



**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL
BROKOLI (*Brassica oleracea L. var. italica*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHID (MDA) HEPAR TIKUS PUTIH
GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI
DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)antracene*)**

SKRIPSI

Oleh

**Dear Farah Sielma
NIM 122010101092**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL
BROKOLI (*Brassica oleracea L. var. italica*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHID (MDA) HEPAR TIKUS PUTIH
GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI
DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)antracene*)**

SKRIPSI

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

Oleh

**Dear Farah Sielma
NIM 122010101092**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Dra. Dewanti Indri Hestiwi dan ayahanda Drs. Psi. Ahmad Farouq, M.Si., adik Ilham Akbar Ahmadio, serta keluarga besar tercinta yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan kasih sayang yang tiada henti. Senyum dan kebahagiaan mereka adalah harapan terbesar saya;
2. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertakwa;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.

(terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 6-8)^{*)}

“Ya Allah sesungguhnya saya minta kepada Engkau ilmu yang bermanfaat, rizqi yang baik, dan amalan yang diterima”

(*Ibnu Maajah*)^{**)}

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an Al-Karim dan Terjemahan Makna ke Dalam Bahasa Indonesia*. Bogor: Sygma.

***) Al-Qarni. 2003. *La Tahzan Jangan Bersedih*. Rangkasbitung: Qisthi Press.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Dear Farah Sielma

NIM : 122010101092

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(a)antracene*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 14 Desember 2015
Yang menyatakan,

Dear Farah Sielma
NIM 122010101092

SKRIPSI

**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL
BROKOLI (*Brassica oleracea L. var. italica*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHID (MDA) HEPAR TIKUS PUTIH
GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI
DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)antracene*)**

Oleh

Dear Farah Sielma
NIM 122010101092

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yudha Nurdian, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin, 14 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.
NIP. 19690901 199903 1 003

Penguji III,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.
NIP. 19840916 200801 2 003

Penguji II,

dr. Sugiyanta, M.Ked.
NIP. 19790207 200501 1 001

Penguji IV,

dr. Yudha Nurdian, M.Kes.
NIP. 19711019 199903 1 001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes.
NIP. 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene); Dear Farah Sielma, 122010101092, 2015: 57 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) merupakan kelompok senyawa organik yang tersebar luas di alam sebagai hasil dari pembakaran material organik yang tidak sempurna. Hasil pembakaran yang tidak sempurna tersebut rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal bebas. Salah satu senyawa radikal bebas yang merupakan produk degradasi PAH adalah DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene). Banyaknya paparan DMBA terutama dari polutan asap kendaraan bermotor, asap rokok, dan asap dapur memungkinkan radikal bebas tersebut berikatan dengan sel, terutama sel-sel hepar. DMBA mengalami metabolisme di hepar melalui jalur sitokrom P450 dan mengubahnya menjadi DMBA-DE (DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida). DMBA-DE dan senyawa xenobiotik PAH lainnya mengakibatkan pembentukan radikal reaktif yang bersifat destruktif, hepatotoksik, serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan. Radikal-radikal tersebut bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran sel hepar sehingga menghasilkan peroksidasi lipid. Reaksi peroksidasi lipid membran sel hepar akan meningkatkan produksi senyawa malondialdehid (MDA) dalam sel hepar.

Proses peroksidasi lipid dapat dicegah melalui pemberian antioksidan. Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) merupakan salah satu tanaman yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan tinggi (IC₅₀: 0,44 mg/ml) melalui uji DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). Komponen flavonoid yang terkandung dalam brokoli berfungsi sebagai *chain breaking antioxidant* atau pemutus reaksi berantai dari radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA. Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan rancangan *Posttest Only Control Group Design*. Sampel penelitian yaitu 24 ekor tikus wistar jantan umur 2-3 bulan, berat badan 100-200 gram, dan kondisi fisik sehat. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 4 ekor tikus.

Kelompok kontrol normal (K) dan kelompok kontrol negatif (K-) diberi aquades per oral selama 7 hari; sedangkan kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4) masing-masing diberi ekstrak etanol brokoli dengan dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB per oral selama 7 hari. Pada hari ke-8, seluruh kelompok kecuali kelompok kontrol normal (K) diinduksi DMBA 15 mg/kgBB *single dose* per oral. Sampel jaringan hepar diambil pada hari ke-12 dan kadar MDA hepar diukur menggunakan MDA *ELISA Kit*. Data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD*.

Rata-rata kadar MDA hepar pada kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan akibat induksi DMBA ($60,00 \pm 5,28$ ng/ml). Efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli terhadap DMBA ditunjukkan dengan penurunan rata-rata kadar MDA hepar pada kelompok perlakuan dosis 500 mg/kgBB ($27,91 \pm 3,24$ ng/ml), 1000 mg/kgBB ($26,64 \pm 3,10$ ng/ml), dan 2000 mg/kgBB ($24,01 \pm 4,36$ ng/ml) hingga mendekati kontrol normal ($22,03 \pm 5,50$ ng/ml). Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Yudha Nurdian, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini;
3. dr. Ancah Caesarina, Ph.D., selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
4. dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D., selaku Dosen Penguji I dan dr. Sugiyanta, M.Ked. selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji skripsi ini;
5. Ayahanda Drs. Psi. Ahmad Farouq, M.Si dan Ibunda Dra. Dewanti Indri Hestiwi tercinta atas dukungan moril, materi, doa, dan kasih sayang yang tak akan pernah putus;
6. Adik saya Ilham Akbar Ahmadio yang selalu memberikan doa dan semangat;

7. Teman-teman angkatan 2012 yang telah berjuang bersama-sama, saling mendukung dan mendoakan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
8. Seluruh civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang membantu dalam urusan skripsi ini;
9. Analis Laboratorium Farmakologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta Analis Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi;
10. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Jika terdapat kekurangan dalam pembuatan skripsi ini penulis mohon maaf. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 14 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Brokoli (<i>Brassica oleracea L. var. italica</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Deskripsi dan Jenis Tanaman.....	7
2.1.4 Kandungan Gizi dan Komponen Antioksidan	8
2.1.5 Potensi Brokoli sebagai Antioksidan	10
2.1.6 Manfaat Brokoli	11
2.1.7 Lethal Dose (LD ₅₀) Brokoli	12

2.2	Antioksidan	13
2.2.1	Jenis Antioksidan	13
2.2.2	Flavonoid	15
2.3	Radikal Bebas	16
2.3.1	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH).....	17
2.3.2	Radikal Bebas DMBA	18
2.3.3	Mekanisme Hepatotoksik DMBA.....	19
2.4	Organ Hepar	20
2.4.1	Anatomi Hepar.....	21
2.4.2	Sirkulasi	21
2.4.3	Fungsi Hepar.....	22
2.5	Kerusakan Hepar	22
2.6	Malondialdehid (MDA)	23
2.7	Kerangka Konsep	25
2.8	Hipotesis	27
BAB 3.	METODE PENELITIAN	28
3.1	Jenis Penelitian	28
3.2	Rancangan Penelitian	28
3.3	Populasi dan Sampel	30
3.3.1	Populasi.....	30
3.3.2	Sampel	30
3.3.3	Besar Sampel	31
3.4	Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.5	Variabel Penelitian	32
3.5.1	Variabel Bebas	32
3.5.2	Variabel Terikat	32
3.5.3	Variabel Terkendali	32
3.6	Definisi Operasional	32
3.6.1	Ekstrak etanol brokoli	32

3.6.2	Dosis ekstrak etanol brokoli.....	33
3.6.3	Dosis DMBA	34
3.6.4	Malondialdehid hepar tikus.....	34
3.6.5	Hewan coba.....	35
3.7	Alat dan Bahan	35
3.7.1	Alat.....	35
3.7.2	Bahan	36
3.8	Prosedur Kerja	36
3.8.1	Pemilihan Tikus Wistar Jantan	36
3.8.2	Persiapan Tikus Wistar Jantan	36
3.8.3	Pembagian Kelompok Perlakuan	37
3.8.4	Pembuatan Ekstrak Etanol Brokoli.....	37
3.8.5	Penginduksian DMBA	38
3.8.6	Perlakuan Hewan Coba.....	38
3.8.7	Pengambilan Jaringan Hepar	39
3.8.8	Pemeriksaan MDA Hepar Tikus Wistar	39
3.9	Analisis Data	40
3.10	Uji Kelayakan Etik Penelitian.....	40
3.11	Alur Penelitian.....	41
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		42
4.1	Hasil Penelitian.....	42
4.1.1	Ekstraksi Brokoli	42
4.1.2	Perlakuan pada Hewan Coba	42
4.2	Analisis Data	45
4.3	Pembahasan	47
BAB 5. PENUTUP		50
5.1	Kesimpulan	50
5.2	Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....		51

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Nilai gizi per 100 gram Brokoli mentah	8
2.2 Tabel hasil pengamatan kadar flavonoid total dan IC ₅₀	10
2.3 Klasifikasi toksisitas akut	12
2.4 Jenis PAH berbahaya	18
3.1 Pembagian kelompok tikus kontrol dan perlakuan	37
4.1 Rata-rata kadar MDA hepar	43
4.2 Persentase penurunan rata-rata kadar MDA hepar	44
4.3 Hasil LSD kadar MDA hepar.....	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Brokoli (Dalimartha, 2000).....	6
2.2 Struktur umum flavonoid (Neldawati, 2013).....	15
2.3 Reaksi penghambatan peroksidasi lipid (Gordon, 1990).....	16
2.4 Struktur kimia DMBA (Sharma <i>et al.</i> , 2012).....	19
2.5 Permukaan hepar (Ganong, 2006)	21
2.6 Struktur Malondialdehid (Royal Society of Chemistry, 2014).....	23
2.7 Kerangka konseptual penelitian	25
3.1 Skema rancangan penelitian.....	28
3.2 Skema alur perlakuan hewan coba.....	41
4.1 Grafik rata-rata kadar MDA hepar tikus	43
4.2 Grafik persentase penurunan rata-rata kadar MDA hepar tikus	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji Yang Dapat Diberikan Pada Berbagai Hewan.....	58
B. Cara Perhitungan Dosis.....	59
C. Kurva Standar Malondialdehid.....	61
D. Hasil Penelitian.....	62
E. Analisis Data.....	63
F. Gambar Penelitian.....	66
G. Persetujuan Etik Penelitian.....	70

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) adalah kelompok senyawa organik yang terdiri atas beberapa rantai siklik aromatik dan tersebar luas di alam sebagai akibat dari pembakaran material organik yang tidak sempurna (CDC, 2009). Hasil pembakaran yang tidak sempurna tersebut rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal bebas (Fessenden, 1986). Radikal bebas merupakan suatu molekul yang relatif tidak stabil dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada atom orbit terluarnya. Molekul radikal bebas menjadi sangat reaktif dengan mengambil elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut supaya molekulnya tetap stabil (Kumar *et al.*, 2007).

