 64–71.

Song, X. dan W. Point. 2014. Mechanism of toxicity. 1:673–674.

Stan, F. G. 2018. Comparative study of the liver anatomy in the rat , rabbit , guinea pig and chinchilla. (May)

Tanvir, E. M., R. Afroz, M. A. Z. Chowdhury, S. H. Gan, N. Karim, M. N. Islam, dan M. I. Khalil. 2016. A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats

Tsai, W. dan N. Pingtung. 2014. *Organochlorine Insecticides*. Edisi Third Edition. Elsevier. *Encyclopedia of Toxicology*.

Uzun, F. G. dan Y. Kalender. 2013. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats : the role of quercetin and catechin. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*. 55:549–556.

Vdoviaková, K., E. Petrovová, L. Krešáková, M. Maloveská, J. Teleky, J. Jenčová, J. Živčák, dan A. J. Jr. 2016. Importance rat liver morphology and vasculature in surgical research. 4716–4728.

Voorhees, J. R., M. T. Remy, C. M. Erickson, L. M. Dutca, D. J. Brat, dan A. A. Pieper. 2019. Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates de fi cits in a rat model of alzheimer ' s disease. *npj Aging and Mechanisms of Disease*. (September 2018)

Yassin, M. M., T. O. Adas, dan M. M. Yasin. 2021. Toxicology and risk assessment serum glucose , bilirubin , liver enzymes , renal parameters , protein profile and some electrolytes in adult male domestic rabbits intoxicated with chlorpyrifos. 7(1):1–10.

Yuningtyaswari dan S. D. Mega. 2020. The effect of phoenix dactylifera pollen on histology liver of rattus norvegicus exposed with air fresheners. (October):13–14.



LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Etik Penelitian


 KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
 UNIVERSITAS JEMBER
 KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
 Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
 68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL
 Nomor : 1594/H25.1.11/KE/2022

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

PERBANDINGAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS REMAJA AKIBAT PAPAN SUBKRONIS KLOORPIRIFOS, KARBOFURAN DAN SIPERMETRIN

Peneliti Utama : Siti Jamalia
Name of the principal investigator

NIM : 182010101042

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 7 April 2022
 Ketua Komisi Etik Penelitian


 Dr. dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 31 Maret 2022

Tanggapan Anggota Komisi Etik untuk protokol penelitian:

Nama : Siti Jamalia

NIM : 182010101042

Judul : Perbandingan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Remaja akibat Paparan Subkronis Klorpirifos, Karbofuran dan Sipermetrin

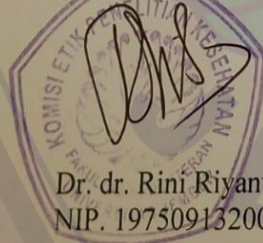
Komentar Reviewer Etik :

Berdasarkan pertimbangan 3 prinsip etika, 7 standar, dan 25 butir pedoman etik penelitian CIOMS-WHO. Maka pertimbangan etik untuk penelitian dengan judul tersebut diatas adalah:

1. Penelitian dapat dilanjutkan dengan memastikan pengakhiran kehidupan hewan coba secara cepat dan sesuai prosedur baku.
2. Peneliti harus mengolah sampah sisa sampel/spesimen uji sesuai standar supaya tidak mencemari lingkungan sekitar laboratorium pengujian.
3. Harap diperhatikan keamanan terhadap peneliti selama melakukan penelitian pada lingkungan berisiko.
4. Peneliti wajib melakukan desimenasi hasil penelitian

Kesimpulan: Penelitian dapat dilanjutkan dengan syarat mematuhi pertimbangan etik tersebut diatas.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



Dr. dr. Rini Riyanti, Sp.PK
NIP. 197509132000032001

Reviewer Etik



dr. Angga Mardro Raharjo, Sp.P
NIP. 198003052008121002

Lampiran 3.2 Cara Pembuatan Larutan Stok DMSO 5% dan Insektisida

Rentang berat badan tikus wistar jantan usia remaja yaitu kisaran 45 – 115 gram. Volume pemberian larutan secara subkutan pada tikus usia remaja dengan asumsi berat badan 100 gram adalah 0,2 cc. Sehingga jika terdapat 6 sampel tikus tiap kelompok dengan diberi perlakuan selama 21 hari, total volume yang dibutuhkan adalah 30 cc.