Salah satu senyawa radikal bebas yang merupakan produk degradasi PAH adalah DMBA (*7,12 dimethylbenz[a]anthracene*). Berdasarkan laporan CDC (2009) dalam *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*, paparan PAH termasuk *benz(a)anthracene* terhadap populasi manusia mengalami peningkatan seiring dengan kemajuan industri dalam beberapa tahun terakhir. Benua Asia merupakan penyumbang emisi PAH terbesar yaitu 53,5% dari total emisi PAH global, dimana Indonesia termasuk dalam lima negara dengan jumlah emisi PAH terbesar setelah China, India, Amerika Serikat, dan Nigeria. Fenomena tersebut tidak lepas dari sumber paparan radikal bebas DMBA yang semakin banyak di lingkungan berupa hasil pembakaran yang tidak sempurna, terutama polutan asap kendaraan bermotor, asap rokok, dan asap dapur (Zhang, 2009).

Paparan radikal bebas DMBA secara terus menerus memungkinkan radikal bebas tersebut berikatan dengan sel di dalam tubuh kita. DMBA dimetabolisme oleh hepar dan akan menjadi senyawa yang reaktif setelah mengalami metabolisme, hal ini kemungkinan dapat menyebabkan kerusakan hepar (Conney, 1982). Alur

metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan enzim microsomal hidrolase pada metabolisme fase 1 mengubah DMBA menjadi DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE). DMBA-DE dan senyawa xenobiotik PAH lainnya mengakibatkan pembentukan radikal reaktif yang bersifat destruktif, hepatotoksik, serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan (Gao *et al.*, 2007; Adetyara *et al.*, 2012).

Radikal tersebut bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran sel hepar sehingga menghasilkan peroksidasi lipid yang selanjutnya akan mengubah struktur dan fungsi membran sel hepar berupa meningkatnya permeabilitas membran sel, diikuti oleh influks masif kalsium hingga kematian sel (El Gerbed, 2013; Haki, 2009). Senyawa malondialdehid (MDA) merupakan salah satu produk akhir peroksidasi PUFA di dalam sel. Jumlah MDA dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan sel atau jaringan akibat peningkatan aktivitas peroksidasi lipid (Utari, 2011). MDA merupakan indikator yang baik untuk melihat kecepatan (*rate*) peroksidasi lipid *in vivo* karena diproduksi secara konstan sesuai jumlah peroksidasi lipid yang terbentuk (Mahdi *et al.*, 2007).

Peroksidasi lipid dapat dicegah dengan adanya antioksidan. Pada dasarnya tubuh manusia memiliki sistem pertahanan utama terhadap ROS berupa antioksidan endogen seperti enzim SOD (superoksida dismutase), katalase, dan glutathion peroksidase (Kumar *et al.*, 2007). Namun keberadaan ROS yang berlebihan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang ditandai dengan penurunan antioksidan endogen tersebut (Bhuvanewari *et al.*, 2004). Oleh sebab itu dibutuhkan antioksidan dari luar atau antioksidan eksogen seperti flavonoid, vitamin C, vitamin E, vitamin A, dan lain-lain yang bisa didapat dari buah-buahan dan sayuran (Sie, 2013). Salah satu antioksidan eksogen alami yang telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi yaitu brokoli (*Brassica oleracea L. var italica*).

Brokoli merupakan sayuran yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia karena rasanya yang enak, mudah didapat, dan harganya relatif terjangkau. Selain itu, brokoli memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi dengan komponen antara lain vitamin C dan vitamin E, karotenoid (beta-karoten), dan flavonoid (quercetin dan kaempferol) (Lingga, 2010). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan adalah sebagai *scavenger* (menangkap radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid dan menangkap oksigen radikal) dan menghambat kerja enzim prooksidan antara lain lipoxigenase, myeloperoksidase (Rukmiasih, 2011). Kedua mekanisme antioksidan tersebut membuat flavonoid memiliki efek yaitu menghambat peroksidasi lipid dan menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

Aktivitas antioksidan dalam brokoli diduga mempunyai efek hepatoprotektif yang ditunjukkan pada beberapa penelitian sebelumnya. Penelitian yang dilakukan Al Howriny (2008) membuktikan bahwa pemberian ekstrak brokoli pada tikus yang diinduksi CCl_4 menunjukkan penurunan enzim-enzim hepar (AST, ALT, ALP), kadar bilirubin, dan MDA jaringan hepar tikus secara signifikan serta memperlihatkan efek hepatoprotektif pada pemeriksaan histopatologis. Hashem *et. al.* (2013) pada penelitiannya yang menguji efek ekstrak etanol brokoli terhadap kerusakan hepatosit tikus akibat induksi parasetamol juga menyatakan bahwa aktivitas profilaktik ekstrak etanol brokoli lebih efektif dibandingkan dengan aktivitas terapeutiknya. Sedangkan Bidchol *et. al.* (2010) dalam uji mengenai aktivitas antioksidan pada brokoli dengan metode aktivitas antiradikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) menyatakan bahwa ekstrak etanol brokoli memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi (IC_{50} : 0,44 mg/ml) dibandingkan dengan ekstrak air brokoli (IC_{50} : 2,13 mg/ml).

Namun sampai saat ini, belum ada penelitian yang mengungkap efek ekstrak etanol brokoli sebagai antioksidan yang potensial dalam mencegah kerusakan hepar akibat induksi DMBA dengan indikator kadar MDA hepar tikus. Hal tersebut mendasari penulis untuk melakukan penelitian yang berjudul “Efek Hepatoprotektif

Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea l. var. italica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(α)anthracene)".

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah dikemukakan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea L.var italica*) terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA?

1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea L.var italica*) terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini terbagi menjadi dua, yaitu manfaat ilmiah dan manfaat praktis.

1.4.1. Manfaat Ilmiah

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) dalam mencegah kerusakan hepar tikus wistar akibat induksi DMBA menggunakan indikator kadar MDA hepar, serta menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil dari penelitian ini diharapkan menjadi bahan pertimbangan masyarakat untuk mengkonsumsi brokoli sebagai alternatif pilihan bahan antioksidan alami yang mudah didapat, ekonomis, dan minim efek samping.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*)

Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) merupakan tanaman yang sering digunakan masyarakat sebagai sayuran. Bagian brokoli yang dimakan adalah kepala bunga berwarna hijau yang tersusun rapat seperti cabang pohon dengan batang tebal. Sebagian besar kepala bunga tersebut dikelilingi dedaunan (Dalimartha, 2000).



Gambar 2.1 Brokoli (Dalimartha, 2000)

2.1.1 Klasifikasi

Brokoli dalam taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut.

- Divisi : Magnoliophyta.
- Kelas : Magnoliopsida.
- Ordo : Capparales, Capparidales.
- Family : Cruciferae, Brassicaceae.
- Genus : *Brassica* L.
- Spesies : *Brassica oleracea L. var. italica* (Dalimartha, 2000)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Brokoli berasal dari daerah Laut Tengah dan sudah dibudayakan sejak masa Yunani kuno. Sayuran ini masuk ke Indonesia sekitar tahun 1970-an dan kini cukup populer sebagai bahan pangan. Brokoli dapat diperbanyak dengan biji. Brokoli termasuk sayuran yang tidak tahan terhadap udara panas sehingga cocok ditanam di dataran tinggi yang lembab dengan suhu rendah yaitu di atas 700 mdpl. Sayuran ini juga tidak tahan terhadap hujan yang terus-menerus (Dalimartha, 2000).