1. Pengenceran DMSO konsentrasi 100%

Konsentrasi DMSO yang tersedia adalah 100%. Sehingga perlu diencerkan terlebih dahulu menggunakan *aquadest* agar konsentrasinya turun menjadi 5%. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 5\% \times 30 \text{ cc} &= 100\% \times V_2 \\ V_2 &= 1,5 \text{ cc (DMSO 100\%)} \end{aligned}$$

Volume DMSO 100% yang dilarutkan adalah 1,5 cc. Sehingga, volume *aquadest* yang dibutuhkan dapat diketahui melalui sisa total volume, yaitu 28,5 cc. Pencampuran DMSO 100% dan *aquadest* inilah yang akan membentuk DMSO 5%.

2. Pembuatan larutan stok insektisida

Jika asumsi kebutuhan volume paparan insektisida selama 21 hari adalah 30 cc untuk masing-masing kelompok, maka dibutuhkan dosis klorpirifos 150 mg, karbofuran 1,5 mg dan sipermetrin 150 mg di dalam 30 cc larutan DMSO 5%. Perhitungan dosis sebagai berikut:

b. Klorpirifos (0,2 cc = 1 mg):

$$\begin{aligned} \frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} &= \frac{30 \text{ cc}}{\text{berat klorpirifos}} \\ \frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} &= \frac{30 \text{ cc}}{x} \\ x &= 150 \text{ mg} \end{aligned}$$

c. Karbofuran (0,2 cc = 0,01 mg):

$$\frac{0,2 \text{ cc}}{0,01 \text{ mg}} = \frac{30 \text{ cc}}{\text{berat klorpirifos}}$$

$$\frac{0,2 \text{ cc}}{0,01 \text{ mg}} = \frac{30 \text{ cc}}{x}$$

$$x = 1,5 \text{ mg}$$

d. Sipermetrin (0,2 cc = 1 mg):

$$\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{30 \text{ cc}}{\text{berat klorpirifos}}$$

$$\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{30 \text{ cc}}{x}$$

$$x = 150 \text{ mg}$$

Lampiran 3.3 Data Berat Badan dan Volume Injeksi Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol (K) diberi perlakuan berupa pemberian pelarut DMSO 5% tanpa insektisida. Volume DMSO 5% yang diinjeksikan pada kelompok K1 adalah 0,2 cc. Rentang berat badan tikus wistar jantan usia remaja yaitu 45 – 115 gram. Pengukuran berat badan dilakukan setiap 1 minggu sekali sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya peningkatan berat badan. Meskipun berat badan tidak memengaruhi volume pemberian DMSO 5%.

Data berat badan kelompok normal (N):

Minggu ke-	Tikus ke-	Berat badan (gram)
1	1	68
	2	60
	3	69
	4	85
	5	50
2	1	98
	2	86
	3	80
	4	103
	5	68

3	1	105
	2	90
	3	85
	4	106
	5	70

Data berat badan dan volume DMSO 5% kelompok kontrol (K):

Minggu ke-	Tikus ke-	Berat badan (gram)	Volume DMSO 5%
1	1	53	0,2
	2	72	0,2
	3	54	0,2
	4	50	0,2
	5	56	0,2
	6	66	0,2
2	1	95	0,2
	2	61	0,2
	3	72	0,2
	4	65	0,2
	5	64	0,2
	6	88	0,2
3	1	126	0,2
	2	63	0,2
	3	74	0,2
	4	67	0,2
	5	65	0,2
	6	90	0,2

Lampiran 3.4 Perhitungan Dosis dan Volume Larutan Klorpirifos

Penentuan dosis dan volume yang dibutuhkan sesuai dengan berat badan tikus wistar jantan usia remaja. Rentang berat badan tikus wistar jantan usia remaja yaitu 45 – 115 gram. Dosis klorpirifos yang digunakan adalah 10% LD 50, yaitu 20 mg/kgbb. Pengukuran berat badan dilakukan setiap 1 minggu sekali sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya peningkatan berat badan. Setiap volume 0,2 cc harus mengandung 1 mg klorpirifos. Jika berat badan tikus adalah 100 gram, maka dosis dan volume yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

Berat badan tikus	Dosis klorpirifos	Volume klorpirifos dengan pelarut DMSO 5%
100 gram	$\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{\text{berat badan}}$ $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{100 \text{ gr}}$ $x = 0,2 \text{ mg}$	$\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{\text{dosis tikus}}$ $\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{0,2 \text{ mg}}$ $x = 0,4 \text{ cc}$