2.1.3 Deskripsi dan Jenis Tanaman

Brokoli adalah tanaman yang termasuk dalam suku kubis-kubisan atau *Brassicaceae*. Brokoli memiliki kemiripan dengan bunga kubis, namun brokoli berwarna hijau sedangkan bunga kubis berwarna putih (Amilah, 2012). Perbedaan lainnya adalah masa tumbuh brokoli yang lebih lama dari bunga kubis, susunan bunga-bunga kecil yang berwarna hijau pada brokoli tidak serapat bunga kubis, dan tangkai brokoli yang lebih panjang. Bagian brokoli yang dimakan adalah kepala bunga berwarna hijau yang tersusun rapat seperti cabang pohon dengan batang tebal. Brokoli perlu dimasak selama beberapa menit saja untuk dapat disajikan. Pemasakan yang terlalu lama akan mengurangi khasiat brokoli (Dalimartha, 2000). Ada 3 jenis brokoli yang dikembangkan di seluruh dunia, antara lain:

- a. Brokoli Italia hijau yang banyak ditemui di pasar dengan daun yang besar dan batang yang tebal.
- b. Brokoli Romanesco yang berwarna hijau kekuningan dan bentuk daunnya yang menonjol.
- c. Brokoli yang berwarna ungu dan memiliki daun seperti kembang kol namun lebih kecil. Brokoli jenis ini biasanya dijual di Spanyol, Italia, dan Inggris. (Azeliya, 2013)

2.1.4 Kandungan Gizi dan Komponen Antioksidan

Brokoli mengandung zat gizi berupa air, protein, lemak, karbohidrat, serat, kalsium, zat besi, fosfor, vitamin seperti vitamin A, C, E, riboflavin, dan nikotinamide (Azeliya, 2013). Nilai gizi brokoli dalam 100 gram terdapat pada Tabel 2.1. Sedangkan komponen antioksidan pada brokoli terdiri atas karotenoid dan sejumlah fitokimia. Karotenoid adalah pigmen alami pada brokoli yang terdiri atas klorofil, lutein, dan beta-karoten. Sementara itu, fitokimia yang dimiliki brokoli terdiri atas glucorapharin, sulforaphan, glucobrassicin, indol-3-carbinol, glucoerucin, glucoiberin, asam-D-glutaric, asam caffeic, quercetin dan kaempferol, asam alpha-lipoic, serta lignin (Lingga, 2010).

Tabel 2.1 Nilai gizi per 100 gram Brokoli mentah

Kandungan Gizi	Jumlah
Energi	22,0 kal
Protein	2,10 g
Lemak	0,10 g
Karbohidrat	4,50 g
Kalsium	52,00 mg
Fosfor	54,00 mg
Serat	0,50 g
Besi	0,80 mg
Vitamin A	210,00 RE
Vitamin B1	0,09 mg
Vitamin B2	0,08 mg
Vitamin C	68.00 mg
Niacin	0,50 mg

Sumber: Wirakusumah (2005)

Klorofil merupakan pigmen hijau alami yang sangat aktif dalam mencegah mutasi sel. Dalam kerjanya, klorofil juga dibantu oleh pigmen lain yakni beta-karoten yang dapat menstabilkan radikal bebas serta mengurangi konsentrasi radikal peroksil yang dapat menyebabkan sel bermutasi dan menjadi sel abnormal. Tidak hanya beta-karoten, brokoli juga mengandung pigmen kuning bernama lutein. Para ahli yang melakukan penelitian di *University of Hawaii* membuktikan bahwa lutein yang berasal dari brokoli merupakan komponen anti-kanker yang baik (Lingga, 2010).

Walaupun tidak setajam bawang-bawangan, brokoli juga mengeluarkan aroma sulfur jika dimasak. Bau tersebut muncul dari senyawa isothiocyanate yang bernama sulforaphan. Dalam kerjanya sulforaphan dibantu oleh sianohidroksibutena dan iberin. Fitokimia tersebut bekerja aktif merangsang pembentukan glutathion. Selain sulforaphane yang merupakan glukosinolate bersulfur, brokoli juga mempunyai fitokimia lain yang tidak bersulfur yaitu indole-3-carbinol. Senyawa indole-3-carbinol juga aktif meningkatkan enzim yang berperan sebagai detoksifikasi namun efeknya sedikit lebih lemah dibandingkan dengan sulforaphane (Lingga, 2010). Fitokimia lainnya yaitu senyawa quercetin yang memiliki fungsi untuk mencegah bahaya oksidasi sel, lipid dan DNA oleh radikal bebas (Koh *et al.*, 2009).

Brokoli memiliki kandungan quercetin dan kaempferol yang merupakan salah satu zat aktif flavanoid sebesar 0,03-10,85 mg/100 g dan 0,24-13,20 mg/100 g (Lingga, 2010). Komponen flavonoid memiliki fungsi sebagai *chain breaking antioxidant* atau pemutus reaksi berantai dari radikal bebas (Huang *et al.*, 2002). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan adalah sebagai *scavenger* (menangkap radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid dan menangkap oksigen radikal) dan menghambat kerja enzim prooksidan antara lain lipoxygenase, myeloperoxidase (Rukmiasih, 2011).

Penelitian Lutfita (2012) menyimpulkan bahwa kandungan flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi brokoli hasil maserasi lebih baik dibandingkan dengan hasil refluks. Hasil pengujian ditampilkan pada Tabel 2.2. Uji

aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan vitamin C sebagai pembanding, sedangkan uji kandungan flavonoid total menggunakan metode Ordon dengan quercetin sebagai pembanding. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin besar (Lutfita, 2012).

Tabel 2.2 Tabel hasil pengamatan kadar flavonoid total dan IC_{50}

Pengujian	Kadar Flavonoid Total ($\mu\text{g/ml}$)	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak metode maserasi		
Ekstrak	43.67	3.63
Fraksi air	33.08	8.36
Fraksi etil asetat	21.25	11.78
Fraksi n-heksan	9.75	52.33
Ekstrak metode refluks		
Ekstrak	33.25	33.84
Fraksi air	18.83	43.78
Fraksi etil asetat	11.25	238.95
Fraksi n-heksan	9.33	173.52

Sumber: Lutfita (2012)

2.1.5 Potensi Brokoli sebagai Antioksidan

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dengan metode aktivitas antiradikal bebas DPPH dari ekstrak etanol dan fraksi ekstrak n-heksan, etil asetat serta etanol dari bunga tumbuhan brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) yang dilakukan oleh Silalahi (2010) diperoleh hasil *screening* fitokimia bahwa ekstrak etanol mengandung

senyawa alkaloida, glikosida, steroida/triterpenoida, flavonoida, dan saponin; fraksi ekstrak n-heksan mengandung senyawa steroida/ triterpenoda; fraksi ekstrak etil asetat mengandung senyawa glikosida dan flavonoid; fraksi ekstrak etanol mengandung alkaloida, glikosida, flavonoida, dan saponin. Ekstrak etanol, fraksi ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol berturut-turut memiliki IC_{50} sebesar 131,51 ppm, 255,19 ppm, 260,78 ppm, dan 175,22 ppm pada menit ke-17, sedangkan pada menit ke 40 diperoleh IC_{50} berturut-turut sebesar 124,44 ppm, 248,69 ppm, 253,68 ppm, dan 179,45 ppm. Perbandingan vitamin C memiliki IC_{50} sebesar 26,067 ppm pada menit ke 17 dan 26,17 ppm pada menit ke-40. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga brokoli memiliki aktivitas antioksidan sedang, fraksi ekstrak n-heksan dan etil asetat memiliki aktivitas antioksidan sangat lemah sedangkan fraksi ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan lemah. Bidchol *et. al.* (2010) dalam uji mengenai aktivitas antioksidan pada brokoli dengan metode aktivitas anti-radikal bebas DPPH menyatakan bahwa ekstrak etanolik brokoli memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi (IC_{50} : 0,44 mg/ml) dibandingkan dengan ekstrak air brokoli (IC_{50} : 2,13 mg/ml).

2.1.6 Manfaat Brokoli

Aktivitas antioksidan dalam brokoli diduga mempunyai efek hepatoprotektif yang ditunjukkan pada beberapa penelitian sebelumnya. Penelitian yang dilakukan Al Howriny (2008) membuktikan bahwa pemberian ekstrak brokoli pada tikus yang diinduksi CCl_4 menunjukkan penurunan enzim-enzim hepar (AST, ALT, ALP), kadar bilirubin, dan MDA jaringan hepar tikus secara signifikan serta memperlihatkan efek hepatoprotektif pada pemeriksaan histopatologis. Hashem *et. al.* (2013) pada penelitiannya yang menguji efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli secara per oral dengan dosis 1 g pada tikus wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik menunjukkan adanya efek hepatoprotektif yang ditandai dengan penurunan enzim hepar (SGOT dan SGPT)

yang signifikan, baik protektif maupun kuratif; hasil histopatologi dari penelitian tersebut menyatakan bahwa efek protektif/profilaksis ekstrak brokoli lebih baik dibandingkan dengan efek kuratif.

Penelitian tentang manfaat brokoli lainnya juga telah dilakukan. Brokoli memiliki fungsi sebagai antikanker melalui mekanisme peningkatan produksi enzim fase II detoksifikasi pada kanker hati (Fahey & Talalay, 1999), kanker payudara (Cornblatt *et al.*, 2007), kanker kolon (Fahey *et al.*, 1997), kanker kandung kemih (Munday *et al.*, 2008), kanker prostat (Singh *et al.*, 2005), dan lain sebagainya. Brokoli juga mampu mengeliminasi infeksi *Helicobacter pylori* yang merupakan penyebab utama ulkus dan kanker lambung (Fahey *et al.*, 1997).