Dosis dan volume klorpirifos pada kelompok P1 (20 mg/kgbb; 0,2 cc = 1 mg):

Minggu ke-	Tikus ke-	Berat badan (gram)	Dosis klorpirifos (mg)	Volume klorpirifos dengan pelarut DMSO 5%
1	1	63	1,26	0,252
	2	58	1,16	0,232
	3	47	0,94	0,188
	4	64	1,28	0,256
	5	56	1,12	0,224
	6	54	1,08	0,216
2	1	103	2,06	0,412
	2	85	1,7	0,34
	3	74	1,48	0,296
	4	80	1,6	0,32
	5	85	1,7	0,34
	6	92	1,84	0,368
3	1	130	2,6	0,52
	2	115	2,3	0,46
	3	99	1,98	0,396
	4	103	2,06	0,412

5	104	2,08	0,416
6	118	2,38	0,472

Lampiran 3.5 Perhitungan Dosis dan Volume Larutan Karbofuran

Penentuan dosis dan volume yang dibutuhkan sesuai dengan berat badan tikus wistar jantan usia remaja. Rentang berat badan tikus wistar jantan usia remaja yaitu 45 – 115 gram. Dosis karbofuran yang digunakan adalah 10% LD 50, yaitu 0,2 mg/kgbb. Pengukuran berat badan dilakukan setiap 1 minggu sekali sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya peningkatan berat badan. Setiap volume 0,2 cc harus mengandung 0,01 mg. Jika berat badan tikus adalah 100 gram, maka dosis dan volume yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

Berat badan tikus	Dosis karbofuran	Volume karbofuran dengan pelarut DMSO 5%
100 gram	$\frac{0,2 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{\text{berat badan}}$ $\frac{0,2 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{100 \text{ gr}}$ $x = 0,02 \text{ mg}$	$\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{\text{dosis tikus}}$ $\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{0,02 \text{ mg}}$ $x = 0,04 \text{ cc}$

Dosis dan volume karbofuran pada kelompok P2 (0,2 mg/kgbb; 0,2 cc = 0,01 mg):

Minggu ke-	Tikus ke-	Berat badan (gram)	Dosis klorpirifos (mg)	Volume klorpirifos dengan pelarut DMSO 5%
1	1	61	0,0122	0,244
	2	64	0,0128	0,256
	3	52	0,0104	0,208
	4	55	0,011	0,22
	5	51	0,0102	0,204
	6	54	0,0108	0,216
2	1	82	0,0164	0,328
	2	87	0,0174	0,348
	3	74	0,0148	0,296
	4	67	0,0134	0,268
	5	74	0,0148	0,296
	6	94	0,0188	0,376
3	1	100	0,02	0,4
	2	105	0,021	0,42

3	103	0,0206	0,412
4	81	0,0162	0,324
5	82	0,0164	0,328
6	109	0,0218	0,436

Lampiran 3.6 Perhitungan Dosis dan Volume Larutan Sipermetrin

Penentuan dosis dan volume yang dibutuhkan sesuai dengan berat badan tikus wistar jantan usia remaja. Rentang berat badan tikus wistar jantan usia remaja yaitu 45 – 115 gram. Dosis sipermetrin yang digunakan adalah 10% LD 50, yaitu 20 mg/kgbb. Pengukuran berat badan dilakukan setiap 1 minggu sekali sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya peningkatan berat badan. Setiap volume 0,2 cc harus mengandung 1 mg sipermetrin. Jika berat badan tikus adalah 100 gram, maka dosis dan volume yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

Berat badan tikus	Dosis klorpirifos	Volume sipermetrin dengan pelarut DMSO 5%
100 gram	$\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{\text{berat badan}}$ $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{x}{100 \text{ gr}}$ $x = 0,2 \text{ mg}$	$\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{\text{dosis tikus}}$ $\frac{0,2 \text{ cc}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{0,2 \text{ mg}}$ $x = 0,4 \text{ cc}$

Dosis dan volume klorpirifos pada kelompok P1 (20 mg/kgbb; 0,2 cc = 1 mg):

Minggu ke-	Tikus ke-	Berat badan (gram)	Dosis klorpirifos (mg)	Volume klorpirifos dengan pelarut DMSO 5%
1	1	60	1,2	0,24
	2	55	1,1	0,22
	3	63	1,26	0,252
	4	60	1,2	0,24
	5	54	1,08	0,216
2	1	85	1,7	0,34
	2	70	1,4	0,28
	3	77	1,54	0,308
	4	90	1,8	0,36
	5	71	1,42	0,284
3	1	118	2,36	0,472

2	95	1,9	0,38
3	80	1,6	0,32
4	121	2,42	0,484
5	80	1,6	0,32

Lampiran 3.7 Prosedur Pembedahan Hewan Uji

Pembedahan tikus dilakukan pada hari ke-22 secara berurutan berdasarkan nomor urut sampel. Prosedur ini dibagi menjadi 2 tahapan, yaitu persiapan dan proses pembedahan.

1. Persiapan

- 1) Menyiapkan pot organ hepar berukuran 50 cc dan diberi label sesuai dengan nomor urut tikus yang akan dilakukan pembedahan.
- 2) Pot organ diisi dengan BNF 10% 30 cc.
- 3) Menyiapkan peralatan yang dibutuhkan:
 - a. *Scalpel* dan *blade*
 - b. Pinset anatomi dan pinset chirurgis
 - c. Gunting bedah: lurus pendek, lurus panjang dan bengkok
 - d. Papan bedah, jarum pentul untuk fiksasi

2. Proses pembedahan

- 1) Melakukan anastesi menggunakan inhalasi eter lalu dilanjutkan dengan dislokasi servikal pada tikus. Tikus harus dipastikan sudah benar-benar mati.
- 2) Meletakkan tikus di atas papan bedah dengan posisi supinasi dan memfiksasi bagian ekstremitas menggunakan jarum pentul.
- 3) Membuat sayatan di kulit sepanjang linea alba, mulai dari region mentalis hingga ke tepi anterior os pelvis. Lalu dilanjutkan dengan membuka bagian kulit dan otot.
- 4) Mengambil organ hepar dan memisahkannya dari jaringan sekitar. Lalu membersihkan organ hepar dari lemak yang menempel pada permukaannya.

- 5) Mencuci organ hepar menggunakan NaCl 0,9% beberapa kali.
 - 6) Memasukkan organ hepar ke dalam pot yang sudah diberi label dan diisi BNF 10%.
 - 7) Mendokumentasikan proses pembedahan.
3. Sanitasi
- 1) Menampung sisa bagian tubuh tikus yang sudah tidak digunakan lagi pada wadah tertutup.
 - 2) Membakar sisa bagian tubuh tikus di dalam tong pembakaran.
 - 3) Memasukkan dan memilah sampah medis.
 - 4) Membersihkan area pembedahan dengan menggunakan sabun lalu diberi desinfektan.

Lampiran 3.8 Protokol Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

1. Fiksasi

Memasukkan organ hepar dalam larutan fiksasi dengan urutan sebagai berikut:

- 1) Memfiksasi organ hepar dalam larutan BNF 10%,
- 2) Dehidrasi menggunakan alcohol 30% dengan durasi 20 menit pertama, 20 menit kedua dan 20 menit ketiga, lalu dilanjutkan dengan alcohol 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% masing-masing selama 1 jam,
- 3) Menggunakan larutan *xylol* alcohol 1 dengan durasi lebih dari 24 jam,
- 4) Melakukan *clearing* menggunakan larutan *xylol* 1,2 dan 3 masing-masing dengan durasi waktu 20 menit. Lalu akan tampak jaringan tembus pandang,
- 5) Memanaskan *xylol* paraffin 1:1 dalam oven 60° C selama 20 menit,
- 6) Melakukan *Embedding* dan *blocking*: paraffin 1,2 dan 3 dengan durasi 20 menit, lalu mencetak jaringan di blok paraffin,
- 7) Membuka cetakan setelah blok didinginkan,
- 8) Melakukan *trimming*, yaitu memotong jaringan membentuk balok.

2. Pemotongan blok

- 1) Menyiapkan *object glass* terlebih dahulu,
- 2) Memberi albumin di bagian tengah *Object glass*,
- 3) Memotong balok organ dengan ketebalan 5 mikro,
- 4) Memasukkan potongan organ ke dalam air panas dengan suhu 60° C. Lalu mengambil jaringan yang mengapung dan meletakkannya pada *object glass*,
- 5) Melakukan proses pengeringan, dengan mendiamkan *object glass*,
- 6) Menghilangkan paraffin yang ada di *object glass* atau jaringan dengan cara dipanaskan dalam oven 60° C.