2.1.7 Lethal Dose (LD₅₀) Brokoli

Nilai LD₅₀ adalah besarnya dosis dalam satu kali pemberian yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% dari jumlah hewan dalam satu kelompok. LD₅₀ merupakan salah satu cara untuk mengukur potensi toksisitas akut suatu senyawa. Klasifikasi toksisitas akut dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Klasifikasi toksisitas akut

No	Kelas	Dosis (mg/KgBB)
1	Luar biasa toksik	1 atau kurang
2	Sangat toksik	1-50
3	Cukup toksik	50-500
4	Sedikit toksik	500-5000
5	Praktis tidak toksik	5000-15000
6	Relatif kurang Berbahaya	Lebih dari 15000

Sumber: Loomis (1987)

Penelitian Hashem (2013) yang berjudul “*Hepatoprotective activity of Brassica oleracea L. var. Italica*” menyatakan bahwa LD_{50} ekstrak brokoli adalah $>10\text{g/kgBB}$. Uji toksisitas akut ekstrak brokoli secara per oral pada tikus betina (120-150 g) juga menyatakan bahwa pemberian hingga 10 g /kgBB aman dan tidak membunuh salah satu hewan uji. Dengan demikian ekstrak brokoli tergolong praktis tidak toksik berdasarkan pada klasifikasi toksisitas akut oleh Loomis.

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan. Cara kerja senyawa antioksidan adalah bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Utami, 2009).

2.2.1 Jenis Antioksidan

Berdasarkan fungsinya antioksidan dapat dibedakan menjadi beberapa jenis sebagai berikut.

a. Antioksidan primer

Antioksidan ini berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru dengan mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang toksik yaitu sebelum sempat bereaksi. Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GSH-Px). Antioksidan primer merupakan sistem pertahanan enzimatik utama terhadap ROS yang dihasilkan selama metabolisme oksidatif. Pertama, dismutasi dari anion superoksida (O_2^-) ke hidrogen peroksida (H_2O_2) dikatalisasi oleh superoksida dismutase (SOD). Kemudian H_2O_2 dikonversi ke H_2O oleh glutathion peroksidase (GPx) atau katalase (CAT). Kegiatan pertama dan kedua terhadap enzim

antioksidan harus seimbang untuk mencegah kerusakan oksidatif pada sel-sel yang dapat berkontribusi untuk berbagai proses patologis (Kumar *et al.*, 2007).

b. Antioksidan sekunder

Merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar.

c. Antioksidan tersier

Merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Kelompok antioksidan tersier meliputi system enzim DNA *repair* dan metionin sulfoksida reduktase.

d. *Oxygen Scavenger*

Merupakan antioksidan yang berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi.

e. *Chelators atau Sequestrants*

Merupakan senyawa yang mengikat logam sehingga logam tersebut tidak dapat mengkatalisis reaksi oksidasi (Agustin, 2014).

Sedangkan berdasarkan sumber perolehan antioksidan dibedakan menjadi tiga, antara lain sebagai berikut.

a. Antioksidan yang dibuat oleh tubuh sendiri

Berupa enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GSH-Px).

b. Antioksidan alami

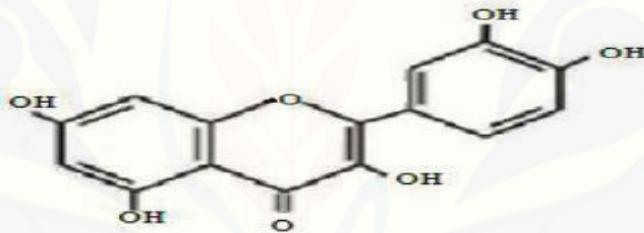
Bisa diperoleh dari hewan dan tumbuhan, yaitu vitamin C, vitamin E, betakaroten, senyawa turunan fenol seperti flavonoid, katekin, tokoferol, dan lainnya.

c. Antioksidan sintetik

Misalnya BHT (Butil Hidroksi Toluen) dan BHA (Butil Hidroksi Anisol) yang merupakan fenol sintetik dan sering digunakan sebagai pengawet (Astutie, 2011).

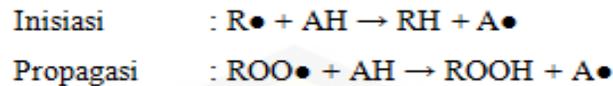
2.2.2 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker. Efek antioksidan flavonoid disebabkan oleh penangkapan radikal bebas (*scavenger*) melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid dan menghambat kerja enzim prooksidan antara lain lipoxygenase, myeloperoxidase (Rukmiasih, 2011). Kedua mekanisme tersebut membuat flavonoid memiliki efek yaitu menghambat peroksidasi lipid dan menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas (Yuhernita dan Juniarti, 2011). Struktur umum flavonoid digambarkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur umum flavonoid (Neldawati, 2013)

Penambahan antioksidan (AH) berupa flavonoid mampu menghambat reaksi peroksidasi lipid pada tahap inisiasi maupun propagasi. Flavonoid memberikan donor atom hidrogen dari gugus hidroksilnya ke radikal lipid ($R\bullet$, $ROO\bullet$) sehingga radikal lipid tersebut bersifat stabil. Hasil reaksi berupa turunan radikal antioksidan ($A\bullet$) memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan dengan radikal lipid. Radikal-radikal antioksidan ($A\bullet$) yang terbentuk pada reaksi tersebut tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain membentuk radikal lipid baru. Kestabilan ini menyebabkan terhentinya reaksi berantai peroksidasi lipid (Gordon, 1990). Reaksi penghambatan tertera pada Gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3 Reaksi penghambatan peroksidasi lipid (Gordon, 1990)

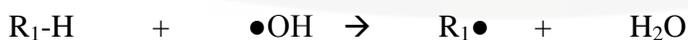
2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut (Kumar *et al.*, 2007). Tiga komponen utama sel yang menjadi target radikal bebas adalah (1) Asam lemak tak jenuh, peroksidasi lipid di membran sel dapat merusak membran sel dengan mengganggu permeabilitas membran dan mengganggu fungsi membran, (2) Protein, kerusakan protein akibat radikal bebas dapat mengganggu aktivitas enzim dan fungsi struktur protein, (3) DNA, kerusakan dapat menyebabkan kematian sel. Dari ketiga molekul tersebut yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh (Sarma, 2010).

Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom ($\text{R}\bullet$). ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* ($\text{O}_2\bullet$), *hydroxyl radicals* ($\text{OH}\bullet$), dan *peroxyl radicals* ($\text{RO}_2\bullet$). Yang non-radikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* (ROOH) (Halliwell and Gutteridge, 2007). Tahapan reaksi pembentukan radikal bebas melalui tiga tahapan sebagai berikut.

a. Tahap inisiasi

Tahap inisiasi adalah tahap awal pembentukan radikal bebas.



b. Tahap propagasi

Tahap propagasi adalah pemanjangan rantai radikal bebas.



c. Tahap terminasi

Tahap terminasi adalah bereaksinya senyawa radikal bebas dengan radikal bebas yang lain atau dengan penangkap radikal bebas sehingga potensi propagasinya rendah.



Kerja radikal bebas dapat dihambat dengan tiga cara, yaitu (1) mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru (2) menginaktivasi atau menangkap radikal bebas dengan pemutusan rantai (3) memperbaiki kerusakan radikal bebas (Agustin, 2014). Sebagai antioksidan, flavonoid bekerja menghambat radikal bebas dengan cara menginaktivasi atau menangkap radikal bebas dengan pemutusan rantai yaitu dengan cara melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid sehingga menghasilkan radikal stabil (Neldawati, 2013).

2.3.1 Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH)

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) adalah kelompok senyawa organik yang terdiri atas beberapa rantai siklik aromatik dan tersebar luas di alam sebagai akibat dari pembakaran material organik yang tidak sempurna (CDC, 2009). Hasil pembakaran yang tidak sempurna tersebut rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal bebas (Fessenden, 1986). PAH merupakan senyawa hidrofobik dengan kelarutan dalam air rendah sehingga memiliki kecenderungan besar untuk berikatan dengan partikel bahan organik padat dan membentuk mikropolutan rekalsitran di lingkungan.

Semakin tinggi berat molekul PAH maka semakin hidrofobik, toksik, dan resisten (Bamforth & Singleton, 2005). Jenis PAH yang berbahaya dimuat dalam Tabel 2.4 berikut ini.

Tabel 2.4 Jenis PAH berbahaya

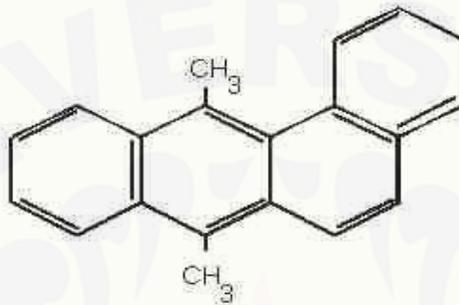
Jenis PAH	Formula	Berat Molekul
Naphthalene	$C_{10}H_8$	128
Acenaphthylene	$C_{12}H_8$	152
Acenaphthene	$C_{12}H_{10}$	154
Fluorene	$C_{13}H_{10}$	166
Phenanthrene	$C_{14}H_{10}$	178
Anthracene	$C_{14}H_{10}$	178
Pyrene	$C_{16}H_{10}$	202
Fluoranthene	$C_{16}H_{10}$	202
Benzo[a]anthracene	$C_{18}H_{12}$	228
Chrysene	$C_{18}H_{12}$	228
Benzo[b]fluoranthene	$C_{20}H_{12}$	252
Benzo[k]fluoranthene	$C_{20}H_{12}$	252
Benzo[a]pyrene	$C_{20}H_{12}$	252
Dibenzo[a,h]anthracene	$C_{22}H_{14}$	278
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	$C_{22}H_{12}$	276
Benzo[g,h,i]perylene	$C_{22}H_{12}$	276

Sumber: Haritash & Kaushik (2009)

2.3.2 Radikal Bebas DMBA

DMBA merupakan salah satu senyawa prototype dari PAH. DMBA merupakan polutan lingkungan dan produk pirolisis minyak bumi serta material

biologi. Sumber paparan DMBA yakni hasil pembakaran tidak sempurna, terutama asap rokok, asap kendaraan, dan asap dapur. Struktur kimia DMBA memiliki 4 cincin aromatik yang berikatan, khas struktur PAH dengan tiga atau lebih cincin aromatik dan 2 substituen metal (Sharma *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Struktur kimia DMBA (Sharma *et al.*, 2012)

2.3.3 Mekanisme Hepatotoksik DMBA

Paparan radikal bebas DMBA secara terus menerus memungkinkan radikal bebas tersebut berikatan dengan sel di dalam tubuh kita. DMBA dimetabolisme oleh hepar dan akan menjadi senyawa yang reaktif setelah mengalami metabolisme, hal ini kemungkinan dapat menyebabkan kerusakan hepar (Conney, 1982). DMBA merupakan karsinogen sekunder (prokarsinogen) sehingga harus mengalami aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogen aktif. Proses metabolisme menghasilkan DMBA menjadi senyawa yang lebih toksik. Alur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan enzim mikrosomal hidrolase pada metabolisme fase 1 mengubah DMBA menjadi DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE). DMBA-DE dan senyawa xenobiotik PAH lainnya mengakibatkan pembentukan radikal reaktif yang bersifat destruktif, hepatotoksik serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan (Gao *et al.*, 2007; Adetyara *et al.*, 2012).