3. Pewarnaan *slide*

- 1) Memasukkan jaringan dalam *xylol 1*, *xylol 2*, dan *xylol 3* masing-masing selama 10 menit,
- 2) Melakukan rehidrasi menggunakan alkohol *xylol* selama 5 menit,
- 3) Membilas menggunakan alkohol 30-96% masing-masing selama 30 menit,
- 4) Membilas menggunakan *aquadest* sekali selama 10 menit,
- 5) Merendam jaringan dalam hematoksilin selama 10 menit,
- 6) Membilas jaringan menggunakan air mengalir hingga bersih,
- 7) Membilas menggunakan *aquadest* lalu *acid alcohol*,
- 8) Membilas menggunakan alkohol 50-96%,
- 9) Membilas menggunakan eosin selama 2-58 menit,
- 10) Membilas menggunakan alkohol 96% sebanyak 2 kali,
- 11) Membilas menggunakan alkohol *xylol*,
- 12) Mengeringkan menggunakan kertas saring,
- 13) Memasukkan dalam *xylol 1* selama 15 menit, *xylol 2* selama 5 menit lalu ditetaskan asam Canada.

Lampiran 4.1 Prosedur Pengamatan Preparat

Pengamatan preparat histopatologi hepar untuk menentukan derajat kerusakan hepatosit dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Menyiapkan preparat histopatologi hepar tikus wistar jantan untuk pengamatan.
2. Mengacak preparat 28 sampel agar menjadi pengamatan *blinding*.
3. Mengamati preparat histopatologi hepar dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada 5 lapang pandang. Lokasi pengamatan berada di zona 3, yaitu zona sentrilobular yang berada di area dekat vena sentral.
4. Melakukan penilaian pada 20 hepatosit tiap lapang pandang secara acak. Pemilihan sel diawali dengan membagi 1 lapang pandang menjadi 4 kuadran, lalu tiap kuadran dipilih 5 hepatosit acak.
5. Penilaian hepatosit berdasarkan metode *Mandja Roenigk*, yaitu:

Skor	Tingkat kerusakan	Deskripsi
1	Normal	Hepatosit berbentuk poligonal, dinding hepatosit berbatas tegas dan sitoplasma berwarna merah homogen.
2	Degenerasi parenkim	Pembesaran hepatosit melebihi ukuran normal dengan disertai sitoplasma bergranula dan keruh.
3	Degenerasi hidropis	Tampak hepatosit membesar dari normal, warna sitoplasma pucat, memiliki banyak vakuola dan terdapat akumulasi cairan.
4	Nekrosis	Inti hepatosit tampak pecah membentuk fragmen kromatin yang menyebar (karioreksis), kromatin dan inti sel larut sehingga tidak nampak (kariolisis), dan inti padat tampak gelap dan mengecil.

6. Hepatosit dijumlahkan sesuai dengan kategori tingkat kerusakan sel, lalu dikalikan dengan skornya pada setiap lapang pandang. Jumlah skor dalam 5 lapang pandang tersebut akan menjadi data 1 sampel. Skor 100 merupakan skor terendah dengan interpretasi seluruh sel normal, dan skor tertinggi yaitu 400 dengan interpretasi seluruh hepatosit mengalami kerusakan nekrosis.

Jember, 16 April 2022
Dokter Pemeriksa



dr. Meiske Margaretha, M. Biomed, Sp.PA

Lampiran 4.2 Data Skoring Histopatologi Hepar

Kelompok	Nomor Tikus	Normal		Degenerasi Parenkim		Degenerasi Hidropik		Nekrosis		Σ Sel	Total skor
		Σ	Skor	Σ	Skor	Σ	Skor	Σ	Skor		
N	1	6	6	94	188	0	0	0	0	100	194
	2	8	8	91	182	1	3	0	0	100	193
	3	6	6	94	188	0	0	0	0	100	194
	4	4	4	96	192	0	0	0	0	100	196
	5	3	3	96	192	1	3	0	0	100	198
K	1	6	6	91	182	3	9	0	0	100	197
	2	6	6	94	188	0	0	0	0	100	194
	3	5	5	95	190	0	0	0	0	100	195
	4	7	7	91	182	1	3	1	4	100	196
	5	6	6	93	186	1	3	0	0	100	195
P1	1	4	4	91	182	4	12	1	4	100	202
	2	5	5	88	176	5	15	2	8	100	204
	3	2	2	96	192	2	6	0	0	100	200
	4	6	6	90	180	4	12	0	0	100	198
	5	5	5	85	170	9	27	1	4	100	206
P2	1	7	7	77	154	13	39	3	12	100	212
	2	5	5	75	150	20	60	0	0	100	215
	3	5	5	67	134	28	84	0	0	100	223
	4	3	3	79	158	18	54	0	0	100	215
	5	5	5	78	156	11	33	6	24	100	218
P3	1	5	5	81	162	14	42	0	0	100	209
	2	6	6	86	172	3	9	5	20	100	207
	3	6	6	74	148	20	60	0	0	100	214
	4	5	5	87	174	4	12	4	16	100	207
	5	9	9	72	144	14	42	5	20	100	215

Jember, 16 April 2022
Dokter Pemeriksa



dr. Meiske Margaretha, M. Biomed, Sp.PA

Lampiran 4.3 Uji Statistik

Uji analisis skoring *Mandja Roenigk*

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Normal	.291	5	.191	.905	5	.440
Kontrol	.237	5	.200*	.961	5	.814
Klorpirifos	.136	5	.200*	.987	5	.967
Karbofuran	.250	5	.200*	.933	5	.617
Sipermetrin	.242	5	.200*	.829	5	.137

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Skor HistoPA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.484	4	20	.077

ANOVA

Skor HistoPA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1793.040	4	448.260	47.285	.000
Within Groups	189.600	20	9.480		
Total	1982.640	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Skor HistoPA

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Differen ce (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Kontrol	-.400	1.947	.839	-4.46	3.66
	Klorpirifos	-7.000*	1.947	.002	-11.06	-2.94
	Karbofuran	-21.600*	1.947	.000	-25.66	-17.54
	Sipermetrin	-15.400*	1.947	.000	-19.46	-11.34
Kontrol	Normal	.400	1.947	.839	-3.66	4.46
	Klorpirifos	-6.600*	1.947	.003	-10.66	-2.54
	Karbofuran	-21.200*	1.947	.000	-25.26	-17.14
	Sipermetrin	-15.000*	1.947	.000	-19.06	-10.94
Klorpirifos	Normal	7.000*	1.947	.002	2.94	11.06
	Kontrol	6.600*	1.947	.003	2.54	10.66
	Karbofuran	-14.600*	1.947	.000	-18.66	-10.54
	Sipermetrin	-8.400*	1.947	.000	-12.46	-4.34
Karbofuran	Normal	21.600*	1.947	.000	17.54	25.66
	Kontrol	21.200*	1.947	.000	17.14	25.26
	Klorpirifos	14.600*	1.947	.000	10.54	18.66
	Sipermetrin	6.200*	1.947	.005	2.14	10.26
Sipermetrin	Normal	15.400*	1.947	.000	11.34	19.46
	Kontrol	15.000*	1.947	.000	10.94	19.06
	Klorpirifos	8.400*	1.947	.000	4.34	12.46
	Karbofuran	-6.200*	1.947	.005	-10.26	-2.14

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

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Normal	5	193	198	195.00	2.000
Kontrol	5	194	197	195.40	1.140
Klorpirifos	5	198	206	202.00	3.162
Karbofuran	5	212	223	216.60	4.159
Sipermetrin	5	207	215	210.40	3.847
Valid N (listwise)	5				

Lampiran 4.4 Dokumentasi Penelitian

Proses Pembuatan Larutan



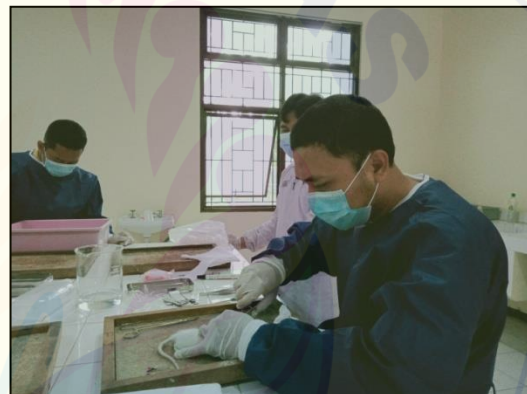
Aklimatisasi, Randomisasi dan Penimbangan Berat Badan Tikus