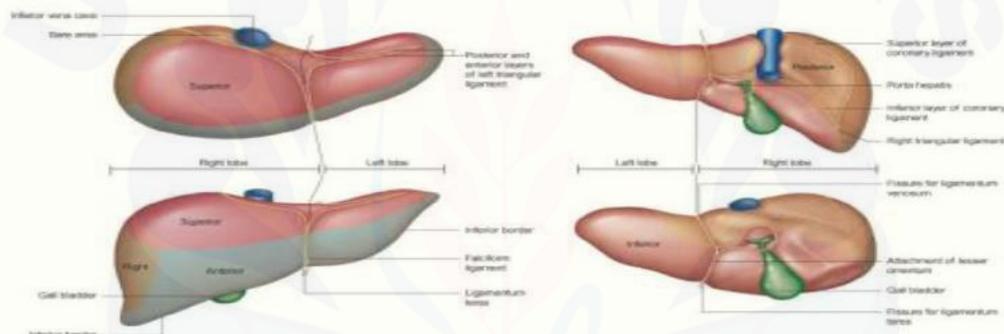
Radikal bebas tersebut mengoksidasi dan menyerang komponen lipid membran sel hepar. Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) (Winarsi, 2007). Fosfolipid dan glikolipid merupakan *lipid bilayer membrane* yang mengandung asam lemak tak jenuh dan rentan teroksidasi sehingga menimbulkan reaksi berantai yang disebut peroksidasi lipid (Panut, 2012). Peroksidasi lipid merupakan suatu rangkaian proses yang terdiri atas 3 tahapan, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Produk oksidasi lemak yang diinduksi oleh stres oksidatif akan membentuk radikal bebas oksigen, salah satunya adalah MDA. Peroksidasi lipid selanjutnya akan mengubah struktur dan fungsi membran sel hepar berupa meningkatnya permeabilitas membran sel, diikuti oleh influks masif kalsium hingga kematian sel (El Gerbed, 2013; Haki, 2009). Hasil penelitian Dakrory *et al.* (2015) menunjukkan bahwa induksi DMBA dosis 15 mg/kgBB yang diberikan pada hari ke-8 dan diterminasi pada hari ke-12 menyebabkan peningkatan kadar MDA menjadi $3,44 \pm 0,07$ nmol/g jaringan hepar dari kelompok normal ($3,24 \pm 0,04$ nmol/g jaringan hepar).

2.4 Organ Hepar

Hepar merupakan pusat metabolisme dan detoksifikasi. Hepar sering menjadi organ sasaran karena sebagian besar toksik/xenobiotik masuk ke tubuh melalui sistem gastrointestinal dan setelah diserap toksisikan dibawa oleh vena porta ke hepar. Hepar memiliki banyak tempat pengikatan untuk senyawa-senyawa xenobiotik. Kadar enzim yang memetabolisme xenobiotik dalam hepar juga tinggi (terutama sitokrom P450). Hal ini membuat toksik dapat diubah menjadi lebih reaktif atau bisa juga diubah menjadi kurang toksik (Joniada, 2011).

2.4.1 Anatomi Hepar

Hepar adalah kelenjar terbesar dalam tubuh, berat rata-rata sekitar 1500 gr atau 2% berat badan orang dewasa normal. Hepar merupakan organ lunak yang lentur dan tercetak oleh struktur sekitarnya. Secara anatomis, hepar terdiri atas dua lobus besar yaitu lobus kanan dan kiri, lobus kanan lebih besar dari lobus kiri. Sebagian besar posisi hepar terdapat pada daerah hipokondrium kanan dan memanjang ke daerah epigastrium. Hepar dikelilingi oleh *cavum thoraks* sehingga pada orang normal tidak dapat dipalpasi (bila teraba berarti ada pembesaran hepar) (Ganong, 2006).



Gambar 2.5 Permukaan hepar (Ganong, 2006)

2.4.2 Sirkulasi

Hepar mendapat vaskularisasi ganda, yaitu melalui vena porta dan arteri hepatica. Darah yang berasal dari saluran pencernaan dan organ abdomen termasuk limpa, pancreas dan kantung empedu masuk melalui vena porta. Darah yang masuk mengandung berbagai nutrisi yang baru diserap dan siap untuk diproses lebih lanjut oleh hepar. Selain nutrisi, pembuluh darah porta dapat menjadi jalan masuk untuk berbagai mikroorganisme dan toksin yang harus diolah, dihancurkan atau juga disimpan. Sebanyak 75-80 % darah pada organ hepar berasal dari vena porta sedangkan dari arteri hepatica mengalir sekitar 20-25 % darah yang kaya akan oksigen.

2.4.3 Fungsi Hepar

Fungsi hepar yang utama adalah melakukan detoksifikasi untuk menghindari terjadinya kerusakan seluler akibat adanya racun. Hal ini disebabkan hepar menerima suplai darah sekitar 80 % dari vena porta yang mengalir dari saluran pencernaan. Bahan-bahan toksik dari saluran cerna seperti berasal dari bahan-bahan kimia akan diabsorpsi ke dalam pembuluh darah portal dan ditransfer ke hepar. Fungsi detoksifikasi sangat penting dan dilakukan oleh enzim hepar melalui oksidasi, reduksi, hidrolisis, atau konjugasi zat-zat yang dapat berbahaya dan mengubahnya menjadi zat yang secara fisiologis tidak aktif (Megawati, 2013). Selain itu, hepar berfungsi untuk mensekresi empedu, metabolisme berbagai macam nutrisi, tempat penyimpanan lemak, karbohidrat, protein yang dapat didaur ulang untuk digunakan ketika terjadi keadaan kekurangan asupan makanan dan penyimpanan vitamin (Megawati, 2013).

2.5 Kerusakan Hepar

Hepar merupakan organ yang menjadi sasaran senyawa toksik. Ada beberapa faktor yang mempengaruhinya. Pertama, sebagian besar xenobiotik masuk ke dalam tubuh lewat saluran pencernaan, diabsorpsi dan kemudian disalurkan ke hepar lewat vena porta hepatic. Oleh karena itu, hepar merupakan organ yang pertama kali terpapar oleh senyawa yang telah diabsorpsi oleh usus. Kedua, tingginya kadar enzim yang memetabolisme xenobiotik di hepar terutama enzim CYP450. Ketiga, proses pembentukan empedu dan perpindahan empedu beserta xenobiotik ke saluran cerna. Xenobiotik dan empedu yang dilepas di usus akan diabsorpsi kembali dan disalurkan ke hepar yang menyebabkan meningkatnya konsentrasi xenobiotik di hepatosit (Wisnuaji, 2012).

Kerusakan sel hepar dapat diakibatkan oleh berbagai mekanisme seperti inhibisi enzim, penurunan ATP, interaksi dengan reseptor, peningkatan kadar kalsium intraseluler, pembentukan metabolit yang reaktif dan perubahan membrane sel.

Akhir-akhir ini perhatian mulai terfokus pada peran biotransformasi yang mengubah senyawa menjadi metabolit reaktif yang dapat menyebabkan kerusakan hepar. Metabolit reaktif dapat berikatan kovalen dengan makromolekul seluler dan dapat mengubah sifatnya. Pembentukan metabolit reaktif dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu lebih tingginya senyawa pengoksidasi daripada senyawa antioksidan di dalam sel. Senyawa pengoksidasi yang berinteraksi dengan makromolekul dapat menyebabkan kerusakan sel (Wisnuaji, 2012).

2.6 Malondialdehid (MDA)

MDA adalah senyawa dialdehyde yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Oleh sebab itu, terjadinya reaksi peroksidasi lipid akan meningkatkan produksi senyawa MDA dalam sel (Winarsi, 2007). MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Jumlah MDA dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan sel atau jaringan akibat peningkatan aktivitas peroksidasi lipid (Utari, 2011).