Perlakuan Hewan Coba

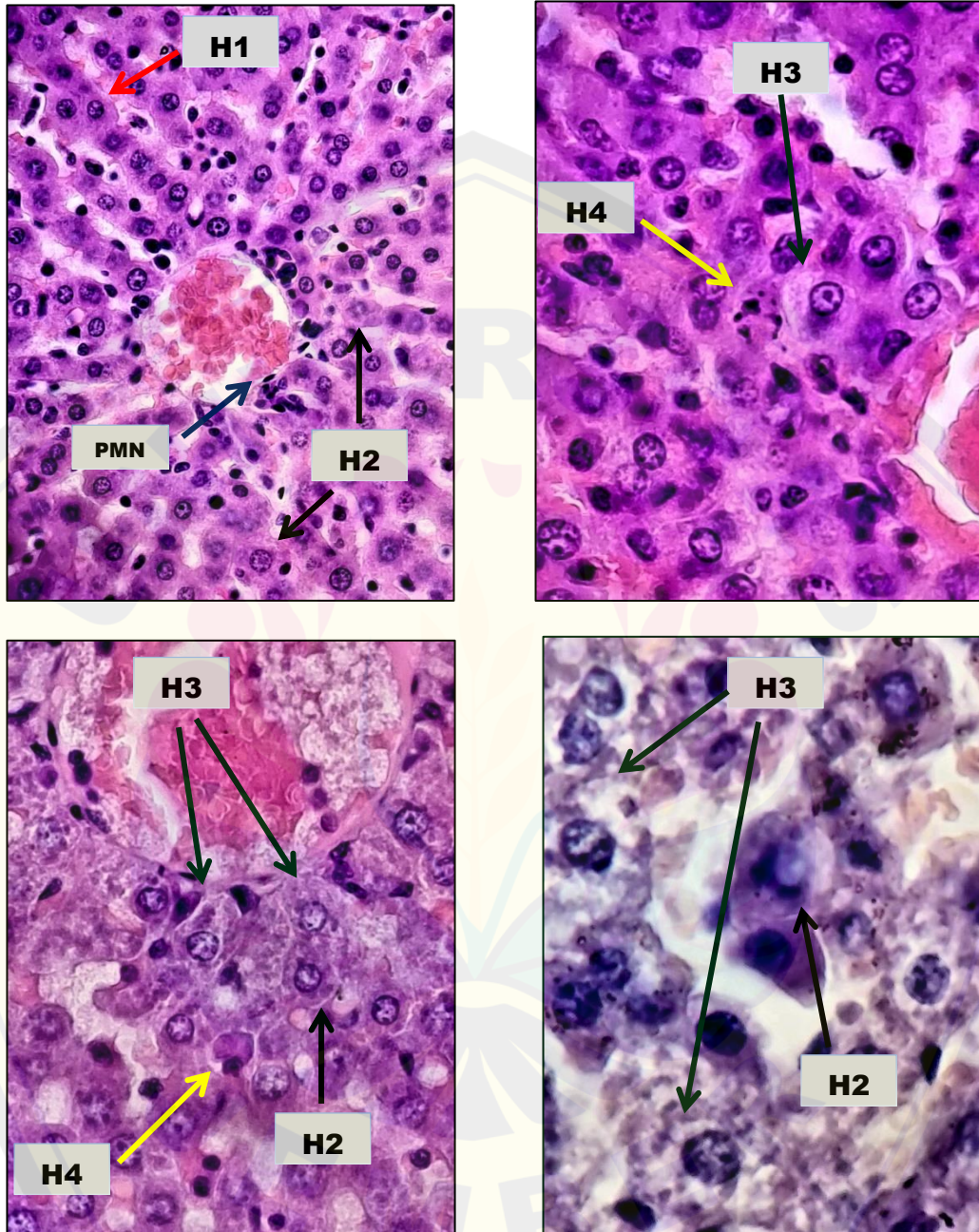


Terminasi Hewan Coba



Gambaran Hepatosit Berdasarkan Metode *Madja Roenigk*

Zona Sentrilobular (Zona 3)



Keterangan:

- H1 : Hepatosit normal
- H2 : Hepatosit degenerasi parenkim
- H3 : Hepatosit degenerasi hidropik
- H4 : Hepatosit nekrosis

Gambaran Histopatologi Hepar Zona Periporta dan Midzonal