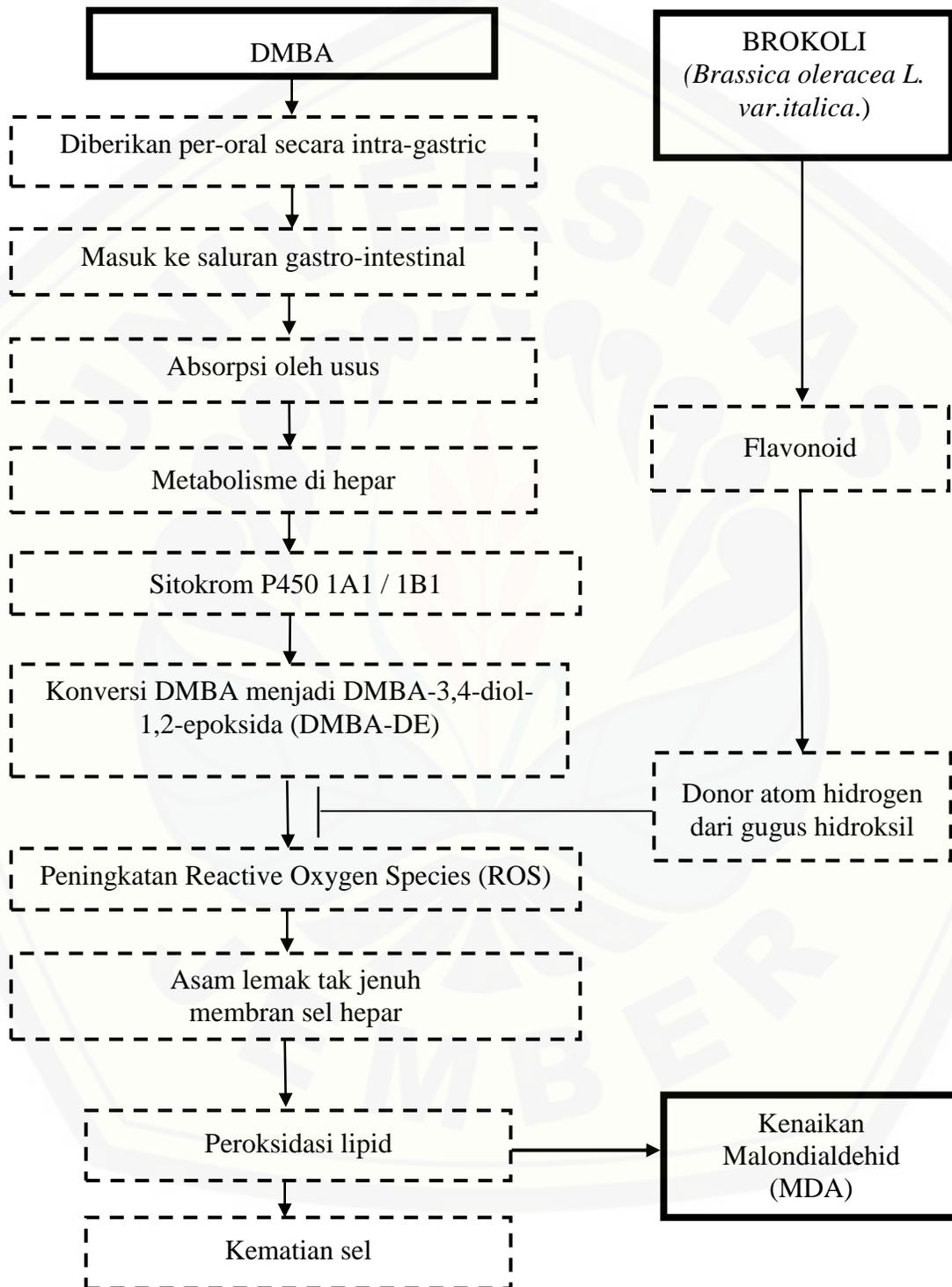
Gambar 2.6 Struktur Malondialdehid (Royal Society of Chemistry, 2014)

MDA merupakan indikator yang baik untuk melihat kecepatan (*rate*) peroksidasi lipid *in vivo* (Mahdi *et.al*, 2007). Tingginya kadar MDA dipengaruhi oleh kadar peroksidasi lipid yang secara tidak langsung juga menunjukkan tingginya jumlah radikal bebas (Sutari, 2013). Keunggulan pemeriksaan MDA dibandingkan produk peroksidasi lipid yang lain adalah signifikan akurat, stabil daripada senyawa lainnya dan sangat cocok sebagai biomarker untuk stres oksidatif karena beberapa alasan, yaitu: (1) pembentukan MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, (2) kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang telah tersedia, (3)

bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, (4) pengukurannya tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan tidak dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet, (5) merupakan produk spesifik dari peroksidasi lemak, dan (6) terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Swastika, 2013).



2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan

- : Merangsang
—| : Menghambat
▭ : Diteliti
▭ (terputus) : Tidak diteliti

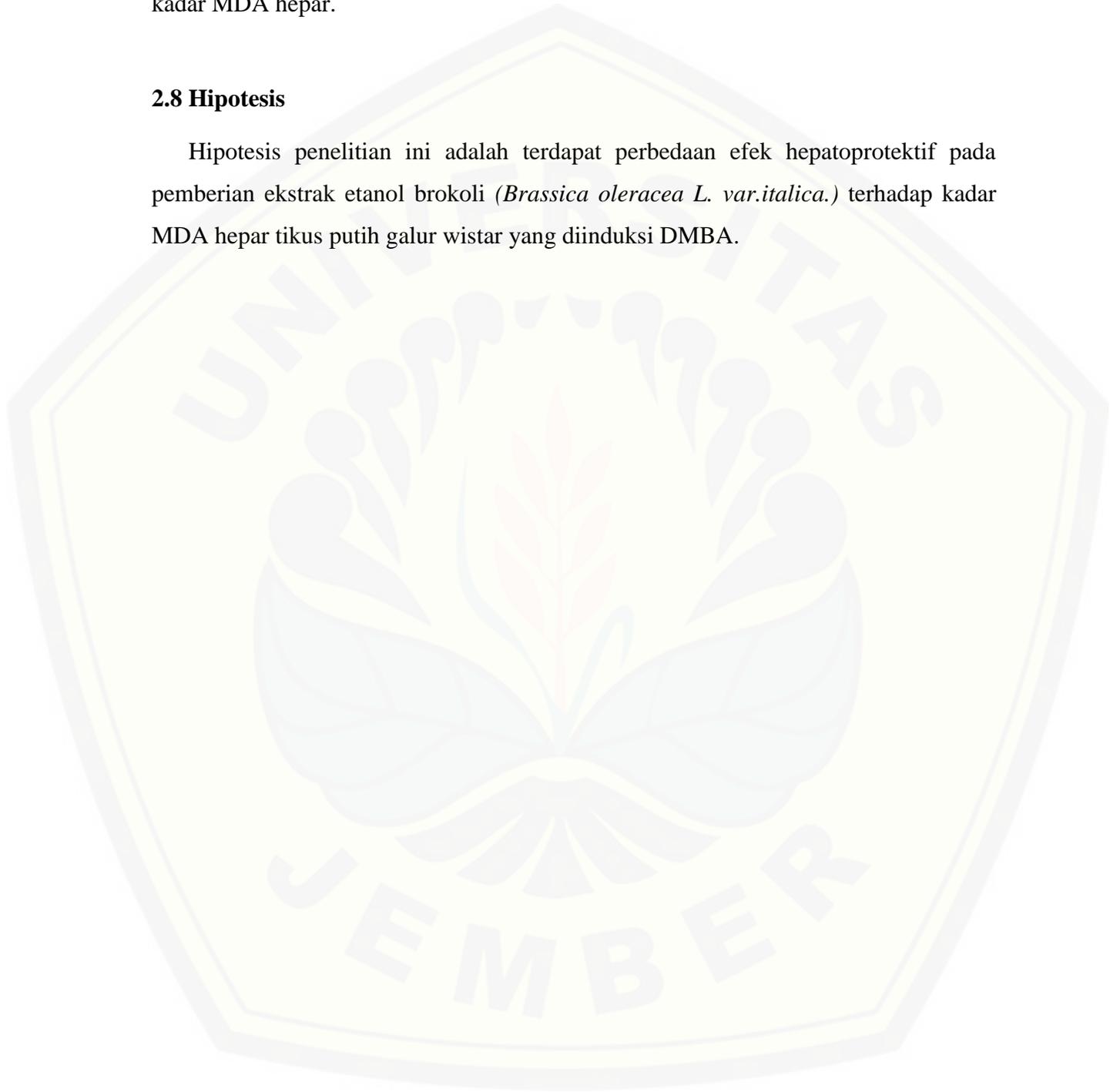
DMBA sebagai radikal bebas diberikan per-oral secara intra gastric, kemudian masuk ke saluran gastro-intestinal dan diabsorpsi oleh usus. Setelah itu, DMBA akan dibawa oleh vena porta masuk ke dalam hepar dan dimetabolisme oleh hepar melalui jalur sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan enzim microsomal hidrolase pada metabolisme fase 1 mengubah DMBA menjadi DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE). DMBA-DE dan senyawa xenobiotik PAH lainnya mengakibatkan pembentukan radikal reaktif yang bersifat destruktif, hepatotoksik serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan. Radikal tersebut bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran sel hepar sehingga menghasilkan peroksidasi lipid yang selanjutnya akan mengubah struktur dan fungsi membran sel berupa meningkatnya permeabilitas membran, diikuti oleh influks masif kalsium hingga kematian sel. Reaksi peroksidasi lipid membran sel hepar akan meningkatkan produksi senyawa MDA dalam sel hepar. MDA adalah salah satu produk akhir peroksidasi PUFA di dalam sel dan merupakan indikator yang baik untuk melihat kecepatan (*rate*) peroksidasi lipid in vivo karena diproduksi secara konstan sesuai jumlah peroksidasi lipid yang terbentuk.

Proses peroksidasi lipid ini dapat dicegah dengan cara memberikan antioksidan alami yaitu brokoli. Kandungan brokoli yang berperan sebagai antioksidan adalah flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan yaitu dengan memberikan atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid ke radikal lipid, menghasilkan radikal stabil dan tidak reaktif sehingga proses peroksidasi lipid tidak terjadi atau dapat

dikurangi. Dengan berkurangnya peroksidasi lipid diharapkan terjadi penurunan kadar MDA hepar.

2.8 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea L. var.italica.*) terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA.



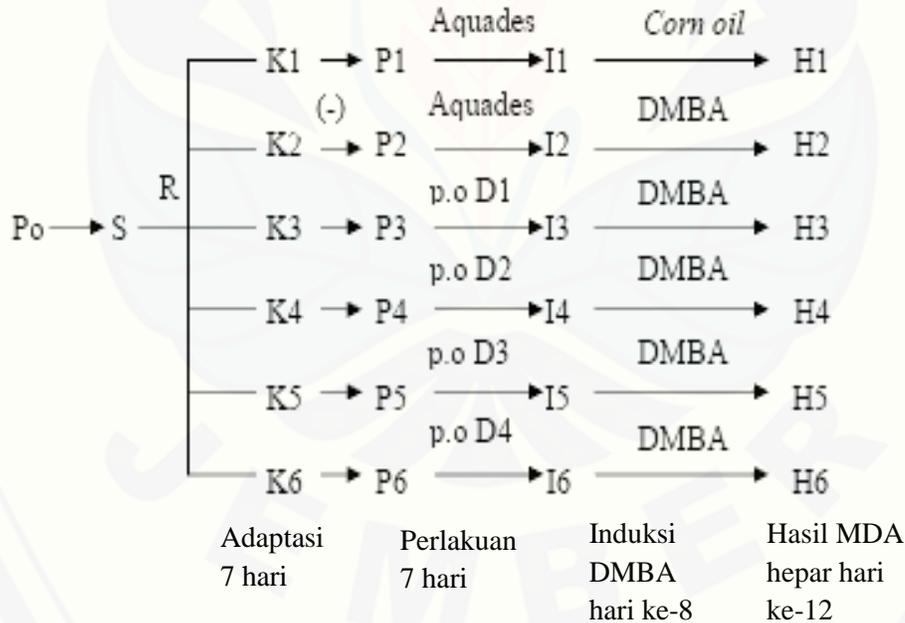
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *true experimental* karena peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Jenis penelitian *true eksperimental* yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design* yang merupakan penelitian eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*), namun hanya dilakukan pengukuran akhir (*posttest*).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

- Po : Populasi dari hewan coba
- S : Sampel dari hewan coba
- R : Proses randomisasi
- p.o : Pemberian per oral
- D1 : Ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB
- D2 : Ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/kgBB
- D3 : Ekstrak etanol brokoli dosis 1000 mg/kgBB
- D4 : Ekstrak etanol brokoli dosis 2000 mg/kgBB
- K1 : Kelompok kontrol normal dengan pemberian aquades dan *corn oil*
- K2 : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian aquades dan DMBA
- K3 : Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 250 mg/kgBB dan DMBA
- K4 : Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 500 mg/kgBB dan DMBA
- K5 : Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 1000 mg/kgBB dan DMBA
- K6 : Kelompok perlakuan 4 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 2000 mg/kgBB dan DMBA
- P1 : Diberikan perlakuan dengan pemberian aquades selama 7 hari
- P2 : Diberikan perlakuan dengan pemberian aquades selama 7 hari
- P3 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 250 mg/kgBB selama 7 hari

- P4 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 500 mg/kgBB selama 7 hari
- P5 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 1000 mg/kgBB selama 7 hari
- P6 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 2000 mg/kgBB selama 7 hari
- I1 : Induksi kelompok kontrol normal dengan pemberian *corn oil* pada hari ke-8
- I2 : Induksi kelompok kontrol negatif dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I3 : Induksi kelompok perlakuan 1 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I4 : Induksi kelompok perlakuan 2 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I5 : Induksi kelompok perlakuan 3 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I6 : Induksi kelompok perlakuan 4 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- H1-6 : Pengambilan sampel jaringan hepar pada hari ke-12 untuk analisis kadar MDA hepar

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan yang diperoleh dari peternak tikus yang ada di Malang.

3.3.2 Sampel

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan untuk membuat homogen sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah sebagai berikut.

- a. *Rattus norvegicus* galur wistar jantan.
- b. Berbulu putih dan sehat (bergerak aktif).

c. Umur 2-3 bulan.

d. Berat 100-200 gram.

Sedangkan kriteria eksklusi sampel penelitian adalah tikus yang sakit atau mati sebelum proses randomisasi.

3.3.3 Besar Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok. Penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial secara sederhana untuk estimasi jumlah pengulangan atau besar sampel dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (1963) sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

n: jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t: jumlah kelompok perlakuan

Besar sampel yang dibutuhkan berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas minimal sebanyak 4 ekor tikus pada masing-masing kelompok. Jadi, dalam penelitian ini jumlah sampel yang digunakan untuk 6 kelompok adalah 24 ekor tikus.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk perawatan tikus, penyondean ekstrak etanol brokoli dan pembedahan tikus. Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember

untuk pembuatan ekstrak etanol brokoli. Laboratorium Biokimia & Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeriksaan kadar MDA hepar tikus putih galur wistar. Waktu penelitian ini dilakukan bulan Oktober hingga November 2015.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol brokoli.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA hepar tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*).

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Umur tikus yaitu 2-3 bulan.
- b. Jenis kelamin jantan dan galur hewan coba yaitu *Rattus norvegicus* galur wistar.
- c. Berat badan tikus 100-200 gram.
- d. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
- e. Lama perlakuan hewan coba.
- f. Dosis dan frekuensi pemberian DMBA.
- g. Frekuensi pemberian ekstrak etanol brokoli.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Ekstrak etanol brokoli

Ekstrak etanol brokoli adalah hasil ekstraksi brokoli dengan pelarut etanol 70% melalui metode maserasi. Brokoli yang digunakan adalah bagian bunga brokoli segar yang diperoleh dari Pasar Tanjung Kabupaten Jember. Serbuk brokoli

dimaserasi selama 48 jam, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstraksi brokoli menggunakan pelarut etanol 70% karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun beberapa senyawa non polar, lebih selektif, tidak beracun, netral dan absorpsinya baik. Selain itu ekstrak etanol bunga brokoli memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi jika dibandingkan ekstrak air, fraksi ekstrak n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi ekstrak etanol (Bidchol *et al.*, 2010; Silalahi, 2010).

Metode yang digunakan dalam proses ekstraksi brokoli yaitu maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut oleh karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel sehingga larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Sie, 2013). Kelebihan metode maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, mudah diusahakan dan senyawa yang terdapat dalam simplisia tetap stabil karena umumnya tidak menggunakan suhu tinggi (Sie, 2013).

3.6.2 Dosis ekstrak etanol brokoli

Dosis ekstrak etanol brokoli yang digunakan yaitu 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB tikus. Ekstrak etanol brokoli diberikan setiap hari selama 7 hari secara per oral menggunakan sonde dengan pelarut aquades. Dosis ini merujuk pada hasil penelitian Hashem *et al.* (2013) bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dengan dosis tersebut pada tikus wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik menunjukkan efek hepatoprotektif ditandai dengan penurunan enzim hepar (SGOT dan SGPT) yang signifikan, baik protektif

maupun kuratif; hasil histopatologi dari penelitian tersebut menyatakan bahwa efek protektif/profilaksis ekstrak brokoli lebih baik dibandingkan dengan efek kuratif.

3.6.3 Dosis DMBA

DMBA diperoleh dari *Sigma Aldrich* (USA). Dosis DMBA yang digunakan adalah 15 mg/kgBB tikus dilarutkan dalam *corn oil* sebanyak 1 ml. Dosis tersebut merujuk pada penelitian Rahardhian (2015) bahwa pemberian DMBA dosis 15 mg/kgBB pada tikus dapat menimbulkan kerusakan hepar yang ditandai dengan peningkatan aktivitas SGPT, SGOT dan ALP secara signifikan. DMBA diberikan *single dose* pada hari ke-8 setelah pemberian proteksi ekstrak etanol brokoli selama 7 hari. Induksi DMBA dilakukan secara per oral menggunakan sonde intra gastric. Estimasi waktu DMBA mampu bekerja sebagai hepatotoksik adalah 4 hari (Dakrory *et al*, 2015).

3.6.4 Malondialdehid hepar tikus

Malondialdehid merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid yang telah digunakan secara luas sebagai indikator kerusakan oksidatif, terutama dari asam lemak tidak jenuh. Pemeriksaan malondialdehid yang dilakukan menggunakan MDA *ELISA kit*. Metode yang digunakan adalah kompetitif *ELISA*. Prinsip pemeriksaanya yaitu MDA di dalam sampel akan berkompetisi untuk berikatan dengan antibodi spesifik untuk MDA. Kemudian ditambahkan enzim, dimana enzim akan bereaksi bila ditambahkan substrat. Reaksi tersebut dapat menimbulkan perubahan warna yaitu menjadi warna biru. Reaksi enzim-substrat dihentikan dengan menambahkan *stop solution* sehingga warna akan berubah menjadi kuning. Kemudian diukur menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

3.6.5 Hewan coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan yang berbulu putih dan sehat (bergerak aktif). Tikus yang digunakan berumur 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram. Adaptasi hewan coba dilakukan sebelum penelitian dimulai. Kandang untuk pemeliharaan hewan coba terbuat dari plastik dengan penutup kawat yang sudah dicat agar tidak berkarat. Alas kandang berupa sekam kayu yang diganti tiap dua hari sekali. Kandang tikus dilengkapi dengan tempat minum, makanan standar, dan pencahayaan yang cukup. Suhu ruangan harus terhindar dari sinar matahari langsung. Suasana tempat hewan coba harus tenang supaya hewan coba terhindar dari stress akibat lingkungan yang kurang kondusif.

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus wistar adalah bak plastik, penutup kawat, botol minum, tempat makan, label, dan timbangan.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak etanol brokoli adalah blender, ayakan 30 mesh, timbangan, pengaduk, toples, labu erlenmeyer, dan *rotary evaporator*.
- c. Alat untuk menyonde ekstrak etanol brokoli adalah handscoon, masker, gelas beaker, pengaduk, dan spuit sonde.
- d. Alat untuk menginduksi DMBA adalah handscoon, masker, gelas beaker, pengaduk, dan spuit sonde.
- e. Alat untuk pengambilan jaringan hepar tikus adalah handscoon, toples, kapas, papan fiksasi, minor set, scalpel, pinset, mortar, timbangan, dan eppendorf.
- f. Alat untuk pemeriksaan MDA hepar tikus adalah eppendorf, rak eppendorf, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, mikropipet, vortex, *sentrifuge*, inkubator, dan *ELISA reader*.

3.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Bahan untuk pemeliharaan tikus adalah pakan standar, minuman dan sekam.
- b. Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol brokoli adalah brokoli segar dan etanol 70%.
- c. Bahan untuk menyonde adalah DMBA dan ekstrak etanol brokoli.
- d. Bahan untuk pengambilan jaringan hepar tikus adalah eter, larutan PBS, dan *dry ice*.
- e. Bahan untuk pemeriksaan MDA hepar tikus adalah hepar tikus, aquabides, dan MDA *ELISA kit*.

3.8 Prosedur Kerja

3.8.1 Pemilihan Tikus Wistar Jantan

Jumlah hewan coba adalah 24 ekor tikus wistar jantan dibagi menjadi 6 kelompok. Pemilihan hewan coba yang dijadikan sampel tiap kelompok perlakuan harus sesuai dengan kriteria inklusi dari penelitian ini yaitu berjenis kelamin jantan yang sehat (bergerak aktif), berbulu putih dengan berat badan 100-200 gram dan umur \pm 2-3 bulan. Sedangkan kriteria eksklusi hewan coba pada penelitian ini tikus yang sakit dan mati.

3.8.2 Persiapan Tikus Wistar Jantan

Sebelum perlakuan, tikus diadaptasi pada kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan baru. Alas kandang berupa sekam kayu yang diganti tiap dua hari sekali. Tikus diberi makanan standar dan diberi aquades *ad libitum*. Lingkungan tempat tinggal dibuat tenang dan terhindar dari sinar matahari langsung.

3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Terdapat 6 kelompok perlakuan yang terdiri atas kelompok kontrol normal dan kontrol negatif, serta 4 kelompok perlakuan dosis, masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor tikus. Pembagian kelompok dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok tikus kontrol dan perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kelompok 1 (Kontrol normal)	Diberikan aquades selama 7 hari dan <i>corn oil</i> pada hari ke-8
Kelompok 2 (Kontrol negatif)	Diberikan aquades selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8
Kelompok 3 (Perlakuan 1)	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8
Kelompok 4 (Perlakuan 2)	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8
Kelompok 5 (Perlakuan 3)	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 1000 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8
Kelompok 6 (Perlakuan 4)	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 2000 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8

3.8.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Brokoli

Bunga brokoli dipisahkan dari bagian tangkainya dan diiris tipis, kemudian dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Brokoli yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak menggunakan mesh hingga didapatkan serbuk yang halus dan ditimbang. 250 gram serbuk brokoli halus dimaserasi selama 48 jam dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Selanjutnya, ekstrak ditampung di labu erlenmeyer kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 25-30°C (Morsy *et al*, 2010).

3.8.5 Penginduksian DMBA

Penginduksian DMBA dilakukan pada semua kelompok penelitian kecuali kelompok kontrol normal. DMBA diberikan secara per oral menggunakan sonde intra gastric dengan dosis 15 mg/kgBB dilarutkan dalam *corn oil* sebanyak 1 ml. DMBA hanya diberikan 1 kali yaitu pada hari ke-8. Estimasi waktu DMBA mampu bekerja sebagai hepatotoksik adalah 4 hari, sehingga pengambilan sampel jaringan hepar untuk mengukur kadar MDA hepar dilakukan pada hari ke-12.

3.8.6 Perlakuan Hewan Coba

Sejumlah 24 ekor tikus ditempatkan di dalam kandang dengan diberi makan standar dan minuman. Setelah tikus diadaptasikan selama 1 minggu, tikus dibagi menjadi 6 kelompok, terdiri atas 4 ekor tikus yang dipilih secara acak. Tikus-tikus tersebut diberi perlakuan selama 7 hari dengan pembagian sebagai berikut.

- a. Kelompok 1 : tikus diberi aquades selama 7 hari dan *corn oil* pada hari ke-8.
- b. Kelompok 2 : tikus diberi aquades selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8.
- c. Kelompok 3 : tikus diberi ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8.
- d. Kelompok 4 : tikus diberi ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8.
- e. Kelompok 5 : tikus diberi ekstrak etanol brokoli dosis 1000 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8.
- f. Kelompok 6 : tikus diberi ekstrak etanol brokoli dosis 2000 mg/kgBB selama 7 hari dan DMBA 15 mg/kgBB pada hari ke-8.

3.8.7 Pengambilan Jaringan Hepar

Pada hari ke-12 dilakukan euthanasia tikus. Tikus dimasukkan ke dalam gelas beaker, lalu dimasukkan kapas yang ditetesi eter ke dalamnya. Gelas beaker ditutup agar eter tidak menguap dan ditunggu beberapa saat hingga tikus tersebut pingsan (Noorrafiqi, 2013). Setelah tikus pingsan, tikus difiksasi di atas tempat pembedahan menggunakan jarum kecil pada kedua tangan serta kedua kakinya. Setelah tikus terfiksasi dengan baik, dilakukan pembedahan dengan gunting bedah tajam dari arah perut bawah menuju ke bagian dada dengan hati-hati sehingga tidak mengenai organ dan pembuluh darah besar. Setelah pengambilan sampel, bagian hewan coba yang tidak dipakai dikremasi.

Jaringan hepar dicuci bersih menggunakan larutan PBS dingin untuk menghilangkan kelebihan darah, ditimbang, dan diambil sebanyak 0,5 gram. Sampel dipotong kecil-kecil, dimasukkan ke dalam eppendorf, kemudian ditambahkan larutan PBS hingga mencapai volume 1 ml. Sampel di vortex selama 2 menit dengan 3 kali pengulangan supaya homogen. Homogenat jaringan hepar sebanyak 1 ml selanjutnya di *sentrifuge* dengan kecepatan 5000 g selama 5 menit. Supernatan diambil untuk analisis kadar MDA (Elabscience, 2014).

3.8.8 Pemeriksaan MDA Hepar Tikus Wistar

Pemeriksaan kadar MDA hepar dilakukan setelah proses preparasi homogenat jaringan fhepar pada semua sampel hewan coba. Pemeriksaan dilakukan di laboratorium Biokimia dan Biomolekular FK UJ. Reagen yang terdapat dalam kit meliputi *wash buffer*, larutan MDA standar, *standard & sample diluent*, *biotinylated detection Ab*, *detection Ab diluent*, *HRP conjugate*, *HRP conjugate diluent*, dan larutan substrat. Mekanisme pemeriksaan MDA yaitu: (1) menambahkan 50 μ L standar, sampel, dan blanko pada tiap lubang *microplate*, (2) menambahkan 50 μ L *biotinylated detection Ab* pada tiap lubang *microplate*, (3) inkubasi pada suhu 37 ° C selama 45 menit, (4) mencuci menggunakan *wash buffer* sebanyak 3 kali, (5)

menambahkan 100 μL HRP conjugate pada tiap lubang *microplate*, (6) inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit, (7) mencuci menggunakan *wash buffer* sebanyak 5 kali, (8) menambahkan 90 μL reagen substrat pada tiap lubang *microplate*, (9) inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan warna akan berubah menjadi biru, (10) menambahkan 50 μL larutan stop dan warna akan segera berubah menjadi kuning, (11) melakukan pembacaan absorbansi menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm, (12) menghitung konsentrasi MDA (Elabscience, 2014).

3.9 Analisis Data

Analisis data secara statistik pada penelitian ini menggunakan statistik parametrik. Statistik parametrik yang dipilih adalah uji statistik *One Way Anova* karena variabel penelitian ini bebas dan tidak berpasangan, serta jumlah perlakuan lebih dari 2. Sebelum dilakukan uji tersebut, dilakukan uji normalitas dan homogenitas varian dengan $p > 0,05$ terlebih dahulu. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan varian datanya homogen, maka dilanjutkan uji *One Way Anova* ($p < 0,05$). Jika data yang diperoleh terdapat perbedaan nyata pada, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significantly Different*) ($p < 0,05$). Jika syarat uji *One Way Anova* tidak terpenuhi ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* dan selanjutnya uji *Mann Whitney*.

3.10 Uji Kelayakan Etik Penelitian

Penelitian ini sudah mendapat persetujuan dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada tanggal 19 Oktober 2015.